Утверждаю
Руководитель Федеральной
службы по надзору в сфере
защиты прав потребителей
и благополучия человека,
Главный государственный
санитарный врач
Российской Федерации
Г.Г.ОНИЩЕНКО
1 апреля 2009 года

Дата введения:
1 июня 2009 года

**4.2. МЕТОДЫ КОНТРОЛЯ. БИОЛОГИЧЕСКИЕ
И МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ**

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ ВОЗБУДИТЕЛЕЙ ОПАСНЫХ БАКТЕРИАЛЬНЫХ ИНФЕКЦИЙ (ЧУМА, СИБИРСКАЯ ЯЗВА, ХОЛЕРА, ТУЛЯРЕМИЯ, БРУЦЕЛЛЕЗ, САП, МЕЛИОИДОЗ) К АНТИБАКТЕРИАЛЬНЫМ ПРЕПАРАТАМ

**МЕТОДИЧЕСКИЕ УКАЗАНИЯ
МУК 4.2.2495-09**

1. Разработаны ФГУЗ Ростовский-на-Дону научно-исследовательский противочумный институт; ФГУЗ Иркутский научно-исследовательский противочумный институт; ФГУЗ Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт; ФГУЗ Ставропольский научно-исследовательский противочумный институт; ФГУЗ Российский научно-исследовательский противочумный институт "Микроб"; ФГУЗ Противочумный центр Роспотребнадзора; Федеральной службой по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека.
2. Рекомендованы к утверждению Комиссией по санитарно-эпидемиологическому нормированию при Федеральной службе по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (протокол от 24 марта 2009 г. N 1).
3. Утверждены Руководителем Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, Главным государственным санитарным врачом Российской Федерации Г.Г. Онищенко 1 апреля 2009 г.
4. Введены в действие с 1 июня 2009 г.
5. Введены взамен "Инструкции по определению чувствительности возбудителей опасных инфекционных заболеваний к антибиотикам и химиопрепаратам", утвержденной Минздравом СССР, от 7 февраля 1989 г.

1. Область применения

В настоящих Методических указаниях изложены стандартизированные методы определения чувствительности возбудителей особо опасных инфекций (ООИ) бактериальной природы к антибактериальным препаратам (АБП) методом серийных разведений (МСР), диско-диффузионным методом (ДДМ) и критерии интерпретации результатов с учетом биологических особенностей каждого вида микроорганизма.

Методические указания предназначены для лабораторий, имеющих разрешение на работу с возбудителями опасных инфекционных болезней I - II и II - IV групп патогенности, противочумных станций, противочумных институтов и специализированных противоэпидемических бригад (СПЭБ) ФГУЗ противочумных институтов.

В лабораториях Центров индикации и диагностики возбудителей особо опасных инфекционных болезней, Референс-центров по мониторингу за возбудителями инфекционных болезней и Национальных центров верификации диагностической деятельности (в соответствии с Приказом Роспотребнадзора от 17.03.08 N 88) выполняют исследования по определению антибиотикочувствительности/устойчивости микроорганизмов I - II групп патогенности с использованием метода серийных разведений и диско-диффузионного метода. В лабораториях ФГУЗ, ЦГиЭ, СПЭБ, противочумных станций допускается применение только диско-диффузионного метода.

2. Нормативные и методические документы

1. Федеральный закон "О санитарно-эпидемиологическом благополучии населения" от 30 марта 1999 г. N 52-ФЗ.
2. Международные медико-санитарные правила. ВОЗ, 2005.
3. СП 1.3.1285-03 "Безопасность работы с микроорганизмами I - II групп патогенности (опасности)".
4. СП 1.2.1318-03 "Порядок выдачи санитарно-эпидемиологического заключения о возможности проведения работ с возбудителями инфекционных заболеваний человека I - IV групп патогенности (опасности), генно-инженерно-модифицированными микроорганизмами, ядами биологического происхождения и гельминтами".
5. СП 3.4.2318-08 "Санитарная охрана территории Российской Федерации".
6. МУ 3.4.1030-01 "Организация, обеспечение и оценка противоэпидемической готовности медицинских учреждений к проведению мероприятий в случае завоза или возникновения особо опасных инфекций, контагиозных вирусных геморрагических лихорадок, инфекционных болезней неясной этиологии, представляющих опасность для населения Российской Федерации и международного сообщения".
7. Приказ Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека от 17.03.08 N 88 "О мерах по совершенствованию мониторинга за возбудителями инфекционных и паразитарных болезней".
8. Специфическая индикация патогенных биологических агентов: Практическое руководство. М., 2006.
9. СП 3.1.7.1380-03 "Профилактика чумы. Общие требования к эпидемиологическому надзору за чумой".
10. Приказ Министерства здравоохранения Российской Федерации, 2004 г., N 7 "Об организации и проведении мероприятий по профилактике чумы".
11. СП 3.1.089-96. Профилактика и борьба с заразными болезнями, общими для человека и животных: Сборник санитарных и ветеринарных правил. "Сибирская язва".
12. СП 3.1.1086-02 "Профилактика холеры. Общие требования к эпидемиологическому надзору за холерой".
13. МУ 3.1.2007-05 "Эпидемиологический надзор за туляремией".
14. МУ 4.2.2218-07 "Лабораторная диагностика холеры".
15. МУ 3.1.7.1189-03 "Профилактика и лабораторная диагностика бруцеллеза у людей".
16. МУК 4.2.2413-08 "Лабораторная диагностика и обнаружение возбудителя сибирской язвы".
17. "Лабораторная диагностика, лечение и профилактика мелиоидоза. Методические рекомендации". Волгоград, 1994.
18. "Инструкция по определению чувствительности возбудителей опасных инфекционных заболеваний к антибиотикам и химиопрепаратам". М., 1990.
19. МУК 4.2.1890-04 "Определение чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препаратам".
20. Приказ МЗ РФ от 12.08.03 N 400 "О совершенствовании организационной работы специализированных противоэпидемических бригад противочумных учреждений".
21. Распоряжение Правительства РФ от 21.05.07 N 642-р "О модернизации специализированных противоэпидемических бригад".

3. Общие сведения

Антибиотикограмма возбудителей особо опасных инфекций бактериальной природы должна быть получена в течение срока идентификации культур, т.к. определяет выбор средств специальной экстренной профилактики и этиотропной терапии инфекции. Адекватность такого выбора зависит от стандартности и качества определения антибиотикограммы, критериев ее интерпретации, отработанных для определенного вида бактерий. Однако критерии оценки результатов определения чувствительности/устойчивости возбудителей особо опасных инфекций до настоящего времени предложены не были. Исследование чувствительности возбудителей ООИ к АБП должно максимально достоверно и в кратчайшие сроки обеспечить:

- выбор средств специальной экстренной профилактики и этиотропной терапии инфекции;
- обоснование необходимости смены антибактериального препарата на основе бактериологического контроля эффективности лечения у отдельного больного;
- единые подходы к осуществлению наблюдения за распространением антибиотикорезистентности среди штаммов микроорганизмов - возбудителей ООИ;
- оценку антибактериальной активности партий АБП, используемых для экстренной профилактики и лечения инфекций, а также новых антибиотиков, перспективных для расширения арсенала средств, применяемых для этиотропной терапии ООИ.

4. Обоснование для исследования чувствительности всех выделенных культур возбудителей ООИ к антибактериальным препаратам

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

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

Большинство природных изолятов сибиреязвенного микроба чувствительно к АБП, однако описаны случаи выделения от больных и из других источников штаммов, устойчивых к пенициллину, амоксициллину, стрептомицину, тетрациклинам, рифампицину.

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

Природная устойчивость возбудителей бруцеллеза и туляремии к бета-лактамным антибиотикам, цефалоспоринам и сниженная чувствительность к химиопрепаратам возбудителей сапа и мелиоидоза затрудняет выбор АБП и их комбинаций для этиотропной терапии этих инфекций.

Экспериментально доказана возможность получения штаммов чумного, сибиреязвенного, туляремийного микробов, устойчивых к АБП, что делает вероятным использование таких вариантов в целях биотерроризма.

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

Вышеизложенное определяет необходимость изучения антибиотикограммы каждой выделенной культуры, постоянного эпидемиологического надзора за чувствительностью/устойчивостью выделяемых культур возбудителей ООИ.

Стандартизированное определение антибиотикограммы возбудителя и ее правильная интерпретация являются основой адекватного выбора антибиотиков для целей экстренной профилактики и лечения ООИ.

5. Методы определения чувствительности возбудителей ООИ к антибактериальным препаратам

5.1. Общая характеристика методов

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

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

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

- чувствительный - рост и размножение бактерий подавляется при концентрациях АБП, создающихся в органах и тканях человека при рекомендуемых дозах и схемах применения. Лечение инфекции, вызванной микроорганизмом, относящимся к этой категории, обычно эффективно;
- промежуточный - МПК АБП в отношении штаммов этой категории выше, чем в отношении чувствительных, но находится в пределах, достигаемых при максимально допустимых режимах дозирования. Лечение инфекции, вызванной микроорганизмом, относящимся к этой категории, может быть эффективным при применении АБП в повышенных дозах, однако не исключен отбор вариантов возбудителя, характеризующегося более высоким значением МПК, сопровождающегося отсутствием эффекта антибиотикотерапии;
- устойчивый - штамм не подавляется при концентрациях АБП, создающихся в органах и тканях при рекомендуемых режимах дозирования. Использование АБП, к которому культура микроорганизмов устойчива, недопустимо.

Основным количественным показателем, характеризующим микробиологическую активность АБП, является значение МПК, которое может быть получено при использовании МСР. Для определения МПК заданные концентрации АБП вносят в питательную среду. Питательную среду с двукратно увеличивающимися концентрациями АБП засевают исследуемой культурой микроорганизма, посевы инкубируют при оптимальной для данного вида возбудителя температуре в течение 18 - 48 ч и затем оценивают наличие или отсутствие видимого роста.

Для получения антибиотикограммы микроорганизмов ДДМ используют стандартизированные условия (состав и количество среды, количество засеваемых микробных клеток, температура и сроки инкубирования, стандартные диски). В определенных пределах величина диаметра зоны подавления роста обратно пропорциональна МПК, т.к. существует линейная связь между логарифмом МПК, измеренной при использовании МСР, и диаметром зоны задержки роста при использовании ДДМ.

Для окончательной характеристики чувствительности/устойчивости культур необходимо использовать МСР АБП в плотной питательной среде для получения наиболее достоверных результатов и адекватного выбора средств специальной экстренной профилактики и этиотропной терапии эпидемически опасных инфекционных заболеваний бактериальной природы.

Необходима строгая стандартизация процедуры определения антибиотикограммы, внедрение внутреннего контроля качества на всех этапах исследования, использование критериев интерпретации результатов для каждого вида возбудителя ООИ.

5.2. Выбор контрольных штаммов

Выбор референтных (контрольных) штаммов определяется видом тестируемого микроорганизма. В качестве контрольных тест-штаммов используют типичные штаммы с хорошо изученными фенотипическими характеристиками, включая чувствительность к АБП, отличающиеся генетической стабильностью. К таковым относятся вакцинные штаммы Yersinia pestis EV НИИЭГ, Francisella tularensis 15, Brucella abortus 19BA, Bacillus anthracis СТИ, а также Vibrio cholerae non O1 KM 162 (Р-9741), депонированный в качестве референтного антибиотикочувствительного тест-штамма в ГК ПБ РосНИПЧИ "Микроб", типичные штаммы буркхольдерий - Burkholderia mallei NCTC 10230 и Burkholderia pseudomallei CIP

6086. Контрольные штаммы, соответствующие каждому виду возбудителей ООИ, используют на этапах предварительного изучения качества питательных сред, применяемых при определении антибиотикочувствительности, контроля активности дисков с антибиотиками и АБП, для их последующего использования в случае эпидемических осложнений (МУ 3.4.1030-01).

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

Допустимые колебания значений МПК АБП и диаметров зон ингибиции роста всех вышеперечисленных контрольных штаммов на используемых для каждого вида возбудителя питательных средах представлены в таблицах соответствующих разделов документа.

Для сохранения свойств и чистоты контрольные штаммы необходимо хранить в лиофилизированном состоянии. "Рабочие" культуры хранят в пробирках на скошенном агаре или в столбиках агара, оптимального для роста каждого вида микроорганизма, при 2 - 8 °C с еженедельным пересевом. Исключением является контрольный штамм Vibrio cholerae non O1 КМ 162 (Р-9741), который хранится в 0,3%-ном полужидком агаре при 18 - 20 °C. Перед использованием для контроля качества определения антибиотикограммы референтный штамм двукратно пересевается.

5.3. Выбор питательных сред

Для оценки чувствительности микроорганизмов к АБП используют питательные среды, разрешенные к применению в Российской Федерации, в соответствии с биологическими особенностями каждого вида изучаемого микроорганизма (Прилож. 1). Стандартной средой является агар Мюллера-Хинтона (Muller-Hinton).

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

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

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

5.4. Требования к культуре, используемой для инокуляции

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

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

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

5.5. Выбор антибактериальных препаратов

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

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

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

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

При составлении наборов АБП в настоящем документе учтены закономерности перекрестной резистентности бактерий к различным представителям одной группы. Так, для определения чувствительности к фторхинолонам достаточно воспользоваться только ципрофлоксацином (или офлоксацином, или пефлоксацином и др.); к цефалоспоринам III поколения - цефтриаксоном (или цефотаксимом, или цефтазидимом).

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

5.6. Интерпретация результатов исследования

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

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

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

5.7. Метод серийных разведений в агаре

Важным этапом МСР является приготовление растворов АБП.

Растворы с высокими концентрациями препаратов (100000 - 10000 - 1000 мг/л) являются основными и могут храниться при 2 - 8 °C в течение недели. Исключением являются растворы тетрациклинов, беталактамов, фуразолидона, сульфаниламидов, которые необходимо использовать ex tempore для внесения в питательные среды в необходимых концентрациях.

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

$$m\ АБ_{теор.} = \frac{C \times V_{теор.}}{A},$$

где:

$m\ АБ_{теор.}$ - расчетная (теоретическая) навеска АБП, мг;

C - необходимая концентрация АБП, мкг/мл;

$V_{теор.}$ - объем растворителя для растворения теоретической навески, мл;

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

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

$$V_{практ.} = \frac{m\ АБ_{практ.} \times V_{теор.}\ (мл)}{m\ АБ_{теор.}\ (мг)},$$

где:

$V_{практ.}$ - объем растворителя для растворения практической навески, мл;

$m\ АБ_{практ.}$ - полученная навеска АБП, мг;

$m\ АБ_{теор.}$ - расчетная (теоретическая) навеска АБП, мг;

$V_{теор.}$ - объем растворителя для растворения теоретической навески, мл.

Различия в растворимости АБП определяют необходимость использования растворителей (солюбилизаторов) в минимальном объеме и необходимого количества разбавителя (дистиллированная вода). Для растворения тетрациклинов, рифампицина, фуразолидона используют димексид, левомицетин растворяют в 96°-ном спирте. Приготовление основных растворов налидиксовой кислоты и фторхинолонов проводят в 1/2 от необходимого объема дистиллированной воды добавлением по капле 0,1 М КОН до полного растворения препаратов с последующим доведением растворителя до расчетного объема. Растворителем и разбавителем для других АБП служит дистиллированная вода.

Для измерения объемов растворов антибиотиков используют калиброванные дозаторы и пипетки.

Рабочие растворы АБП готовят на дистиллированной воде в концентрациях, необходимых для внесения в расплавленный и остуженный (до 48 - 50 °C) агар (20 мл на одну чашку Петри) для создания в нем двукратно увеличивающихся концентраций (например: 1 - 2 - 4 - 8 - 16 - 32 мг/л) препарата в соответствии с пограничными значениями МПК для чувствительных и устойчивых штаммов данного вида микроорганизма. В зависимости от необходимого количества чашек Петри с каждой из концентраций АБП используют мерные широкогорлые флаконы на 50 - 100 мл, в которые наливают агар в объеме 20 - 40 мл и т.д. и добавляют раствор АБП (начиная с наименьшей концентрации), интенсивно размешивают и выливают в чашки Петри, на которых указана концентрация АБП. Контролем служит агаровая чашка без АБП. После застывания агара в чашках и их подсушивания на дне чашки делают надписи: дата посева, вид возбудителя, номер исследуемых культур.

Испытуемые суспензии культур наносят на поверхность питательного агара без АБП (контроль) и с АБП (начиная с наименьшей концентрации) каплями легким касанием пипетки (~ 0,005 мл) или с помощью штампа-репликатора (~ 0,001 мл). Одновременно можно изучать до 25 - 50 культур, обязательно включая контрольные референс-штаммы, что обеспечивает достоверность данных антибиотикограммы.

После полного впитывания капель суспензий в агар чашки переворачивают вверх дном и инкубируют при оптимальной для данного возбудителя температуре (28, 37 °C) в течение 18 - 48 ч. Учет результатов проводят после появления роста тестируемых культур на агаре без АБП и при условии, что значения МПК для контрольных штаммов укладываются в рекомендуемый диапазон значений этого показателя для испытуемых АБП (таблицы в соответствующих разделах). Минимальная подавляющая концентрация (МПК) - это концентрация АБП в агаре, которая полностью подавляет рост культуры. По значению МПК исследуемая культура может быть отнесена к чувствительной, промежуточной, устойчивой в соответствии с критериями для изучаемого вида возбудителя (таблицы в соответствующих разделах).

5.8. Диско-диффузионный метод

Проверенный на пригодность с использованием эталонных антибиотикочувствительных штаммов питательный агар (приготовленный, расплавленный, остуженный, как указано ранее) разливают в чашки Петри, установленные на строго горизонтальной поверхности, в объеме 20 мл на чашку диаметром 90 мм, 25 мл - на чашку диаметром 100 мм, 60 мл - на чашку диаметром 150 мм. Толщина слоя агара должна составлять строго (4 +/- 0,5) мм. Эти требования следует выполнять обязательно, т.к. зоны ингибиции роста зависят от глубины и равномерности агарового слоя.

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

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

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

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

Бактериальную суспензию необходимой концентрации наносят на агаровую чашку Петри в объеме 0,2 - 0,3 мл и распределяют равномерно по поверхности с помощью стерильного шпателя. Приоткрытые чашки подсушивают при комнатной температуре в течение 10 - 15 мин. и затем наносят диски (не более 6 на чашку). Диски наносят стерильным пинцетом и слегка придавливают. Расстояние от диска до края чашки и между дисками должно составлять 15 - 20 мм.

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

Появление колоний в зоне задержки роста микроорганизмов может свидетельствовать или о загрязнении культуры посторонней микрофлорой, или о гетерогенности тестируемой культуры по признаку чувствительности/устойчивости к данному антибиотику. И в одном, и в другом случае исследование необходимо повторить с изучением чувствительности к АБП культур из колоний (если это не загрязнение), выросших в пределах диаметра зоны ингибиции роста. Интерпретацию результатов исследования следует провести с использованием таблиц, в которых даны пограничные значения диаметров зон ингибиции роста исследуемого микроорганизма конкретным АБП (разделы 6, 7, 8, 9, 10, 11).

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

6. Определение чувствительности чумного микроба (Yersinia pestis) к антибактериальным препаратам

6.1. Контрольные штаммы

Для стандартизации определения антибиотикограммы возбудителя чумы в качестве контрольных штаммов могут быть использованы:

1) вакцинный штамм чумного микроба - Yersinia pestis EV НИИЭГ, чувствительный к антибактериальным препаратам;

2) референс-штамм Escherichia coli ATCC 25922, рекомендованный для определения антибиотикочувствительности бактерий семейства Enterobacteriaceae, к которому относится и возбудитель чумы.

6.2. Питательные среды

Для определения чувствительности чумного микроба к антибактериальным препаратам МСР и ДДМ могут быть использованы:

1) агар Мюллера-Хинтона (Muller-Hinton), pH 7,3 +/- 0,2;

2) агар Хоттингера pH 7,2 +/- 0,1 (1,2 - 1,4 г/л аминного азота).

Для ДДМ дополнительно можно использовать агар Гивенталя - Ведьминой (АГВ), pH 7,4 +/- 0,2.

Каждая серия питательного агара перед использованием для определения антибиотикограммы возбудителя чумы должна быть проверена с использованием контрольных штаммов и АБП. Допустимые колебания значений МПК и диаметров зон ингибиции роста для контрольных штаммов представлены в табл. 6.1 и 6.2.

6.3. Антибактериальные препараты

Для определения антибиотикограммы чумного микроба, выделенного в природном очаге чумы или от больного, используют антибактериальные препараты, рекомендованные МУ 3.4.1030-01 для экстренной профилактики и лечения этой инфекции.

Для МСР в плотной питательной среде выбирают серии двукратно увеличивающихся концентраций антибактериальных препаратов в соответствии с пограничными значениями МПК для чувствительных и устойчивых культур чумного микроба.

Препараты первого ряда:
Стрептомицин 4 - 8 - 16 - 32 - 64 мг/л
Амикацин 4 - 8 - 16 - 32 - 64 мг/л
Гентамицин 2 - 4 - 8 - 16 мг/л
Доксициклин 2 - 4 - 8 - 16 мг/л
Ципрофлоксацин (или офлоксацин, пефлоксацин, ломефлоксацин, левофлоксацин) 0,06 - 0,125 - 0,25 - 0,5 - 1,0 мг/л
Цефтриаксон (или цефотаксим) 0,5 - 1 - 2 - 4 мг/л
Рифампицин 2 - 4 - 8 - 16 - 32 мг/л
Триметоприм/сульфаметоксазол 1 - 2 - 4 - 8 мг/л (по триметоприму).
Препараты второго ряда:
Канамицин 4 - 8 - 16 - 32 - 64 мг/л
Нетилмицин 2 - 4 - 8 - 16 мг/л
Тобрамицин 4 - 8 - 16 - 32 мг/л
Тетрациклин 2 - 4 - 8 - 16 мг/л
Ампициллин 4 - 8 - 16 - 32 мг/л
Цефтазидим (или цефтибутен, цефиксим, цефепим) 0,5 - 1 - 2 - 4 мг/л
Азтреонам 0,5 - 1 - 2 - 4 - 8 мг/л
Налидиксовая кислота 4 - 8 - 16 - 32 мг/л
Левомицетин 2 - 4 - 8 - 16 мг/л.

Налидиксовая кислота не рекомендуется для экстренной профилактики и лечения чумы, однако устойчивость чумного микроба к этому препарату может сопровождаться снижением эффективности фторхинолонов при сохранении к ним чувствительности in vitro.

С целью экономии времени и средств для проведения исследования МСР могут применяться штампы-репликаторы, позволяющие изучить антибиотикограммы 25 - 50-ти штаммов одновременно с введением в исследование контрольного антибиотикочувствительного штамма, что повышает достоверность получаемых результатов.

Для постановки ДДМ используют проверенные (на предварительно прошедшей контроль серии питательной среды) коммерческие диски с определенными концентрациями АБЦ (табл. 6.2).

6.4. Посевная доза, инокуляция, инкубация

При определении чувствительности возбудителя чумы к антибактериальным препаратам с помощью ДДМ используют суспензию микробных клеток из суточной агаровой культуры в 0,85%-ном изотоническом растворе хлорида натрия, стандартизированную по отраслевому стандарту мутности ГИСК им. Л.А. Тарасевича на 5 ед. - 5×10^8 м.к. (~ $1,5 \times 10^8$ КОЕ/мл). Суспензию наносят на поверхность агара в объеме 0,2 мл ($n \times 10^7$ КОЕ), равномерно распределяют стерильным шпателем. Через 10 - 15 мин. накладывают диски (не более шести на чашку диаметром 100 мм). Посевы инкубируют при 28 °C. Предварительный учет проводят через 24 ч, окончательный - через 48 ч. Результаты учитывают при появлении сливного роста на контрольных чашках (без дисков). Диаметры зон задержки роста культуры вокруг дисков, включая диаметр самого диска, измеряют с точностью до 1 мм штангенциркулем, кронциркулем или специальной линейкой-лекалом.

Для МСР используют суспензию той же концентрации 5×10^8 м.к. (~ $1,5 \times 10^8$ КОЕ/мл), нанося небольшими каплями с помощью штампа-репликатора или касанием пипетки с тонким концом на чашки с питательной средой, содержащей различные концентрации антибактериальных препаратов, начиная с чашек, содержащих минимальное количество антибиотиков. Посевная доза - $n \times 10^5$ - 10^6 КОЕ. Посевы инкубируют при температуре 28 °С. Учет через 36 - 48 ч. Чувствительность/устойчивость культур определяют по минимальной концентрации препарата, подавляющей рост возбудителя (МПК, мг/л) на среде культивирования при наличии роста в контроле (агар без антибиотика).

6.5. Критерии оценки чувствительности/устойчивости чумного микроба к антибактериальным препаратам

Интерпретацию результатов определения чувствительности штаммов чумного микроба проводят в соответствии с пограничными значениями МПК и диаметров зон подавления роста для чувствительных и устойчивых культур возбудителя (табл. 6.3). Между этими показателями находятся значения МПК для штаммов с промежуточной устойчивостью. Кроме того, сравнивают полученные результаты с одновременным определением МПК и диаметров зон подавления роста контрольных штаммов - Y. pestis EV НИИЭГ и E. coli ATCC 25922 (табл. 6.1, 6.2), а также с диапазонами значений для 75-ти антибиотикочувствительных штаммов Y. pestis, включающих 25 культур, выделенных в зоне действия Иркутского НИПЧИ в 2006 г. (табл. 6.4).

Таблица 6.1

ДОПУСТИМЫЕ КОЛЕБАНИЯ ЗНАЧЕНИЙ МПК АНТИБАКТЕРИАЛЬНЫХ ПРЕПАРАТОВ ДЛЯ КОНТРОЛЬНЫХ ШТАММОВ ESCHERICHIA COLI ATCC 25922 И YERSINIA PESTIS EV НИИЭГ

Антибактериальный препарат	Диапазон значений МПК, мг/л			
	агар Мюллера-Хинтона pH 7,3 +/- 0,2		агар Хоттингера pH 7,2 +/- 0,1	
	E. coli ATCC 25922	Y. pestis EV НИИЭГ	E. coli ATCC 25922	Y. pestis EV НИИЭГ
1	2	3	4	5
Стрептомицин	1 - 4	2 - 8	1 - 4	1 - 8
Канамицин	1 - 4	2 - 8	1 - 4	2 - 8
Амикацин	0,5 - 4,0	2 - 8	0,5 - 4,0	2 - 8
Гентамицин	0,25 - 1,0	0,25 - 2,0	0,25 - 1,0	0,25 - 1,0
Нетилмицин	0,25 - 1,0	0,25 - 2,0	0,25 - 1,0	0,25 - 1,0
Тобрамицин	0,25 - 1,0	0,5 - 2,0	0,25 - 1,0	0,25 - 1,0
Тетрациклин	0,5 - 2,0	0,5 - 2,0	0,5 - 2,0	0,5 - 2,0
Доксициклин	0,5 - 2,0	0,25 - 1,0	0,5 - 2,0	0,25 - 1,0
Левомицетин	2 - 8	1 - 4	2 - 8	1 - 4
Рифампицин	4 - 16	1 - 4	4 - 16	1 - 4
Ампициллин	2 - 8	0,5 - 1,0	2 - 8	0,5 - 1,0
Цефтриаксон	0,03 - 0,12	0,01 - 0,02	0,03 - 0,12	0,01 - 0,02
Цефотаксим	0,03 - 0,12	0,01 - 0,02	0,03 - 0,12	0,01 - 0,02
Цефтибутен	0,12 - 0,5	0,01 - 0,02	0,12 - 0,5	0,01 - 0,02
Цефтазидим	0,06 - 0,5	0,02 - 0,08	0,06 - 0,5	0,02 - 0,08
Цефиксим	0,25 - 1,0	0,08 - 0,16	0,25 - 1,0	0,08 - 0,16
Цефепим	0,016 - 0,12	0,02 - 0,04	0,016 - 0,12	0,02 - 0,04
Азтреонам	0,06 - 0,25	0,01 - 0,02	0,06 - 0,25	0,01 - 0,02
Налидиксовая кислота	1 - 4	0,5 - 2,0	1 - 4	0,5 - 2,0
Ципрофлоксацин	0,004 - 0,016	0,01 - 0,02	0,004 - 0,016	0,01 - 0,04
Офлоксацин	0,015 - 0,12	0,005 - 0,01	0,015 - 0,12	0,005 - 0,01
Пефлоксацин	0,03 - 0,12	0,02 - 0,08	0,03 - 0,12	0,02 - 0,04
Ломефлоксацин	0,03 - 0,12	0,01 - 0,08	0,03 - 0,12	0,01 - 0,08
Левофлоксацин	0,008 - 0,06	0,005 - 0,01	0,008 - 0,06	0,005 - 0,01
Триметоприм/ сульфаметоксазол	0,5/9,5 - 2/38	1/19 - 2/38	0,5/9,5 - 2/38	1/19 - 2/38

Таблица 6.2

ДОПУСТИМЫЕ КОЛЕБАНИЯ ЗНАЧЕНИЙ ДИАМЕТРОВ ЗОН ПОДАВЛЕНИЯ РОСТА ДЛЯ КОНТРОЛЬНЫХ ШТАММОВ ESCHERICHIA COLI ATCC 25922 И YERSINIA PESTIS EV НИИЭГ

Антибактериальный препарат	Содержание препарата в диске, мкг	Диаметр зон подавления роста, мм					
		агар Мюллера-Хинтона pH 7,3 +/- 0,2		агар Хоттингера pH 7,2 +/- 0,1		АГВ pH 7,4 +/- 0,2	
		E coli ATCC 25922	Y. pestis EV НИИЭГ	E. coli ATCC 25922	Y. pestis EV НИИЭГ	E. coli ATCC 25922	Y. pestis EV НИИЭГ
1	2	3	4	5	6	7	8
Стрептомицин	30	17 - 25	17 - 23	17 - 25	19 - 25	17 - 25	19 - 26
Канамицин	30	17 - 25	18 - 23	17 - 25	19 - 25	17 - 25	19 - 26
Амикацин	30	19 - 26	19 - 23	19 - 26	20 - 26	19 - 26	20 - 30
Гентамицин	10	19 - 26	20 - 27	19 - 26	22 - 27	19 - 26	25 - 30

Нетилмицин	30	22 - 30	25 - 30	22 - 30	25 - 30	22 - 30	30 - 40
Тобрамицин	10	18 - 26	18 - 26	18 - 26	25 - 30	18 - 26	25 - 33
Тетрациклин	30	18 - 25	20 - 27	18 - 25	20 - 27	18 - 25	20 - 27
Доксициклин	10	18 - 24	20 - 27	18 - 24	20 - 27	18 - 24	20 - 27
Левомицетин	30	21 - 27	25 - 33	21 - 27	25 - 33	21 - 27	25 - 33
Рифампицин	5	8 - 10	15 - 22	8 - 10	15 - 20	8 - 10	15 - 20
Ампициллин	10	16 - 22	23 - 28	16 - 22	23 - 28	13 - 20	25 - 33
Цефтриаксон	30	29 - 35	30 - 40	29 - 35	30 - 40	29 - 35	30 - 40
Цефотаксим	30	29 - 35	30 - 40	29 - 35	30 - 40	29 - 35	30 - 40
Цефтибутен	30	27 - 35	30 - 40	27 - 35	35 - 45	27 - 35	30 - 40
Цефтазидим	30	25 - 32	28 - 35	25 - 32	30 - 35	25 - 32	30 - 35
Цефиксим	5	23 - 27	28 - 35	23 - 27	30 - 35	23 - 27	30 - 35
Цефепим	30	31 - 37	31 - 40	31 - 37	31 - 40	31 - 37	31 - 37
Азтреонам	30	28 - 36	29 - 37	28 - 36	30 - 36	28 - 36	30 - 35
Налидиксовая кислота	30	22 - 28	28 - 35	22 - 28	30 - 35	22 - 28	28 - 35
Ципрофлокса-цин	5	30 - 40	30 - 35	30 - 40	30 - 35	30 - 40	30 - 35
Офлоксацин	5	29 - 33	29 - 35	29 - 33	30 - 35	29 - 33	29 - 35
Пефлоксацин	10	28 - 35	29 - 35	28 - 35	29 - 35	28 - 35	30 - 35
Ломефлокса-цин	10	27 - 33	30 - 37	27 - 33	30 - 37	27 - 33	30 - 37
Левофлокса-цин	5	29 - 37	30 - 40	29 - 37	30 - 40	29 - 37	30 - 40
Триметоприм/ сульфамето-ксазол	1,25/ 23,75	23 - 29	23 - 28	23 - 29	23 - 28	23 - 29	23 - 28

Таблица 6.3

КРИТЕРИИ ИНТЕРПРЕТАЦИИ РЕЗУЛЬТАТОВ ИССЛЕДОВАНИЯ YERSINIA PESTIS: ПОГРАНИЧНЫЕ ЗНАЧЕНИЯ ДИАМЕТРОВ ЗОН ПОДАВЛЕНИЯ РОСТА (ММ) И ВЕЛИЧИН МПК (МГ/Л) АНТИБАКТЕРИАЛЬНЫХ ПРЕПАРАТОВ

Антибактериальный препарат	Содержа-ние в диске, мкг	Диаметр зон подавления роста, мм		Значение МПК, мг/л	
		S*	R*	S*	R*
1	2	3	4	5	6
Стрептомицин	30	>= 18	<= 13	<= 16	>= 64
Канамицин	30	>= 18	<= 13	<= 16	>= 64
Амикацин	30	>= 17	<= 14	<= 16	>= 64
Гентамицин	10	>= 17	<= 14	<= 4	>= 16
Нетилмицин	30	>= 19	<= 14	<= 4	>= 16
Тобрамицин	10	>= 17	<= 14	<= 8	>= 32
Тетрациклин	30	>= 19	<= 14	<= 4	>= 16
Доксициклин	10	>= 19	<= 14	<= 4	>= 16
Левомицетин	30	>= 19	<= 14	<= 4	>= 16
Рифампицин	5	>= 15	<= 13	<= 4	>= 32
Ампициллин	10	>= 19	<= 14	<= 8	>= 32
Цефтриаксон	30	>= 25	<= 20	<= 1	>= 4
Цефотаксим	30	>= 25	<= 20	<= 1	>= 4
Цефтибутен	30	>= 25	<= 20	<= 1	>= 4
Цефтазидим	30	>= 25	<= 20	<= 1	>= 4
Цефиксим	5	>= 25	<= 20	<= 1	>= 4
Цефепим	30	>= 25	<= 20	<= 1	>= 4
Азтреонам	30	>= 23	<= 17	<= 1	>= 8
Налидиксовая кислота	30	>= 25	<= 20	<= 8	>= 32
Ципрофлоксацин	5	>= 25	<= 19	<= 0,1	>= 1
Офлоксацин	5	>= 25	<= 19	<= 0,1	>= 1
Пефлоксацин	10	>= 22	<= 17	<= 0,2	>= 2
Ломефлоксацин	10	>= 22	<= 17	<= 0,1	>= 1
Левофлоксацин	5	>= 22	<= 17	<= 0,1	>= 1
Триметоприм/ сульфаметоксазол	1,25/ 23,75	>= 21	<= 16	<= 2/38	>= 8/152
Примечание: S* - чувствительный; R* - устойчивый; значения МПК для штаммов с промежуточной устойчивостью находятся между значениями для S и R культур.					

Таблица 6.4

ДИАПАЗОН ЗНАЧЕНИЙ МПК АНТИБАКТЕРИАЛЬНЫХ ПРЕПАРАТОВ И ДИАМЕТРОВ ЗОН ПОДАВЛЕНИЯ РОСТА ДЛЯ 75-ТИ АНТИБИОТИКОЧУВСТВИТЕЛЬНЫХ ШТАММОВ YERSINIA PESTIS

Антибактери-	Содер-	Диаметр зон подавления	Значение МПК, мг/л

альный препарат	жание препа-рата в диске, мкг	роста, мм				
		агар Мюллера-Хинтона pH 7,3 +/- 0,2	агар Хоттингера pH 7,2 +/- 0,1	АГВ pH 7,4 +/- 0,2	агар Мюллера-Хинтона pH 7,3 +/- 0,2	агар Хоттингера pH 7,2 +/- 0,1
1	2	3	4	5	6	7
Стрептомицин	30	18 - 24	20 - 27	20 - 25	2 - 8	1 - 8
Канамицин	30	18 - 24	20 - 27	25 - 30	2 - 8	2 - 8
Амикацин	30	20 - 26	22 - 30	25 - 30	2 - 8	2 - 8
Гентамицин	10	20 - 28	25 - 30	25 - 30	0,25 - 2	0,25 - 1
Нетилмицин	30	25 - 30	27 - 33	30 - 35	0,25 - 2	0,25 - 1
Тобрамицин	10	20 - 28	25 - 30	25 - 30	0,25 - 2	0,25 - 1
Тетрациклин	30	21 - 28	23 - 28	20 - 27	0,5 - 4	0,5 - 4
Доксициклин	10	20 - 28	20 - 27	20 - 27	0,25 - 1	0,25 - 1
Левомицетин	30	25 - 33	23 - 30	25 - 33	1 - 4	1 - 4
Рифампицин	5	15 - 22	15 - 20	15 - 20	1 - 4	1 - 4
Ампициллин	10	23 - 28	23 - 28	25 - 33	0,5 - 1,0	0,5 - 1,0
Цефтриаксон	30	30 - 40	30 - 40	30 - 40	0,005 - 0,02	0,005 - 0,02
Цефотаксим	30	30 - 40	30 - 40	30 - 40	0,005 - 0,02	0,005 - 0,02
Цефтибутен	30	30 - 40	35 - 45	35 - 40	0,01 - 0,02	0,01 - 0,02
Цефтазидим	30	28 - 35	30 - 35	30 - 35	0,02 - 0,08	0,02 - 0,08
Цефиксим	5	28 - 35	30 - 35	30 - 35	0,08 - 0,16	0,08 - 0,16
Цефепим	30	31 - 40	31 - 40	31 - 35	0,01 - 0,04	0,01 - 0,04
Азтреонам	30	29 - 35	30 - 35	30 - 35	0,01 - 0,02	0,01 - 0,02
Налидиксовая кислота	30	30 - 35	30 - 35	30 - 35	0,5 - 2,0	0,5 - 2,0
Ципрофлокса-цин	5	30 - 40	30 - 40	30 - 40	0,01 - 0,04	0,01 - 0,04
Офлоксацин	5	29 - 35	30 - 35	29 - 35	0,005 - 0,01	0,0025 - 0,01
Пефлоксацин	10	29 - 35	29 - 38	22 - 33	0,02 - 0,08	0,01 - 0,04
Ломефлокса-цин	10	28 - 34	30 - 40	27 - 37	0,01 - 0,08	0,01 - 0,08
Левофлокса-цин	5	29 - 35	30 - 35	30 - 35	0,005 - 0,01	0,005 - 0,01
Триметоприм/ сульфамето-ксазол	1,25/ 23,75	21 - 27	23 - 28	30 - 35	1/19 - 2/38	1/19 - 2/38

7. Определение чувствительности возбудителя сибирской язвы (Bacillus anthracis) к антибактериальным препаратам

7.1. Контрольные штаммы

Для контроля точности и стандартности проведения исследования в каждом опыте необходимо использовать тест-культуру с известной чувствительностью к антибиотикам. Национальный Комитет Клинических Лабораторных Стандартов (NCCLS) рекомендует для этой цели использовать Staphylococcus aureus ATCC 25923. В качестве контрольного должен быть использован и вакцинный штамм B. anthracis СТИ, применяемый для иммунизации людей, основные биологические свойства которого, в т.ч. и антибиотикочувствительность, изучены наиболее полно.

7.2. Питательные среды

Для определения чувствительности B. anthracis к антибактериальным препаратам обоими методами (МСР и ДДМ) может быть использован агар Мюллера-Хинтона (pH 7,3 +/- 0,2) или агар Хоттингера (pH 7,2 +/- 0,1). Агар Гивенталя - Ведьминой (АГБ) для ДДМ используется только в случае отсутствия других питательных сред. Допустимые колебания значений МПК и диаметров зон ингибиции роста для контрольных штаммов представлены в табл. 7.1 и 7.2.

7.3. Антибактериальные препараты

Для определения чувствительности B. anthracis используют АБП, рекомендуемые для экстренной профилактики и лечения сибирской язвы.

Препараты первого ряда, к которым в первую очередь определяют чувствительность сибиреязвенного микроба при выделении возбудителя от больного: бензилпенициллин, ампициллин, доксициклин, тетрациклин, ципрофлоксанин (или офлоксацин, пефлоксацин), рифампицин. В последние годы широкое применение получили антибиотики класса карбапенемов - меропенем, имипенем. Изучение чувствительности сибиреязвенного микроба к данным антибиотикам позволило рекомендовать эту группу препаратов для лечения септической формы сибирской язвы и в случае экстренной профилактики при ингаляционном заражении.

К препаратам второго ряда относят антибиотики группы аминогликозидов, цефалоспоринов, макролидов. Следует отметить, что сибиреязвенный микроб чувствителен только к цефалоспоринам (ЦФ) I поколения (цефазолин и др.), тогда как к ЦФ II - IV поколения (цефуроксим, цефтазидим, цефтриаксон, цефотаксим) устойчив.

Для МСР в плотной питательной среде выбирают серии двукратно увеличивающихся концентраций антибактериальных препаратов в соответствии с пограничными значениями МПК для чувствительных и устойчивых культур сибиреязвенного микроба на агаре Мюллера-Хинтона или агаре Хоттингера (табл. 7.3).

Препараты первого ряда:
Ампициллин (или бензилпенициллин) 0,06 - 0,125 - 0,25 - 0,5 - 1 мг/л
Доксициклин (или тетрациклин) 0,06 - 0,125 - 0,25 - 0,5 - 1 мг/л
Ципрофлоксацин (или офлоксацин, пефлоксацин) 0,06 - 0,125 - 0,25 - 0,5 - 1 мг/л
Рифампицин 0,06 - 0,125 - 0,25 - 0,5 - 1 мг/л
Меропенем (или имипенем) 0,06 - 0,125 - 0,25 - 0,5 - 1 мг/л/
Препараты второго ряда:
Цефазолин (или цефалексин) 0,125 - 0,25 - 0,5 - 1 мг/л
Эритромицин (или азитромицин) 0,5 - 1 - 2 - 4 мг/л

Линкомицин 0,5 - 1 - 2 - 4 мг/л

Канамицин (или гентамицин, амикацин, стрептомицин) 0,25 - 0,5 - 1 - 2 - 4 мг/л.

Для постановки ДДМ используют коммерческие диски с определенными концентрациями антибактериальных препаратов (табл. 7.3).

7.4. Посевная доза, инокуляция, инкубация

При определении чувствительности сибиреязвенного микроба с помощью ДДМ для посева используют типичные колонии из 16 - 18 ч. агаровых культур. Из выросших колоний готовят взвесь микробов в 0,85%-ном растворе хлорида натрия, доводя плотность инокулюма до 10 ед. по стандарту мутности ГИСК им. Л.А. Тарасевича, что соответствует ~ 2×10^7 КОЕ/мл. Эту взвесь в объеме 0,3 мл (~ 6×10^6 КОЕ) наносят на поверхность питательной среды и равномерно распределяют шпателем. Чашки выдерживают 15 мин. при комнатной температуре для впитывания суспензии. Затем диски накладывают стерильным пинцетом на поверхность засеянной питательной среды на одинаковом расстоянии один от другого, отступив около 2 см от стенки чашки (не более 4 дисков на чашку диаметром 90 - 100 мм). Вновь выдерживают 15 мин. при комнатной температуре, а затем, перевернув чашки с посевами вверх дном, инкубируют при 37 °С в течение 18 - 20 ч (не более). Измеряют диаметр зон задержки роста вокруг дисков, включая диаметр самого диска, с точностью до 1 мм. При расплывчатых краях зоны или при зонах с двойными контурами измеряют диаметр зоны по наиболее четкой границе. Для интерпретации полученных результатов пользуются табл. 7.3.

Для МСР используют суспензию той же концентрации микробных клеток, нанося небольшими каплями с помощью штампа-репликатора или касанием пипетки с тонким концом на агаровые пластинки с разными концентрациями антибактериальных препаратов, начиная с чашек с минимальным содержанием антибиотиков. Посевная доза составляет ~ $n \times 10^4 - 10^5$ КОЕ соответственно. Посевы инкубируют 18 - 24 ч при температуре 37 °С. Чувствительность/устойчивость культур определяют по минимальной концентрации препарата, подавляющей рост возбудителя (МПК, мг/л) на среде культивирования.

7.5. Критерии оценки чувствительности/устойчивости сибиреязвенного микроба к антибактериальным препаратам

Интерпретацию результатов определения чувствительности культур сибиреязвенного микроба проводят путем сопоставления их с пограничными значениями МПК и диаметров зон подавления роста возбудителя (табл. 7.3), адаптированными для сибиреязвенного микроба и выбранными с учетом диапазона значений МПК для 50-ти штаммов B. anthracis (табл. 7.4), соотнесения данных in vitro с эффективностью in vivo и значений терапевтического индекса, рассчитанных на основании концентраций антибиотика в организме при введении терапевтических доз в сопоставлении с МПК. Для адаптации использованы критерии чувствительности/устойчивости бактерий семейства Staphylococcus spp., представленные в МУК 4.2.1890-04. В табл. 7.3 даны пограничные значения МПК и зон подавления роста для чувствительных и устойчивых культур. Между этими показателями находятся значения для культур с промежуточной устойчивостью. Необходимо учитывать результаты определения МПК и зон подавления роста для контрольных штаммов B. anthracis СТИ и S. aureus ATCC 25923 на данной серии питательной среды. Изменения МПК и диаметров зон подавления роста для контрольных штаммов, выходящие за пределы допустимых значений (табл. 7.1 и 7.2), могут свидетельствовать о несоответствии качества сред или дисков с антибактериальными препаратами и потребовать их замены. Увеличение МПК для исследуемых штаммов по сравнению с контрольным штаммом B. anthracis СТИ может свидетельствовать о тенденции к нарастанию устойчивости культур, что требует изменения схемы терапии данным антибиотиком или использования для лечения и профилактики другого, более эффективного антибактериального препарата.

Таблица 7.1

ДОПУСТИМЫЕ КОЛЕБАНИЯ ЗНАЧЕНИЙ МПК АНТИБАКТЕРИАЛЬНЫХ ПРЕПАРАТОВ ДЛЯ КОНТРОЛЬНЫХ ШТАММОВ STAPHYLOCOCCUS AUREUS ATCC 25923 И BACILLUS ANTHRACIS СТИ

Антибактериальный препарат	Диапазон значений МПК, мг/л			
	агар Мюллера-Хинтона pH 7,3 +/- 0,2		агар Хоттингера pH 7,2 +/- 0,1	
	S. aureus ATCC 25923	B. anthracis СТИ	S. aureus ATCC 25923	B. anthracis СТИ
1	2	3	4	5
Бензилпенициллин	0,008 - 0,128	0,002 - 0,016	0,008 - 0,128	0,002 - 0,004
Ампициллин	0,05 - 0,1	0,008 - 0,064	0,05 - 0,1	0,008 - 0,016
Цефазолин	0,25 - 0,5	0,125 - 0,25	0,25 - 0,5	0,06 - 0,12
Цефалексин	0,25 - 1,0	0,25 - 0,5	0,25 - 1,0	0,25 - 1,0
Эритромицин	0,25 - 1,0	0,25 - 0,5	0,25 - 1,0	0,5 - 1,0
Азитромицин	0,5 - 2,0	0,5 - 1,0	0,5 - 2,0	0,5 - 2,0
Линкомицин	0,125 - 0,25	1,0 - 4,0	0,125 - 0,25	1,0 - 2,0
Канамицин	0,25 - 1,0	0,06 - 0,12	0,5 - 1,0	0,06 - 0,24
Гентамицин	0,03 - 0,06	0,03 - 0,12	0,06 - 0,12	0,03 - 0,06
Стрептомицин	0,06 - 0,12	0,06 - 0,12	0,06 - 0,12	0,06 - 0,12
Амикацин	0,5 - 1,0	0,125 - 0,25	0,5 - 1,0	0,125 - 0,25
Тетрациклин	0,03 - 0,06	0,008 - 0,016	0,06 - 0,12	0,008 - 0,016
Доксициклин	0,008 - 0,016	0,008 - 0,016	0,03 - 0,06	0,008 - 0,016
Рифампицин	0,008 - 0,064	0,008 - 0,064	0,008 - 0,064	0,008 - 0,064
Ципрофлоксацин	0,004 - 0,016	0,004 - 0,016	0,004 - 0,016	0,004 - 0,016
Офлоксацин	0,125 - 0,25	0,05 - 0,1	0,125 - 0,25	0,05 - 0,1
Пефлоксацин	0,125 - 0,25	0,05 - 0,1	0,125 - 0,25	0,05 - 0,1
Ломефлоксацин	0,125 - 0,5	0,05 - 0,1	0,125 - 0,5	0,05 - 0,1
Меропенем	0,008 - 0,032	0,002 - 0,008	0,008 - 0,032	0,002 - 0,008
Имипенем	0,008 - 0,032	0,002 - 0,008	0,008 - 0,032	0,002 - 0,008

Таблица 7.2

ДОПУСТИМЫЕ КОЛЕБАНИЯ ЗНАЧЕНИЙ ДИАМЕТРОВ ЗОН ПОДАВЛЕНИЯ РОСТА
ДЛЯ КОНТРОЛЬНЫХ ШТАММОВ STAPHYLOCOCCUS AUREUS ATCC 25923
И BACILLUS ANTHRACIS СТИ

Антибактериальный препарат	Содержание препарата в диске, мкг	Диаметр зон подавления роста, мм					
		агар Мюллера-Хинтона pH 7,3 +/- 0,2		агар Хоттингера pH 7,2 +/- 0,1		АГВ pH 7,4 +/- 0,2	
		S. aureus ATCC 25923	B. anthracis СТИ	S. aureus ATCC 25923	B. anthracis СТИ	S. aureus ATCC 25923	B. anthracis СТИ
1	2	3	4	5	6	7	8
Бензилпенициллин	10	26 - 37	32 - 39	26 - 37	34 - 40	26 - 30	32 - 39
Ампициллин	10	27 - 35	27 - 35	27 - 35	27 - 35	27 - 35	27 - 32
Цефазолин	30	29 - 35	29 - 35	29 - 35	29 - 35	29 - 35	29 - 35
Цефалексин	30	29 - 37	29 - 35	29 - 37	29 - 33	29 - 35	29 - 35
Эритромицин	15	22 - 30	18 - 24	22 - 30	18 - 24	22 - 30	18 - 24
Азитромицин	30	24 - 30	24 - 30	24 - 30	24 - 30	21 - 26	21 - 26
Линкомицин	15	22 - 32	22 - 30	22 - 32	22 - 30	22 - 32	22 - 30
Канамицин	30	19 - 26	22 - 30	19 - 26	22 - 30	19 - 26	19 - 26
Гентамицин	10	19 - 27	24 - 32	19 - 27	24 - 30	19 - 27	24 - 30
Стрептомицин	10	18 - 22	18 - 30	18 - 22	18 - 30	18 - 22	19 - 29
Амикацин	30	20 - 26	26 - 32	20 - 26	26 - 32	20 - 26	20 - 26
Тетрациклин	30	24 - 30	30 - 40	24 - 30	30 - 40	24 - 30	30 - 35
Доксициклин	10	23 - 29	30 - 40	23 - 29	30 - 40	23 - 29	27 - 32
Рифампицин	5	26 - 34	20 - 26	26 - 34	20 - 26	26 - 34	19 - 22
Ципрофлоксацин	5	22 - 30	27 - 35	22 - 30	27 - 35	22 - 30	25 - 30
Офлоксацин	5	24 - 28	27 - 35	24 - 28	27 - 35	24 - 28	23 - 30
Пефлоксацин	10	17 - 28	27 - 35	17 - 28	27 - 35	17 - 28	22 - 30
Ломефлоксацин	10	23 - 29	27 - 35	23 - 29	27 - 35	23 - 29	22 - 30
Меропенем	10	29 - 37	30 - 37	29 - 37	30 - 37	27 - 35	27 - 30

Таблица 7.3

КРИТЕРИИ ИНТЕРПРЕТАЦИИ РЕЗУЛЬТАТОВ ИССЛЕДОВАНИЯ
BACILLUS ANTHRACIS: ПОГРАНИЧНЫЕ ЗНАЧЕНИЯ ДИАМЕТРОВ ЗОН
ПОДАВЛЕНИЯ РОСТА (ММ) И ВЕЛИЧИН МПК (МГ/Л)
АНТИБАКТЕРИАЛЬНЫХ ПРЕПАРАТОВ

Антибактериальный препарат	Содержание препарата в диске, мкг	Диаметр зон подавления роста, мм		Значение МПК, мг/л	
		S*	R*	S*	R*
1	2	3	4	5	6
Бензилпенициллин	10	>= 26	<= 16	<= 0,1	>= 1,0
Ампициллин	10	>= 27	<= 16	<= 0,1	>= 1,0
Цефазолин	30	>= 29	<= 16	<= 0,2	>= 1,0
Цефалексин	30	>= 29	<= 16	<= 1,0	>= 4,0
Эритромицин	15	>= 24	<= 16	<= 1,0	>= 4,0
Азитромицин	30	>= 24	<= 16	<= 1,0	>= 4,0
Линкомицин	15	>= 23	<= 16	<= 1,0	>= 4,0
Канамицин	10	>= 19	<= 16	<= 1,0	>= 4,0
Гентамицин	10	>= 23	<= 16	<= 1,0	>= 4,0
Стрептомицин	10	>= 18	<= 16	<= 1,0	>= 4,0
Амикацин	30	>= 23	<= 16	<= 1,0	>= 4,0
Тетрациклин	30	>= 23	<= 16	<= 0,1	>= 1,0
Доксициклин	10	>= 23	<= 16	<= 0,1	>= 1,0
Рифампицин	5	>= 20	<= 13	<= 0,1	>= 1,0
Ципрофлоксацин	5	>= 17	<= 15	<= 0,1	>= 1,0
Офлоксацин	5	>= 19	<= 15	<= 0,1	>= 1,0
Пефлоксацин	10	>= 19	<= 15	<= 0,1	>= 1,0
Ломефлоксацин	10	>= 20	<= 15	<= 0,1	>= 1,0
Меропенем	10	>= 26	<= 15	<= 0,1	>= 1,0
Имипенем	-	-	-	<= 0,1	>= 1,0
Примечание: то же, что к табл. 6.3.					

Таблица 7.4

ДИАПАЗОН ЗНАЧЕНИЙ МПК АНТИБАКТЕРИАЛЬНЫХ ПРЕПАРАТОВ
И ДИАМЕТРОВ ЗОН ПОДАВЛЕНИЯ РОСТА ДЛЯ 50-ТИ
АНТИБИОТИКОЧУВСТВИТЕЛЬНЫХ ШТАММОВ B. ANTHRACIS

Антибактериальный препарат	Содержание препарата в диске, мкг	Диаметр зон подавления роста, мм		Значение МПК, мг/л	
		агар Мюллера-Хинтона pH 7,3 +/- 0,2	агар Хоттингера pH 7,2 +/- 0,1	агар Мюллера-Хинтона pH 7,3 +/- 0,2	агар Хоттингера pH 7,2 +/- 0,1
Бензилпенициллин	10	26 - 30	34 - 46	0,002 - 0,064	0,002 - 0,064
Ампициллин	10	27 - 35	27 - 35	0,008 - 0,064	0,008 - 0,016
Цефазолин	30	29 - 35	29 - 35	0,125 - 0,25	0,06 - 0,12
Цефалексин	30	29 - 35	29 - 33	0,25 - 1,0	0,25 - 1,0
Эритромицин	15	18 - 24	18 - 24	0,25 - 1,0	0,5 - 1,0
Азитромицин	30	24 - 30	24 - 30	0,5 - 2,0	0,5 - 2,0
Линкомицин	15	22 - 30	22 - 30	1,0 - 4,0	1,0 - 2,0
Канамицин	10	22 - 30	22 - 30	0,06 - 0,48	0,06 - 0,24
Гентамицин	10	24 - 32	24 - 30	0,03 - 0,12	0,03 - 0,06
Стрептомицин	10	18 - 30	18 - 30	0,06 - 0,12	0,06 - 0,12
Амикацин	30	26 - 32	26 - 32	0,125 - 0,25	0,125 - 0,25
Тетрациклин	30	30 - 40	30 - 40	0,008 - 0,016	0,008 - 0,016
Доксициклин	10	30 - 40	30 - 40	0,008 - 0,016	0,008 - 0,016
Рифампицин	5	20 - 26	20 - 26	0,008 - 0,064	0,008 - 0,064
Ципрофлоксацин	5	27 - 35	27 - 35	0,004 - 0,016	0,004 - 0,016
Офлоксацин	5	27 - 35	27 - 35	0,05 - 0,1	0,05 - 0,1
Пефлоксацин	10	27 - 35	27 - 35	0,05 - 0,1	0,05 - 0,1
Ломефлоксацин	10	27 - 35	27 - 35	0,05 - 0,4	0,05 - 0,4
Меропенем	10	30 - 37	30 - 37	0,002 - 0,008	0,002 - 0,008
Имипенем	-	-	-	0,002 - 0,008	0,002 - 0,008

8. Определение чувствительности холерного вибриона (Vibrio cholerae) к антибактериальным препаратам

8.1. Контрольные штаммы

Одним из условий стандартизации определения антибиотикограммы микроорганизмов является использование в качестве контроля заведомо чувствительных референтных штаммов (оптимально - данного вида возбудителя), для которых отработаны допустимые диапазоны значений МПК и диаметров зон подавления роста культуры микроорганизма. Для изучения антибиотикограмм культур V. cholerae предложен антибиотикочувствительный референс-штамм V. cholerae non O1 КМ 162 (Р-9741), который с 1979 г. рекомендован для контроля качества питательных сред, используемых для выделения возбудителя холеры из исследуемого материала. В качестве контрольного может быть также использован и референс-штамм Escherichia coli ATCC 25922, рекомендованный для определения антибиотикочувствительности неприхотливых бактерий.

8.2. Питательные среды

Для определения чувствительности холерного вибриона к антибактериальным препаратам обоими методами (МСР и ДДМ) может быть использован агар Мюллера-Хинтона (Muller-Hinton), pH 7,3 +/- 0,2, или агар Хоттингера, pH 7,2 +/- 0,1 (1,2 - 1,4 г/л аминного азота, 1,5 - 2% агара), и для ДДМ - дополнительно агар Гивенталя - Ведьминой (АГВ), pH 7,4 +/- 0,2. Прежде чем использовать в работе серии питательных сред, необходимо произвести оценку соответствия значений МПК и диаметров зон подавления роста (это и контроль качества дисков) на используемой среде допустимым колебаниям величин этих показателей для контрольных штаммов микроорганизмов (табл. 8.1, 8.2).

8.3. Антибактериальные препараты

Для определения чувствительности/устойчивости холерного вибриона используют антибактериальные препараты, рекомендованные МУ 3.4.1030-01 для экстренной профилактики и лечения холеры.

Препараты первого ряда - основные препараты, к которым определяют чувствительность/устойчивость холерного вибриона при выделении возбудителя от больного: доксициклин, ципрофлоксацин (или офлоксацин, пефлоксацин), триметоприм/сульфаметоксазол (или триметоприм/сульфамонометоксин), фуразолидон, гентамицин, налидиксовая кислота. Включение налидиксовой кислоты в число препаратов первого ряда определяется рекомендациями ВОЗ в связи с тем, что резистентность к этому препарату (МПК >= 128 мг/л) может сопровождаться повышением значений МПК фторхинолонов в 10 - 40 раз и приводить к снижению их эффективности.

Препараты второго ряда, чувствительность/устойчивость к которым может служить целям дополнительного выбора препарата, одним из эпидемиологических маркеров для выявления источника, отслеживания путей распространения инфекции и контроля за изменением антибиотикограммы возбудителя в ходе эпидемического процесса: тетрациклин, левомицетин, ампициллин, стрептомицин, канамицин, рифампицин, цефтриаксон или цефотаксим.

Для МСР в плотной питательной среде выбирают серии двукратно увеличивающихся концентраций антибактериальных препаратов в соответствии с пограничными значениями МПК для чувствительных и устойчивых культур холерного вибриона на агаре Мюллера-Хинтона или Хоттингера (табл. 8.3).

Препараты первого ряда:
Доксициклин 1 - 2 - 4 - 8 мг/л
Ципрофлоксацин (или офлоксацин, пефлоксацин) 0,06 - 0,125 - 0,25 - 0,5 - 1 мг/л
Налидиксовая кислота 2 - 4 - 8 - 16 мг/л
Триметоприм/сульфаметоксазол (или триметоприм/сульфамонометоксин) 1 - 2 - 4 - 8 мг/л (по триметоприму)
Фуразолидон 2 - 4 - 8 - 16 мг/л
Гентамицин 2 - 4 - 8 - 16 мг/л.
Препараты второго ряда:
Тетрациклин 2 - 4 - 8 - 16 мг/л
Левомицетин 2 - 4 - 8 - 16 мг/л
Цефотаксим (или цефтриаксон) 0,5 - 1 - 2 - 4 мг/л
Ампициллин 2 - 4 - 8 - 16 мг/л
Стрептомицин 8 - 16 - 32 - 64 мг/л
Канамицин 8 - 16 - 32 - 64 мг/л
Рифампицин 2 - 4 - 8 - 16 мг/л.

С помощью штампа-репликатора можно одновременно изучить антибиотикограммы 20 - 50-ти культур, включая контрольный антибиотикочувствительный штамм, что значительно экономит средства и время, обеспечивая наибольший объем информации.

Для постановки ДДМ используют проверенные коммерческие диски с определенными концентрациями антибактериальных препаратов (табл. 8.2).

8.4. Посевная доза, инокуляция, инкубация

При определении чувствительности холерного вибриона к АБП с помощью ДДМ используют суспензию микробных клеток в 0,85%-ном изотоническом растворе хлорида натрия из 16 - 18 ч. чистой агаровой культуры возбудителя или 1 - 3-х типичных изолированных колоний (полиуглеводная среда или щелочной агар), стандартизированную по отраслевому оптическому стандарту мутности ГИСК им. Л.А. Тарасевича на 5 ед. (~ 3,0 x 10^8 КОЕ/мл). Суспензию наносят на поверхность агара в объеме 0,2 - 0,3 мл (~ n x 10^7 КОЕ), равномерно распределяют шпателем и ожидают полного впитывания в агар. Затем накладывают диски (не более шести на чашку диаметром 100 мм). Инкубацию посевов проводят при 37 °C. Результаты можно учитывать при появлении сливного роста в контроле (агар без дисков). Предварительный учет можно осуществлять через 6 - 8 ч, окончательный - через 18 ч. Диаметры зон задержки роста микробов вокруг дисков, включая диаметр самого диска, измеряют с точностью до 1 мм; предпочтительнее пользоваться штангенциркулем, кронциркулем или специальной линейкой-лекалом.

Для МСР используют суспензию той же концентрации микробных клеток/мл и с помощью штампа-репликатора или касанием пипетки с тонким концом наносят ее на агаровые пластины с разными концентрациями антибактериальных препаратов, начиная с чашек с минимальным содержанием антибиотиков. Посевная доза составляет ~ n x 10^5 - 10^6 КОЕ соответственно. Посевы инкубируют при температуре 37 °C. Учет отношения культуры к антибактериальным препаратам при такой величине посевной дозы можно проводить через 12 - 18 ч при наличии роста в контроле (агар без антибиотика). Чувствительность/устойчивость культур определяют по минимальной концентрации препарата, подавляющей рост возбудителя (МПК, мг/л) на среде культивирования.

8.5. Критерии оценки чувствительности/устойчивости холерного вибриона к антибактериальным препаратам

Интерпретацию результатов определения чувствительности культур холерного вибриона проводят в соответствии с пограничными значениями МПК и диаметров зон подавления роста возбудителя (табл. 8.3), адаптированными именно для этого вида микроорганизма, с учетом диапазона значений для 50-ти антибиотикочувствительных штаммов V. cholerae cholerae и eltor in vitro (табл. 8.4) и соотнесения данных in vitro с эффективностью in vivo, а также клиническими наблюдениями и особенностями фармакокинетики препарата. В табл. 8.3 даны пограничные значения МПК и диаметров зон подавления роста для чувствительных и устойчивых культур на агаре Мюллера-Хинтона, агаре Хоттингера и для ДДМ - дополнительно на АГВ. Между этими показателями находятся значения для культур с промежуточной устойчивостью. Необходимо учитывать также результаты определения МПК и диаметры зон подавления роста для контрольных штаммов (табл. 8.1, 8.2) на используемой серии питательной среды. Увеличение значений МПК препаратов для изучаемых штаммов холерного вибриона в сравнении с МПК для контрольного штамма может свидетельствовать о тенденции к нарастанию устойчивости культуры, что требует использования в клинике максимальных терапевтических доз, удлинения сроков их применения, а также обязательного контроля эффективности на фоне этиотропной терапии (исследование материала от больных на 2 - 3 день после начала лечения), что может потребовать замены используемого препарата на эффективный в случае выделения культуры возбудителя.

Таблица 8.1

ДОПУСТИМЫЕ КОЛЕБАНИЯ ЗНАЧЕНИЙ МПК АНТИБАКТЕРИАЛЬНЫХ ПРЕПАРАТОВ ДЛЯ КОНТРОЛЬНЫХ ШТАММОВ E. COLI ATCC 25922 И V. CHOLERAE NON O1 KM 162

Антибактериальный препарат	Диапазон значений МПК, мг/л			
	агар Мюллера-Хинтона pH 7,3 +/- 0,2		агар Хоттингера pH 7,2 +/- 0,1	
	E. coli ATCC 25922	V. cholerae non O1 KM 162	E. coli ATCC 25922	V. cholerae non O1 KM 162
1	2	3	4	5
Доксициклин	0,5 - 2,0	0,25 - 1,0	0,5 - 2,0	0,25 - 1,0
Тетрациклин	0,5 - 2,0	0,5 - 1,0	0,5 - 2,0	0,5 - 1,0
Левомицетин	2 - 8	1 - 4	2 - 8	1 - 4
Налидиксовая кислота	1 - 4	1 - 4	1 - 4	0,5 - 2,0
Ципрофлоксацин	0,004 - 0,016	0,001 - 0,06	0,004 - 0,03	0,001 - 0,03
Офлоксацин	0,015 - 0,12	0,004 - 0,03	0,001 - 0,02	0,004 - 0,03
Норфлоксацин	0,03 - 0,12	0,016 - 0,03	0,004 - 0,06	0,008 - 0,03
Пефлоксацин	0,03 - 0,12	0,004 - 0,03	0,016 - 0,12	0,002 - 0,016
Ломефлоксацин	0,03 - 0,12	0,016 - 0,03	0,016 - 0,06	0,004 - 0,03
Левофлоксацин	0,008 - 0,06	0,004 - 0,016	0,008 - 0,06	0,004 - 0,016
Рифампицин	4 - 16	1 - 4	4 - 16	1 - 4
Стрептомицин	4 - 8	4 - 8	2 - 8	4 - 8
Гентамицин	0,25 - 1,0	1 - 2	0,25 - 1,0	1 - 2
Канамицин	1 - 4	4 - 16	1 - 4	2 - 8
Нетилмицин	0,5 - 1,0	1 - 2	0,25 - 1,0	0,5 - 2,0
Амикацин	0,5 - 4,0	1 - 4	1 - 8	1 - 8
Тобрамицин	0,25 - 1,0	1 - 2	1 - 2	0,5 - 2,0
Ампициллин	2 - 8	2 - 8	2 - 8	2 - 8
Цефотаксим	0,03 - 0,12	0,016 - 0,06	0,03 - 0,12	0,008 - 0,06
Цефтриаксон	0,03 - 0,12	0,016 - 0,06	0,03 - 0,12	0,008 - 0,06
Фуразолидон	4 - 16	2 - 8	4 - 16	2 - 8

Триметоприм/ сульфаметокса-зол	0,5/9,5	1/19 - 2/38	0,5/9,5	1/19 - 2/38

Таблица 8.2

ДОПУСТИМЫЕ КОЛЕБАНИЯ ЗНАЧЕНИЙ ДИАМЕТРОВ ЗОН ПОДАВЛЕНИЯ РОСТА ДЛЯ КОНТРОЛЬНЫХ ШТАММОВ E. COLI ATCC 25922 И V. CHOLERAE NON O1 KM 162

Антибактери-альный препарат	Содер-жание препа-рата в диске, мкг	Диаметр зон подавления роста, мм					
		агар Мюллера-Хинтона pH 7,3 +/- 0,2		агар Хоттингера pH 7,2 +/- 0,1		АГВ pH 7,4 +/- 0,2	
		E. coli ATCC 25922	V. cho-lerae non O1 KM 162	E. coli ATCC 25922	V. cho-lerae non O1 KM 162	E. coli ATCC 25922	V. cho-lerae non O1 KM 162
1	2	3	4	5	6	7	8
Доксициклин	10	16 - 19	20 - 30	16 - 19	20 - 25	16 - 19	20 - 25
Тетрациклин	30	18 - 25	25 - 30	18 - 25	23 - 29	18 - 26	20 - 25
Левомицетин	30	21 - 27	25 - 30	21 - 27	25 - 30	19 - 27	25 - 30
Налидиксовая кислота	30	22 - 28	25 - 32	22 - 28	25 - 32	22 - 28	25 - 32
Ципрофлоксацин	5	30 - 40	30 - 40	30 - 40	30 - 40	30 - 40	30 - 40
Офлоксацин	5	29 - 33	30 - 40	27 - 33	30 - 40	27 - 33	30 - 40
Норфлоксацин	10	28 - 35	30 - 35	28 - 35	30 - 40	28 - 35	30 - 40
Пефлоксацин	10	29 - 33	30 - 35	30 - 40	30 - 40	29 - 35	30 - 40
Ломефлоксацин	10	27 - 33	30 - 40	28 - 35	35 - 45	28 - 35	30 - 40
Левофлоксацин	5	29 - 37	29 - 35	28 - 35	30 - 40	28 - 35	30 - 40
Рифампицин	5	8 - 10	21 - 27	8 - 15	20 - 27	7 - 11	20 - 27
Стрептомицин	30	15 - 20	17 - 20	17 - 25	17 - 25	14 - 19	18 - 25
Гентамицин	10	19 - 26	21 - 25	19 - 26	21 - 30	21 - 30	21 - 30
Канамицин	30	17 - 25	20 - 25	17 - 25	18 - 25	15 - 19	18 - 25
Нетилмицин	30	22 - 30	21 - 25	22 - 30	21 - 30	22 - 30	21 - 30
Амикацин	30	19 - 26	18 - 25	19 - 26	18 - 25	19 - 26	18 - 25
Тобрамицин	10	18 - 26	20 - 25	18 - 26	20 - 25	18 - 26	20 - 30
Ампициллин	10	16 - 22	16 - 22	16 - 22	16 - 22	16 - 22	16 - 22
Цефотаксим	30	29 - 35	30 - 40	29 - 35	30 - 40	29 - 35	30 - 40
Цефтриаксон	30	29 - 35	30 - 40	29 - 35	30 - 40	29 - 35	30 - 40
Фуразолидон	300	20 - 25	18 - 25	20 - 25	18 - 25	22 - 29	18 - 25
Триметоприм/ сульфаметокса-зол	1,25/ 23,75	23 - 29	20 - 25	19 - 25	21 - 28	19 - 25	21 - 28

Таблица 8.3

КРИТЕРИИ ИНТЕРПРЕТАЦИИ РЕЗУЛЬТАТОВ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ V. CHOLERAE O1 И O139 СЕРОГРУПП: ПОГРАНИЧНЫЕ ЗНАЧЕНИЯ ДИАМЕТРОВ ЗОН ПОДАВЛЕНИЯ РОСТА (ММ) И МПК (МГ/Л) АНТИБАКТЕРИАЛЬНЫХ ПРЕПАРАТОВ

Антибактери-альный препарат	Содер-жание в диске, мкг	Диаметр зон подавления роста, мм		Значение МПК, мг/л	
		S*	R*	S*	R*
1	2	3	4	5	6
Доксициклин	10	>= 19	<= 17	<= 2,0	>= 4,0
Тетрациклин	30	>= 19	<= 17	<= 4,0	>= 8,0
Левомицетин	30	>= 23	<= 19	<= 4,0	>= 16,0
Налидиксовая кислота	30	>= 20	<= 18	<= 4,0	>= 16,0
Ципрофлоксацин	5	>= 25	<= 19	<= 0,1	>= 1,0
Офлоксацин	5	>= 25	<= 15	<= 0,1	>= 1,0
Пефлоксацин	10	>= 22	<= 16	<= 0,1	>= 1,0
Норфлоксацин	10	>= 22	<= 19	<= 0,1	>= 1,0
Ломефлокацин	10	>= 22	<= 19	<= 0,1	>= 1,0
Левофлоксацин	5	>= 22	<= 19	<= 0,1	>= 1,0
Рифампицин	5	>= 20	<= 13	<= 4,0	>= 16,0
Стрептомицин	30	>= 15	<= 12	<= 16,0	>= 32,0
Гентамицин	10	>= 16	<= 12	<= 4,0	>= 8,0
Канамицин	30	>= 17	<= 15	<= 16,0	>= 32,0
Амикацин	30	>= 17	< 15	<= 8,0	>= 16,0
Тобрамицин	10	>= 17	< 12	<= 4,0	>= 16,0
Нетилмицин	30	>= 19	< 17	<= 4,0	>= 8,0
Ампициллин	10	>= 17	<= 13	<= 4,0	>= 16,0
Цефотаксим	30	>= 25	< 15	<= 1,0	>= 4,0
Цефтриаксон	30	>= 25	< 15	<= 1,0	>= 4,0
Фуразолидон	300	>= 18	< 15	<= 4,0	>= 16,0

Триметоприм/ сульфаметоксазол	1,25/ 23,75	>= 20	< 15	<= 2,0/38,0	>= 8,0/152,0
Примечание: то же, что к табл. 6.3.					

Таблица 8.4

ДИАПАЗОН ЗНАЧЕНИЙ МПК АНТИБАКТЕРИАЛЬНЫХ
ПРЕПАРАТОВ И ДИАМЕТРОВ ЗОН ПОДАВЛЕНИЯ РОСТА ДЛЯ 50-ТИ
АНТИБИОТИКОЧУВСТВИТЕЛЬНЫХ ШТАММОВ V. CHOLERAE O1 СЕРОГРУППЫ

Антибактериальный препарат	Содержание препарата в диске, мкг	Диаметр зон подавления роста, мм			Значение МПК, мг/л	
		агар Мюллера-Хинтона pH 7,3 +/- 0,2	агар Хоттингера pH 7,2 +/- 0,1	АГВ pH 7,4 +/- 0,2	агар Мюллера-Хинтона pH 7,3 +/- 0,2	агар Хоттингера pH 7,2 +/- 0,1
1	2	3	4	5	6	7
Доксициклин	10	18 - 25	18 - 25	18 - 25	0,25 - 0,5	0,25 - 0,5
Тетрациклин	30	20 - 25	20 - 25	20 - 25	0,5 - 2,0	0,5 - 1,0
Левомицетин	30	25 - 30	23 - 29	25 - 30	0,5 - 2,0	1 - 2
Налидиксовая кислота	30	25 - 32	25 - 32	25 - 35	0,5 - 1,0	0,5 - 2,0
Ципрофлоксацин	5	30 - 40	30 - 40	30 - 40	0,001 - 0,004	0,002 - 0,004
Офлоксацин	5	29 - 35	29 - 35	29 - 35	0,002 - 0,03	0,002 - 0,004
Норфлоксацин	10	30 - 40	30 - 40	30 - 40	0,001 - 0,016	0,002 - 0,004
Пефлоксацин	10	30 - 40	30 - 40	30 - 40	0,004 - 0,03	0,004 - 0,016
Ломефлоксацин	10	30 - 40	30 - 40	30 - 40	0,002 - 0,03	0,002 - 0,004
Левофлоксацин	5	29 - 35	29 - 35	29 - 35	0,004 - 0,03	0,002 - 0,004
Рифампицин	5	20 - 27	20 - 27	20 - 27	0,5 - 2,0	0,5 - 1,0
Стрептомицин	30	19 - 29	20 - 30	18 - 25	2 - 16	4 - 8
Гентамицин	10	21 - 25	21 - 30	21 - 30	0,25 - 2,0	0,5 - 1,0
Канамицин	30	20 - 25	20 - 25	20 - 25	2 - 16	2 - 8
Нетилмицин	30	21 - 30	21 - 30	21 - 30	0,5 - 1,0	0,5 - 1,0
Амикацин	30	18 - 25	18 - 25	18 - 25	2 - 16	2 - 8
Тобрамицин	10	20 - 25	20 - 30	20 - 30	0,5 - 2,0	1 - 2
Ампициллин	10	16 - 22	16 - 22	16 - 22	0,5 - 4,0	1 - 4
Цефотаксим	30	30 - 40	30 - 40	30 - 40	0,002 - 0,12	0,002 - 0,03
Цефтриаксон	30	30 - 40	30 - 40	30 - 40	0,002 - 0,12	0,002 - 0,03
Фуразолидон	300	18 - 25	18 - 25	18 - 25	1 - 4	2 - 4
Триметоприм/ сульфаметоксазол	1,25/ 23,75	20 - 25	20 - 25	20 - 25	0,5/9,5 - 2,0/38,0	0,5/9,5 - 1,0/19,0

9. Определение чувствительности туляремийного микроба (Francisella tularensis) к антибактериальным препаратам

9.1. Контрольные штаммы

В качестве контрольных штаммов для определения антибиотикочувствительности туляремийного микроба предлагается использовать штамм Escherichia coli ATCC 25922 (для контроля качества дисков) и вакцинный штамм Francisella tularensis 15 (для контроля качества питательных сред и качества дисков).

9.2. Питательные среды

В качестве оптимальных питательных сред для выращивания и определения антибиотикочувствительности штаммов туляремийного микроба трех основных подвидов (subsp. nearctica, mediaasiatica, holarctica) предлагается использовать следующие среды:

1. Агар Мюллера-Хинтона с добавлением следующих ростовых компонентов (г/л среды): $MgSO_4$ - 0,05; $FeSO_4$ - 0,1; L-цистеин - 0,6; лимоннокислый натрий - 1,2; KCl - 2; K_2HPO_4 - 4; глюкоза - 15. Стерильные (кипячение 20 мин.) ростовые добавки вносят в растопленный и остуженный агар перед разливанием его в чашки Петри.
2. Эритрит-агар с добавлением вышеперечисленных ростовых компонентов.
3. Агар АДЭТ (Прилож. 1). В связи с тем, что данная среда не подлежит автоклавированию и содержит ряд антибиотиков, она может быть использована только для ДДМ.
4. Агар LB (г/л): триптон Bacto - 10; дрожжевой экстракт Bacto - 5; NaCl - 10 с добавлением ростовых добавок (п. 1).

Целесообразность включения в работу разнообразных питательных сред определяется различными техническими и материальными возможностями лабораторий, допущенных к исследованию возбудителя туляремии.

Перед использованием питательных сред для контроля их качества и контроля качества используемых дисков необходимо провести определение соответствия значений МПК и диаметров зон подавления роста для контрольных штаммов микроорганизмов (табл. 9.1 и 9.2).

9.3. Антибактериальные препараты

Для определения чувствительности/устойчивости возбудителя туляремии используют антибактериальные препараты, применяемые для профилактики и лечения туляремии.

Препараты первого ряда - основные препараты, к которым проводят определение чувствительности бактерий: доксициклин, ципрофлоксацин (офлоксацин, пефлоксацин, ломефлоксацин, левофлоксацин), стрептомицин, гентамицин, рифампицин.

Препараты второго ряда - чувствительность/устойчивость к которым может определяться для дополнительного выбора, а также для проведения мониторинга чувствительности/устойчивости возбудителя: амикацин, канамицин, налидиксовая кислота.

Для МСР в плотной питательной среде готовят серии двукратно увеличивающихся концентраций антибактериальных препаратов, ориентируясь на пограничные значения МПК для чувствительных и устойчивых штаммов туляремийного микроба на рекомендуемых питательных средах.

Препараты первого ряда:

Доксициклин - 2 - 4 - 8 - 16 мг/л

Ципрофлоксацин (или офлоксацин, пефлоксацин, левофлоксацин, ломефлоксацин) - 0,12 - 0,25 - 0,5 - 1 - 2 мг/л

Стрептомицин - 2 - 4 - 8 - 16 мг/л

Гентамицин - 2 - 4 - 8 - 16 мг/л

Рифампицин - 1 - 2 - 4 - 8 мг/л.

Препараты второго ряда:

Амикацин - 4 - 8 - 16 - 32 мг/л

Канамицин - 4 - 8 - 16 - 32 мг/л

Налидиксовая кислота - 2 - 4 - 8 - 16 мг/л.

С целью экономии времени и средств для проведения исследования МСР могут применяться штампы-репликаторы, позволяющие проводить изучение 25 - 50 культур одновременно, включая контрольные штаммы.

При определении антибиотикограмм бактерий ДДМ используют проверенные коммерческие диски с определенными концентрациями антибактериальных препаратов.

9.4. Посевная доза, инокуляция, инкубация

При определении чувствительности с помощью ДДМ используют суспензию микробных клеток в 0,85%-ном растворе хлорида натрия, приготовленную из 24 ч. агаровой культуры F. tularensis.

Суспензию стандартизируют по отраслевому стандарту мутности ГИСК им. Л.А. Тарасевича на 5 ед., что соответствует $n \times 10^{8} - 10^{9}$ КОЕ/мл туляремийного микроба в зависимости от используемых штаммов и питательных сред. Суспензию наносят на поверхность агара в объеме 0,3 мл ($n \times 10^{7} - 10^{8}$ КОЕ), равномерно распределяют шпателем и выдерживают до полного впитывания в агар. После этого накладывают диски (не более 6 на чашку диаметром 100 мм). Посевы инкубируют при 37 °C в течение 24 - 48 ч. Результаты учитывают только в случае появления сливного роста на контрольных чашках (без дисков). Диаметр зон задержки роста бактерий вокруг дисков (включая диаметр самого диска) измеряют с точностью до 1 мм линейкой-лекалом или штангенциркулем.

Для МСР используют суспензию той же концентрации м.к./мл, которую наносят небольшими каплями с помощью штампа-репликатора или касанием пипетки (посевная доза $n \times 10^{6}$ КОЕ) на чашки с питательной средой, содержащей различные концентрации антибактериальных препаратов, начиная с чашки с минимальным содержанием антибиотика. Посевы инкубируют при 37 °C в течение 24 - 48 ч. Учет результатов проводят при наличии роста культуры на контрольных чашках (без антибиотика). Чувствительность/устойчивость культур оценивают по минимальной концентрации препарата, подавляющей рост микробов (МПК, мг/л).

9.5. Критерии оценки чувствительности/устойчивости туляремийного микроба к антибактериальным препаратам

Интерпретацию результатов определения чувствительности штаммов F. tularensis проводят в соответствии с пограничными значениями МПК и диаметрами зон задержки роста для чувствительных и устойчивых культур (табл. 9.3), адаптированными именно для этого вида микробов, на конкретной питательной среде с учетом диапазона значений для 20-ти антибиотикочувствительных штаммов F. tularensis (табл. 9.4).

Увеличение значений МПК препаратов или же уменьшение диаметра зон подавления роста изучаемых штаммов туляремийного микроба по сравнению с этими показателями для контрольных штаммов может свидетельствовать о тенденции к нарастанию устойчивости микроорганизмов и требует использования максимальных терапевтических доз и удлинения сроков их применения.

Таблица 9.1

ДОПУСТИМЫЕ КОЛЕБАНИЯ ЗНАЧЕНИЙ МПК АНТИБАКТЕРИАЛЬНЫХ ПРЕПАРАТОВ ДЛЯ КОНТРОЛЬНЫХ ШТАММОВ ESCHERICHIA COLI ATCC 25922 И FRANCISELLA TULARENSIS 15

Антибактериальный препарат	Диапазон значений МПК, мг/л					
	агар Мюллера-Хинтона с ростовыми добавками pH 7,3 +/- 0,2		агар LB с ростовыми добавками pH 7,1 +/- 0,1		эритрит-агар с ростовыми добавками pH 7,2 +/- 0,1	
	E. coli ATCC 25922	F. tularensis 15	E. coli ATCC 25922	F. tularensis 15	E. coli ATCC 25922	F. tularensis 15
Гентамицин	2 - 4	1 - 2	2 - 4	1 - 2	2 - 4	1 - 2
Амикацин	4 - 8	2 - 4	4 - 8	2 - 4	4 - 8	2 - 4
Канамицин	4 - 8	2 - 4	4 - 8	2 - 4	4 - 8	2 - 4
Стрептомицин	4 - 8	1 - 2	4 - 8	1 - 2	4 - 8	1 - 2
Доксициклин	0,5 - 2,0	0,5 - 1,0	1 - 2	1 - 2	1 - 2	1 - 2
Налидиксовая кислота	1 - 4	1 - 2	1 - 4	1 - 2	1 - 4	1 - 2
Ципрофлоксацин	0,016 - 0,032	0,06 - 0,12	0,016 - 0,032	0,06 - 0,12	0,016 - 0,032	0,06 - 0,12
Офлоксацин	0,06 - 0,12	0,12 - 0,25	0,06 - 0,12	0,12 - 0,25	0,06 - 0,12	0,12 - 0,25
Пефлоксацин	0,06 - 0,12	0,12 - 0,25	0,06 - 0,12	0,12 - 0,25	0,06 - 0,12	0,12 - 0,25

Ломефлокса-цин	0,12 - 0,5	0,12 - 0,25	0,12 - 0,5	0,12 - 0,25	0,12 - 0,5	0,12 - 0,5
Левофлокса-цин	0,012 - 0,03	0,03 - 0,06	0,012 - 0,03	0,03 - 0,06	0,012 - 0,033	0,06 - 0,12
Рифампицин	4 - 16	0,25 - 0,5	4 - 16	0,25 - 0,5	4 - 16	0,5 - 1,0

Таблица 9.2

ДОПУСТИМЫЕ КОЛЕБАНИЯ ЗНАЧЕНИЙ ДИАМЕТРОВ ЗОН ПОДАВЛЕНИЯ РОСТА
ДЛЯ КОНТРОЛЬНЫХ ШТАММОВ ESCHERICHIA COLI ATCC 25922
И FRANCISELLA TULARENSIS 15

Антибактери-альный препарат	Со-держа-ние пре-парата в диске, мкг	Диаметр зон подавления роста, мм							
		агар Мюллера-Хинтона с ростовыми добавками pH 7,3 +/- 0,2		агар LB с ростовыми добавками pH 7,1 +/- 0,1		эритрит-агар с ростовыми добавками pH 7,2 +/- 0,1		АДЭТ pH 7,2 +/- 0,1	
		E. coli ATCC 25922	F. tula-rensis 15	E. coli ATCC 25922	F. tula-rensis 15	E. coli ATCC 25922	F. tula-rensis 15	E. coli ATCC 25922	F. tula-rensis 15
Гентамицин	10	16 - 25	25 - 30	16 - 25	25 - 30	16 - 25	25 - 30	16 - 25	25 - 30
Амикацин	30	16 - 25	25 - 30	16 - 25	25 - 30	16 - 25	25 - 30	16 - 25	25 - 30
Канамицин	30	16 - 25	25 - 30	16 - 25	25 - 30	16 - 25	25 - 30	16 - 25	25 - 30
Стрептомицин	30	15 - 25	25 - 30	15 - 25	25 - 30	15 - 25	25 - 30	16 - 25	25 - 30
Доксициклин	10	16 - 20	25 - 30	16 - 20	25 - 30	16 - 20	25 - 30	16 - 20	25 - 30
Налидиксовая кислота	30	22 - 28	25 - 30	22 - 28	25 - 30	22 - 28	25 - 30	22 - 28	25 - 30
Ципрофлокса-цин	5	30 - 35	30 - 35	30 - 35	30 - 35	30 - 35	30 - 35	30 - 35	30 - 35
Офлоксацин	5	25 - 30	30 - 35	25 - 30	30 - 35	25 - 30	30 - 35	25 - 30	30 - 35
Пефлоксацин	10	25 - 30	30 - 35	25 - 30	30 - 35	25 - 30	30 - 35	25 - 30	30 - 35
Ломефлокса-цин	10	25 - 30	25 - 30	25 - 30	25 - 30	25 - 30	25 - 30	25 - 30	25 - 30
Левофлокса-цин	5	25 - 30	30 - 35	25 - 30	30 - 35	25 - 30	30 - 35	25 - 30	30 - 35
Рифампицин	5	8 - 10	25 - 30	8 - 10	25 - 30	8 - 10	25 - 30	8 - 10	25 - 30

Таблица 9.3

КРИТЕРИИ ИНТЕРПРЕТАЦИИ РЕЗУЛЬТАТОВ ИССЛЕДОВАНИЯ FRANCISELLA
TULARENSIS: ПОГРАНИЧНЫЕ ЗНАЧЕНИЯ ДИАМЕТРОВ ЗОН ПОДАВЛЕНИЯ
РОСТА (ММ) И ВЕЛИЧИН МПК (МГ/Л) АНТИБАКТЕРИАЛЬНЫХ ПРЕПАРАТОВ

Антибактериаль-ный препарат	Содержа-ние препарата в диске, мкг	Диаметр зон подавления роста, мм		Значение МПК, мг/л	
		S*	R*	S*	R*
Гентамицин	10	>= 25	<= 20	<= 4	>= 16
Амикацин	30	>= 25	<= 20	<= 8	>= 32
Канамицин	30	>= 25	<= 20	<= 8	>= 32
Стрептомицин	30	>= 25	<= 20	<= 4	>= 16
Доксициклин	10	>= 25	<= 20	<= 4	>= 16
Налидиксовая кислота	30	>= 25	<= 20	<= 4	>= 16
Ципрофлоксацин	5	>= 30	<= 25	<= 0,25	>= 1
Офлоксацин	5	>= 30	<= 25	<= 0,25	>= 1
Пефлоксацин	10	>= 30	<= 25	<= 0,25	>= 1
Ломефлоксацин	10	>= 25	<= 20	<= 1	>= 2
Левофлоксацин	5	>= 30	<= 25	<= 0,25	>= 1
Рифампицин	5	>= 25	<= 20	<= 2	>= 8
Примечание: то же, что к табл. 6.3.					

Таблица 9.4

ДИАПАЗОН ЗНАЧЕНИЙ МПК АНТИБАКТЕРИАЛЬНЫХ
ПРЕПАРАТОВ И ДИАМЕТРОВ ЗОН ПОДАВЛЕНИЯ РОСТА ДЛЯ 20-ТИ
АНТИБИОТИКОЧУВСТВИТЕЛЬНЫХ ШТАММОВ FRANCISELLA TULARENSIS
ТРЕХ ОСНОВНЫХ ПОДВИДОВ (SUBSP. NEARCTICA,
MEDIAASIATICA, HOLARCTICA)

Антибактери-альный препарат	Содер-жание препа-рата в диске, мкг	Диаметр зон подавления роста, мм				Значение МПК, мг/л		
		агар Мюллера-Хинтона с ростовыми добавками pH 7,3	агар LB с ростовыми добавками pH 7,1 +/- 0,1	эритрит-агар с ростовыми добавками pH 7,2 +/- 0,1	АДЭТ pH 7,2 +/- 0,1	агар Мюллера-Хинтона с ростовыми добавками pH 7,3 +/-	агар LB с ростовыми добавками pH 7,1 +/- 0,1	эритрит-агар с ростовыми добавками pH 7,2 +/- 0,1

		+/- 0,2				0,2		
1	2	3	4	5	6	7	8	9
Гентамицин	10	26 - 30	25 - 33	25 - 33	25 - 36	0,5 - 2,0	1 - 2	0,5 - 2,0
Амикацин	30	26 - 30	25 - 30	25 - 30	25 - 35	2 - 4	1 - 4	2 - 4
Канамицин	30	25 - 35	25 - 35	25 - 35	29 - 35	1 - 4	2 - 4	1 - 4
Стрептомицин	30	25 - 30	25 - 30	25 - 30	25 - 30	1 - 2	1 - 2	1 - 2
Доксициклин	10	25 - 35	25 - 35	25 - 35	25 - 35	0,25 - 1,0	0,5 - 2,0	1 - 2
Налидиксовая кислота	30	25 - 38	25 - 38	25 - 38	25 - 38	1 - 4	1 - 4	1 - 4
Ципрофлокса-цин	5	30 - 38	30 - 35	30 - 35	30 - 38	0,03 - 0,12	0,03 - 0,12	0,03 - 0,12
Офлоксацин	5	30 - 38	30 - 38	30 - 38	30 - 38	0,06 - 0,12	0,06 - 0,25	0,06 - 0,25
Пефлоксацин	10	30 - 38	30 - 38	30 - 38	30 - 38	0,06 - 0,25	0,06 - 0,25	0,12 - 0,25
Ломефлокса-цин	10	25 - 35	25 - 35	25 - 35	25 - 35	0,12 - 0,25	0,12 - 0,25	0,12 - 0,5
Левофлокса-цин	5	30 - 40	30 - 40	30 - 40	30 - 40	0,016 - 0,06	0,016 - 0,06	0,03 - 0,12
Рифампицин	5	25 - 38	25 - 35	25 - 35	25 - 35	0,25 - 0,5	0,25 - 0,5	0,25 - 1

10. Определение чувствительности бруцелл (Brucella spp.) к антибактериальным препаратам

10.1. Контрольные штаммы

В качестве контрольных для определения антибиотикочувствительности бруцелл предлагается использовать штамм Escherichia coli ATCC 25922 и вакцинный штамм B. abortus 19 BA (для контроля качества питательных сред, качества дисков, стандартизации определения антибиотикограммы).

Диапазоны значений МПК и зон подавления роста для контрольных штаммов представлены в табл. 10.1 и 10.2.

10.2. Питательные среды

В качестве оптимальных питательных сред для выращивания и определения антибиотикочувствительности штаммов возбудителя бруцеллеза трех видов (B. abortus, B. suis, B. melitensis) предлагается использовать:

1. Агар Мюллера-Хинтона (pH 7,3 +/- 0,2).
2. Агар Мюллера-Хинтона с добавлением следующих ростовых компонентов (г/л среды): $MgSO_4$ - 0,05; $FeSO_4$ - 0,1; L-цистеин - 0,6; лимоннокислый натрий - 1,2; KCl - 2; K_2HPO_4 - 4; глюкоза - 15. Стерильные (кипячение 20 мин.) ростовые добавки вносят в растопленный и остуженный агар перед разливанием его в чашки Петри.
3. Эритрит-агар.
4. Эритрит-агар с добавлением вышеперечисленных ростовых компонентов.
5. Агар LB (г/л): триптон Bacto - 10; дрожжевой экстракт Bacto - 5; NaCl - 10 с добавлением ростовых добавок (п. 2).

Использование среды Мюллера-Хинтона и эритрит-агара без ростовых добавок позволяет проводить учет результатов через 48 ч; добавление в перечисленные среды ростовых добавок сокращает срок учета до 24 ч.

Целесообразность включения в работу разнообразных питательных сред определяется различными техническими и материальными возможностями лабораторий, допущенных к исследованию возбудителя бруцеллеза.

Перед использованием питательных сред для контроля их качества и используемых дисков необходимо провести определение соответствия значений МПК и диаметров зон подавления роста для контрольных штаммов микроорганизмов (табл. 10.1 и 10.2).

10.3. Антибактериальные препараты

Для определения чувствительности/устойчивости возбудителя бруцеллеза используют антибактериальные препараты, применяемые для профилактики и лечения бруцеллеза.

Препараты первого ряда - основные препараты, к которым проводят определение чувствительности бактерий: гентамицин, стрептомицин, доксициклин, рифампицин, ципрофлоксацин (офлоксацин, пефлоксацин, ломефлоксацин, левофлоксацин).

Препараты второго ряда, чувствительность/устойчивость к которым может определяться для дополнительного выбора средств этиотропной терапии и эпидемиологического надзора за антибиотикочувствительностью/устойчивостью: амикацин, канамицин, тетрациклин, налидиксовая кислота.

Для МСР в плотной питательной среде готовят серии двукратно увеличивающихся концентраций антибактериальных препаратов, ориентируясь на пограничные значения МПК для чувствительных и устойчивых штаммов бруцелл на рекомендуемых питательных средах.

Препараты первого ряда:

Гентамицин, стрептомицин 4 - 8 - 16 - 32 мг/л

Ципрофлоксацин 2 - 4 - 8 - 16 мг/л (или офлоксацин, пефлоксацин, ломефлоксацин 4 - 8 - 16 - 32 мг/л; или левофлоксацин 1 - 2 - 4 - 8 мг/л)

Доксициклин 2 - 4 - 8 - 16 - 32 мг/л

Рифампицин 2 - 4 - 8 - 16 мг/л.

Препараты второго ряда:

Амикацин, канамицин 8 - 16 - 32 - 64 мг/л

Тетрациклин 2 - 4 - 8 - 16 мг/л

Налидиксовая кислота 16 - 32 - 64 - 128 мг/л.

С целью экономии времени и средств для проведения исследования могут применяться штампы-репликаторы, позволяющие проводить изучение 25 - 50 штаммов одновременно с включением контрольного антибиотикочувствительного штамма. При определении антибиотикограмм бактерий ДДМ используют проверенные коммерческие диски с определенными концентрациями антибактериальных препаратов.

10.4. Посевная доза, инокуляция, инкубация

При определении чувствительности с помощью ДДМ используют суспензию микробных клеток в 0,85%-ном растворе хлорида натрия, приготовленную из 24 ч. агаровой культуры возбудителя.

Суспензию стандартизируют по отраслевому стандарту мутности ГИСК им. Л.А. Тарасевича на 5 ед. (~ $n \times 10^{8}$ КОЕ/мл). Суспензию наносят на поверхность агара в объеме 0,3 мл ($n \times 10^{7}$ КОЕ), равномерно распределяют шпателем и выдерживают до полного впитывания в агар. После этого накладывают диски (не более 6 на чашку диаметром 100 мм). Посевы инкубируют при 37 °С в течение 24 - 48 ч. Результаты учитывают только в случае появления сливного роста на контрольных чашках (без дисков). Диаметр зон задержки роста бактерий вокруг дисков (включая диаметр самого диска) измеряют с точностью до 1 мм линейкой-лекалом или штангенциркулем.

Для МСР используют суспензию той же концентрации м.к./мл, которую наносят небольшими каплями с помощью штампа-репликатора или касанием пипетки (посевная доза $n \times 10^{5} - 10^{6}$ КОЕ) на чашки с питательной средой, содержащей различные концентрации антибактериальных препаратов, начиная с чашки с минимальным содержанием антибиотика. Посевы инкубируют при 37 °С в течение 24 - 48 ч. Использование среды Мюллера-Хинтона и эритрит-агара без ростовых добавок позволяет проводить учет результатов через 48 ч; добавление в перечисленные среды ростовых добавок сокращает срок учета до 24 ч. Учет результатов проводят при наличии роста культуры на контрольных чашках (без антибиотика). Чувствительность/устойчивость культур оценивают по минимальной концентрации препарата, подавляющей рост микробов (МПК, мг/л).

10.5. Критерии оценки чувствительности/устойчивости возбудителя бруцеллеза к антибактериальным препаратам

Интерпретацию оценки определения чувствительности штаммов Brucella проводят в соответствии с пограничными значениями МПК и диаметрами зон задержки роста для чувствительных и устойчивых культур (табл. 10.3), адаптированными именно для этого вида микробов, на конкретной питательной среде с учетом диапазона значений для 20-ти штаммов бруцелл (табл. 10.4).

Увеличение значений МПК препаратов или же уменьшение диаметров зон подавления роста изучаемых штаммов возбудителя бруцеллеза по сравнению с этими показателями для контрольных штаммов (табл. 10.1, 10.2) может свидетельствовать о тенденции к нарастанию устойчивости микроорганизмов и требует использования максимальных терапевтических доз и удлинения сроков их применения.

Таблица 10.1

ДОПУСТИМЫЕ КОЛЕБАНИЯ ЗНАЧЕНИЙ МПК АНТИБАКТЕРИАЛЬНЫХ ПРЕПАРАТОВ ДЛЯ КОНТРОЛЬНЫХ ШТАММОВ ESCHERICHIA COLI ATCC 25922 И BRUCELLA ABORTUS 19 BA

Антибактериальный препарат	Диапазон значений МПК, мг/л					
	агар Мюллера-Хинтона с ростовыми добавками (или без них) pH 7,3 +/- 0,2		агар LB с ростовыми добавками pH 7,1 +/- 0,1		эритрит-агар с ростовыми добавками (или без них) pH 7,2 +/- 0,1	
	E. coli ATCC 25922	B. abortus 19 BA	E. coli ATCC 25922	B. abortus 19 BA	E. coli ATCC 25922	B. abortus 19 BA
1	2	3	4	5	6	7
Гентамицин	2 - 4	1 - 2	2 - 4	1 - 2	2 - 4	2 - 4
Амикацин	4 - 8	2 - 4	4 - 8	2 - 4	4 - 8	4 - 8
Канамицин	4 - 8	2 - 4	4 - 8	2 - 4	4 - 8	4 - 8
Стрептомицин	4 - 8	2 - 4	4 - 8	1 - 2	4 - 8	2 - 4
Доксициклин	0,5 - 2,0	1 - 2	1 - 4	2 - 4	1 - 4	1 - 2
Тетрациклин	0,5 - 2,0	1 - 2	1 - 4	1 - 2	1 - 4	1 - 2
Налидиксовая кислота	1 - 4	8 - 16	1 - 4	8 - 16	1 - 4	8 - 16
Ципрофлоксацин	0,016 - 0,032	0,5 - 1,0	0,016 - 0,032	1 - 2	0,016 - 0,032	1 - 2
Офлоксацин	0,06 - 0,12	1 - 2	0,06 - 0,12	1 - 2	0,06 - 0,12	2 - 4
Пефлоксацин	0,06 - 0,12	2 - 4	0,06 - 0,12	2 - 4	0,06 - 0,12	2 - 4
Ломефлоксацин	0,12 - 0,5	2 - 4	0,12 - 0,5	2 - 4	0,12 - 0,5	2 - 4
Левофлоксацин	0,012 - 0,03	0,5 - 1,0	0,012 - 0,03	0,25 - 0,5	0,012 - 0,03	0,5 - 1,0
Рифампицин	4 - 16	1 - 2	4 - 16	1 - 2	4 - 16	2 - 4

Таблица 10.2

ДОПУСТИМЫЕ КОЛЕБАНИЯ ЗНАЧЕНИЙ ДИАМЕТРОВ ЗОН ПОДАВЛЕНИЯ РОСТА ДЛЯ КОНТРОЛЬНЫХ ШТАММОВ ESCHERICHIA COLI ATCC 25922 И BRUCELLA ABORTUS 19 BA

Антибактериальный препарат	Содержание препарата в диске, мкг	Диаметр зон подавления роста, мм					
		агар Мюллера-Хинтона с ростовыми добавками (или без них) pH 7,3 +/- 0,2		агар LB с ростовыми добавками pH 7,1 +/- 0,1		эритрит-агар с ростовыми добавками (или без них) pH 7,2 +/- 0,1	
		E. coli ATCC 25922	B. abortus 19 BA	E. coli ATCC 25922	B. abortus 19 BA	E. coli ATCC 25922	B. abortus 19 BA
Гентамицин	10	15 - 25	20 - 25	15 - 25	20 - 25	15 - 25	20 - 25

Амикацин	30	15 - 25	20 - 25	15 - 25	20 - 25	15 - 25	20 - 25
Канамицин	30	15 - 25	20 - 25	15 - 25	20 - 25	15 - 25	20 - 25
Стрептомицин	30	15 - 25	20 - 25	15 - 25	20 - 25	15 - 25	20 - 25
Доксициклин	10	16 - 20	20 - 25	16 - 20	20 - 25	16 - 20	20 - 25
Тетрациклин	30	16 - 20	25 - 30	16 - 20	25 - 30	16 - 20	25 - 30
Налидиксовая кислота	30	22 - 28	15 - 20	22 - 28	15 - 20	22 - 28	15 - 20
Ципрофлоксацин	5	30 - 35	25 - 30	30 - 35	25 - 30	30 - 35	25 - 30
Офлоксацин	5	25 - 30	25 - 30	25 - 30	25 - 30	25 - 30	25 - 30
Пефлоксацин	10	25 - 30	25 - 30	25 - 30	25 - 30	25 - 30	25 - 30
Ломефлоксацин	10	25 - 30	25 - 30	25 - 30	25 - 30	25 - 30	25 - 30
Левофлоксацин	5	25 - 30	25 - 30	25 - 30	25 - 30	25 - 30	25 - 30
Рифампицин	5	8 - 10	20 - 25	8 - 10	20 - 25	8 - 10	20 - 25

Таблица 10.3

КРИТЕРИИ ИНТЕРПРЕТАЦИИ РЕЗУЛЬТАТОВ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ ШТАММОВ BRUCELLA SPP.: ПОГРАНИЧНЫЕ ЗНАЧЕНИЯ ДИАМЕТРОВ ЗОН ПОДАВЛЕНИЯ РОСТА (ММ) И ВЕЛИЧИН МПК (МГ/Л) АНТИБАКТЕРИАЛЬНЫХ ПРЕПАРАТОВ

Антибактериальный препарат	Содержание препарата в диске, мкг	Диаметр зон подавления роста, мм		Значение МПК, мг/л	
		S*	R*	S*	R*
Гентамицин	10	>= 20	<= 15	<= 8	>= 32
Амикацин	30	>= 20	<= 15	<= 16	>= 64
Канамицин	30	>= 20	<= 15	<= 16	>= 64
Стрептомицин	30	>= 20	<= 15	<= 8	>= 32
Доксициклин	10	>= 20	<= 15	<= 4	>= 32
Тетрациклин	30	>= 25	<= 20	<= 4	>= 16
Налидиксовая кислота	30	>= 15	<= 10	<= 32	>= 128
Ципрофлоксацин	5	>= 30	<= 25	<= 4	>= 16
Офлоксацин	5	>= 25	<= 20	<= 8	>= 32
Пефлоксацин	10	>= 25	<= 20	<= 8	>= 32
Ломефлоксацин	10	>= 25	<= 20	<= 8	>= 32
Левофлоксацин	5	>= 30	<= 25	<= 2	>= 4
Рифампицин	5	>= 15	<= 10	<= 8	>= 16
Примечание: то же, что к табл. 6.3.					

Таблица 10.4

ДИАПАЗОН ЗНАЧЕНИЙ МПК АНТИБАКТЕРИАЛЬНЫХ ПРЕПАРАТОВ И ДИАМЕТРОВ ЗОН ПОДАВЛЕНИЯ РОСТА ДЛЯ 20-ТИ АНТИБИОТИКОЧУВСТВИТЕЛЬНЫХ ШТАММОВ BRUCELLA SPP.

Антибактериальный препарат	Содержание препарата в диске, мкг	Диаметр зон подавления роста, мм			Значение МПК, мг/л		
		агар Мюллера-Хинтона с ростовыми добавками (или без них) pH 7,3 +/- 0,2	агар LB с ростовыми добавками pH 7,1 +/- 0,1	эритрит-агар с ростовыми добавками (или без них) pH 7,2 +/- 0,1	агар Мюллера-Хинтона с ростовыми добавками (или без них) pH 7,3 +/- 0,2	агар LB с ростовыми добавками pH 7,1 +/- 0,1	эритрит-агар с ростовыми добавками (или без них) pH 7,2 +/- 0,1
1	2	3	4	5	6	7	8
Гентамицин	10	20 - 30	20 - 30	20 - 30	1 - 4	1 - 2	2 - 4
Амикацин	30	20 - 30	20 - 30	20 - 30	2 - 4	2 - 4	4 - 8
Канамицин	30	20 - 30	20 - 30	20 - 30	2 - 4	2 - 4	4 - 8
Стрептомицин	30	20 - 25	20 - 25	20 - 25	1 - 4	0,5 - 2,0	2 - 4
Доксициклин	10	20 - 30	20 - 30	20 - 30	0,5 - 2,0	0,5 - 4,0	0,5 - 2,0
Тетрациклин	30	25 - 30	25 - 30	25 - 30	0,5 - 2,0	0,5 - 2,0	1 - 2
Налидиксовая кислота	30	15 - 20	15 - 20	15 - 20	8 - 16	8 - 16	8 - 16
Ципрофлоксацин	5	30 - 35	30 - 35	28 - 35	0,25 - 1,0	0,5 - 2,0	0,5 - 2,0
Офлоксацин	5	30 - 35	30 - 35	27 - 35	0,5 - 2,0	1 - 2	1 - 2
Пефлоксацин	10	30 - 35	30 - 35	27 - 35	1 - 4	1 - 4	2 - 4
Ломефлоксацин	10	25 - 35	25 - 35	25 - 35	2 - 8	2 - 8	2 - 8
Левофлоксацин	5	30 - 35	30 - 35	30 - 35	0,5 - 1,0	0,25 - 0,5	0,5 - 1,0
Рифампицин	5	15 - 25	15 - 25	15 - 25	1 - 2	1 - 2	2 - 4

11. Определение чувствительности возбудителей сапа и мелиоидоза (Burkholderia mallei и Burkholderia pseudomallei) к антибактериальным препаратам

11.1. Контрольные штаммы

Для стандартизации определения антибиотикограммы микроорганизмов необходимо использовать в качестве контроля референтные штаммы, обладающие стандартной для данного вида антибиотикочувствительностью, для которых известны допустимые диапазоны значений МПК и диаметров зон подавления роста культуры. Из культур 27 видов буркхольдерий для изучения антибиотикограмм принципиальное значение имеют типичные штаммы двух эпидемически значимых видов - Burkholderia mallei NCTC 10230 и Burkholderia pseudomallei CIP 6086. У этих штаммов подробно изучены фенотипические свойства, и они имеются практически во всех учреждениях, получивших разрешение на проведение исследований с патогенными буркхольдериями. Под вышеуказанными номерами культуры штаммов зарегистрированы в Английской национальной коллекции типовых культур (NCTC). Для контроля качества дисков и сред возможно также использование референтного для не ферментирующих глюкозу бактерий штамма Pseudomonas aeruginosa ATCC 27853.

11.2. Питательные среды

Для определения чувствительности патогенных буркхольдерий к антибактериальным препаратам обоими методами (МСР и ДДМ) может быть использован агар Мюллера-Хинтона (Muller-Hinton) pH 7,3 +/- 0,2, для выращивания культур используют мясопептонный агар (МПА), pH 6,8 +/- 0,2. Прежде чем использовать в работе серии питательной среды, необходимо произвести оценку соответствия значений МПК и диаметров зон подавления роста (это и контроль качества дисков) на испытуемой серии среды допустимым величинам этих показателей для контрольных штаммов микроорганизмов (табл. 11.1 и 11.2).

11.3. Антибактериальные препараты

Для определения чувствительности/устойчивости патогенных буркхольдерий используют антибактериальные препараты, рекомендуемые в настоящее время для экстренной профилактики и лечения сапа и мелиоидоза.

Препараты первого ряда - основные препараты, к которым определяют чувствительность/устойчивость возбудителей сапа и мелиоидоза при выделении от больного или из внешней среды: доксициклин, триметоприм/сульфаметоксазол, левомицетин, цефтазидим, имипенем (меропенем), рифампицин. Применяют их, как правило, в разных сочетаниях: триметопримом/сульфаметоксазол + доксициклин, цефтазидим + доксициклин, доксициклин + левомицетин + рифампицин и др. Основным лечебным препаратом при лечении острых форм начиная с 1982 г. является цефтазидим, особенно в комбинации с триметоприм/сульфаметоксазолом. При этом сочетании возникновение резистентных форм отмечается в редчайших случаях. Препараты группы карбапенемов обладают наиболее низкой величиной МПК и хорошей бактерицидной активностью.

Препараты второго ряда включают амоксициллин/клавулановую кислоту (амоксиклав) и некоторые фторхинолоны (ципрофлоксацин, спарфлоксацин). Амоксиклав оказался первым эффективным препаратом, применяемым per os. Ципрофлоксацин - препарат с бактерицидным эффектом, он хорошо проникает внутрь эукариотических клеток и рекомендуется для поддерживающей терапии в сочетании с цефтазидимом.

Для МСР выбирают серии двукратно уменьшающихся концентраций антибактериальных препаратов в соответствии с пограничными значениями МПК для изучаемых видов буркхольдерий.

Препараты первого ряда:

Доксициклин 2 - 4 - 8 - 16 мг/л

Триметоприм/сульфаметоксазол 0,5 - 1 - 2 - 4 мг/л (по триметоприму)

Цефтазидим 4 - 8 - 16 - 32 мг/л

Имипенем (меропенем) 2 - 4 - 8 - 16 мг/л

Рифампицин 2 - 4 - 8 - 16 - 32 мг/л

Левомицетин 4 - 8 - 16 - 32 мг/л

Препараты второго ряда:

Амоксициллин/клавулановая кислота 2/1 - 4/2 - 8/4 - 16/8 мг/л

Ципрофлоксацин (или спарфлоксацин, ломефлоксацин, офлоксацин) 0,5 - 1 - 2 - 4 - 8 мг/л

Цефтриаксон (или цефепим) 4 - 8 - 16 - 32 - 64 мг/л

Пиперациллин 8 - 16 - 32 - 64 мг/л

Сульфаметоксазол 5 - 100 - 200 - 400 мг/л.

Для постановки ДДМ используют проверенные коммерческие диски с определенными концентрациями антибактериальных препаратов (табл. 11.3).

11.4. Посевная доза, инокуляция, инкубация

Для приготовления инокулюма используют суточную культуру бактерий, выросших на плотной питательной среде (МПА). Суспензию стандартизируют по отраслевому стандарту мутности ГИСК им. Л.А. Тарасевича на 5 ед., что соответствует ~ 2×10^8 КОЕ/мл. При определении чувствительности штаммов Burkholderia mallei и Burkholderia pseudomallei с помощью ДДМ суспензию наносят на поверхность агара в объеме 0,2 - 0,3 мл, равномерно распределяют шпателем и ожидают полное впитывание в агар (посевная доза $4 - 6 \times 10^7$ КОЕ). Затем накладывают диски (не более 6 штук на чашку диаметром 100 мм). Инкубацию посевов проводят при температуре 37 °С. Результаты можно учитывать через 18 - 24 ч. Диаметры зон задержки роста микробов вокруг дисков, включая диаметр самого диска (стандарт - 6,35 мм), измеряют с точностью до 1 мм, используя штангенциркуль или специальную линейку-лекало.

Для МСР используют суспензию той же концентрации микробных клеток ($n \times 10^8$ КОЕ/мл), нанося небольшими каплями с помощью пипетки с тонким концом на агаровые пластины с разными концентрациями антибактериальных препаратов, начиная с чашек с минимальным содержанием антибиотика. Посевная доза при этом составляет около $n \times 10^6$ КОЕ. Посевы инкубируют при температуре 37 °С. Учет результатов исследований можно проводить через 18 - 24 ч при наличии выраженного роста культуры в контроле (агаровая среда без антибиотика). Чувствительность/устойчивость культур определяют по минимальной концентрации препарата, подавляющей рост возбудителя (МПК, мг/л) на среде культивирования.

11.5. Критерии оценки чувствительности/устойчивости

возбудителей сапа и мелиоидоза
к антибактериальным препаратам

Интерпретацию результатов определения чувствительности патогенных буркхольдерий проводят в соответствии с пограничными значениями МПК и зон подавления роста бактерий (табл. 11.3), адаптированными именно для данного рода микроорганизмов, с учетом диапазона значений для всех изученных штаммов видов, входящих в род Burkholderia, и соотнесения данных in vitro с клинической эффективностью, а также особенностями фармакокинетики препарата. Основой для адаптации послужили критерии чувствительности/устойчивости для бактерий семейства Pseudomonas spp. (МУК 4.2.1890-04), к которым до последнего времени относили возбудителей сапа и мелиоидоза. Диапазон значений МПК химиопрепаратов и диаметров зон подавления роста коллекционных штаммов патогенных буркхольдерий приведен в табл. 11.4. Данные свидетельствуют о гетерогенности изученных штаммов по признаку чувствительности/устойчивости к антибактериальным препаратам, что позволяет проводить оптимальный выбор комбинаций на основе данных антибиотикограммы с учетом синергидного характера их действия.

Таблица 11.1

ДОПУСТИМЫЕ КОЛЕБАНИЯ ЗНАЧЕНИЙ МПК АНТИБАКТЕРИАЛЬНЫХ ПРЕПАРАТОВ ДЛЯ КОНТРОЛЬНЫХ ШТАММОВ P. AERUGINOSA ATCC 27853, B. MALLEI NCTC 10230 И B. PSEUDOMALLEI CIP 6086 НА СРЕДЕ МЮЛЛЕРА-ХИНТОНА

Антибактери-альный препарат	Диапазон значений МПК, мг/л		
	P. aeruginosa ATCC 27853	B. mallei NCTC 10230	B. pseudomallei CIP 6086
1	2	3	4
Амоксициллин/клавулановая кислота	-	1,35/0,65 - 2,67/1,33	2,67/1,33 - 5,34/2,67
Пиперациллин	-	16 - 32	16 - 32
Имипенем	1 - 4	0,25 - 0,5	0,5 - 1,0
Меропенем	0,25 - 1,0	0,25 - 0,5	0,5 - 1,0
Доксициклин	-	0,5 - 2,0	0,5 - 1,0
Левомицетин	-	4 - 8	4 - 8
Рифампицин	16 - 64	2 - 4	8 - 16
Ципрофлоксацин	0,25 - 1,0	0,5 - 1,0	1 - 2
Офлоксацин	1 - 8	1 - 2	2 - 4
Ломефлоксацин	1 - 4	0,5 - 1,0	2 - 4
Спарфлоксацин	0,5 - 2,0	1 - 2	2 - 4
Цефепим	1 - 8	2 - 4	4 - 8
Цефтазидим	1 - 4	2 - 4	8 - 16
Цефтриаксон	8 - 64	8 - 16	16 - 32
Сульфаметокса-зол	-	4 - 8	16 - 32
Триметоприм/сульфаметокса-зол	8/152 - 32/608	0,15/2,85 - 0,3/5,7	0,6/11,4 - 1,2/23,8

Таблица 11.2

ДОПУСТИМЫЕ КОЛЕБАНИЯ ЗНАЧЕНИЙ ДИАМЕТРОВ ЗОН ПОДАВЛЕНИЯ РОСТА ДЛЯ КОНТРОЛЬНЫХ ШТАММОВ P. AERUGINOSA ATCC 27853, B. MALLEI NCTC 10230 И B. PSEUDOMALLEI CIP 6086 НА СРЕДЕ МЮЛЛЕРА-ХИНТОНА

Антибактериальный препарат	Содержание препарата в диске, мкг	Диаметр зон подавления роста, мм		
		P. aeruginosa ATCC 27853	B. mallei NCTC 10230	B. pseudomallei CIP 6086
Амоксициллин/клавулановая кислота	20/10	-	27 - 28	26 - 27
Пиперациллин	75	-	23 - 25	20 - 22
Имипенем	10	20 - 28	29 - 30	29 - 30
Меропенем	10	27 - 33	28 - 30	28 - 30
Доксициклин	10	-	19 - 20	19 - 20
Левомицетин	30	-	19 - 20	20 - 22
Рифампицин	30	-	20 - 22	19 - 20
Ципрофлоксацин	5	25 - 33	26 - 28	28 - 30
Офлоксацин	5	17 - 21	25 - 27	25 - 27
Ломефлоксацин	10	22 - 28	20 - 23	22 - 23
Спарфлоксацин	5	21 - 29	28 - 30	28 - 30
Цефепим	30	24 - 30	16 - 17	14 - 15
Цефтазидим	30	22 - 29	15 - 17	14 - 15
Цефтриаксон	30	17 - 23	19 - 20	14 - 15
Сульфаметоксазол	200	-	20 - 22	18 - 20
Триметоприм/сульфаметоксазол	1,25/23,75	-	25 - 26	20 - 22

Таблица 11.3

КРИТЕРИИ ИНТЕРПРЕТАЦИИ РЕЗУЛЬТАТОВ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ БАКТЕРИЙ РОДА BURKHOLDERIA: ПОГРАНИЧНЫЕ ЗНАЧЕНИЯ ДИАМЕТРОВ ЗОН ПОДАВЛЕНИЯ РОСТА (ММ) И ВЕЛИЧИН МПК (МГ/Л) АНТИБАКТЕРИАЛЬНЫХ ПРЕПАРАТОВ

Антибактериальный препарат	Содержание препарата в диске, мкг	Диаметр зон подавления роста, мм		Значение МПК, мг/л	
		S*	R*	S*	R*
Амоксициллин/ клавулановая кислота	20/10	>= 21	<= 14	<= 4/2	>= 16/8
Пиперациллин	75	>= 33	<= 25	<= 16	>= 64
Имипенем	10	>= 16	<= 13	<= 4	>= 16
Меропенем	10	>= 16	<= 13	<= 4	>= 16
Доксициклин	10	>= 16	<= 12	<= 4	>= 16
Левомицетин	30	>= 18	<= 12	<= 8	>= 32
Рифампицин	30	>= 19	<= 14	<= 4	>= 16
Ципрофлоксацин	5	>= 21	<= 16	<= 1	>= 4
Офлоксацин	5	>= 16	<= 12	<= 2	>= 8
Ломефлоксацин	10	>= 22	<= 18	<= 2	>= 8
Спарфлоксацин	5	>= 20	<= 16	<= 1	>= 2
Цефепим	30	>= 18	<= 14	<= 8	>= 32
Цефтазидим	30	>= 18	<= 14	<= 8	>= 32
Цефтриаксон	30	>= 21	<= 13	<= 8	>= 64
Сульфаметоксазол	200	>= 17	<= 12	<= 100	>= 350
Триметоприм/ сульфаметоксазол	1,25/ 23,75	>= 16	<= 10	<= 2/38	>= 4/76
Примечание: то же, что к табл. 6.3.					

Таблица 11.4

ДИАПАЗОН ЗНАЧЕНИЙ МПК АНТИБАКТЕРИАЛЬНЫХ ПРЕПАРАТОВ
И ДИАМЕТРОВ ЗОН ПОДАВЛЕНИЯ РОСТА ДЛЯ 14 ШТАММОВ
B. MALLEI И 40 ШТАММОВ B. PSEUDOMALLEI
(НА СРЕДЕ МЮЛЛЕРА-ХИНТОНА)

Антибактериальный препарат	Содержание препарата в диске, мкг	Диаметр зон подавления роста, мм		Значение МПК, мг/л	
		B. mallei	B. pseudomallei	B. mallei	B. pseudomallei
Амоксициллин/ клавулановая кислота	20/10	26 - 32	20 - 31	0,6/0,3 - 2,65/1,3	2,65/1,3 - 5,3/2,65
Пиперациллин	75	20 - 30	16 - 31	4 - 16	2 - 16
Имипенем	10	28 - 35	28 - 32	0,125 - 0,5	0,5 - 2,0
Меропенем	10	24 - 35	25 - 32	0,125 - 1,0	0,25 - 4,0
Доксициклин	10	16 - 22	14 - 22	0,25 - 4,0	0,5 - 4,0
Левомицетин	30	14 - 25	14 - 22	4 - 64	4 - 64
Рифампицин	30	18 - 24	16 - 22	2 - 16	4 - 64
Ципрофлоксацин	5	18 - 30	16 - 30	0,025 - 8,0	1 - 16
Офлоксацин	5	22 - 28	18 - 28	0,5 - 8,0	1 - 8
Ломефлоксацин	10	24 - 30	20 - 28	0,5 - 2,0	1 - 4
Спарфлоксацин	5	18 - 30	16 - 30	1 - 8	2 - 8
Цефепим	30	14 - 20	13 - 18	2 - 32	4 - 32
Цефтазидим	30	15 - 26	14 - 22	2 - 16	1 - 64
Цефтриаксон	30	14 - 22	13 - 22	8 - 32	8 - 64
Сульфаметоксазол	200	16 - 24	14 - 24	2 - 64	12 - 64
Триметоприм/ сульфаметоксазол	1,25/ 23,75	22 - 28	16 - 28	0,15/2,85 - 1,2/23,8	0,3/5,7 - 4/76

Приложение

ПИТАТЕЛЬНЫЕ СРЕДЫ ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ
ВОЗБУДИТЕЛЕЙ ОСОБО ОПАСНЫХ ИНФЕКЦИЙ БАКТЕРИАЛЬНОЙ ПРИРОДЫ
К АНТИБАКТЕРИАЛЬНЫМ ПРЕПАРАТАМ

1. Среды для определения чувствительности к антибактериальным препаратам возбудителя чумы
1.1. Среда (агар) Мюллера-Хинтона сухая (Производитель: НИЦФ, г. Санкт-Петербург).
1.2. Среда (агар) Мюллера-Хинтона M173 (Производитель: Himedia, Индия).
1.3. Агар Хоттингера, pH 7,2 +/- 0,1, с содержанием 1,2 - 1,4 г/л аминного азота (Производитель: отделы питательных сред противочумных институтов).

1.4. Питательная среда для культивирования чумного микроба сухая (Производитель: ФГУЗ Иркутский НИПЧИ).

1.5. Питательная среда для определения антибиотикочувствительности микроорганизмов сухая (типа АГВ) (Производитель: ФГУП "ГНЦПМ", г. Оболенск).

1.6. Сухой питательный агар АГВ (Производитель: ФГУП "ГНЦПМ", г. Махачкала).

2. Среды для определения чувствительности к антибактериальным препаратам возбудителя сибирской язвы

Пункты: 1.1, 1.2, 1.3, 1.5, 1.6.

3. Среды для определения чувствительности к антибактериальным препаратам возбудителя холеры

Пункты: 1.1, 1.2, 1.3, 1.5, 1.6.

4. Среды для определения чувствительности к антибактериальным препаратам возбудителя бруцеллеза

4.1. Агар Мюллера-Хинтона (п. п. 1.1, 1.2) с добавлением ростовых компонентов (г/л среды): $MgSO_4$ - 0,05; $FeSO_4$ - 0,1; L-цистеин - 0,6; лимоннокислый натрий - 1,2; KCl - 2; K_2HPO_4 - 4; глюкоза - 15. Стерильные (кипячение 20 мин.) ростовые добавки вносят в растопленный и остуженный агар перед разливанием его в чашки Петри.

4.2. Питательная среда для выделения и культивирования бруцелл сухая (эритрит-агар) (Производитель: ФГУП, ГНЦПМ, г. Махачкала) с добавлением ростовых компонентов по прописи п. 4.1.

4.3. Агар LB (г/л): триптон Bacto - 10; дрожжевой экстракт Bacto - 5; NaCl - 10 с добавлением ростовых компонентов по прописи п. 4.1.

5. Среды для определения чувствительности к антибактериальным препаратам возбудителя туляремии

5.1. Пункты: 4.1, 4.2, 4.3.

5.2. Питательная среда для выделения возбудителя туляремии сухая (АДЭТ) (Производитель: НИПЧИ, г. Ростов-на-Дону).

6. Среды для определения чувствительности к антибактериальным препаратам возбудителей сапа и мелиоидоза

Пункты: 1.1, 1.2.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

АБП - антибактериальные препараты

АГВ - агар Гивенталя - Ведьминой

ВОЗ - Всемирная организация здравоохранения

ДДМ - диско-диффузионный метод

КОЕ - колониеобразующая единица

МПК - минимальная концентрация АБП, подавляющая видимый рост исследуемого микроорганизма

МСР - метод серийных разведений

МФА - метод флюоресцирующих антител

ПБА - патогенный биологический объект

ПЦР - полимеразная цепная реакция

РНГА - реакция непрямой гемагглютинации

ATCC - American Type Culture Collection - Американская коллекция типовых культур микроорганизмов

CA SFM - Comite de l'Antibiogramme de la Societe Francaise de Microbiologie - Комитет по антибиотикограммам Французского общества микробиологов