



МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ И СОЦИАЛЬНОГО РАЗВИТИЯ
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
ФГУ «ГОСУДАРСТВЕННЫЙ НАУЧНЫЙ ЦЕНТР ДЕРМАТОВЕНЕРОЛОГИИ»

**СТАНДАРТНЫЕ ОПЕРАЦИОННЫЕ ПРОЦЕДУРЫ
ПО МЕТОДАМ ОПРЕДЕЛЕНИЯ
ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ ГОНОКОККА
К АНТИБАКТЕРИАЛЬНЫМ ПРЕПАРАТАМ**

СОП № 006/03 ГОН

Москва, 2008 г.

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ И СОЦИАЛЬНОГО РАЗВИТИЯ
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
ФГУ «ГОСУДАРСТВЕННЫЙ НАУЧНЫЙ ЦЕНТР ДЕРМАТОВЕНЕРОЛОГИИ»

**СТАНДАРТНЫЕ ОПЕРАЦИОННЫЕ ПРОЦЕДУРЫ
ПО МЕТОДАМ ОПРЕДЕЛЕНИЯ
ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ ГОНОКОККА
К АНТИБАКТЕРИАЛЬНЫМ ПРЕПАРАТАМ**

СОП № 006/03 ГОН

Москва, 2008 г.

УДК 616.94-022.7-07:615.281.9(083.131)

ББК 52.649.212

С76

Стандартные операционные процедуры по методам определения чувствительности гонококка антибактериальным препаратам. – М.: ООО «ДЭКС-ПРЕСС», 2008. – 16 с.
ISBN 978-5-9517-0039-1

Сборник стандартных операционных процедур разработан в рамках выполнения Федеральной целевой программы «Предупреждение и борьба с заболеваниями социального характера», утвержденной Постановлением Правительства Российской Федерации от 13 ноября 2001 года № 790, и реализации мероприятий в рамках подпрограммы «О мерах по предупреждению дальнейшего распространения заболеваний, передаваемых половым путем». Третья переработанная и дополненная редакция стандартных операционных процедур была подготовлена в рамках подпрограммы «Инфекции, передаваемые половым путем» Федеральной целевой программы «Предупреждение и борьба с социально значимыми заболеваниями (2007—2011 гг.)», утвержденной Постановлением Правительства Российской Федерации от 10 мая 2007 года № 280.

Сборник стандартных операционных процедур разработан под руководством академика РАМН, профессора А.А. Кубановой, коллективом авторов ФГУ «ГНЦД Минздравсоцразвития»: д.м.н. Н.В. Фриго, д.м.н. А.А. Кубановым, н.с. С.А. Полевщицовой, к.б.н. В.С. Соломкой.

Стандартные операционные процедуры, третья редакция.

УДК 616.94-022.7-07:615.281.9(083.131)

ББК 52.649.212

СТАНДАРТНЫЕ ОПЕРАЦИОННЫЕ ПРОЦЕДУРЫ ПО МЕТОДАМ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ ГОНОКОККА К АНТИБАКТЕРИАЛЬНЫМ ПРЕПАРАТАМ

Формат 60×90/8. Усл. печ. л. 2. Тираж 500 экз. Заказ № 368-12.

Издатель ООО «ДЭКС-Пресс», 125167 Москва, 4-я ул. 8 Марта, д. ба.

ISBN ISBN 978-5-9517-0039-1

© ФГУ «ГНЦД Минздравсоцразвития», 2008

© Оформление ООО «Дэкс-Пресс», 2008

СОДЕРЖАНИЕ

I. ВВЕДЕНИЕ.....	4
II. ОБЛАСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ.....	4
III. ПЕРЕСМОТР.....	5
IV. ТЕРМИНЫ И ОБОЗНАЧЕНИЯ.....	5
V. ТЕХНИКА БЕЗОПАСНОСТИ И ОХРАНА ТРУДА.....	5
VI. ОТВЕТСТВЕННОСТЬ ПЕРСОНАЛА.....	6
VII. МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ.....	6
VIII. ПРОЦЕДУРА.....	7
8.1. Дisko-диффузионный метод.....	7
8.2. Метод серийных разведений антибиотиков в агаре.....	9
8.3. Эпсилометрический метод — E-тест.....	13

I. ВВЕДЕНИЕ

В современных условиях проблема лекарственной устойчивости микроорганизмов приобрела глобальный характер. Нерациональная антибиотикотерапия является причиной возникновения хронических процессов и осложнений после лечения и рецидивов гонококковой инфекции.

Это диктует необходимость внедрения в работу клинических эпидемиологов и бактериологов комплекса аналитических исследований и организационных мероприятий по проведению мониторинга структуры и уровня лекарственной устойчивости микроорганизмов.

Антибиотикограммы возбудителей, выделенных от пациентов, должны регистрироваться не только в лабораторных журналах и историях болезни, но и формировать базу данных и использоваться различными специалистами.

Эмпирическая антибиотикотерапия для гонококковой инфекции должна учитывать фактические данные эпидемиологического мониторинга антибиотикорезистентности штаммов гонококков, циркулирующих в Российской Федерации и ее конкретных регионах и городах. Это важно как для назначения индивидуальной оптимальной антибиотикотерапии для каждого конкретного больного, так и для построения формуляра антибактериальных средств и определения политики применения антибактериальных препаратов.

Согласно рекомендациям Всемирной организации здравоохранения, если уровень резистентности *N. gonorrhoeae* к антимикробному препарату составляет более 5%, он не может рутинно применяться для эмпирической терапии гонореи (WHO, 1997).

Выработка рациональной стратегии и тактики применения антимикробных препаратов на основе постоянного динамического слежения за чувствительностью микроорганизмов направлена на сдерживание формирования устойчивости *N. gonorrhoeae* к противомикробным препаратам.

Определение чувствительности гонококка к антимикробным препаратам (АМП) сопряжено с определенными трудностями. До настоящего времени в России этому уделялось недостаточно внимания. Данные о состоянии резистентности гонококка к АМП в России носят разрозненный характер и получены при помощи различных методов определения чувствительности, к которым относятся диско-диффузионный метод, Е-тест, метод серийных разведений. Это не может обеспечить точного представления о состоянии антибиотикорезистентности гонококка в целом по стране. Для получения достоверной картины резистентности *N. gonorrhoeae* к наиболее часто используемым для лечения гонореи антибиотикам необходимо применение единой стандартизированной системы определения чувствительности гонококка к АМП с четким описанием методик постановки и критериев интерпретации полученных результатов.

Стандартная операционная процедура (СОП) входит в комплект нормативной документации лаборатории и составляет неотъемлемую часть руководства по качеству.

Данный документ является подробной инструкцией по методикам определения чувствительности гонококка к антибактериальным препаратам в соответствии с международными стандартами.

Целью выполнения процедуры является качественное проведение исследований по определению профиля резистентности гонококка к антибактериальным препаратам.

II. ОБЛАСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ

СОП № 006/03 ГОН «Стандартные операционные процедуры по методам определения чувствительности гонококка к антибактериальным препаратам» используется в качестве стандарта персоналом лаборатории, выполняющим данную процедуру, а также для обучения нового персонала.

III. ПЕРЕСМОТР

СОП № 006/03 ГОН — третья редакция

IV. ТЕРМИНЫ И ОБОЗНАЧЕНИЯ

- **АМП** — антимикробные препараты.
- **АБ** — антибиотик.
- **МПК** — минимальная концентрация антимикробного препарата, подавляющая видимый рост исследуемого микроорганизма.
- **Резистентность микроорганизма к АМП** — устойчивость микроорганизма (*N. gonorrhoeae*) к действию на него антимикробных средств.
- **CLSI** — Clinical and Laboratory Standards Institute (Институт клинических и лабораторных стандартов).
- **EARSS** — European Antimicrobial Resistance Surveillance System (Европейская система по надзору за антибиотикорезистентностью).
- **NCCLS** — National Committee for Clinical Laboratory Standards (Национальный комитет по клиническим лабораторным стандартам, США).
- **«Озирис»** — уникальная автоматизированная система чтения и интерпретации антибиотикограмм, полученных с помощью диско-диффузионного метода.
- **ДДМ** — диско-диффузионный метод.
- **Криосреда** — стерильный раствор для сохранения гонококка при низкой температуре.
- **Е-тест** — эпсилометрический тест.
- **МСП** — метод серийных разведений.

V. ТЕХНИКА БЕЗОПАСНОСТИ И ОХРАНА ТРУДА

Соблюдение правил техники безопасности и санитарно-эпидемиологических правил при работе с гонококком (микроорганизм III группы патогенности) является неукоснительным требованием при выполнении процедуры всеми лицами, участвующими в постановке методов.

Ответственность за организацию безопасных условий труда в подразделении возлагается в соответствии с приказом по учреждению на руководителя или выделенное ответственное лицо. Комплект документов регулярно пересматривается в плановом порядке (1 раз в 5 лет) или внепланово в связи с возникновением внештатной ситуации, а также в связи с внедрением новых методов исследования и приобретением нового оборудования; после согласования с комиссией местного профсоюзного комитета. Инструкции по технике безопасности утверждаются руководителем учреждения.

Каждый сотрудник получает первичный инструктаж по технике безопасности при приеме на работу или возвращении к данному виду деятельности после длительного перерыва, о чем делается запись по установленной форме в «Журнале проведения инструктажа по технике безопасности».

Повторный плановый инструктаж проводится ежегодно, а внеплановый — при возникновении аварийных ситуаций или по распоряжению администрации учреждения. О прохождении инструктажа и допуске к самостоятельной работе делается отметка под роспись в соответствующем журнале. По согласованию с администрацией учреждения проверка знаний по технике безопасности может контролироваться путем собеседования, экзамена, анкетирования, инспектирования в процессе работы.

VI. ОТВЕТСТВЕННОСТЬ ПЕРСОНАЛА

Сотрудники лаборатории несут ответственность за выполнение ими правил техники безопасности и соблюдение санитарно-эпидемиологического и противопожарного режимов на рабочем месте.

Сотрудникам лаборатории запрещается без разрешения администрации учреждения выносить за пределы рабочей зоны (кабинет врача, лаборатория) образцы биологических материалов, штаммов и рабочую документацию подразделения.

Сотрудники микробиологической лаборатории несут персональную ответственность за своевременность и правильность маркировки биологического материала, соблюдение условий его хранения, соответствие маркировки и содержимого емкостей для хранения биологического материала.

VII. МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ

В бактериологических лабораториях следует использовать лабораторное оборудование и комплектующие расходные материалы, входящие в рекомендуемый перечень.

Рекомендуемый перечень оборудования и расходных материалов

Оборудование

1. Низкотемпературная морозильная камера на -70 — -80°C , -40°C .
2. Холодильник бытовой с камерой охлаждения до $+4$ — $+8^{\circ}\text{C}$ и морозильной камерой на минус 18 — 24°C .
3. Термостат электрический суховоздушный.
4. CO_2 — инкубатор.
5. Ламинарный шкаф с вертикальным потоком воздуха.
6. Автоматизированная система «Озирис» для чтения и интерпретации антибиотикограмм, полученных с помощью диско-диффузионного метода.
7. Автоматические пипеточные дозаторы 1—8-канальные (20—200 мкл; 100—1000 мкл; 1000—5000 мкл).
8. Весы электронные аналитические 1-го класса точности.
9. Газовая горелка (спиртовая).
10. Вортекс лабораторный.
11. Облучатель бактерицидный стационарный.
12. Диспенсер.
13. Оптический прибор для определения стандарта мутности по МакФарланду.

Расходные материалы

1. Медицинские перчатки.
2. Дезинфицирующие растворы.
3. Этиловый спирт 96°.
4. Микробиологическая платиновая петля (стерильная бактериологическая петля).
5. Эксикатор объемом 3 — 5 л.
6. Штативы для пробирок.
7. Реактивы для биологических исследований (питательные среды: «питательная среда для выделения гонококка сухая» производства ФГУП «НПО «Микроген»; «основа GC Medium Agar Base», ростовая добавка «Isovitalex», селективная добавка «VCAT» производства «Becton Dickinson», США; ростовая добавка «PolyVitex» производства «BioMerieux», Франция), наборы для окраски по Граму.

8. Стандартные навески субстанций антибиотиков (Sigma, Aldrich).
9. Диски с антибиотиками.
10. Одноразовые наконечники к автоматическим пипеточным дозаторам объемом: 20— 200 мкл; 100—1000 мкл; 1000—5000 мкл.
11. Штативы лабораторные для размещения пробирок на 10, 20 и 40 ячеек.
12. Газогенерирующие (CO₂) пакеты.
13. Стерильные чашки Петри для микробиологических анализов диаметром 40, 60, 90 мм.
14. Посуда медицинская лабораторная и принадлежности для клинико-лабораторных исследований.
15. Пробирки одноразовые пластиковые с крышкой емкостью 4,0—5,0 мл.
16. Стерильные ватные палочки-тампоны.
17. Пробирки типа «Эппендорф» емкостью 1,5—2,0 мл.
18. Криосреда (80% триптиказо-соевого бульона, 20% глицерина).
19. Пастеровские пипетки одноразовые стерильные.
20. Оптический стандарт мутности МакФарланда 0,5 ед.

VIII. ПРОЦЕДУРА

8.1. Диско-диффузионный метод (ДДМ)

1-й этап. Подготовка культуры гонококка к исследованию

Для определения чувствительности гонококка к АМП используется суточная культура микроорганизма. Методику посева, выделения и проведения видовой идентификации культуры гонококка необходимо проводить в соответствии с СОП 003/04; 004/04; 005/04 ГОН.

2-й этап. Выбор дисков с антибиотиками

Для постановки диско-диффузионного метода используют диски с антибиотиками промышленного и зарубежного производства, зарегистрированные в Российской Федерации. Диски с антибиотиками имеют стандартный размер и содержат антибиотики в концентрации, соответствующей рекомендациям CLSI 2007 год.

Рабочий запас дисков с антибиотиками хранят при температуре +2 — +8°С согласно инструкции производителя.

После извлечения из холодильника упаковка с дисками выдерживается при комнатной температуре в течение 1 часа.

Рекомендуемый перечень антибактериальных препаратов для определения чувствительности / резистентности гонококка с помощью ДДМ:

- препараты группы пенициллина: пенициллин, ампициллин;
- препараты группы тетрациклина: тетрациклин, доксициклин;
- препараты группы макролидов: эритромицин, азитромицин;
- препараты группы фторхинолонов: ципрофлоксацин, офлоксацин;
- препараты группы цефалоспоринов: цефтриаксон, цефотаксим;
- спектиномицин.

К числу обязательных относятся диски с пенициллином, тетрациклином, цефтриаксоном, ципрофлоксацином, азитромицином и спектиномицином.

Диски с остальными антимикробными препаратами являются дополнительными.

Перечисленные антибиотики являются основными в терапии гонококковой инфекции, поэтому диски с этими препаратами целесообразно использовать при первичном лабораторном исследовании. Информация о результатах исследования должна передаваться лечащему врачу.

3-й этап. Приготовление суспензии гонококка

- для приготовления суспензии гонококка необходима чистая суточная культура возбудителя;
- с поверхности колоний гонококка стерильным ватным тампоном следует собрать несколько отдельных изолированных колоний и перенести в стерильную пробирку со стерильным 0,9 % NaCl;
- вставить пробирку в прибор для определения стандарта мутности по МакФарланду;
- пригодной для исследования является взвесь, стандарт мутности которой соответствует 0,5—0,6 МакФарланда.

4-й этап. Посев (инокуляция) исследуемой культуры на поверхность питательной среды

Методика посева

Стерильный ватный тампон погружают в микробную суспензию, ротируют его, чтобы он равномерно пропитался, тщательно отжимают тампон о сухую стенку пробирки выше уровня жидкости, затем взвесь наносят на всю поверхность питательной среды, поворачивая чашку Петри каждый раз на 60°. Стерильным ватным тампоном обрабатывают поверхность агара 3—4 раза. В этом случае возможность избыточного увлажнения поверхности питательной среды исключается.

Методика наложения дисков

Диски должны быть распределены по поверхности агара равномерно. Если чашка Петри имеет диаметр 90 мм, то диски следует располагать на расстоянии 2,4—2,5 см от центра по кругу (рис.1). Их должно быть не более 5—6 на чашку. Не следует дополнительный диск располагать в центре чашки. Диск, нанесенный на поверхность питательной среды, нельзя перемещать на новое место.

Целесообразно использовать трафарет с нанесенными метками (5 или 6 по кругу в 2,4 см от центра). Его подкладывают под чашку Петри. При боковом освещении эти метки хорошо видны, и над ними накладывается диск. Диски с антибиотиками можно также наносить с помощью автоматического диспенсера. Диск должен быть плотно (без образования пустот) прижат к поверхности питательной среды. Через 15 минут после нанесения диска на питательную среду чашки в перевернутом виде ставят в термостат. Инкубация проводится при температуре 35—37°С.

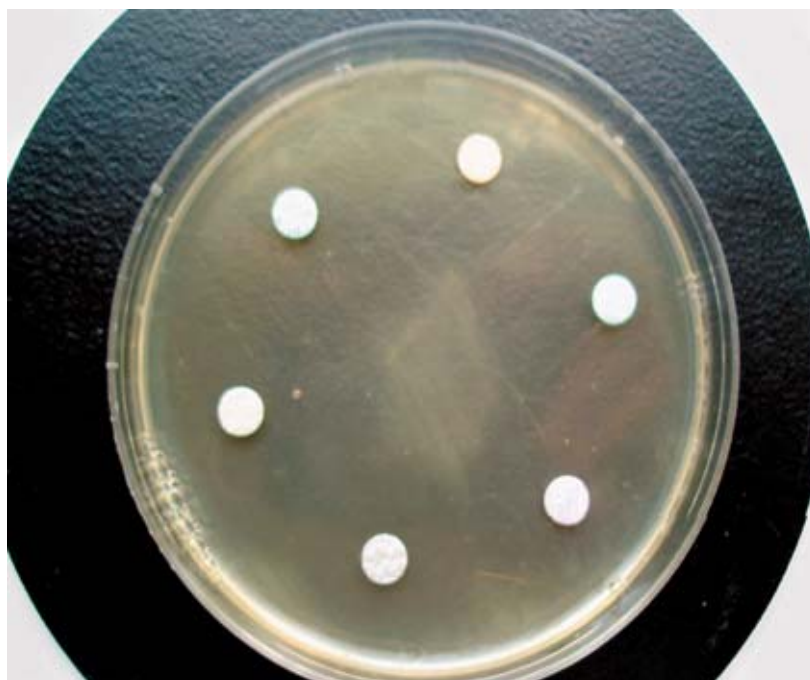


Рисунок 1. Диско-диффузионный метод

5-й этап. Учет и интерпретация результатов определения чувствительности *N. gonorrhoeae* ДДМ

Учет и интерпретация результатов определения чувствительности *N. gonorrhoeae* к АМП диско-диффузионным методом проводят через 18 часов инкубации культур *N. gonorrhoeae* с дисками АМП. При оценке результатов определения чувствительности *N. gonorrhoeae* к АМП ориентируются на величину диаметра зон задержки роста референс-штаммов *N. gonorrhoeae* с определенным уровнем чувствительности *N. gonorrhoeae* к каждому конкретному АМП. В соответствии с разработанными критериями все штаммы *N. gonorrhoeae* могут быть отнесены к трем категориям: чувствительные (S — sensitive), резистентные (R — resistant), штаммы с промежуточным уровнем чувствительности (I — intermediate). Величина зон задержки роста штаммов *N. gonorrhoeae* с разными уровнями чувствительности к АМП приведена в таблице 1.

Таблица 1

Диаметры зон задержки роста референс-штамма гонококка, используемых для оценки точности исследований чувствительности ДДМ

№ п/п	Название препарата	Зона задержки роста для референс-штамма (мм)		
		S	I	R
1.	пенициллин	<26	27—46	>47
2.	цефтриаксон	—	—	<35
3.	тетрациклин	<30	31—37	>38
4.	ципрофлоксацин	<27	28—40	>41
5.	спектиномицин	<14	15—17	>18

Для успешного выполнения ДДМ необходимо соблюдать следующие правила:

1. Рост культуры гонококка должен быть сплошным, равномерным и неплотным.
2. Для измерения зон подавления роста *N. gonorrhoeae* используют автоматическую линейку (входит в комплект прибора «Озирис») либо прозрачную линейку со скошенным краем и четкими рисками, кронциркуль или шаблон, возможно использование специальных бумажных линеек (например: производства НИЦФ, Санкт-Петербург и др.).
3. Чашки рекомендуется держать над темной поверхностью (например, черным неглянцевым листом бумаги). Поверхность среды должна быть хорошо освещена отраженным светом.
4. Линейку или кронциркуль прикладывают к задней поверхности чашки.
5. Зоной, подлежащей измерению, следует считать тот ее участок, на котором рост отсутствует полностью (среда прозрачна).
6. Контроль качества определения чувствительности ДДМ осуществляется с использованием контрольного штамма гонококка АТСС 49226. Результаты определения чувствительности *N. gonorrhoeae* к АМП считают достоверными, если зоны задержки роста контрольного штамма укладываются в допустимые пределы *N. gonorrhoeae*.
7. Не следует учитывать иногда имеющийся слабый рост («ободок») по периферии зоны. Это рост культуры, и в зону подавления роста он не входит. Если внутри зоны имеются колонии, их следует выделить и изучить на принадлежность к исследуемому штамму и на чувствительность к тестируемому антимикробному препарату.

8.2. Метод серийных разведений антибиотиков в агаре

Минимальную подавляющую концентрацию определяют по минимальной концентрации антибиотика, задерживающей видимый рост микроорганизма на чашках с питательной средой, содержащих убывающие концентрации антибиотика.

Чувствительность гонококка необходимо определять к препаратам, применяемых для лечения гонореи (пенициллину, тетрациклину, ципрофлоксацину, азитромицину, цефтриаксону, спектиномицину), используя стандартные навески субстанций АМП (например, производства Sigma, США).

Для постановки теста определения чувствительности *N. gonorrhoeae* к АМП следует использовать гонококковый агар, состоящий из GC Medium Agar Base» с гемоглобином или без гемоглобина и 1%-ной ростовой добавки Isovitalex (**без селективной добавки!**).

На первом этапе необходимо подготовить чашки Петри 40 мм с гонококковым агаром и двукратным разведением антибиотиков в нем (рис. 2).



Рисунок 2. Чашки Петри с GC Medium Agar Base и двукратным разведением антибиотиков в нем

На втором этапе следует произвести посев штаммов гонококка на подготовленную среду с разведениями антибиотиков и инкубировать по стандартной методике.

Методика

1. Приготовить необходимую массу субстанций АМП из расчёта, чтобы в 200 мкл раствора, привносимого в чашку, куда будет добавлено 3200 мкл агара, содержалось количество антибиотика (в мг), необходимое для получения конечной концентрации в мкг/мл. Количество необходимого растворителя рассчитывается по формуле:

$$\text{Объем растворителя (л)} = \frac{\text{Реальный вес АБ} \times \text{Активность субстанции (мг/г)}}{\text{Концентрация (мг/л)}}.$$

Активность субстанции — это понятие, характеризующее количество активного вещества, содержащегося в субстанции антибиотика.

Необходимое количество субстанции антибиотика и растворителя рассчитывается по формуле:

$$\text{Вес АБ (г)} = \frac{\text{Объем растворителя (л)} \times \text{Концентрация (мг/л)}}{\text{Активность субстанции (мг/г)}}$$

Примечание. В качестве растворителя для пенициллина, цефтриаксона, спектиномицина для ципрофлоксацина 0,1М NaOH и тетрациклина следует использовать стерильную дистиллированную воду, а для азитромицина — 95%-ный этанол или ледяную уксусную кислоту.

2. Для приготовления серийных разведений антибиотиков готовится базовый раствор с наивысшей концентрацией каждого антибиотика в нем, затем готовится серия двойных разведений, т. е. каждое следующее разведение делается в 2 раза менее концентрированным. Таким образом, концентрация АМП в каждом последующем разведении должна быть в 2 раза меньше, чем в предыдущем (таблица 2).

Таблица 2

Таблица разведений (соответствует значениям МПК антимикробных препаратов)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
Пенициллин	16	8	4	2	1	0,5	0,25	0,12	0,06	0,03	0,015	—	—	—	—	—	—
Цефтриаксон	4	2	1	0,5	0,25	0,12	0,06	0,03	0,015	0,008	0,004	0,002	—	—	—	—	—
Ципрофлоксацин	128	64	32	16	8	4	2	1	0,5	0,25	0,12	0,06	0,03	0,015	0,008	0,004	0,002
Тетрациклин	32	16	8	4	2	1	0,5	0,25	0,12	0,06	0,03	0,06	0,03	—	—	—	—
Спектиномицин	256	128	64	32	16	8	4	2	1	0,5	0,25	0,125	—	—	—	—	—
Азитромицин	4	2	1	0,5	0,25	0,12	0,06	0,03	0,015	0,008	0,004	0,002	—	—	—	—	—

Количество разведений АМП готовится в соответствии с рекомендациями CLSI 2007 год. Серия каждого антибактериального препарата включает в себя пограничные МПК и допустимые диапазоны МПК для контрольных штаммов.

3. Следует готовить агар, содержащий различные концентрации антибиотиков в нем и разливать его в 40 мм чашки Петри, с указанием степени разведения антибиотиков в каждой чашке, для чего к 200 мкл раствора антибиотика следует добавить 3200 мкл разогретого до 50°C агара, и тщательно перемешать для равномерного распределения антибиотика по всей толще питательной среды.
4. После приготовления чашки с агаром следует оставить в горизонтальном положении для застывания. Кроме чашек с антибиотиками, необходимо также приготовить чашки без антибиотиков для контроля роста гонококков.
5. Для инокуляции чашек с антибиотиками из суточных культур необходимо подготовить суспензии гонококков, которые содержат примерно 108 КОЕ/мл. Для этого следует использовать стандарт мутности 0,5 единицы по МакФарланду.

Не позднее 15 минут после приготовления суспензии микроорганизмов во избежание возможной гибели гонококков следует произвести посев культуры на агар с серийными разведениями антибиотиков. Бактериальную суспензию стерильными пипетками необходимо перенести на стерильный пластиковый планшет с соответствующим количеством лунок (каждая объёмом около 1 мл) (1 лунка — 1 штамм) (рис. 3).

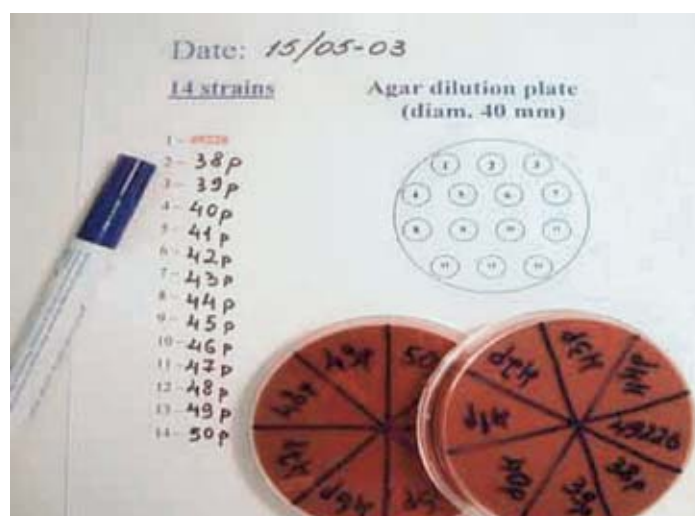


Рисунок 3. Схема нанесения культур гонококка на чашки Петри

6. С помощью многоточечного дозатора со стерильными наконечниками необходимо забирать по 1—2 мкл суспензии из каждой лунки и сделать отпечаток на поверхности агара, что соответствует концентрации микроорганизмов 10^4 КОЕ/точку (рис. 4).



Рисунок 4. Чашка Петри с отпечатком культуры гонококка на агаре

Таким способом инокулируется культура *N. gonorrhoeae* на всю серию чашек с различными концентрациями. Перед инокуляцией готовится схема лунок для дальнейшего считывания и регистрации результатов. В первую и последнюю лунки следует поместить суспензию контрольного штамма. Во вторую и предпоследнюю — физиологический раствор, который использовался для приготовления бактериальной взвеси (для контроля стерильности физиологического раствора).

7. Сразу после посева чашки необходимо поместить в CO_2 — инкубатор (термостат) при температуре 36—37°C.

8. Регистрация результатов постановки проводится через 20—24 часа.

Примечание. Минимальной подавляющей концентрацией считается наименьшая концентрация антибиотика в той чашке, где отсутствует рост гонококков. Единичную колонию не следует учитывать как наличие роста.

9. Интерпретация результатов определения чувствительности *N. gonorrhoeae* к АМП проводится автоматически с использованием компьютерной программы WHONET версии 5.1, в которую включены критерии CLSI.

Допустимые диапазоны значений МПК исследуемых антибиотиков для контрольного штамма, а также используемые критерии интерпретации полученных результатов представлены в таблице 3.

При характеристике чувствительности микроорганизмов к АМП следует использовать общепринятые показатели — с определением чувствительных (S), умеренно резистентных (I) и резистентных (R) штаммов.

Для интегральной характеристики лекарственной устойчивости может быть применен термин «нечувствительные штаммы», объединяющий умеренно резистентные и резистентные микроорганизмы. Этот показатель используется в исследованиях по антибиотикорезистентности, проводимых *Европейской системой по надзору за антибиотикорезистентностью (EARSS)*.

Критерии интерпретации результатов определения чувствительности штаммов гонококка к антибиотикам (МПК) и диапазоны значений МПК антибиотиков для контрольного штамма, мкг/мл

Антибиотик	Чувствительный, S	Умеренно резистентный, I	Резистентный, R	<i>N. gonorrhoeae</i> ATCC 49226
Пенициллин	<0.06	0.12—1	>2	0.25—1
Тетрациклин	<0.25	0.5—1	>2	0.25—1
Ципрофлоксацин	<0.06	0.12—0.5	>1	0.001—0.008
Цефтриаксон	<0.25	-	-	0.004—0.015
Спектиномицин	<32	64	>128	8—32

Для контроля качества определения чувствительности методом серийных разведений антибиотика в агаре следует использовать референс-штамм *N. gonorrhoeae* ATCC 49226, допустимые значения чувствительности к антибиотикам которого представлены в таблице 3.

Результаты тестируемых штаммов учитываются и регистрируются, если МПК для контрольного штамма в обеих точках находится в допустимых пределах.

8.3. Эпсилометрический метод — Е-тест

Е-тест — это точный, количественный метод определения чувствительности гонококка к АМП, позволяющий определить минимальную подавляющую концентрацию (МПК) антибактериального препарата.

В качестве носителя антибактериального препарата в Е-тесте используется не бумажный диск, а узкая полоска полимера (0,5 x 6,0 см), пропитанная различными концентрациями антибиотика (от минимальных до максимальных). Ингибция роста микроорганизма вокруг полоски происходит только в той зоне, где концентрация антибиотика, диффундирующего из полоски, выше МПК для исследуемого микроорганизма.

Для постановки эпсилометрического метода следует использовать:

- стандартные полоски Е-теста с антибиотиками в соответствующей концентрации;
- гонококковую агаровую основу (GCII — Agar Base, Becton Dickinson, США) и 1%-ную комплексную ростовую добавку, без гемоглобина;
- приготовленную суспензию гонококка, соответствующую 0,5 единицы стандарта по Мак-Фарланду.

Методика посева

Взвесь микроорганизмов наносят на поверхность чашки Петри с питательной средой деревянной палочкой, со стерильным ватным тампоном. Стерильный ватный тампон на держателе погружают в микробную суспензию, ротируют его, чтобы он равномерно пропитался, затем тщательно отжимают тампон о сухую стенку пробирки выше уровня жидкости. Тампоном культуру наносят на всю поверхность питательной среды, поворачивая чашку каждый раз на 60°. Таким образом, тампоном обрабатывают поверхность агара 3—4 раза. В этом случае возможность избыточного увлажнения поверхности питательной среды исключается.

Методика нанесения полосок

Полоски Е-теста помещаются на поверхность агара пластиковой поверхностью с отметками градиента концентраций кверху. На чашку диаметром 90 мм наносят не более трех полосок (рис. 5).

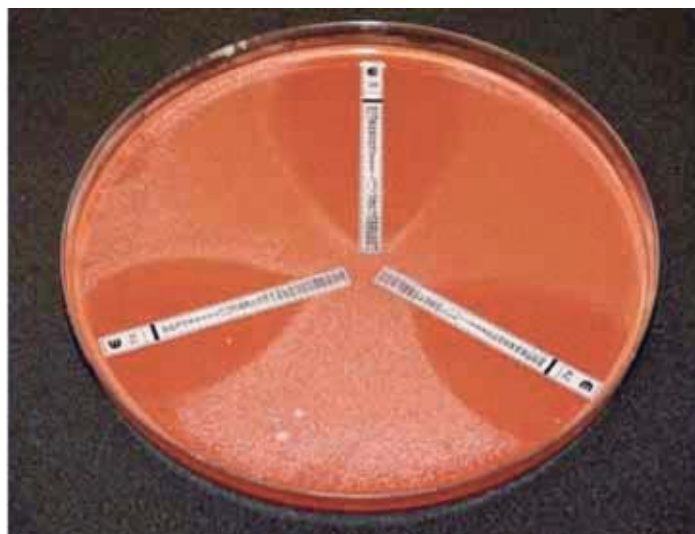


Рисунок 5. Е-тест

Посевы *N. gonorrhoeae* на агаре с полосками Е-теста инкубируют в течение 20—24 часов при температуре 35—36°C в атмосфере CO₂.

Учет результатов

Результаты могут быть учтены, если испытуемая культура выросла плотным газоном на питательной среде.

Результатом диффузии антибиотика в питательную среду является образование вокруг полоски каплевидной зоны ингибиции роста. Величины концентрации антибиотика в каждом участке полоски типографическим способом нанесены на соответствующем отрезке наружной (обращенной к исследователю) ее поверхности. Величину МПК учитывают в том месте, где граница зоны ингибиции роста вплотную подходит к полоске.

Интерпретация результатов производится:

1. Автоматически с использованием компьютерной программы WHONET версии 5.1, в которую включены критерии;
2. Полученные результаты регистрируются в специальных рабочих таблицах;
3. Обработанные результаты заносятся в специально разработанную компьютерную базу данных штаммов гонококка.

Все представленные способы обработки целесообразнее проводить с использованием компьютерной аналитической программы WHONET версии 5.1, в которую включены все критерии интерпретации антибиотикограмм.

Данная программа позволяет производить анализ распределения резистентных и чувствительных штаммов микроорганизмов:

- путем распределения по доли резистентных (R), умеренно чувствительных (I) и чувствительных (S) штаммов, которые могут быть представлены в виде таблицы %R, %I и %S, гистограмм и графиков рассеяния (скатерграммы);
- путем оценки профилей резистентности.

Для заметок

Для заметок