МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ СССР

МЕТОДИЧЕСКИЕ УКАЗАНИЯ

ПО ОПРЕДЕЛЕНИЮ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ МИКРООРГАНИЗМОВ К АНТИБИОТИКАМ МЕТОДОМ ДИФФУЗИИ В АГАР С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ДИСКОВ

Москва — 1983

gost.e-ecolog.ru

Разработаны:

Центральным ордена Ленина институтом усовершенствования врачей (Н. И. Гивенталь, В. Р. Соболев, Е. А. Ведьмина, И. В. Власова);

Всесоюзным научно-исследовательским институтом антибиотиков (С. П. Резван, С. М. Чайковская, И. П. Фомина, С. М. Новашин).

Рекомендованы к утверждению Лабораторным Советом при Главном санитарно-эпидемиологическом управлении Министерства здравоохранения СССР.

УТВЕРЖДАЮ
Начальник главного
санитарно-эпидемиологического
управления Министерства
здравоохранения СССР
В. Е. Ковшило
10 марта 1983 г.
№ 2675—83

МЕТОДИЧЕСКИЕ УКАЗАНИЯ ПО ОПРЕДЕЛЕНИЮ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ МИКРООРГАНИЗМОВ К АНТИБИОТИКАМ МЕТОДОМ ДИФФУЗИИ В АГАР С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ДИСКОВ

1. Введение

В основе рациональной химиотерапии бактериальных инфекций лежит комплекс лабораторных методов исследований, в частности, выделение и идентификация возбудителя и определение его антибиограммы. У нас в стране определение чувствительности регламентируется «Методическими указаниями», изданными в 1976 г. («Методические указания по применению унифицированных клинических лабораторных методов исследований. Определение чувствительности микроорганизмов к химиотерапевтическим препаратам». Утверждены Приказом Министерства здравоохранения СССР № 250 от 13 марта 1975 г.). Рекомендуемый «Методическими указаниями» метод диффузии в агар с применением бумажных дисков является качественным и не отвечает современным требованиям клиники.

В связи с расширением ассортимента выпускаемых дисков и новыми рекомендациями ВОЗ по определению чувствительности микроорганизмов к антибиотикам (28 доклад Комитета экспертов ВОЗ по стандартизации биологических препаратов, 1980) некоторые положения «Методических указаний» 1976 г. должны быть пересмотрены. В частности, пересмотра требует раздел «Определение чувствительности *микроорганизмов к антибиотикам методом диффузии в агар* с применением бумажных дисков».

Настоящие «Методические указания по определению чувствительности микроорганизмов к антибиотикам методом диффузии в агар с использованием дисков» выпускаются с целью замены соответствующего раздела «Методических указаний» 1976 г.

Предлагаемая настоящими «Методическими указаниями» интерпретация результатов определения чувствительности основана на установлении зависимости между размерами зон задержки роста испытуемых культур вокруг дисков с антибиотиками и значениями МПК соответствующих антибиотиков в отношении тех же культур. Установление такой зависимости позволяет придать интерпретации результатов полуколичественный характер и относить изучаемые штаммы к одной из трех категорий чувствительности: устойчивые, умеренно устойчивые, чувствительные.

В связи с тем, что определяемая in vitro степень чувствительности микроорганизмов к антибиотикам зависит от условий постановки опыта, для получения достоверных и воспроизводимых результатов необходимо точное выполнение требований настоящей инструкции, а также использование стандартных сред и дисков промышленного производства.

2. Материалы

2.1. Диски с антибиотиками

Для определения чувствительности следует использовать диски, выпускаемые ПО «Мосмедпрепараты» им. Л. Я. Карпова. Диски готовят из фильтровального картона (ГОСТ 6723—75), который пропитывают раствором антибиотиков определенной концентрации, сушат и перфорируют. Размер дисков 6±0,5 мм. Содержание антибиотика в диске, указанное на этикетке, соответствует рекомендациям ВОЗ. Диски одного наименования содержат одну дозу антибиотика, за исключением дисков с карбенициллином, которые выпускают с содержанием 25 и 100 микрограмм препарата на диск.

Диски с различными антибиотиками отличаются друг от друга цветом картона или кодом, который представляет собой первую букву названия антибиотика, вытесненную на диске. Перечень дисков и их регистрационные номера приведены в табл. 1.

Диски расфасованы во флаконы по 100 штук. В связи с гигроскопичностью некоторых антибиотиков на дно флакона помещают силикагель — вещество, быстро поглощающее влагу и меняющее при этом свою окраску с синей на розовую. Изменение цвета силикагеля является показателем присутствия влаги во флаконе; диски из флаконов, в которых силикагель окрашен в розовый цвет, использовать нельзя.

Сроки и температура хранения дисков указаны на этикетке упаковки. Диски с просроченным сроком годности исполь-

зовать нельзя. После вскрытия флакон с дисками можно хранить в течение недели при температуре рефрижератора. Перед употреблением флаконы с дисками необходимо выдержать при комнатной температуре в течение 1 часа для предотвращения образования конденсата на внутренней стенке флакона.

Таблица 1

Перечень дисков, выпускаемых ПО «Мосмедпрепараты» им. Л. Я. Карпова

Антибиотик в диске	Регистрационный номер *	Антибиотик в диске	Регистрационный номер *
Ампициллин	60119	Олеандомицин	65065
Бензилпенициллин	60006	Оксациллин	60122
Гентамицин	64136	Полимиксин	64024
Доксициклин	—	Ристомицин	65073
Канамицин	64108	Рифампицин	69072
Карбенициллин (25 мкг)	60120	Сизомицин	—
Карбенициллин (100 мкг)	60121	Стрептомицин	61010
Левомицетин	63003	Тетрациклин	62015
Линкомицин	64124	Фузидин	—
Метициллин	60123	Цефалексин	—
Мономицин	65057	Цефалотин	—
Неомицин	64068	Эритромицин	65048

* На ряд дисков регистрационные номера не установлены.

2.2. **Питательные среды**

Для определения чувствительности могут быть использованы следующие плотные питательные среды:

Среда № 1.

Бульон Хоттингера с содержанием 120—140 мг% аминного азота	— 1000 мл
Агар-агар *	— 15 г

* В связи с наличием в некоторых сортах агар-агара повышенного содержания ионов двухвалентных металлов Ca^{++} и Mg^{++}, существенно влияющих на результаты определения чувствительности к ряду антибиотиков (тетрациклинам, аминогликозидам, полимиксину), для приготовления сред № 1 и № 2 рекомендуется использовать агар-агар «Тафуинский» Южно-морского завода Министерства рыбного хозяйства СССР

Натрия фосфат двузамещенный — 3 г
pH после стерилизации — 7,2—7,4

Среда № 2.

Мясо-пептонный бульон 1 : 2 — 1000 мл
Агар-агар — 15 г
Натрия фосфат двузамещенный — 3 г
pH после стерилизации — 7,2—7,4

Среда АГВ *.

Сухая питательная среда, в состав которой входят сухой питательный бульон, агар порошковидный, крахмал растворимый, натрия фосфат двузамещенный. Среду готовят из сухого порошка в соответствии с указанием, имеющимся на этикетке; pH после стерилизации $7{,}4 \pm 0{,}2$.

Для гемофильных микроорганизмов, не растущих на обычных питательных средах, в перечисленные выше питательные среды добавляют 5% дефибринированной или гемолизированной крови.

3. Методика определения чувствительности

3.1. Приготовление чашек

Расплавленную среду разливают по 20 мл в стерильные чашки Петри диаметром 100 мм, расположенные на горизонтальной поверхности. Перед заражением поверхность застывшей среды подсушивают в течение 30—40 минут при комнатной температуре с приоткрытыми крышками. Готовые чашки можно хранить при $+10°$ С не более 7 дней; перед употреблением их необходимо подсушить, как указано выше.

3.2. Приготовление инокулята и нанесение его на поверхность агаровой среды

Инокулят готовят из чистой 18—20 часовой культуры бактерий, выросшей на поверхности плотной питательной среды. Для этого 5—10 изолированных колоний суспендируют в жидкой питательной среде или в изотоническом растворе хлорида натрия. В качестве инокулята можно использовать также чистую 8—20 часовую бульонную культуру. Суспензию или бульонную культур разводят изотоническим раствором хлори-

---

* Среда АГВ выпускается Дагестанским НИИ питательных сред.

да натрия до мутности оптического стандарта ГИСК им. Л. А. Тарасевича на 10 ЕД (при работе со средой № 1 или № 2) или 5 ЕД (при работе со средой АГВ), а затем полученную взвесь разводят далее еще в 10 раз изотоническим раствором хлорида натрия. Такой инокулят в первом случае содержит $5 \cdot 10^7$, а во-втором — $2{,}5 \cdot 10^7$ микробных клеток в 1 мл взвеси (различия в плотности используемых инокулятов связаны с большей питательностью среды АГВ).

Инокулят в объеме 1—2 мл сразу после изготовления наносят на поверхность подсушенной агаровой среды и равномерно распределяют путем покачивания чашки. Избыток жидкости удаляют пипеткой. Приоткрытые чашки подсушивают при комнатной температуре в течение 10—15 минут.

В экстренных случаях для получения ориентировочных данных о чувствительности микроорганизмов допускается использование для посева непосредственно испытуемого материала. Плотные субстраты (мокрота, кал, гной и др.) должны быть предварительно тщательно гомогенизированы (растерты). Мочу или экссудат предварительно центрифугируют и посев производят из осадка. Материал наносят на поверхность среды с помощью ватного тампона или петли. После выделения чистой культуры анализ следует повторить.

3.3. **Наложение дисков**

Диски с помощью пинцета накладывают на поверхность зараженной питательной среды на одинаковом расстоянии один от другого и примерно на расстоянии 2 см от края чашки. На одну чашку следует помещать не более 6 дисков.

3.4. **Инкубация чашек**

Чашки помещают в термостат сразу после наложения дисков и инкубируют в течение 18—20 часов при 35—37° С в перевернутом кверху дном положении. При определении чувствительности к метициллину и оксациллину чашки инкубируют при 35° С.

3.5. **Учет результатов**

Чашки помещают кверху дном на темную матовую поверхность так, чтобы свет настольной лампы падал на них под углом 45° (учет в отраженном свете). Допускается учет результатов в проходящем свете, однако в этом случае отмечается бóльшая субъективность в оценке диаметров зон задержки роста.

Таблица 2

Пограничные значения диаметров зон задержки роста и значений МПК антибиотиков для интерпретации результатов

Антибиотики	Содержание антибиотика в диске мкг	Цвет диска	Код диска	Диаметы зон, мм: для сред № 1 и № 2: устойчивые	для сред № 1 и № 2: умеренно устойчивые	для сред № 1 и № 2: чувствительные	для среды АГВ: устойчивые	для среды АГВ: умеренно устойчивые	для среды АГВ: чувствительные	МПК, мкг/мл: устойчивые	МПК, мкг/мл: чувствительные
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Бензилпенициллин:											
при испытании стафилококков	6	зеленый	—	⩽20	21—28	⩾29	⩽20	21—28	⩾29	—	⩽0,1
при испытании других микроорганизмов				⩽11	12—21	⩾22	⩽10	11—16	⩾17	—	⩽1,5
Ампициллин:	10	белый	Л								
при испытании стафилококков				⩽20	21—28	⩾29	⩽20	21—28	⩾29	—	⩽0,2
при испытании грамотрицательных бактерий и энтерококков				⩽9	10—13	⩾14	⩽9	10—13	⩾14	⩾32	⩽8
Карбенициллин:											
при испытании культур кишечной палочки и протея	25	белый	К	⩽14	15—18	⩾19	⩽14	15—18	⩾19	⩾32	⩽16
при испытании культур синегнойной палочки	100	оливковый	К	⩽13	14—16	⩾17	⩽11	12—14	⩾15	⩾250	⩽125
Метициллин	10	белый	М	⩽13	14—17	⩾18	⩽13	14—18	⩾19	—	⩽3
Оксациллин	10	белый	О	⩽19	20—23	⩾24	⩽15	16—19	⩾20	—	⩽3
Цефалексин	30	белый	Ц	⩽11	12—16	⩾17				⩾32	⩽10
Цефалотин	30	желтый	Ц	⩽11	12—16	⩾17	⩽14	15—18	⩾19	⩾32	⩽10
Стрептомицин	30	фиолетовый	—	⩽13	14—16	⩾17	⩽16	17—19	⩾20	⩾15	⩽6
Неомицин	30	коричневый	—	⩽13	14—17	⩾18	⩽12	13—16	⩾17	—	⩽10
Канамицин	30	оранжевый	—	⩽14	15—18	⩾19	⩽14	15—18	⩾19	⩾25	⩽6
Мономицин	30	светло-оранжевый	—	⩽13	14—17	⩾18	⩽13	14—17	⩾18	—	⩽10

1	2	3	4
Гентамицин	10	белый	Г
Сизомицин	10	белый	С
Тетрациклин	30	желтый	—
Доксициклин	10	белый	Д
Эритромицин	15	красный	—
Олеандомицин	15	бирюзовый	—
Линкомицин	15	голубой	—
Левомицетин	30	белый	—
Рифампицин	5	оранжевый	Р
Фузидин	10	белый	Ф
Полимиксин	300 ЕД	бежевый	—
Ристомицин	30	черный	—

С помощью линейки или измерителя (кронциркуль, штангенциркуль) измеряют диаметры зон задержки роста вокруг дисков, включая диаметр самих дисков, с точностью до 1 мм. Не следует обращать внимание на очень мелкие колонии, выявляемые при определенных условиях освещения в пределах зоны торможения роста. При нерезко очерченных краях зон или зонах с двойными контурами следует измерять диаметр зоны по наиболее четкому контуру, игнорируя мелкие колонии или едва заметный газон у края зоны. При наличии больших колоний по периферии зоны, граница ее определяется местоположением внутреннего края этой группы колоний. Если крупные колонии распределены по всей зоне, культуру следует проверить на однородность, а испытание повторить. Такие колонии при отсутствии загрязнения инокулята посторонней микрофлорой позволяют предположить наличие гетерорезистентной популяции.

При определении чувствительности к некоторым антибиотикам роящихся штаммов протея, зона задержки роста может быть затянута тонкой вуалеобразной пленкой, которая обычно не мешает установлению границы зоны.

5	6	7	8	9	10	11	12
⩽13	—	⩾14	⩽15	—	⩾16	⩾6	⩽4
⩽13	—	⩾14				⩾6	⩽4
⩽15	16—19	⩾20	⩽16	17—21	⩾22	⩾12	⩽2
⩽12	13—19	⩾20				⩾12	⩽2
⩽14	15—18	⩾19	⩽17	18—21	⩾22	⩾8	⩽2
⩽12	13—17	⩾18	⩽16	17—20	⩾21	⩾8	⩽2
⩽19	20—23	⩾24	⩽19	20—23	⩾24	⩾8	⩽2
⩽14	15—18	⩾19	⩽15	16—18	⩾19	⩾16	⩽8
⩽9	10—12	⩾13	⩽12	13—15	⩾16	⩾8	⩽2
⩽12	13—19	⩾20				⩾16	⩽2
⩽8	9—12	⩾13	⩽11	12—14	⩾15	⩾50 ЕД/мл	—
⩽9	10—11	⩾12	⩽9	10—11	⩾12	—	⩽5

3.6. **Интерпретация полученных результатов**

Оценку результатов проводят по табл. 2, которая содержит пограничные значения диаметров зон задержки роста для устойчивых, умеренно устойчивых и чувствительных штаммов, а также значения МПК антибиотиков для устойчивых и чувствительных штаммов.

Пограничные значения диаметров зон представлены раздельно для сред № 1—2 и АГВ, поскольку эти среды отличаются по ряду параметров, определяющих интенсивность роста микроорганизмов и способность антибиотиков диффундировать в агар.

Полученные значения диаметров зон задержки роста сравнивают с пограничными значениями в таблице и относят изучаемые штаммы к одной из трех категорий чувствительности.

К чувствительным относят штаммы микроорганизмов, рост которых подавляется при концентрациях препарата, обнаруживаемых в сыворотке крови больного при использовании обычных доз антибиотиков. К умеренно-устойчивым относят

штаммы, для подавления роста которых требуются концентрации, создающиеся в сыворотке крови при введении максимальных доз препарата. Устойчивыми являются микроорганизмы, рост которых не подавляется препаратом в концентрациях, достижимых в организме при использовании максимально допустимых доз.

Метод диффузии в агар не дает надежных данных при определении чувствительности к плохо диффундирующим полипептидным антибиотикам — полимиксину, ристомицину. Если эти антибиотики предполагается использовать для лечения генерализованной инфекции, определение чувствительности следует проводить методом разведений.

4. Выбор дисков для исследования

Для сокращения объема испытания целесообразно использовать наборы дисков, составленные с учетом вида выделенного возбудителя и локализации инфекции (табл. 3).

Таблица 3

Основные наборы дисков с антибиотиками, рекомендуемые для определения чувствительности возбудителя в зависимости от патологического материала и вида выделенной культуры

Диски с антибиотиками	Предварительное испытание чувствительности микрофлоры путем прямого посева патологического материала			Испытание чувствительности чистой кольтуры возбудителя			
	мокрота	гной	моча	стафилокок	стрептококки, пневмококки	энтеробактерии (эшерихи, протей и др.)	псевдомонады
1	2	3	4	5	6	7	8
Бензилпенициллин	(+)	+		+	+		
Ампициллин	+		+			+	
Карбенициллин (25 мкг)						(+)	
Карбенициллин (100 мкг)			+				+
Метициллин-Оксациллин	+	+		+			
Цефалексин-Цефалотин	+	+		+	+	+	

1	2	3	4	5	6	7	8
Стрептомицин				(+)		(+)	
Неомицин-Мономицин						(+)	
Канамицин		+		(+)		+	
Гентамицин-Сизомицин		+		(+)		(+)	+
Тетрациклин-Докси-циклин	+	+		+	+	+	
Эритромицин-Олеандомицин	+			+	+		
Линкомицин				+	+		
Левомицетин	+	+				+	
Рифампицин				(+) *		(+) *	(+) *
Фузидин				(+)			
Полимиксин						(+)	+
Ристомицин				(+)			

Примечание: (+) — антибиотики, чувствительность к которым следует определять во вторую очередь;

(+) * — возможно применение при устойчивости ко всем другим антибиотикам.

ВОЗ для определения чувствительности к антибиотикам, близким по химическому строению и антибактериальному спектру действия, рекомендует использовать класс-диск, содержащий один из антибиотиков определенной группы.

Так, с помощью диска, содержащего бензилпеницилин, можно определять чувствительность к феноксиметилпенициллину и бициллину. Для определения чувствительности к антибиотикам тетрациклиновой группы (за исключением доксициклина) пользуются диском, содержащим тетрациклин.

Диски с оксациллином можно использовать для определения чувствительности к оксациллину, метициллину и диклоксациллину. Стафилоккоки, устойчивые к оксациллину, устойчивы и к антибиотикам цефалоспориновой группы. Диск с цефалотином можно использовать для определения чувствительности к цефалоридину и цефалексину.

5. Контроль воспроизводимости и точности полученных результатов

Применение заранее разработанной таблицы для интерпретации результатов возможно только при соблюдении строго стандартных условий постановки опыта и использовании стандартных питательных сред.

Таблица 4

Допустимые пределы диаметров зон задержки роста эталонных штаммов при контроле воспроизводимости и точности результатов

	Диаметры зон задержки роста на средах № 1 и № 2, мм			Диаметры зон задержки роста на среде АГВ, мм		
	Staph. aureus ATCC 25923	E. coli ATCC 25922	Ps. aeruginosa ATCC 27853	Staph. aureus ATCC 25923	E. coli ATCC 25922	Ps. aeruginosa ATCC 27853
Бензилпенициллин	—	—	—	29—38	—	—
Ампициллин	24—35	13—20	—	30—36	14—20	—
Карбенициллин (25 мкг)	—	—	—	32—38	19—25	—
Карбенициллин (100 мкг)	—	21—26	20—24	35—42	23—29	18—24
Метициллин	—	—	—	22—30	—	—
Оксациллин	27—32	—	—	24—34	—	—
Цефалотин	24—37	15—22	—	30—40	15—20	—
Стрептомицин	17—25	14—22	—	20—25	14—19	—
Неомицин	19—27	18—24	—	20—27	13—17	—
Канамицин	20—27	18—26	—	20—27	15—19	—
Мономицин	—	—	—	22—30	14—18	—
Гентамицин	20—28	20—27	16—24	22—32	21—30	16—26
Тетрациклин	20—29	19—26	—	22—31	17—26	—
Эритромицин	23—31	—	—	22—31	8—15	—
Олеандомицин	20—29	—	—	22—29	—	—
Линкомицин	24—32	—	—	24—32	—	—
Левомицетин	21—27	23—28	—	19—25	19—27	—
Рифампицин	—	—	—	26—34	7—11	—
Полимиксин	—	12—17	—	—	16—20	15—20
Ристомицин	14—18	—	—	12—16	—	—

Для контроля воспроизводимости и точности процедуры определения чувствительности рекомендуется при каждой постановке теста параллельно с испытуемыми штаммами использовать эталонные штаммы Escherichia coli (ATCC 25922), Staphylococcus aureus (ATCC 25923) и Pseudomonas aeruginosa (ATCC 27853), которые можно получить в ГИСК им. Л. А. Тарасевича.

Эталонные штаммы сохраняют в полужидком питательном агаре под вазелиновым маслом. Пересев производят один раз в 3 месяца.

Диаметры зон задержки роста эталонных штаммов не должны выходить за пределы, указанные в табл. 4. Эталонные штаммы могут быть использованы для проверки качества среды, дисков и правильности методики постановки теста.

Выше было отмечено влияние катионов Ca^{++} и Mg^{++} в питательной среде на результаты определения чувствительности. Колебания в содержании указанных катионов особенно сильно отражаются на чувствительности Pseudomonas aeruginosa к гентамицину, что в ряде случаев может привести к неправильной оценке результатов определения. Эталонный штамм Pseudomonas aeruginosa ATCC 27853 можно использовать для корректировки пограничных значений диаметров зон при определении чувствительности клинических штаммов Pseudomonas aeruginosa к гентамицину. Для этого от диаметра зоны эталонного штамма, установленного в опыте, отнимают 6 и 3 мм. Полученные две цифры характеризуют границы «подвижной» промежуточной зоны, т. е. зоны умеренно устойчивых штаммов. Например, если диаметр зоны эталонного штамма вокруг диска с гентамицином равен 19 мм, то границами промежуточной зоны будут 13—16 мм, а пограничными значениями для устойчивых и чувствительных штаммов станут соответственно $\leqslant 12$ и $\geqslant 17$ мм (см. табл. 2).

Заключение

Разработаны новые «Методические указания по определению чувствительности микроорганизмов к антибиотикам методом диффузии в агар с использованием дисков». Предлагаемая методика основана на измерении диаметров зон задержки роста изучаемых микроорганизмов вокруг дисков с антибиотиками и оценке полученных данных по прилагаемой таблице.

Оценочная таблица для интерпретации данных диффузионного теста адаптирована к определенным питательным средам. Внедрение в производство новых питательных сред, антибиотиков и дисков потребует внесения в «Методические указания» соответствующих уточнений и дополнений.

Л-78554 от 28.04.83 г. Зак. 839. Тир. 500.

Типография Министерства здравоохранения СССР

gost.e-ecolog.ru