ФЕДЕРАЛЬНОЕ АГЕНТСТВО

ПО ТЕХНИЧЕСКОМУ РЕГУЛИРОВАНИЮ И МЕТРОЛОГИИ

НАЦИОНАЛЬНЫЙ СТАНДАРТ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

ГОСТ Р ИСО 20776-1— 2010

КЛИНИЧЕСКИЕ ЛАБОРАТОРНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ И ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ТЕСТ-СИСТЕМЫ *IN VITRO*. ИССЛЕДОВАНИЕ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ ИНФЕКЦИОННЫХ АГЕНТОВ И ОЦЕНКА ФУНКЦИОНАЛЬНЫХ ХАРАКТЕРИСТИК ИЗДЕЛИЙ ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЯ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ К АНТИМИКРОБНЫМ СРЕДСТВАМ

Часть 1

Референтный метод лабораторного исследования активности антимикробных агентов против быстрорастущих аэробных бактерий, вызывающих инфекционные болезни

ISO 20776-1:2006
Clinical laboratory testing and *in vitro* diagnostic test systems — Susceptibility testing of infectious agents and evaluation of performance of antimicrobial susceptibility test devices — Part 1: Reference method for testing the *in vitro* activity of antimicrobial agents against rapidly growing aerobic bacteria involved in infectious diseases
(IDT)

Издание официальное

Москва
Стандартинформ
2011

gost.e-ecolog.ru

Предисловие

Цели и принципы стандартизации в Российской Федерации установлены Федеральным законом от 27 декабря 2002 г. № 184-ФЗ «О техническом регулировании», а правила применения национальных стандартов Российской Федерации — ГОСТ Р 1.0 — 2004 «Стандартизация в Российской Федерации. Основные положения»

Сведения о стандарте

1 ПОДГОТОВЛЕН Лабораторией проблем клинико-лабораторной диагностики ГОУ ВПО «Московская медицинская академия им. И.М. Сеченова» на основе собственного аутентичного перевода на русский язык стандарта, указанного в пункте 4

2 ВНЕСЕН Техническим комитетом по стандартизации ТК 380 «Медицинские изделия для диагностики *in vitro*»

3 УТВЕРЖДЕН И ВВЕДЕН В ДЕЙСТВИЕ Приказом Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии Российской Федерации от 23 ноября 2010 г. № 499-ст

4 Настоящий стандарт идентичен международному стандарту ИСО 20776-1:2006 «Клинические лабораторные исследования и диагностические тест-системы *in vitro*. Исследование чувствительности инфекционных агентов и оценка функциональных характеристик изделий для исследования чувствительности к антимикробным средствам. Часть 1. Референтный метод лабораторного исследования активности антимикробных агентов против быстрорастущих аэробных бактерий, вызывающих инфекционные болезни» (ISO 20776-1:2006 «Clinical laboratory testing and *in vitro* diagnostic test systems — Susceptibility testing of infectious agents and evaluation of performance of antimicrobial susceptibility test devices — Part 1 :Reference method for testing the *in vitro* activity of antimicrobial agents against rapidly growing aerobic bacteria involved in infectious diseases»)

5 ВВЕДЕН ВПЕРВЫЕ

Информация об изменениях к настоящему стандарту публикуется в ежегодно издаваемом информационном указателе «Национальные стандарты», а текст изменений и поправок — в ежемесячно издаваемых информационных указателях «Национальные стандарты». В случае пересмотра (замены) или отмены настоящего стандарта соответствующее уведомление будет опубликовано в ежемесячно издаваемом информационном указателе «Национальные стандарты». Соответствующая информация, уведомление и тексты размещаются также в информационной системе общего пользования — на официальном сайте Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии в сети Интернет

© Стандартинформ, 2011

Настоящий стандарт не может быть полностью или частично воспроизведен, тиражирован и распространен в качестве официального издания без разрешения Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии

Содержание

1 Область применения 1
2 Термины и определения 1
3 Процедуры испытания 3
3.1 Общие положения 3
3.2 Среда 3
3.3 Антибактериальные агенты 3
3.4 Подготовка инокулюма (прививочного материала) 8
3.5 Инокулирование планшетов для микроразведения 9
3.6 Инкубация планшетов для микроразведения 9
3.7 Чтение результатов 10
3.8 Особые ситуации испытаний, при которых результат МПК может быть ненадежным 10
4 Контроль качества 11
Приложение А (обязательное) Требования к бульону Mueller—Hinton 16
Библиография 17

Введение

Лабораторные исследования чувствительности проводят на микроорганизмах, вызывающих болезни, особенно если организм предположительно относится к виду резистентному (устойчивому) по отношению к часто используемым антибактериальным агентам.

Данные тесты также важны для надзора за резистентностью, для эпидемиологических исследований восприимчивости и при сравнении новых и существующих антибактериальных средств.

Процедуры разведения используются для определения минимальной подавляющей концентрации (МПК) антимикробных препаратов и служат референтным методом испытания чувствительности (восприимчивости) микроорганизмов к антимикробным средствам.

Методы МПК используются:

- для надзора за резистентностью;
- при сравнительных испытаниях новых агентов, чтобы установить восприимчивость организмов, дающих сомнительные результаты в рутинных исследованиях;
- для испытаний на организмах, где рутинные тесты могут быть ненадежными и когда количественный результат требуется для менеджмента лечения.

В тестах разведения микроорганизмы проверяют на их способность производить видимый рост на ряде агаровых пластин (разведение в агаре) или в бульоне (разведение в бульоне), содержащих последовательные разведения антибактериального агента.

Наиболее низкая концентрация антибактериального агента (в мг/л), которая при определенных условия *in vitro* предотвращает появление видимого роста микроорганизма в пределах определенного промежутка времени, известна как минимальная подавляющая концентрация (МПК).

МПК служит руководством для клинициста относительно чувствительности организма к антибактериальному агенту и помогает в принятии решений о проведении лечения. Необходимы тщательный контроль и стандартизация внутри- и межлабораторной воспроизводимости, поскольку результаты могут значительно различаться в зависимости от используемого метода.

Общепринято, что бульонные тесты МПК воспроизводимы в пределах одного двойного разведения реальной конечной точки (то есть ± одна лунка или пробирка в серии двойных разведений).

Разведение бульона — техника, согласно которой контейнеры, содержащие идентичные объемы растворов бульона с антибактериальным агентом в возрастающих (обычно в геометрической прогрессии) концентрациях, инокулируют известным числом микроорганизмов.

Микроразведение бульона — выполнение теста разведения бульона в емкостях для микроразведения.

Метод, описанный в настоящем стандарте, предназначен для испытания чистых культур аэробных бактерий, которые легко выращиваются путем ночной инкубации на агаре и хорошо растут в бульоне Mueller-Hinton, который может иметь добавки. Метод микроразведения в бульоне, описанный в настоящем стандарте, аналогичен методам, используемым во многих странах [1] — [5]. Данный метод — по существу то же самое, что и метод микроразведения в бульоне, изданный Европейским Комитетом по испытаниям антибактериальной восприимчивости (EUCAST) [6]. Все эти методы основаны на принципах, описанных Ericsson и Sherris [7].

НАЦИОНАЛЬНЫЙ СТАНДАРТ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

КЛИНИЧЕСКИЕ ЛАБОРАТОРНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ И ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ТЕСТ-СИСТЕМЫ *IN VITRO*. ИССЛЕДОВАНИЕ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ ИНФЕКЦИОННЫХ АГЕНТОВ И ОЦЕНКА ФУНКЦИОНАЛЬНЫХ ХАРАКТЕРИСТИК ИЗДЕЛИЙ ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЯ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ К АНТИМИКРОБНЫМ СРЕДСТВАМ

Часть 1

Референтный метод лабораторного исследования активности антимикробных агентов против быстрорастущих аэробных бактерий, вызывающих инфекционные болезни

Clinical laboratory testing and *in vitro* diagnostic test systems. Susceptibility testing of infectious agents and evaluation of performance of antimicrobial susceptibility test devices. Part 1. Reference method for testing the *in vitro* activity of antimicrobial agents against rapidly growing aerobic bacteria involved in infectious diseases

Дата введения — 2012 — 03— 01

ПРЕДОСТЕРЕЖЕНИЕ! Использование настоящего стандарта может быть связано с применением опасных материалов, операций и оборудования. Настоящий стандарт не затрагивает решения проблем безопасности, связанных с его использованием. На пользователе настоящего стандарта лежит ответственность за установление соответствующих мер безопасности, условий охраны здоровья и определение применимости регулирующих ограничений перед использованием стандарта.

1 Область применения

Настоящий стандарт описывает референтный метод микроразведений в бульоне для определения МПК. МПК отражает активность препарата в описанных условиях проведения теста и может быть использована для целей менеджмента лечения, принимая в расчет другие факторы, такие как фармакология препарата или механизмы резистентности бактерий. Это позволяет осуществить классификацию бактерий как «чувствительную» (S), «промежуточную» (I) или «резистентную» (R) формы. Кроме того, распределения МПК могут использоваться для определения дикого или недикого типов бактериальной популяции.

Хотя клиническая интерпретация значения МПК вне возможностей настоящего стандарта, модификации основного метода требуются для определенного антибактериального агента или комбинации бактерий, чтобы облегчить клиническую интерпретацию. Эти модификации приведены в таблице 3. Желательно сравнить другие методы испытания восприимчивости (например, рутинные методы или диагностические испытательные устройства) с данным референтным методом для валидации, чтобы гарантировать сопоставимые и надежные результаты.

2 Термины и определения

В настоящем стандарте применены следующие термины с соответствующими определениями:

2.1 **антибактериальный агент** (antimicrobial agent): Вещество биологического, полусинтетического или синтетического происхождения, которое тормозит рост или убивает бактерии и таким образом потенциально применимо для лечения инфекций.

Примечание — Дезинфицирующие средства, антисептики и консерванты не включены в это определение.

Издание официальное

2.2 **антибактериальные агенты — свойства** (antimicrobial agents — properties):

2.2.1 **активность** (potency): Антибактериально активная фракция испытуемого вещества, определенного в биопробе против образца для сравнения того же вещества.

Примечание — Активность выражена как массовая доля в миллиграммах на грамм (мг/г) или как содержание активности в Международных Единицах (IU) на грамм, или как объемная доля или массовая доля в процентах, или как концентрация количества вещества (массовая доля) в молях на литр компонентов в испытуемом веществе.

2.2.2 **концентрация** (concentration): Количество антибактериального агента в определенном объеме жидкости.

Примечание 1 — Концентрация выражена в мг/л.

Примечание 2 — Мг/л =мкг/мл, но не рекомендуют использовать единицу мкг/мл.

2.3 **базовый (основной) раствор** (stock solution): Первоначальный раствор, используемый для дальнейших разведений.

2.4 **минимальная подавляющая концентрация;** МПК (minimum inhibitory concentration, MIC): Наименьшая концентрация, которая, при определенных условиях *in vitro* предотвращает видимый рост бактерий в пределах определенного промежутка времени.

Примечание — МПК выражена в мг/л.

2.5 **пограничное значение** (breakpoint, BP): Определенные значения параметров, например МПК, на основе которых бактерии могут быть распределены на клинические категории, как «чувствительные», «промежуточные» и «резистентные».

Примечание — Для действующих интерпретирующих пограничных значений можно сослаться на последние публикации организаций, использующих данный референтный метод (например, CLSI и EUCAST).

2.5.1 **чувствительный** (susceptible, S): Бактериальный штамм, ингибированный *in vitro* концентрацией антибактериального агента, которая связана с высокой вероятностью терапевтического успеха

Примечание 1 — Бактериальный штамм класифицирован как чувствительный, путем применения соответствующих пограничных значений в определенной фенотипичной тест-системе.

Примечание 2 — Эти пограничные значения могут быть изменены из-за изменений условий (например, изменения дозировки обычно используемого препарата, появление новых механизмов резистентности)

2.5.2 **промежуточная (умеренно чувствительная) форма** (intermediate, I): Бактериальный штамм, ингибированный *in vitro* концентрацией антибактериального агента, которая связана с сомнительным терапевтическим эффектом

Примечание 1 — Бактериальный штамм классифицирован как промежуточная форма, с применением соответствующих пограничных значений в определенной фенотипичной тест-системе.

Примечание 2 — Данный класс чувствительности означает, что инфекция, вызванная данным изолятом, может быть соответственно купирована в тех участках тела, где препарат физиологически концентрируется, или когда может быть применена высокая дозировка препарата.

Примечание 3 — Данный класс также обозначает «буферную зону» для предупреждения небольших неконтролируемых технических факторов от несоответствия в интерпретациях.

Примечание 4 — Данные пограничные значения могут быть изменены из-за изменений в условиях (например, изменения дозировки обычно используемого препарата, появление новых механизмов резистентности).

2.5.3 **резистентный** (resistant, R): Бактериальный штамм, ингибированный *in vitro* концентрацией антибактериального агента, которая связана с высокой вероятностью терапевтической неудачи.

Примечание 1 — Бактериальный штамм классифицирован как резистентный, с применением соответствующих пограничных значений в определенной фенотипичной тест-системе.

Примечание 2 — Данные пограничные значения могут быть изменены из-за изменений при обстоятельствах (например, изменения дозировки обычно используемого препарата, появления новых механизмов резистентности).

2.6 **дикий тип** (wild type): Отсутствие приобретенных механизмов резистентности к антибактериальному агенту для данного штамма.

2.7 **референтный штамм** (reference strain): Каталогизируемые, охарактеризованные бактерии с устойчивыми, определенными антибактериальными фенотипами и/или генотипами чувствительности.

Примечание — Референтные штаммы сохраняют как базовые культуры, из которых получают рабочие культуры. Они могут быть получены из коллекций культур и использованы для контроля качества.

2.8 **метод испытания чувствительности** (susceptibility testing method):

2.8.1 **разведение в бульоне** (broth dilution): Техника, в которой контейнеры заполнены соответствующими объемами антибактериального раствора, с использованием возрастающих (обычно вдвое) концентраций антибактериального агента и соответствующих объемов бульона с определенным прививочным материалом.

Примечание — Цель этого метода — определение МПК.

2.8.2 **микроразведение** (microdilution): Выполнение разведения в бульоне в планшетах для микроразведения вместимостью 200 мкл на лунку.

2.9 **бульон** (broth): Жидкая среда, используемая для роста бактерий *in vitro*.

2.10 **инокулюм (прививочный материал)** (inoculum): Число бактерий в суспензии, рассчитанное относительно окончательного объема.

Примечание — Прививочный материал выражен как колонии, образующие единицы в миллилитре (КОЕ/мл).

2.11 **эффект инокулюма** (inoculum effect): Изменение в МПК, связанное с изменением в инокулюме (прививочном материале).

3 Процедуры испытания

3.1 Общие положения

Испытания выполняют в планшетах для микроразведения. Метод основан на подготовке рабочих растворов антибактериального агента объемом 50 мкл на лунку (с добавлением прививочного материала также в объеме 50 мкл) или в объеме 100 мкл на лунку (с добавлением максимально 5 мкл объемов прививочного материала).

3.2 Среда

Следует использовать бульон Mueller—Hinton (см. приложение А для уточнения).

3.3 Антибактериальные агенты

3.3.1 Общие положения

Антибактериальные агенты должны быть получены непосредственно от изготовителя или из надежных коммерческих источников; фармацевтические препараты для клинического применения неприемлемы. Антибактериальные агенты должны быть снабжены номером партии, показателем потенции, указанием срока действия и деталями рекомендованных условий хранения. Вещества следует хранить в плотно закрытых контейнерах в темноте при температуре 4 °С — 8 °С, с осушителем, если иначе не рекомендовано изготовителем. Гигроскопические агенты должны быть распределены в определенных аликвотах, одна из которых используется в каждом случае испытания. Чтобы избежать конденсации, следует согреть контейнеры до комнатной температуры перед открытием.

3.3.2 Подготовка основных растворов

Для взвешивания антибактериальных агентов следует использовать калиброванные аналитические весы. Расчет потенции порошка для получения количества вещества антибактериального агента или объема разбавителя, необходимого для стандартного раствора, вычисляют по формуле

$$m = \frac{V \times \rho}{P}, \quad (1)$$

$$V = \frac{m \times P}{\rho}, \quad (2)$$

где ρ — концентрация основного раствора, мг/л ;

m — масса антибактериального агента (порошок), г;

P — потенция антибактериального агента (порошок), мг/г;

V — объем разбавителя, л.

Концентрации основных растворов должны быть 1000 мг/л или больше, хотя растворимость некоторых агентов является лимитирующим фактором. Фактические концентрации основных растворов зависят от метода подготовки рабочих растворов (серийных разведений). Агенты должны быть растворены и разведены стерильной дистиллированной водой, если изготовителем не установлено иное. Некоторые агенты требуют альтернативных растворителей (см. таблицу 1). Стерилизация растворов обычно не является необходимой. Если она требуется, стерилизация должна быть проведена с помощью мембранной фильтрации, и образцы до и после стерилизации должны быть сравнены испытанием, чтобы гарантировать, что не произошло адсорбции.

Если информация относительно стабильности основных растворов при указанных условиях хранения недоступна, должны быть приготовлены свежие растворы для каждой партии испытаний.

Таблица 1 — Примеры растворителей и разбавителей для приготовления основных растворов избранных антимикробных средств

Антимикробный агент	Растворитель	Разбавитель
Amikacin	Вода	
Amoxicillin	Фосфатный буфер 0,1моль/л, pH 6,0	Фосфатный буфер 0,1моль/л, pH 6,0
Ampicillin	Фосфатный буфер 0,1моль/л, pH 6,0	Фосфатный буфер 0,1моль/л, pH 6,0
Azithromycin	Этанол, объемная доля 95 % или ледяная уксусная кислота[a]	Вода
Azlocillin	Вода	
Aztreonam	Насыщенный раствор бикарбоната натрия	Вода
Carbenicillin	Вода	
Cefaclor	Вода	
Cefamandole	Вода	
Cefazolin	Фосфатный буфер 0,1моль/л, pH 6,0	Фосфатный буфер 0,1моль/л, pH 6,0
Cefdinir	Фосфатный буфер 0,1моль/л, pH 6,0	
Cefditoren	Фосфатный буфер 0,1моль/л, pH 6,0	
Cefepime	Фосфатный буфер 0,1моль/л, pH 6,0	Фосфатный буфер 0,1моль/л, pH 6,0
Cefetamet	Фосфатный буфер 0,1моль/л, pH 6,0	
Cefixime	Фосфатный буфер 0,1моль/л, pH 6,0	Фосфатный буфер 0,1моль/л, pH 6,0
Cefmetazole	Вода	
Cefonicid	Вода	
Cefoperazone	Вода	
Cefotaxime	Вода	
Cefotetan	Диметилсульфоксид	Вода
Cefoxitin	Вода	
Cefpodoxime	Раствор бикарбоната натрия, массовая концентрация 0,1 %	Вода
Cefprozil	Вода	
Ceftazidime	Насыщенный раствор бикарбоната натрия	Вода
Ceftibuten	1/10 объема диметилсульфоксида	Вода
Ceftizoxime	Вода	

Продолжение таблицы 1

Антимикробный агент	Растворитель	Разбавитель
Ceftobiprole	Диметилсульфоксид плюс ледяная уксусная кислота[b]	Вода
Ceftriaxone	Вода	
Cefuroxime	Фосфатный буфер 0,1моль/л, pH 6,0	Фосфатный буфер 0,1моль/л, pH 6,0
Cephalothin	Фосфатный буфер 0,1моль/л, pH 6,0	Вода
Chloramphenicol		Вода
Cinoxacin		Вода
Ciprofloxacin	Вода	
Clarithromycin	Метанол или ледяная уксусная кислота[a]	0,1моль/л фосфатный буфер, pH 6,5
Clavulanic acid	Фосфатный буфер 0,1моль/л, pH 6,0	Фосфатный буфер 0,1моль/л, pH 6,0
Clinafloxacin	Вода	
Clindamycin	Вода	
Colistin[c]	Вода	Вода
Dalbavancin	Диметилсульфоксид	Вода плюс диметил сульфоксид[d]
Daptomicin	Вода	Вода
Dirithromycin	Ледяная уксусная кислота[a]	Вода
Doripenem	NaCl, объемная доля 0,85 %	NaCl, объемная доля 0,85 %
Doxycycline	Вода	
Enoxacin	Половина объема воды, минимальный объем 0,1 моль/л NaOH до растворения, затем довести водой до полного объема	Вода
Ertapenem	Фосфатный буфер 0,01 моль/л, pH 7,2	Фосфатный буфер 0,01 моль/л, pH 7,2
Erythromycin	Этанол, объемная доля 95 % или ледяная уксусная кислота[a]	Вода
Faropenem	Вода	Вода
Fleroxacin	Половина объема воды, минимальный объем 0,1 моль/л NaOH до растворения, затем довести водой до полного объема	Вода
Fusidic acid	Этанол, объемная доля 95 %	Вода
Garenoxacin	Вода (при встряхивании)	
Gatifloxacin	Вода (при встряхивании)	
Gemifloxacin	Вода	
Gentamicin	Вода	
Imipenem	Фосфатный буфер 0,01 моль/л, pH 7,2	Фосфатный буфер 0,01 моль/л, pH 7,2
Kanamycin	Вода	
Levofloxacin	Половина объема воды, минимальный объем 0,1 моль/л NaOH до растворения, затем довести водой до полного объема	Вода

Продолжение таблицы 1

Антимикробный агент	Растворитель	Разбавитель
Linezolid	Вода	
Loracarbef	Вода	
Mecillinam	Вода	
Meropenem	Фосфатный буфер 0,01 моль/л, pH 7,2	Фосфатный буфер 0,01 моль/л, pH 7,2
Methicillin	Вода	
Mezlocillin	Вода	
Minocycline	Вода	
Moxalactam (diammonium salt)[e]	0,04 моль/л NaCl (оставить на 1,5—2,0 ч)	Фосфатный буфер 0,1 моль/л, pH 6,0
Moxifloxacin	Вода	
Mupirocin	Вода	
Nafcillin	Вода	
Nalidixic acid	Половина объема воды, минимальный объем 0,1 моль/л NaOH до растворения, затем довести водой до полного объема	Вода
Netilmicin	Вода	
Nitrofurantoin	Минимальный объем диметилформамида до растворения, затем довести до полного объема фосфатным буфером 0,1 моль/л, pH 8,0	Фосфатный буфер 0,1 моль/л, pH 8,0
Norfloxacin	Половина объема воды, минимальный объем 0,1 моль/л NaOH до растворения, затем довести водой до полного объема	Вода
Ofloxacin	Половина объема воды, минимальный объем 0,1 моль/л NaOH до растворения, затем довести водой до полного объема	Вода
Oxacillin	Вода	
Penicillin	Вода	
Piperacillin	Вода	
Polymyxin B	Вода	Вода
Quinupristindalfo pristin	Вода	
Rifampicin	Метанол	Вода
Sparfloxacin	Вода	
Sulbactam	Фосфатный буфер 0,1моль/л, pH 6,0	Фосфатный буфер 0,1моль/л, pH 6,0
Sulphonamides	Половина объема воды, минимальный объем 0,1 моль/л NaOH до растворения, затем довести водой до полного объема	Вода
Teicoplanin	Вода	

Окончание таблицы 1

Антимикробный агент	Растворитель	Разбавитель
Telavancin	Диметилсульфоксид	Вода
Telithromycin	Ледяная уксусная кислота[a]	Вода
Tetracycline	Вода	
Ticarcillin	Фосфатный буфер 0,1моль/л, pH 6,0	Фосфатный буфер 0,1моль/л, pH 6,0
Tigecycline	Вода	Вода
Tobramycin	Вода	
Trimethoprim	Половина объема воды, затем минимальный объем 0,1 моль/л молочной кислоты или 0,1 моль/л NaCl до растворения, затем довести до общего объема водой	Вода
Trimethoprim (if lactate)	Вода	
Trospectomycin	Вода	
Vancomycin	Вода	

[a]Для приготовления ледяной уксусной кислоты к половине объема воды добавить по каплям ледяную уксусную кислоту до растворения, не превышая концентрацию 2,5 мг/л, добавить воду до полного объема. Приготовленная таким образом ледяная уксусная кислота эквивалентна уксусной кислоте с объемной фракцией >99 %.

[b] На каждые 1,5 мг ceftobiprole добавить 110 мкл смеси диметилсульфоксида и ледяной уксусной кислоты в соотношении 10:1. Энергично смешивать в течение 1 мин, затем прерывисто в течение 15 мин. Развести до 1 мл дистиллированной водой.

[c] Формула colistin, использованного при испытании антимикробной чувствительности, представляет собой colistin sulphate, а не colistin methane sulfphonate (sulphomethate).

[d] Стартовый основной раствор dalbavancin должен быть приготовлен с концентрацией не выше 1600 мг/л. Промежуточный раствор с концентрацией 100× должен быть затем разбавлен диметисульфоксидом. Окончательные 1:100 разведения должны быть сделаны прямо в юстированный по катионам бульон Mueller-Hinton (CAMHB) с добавкой полисорбата-80, объемная доля 0,002 %, таким образом, чтобы конечная концентрация диметилсульфоксида была бы не больше 1 %.

[e] Диаммониевая соль moxalactam очень стабильна, но не является полностью чистым R-изомером. Moxalactam для клинического применения представляет собой смесь R- и S-изомеров в соотношении 1:1. Поэтому соль растворяют в 0,04 моль/л HCl и оставляют на 1,5—2,0 ч для проведения реакции, с тем, чтобы установилось равное соотношение обоих изомеров.

Примечание 1 — Информация относительно растворителей и разбавителей, приведенная в таблице 1, была заимствована, в основном, из документа CLSI (ранее NCCLS) M100-S16 (стандарты функциональных характеристик для испытания антимикробной чувствительности; Шестнадцатое информационное приложение [7]). Данная информация периодически обновляется. Можно свериться с последней версией M-100 в CLSI (бывший NCCLS), 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, PA 19087, USA.

Примечание 2 — Дальнейшую информацию относительно растворителей и разбавителей для приготовления основных растворов избранных антимикробных средств можно получить в Европейской фармакопее или Фармакопее США[1)].

3.3.3 Подготовка рабочих растворов

Диапазон концентраций, отобранных для испытания, зависит от микроорганизмов и антибактериального агента. Выбранный диапазон должен давать полное определение конечной точки МПК для соответствующих референтных штаммов. Двойные серийные разведения, основанные на 1 мг/л, готовят в бульоне Mueller-Hinton. Разведения должны быть приготовлены не последовательным разведением, а согласно процедуре, представленной в таблице 2. Рабочие растворы должны использоваться в день их приготовления, если нет информации о стабильности растворов при указанных условиях хранения.

[1)] Аналогичная информация представлена в Государственной фармакопее Российской Федерации.

Таблица 2 — Подготовка рабочих растворов антибактериальных агентов для использования при испытаниях чувствительности с применением разведений в бульоне [8]

Концентрация антибактериального агента в базовом растворе, мг/л	Объем базового раствора, мл	Объем бульона[a], мл	Полученная концентрация антимикробного агента, мг/л
5120	1	9	512
512	1	1	256
512	1	3	128
512	1	7	64
64	1	1	32
64	1	3	16
64	1	7	8
8	1	1	4
8	1	3	2
8	1	7	1
1	1	1	0,5
1	1	3	0,25
1	1	7	0,125

[a]Бульон, использованный для разведения, затем используют для теста чувствительности. Любую добавку вводят перед введением антибактериального агента, чтобы сохранить требуемую концентрацию.

3.3.4 Подготовка планшетов для микроразведения

Рабочие растворы распределяют в планшеты для микроразведения по 50 мкл на лунку с удвоенной желательной окончательной концентрацией антибактериального агента, или по 100 мкл в лунку с желательной окончательной концентрацией.

По крайней мере одна лунка, содержащая 50 мкл или 100 мкл антибактериальной среды без агента, должна быть использована как контроль роста для каждого проверяемого штамма. Аналогично, лунка, содержащая 100 мкл среды без антибактериального агента, должна быть использована как неинокулированная лунка отрицательного контроля для каждого проверяемого штамма.

3.3.5 Хранение планшетов для микроразведения

Заполненные планшеты могут использоваться немедленно или могут быть сохранены в течение трех месяцев. Для хранения заполненные планшеты должны быть запечатаны в полиэтиленовые пакеты и немедленно помещены в морозильник при температуре ниже минус 60 °С, если нет информации относительно устойчивости антибактериального агента при более высоких температурах.

Хотя антибактериальные агенты в замороженных планшетах обычно остаются устойчивыми в течение нескольких месяцев, определенные агенты (например, clavulanic acid и imipenem) более лабильны, чем другие, и должны храниться при температуре ниже минус 60 °С. Подносы не следует хранить в морозильнике с функцией саморазмораживания и допускать их растаивание, антибактериальные растворы нельзя повторно замораживать, так как повторные циклы таяния — замораживания ускоряют деградацию некоторых антибактериальных агентов, особенно β-лактамов.

3.4 Подготовка инокулюма (прививочного материала)

3.4.1 Общие положения

Стандартизация инокулюма существенна для точного и воспроизводимого испытания чувствительности методом разведения в бульоне. Поэтому проверки чистоты и подсчет жизнеспособных колоний должны быть выполнены на каждом изоляте, проверенном с применением данной референтной методики.

Инокулюм может быть приготовлен путем разведения бульонной культуры или суспензии колоний, взятых из ночной культуры на неселективной агаровой среде, в бульоне или солевом растворе. Для любого метода берут четыре или пять колоний, выросших на чистой неселективной питательной агаровой среде, чтобы избежать случайного выбора нетипичного варианта микроорганизма.

Окончательный состав инокулюма должен содержать 5×10^5 КОЕ/мл (диапазон от 2×10^5 до 8×10^5 КОЕ/мл).

3.4.2 Метод бульонной культуры

Три — пять колоний берут петлей с неселективной питательной агаровой среды и перемещают в бульон типа триптиказо-соевого или бульона из сердечно-мозговой вытяжки. Используемый бульон не должен быть антагонистом по отношению к проверяемому антибактериальному агенту. Бульон инкубируют при 34 °С — 37 °С, пока рост не достигнет мутности, равной или превышающей 0,5 стандарта McFarland. Если нужно, культура может быть отрегулирована с помощью солевого раствора или бульона до мутности, эквивалентной 0,5 стандарта McFarland. Это может быть сделано с помощью фотометрического устройства (используют длину волны 625 нм и кювету с длиной светового пути 1 см, абсорбция составит 0,08 — 0,13) или соответственно откалиброванного нефелометра. Такой же результат может быть достигнут путем визуального сравнения появляющихся в инокулюме черных линий и суспензии 0,5 стандарта McFarland (инокулюм и стандарт McFarland должны находиться в пробирках одного и того же размера) или любым другим методом, который дает воспроизводимую концентрацию КОЕ/мл.

Примечание — 0,5 стандарта McFarland можно получить, добавляя аликвоту 0,5 мл 0,048 моль/л $BaCl_2$ (11,72 г/л $BaCl_2\cdot 2H_2O$) к 99,5 мл из 0,18 моль/л H_2SO_4 при постоянном встряхивании для сохранения суспензии.

3.4.3 Метод суспензии колоний

Три — пять колоний из неселективной питательной агаровой среды (инкубированной при 34 °С — 37 °С в течение 18 — 24 ч, если более длинная инкубация не требуется) берут петлей и перемещают в стерильный бульон или соляной раствор. Суспензию регулируют для получения мутности, эквивалентной 0,5 стандарта McFarland, как описано в 3.4.2 для метода бульонной культуры.

Для всех организмов точная концентрация жизнеспособных клеток в окончательном инокулюме зависит от состояния культуры. Этот эффект наиболее выражен у прихотливых организмов, типа Streptococcus pneumoniae, использование старых культур которых может значительно сократить число жизнеспособных клеток в суспензии.

Точно отрегулированная суспензия, подготовленная любым методом, содержит приблизительно 1×10^8 КОЕ/мл для обычных бактерий.

Отрегулированный инокулюм, приготовленный, как указано выше, разводят в бульоне, чтобы получить окончательную концентрацию числа клеток 5×10^5 КОЕ/мл (в диапазоне от 2×10^5 КОЕ/мл до 8×10^5 КОЕ/мл). Требуемое разведение зависит от проверяемого организма и метода, используемого для подготовки инокулюма. Перемещение 0,1 мл суспензии стандартизированного организма в пробирку, содержащую 9,9 мл (разведение 1:100) бульона, дает суспензию с концентрацией клеток 1×10^6 КОЕ/мл, при добавлении 50 мкл которой к равному объему (50 мкл) раствора антибактериального агента получают окончательный состав инокулюма 5×10^5 КОЕ/мл для многих грамотрицательных бактерий (например, Escherichia coli). Если лунки уже содержат по 100 мкл антибактериального агента в бульоне, соответствующее разведение, чтобы получить необходимый окончательный инокулюм, должно быть приготовлено путем добавления по 5 мкл разведенной суспензии в каждую лунку. Для грамположительных организмов может быть достаточным меньшее разведение суспензии 0,5 McFarland, как определено подсчетом колоний в предварительных испытаниях.

3.5 Инокулирование планшетов для микроразведения

Планшеты должны инокулироваться в пределах 30 мин стандартизации суспензии инокулюма, чтобы сохранить концентрацию числа жизнеспособных клеток. К каждой лунке, содержащей 50 мкл антибактериального агента, разведенного в бульоне (см. 3.3), добавляют 50 мкл бактериальной суспензии (см. 3.4). В лунки планшета, которые содержат по 100 мкл антибактериального агента, разведенного в бульоне, должно быть добавлено по 5 мкл разведенной суспензии инокулюма.

Подсчет жизнеспособных клеток должен быть выполнен на испытуемой суспензии, чтобы гарантировать, что тестовые лунки содержат приблизительно 5×10^5 КОЕ/мл. Для этого берут 10 мкл из лунки контроля роста немедленно после инокулирования и разводят эту аликвоту в 10 мл бульона или солевого раствора. 100 мкл этого разведения распределяют по поверхности подходящей агаровой пластины, которую затем инкубируют в течение ночи. Ожидается появление от 20 до 80 колоний от приемлемой испытуемой суспензии. Если этого не удается получить, результаты для этого штамма не могут быть использованы.

3.6 Инкубация планшетов для микроразведения

Планшеты для микроразведения должны быть запечатаны в пакеты из полиэтилена или прижаты плотной крышкой или клейкой пленкой перед инкубацией, чтобы предотвратить высушивание. Чтобы избе-

жать неравного нагревания, планшеты для микроразведения должны быть сложены в стопки не больше чем по пять штук.

Если иначе не определено, планшеты для микроразведения инкубируют при 34 °С — 37 °С окружающей среды в течение (18 ± 2) ч для большинства комбинаций антибактериальных агентов и бактерий. Не должна использоваться атмосфера, обогащенная CO_2.

3.7 Чтение результатов

Результаты следует прочитывать только при наличии достаточного роста испытуемого организма (то есть при явном пятне или определенном помутнении в положительном контроле роста), когда нет никакого роста в неинокулированном или отрицательном контроле роста (если присутствует) и когда были установлены чистота и соответствующая концентрация числа клеток инокулюма. Размер роста в каждой лунке сравнивают с размером роста в положительном контроле роста и наиболее низкую концентрацию агента, которая полностью тормозит видимый рост, регистрируют как МПК.

3.8 Особые ситуации испытаний, при которых результат МПК может быть ненадежным

В некоторых случаях значение МПК может не отражать истинную активность, поэтому интерпретация результатов испытаний с некоторыми антибактериальными агентами для клинического применения возможно должна быть изменена. В этих ситуациях референтный метод должен быть модифицирован, например, путем изменения условий инкубации или введением добавок в среду. Кроме того, при использовании стандартного метода разведения не всегда могут быть обнаружены определенные механизмы резистентности, например, экспрессия некоторых β-лактамаз, модификации выводящих насосов или целевого участка антибактериального препарата. В таких случаях МПК следует интерпретировать с осторожностью или использовать другую информацию для регулирования клинического лечения. В таблице 3 приведены несколько комбинаций антибактериальных агентов и бактерий, требующих особого внимания.

Таблица 3 — Особые ситуации испытаний

Антибактериальные агенты	Бактерии	Замечания
Aminoglycosides	Enterococcus spp.	Медианы МПК для дикого типа Enterococcus faecalis и Enterococcus faecium для гентамицина и тобрамицина составляют от 8 до 16 мг/л и для стрептомицина — от 8 до 32 мг/л. Аминогликозиды демонстрируют синергический эффект при комбинации с препаратами, действующими на клеточную стенку (например, penicillins, carbapenems, glycopeptides). Некоторые штаммы проявляют резистентность высокого уровня к аминогликозидам (МПК ≥ 500 мг/л). В отношении таких изолятов синергический эффект не проявляется. При испытании Enterococcus spp. диапазон разведений должен быть достаточным, чтобы определить резистентность высокого уровня. Время инкубации должно быть 24 ч для гентамицина и 48 ч — для стрептомицина
β-lactams	Все	МПК может оказаться недостаточным основанием для терапевтического решения, если бактерии продуцируют некоторые β-lactamases; в этом случае МПК следует интерпретировать с осторожностью
Methicillin Oxacillin	Staphylococcus spp.	Микроразведение в бульоне не может надежно обнаружить резистентность, присущую гену mecA. Следующие модификации могут усилить способность обнаружить резистентность: - добавление NaCl до окончательной концентрации 20 г/л в бульоне; - инкубация тестов в течение 24 ч; - температура инкубации 30 °С (не выше 35 °С); - использование метода прямой суспензии, а не метода выращивания, для подготовки бактериального инокулюма,. Детекция гена mecA является референтным методом для обнаружения резистентности к Methicillin/Oxacillin
Daptomycin	Все	Среда должна быть дополнена Ca++ до конечной концентрации 50 мг/л

Окончание таблицы 3

Антибактериальные агенты	Бактерии	Замечания
Fosfomycin	Все	Микроразведение в бульоне может не дать надежный результат. Разведение в агаре может рассматриваться как референтный метод [5], [9]. Тест в агаре следует проводить с добавлением 25 мг/л глюкозо-6-фосфата
Glycopeptides	Все	МПК следует читать после 24 ч инкубации, чтобы получить последовательные и надежные результаты
	Staphylococcus aureus	Микроразведение в бульоне не может надежно обнаруживать гетерогенно резистентный к гликопептидам промежуточный штамм Staphylococcus aureus
Glycylcyclines Tigecycline	Все	Должна использоваться свежеприготовленная (< 12 ч) среда
Lincosamides	Все	МПК может не предсказать клиническую эффективность применения препарата, если штамм способен продуцировать метилазы (MLS_B резистентность)
Sulphonamides and Trimethoprim	Все	МПК следует читать при наиболее низкой концентрации, которая тормозит приблизительно 80 % роста при сравнении с контрольной лункой роста

4 Контроль качества

Качество результатов испытаний должно быть отслежено с помощью сопутствующего использования контрольных штаммов (см. таблицу 4). Банк контрольных штаммов следует хранить в лиофилизированном или замороженном виде (при температуре минус 60 °С или ниже). Рабочие культуры готовят с помощью субкультур из банка штаммов на неселективной питательной агаровой среде. Дальнейшие субкультуры могут быть приготовлены из первой рабочей культуры только в течение одной недели. Когда это возможно, по крайней мере, два соответствующих контрольных штамма должны быть проверены каждый день, когда проводят испытание. Испытуемые колонии контрольных культур обрабатывают таким же образом, как и обычные культуры. МПК антибактериальных агентов для контрольных организмов должны быть в пределах диапазонов, приведенных в таблице 4.

Таблица 4 — Диапазоны МПК (мг/л) для контрольных штаммов

Антибактериальный агент	Staphylococcus aureus ATCC 29213[a] NCTC 12973[b] CIP 103429[c] DSM 2569[d]	Enterococcus faecalis ATCC 29212 NCTC 12697 CIP 103214 DSM 2570	Escherichia coli ATCC 25922 NCTC 12241 CIP 7624 DSM 1103	Pseudomonas aeruginosa ATCC 27853 NCTC 12973 CIP 76110 DSM 1117	Escherichia coli ATCC 35218 DSM 5564	Streptococcus pneumoniae ATCC 49619 NCTC 12977
Amikacin	1—4	64—256	0,5—4	1—4	—	—
Amoxicillinclavulanic acid (fixed 2:1 ratio)	0,12/0,06— 0,50/0,25	0,25/0,12— 1,0/0,5	2/1—8/4	—	4/2—16/8	0,030/ 0,015—0,12/ 0,06
Amoxicillin[e]	0,25—1,00	—	4—16	—	—	0,03—0,12
Ampicillin	0,5—2,0	0,5—2,0	2—8	—	—	0,06—0,25
Ampicillin-sulbactam (fixed 2:1 ratio)	—	—	2/1—8/4	—	8/4—32/16	—
Azithromycin	0,5—2,0	—	—	—	—	0,06—0,25
Azlocillin	2—8	1—4	8—32	2—8	—	—

Продолжение таблицы 4

Антибактериальный агент	Staphylococcus aureus ATCC 29213[a] NCTC 12973[b] CIP 103429[c] DSM 2569[d]	Enterococcus faecalis ATCC 29212 NCTC 12697 CIP 103214 DSM 2570	Escherichia coli ATCC 25922 NCTC 12241 CIP 7624 DSM 1103	Pseudomonas aeruginosa ATCC 27853 NCTC 12973 CIP 76110 DSM 1117	Escherichia coli ATCC 35218 DSM 5564	Streptococcus pneumoniae ATCC 49619 NCTC 12977
Aztreonam	—	—	0,06—0,25	2—8	—	—
Carbenicillin	2—8	16—64	4—16	16—64	—	—
Cefaclor	1—4	—	1—4	—	—	1—4
Cefamandole	0,25—1,00	—	0,25—1,00	—	—	—
Cefazolin	0,25—1,00	—	1—4	—	—	—
Cefdinir	0,12—0,50	—	0,12—0,50	—	—	0,03—0,25
Cefditoren	0,25—2,00	—	0,12—1,00	—	—	0,015—0,120
Cefepime	1—4	—	0,015—0,120	1—8	—	0,03—0,25
Cefetamet	—	—	0,25—1,00	—	—	0,5—2,0
Cefixime	8—32	—	0,25—1,00	—	—	—
Cefmetazole	0,5—2,0	—	0,25—1,00	> 32	—	—
Cefonicid	1—4	—	0,25—1,00	—	—	—
Cefoperazone	1—4	—	0,12—0,50	2—8	—	—
Cefotaxime	1—4	—	0,03—0,12	8—32	—	0,03—0,12
Cefotetan	4—16	—	0,06—0,25	—	—	—
Cefoxitin	1—4	—	2—8	—	—	—
Cefpodoxime	1—8	—	0,25—1,00	—	—	0,03—0,12
Cefprozil	0,25—1,00	—	1—4	—	—	0,25—1,00
Ceftazidime	4—16	—	0,06—0,50	1—4	—	—
Ceftibuten	—	—	0,12—0,50	—	—	—
Ceftizoxime	2—8	—	0,03—0,12	16—64	—	0,12—0,50
Ceftobiprole	0,25—1,00	0,06—0,50	0,03—0,12	1—4	—	0,004—0,003
Ceftriaxone	1—8	—	0,03—0,12	8—64	—	0,03—0,12
Cefuroxime	0,5—2,00	—	2—8	—	—	0,25—1,00
Cephalexin[e]	—	—	4—16	—	—	—
Cephalothin	0,12—0,50	—	4—16	—	—	0,5—2,0
Chloramphenicol	2—16	4—16	2—8	—	—	2—8
Cinoxacin	—	—	2—8	—	—	—
Ciprofloxacin	0,12—0,50	0,25—2,00	0,004—0,015	0,25—1,00	—	—
Clarithromycin	0,12—0,50	—	—	—	—	0,03—0,12
Clinafloxacin	0,008—0,060	0,03—0,25	0,002—0,015	0,06—0,50	—	0,03—0,12
Clindamycin	0,06—0,25	4—16	—	—	—	0,03—0,12
Colistin	—	—	0,25—1	0,25—2,00	—	—
Dalbavancin	0,03—0,12	0,03—0,12	—	—	—	0,008—0,030
Daptomycin[f]	0,25—1,00	1—4	—	—	—	0,06—0,50

Продолжение таблицы 4

Антибактериальный агент	Staphylococcus aureus ATCC 29213[a] NCTC 12973[b] CIP 103429[c] DSM 2569[d]	Enterococcus faecalis ATCC 29212 NCTC 12697 CIP 103214 DSM 2570	Escherichia coli ATCC 25922 NCTC 12241 CIP 7624 DSM 1103	Pseudomonas aeruginosa ATCC 27853 NCTC 12973 CIP 76110 DSM 1117	Escherichia coli ATCC 35218 DSM 5564	Streptococcus pneumoniae ATCC 49619 NCTC 12977
Dirithromycin	1—4	—	—	—	—	0,06—0,25
Doripenem	0,015—0,060	1—4	0,015—0,060	0,12—0,50	—	0,03—0,12
Doxycycline	0,12—0,50	2—8	0,5—2	—	—	0,015—0,120
Enoxacin	0,5—2,0	2—16	0,06—0,25	2—8	—	—
Ertapenem	0,06—0,25	4—16	0,004—0,015	2—8	—	0,03—0,25
Erythromycin	0,25—1,00	1—4	—	—	—	0,03—0,12
Faropenem	0,03—0,12		0,25—1,00	—	—	0,03—0,25
Fleroxacin	0,25—1,00	2—8	0,03—0,12	1—4	—	—
Fusidic acid[e]	0,06—0,25	1—4	—	—	—	—
Garenoxacin	0,004—0,030	0,03—0,25	0,004—0,030	0,5—2,0	—	0,015—0,060
Gatifloxacin	0,03—0,12	0,12—1,00	0,008—0,030	0,5—2,0	—	0,12—0,50
Gemifloxacin	0,008—0,030	0,015—0,120	0,004—0,015	0,25—1,00	—	0,008—0,030
Gentamicin	0,12—1,00	4—16	0,25—1,00	0,5—2,0	—	—
Grepafloxacin	0,03—0,12	0,12—0,50	0,004—0,030	0,25—2,00	—	0,06—0,50
Imipenem	0,015—0,060	0,5—2,0	0,06—0,25	1—4	—	0,03—0,12
Kanamycin	1—4	16—64	1—4	—	—	—
Levofloxacin	0,06—0,50	0,25—2,00	0,008—0,060	0,5—4,0	—	0,5—2,0
Linezolid	1—4	1—4	—	—	—	0,5—2,0
Lomefloxacin	0,25—2,00	2—8	0,03—0,12	1—4	—	—
Loracarbef	0,5—2,0	—	0,5—2,0	> 8	—	2—8
Mecillinam	—	—	0,03—0,25	—	—	—
Meropenem	0,03—0,12	2—8	0,008—0,060	0,25—1,00	—	0,06—0,25
Methicillin	0,5—2,0	> 16	—	—	—	—
Mezlocillin	1—4	1—4	2—8	8—32	—	—
Minocycline	0,06—0,50	1—4	0,25—1,00	—	—	—
Moxalactam	4—16	—	0,12—0,50	8—32	—	—
Moxifloxacin	0,015—0,120	0,06—0,50	0,008—0,060	1—8	—	0,06—0,25
Mupirocin[e]	0,06—0,25	—	—	—	—	—
Nafcillin	0,12—0,50	2—8	—	—	—	—
Nalidixic acid	—	—	1—4	—	—	—
Netilmicin	≤ 0,25	4—16	≤ 0,5—1,0	0,5—8,0	—	—
Nitrofurantoin	8—32	4—16	4—16	—	—	4—16
Norfloxacin	0,5—2,0	2—8	0,03—0,12	1—4	—	2—8
Ofloxacin	0,12—1,00	1—4	0,015—0,120	1—8	—	1—4
Oritavancin	0,5—2,0	0,12—1,00	—	—	—	0,008—0,060

Продолжение таблицы 4

Антибактериальный агент	Staphylococcus aureus ATCC 29213[a] NCTC 12973[b] CIP 103429[c] DSM 2569[d]	Enterococcus faecalis ATCC 29212 NCTC 12697 CIP 103214 DSM 2570	Escherichia coli ATCC 25922 NCTC 12241 CIP 7624 DSM 1103	Pseudomonas aeruginosa ATCC 27853 NCTC 12973 CIP 76110 DSM 1117	Escherichia coli ATCC 35218 DSM 5564	Streptococcus pneumoniae ATCC 49619 NCTC 12977
Oxacillin	0,12—0,50	8—32	—	—	—	—
Penicillin	0,25—2,00	1—4	—	—	—	0,25—1,00
Piperacillin	1—4	1—4	1—4	1—8	—	—
Piperacillintazobactam (fixed inhibitor concentration 4 mg/l)	0,25/4—2,00/4	1/4—4/4	1/4—4/4	1/4—8/4	0,5/4—2,0/4	—
Pipemidic acid[e]	—	—	0,5—2,0	—	—	—
Polymyxin B	—	—	0,25—2,00	0,25—2,00	—	—
Quinupristindalfopristin	0,25—1,00	2—8	—	—	—	0,25—1,00
Rifampin	0,004—0,015	0,5—4,0	4—16	16—64	—	0,015—0,060
Sparfloxacin	0,03—0,12	0,12—0,50	0,004—0,015	0,5—2,0	—	0,12—0,50
Streptomycin[e]	—	—	4—16	—	—	—
Sulfisoxazole	32—128	32—128	8—32	—	—	—
Teicoplanin	0,25—1,00	0,06—0,25	—	—	—	—
Telavancin	0,12—1,00	0,12—0,50	—	—	—	0,002—0,015
Telithromycin	0,06—0,25	0,015—0,120	—	—	—	0,004—0,030
Tetracycline	0,12—1,00	8—32	0,5—2,0	8—32	—	0,12—0,5
Ticarcillin	2—8	16—64	4—16	8—32	—	—
Ticarcillin-clavulanic acid (fixed inhibitor concentration 2 mg/	0,5/2—2,0/2	16/2—64/2	4/2—16/2	8/2—32/2	8/2—32/2	—
Tigecycline	0,03—0,25	0,03—0,12	0,03—0,25	—	—	0,015—0,120
Tobramycin	0,12—1,00	8—32	0,25—1,00	0,25—1,00	—	—
Trimethoprim	1—4	≤ 1	0,5—2,0	> 64	—	—
Trimethoprimsulfamethoxazole (fixed 1:19 ratio)	≤ 0,5/9,5	≤ 0,5/9,5	≤ 0,5/9,5	8/152—32/608	—	0,12/2,4—1,00/19,0
Trospectomycin	2—16	2—8	8—32		—	1—4
Trovafloxacin	0,008—0,030	0,06—0,25	0,004—0,015	0,25—2,00	—	0,06—0,25
Vancomycin	0,5—2,0	1—4	—	—	—	0,12—0,50

[a] ATCC, American Type Culture Collection, 12301 Parklawn Drive, Rockville, MD 20852, USA.

[b] NCTC, National Collection of Type Cultures, Health Protection Agency Centre for Infections, 61 Colindale Avenue, London NW9 5HT, UK.

[c] CIP, Collection de Institut Pasteur, 25–28 Rue du Docteur Roux, 75724 Paris Cedex 15 France.

[d] DSMZ, Deutsche Stammsammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen, Mascheroder Weg 16, D-38124 Braunschweig, Germany.

[e] Диапазон МПК выведен из целевых МПК, предоставленных EUCAST (Clin. Microbiol. Infec. 9:1—7, 2003). На веб—сайте EUCAST gost.e-ecolog.ru можно проверить публикуемые EUCAST целевые контрольные значения.

Окончание таблицы 4

[f] Диапазоны контроля качества Daptomycin отражают МПК, полученные при добавлении в бульон Mueller—Hinton кальция до конечной концентрации 50 мг/л.

Примечание — Кроме тех случаев, где это отмечено, диапазоны МПК были заимствованы (с разрешения) из документа CLSI M100—S16 (стандарты эксплуатационных характеристик тестов антибактериальной чувствительности; Шестнадцатое информационное приложение) [7]. Диапазоны контроля — для отрегулированного катионами бульона Mueller—Hinton для всех контрольных организмов, кроме S. pneumoniae ATCC 49619, который проверен, используя отрегулированный катионами бульон Mueller—Hinton с добавленной 2,5—5,0 %-ной лизированной лошадиной кровью. Диапазоны периодически обновляются. Последнюю версию M100 с обновленными диапазонами можно проверить в CLSI (прежде NCCLS) по адресу: CLSI, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Пенсильвания 19087, США.

Приложение А
(обязательное)

Требования к бульону Mueller—Hinton

А.1 Общие положения

Добавки, помимо двухвалентных катионов или других дополнительных компонентов, не должны использоваться, если они не являются необходимыми для роста испытуемых организмов.

А.2 Испытания неприхотливых микроорганизмов в бульоне Mueller—Hinton

А.2.1 Общие положения

Стандартной средой для испытания неприхотливых микроорганизмов является бульон Mueller—Hinton. Оригинальная формула его приготовления следующая [10]:

обезвоженная вытяжка из 300 г мяса;
кислотный отвар казеина 17,5 г;
крахмал 1,5 г;
QSP дистиллированная вода 1000 мл;
pH 7,2 — 7,4.

А.2.2 Добавление и содержание катионов

Бульон должен содержать достаточную концентрацию катионов, чтобы обеспечить адекватный рост и чтобы позволить пользователю определить значение МПК для контроля качества штаммов в пределах, указанных в таблице 4.

Новые партии бульона Mueller—Hinton могут требовать определения приемлемого содержания катионов. Это исследование может быть выполнено с помощью индуктивно-сопряженной плазменной спектроскопии (ICP) пламенной атомно-абсорбционной спектрометрии (FAAS) [11].

Для добавления ионов кальция и магния готовят растворы 10 мг/л хлорида кальция (3,68 г $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ в 100 мл деионизированной воды) и хлорида магния (8,36 г $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ в 100 мл деионизированной воды), стерилизуют с помощью мембранногог фильтра и хранят при температуре от 2 °С до 8 °С. Каждые 0,1 мл раствора катионов 10 мг/л, добавленные к 1 л бульона, повышают содержание катионов на 1 мг/л. Добавляют при помешивании при температуре от 2 °С до 8 °С.

Для большинства комбинаций антибактериальный агент-бактерия добавление кальция и магния до окончательной концентрации от 20 до 25 мг/л соответственно позволило получить правильные результаты контроля качества [12], [13].

Для daptomycin требуется окончательная концентрация ионов кальция в среде 50 мг/л [14].

Для агентов carbapenem — imipenem и meropenem — было показано, что окончательная концентрация цинка должна быть меньше 3 мг/л [15]. Массовая концентрация цинка, необходимая для максимальной активности других препаратов carbapenem, не была установлена, но возможно она должна быть на том же уровне.

А.2.3 Испытание родов Streptococcus

При испытании родов Streptococcus к содержащей катионы среде бульона Mueller—Hinton должна быть добавлена лизированная лошадиная кровь до окончательной концентрации от 2,5 % до 5,0 % . Кровь должна быть получена от заслуживающего доверия поставщика. Должна быть известна информация о гематокрите (не менее 30 %). Для приготовления лизированной крови смешивают равные объемы дефибринированной крови и стерильной дистиллированной воды. Замораживают при температуре минус 20 °С и размораживают до окончательного лизирования клеток (может требоваться пять—семь циклов замораживания—оттаивания). Центрифугируют для просветления раствора. Полученный препарат лизированной крови является базовым раствором с объемной концентрацией 50 %.

А.2.4 Дополнительные сообщения о средах

А.2.4.1 Общие положения

В настоящее время невозможно указать все возможности, которые появятся для контроля качества и референтного испытания антимикробной чувствительности аэробных и факультативно-аэробных бактериальных родов. Некоторые данные об эффектах сред содержатся в неопубликованных материалах. Новые агенты потребуют «стандартных» препаратов среды. Пользователи будут требовать подтверждения, что параметры стандартов контроля качества будут соответствовать и что новые издания будут доступны на международном уровне, так что настоящий стандарт может обновляться регулярно.

А.2.4.2 Sulphonamides и trimethoprim

Среда должна иметь массовую концентрацию тимидина менее чем 0,03 мг/л. Такая среда предотвращает использование для испытания других антимикробных средств.

А.2.4.3 Tigecycline

Tigecycline должен быть добавлен в бульон Mueller—Hinton в течение 12 ч приготовления бульона. Приготовленные планшеты для микроразведения могут быть заморожены.

А.2.4.4 Dalbavancin

Для испытания Dalbavancin отрегулированный катионами бульон Mueller—Hinton должен быть дополнен полисорбатом — 80 объемной долей 0,002 %.

Библиография

[1] Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie. (1966), Technical recommendations for in vitro susceptibility testing, Clin Microbiol Infect. 2 (suppl 1): S 11—25

[2] Deutsches Institut für Normung (1999), Medical microbiology — Susceptibility testing of pathogens to antimicrobial agents — Part 4: Evaluation classes of the minimum inhibitory concentration, DIN, Berlin, pp. 58940-4

[3] OLSSON-LILJEQUIST, B., LARSSON, P., WALDER, M. and MIORNER, H. (1997), Antimicrobial susceptibility testing in Sweden III. Methodology for susceptibility testing, Scand J Infect Dis. 105 (suppl): 13—23

[4] ANDREWS, J.M. (2001), Determination of minimum inhibitory concentrations, J Antimicrob Chemother.48 Suppl. S1: 5-16 (for latest version, see gost.e-ecolog.ru)

[5] Clinical and Laboratory Standards Institute (2006), Methods for Dilution Antimicrobial SusceptibilityTests for Bacteria That Grow Aerobically, 7th edn. Approved Standard M7—A7, Wayne, PA

[6] European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. (2003), Determination of minimuminhibitory concentrations (MICs) of antibacterial agents by broth microdilution, EUCAST DiscussionDocument E.Def 5.1. Clinl Microbiol Infect; 9 (issue 7 insert): 1—10 (see gost.e-ecolog.ru)

[7] Clinical and Laboratory Standards Institute (2006), Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing, 16th edn. Informational Supplement M100-S16, Wayne, PA

[8] ERICSSON, H.M., SHERRIS, J.C. (1971), Antibiotic sensitivity testing. Report of an internationalcollaborative study, Acta Pathol Microbiol Scand. Sect B 217 (suppl): 1—90

[9] European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (2000), Determination of minimum nhibitory concentrations (MICs) of antibacterial agents by agar dilution, EUCAST Definitive DocumentE.Def 3.1 (for latest version, see gost.e-ecolog.ru)

[10] MUELLER, J.H. and HINTON, J. (1941), A protein-free medium for primary isolation of the gonococcus and meningococcus, Proc Soc ExperBiol Med. 48: 330

[11] MORRISON, G.H. (1969), Critical Reviews in Analytical Chemistry, (14) 28A, CRC Press, Boca Raton, Florida

[12] BARRY, A.L., MILLER, G.H., THORNSBERRY, C. et al. (1987), Influence of cation supplements on activity of netilmicin against *Pseudomonas aeruginosa* in vitro and in vivo, Antimicrob Agents Chemother. 31:1514—1518

[13] BARRY, A.L., RELLER, L.B., MILLER, G.H. et al. (1992), Revision of standards for adjusting the cation content of Mueller-Hinton broth for testing susceptibility of *Pseudomonas aeruginosa* to aminoglycosides, J. Clin Microbiol. 30: 585–589

[14] FUCHS, P.C., BARRY, A.L. and BROWN, S.D. (2000), Daptomycin susceptibility tests: interpretive criteria, quality control and effect of calcium on in vitro tests, Diag Microbiol Infect Dis. 38: 51—58

[15] DALY, J.S., DODGE, R.A., GLEW, R.H., SOJA, D.T., DELUCA, B.A. and HEBERT, S. (1997), Effect of zinc concentration in Mueller—Hinton agar on susceptibility of Pseudomonas aeruginosa to imipenem, J. Clin Microbiol. 35:1027—1029

[16] European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing, Clinical breakpoints and epidemiological cut-off values (for latest version, see gost.e-ecolog.ru .

УДК 61.006:354 ОКС 11.100.10 Р20

Ключевые слова: клинические лабораторные исследования, диагностические тест-системы *in vitro*, инфекционные агенты, оценка функциональных характеристик, антимикробные средства

Редактор *Н. В. Таланова*
Технический редактор *В. Н. Прусакова*
Корректор *В. Г. Гришунина*
Компьютерная верстка *Т. Ф. Кузнецовой*

Сдано в набор 17.05.2011. Подписано в печать 26.07.2011. Формат 60×84 1/8. Бумага офсетная. Гарнитура Ариал. Печать офсетная. Усл. печ. л. 2,79. Уч.-изд. л. 2,00. Тираж 99 экз. Зак. 651

ФГУП «СТАНДАРТИНФОРМ», 123995 Москва, Гранатный пер., 4.
gost.e-ecolog.ru gost.e-ecolog.ru
Набрано и отпечатано в Калужской типографии стандартов, 248021 Калуга, ул. Московская, 256.

gost.e-ecolog.ru