

Министерство здравоохранения Республики Беларусь

УТВЕРЖДАЮ

Заместитель Министра  
здравоохранения -

Главный государственный  
санитарный врач

Республики Беларусь

В.И. Качан

2008г.



## МЕТОДЫ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ МИКРООРГАНИЗМОВ К АНТИБАКТЕРИАЛЬНЫМ ПРЕПАРАТАМ

### Инструкция по применению

Учреждение разработчик: ГУ «Республиканский центр гигиены, эпидемиологии и общественного здоровья» Министерства здравоохранения Республики Беларусь, ГУ «Научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии» Министерства здравоохранения Республики Беларусь, ГУО «Белорусская медицинская академия последипломного образования».

Авторы: А.М. Марейко, Т.И. Сероокая, Л.П. Титов, Т.С. Ермакова, О.В. Тонко

Минск - 2008

## ГЛАВА 1 ОБЛАСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ

1. Настоящая Инструкция по применению предназначена для применения в микробиологических лабораториях органов и учреждений, осуществляющих государственный санитарный надзор, других организаций здравоохранения.

2. В настоящей Инструкции по применению изложены стандартные методы определения чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препаратам (методы серийных разведений и диско-диффузионный метод).

## ГЛАВА 2 ОБЩИЕ СВЕДЕНИЯ

3. Определение чувствительности микроорганизмов - возбудителей инфекционных заболеваний человека к антибактериальным препаратам (далее-АБП) приобретает все более важное значение в связи с появлением и широким распространением антибиотико-резистентности у бактерий. Стандартные методы определения чувствительности микроорганизмов к АБП (диско-диффузионный и серийных разведений) были разработаны во второй половине 60-х - начале 70-х годов XX века и с тех пор с методической точки зрения не претерпели принципиальных изменений.

Однако внедрение в клиническую практику значительного количества новых АБП и появление новых механизмов антибиотико-резистентности у микроорганизмов потребовало более строгой стандартизации процедуры тестирования, разработки новых подходов к интерпретации результатов, внедрения современной системы внутреннего контроля качества на каждом этапе исследования.

В настоящей Инструкции по применению систематизированы современные подходы к определению чувствительности бактериальных возбудителей инфекционных заболеваний человека, учитывающие рекомендации Европейского комитета по определению чувствительности к антибиотикам, а также Национального комитета по клиническим лабораторным стандартам США.

4. Исследования чувствительности микроорганизмов к АБП осуществляются для решения следующих задач: обоснование целенаправленной индивидуальной антибактериальной терапии для лечения конкретной инфекционной болезни отдельным пациентам; обоснование эмпирической терапии отдельных нозологических форм инфекционных болезней в пределах лечебных учреждений или географических регионов; осуществление наблюдения за распространением антибиотико-резистентности в отдельных учреждениях или географических регионах; исследование новых химических соединений на наличие антибактериальной активности.

## ГЛАВА 3 ПОКАЗАНИЯ ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЯ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ МИКРООРГАНИЗМОВ К АНТИБАКТЕРИАЛЬНЫМ ПРЕПАРАТАМ

5. В ходе повседневной деятельности в микробиологических лабораториях из различных биологических материалов и объектов окружающей среды выделяют множество бактерий, относящихся к различным таксономическим группам. Однако определение чувствительности выделенных микроорганизмов к АБП показано не во всех случаях.

Определять чувствительность к АБП представителей нормальной микрофлоры человека, при их выделении из естественных мест обитания, бактерий, выделенных из объектов окружающей среды, за исключением случаев проведения специальных исследований, нецелесообразно.

Обязательному исследованию на чувствительность к АБП подлежат все микроорганизмы, выделенные из первично стерильных жидкостей, органов и тканей человека. В остальных случаях оценке чувствительности должна предшествовать оценка клинической значимости выделенного микроорганизма.

Определение чувствительности выделенного штамма микроорганизма показано, если уровень его устойчивости к АБП не может быть предсказан на основании данных идентификации или вероятной таксономической принадлежности микроорганизма. Практически важной задачей является выявление приобретенной резистентности к АБП у природно-чувствительных к ним микроорганизмов. Подтверждение природной чувствительности или резистентности микроорганизма к АБП не является целью практических исследований.

6. Исследованию по оценке антибиотикочувствительности подлежат чистые культуры микроорганизмов или материал изолированных колоний с плотных питательных сред после первичного посева образца клинического материала, в последнем случае параллельно необходимо провести идентификацию культуры.

При обнаружении на плотных питательных средах после первичного посева смешанной культуры исследовать антибиотикочувствительность до идентификации и оценки этиологической значимости отдельных микроорганизмов нецелесообразно.

Прямое определение чувствительности с использованием клинического материала (без выделения чистой культуры) возможно только в исключительных случаях при условии подтверждения однородности культуры и высокой степени обсемененности при окраске по Граму, причем исследование следует повторить после выделения чистой культуры микроорганизма.

7. Следует уделять особое внимание определению чувствительности микроорганизмов, относящихся к таксономическим группам, для которых характерна высокая частота распространения приобретенной резистентности.

У микроорганизмов, проявляющих универсальную чувствительность к каким-либо АБП, т. е. когда случаев резистентности не описано (например, *Streptococcus ruogenes* - все штаммы чувствительны к пенициллину), проводить определение чувствительности к этим препаратам в повседневной практике нецелесообразно.

Факты выявления резистентности у микроорганизмов, для которых этот феномен ранее не был описан в научной литературе, следует оценивать с крайней осторожностью, и рекомендуется обращаться за консультациями в лаборатории, занимающиеся изучением антибиотико-резистентности.

Не следует в практических целях исследовать микроорганизмы, для которых методы определения чувствительности в настоящее время не стандартизованы и отсутствуют критерии интерпретации результатов. Результаты, полученные в данном случае, не могут служить основанием для назначения антибактериального препарата.

## ГЛАВА 4

### МЕТОДЫ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ МИКРООРГАНИЗМОВ К АНТИБАКТЕРИАЛЬНЫМ ПРЕПАРАТАМ

#### 8. Общая характеристика методов:

8.1. современные стандартизованные методы определения чувствительности микроорганизмов к АБП подразделяют на методы серийных разведений и диффузионные.

Методы серийных разведений основаны на прямом определении основного количественного показателя, характеризующего микробиологическую активность АБП - величины его минимальной подавляющей концентрации (далее-МПК). МПК - минимальная концентрация, подавляющая видимый рост исследуемого микроорганизма в бульонной культуре или на плотной среде. Для определения МПК заданные концентрации АБП вносят в питательную среду, которую затем засевают культурой исследуемого микроорганизма и после инкубации оценивают наличие или отсутствие видимого роста. В зависимости от характера используемой питательной среды различают методы серийных разведений в агаре или в бульоне. В зависимости от объема используемой жидкой питательной среды выделяют методы серийных макро и микроразведений.

Разновидностью метода серийных разведений является также метод, основанный на использовании только двух концентраций АБП, соответствующих пограничным значениям МПК. Этот принцип исследования широко используется в автоматизированных системах для определения чувствительности микроорганизмов.

Диффузионные методы определения чувствительности основаны на диффузии АБП из носителя в плотную питательную среду и подавлении роста исследуемой культуры в той зоне, где концентрация АБП превосходит МПК. В настоящее время существуют две основные модификации диффузионного метода: диско-диффузионный и Е-тест.

В диско-диффузионном методе в качестве носителя АБП используют бумажный диск. Образование зоны подавления роста происходит в результате диффузии АБП из носителя в питательную среду. В определенных пределах величина диаметра зоны подавления роста обратно пропорциональна МПК. Однако диско-диффузионный метод позволяет лишь косвенно судить о величине МПК, а результатом исследования является отнесение микроорганизма к одной из категорий чувствительности (чувствительный, промежуточный или резистентный).

Е-тест представляет собой узкую полоску полимера (0,5 x 6,0 см), на которую нанесен градиент концентраций АБП (от минимальных до максимальных). Подавление роста микроорганизма вокруг полоски Е-теста происходит только в той зоне, где концентрация АБП, диффундирующего из носителя, выше МПК, при этом образуется каплевидная зона ингибиции. Значения концентрации АБП в каждом участке носителя типографским способом нанесены на наружной (обращенной к исследователю) поверхности Е-теста. Величину МПК учитывают в том месте, где граница зоны подавления роста вплотную подходит к носителю. Детальные инструкции по определению чувствительности с использованием Е-тестов прилагаются изготовителем к набору реактивов;

## 8.2. основные этапы проведения тестирования.

Исследование по определению антибиотикочувствительности, независимо от конкретного метода, предполагает последовательное выполнение нескольких этапов: приготовление питательных сред; приготовление суспензии исследуемых микроорганизмов (инокулюма); инокуляция; инкубация; учет и интерпретация результатов, формулировка рекомендаций по лечению. Диффузионные методы включают также этап наложения дисков или полосок Е-теста на плотную питательную среду;

## 8.3. приготовление питательных сред для определения чувствительности.

Для оценки чувствительности используют специально предназначенные для этой цели питательные среды, по своим характеристикам удовлетворяющие требованиям, приведенным в главе 5 настоящей Инструкции по применению. В международной практике основной средой используемой во всех методах оценки антибиотикочувствительности является среда Мюллер-Хинтон (агар и бульон).

Вид питательной среды для оценки чувствительности определяют выбранным методом проведения исследования (агар или бульон), а также видом тестируемого микроорганизма.

Выборную питательную среду для определения чувствительности готовят из сухой среды промышленного производства. После автоклавирования питательную среду сразу же разливают в стерильные пробирки или в чашки Петри, или (если необходимо) колбы со средой помещают на водяную баню при 48 - 50°C, где выдерживают до достижения указанной температуры, после чего в них асептически вносят термолабильные питательные добавки и/или рабочие растворы антибиотиков, а затем разливают в пробирки или в чашки Петри.

Агар разливают по чашкам слоем толщиной 4 мм (на чашку диаметром 100 мм требуется 25 мл агара, на чашку диаметром 90 мм - 20 мл). Чашки оставляют при комнатной температуре для застывания. Приготовленные чашки Петри предпочтительнее использовать немедленно. Допускается хранение в запаянных полиэтиленовых пакетах в холодильнике при + 4 - +8 °С не более 7 суток;

## 8.4. приготовление суспензии исследуемых микроорганизмов (инокулюма).

Общим и принципиально важным для всех методов тестирования является стандартизация суспензии исследуемого микроорганизма, ее концентрация должна составлять  $1-2 \times 10^8$  колониеобразующих единиц (далее - КОЕ)/мл. Практически наиболее приемлемым методом оценки концентрации бактериальной суспензии является измерение ее оптической плотности. Оптическая плотность бактериальной суспензии с концентрацией  $1-2 \times 10^8$  КОЕ/мл при визуальном контроле соответствует стандарту мутности 0,5 по МакФарланду. Контроль оптической плотности суспензии можно также осуществлять спектрофотометрически (денситометрически). Существуют коммерчески доступные стандарты мутности и спектрофотометры. Бактериальную суспензию можно готовить либо из бульонной, либо из агаровой культуры.

Приготовление инокулюма из агаровой культуры. Для приготовления инокулюма используют чистую суточную культуру микроорганизмов, выросших на плотных питательных средах. Отбирают одну или несколько однотипных, четко

изолированных колоний, выросших на неселективных плотных питательных средах. Петлей переносят незначительное количество материала с верхушек колоний в пробирку со стерильным физиологическим раствором или питательным бульоном, доводя плотность инокулюма точно до 0,5 по стандарту МакФарланда. Инокулюм следует использовать в течение 15 мин после приготовления.

Приготовление инокулюма из бульонной культуры. При определении чувствительности быстро растущих бактерий с обычными питательными потребностями для приготовления инокулюма также можно использовать 5—6-часовую бульонную культуру микроорганизма. Для этого отбирают несколько однотипных изолированных колоний, петлей переносят незначительное количество материала в пробирку с 4,0 - 5,0 мл жидкой неселективной питательной среды. Инкубируют при 35°C. Через 5 - 6 ч инкубации плотность микробной суспензии приблизительно соответствует необходимой, и ее точно доводят до 0,5 по МакФарланду путем добавления стерильного бульона или физиологического раствора. Стандарт МакФарланда может быть либо приобретен, либо приготовлен в лаборатории;

#### 8.5. приготовление стандарта 0,5 по МакФарланду.

К 0,5 мл раствора  $\text{BaCl}_2$  в концентрации 0,048 моль/л (1,175 % раствор  $\text{BaCl}_2 \times 2 \text{H}_2\text{O}$ ) медленно при тщательном перемешивании добавить 99,5 мл раствора  $\text{H}_2\text{SO}_4$  в концентрации 0,18 моль/л (1 %) до получения гомогенной суспензии. Правильность приготовления суспензии необходимо проверить на спектрофотометре. Поглощение при использовании кюветы 1 см должно составить 0,08 - 0,10 при длине волны 625 нм. Полученную суспензию необходимо разлить по 4 - 6 мл в пробирки с герметично закрывающимися крышками. Пробирки должны быть такого же диаметра, как и используемые для приготовления бактериальной суспензии. Хранить пробирки с суспензией необходимо в темноте при комнатной температуре. Перед использованием пробирки необходимо тщательно встряхивать и оценивать однородность суспензии. При появлении видимых частиц пробирки изымаются из употребления. Стандарт мутности необходимо обновлять или проверять его оптическую плотность ежемесячно.

### 9. Методы серийных разведений:

#### 9.1. приготовление растворов АБП для методов серийных разведений.

Общим и крайне важным этапом для всех методов серийных разведений является приготовление растворов АБП. Различают основные растворы АБП (пригодные для хранения) и рабочие - те, которые необходимо использовать «ex tempore» для приготовления питательных сред.

Для приготовления основных растворов АБП необходимо использовать субстанции АБП с известной активностью, лекарственные формы не пригодны. Для взвешивания субстанций необходимо использовать электронные лабораторные весы с точностью до четвертого знака, для измерения объёмов - калиброванные дозаторы и пипетки.

Основные растворы АБП готовят в концентрации 1000,0 мкг/мл и выше. Навески АБП для приготовления основных растворов готовят с учетом их активности. Расчет навески АБП для приготовления основного раствора проводят по формуле:

$$\text{Вес (мг)} == \frac{V \text{ (мл)} \times C \text{ (мкг/мл)}}{A \text{ (содержание АБП в мкг / мг)}}, \text{ где}$$

V - объём растворителя;

C - необходимая концентрация АБП (мкг/мл);

A - активность АБП субстанции (количество активного вещества содержащегося в субстанции).

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

$$V_{\text{практ.}} \text{ (мл)} == \frac{m \text{ АБП}_{\text{практ.}} \text{ (мг)} \times V_{\text{теор.}} \text{ (мл)}}{m \text{ АБП}_{\text{теор.}} \text{ (мг)}}, \text{ где}$$

$V_{\text{практ.}}$  - объём растворителя для растворения практической навески;

$m \text{ АБП}_{\text{практ.}}$  - полученная навеска АБП;

$m \text{ АБП}_{\text{теор.}}$  - расчётная (теоретическая) навеска АБП;

$V_{\text{теор.}}$  - объём растворителя для растворения теоретической навески.

В связи с тем, что АБП существенно различаются по растворимости, в ряде случаев возникает необходимость использовать различные вещества для первичного растворения (солюбилизации) препаратов (растворители) и для доведения их до заданной концентрации (разбавители). В тех случаях когда растворители и разбавители являются разными веществами, для растворения АБП необходимо использовать минимально возможное количество растворителя.

Отличные от воды растворители и разбавители для отдельных АБП приведены в приложении 1 к настоящей Инструкции по применению. Основные растворы необходимо хранить при температуре не выше  $-20^{\circ}\text{C}$  (сроки хранения отдельных АБП при данной температуре существенно различаются). Оптимальными условиями для хранения основных растворов АБП является температура  $-60^{\circ}\text{C}$  и ниже, длительность не более 6 месяцев. При этом необходимо иметь в виду, что основные растворы бета-лактамов АБП могут терять активность и в более ранние сроки.

После извлечения из холодильника перед открыванием флаконов с основными растворами их необходимо довести до комнатной температуры для предотвращения конденсации влаги. Размороженные основные растворы должны быть использованы для приготовления рабочих растворов, повторное замораживание не допускается. Для приготовления рабочих растворов используется дистиллированная вода.

Из основных растворов готовят рабочие двукратные разведения АБП. При расчетах за основу берется конечная концентрация АБП в питательной среде равная 1,0 мкг/мл (более высокие - 2, 4, 8, и т. д.; более низкие - 0,5; 0,25; 0,125 и т. д.). При этом реальные концентрации растворов должны учитывать фактор раз-

бавления раствора АБП при приготовлении чашек с плотной питательной средой или при инокуляции. Диапазон двукратных серийных разведений АБП зависит от вида тестируемого микроорганизма, предполагаемой активности АБП и целей исследования;

#### 9.2. метод серийных разведений в бульоне.

Различают два основных варианта метода серийных разведений в бульоне: макрометод (пробирочный) и микрометод (при величине конечного объема 0,2 мл и меньше). Область применения макрометода из-за низкой производительности ограничивается случаями необходимости оценки чувствительности единичных штаммов.

##### Макрометод.

Процедура. Тестирование проводят в объеме 1 мл каждого разведения АБП с конечной концентрацией исследуемого микроорганизма примерно  $5 \times 10^5$  КОЕ/мл.

Питательная среда. Питательный бульон для определения чувствительности разливают по 0,5 мл в каждую пробирку. Количество пробирок определяют необходимым диапазоном разведений АБП и увеличивают на одну для постановки «отрицательного» контроля.

Приготовление серийных разведений АБП. Рабочий раствор АБП готовят из основного раствора с использованием жидкой питательной среды. Концентрацию рабочего раствора рассчитывают исходя из необходимой максимальной концентрации в ряду серийных разведений, учитывая фактор разбавления препарата при последующей инокуляции. Затем рабочий раствор в количестве 0,5 мл при помощи микропипетки со стерильным наконечником вносят в первую пробирку, содержащую 0,5 мл бульона. Тщательно перемешивают и новым стерильным наконечником переносят 0,5 мл раствора АБП в бульоне во вторую пробирку, содержащую первоначально 0,5 мл бульона. Эту процедуру повторяют, пока не будет приготовлен весь необходимый ряд разведений. Из последней пробирки 0,5 мл бульона удаляют. Таким образом, получают ряд пробирок с растворами АБП, концентрации которых отличаются в соседних пробирках в 2 раза. Одновременно готовят дополнительные ряды серийных разведений АБП для тестирования контрольных штаммов. Серия разведений обязательно должна включать в себя пограничные концентрации и допустимые диапазоны МПК для контрольных штаммов.

Приготовление инокулюма и инокуляция. Для инокуляции используют стандартную микробную взвесь, эквивалентную 0,5 по стандарту МакФарланда, разведенную в 100 раз на питательном бульоне, после чего концентрация микроорганизма в ней составит примерно  $10^6$  КОЕ/мл. По 0,5 мл инокулюма вносят в каждую пробирку, содержащую по 0,5 мл соответствующего разведения АБП, и в одну пробирку с 0,5 мл питательного бульона без АБП («отрицательный» контроль). Конечная концентрация микроорганизма в каждой пробирке достигнет необходимой - примерно  $5 \times 10^5$  КОЕ/мл. Инокулюм должен быть внесен в пробирки с разведениями АБП не позднее 15 - 30 мин с момента приготовления.

Инкубация. Пробирки закрывают стерильными ватно-марлевыми пробками или металлическим колпачками и все пробирки с тестируемыми штаммами, кро-



ме пробирки «отрицательный» контроль, инкубируют в обычной атмосфере при температуре 35°C в течение 16 - 20 или 20 - 24 ч (в зависимости от вида тестируемого микроорганизма). Пробирку «отрицательный» контроль помещают в холодильник при 4°C, где хранят до учета результатов.

Учет результатов. Для определения наличия роста микроорганизма пробирки с посевами просматривают в проходящем свете. Рост культуры в присутствии АБП сравнивают с референтной пробиркой («отрицательный» контроль), содержащей исходный инокулюм и хранившейся в холодильнике. МПК определяют по наименьшей концентрации АБП, которая подавляет видимый рост микроорганизма.

#### Микрометод.

Преимуществами микрометода является высокая производительность и возможность длительного хранения заранее приготовленных планшет. Тестирование проводят при величине конечного объема 0,2 мл и меньше, что позволяет значительно сократить количество расходных материалов. Методика не имеет отличий от макрометода, за исключением используемых объемов питательного бульона с разведениями антибиотиков и инокулюма, но требует дополнительного оснащения лаборатории многоканальными пипетками, 96-луночными планшетами для иммунологических исследований (с плоским дном) со стерильными крышками.

Первым этапом является изготовление планшет, пригодных для хранения. После внесения рабочих растворов антибиотиков в лунки, запаянные в полиэтилен планшеты могут храниться при температуре ниже 60°C до момента использования. Повторное замораживание-оттаивание не допускается.

Для проведения исследования планшеты после извлечения из холодильника выдерживают до достижения ими комнатной температуры, после чего проводят инокуляцию приготовленной суспензией исследуемого микроорганизма. При проведении инкубации планшет обязательно должен быть закрыт крышкой для предотвращения высыхания содержимого лунок.

Учет результатов проводят визуально или спектрофотометрически, сравнивая рост микроорганизма в присутствии АБП с ростом культуры в ячейке без АБП. За МПК принимают минимальную концентрацию, обеспечивающую полное подавление видимого роста исследуемого штамма.

Метод серийных микроразведений в бульоне легко поддается модификациям для разработки тест-систем. При использовании тест-систем, разрешенных к применению в установленном порядке, следует пользоваться инструкциями изготовителей.

Контроль качества. При постановке методов серийных разведений в бульоне необходимо проводить контроль роста культуры в среде без АБП. Необходимо также контролировать чистоту суспензии микроорганизма, использованной для инокуляции, путем высева на неселективные среды. Каждая партия тестируемых штаммов сопровождается внутренним контролем качества исследования с использованием соответствующих контрольных (референтных) штаммов;

### 9.3. метод серийных разведений в агаре.

Метод серийных разведений в агаре позволяет одновременно определить МПК партии штаммов (от 15 до 30 клинических штаммов и контрольных штаммов, в зависимости от используемой модели инокулятора).

Процедура. Принцип метода заключается в посеве тестируемых микроорганизмов на чашки Петри с агаром, содержащим последовательные двойные разведения антибиотиков. Одновременно проводят тестирование партии клинических штаммов и соответствующих контрольных штаммов, а также контроль роста микроорганизмов на чашках без АБП и контроль чистоты культуры путем высева образцов инокулюма на неселективные питательные среды.

Приготовление серийных разведений АБП. Из основного раствора исследуемого АБП готовят рабочий раствор в концентрации, в 10 раз превосходящей максимальную из используемых в конкретном исследовании. Затем готовят серию двукратных разведений рабочего раствора. Таким образом, концентрация АБП в каждом последующем разведении должна быть в 2 раза меньшей, чем в предыдущем. Для приготовления серии разведений используют любые стерильные химически инертные лабораторные ёмкости с завинчивающимися крышками объёмом не менее 10 мл (для удобства размешивания).

Питательная среда. Сухую агаризованную питательную среду растворяют и автоклавируют в соответствии с инструкцией изготовителя. После автоклавирования колбы с питательной средой помещают на водяную баню при 48 - 50°C, где выдерживают до достижения указанной температуры после чего в них асептически вносят рабочие растворы АБП (1 часть рабочего раствора АБП на 9 частей расплавленного агара) и при необходимости, термолабильные питательные добавки. Затем среду тщательно перемешивают и разливают по чашкам Петри, толщина слоя питательной среды должна быть 3 - 4 мм.

Вторым способом приготовления чашек Петри с агаром, содержащим разведения АБП, является смешивание питательной среды и раствора АБП непосредственно в чашке Петри. Для приготовления стандартных пластиковых чашек диаметром 90 мм необходимо к 2 мл раствора АБП добавить 18 мл разогретого до 50°C жидкого агара. Чашки предварительно маркируют с указанием препарата и его концентрации. Очень важно тщательно перемешивать агар до того, как он начнёт застывать для равномерного распределения АБП по всей толще питательной среды. Перемешивание производят на горизонтальной поверхности последовательно плавными разнонаправленными круговыми движениями чашки. После приготовления чашек агар должен затвердеть в горизонтальном положении. Нельзя резко передвигать, переносить чашки до полного застывания агара.

Параллельно с чашками Петри, содержащими растворы АБП, для контроля роста готовят чашки Петри без АБП. Чашки оставляют при комнатной температуре для застывания и подсушивания на 10-12 ч.

Приготовленные указанным образом чашки Петри предпочтительнее использовать немедленно, допускается хранение в запаянных полиэтиленовых пакетах при + 4 - + 8°C в течение 5 сут. При этом необходимо иметь в виду, что некоторые бета-лактамы АБП (прежде всего, ампициллин, цефаклор, имипенем), особенно при низких концентрациях, не выдерживают даже указанный срок хранения. В этой связи стабильность АБП в приготовленных в лаборатории чашках

Петри целесообразно устанавливать экспериментально с использованием референтных штаммов.

Приготовление инокулюма и инокуляция.

Конечная посевная доза исследуемого микроорганизма на поверхности питательной среды должна составлять  $10^4$  КОЕ. Поскольку коммерческие инокуляторы или стандартная бактериологическая петля диаметром 3,0 мм переносят 1-2 мкл жидкости, концентрация микроорганизмов в исходной суспензии должна быть  $10^7$  КОЕ/мл. Такую концентрацию можно получить при разведении стандартной микробной суспензии, соответствующей стандарту 0,5 по МакФарланду, в 10 раз.

Полученную суспензию необходимо инокулировать на поверхность агар в течение 15 мин после приготовления, при этом образуется пятно диаметром 5-8 мм.

Для контроля качества приготовления суспензий периодически рекомендуется проводить подсчет реальных КОЕ путем высева образца приготовленного инокулюма на неселективные питательные среды.

Инкубация. После инокуляции чашки оставляют при комнатной температуре для подсыхания, далее переворачивают и инкубируют при температуре  $35^{\circ}\text{C}$  в течение 18-24 ч (в зависимости от вида тестируемого микроорганизма).

Учет результатов. Учет результатов проводят, поместив чашку на темную не отражающую свет поверхность. За МПК принимают концентрацию, вызвавшую полную ингибицию видимого роста. Для дифференцирования нежного роста от налета, оставшегося после инокулята, в ряде случаев целесообразно использовать увеличение. Появление единственной колонии на чашке с концентрацией на 1 разведение выше, чем явная МПК, можно не учитывать. Результат оценки антибиотикочувствительности имеет смысл учитывать только при подтверждении чистоты культуры.

Контроль качества. При постановке методов серийных разведений в агаре необходимо проводить контроль роста культуры на чашке Петри с питательной средой, не содержащей АБП. Важнейшим требованием контроля качества является высев, использованной для инокуляции суспензии на плотную неселективную среду для подтверждения чистоты культуры. Каждая партия тестируемых штаммов сопровождается внутренним контролем качества исследования с использованием соответствующих контрольных (референтных) штаммов;

#### 9.4. общие комментарии по методам серийных разведений.

Несмотря на то, что методы серийных разведений являются наиболее точными и информативными, их постановка в практических лабораториях сопряжена со значительными методическими трудностями. Прежде всего, речь идет о необходимости использования субстанций АБП с известным уровнем активности, строгого соблюдения режимов хранения, тщательного выполнения контроля качества питательных сред, трудоемкости приготовления рабочих растворов АБП.

Использование тест-систем на основе метода микроразведений позволяет избегать трудоемких процедур по стандартизации подготовительных этапов, но при этом обеспечивает получение достоверных количественных результатов по

уровню антибиотико-резистентности. Весьма экономичным и простым в исполнении является также вариант метода серийных микроразведений, основанный на использовании двух пороговых концентраций, позволяющий получить качественные результаты (т. е. распределить штаммы по чувствительности на три категории).

10. Диско - диффузионный метод (далее - ДДМ):

10.1. принцип метода.

ДДМ определения чувствительности основан на способности АБП диффундировать из пропитанных ими бумажных дисков в питательную среду, угнетающая рост микроорганизмов, посеянных на поверхности агара;

10.2. питательная среда.

Для определения чувствительности ДДМ используют такую же, как и для метода разведений в агаре, питательную среду. К качеству питательных сред для постановки метода выдвигают те же требования, что и к плотным питательным средам для постановки метода серийных разведений в агаре, соответственно используют и те же методы контроля качества.

Приготовление чашек Петри с плотной питательной средой связано с некоторыми особенностями. Плотную питательную среду готовят в соответствии с инструкцией изготовителя. Важным моментом при определении чувствительности ДДМ является толщина слоя агара в чашке. Она должна составлять  $(4,0 \pm 0,5)$  мм, что достигается при внесении в чашку Петри диаметром 90 мм строго 20 мл агара, диаметром 100 мм - 25 мл агара, а диаметром 150 мм - 60 мл агара. Перед заполнением расплавленной средой чашки Петри устанавливают на строго горизонтальную поверхность. Соблюдение указанных предосторожностей необходимо в связи с тем, что размер и форма зоны ингибиции роста зависят от глубины и равномерности агарового слоя.

После заполнения чашки оставляют при комнатной температуре для застывания. Хранить чашки можно запаянными в полиэтиленовые пакеты при  $+4 - +8^{\circ}\text{C}$  не более 7 суток. При использовании свежеприготовленных чашек или чашек после хранения в холодильнике их необходимо подсушить перед инокуляцией, что достигается инкубацией при  $35^{\circ}\text{C}$  с приоткрытой крышкой в течение 10 - 20 мин. Перед инокуляцией необходимо проконтролировать отсутствие конденсата жидкости на внутренней поверхности крышек;

10.3. диски с антибиотиками.

Для определения чувствительности ДДМ следует использовать только стандартизированные качественные диски.

Для получения правильных результатов определения чувствительности ДДМ необходимо строго соблюдать правила хранения и использования коммерческих дисков, в противном случае содержание в них АБП может снизиться ниже допустимого уровня (прежде всего в результате увлажнения) еще до истечения срока годности.

Долговременное хранение дисков с АБП осуществляют в герметичной упаковке в морозильной камере при температуре  $-18^{\circ}\text{C}$  и ниже. Небольшие партии дисков, используемые при повседневной работе, можно хранить в холодильнике при температуре  $+4 - +8^{\circ}\text{C}$  в течение 5-7 дней, плотно укупороенными так, чтобы

гарантировать невозможность попадания во флакон влаги, кроме того для дополнительной защиты от влаги во флаконах (картриджах) с дисками содержится специальный влагопоглотитель (силикагель).

Флаконы (картриджи) с дисками следует извлекать из холодильника за 1 ч до начала работы и выдерживать герметично закрытыми до достижения ими комнатной температуры, что предотвращает образование конденсата на дисках после открывания флаконов;

#### 10.4. приготовление бактериальной суспензии и инокуляция.

При определении чувствительности ДДМ используют стандартный инокулюм, соответствующий по плотности 0,5 по стандарту МакФарланда и содержащий примерно  $1-2 \times 10^8$  КОЕ/мл. Инокулюм следует использовать в течение 15 мин после приготовления. Для инокуляции приготовленных чашек с агаром можно использовать два способа.

Наиболее удобным способом инокуляции является использование стерильных ватных тампонов. Тампон необходимо погрузить в стандартную суспензию микроорганизма, затем избыток инокулюма удалить, отжав тампон о стенки пробирки. Инокуляцию проводят штриховыми движениями, поворачивая чашку Петри на  $60^\circ\text{C}$ .

При использовании второго способа стандартный инокулюм наносят пипеткой на поверхность чашки Петри с питательной средой в объеме 1 - 2 мл, равномерно распределяют по поверхности покачиванием, после чего удаляют избыток инокулюма пипеткой. Приоткрытые чашки подсушивают при комнатной температуре в течение 10 - 15 мин;

#### 10.5. аппликация дисков и инкубация.

Не позднее чем через 15 мин после инокуляции на поверхность питательной среды наносят диски с АБП. Аппликацию дисков проводят с помощью стерильного пинцета. Расстояние от диска до края чашки и между дисками должно быть 15 - 20 мм. Таким образом, на одну чашку диаметром 90 мм следует помещать не более 6 дисков с АБП. Количество дисков может быть увеличено до 8 при применении устройств для наложения дисков. Диски должны равномерно контактировать с поверхностью агара, для чего их следует аккуратно прижать пинцетом.

Непосредственно или не позднее 30 минут после аппликации дисков чашки Петри помещают в термостат кверху дном и инкубируют при температуре  $35^\circ\text{C}$  в течение 18 - 24 ч (в зависимости от вида тестируемого микроорганизма). Увеличение интервала времени между нанесением дисков на поверхность среды и началом инкубации (а соответственно - началом роста исследуемой культуры микроорганизма) приводит к «преддиффузии» АБП в агар и к увеличению диаметра зоны подавления роста. Превышение температуры инкубации более  $35^\circ\text{C}$ , может привести к искажению результатов определения чувствительности к оксациллину;

#### 10.6. учет результатов.

После окончания инкубации чашки помещают кверху дном на темную матовую поверхность так, чтобы свет падал на них под углом в  $4-5^\circ$  (учет в отраженном свете). Диаметр зон задержки роста измеряют с точностью до 1 мм,

предпочтительнее пользоваться штангенциркулем или кронциркулем.

При измерении зон задержки роста следует ориентироваться на зону полного подавления видимого роста. Не следует обращать внимания на очень мелкие колонии, выявляемые в пределах зоны задержки роста только при особых условиях освещения или увеличении, и едва заметный налет у края зоны. Исключение составляют случаи учета результатов определения чувствительности стафилококков к оксациллину, когда необходимо учитывать и самые мелкие колонии, выявляемые в пределах четкой зоны подавления роста.

Крупные колонии, выявляемые в пределах четкой зоны подавления роста, свидетельствуют о наличии посторонней микрофлоры или о гетерорезистентности популяции микроорганизмов, в этом случае необходимо повторить идентификацию микроорганизма, формирующего колонию, и определение чувствительности штамма.

При определении чувствительности ДДМ роящихся штаммов протей, зона подавления роста может быть затянута тонкой вуалеобразной пленкой, которая не мешает установлению границы зоны и не учитывается при регистрации результатов.

При определении чувствительности к сульфаниламидам и их комбинации с триметопримом границу зоны подавления роста следует учитывать на уровне ингибиции роста на 80 %. Это связано с тем, что под действием этих препаратов перед полным подавлением роста возможно завершение 1 - 2 циклов пролиферации микроорганизма.

## ГЛАВА 5

### КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА ОПРЕДЕЛЕНИЯ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ МИКРООРГАНИЗМОВ К АБП

11. При определении чувствительности микроорганизмов к АБП любым методом необходимо выполнять процедуры внутреннего контроля качества исследования. Достоверность результатов исследования чувствительности микроорганизмов к АБП зависит от следующих основных параметров: состава питательной среды; соответствия реальной активности используемых АБП (или их содержания в дисках) паспортным характеристикам (активности); соблюдения стандартности выполнения всех лабораторных процедур.

12. Контроль инокулюма.

На поверхности среды должен быть равномерный, но не плотный газон. Не допускается образование изолированных колоний, а также избыточность роста, которая характеризуется плотным газоном с толщиной слоя биомассы около 0,5 мм и более, а также малым размером зон подавления роста эталонных штаммов.

13. Контроль качества питательных сред:

13.1. контроль роста.

Каждую партию плотных питательных сред для определения чувствительности должны проверять на пригодность для роста тестируемых микроорганизмов. Для этого используют соответствующие контрольные штаммы *E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. aureus*, *E. faecalis*, *S. pneumoniae*, *H. influenzae*, *N. gonorrhoeae*. Из суточных культур указанных микроорганизмов готовят микробную взвесь, соответствующую по плотности 0,5 по стандарту МакФарланда (содержащую при-

близительно  $1-2 \times 10^8$  КОЕ/мл). Из полученной микробной взвеси готовят серию последовательных разведений 1:10. Затем на приготовленные чашки с соответствующим агаром высевают по 0,1 мл взвеси - 5, - 6, -7 разведений, содержащих соответственно  $1 \times 10^3$ ,  $1 \times 10^2$ ,  $1 \times 10^1$  КОЕ/мл. При хороших питательных свойствах среды должен отмечаться рост микроорганизмов из - 6, - 7 разведений.

Для контроля роста при определении чувствительности методами разведений (в агаре, в жидкой питательной среде) используют чашки с агаром, пробирки с бульоном или специально выделенные лунки микротитровального планшета, в которые не внесен АБП;

### 13.2. контроль стерильности.

Для контроля стерильности проводят инкубацию при  $35^\circ\text{C}$  в течение 24 часов 10% , но не менее 4 чашек с агаром из каждой партии, при определении чувствительности ДДМ, чашек с агаром или пробирок с бульоном, не содержащих антибиотиков, при тестировании методом разведений в агаре или макроразведений в бульоне, соответственно. При определении чувствительности методом микроразведений контроль стерильности производят по специально выделенным для этой цели лункам микротитровального планшета, в которые не вносят растворы АБП и микробную взвесь;

### 13.3. проверка pH агара.

Определение pH проводят после автоклавирования, внесения всех необходимых добавок и охлаждения до комнатной температуры ( $25^\circ\text{C}$ ). Для достоверного определения pH необходимо использовать pH-метр с поверхностно-активным электродом, другие методы определения pH (с помощью лакмусовой бумаги, обычного pH-метра) не должны использоваться, так как не обеспечивают получения достаточно точных результатов. Приемлемый диапазон pH для питательных сред для определения чувствительности 7,2 - 7,4. При pH среды, выходящей за указанные пределы, возможны существенные отклонения результатов определения чувствительности от должных значений;

### 13.4. контроль катионного состава.

Для получения воспроизводимых результатов определения чувствительности к АБП питательная среда должна содержать строго стандартизированные концентрации двухвалентных катионов, прежде всего  $\text{Ca}^{2+}$  и  $\text{Mg}^{2+}$  ( $\text{Ca}^{2+} = 20 - 25$  мг/л и  $\text{Mg}^{2+} = 10,0 - 12,5$  мг/л). Применение метода атомной абсорбционной спектрофотометрии для непосредственной оценки концентрации двухвалентных катионов в среде в повседневной практике мало реально. О содержании в среде двухвалентных катионов косвенно можно судить по результатам тестирования чувствительности контрольного штамма *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 к аминогликозидам (диаметр зоны вокруг диска с гентамицином должен быть в пределах 16- 21 мм, а МПК гентамицина - в пределах 0,5- 2,0 мкг/мл);

### 13.5. контроль содержания тимина и тимидина.

При определении чувствительности к АБП из группы антагонистов фолиевой кислоты (антифолатов) - сульфаниламидов и триметоприма критически важным показателем является содержание антагонистов действия этих препаратов - тимина и тимидина в питательной среде. Питательные среды для определения чувствительности к сульфаниламидам и триметоприму должны содержать мини-

мальные концентрации тимидина. О пригодности питательной среды для определения чувствительности к антифолатам можно косвенно судить по результатам тестирования контрольного штамма *Enterococcus faecalis* ATCC 29212. Среда считается удовлетворительной по качеству при МПК триметоприма/сульфаметоксазола в отношении *E. faecalis* меньше 0,5/9,5 мг/л и диаметре зоны подавления роста вокруг диска с этим АБП больше или равно 20 мм.

#### 14. Интегральный контроль качества определения чувствительности:

14.1. наиболее доступным интегральным методом оценки качества определения чувствительности является сопоставление результатов определения чувствительности (МПК или диаметров зон подавления роста) контрольных (референтных) штаммов микроорганизмов с соответствующими показателями, приведенными в их паспортной характеристике. Тестирование контрольных штаммов проводят параллельно тестированию клинических изолятов;

#### 14.2. контрольные (референтные) штаммы микроорганизмов.

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

Выбор контрольных штаммов для проведения контроля качества тестирования определяется видом исследуемого микроорганизма.

При детекции отдельных механизмов резистентности бета-лактамазы расширенного спектра (далее - БЛРС) метициллинрезистентности и других, возникает необходимость использования контрольных штаммов, обладающих данными механизмами;

14.3. допустимые диапазоны значений МПК (мг/л) контрольных штаммов микроорганизмов с обычными питательными потребностями приведены в приложении 2 к настоящей Инструкции по применению; допустимые диапазоны значений диаметров зон подавления роста (мм) контрольных штаммов микроорганизмов с обычными питательными потребностями приведены в приложении 3 к настоящей Инструкции по применению; допустимые диапазоны значений МПК (мг/л) контрольных штаммов микроорганизмов со сложными питательными потребностями приведены в приложении 4 к настоящей Инструкции по применению; допустимые диапазоны значений диаметров зон подавления роста (мм) контрольных штаммов микроорганизмов со сложными питательными потребностями приведены в приложении 5 к настоящей Инструкции по применению.

#### 15. Хранение контрольных штаммов.

В условиях лаборатории контрольные штаммы должны храниться таким образом, чтобы возможность мутаций и контаминации культуры была минимальной. Для этого создается банк контрольных штаммов, предназначенный для длительного хранения, а для ежедневной рутинной работы используются регулярно субкультивируемые культуры.

Для длительного хранения штаммов существуют два основных способа.



Первый состоит в приготовлении суспензии микроорганизмов в стабилизирующем растворе (50 % фетальной телячьей сыворотки в бульоне, 10 - 15% глицерина в триптиказо-соевом бульоне, дефибринированная баранья или кроличья кровь). Наилучшую сохранность культур удается получить при хранении в замороженном состоянии при температуре  $-70^{\circ}\text{C}$  и ниже в морозильной камере или в жидком азоте. Другой метод длительного хранения контрольных штаммов - в лиофилизированном виде.

Для непродолжительного хранения «рабочих» контрольных штаммов их выращивают в пробирке со скошенным агаром (триптиказосоевым или другим аналогичным для «непривередливых» микроорганизмов, шоколадным для «привередливых» бактерий) и хранят в холодильнике при температуре  $+2 - 8^{\circ}\text{C}$ , субкультивируя еженедельно.

В случае, если «рабочие» контрольные штаммы были контаминированы или результаты определения чувствительности контрольного штамма не попадают в необходимые пределы, и это не может быть объяснено нарушениями методики определения чувствительности, «рабочий» штамм должен быть заменен на свежий из банка контрольных штаммов.

Перед использованием для контроля качества определения чувствительности хранившийся контрольный штамм должен быть дважды субкультивирован на подходящих питательных средах.

#### 16. Частота проведения контроля качества.

Оптимальным является проведение контроля качества определения чувствительности с использованием набора контрольных штаммов ежедневно, параллельно с тестированием клинических изолятов.

Однако на практике, при получении достаточно стабильных результатов контроля качества в течение хотя бы одного месяца, частота контрольных исследований может быть сокращена. Контрольные исследования необходимо проводить при использовании новых партий реагентов, прежде всего, питательных сред.

В то же время, если при проведении подобного тестирования получаемые результаты окажутся за пределами указанных границ, необходимо вернуться к ежедневному контролю качества для выяснения причины получения неправильных результатов.

## ГЛАВА 6

### ОПРЕДЕЛЕНИЕ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ ОТДЕЛЬНЫХ ГРУПП БАКТЕРИЙ К АНТИБАКТЕРИАЛЬНЫМ ПРЕПАРАТАМ И ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

17. Принципы выбора АБП для тестирования различных видов микроорганизмов и интерпретации результатов:

#### 17.1. выбор АБП.

Основой для выбора АБП, подлежащих включению в исследование, являются данные о природной чувствительности отдельных видов микроорганизмов или их групп, о распространении среди них приобретенной резистентности, а также о клинической эффективности АБП.

В исследование целесообразно включать АБП, обладающие в отношении

выделенных микроорганизмов природной активностью и клинически подтвержденной эффективностью при соответствующих инфекциях. Учитывая значительное количество имеющихся в клинической практике АБП, различия между организациями здравоохранения по контингенту пациентов, особенностям этиологической структуры инфекций и по распространенности приобретенной антибиотикорезистентности, создать единые стандартные наборы АБП для всех организаций здравоохранения не представляется возможным.

В настоящее время перечень АБП, чувствительность к которым рекомендуется определять у различных видов микроорганизмов, принято подразделять на две группы: подлежащие изучению в первую очередь (I группа) и дополнительные (II группа). Оценка чувствительности к препаратам I группы позволяет получить минимально необходимую информацию для обоснования рациональной терапии инфекции, вызванной исследуемым микроорганизмом. Информативность исследований возрастает по мере увеличения количества включенных в исследование АБП из группы II.

Накопленные к настоящему времени данные свидетельствуют о том, что прогнозирование клинической эффективности АБП, на основе оценки фенотипа (антибиотикограммы) менее информативно, чем ее прогнозирование на основе выявления генотипа (набора детерминант резистентности) данного патогена. Однако непосредственная детекция детерминант резистентности генетическими методами (генотипирование) в рутинной практике в большинстве случаев неосуществима. В ряде случаев генотипирование может быть заменено оценкой чувствительности к АБП, являющимся маркерами того или иного механизма устойчивости.

Наиболее демонстративным примером указанного подхода является использование оксациллина в качестве маркера устойчивости *Staphylococcus spp.* ко всем бета-лактамам, связанной с наличием *mec A* гена. На практике возможны ситуации, когда исследуемый микроорганизм при обычном тестировании проявляет устойчивость к оксацилину, но чувствителен к другим бета-лактамам. В указанных случаях приоритет отдается результатам, получаемым при тестировании оксациллина.

Следующей важной особенностью, которую необходимо учитывать при составлении наборов АБП для изучения чувствительности являются закономерности перекрестной резистентности бактерий к различным представителям одной группы АБП. В пределах некоторых групп АБП можно выделить подгруппы препаратов, в отношении которых бактерии проявляют полную перекрестную резистентность. В этих случаях на практике достаточно оценивать чувствительность только к одному АБП данной подгруппы.

Окончательное формирование наборов АБП для определения чувствительности различных видов микроорганизмов в конкретных организациях является задачей врача-бактериолога, для ее решения необходимо привлекать врачей клинических специальностей;

#### 17.2. интерпретация результатов.

Интерпретация результатов оценки чувствительности заключается в прогнозировании результата антибактериальной терапии на основе данных исследования возбудителя инфекционной болезни *in vitro*.

Интерпретация результатов оценки антибиотикочувствительности заключается в отнесении исследуемого микроорганизма к одной из трех категории.

**Чувствительный** - штамм подавляется при концентрациях АБП создающихся в органах и тканях человека при рекомендуемых режимах дозирования. Лечение инфекции, вызванной микроорганизмом, относящимся к этой категории, обычно эффективно при применении АБП в рекомендуемых дозах.

**Промежуточный** - МПК АБП в отношении штаммов этой категории выше, чем в отношении чувствительных, но находится в пределах, достижимых при рекомендуемых режимах дозирования. Лечение инфекции, вызванной микроорганизмом, относящимся к этой категории может быть эффективным при применении АБП в повышенных дозах либо при локализации очага инфекции в тех органах или тканях в которых в силу физиологических особенностей создаются повышенные концентрации АБП.

**Устойчивый** - штамм не подавляется при концентрациях АБП, создающихся в органах и тканях при рекомендуемых режимах дозирования. Для устойчивых штаммов характерно наличие определенных механизмов резистентности. Лечение инфекции, вызванной микроорганизмом, относящимся к данной категории, скорее всего, будет неэффективным.

Интерпретация осуществляется на основании сопоставления результатов исследования (величины МПК АБП или диаметра зоны ингибиции роста) с пограничными значениями этих параметров, отделяющих чувствительные штаммы от промежуточных и промежуточные от устойчивых.

При выборе значений пограничных концентраций АБП учитывают микробиологические, фармакокинетические, фармакодинамические, а также клинические факторы. Обоснование значений пограничных концентраций является сложным и, во многом, субъективным процессом.

Приведенные выше категории являются клинически ориентированными и не всегда коррелируют с микробиологическими. Возможны как ситуации, при которых чувствительный с микробиологической точки зрения штамм будет отнесен к устойчивым, так и обратные, при которых к чувствительным будет отнесен штамм, устойчивый с микробиологической точки зрения.

18. Определение чувствительности представителей семейства *Enterobacteriaceae*:

18.1. представители семейства *Enterobacteriaceae* являются одними из ведущих этиологических агентов как внебольничных, так и нозокомиальных инфекций, для них характерно крайнее разнообразие возможных механизмов резистентности к АБП.

При тестировании микроорганизмов семейства *Enterobacteriaceae* рекомендуется использовать отдельные наборы АБП для определения чувствительности возбудителей: внекишечных инфекций (кроме инфекций мочевыводящих путей, далее-ИМП); кишечных инфекций (*Shigella* spp., *Salmonella* spp., *Escherichia* spp.); внебольничных ИМП. Необходимость такого разделения связана с особенностями фармакокинетики отдельных АБП в желудочно-кишечном тракте и мочевыводящих путях, а также различиями в их клинической эффективности.

Критерии интерпретации результатов определения чувствительности для

штаммов Enterobacteriaceae (пограничные значения МПК АБП и соответствующие диаметры зон подавления роста) приведены в приложении 6 к настоящим Методическим рекомендациям;

18.2. оценка антибиотикочувствительности микроорганизмов семейства Enterobacteriaceae возбудителей внекишечных инфекций.

Основу лечения внекишечных инфекций, вызываемых представителями семейства Enterobacteriaceae, составляют бета-лактамы антибиотики. Выбор препаратов для включения в исследование чувствительности, а также принципы интерпретации результатов основываются на данных о природной активности АБП. Несмотря на наличие природной активности в отношении некоторых представителей семейства Enterobacteriaceae такие препараты, как незащищенные амино-, карбокси- и уреидопенициллины, а также цефалоспорины I поколения практически полностью утратили значение при лечении инфекций, вызываемых этими бактериями, в этой связи оценка чувствительности к ним лишена практического смысла.

Препаратами альтернативными бета-лактамам являются аминогликозиды и фторхинолоны.

Оценивать чувствительность возбудителей внекишечных инфекций к тетрациклам, хлорамфениколу и ко-тримоксазолу в настоящее время нецелесообразно. Препараты относятся к бактериостатикам и существенно уступают по эффективности антибиотикам других групп, кроме этого среди микроорганизмов к ним широко распространена резистентность. Перечень АБП, для определения чувствительности микроорганизмов семейства Enterobacteriaceae, выделенных при внекишечных инфекциях приведен в приложении 7 к настоящей Инструкции по применению.

Характеристика препаратов первого ряда.

В первую очередь чувствительность представителей семейства Enterobacteriaceae необходимо оценивать к следующим АБП.

Ампициллин. Является типовым представителем подгруппы аминопенициллинов. Получаемые результаты можно полностью экстраполировать на амоксициллин. Оценивать чувствительность к амоксициллину нецелесообразно, поскольку критерии чувствительности к этому антибиотику для микроорганизмов семейства Enterobacteriaceae не обоснованы. Включение ампициллина в набор для тестирования микроорганизмов семейства Enterobacteriaceae объясняется не столько клиническим значением данного АБП, сколько важностью для оценки фенотипа исследуемого микроорганизма и внутреннего контроля качества.

Ингибиторзащищенный аминопенициллин. Амоксициллин/клавуланат и ампициллин/сульбактам во многом сходны по своим антибактериальным свойствам. В то же время необходимо иметь в виду, что клавуланат является более эффективным ингибитором бета-лактамаз. Возможны отдельные случаи сохранения чувствительности к амоксициллину/клавуланату при устойчивости к ампициллину/сульбактаму.

Цефотаксим или цефтриаксон. Оба цефалоспорины практически идентичны по своим антибактериальным свойствам. Результаты исследования чувствительности к указанным АБП необходимо оценивать, учитывая возможную продукцию

микроорганизмами БЛРС. При подтверждении продукции БЛРС все цефалоспорины необходимо рассматривать как клинически недостаточно эффективные независимо от конкретных результатов тестирования.

Гентамицин. Результаты, получаемые при оценке чувствительности к гентамицину, нельзя экстраполировать на другие аминогликозиды.

Фторхинолон. Применительно к микроорганизмам семейства *Enterobacteriaceae* существенных различий в уровне антибактериальной активности между цiproфлоксацином, офлоксацином, пефлоксацином, а также новыми «антипневмококковыми» фторхинолонами нет. Между перечисленными препаратами наблюдают практически полную перекрестную резистентность. Выбор конкретного фторхинолона для включения в исследования должен основываться на местных условиях.

Характеристика дополнительных препаратов.

В случае тяжелых, крайне тяжелых и, особенно, госпитальных инфекций, в исследование целесообразно включать следующие антибиотики.

Цефтазидим. Антибиотик не рекомендуется для лечения инфекций, вызываемых микроорганизмами семейства *Enterobacteriaceae*. Однако поскольку цефтазидим высоко чувствителен к действию большинства БЛРС, то он может служить маркером продукции этих ферментов исследуемым микроорганизмом.

Карбапенемы. Поскольку устойчивость к этим АБП среди микроорганизмов семейства *Enterobacteriaceae* встречается очень редко и, как правило, носит перекрестный характер между отдельными представителями группы, то в исследование достаточно включать лишь один препарат.

Цефепим. Антибиотик обладает значительно большей устойчивостью к хромосомным бета-лактамазам класса С в сравнении с цефалоспоринами III поколения, может также сохранять активность в отношении части продуцентов БЛРС.

Цефоперазон/сульбактам, тикарциллин/клавуланат. АБП могут сохранять активность *in vitro* в отношении части продуцентов БЛРС. Однако клиническое значение этого феномена не определено. Данные, подтверждающие наличие или отсутствие клинической эффективности указанных АБП при инфекциях, вызываемых продуцентами БЛРС, отсутствуют.

Цефокситин. Антибиотик не имеет реального значения в лечении инфекций, вызванных микроорганизмами семейства *Enterobacteriaceae*, однако может быть использован для дифференцирования продуцентов БЛРС и AmpC. Продуценты БЛРС - чувствительны, продуценты AmpC - устойчивы.

Амикацин. К амикацину сохраняет чувствительность значительная часть штаммов, устойчивых к гентамицину. Оценивать чувствительность микроорганизмов семейства *Enterobacteriaceae* к другим аминогликозидам нецелесообразно.

Для оценки чувствительности возбудителей инфекций легкой и средней степеней тяжести в исследование следует включать цефалоспорины II поколения и оральные цефалоспорины II—III поколений.

При определении чувствительности микроорганизмов семейства *Enterobacteriaceae* особенно важным является выявление штаммов, вырабатывающих БЛРС. Необходимость дополнительной детекции данного механизма устойчивости связана с тем фактом, что часть продуцентов БЛРС при примене-

нии существующих критериев попадают в категорию чувствительных, однако клинические наблюдения свидетельствуют о недостаточной эффективности цефалоспоринов II—IV поколений при инфекциях, вызываемых такими микроорганизмами. Для детекции БЛРС предлагается последовательное проведение скрининга (выявление подозрительных штаммов) и подтверждающих тестов в отношении подозрительных штаммов. Для эффективного скрининга в рутинное микробиологическое исследование необходимо включать несколько цефалоспориновых антибиотиков, минимальный набор должен включать 3 цефалоспорины III поколения: цефотаксим, цефтриаксон и цефтазидим.

В случае выявления или подозрения на продукцию БЛРС необходимо информировать лечащих врачей о высокой вероятности клинической неэффективности терапии пенициллинами и цефалоспорины I- IV поколений, независимо от конкретных результатов определения чувствительности.

При выдаче результатов тестирования микроорганизмов группы *Enterobacter*, *Citrobacter*, *Serratia*, *Morganella*, *Providencia* необходимо указывать, что при монотерапии генерализованных инфекций, вызванных данными возбудителями, цефалоспорины III поколения возможно развитие резистентности в процессе лечения.

При интерпретации результатов оценки устойчивости к аминогликозидам следует ориентироваться на следующие особенности. Широкий субстратный профиль аминогликозидмодифицирующих ферментов, возможность продукции микроорганизмами семейства *Enterobacteriaceae* одновременно нескольких энзимов, приводят к частой перекрестной резистентности между отдельными препаратами. На основании данных о чувствительности или устойчивости исследуемого микроорганизма к одному или нескольким аминогликозидам прогнозировать уровень резистентности к другим АБП этой группы практически невозможно.

Интерпретация результатов оценки резистентности к хинолонам, как правило, не вызывает затруднения. Штаммы, устойчивые к нефторированным хинолонам, могут сохранять чувствительность к фторированным. На практике можно считать, что между ципрофлоксацином, офлоксацином, пефлоксацином и ломефлоксацином имеется полная перекрестная резистентность;

18.3. тестирование микроорганизмов семейства *Enterobacteriaceae* - возбудителей кишечных инфекций.

Основную роль в этиологии кишечных инфекций играют представители родов *Shigella*, *Salmonella*, *Escherichia* и *Yersinia*, относящихся к семейству *Enterobacteriaceae*, а также семейств *Spirillaceae* (род *Campylobacter*) и *Vibrionaceae*. В рутинной практике при кишечных инфекциях определение чувствительности следует проводить только для штаммов семейства *Enterobacteriaceae*.

Перечень АБП, подлежащих исследованию, весьма ограничен и включает препараты с подтвержденной клинической эффективностью. Рекомендуемый перечень АБП для определения чувствительности семейства *Enterobacteriaceae*, выделенных при кишечных инфекциях, согласно приложению 8 к настоящей Инструкции по применению. При генерализованных инфекциях, вызванных микроорганизмами рода *Salmonella* (выделение возбудителя из стерильных локусов), в исследование необходимо включать цефалоспорины III поколения (цефотаксим

или цефтриаксон).

Дополнительно возможно включение хлорамфеникола и тетрациклинов, однако их роль в лечении инфекций желудочно-кишечного тракта представляется на сегодняшний день крайне сомнительной. В то же время результаты определения чувствительности к этим АБП могут иметь определенное значение для эпидемиологического мониторинга;

18.4. тестирование микроорганизмов семейства *Enterobacteriaceae* - возбудителей ИМП.

С практической точки зрения ИМП крайне важно разделять на внебольничные и нозокомиальные. Для тестирования штаммов микроорганизмов семейства *Enterobacteriaceae*, выделенных при нозокомиальных ИМП, следует использовать те же АБП, что и для определения чувствительности возбудителей инфекций различной локализации.

Формирование отдельного набора АБП для оценки чувствительности возбудителей внебольничных ИМП целесообразно при наличии значительного потока таких исследований. Рекомендуемый перечень АБП для определения чувствительности микроорганизмов семейства *Enterobacteriaceae*, выделенных при внебольничных ИМП приведен в приложении 9 к настоящей Инструкции по применению;

18.5. выявление БЛРС у штаммов микроорганизмов семейства *Enterobacteriaceae* фенотипическими методами.

Обоснованные рекомендации по выявлению БЛРС фенотипическими методами распространяются только на штаммы *Klebsiella spp.* и *E.coli*. Однако продукция БЛРС может отмечаться практически у всех видов семейства *Enterobacteriaceae* и ряда других грамотрицательных микроорганизмов. Учитывая распространенность ферментов этой группы, представляется целесообразным проведение скрининга всех выделенных в лаборатории штаммов микроорганизмов семейства *Enterobacteriaceae* с последующим использованием специальных подтверждающих исследований у любых штаммов, которые по данным предварительного тестирования проявляют пониженную чувствительность хотя бы к одному из цефалоспоринов III поколения (МПК больше 2 мг/л либо эквивалентное уменьшение диаметра зоны подавления роста), согласно приложению 10 к настоящей Инструкции по применению.

Скрининг не предполагает проведения специального исследования, его основу должен составлять анализ данных, получаемых в рутинной практике. В то же время, для эффективного скрининга в рутинное микробиологическое исследование необходимо включать несколько цефалоспориновых АБП, даже если использование некоторых из них в качестве терапевтических препаратов не планируется. Наиболее чувствительными к гидролизу БЛРС считаются цефподоксим и цефтазидим. Соответственно, данные препараты целесообразно включать в набор для определения чувствительности микроорганизмов семейства *Enterobacteriaceae*. При отсутствии возможности тестирования цефподоксима, минимальный набор цефалоспоринов III поколения, используемых для определения чувствительности грамотрицательных микроорганизмов, должен включать цефотаксим, цефтриаксон и цефтазидим.

Чем больше цефалоспоринов использовано для тестирования, тем более до-

стоверными будут результаты выявления БЛРС. Некоторые штаммы могут проявлять высокий уровень устойчивости ко всем АБП, у других же обнаруживается лишь незначительное повышение МПК к 1 - 2 АБП цефалоспоринового ряда. Результаты тестирования *Klebsiella* spp. и *E. coli* к цефалоспориновым, указывающие на возможную продукцию БЛРС данными штаммами, приведены в приложении 10 к настоящей Инструкции по применению.

После выявления штамма, подозрительного на продукцию БЛРС, рекомендуется провести подтверждающий тест;

#### 18.6. тесты, подтверждающие продукцию БЛРС.

Все фенотипические тесты для подтверждения продукции БЛРС являются вариантами стандартных методов определения чувствительности к АБП и основаны на ингибции БЛРС клавуланатом. При постановке данных тестов проводится сравнение чувствительности исследуемых микроорганизмов к различным цефалоспориновым III поколения и к комбинации данных АБП с клавулановой кислотой.

Диско-диффузионный метод предусматривает использование стандартных дисков с обычным содержанием цефотаксима и цефтазидима (30 мкг) или диска с цефподоксимом (10 мкг), а также диски, содержащие комбинации: цефотаксим + клавуланат или цефтазидим + клавуланат (30/10 мкг) или цефподоксим + клавуланат (10/10 мкг). В исследование целесообразно включать одновременно и диски с цефотаксимом и диски с цефтазидимом и их комбинациями с клавуланатом.

Постановка теста. Методика приготовления микробной взвеси и инокуляции чашек с агаром стандартные. На поверхность агара накладывают диски с цефалоспориновыми и их комбинациями с клавулановой кислотой. Чашки инкубируют в термостате при 35°C в течение 18 - 20 ч.

Интерпретация результатов. Различия в диаметрах зон подавления роста для дисков с цефподоксимом в комбинации с клавулановой кислотой и цефподоксимом на 6 мм и более, для дисков с цефотаксимом в комбинации с клавулановой кислотой и цефотаксимом, цефтазидимом в комбинации с клавулановой кислотой и цефтазидимом - на 5 мм и более, свидетельствует о продукции штаммом БЛРС. Необходимо подчеркнуть, что результат считается положительным, если данные различия получены хотя бы для одной пары дисков.

Контроль качества. Для контроля качества исследования необходимо использовать два штамма (отрицательный и положительный контроли): отрицательный контроль, при тестировании контрольного штамма *E. coli*, не продуцирующего БЛРС, различия в диаметрах зон между дисками с ингибитором и без него не должны превышать 2,0 мм; положительный контроль, при тестировании контрольного штамма *K. pneumoniae*, продуцирующего БЛРС, различия в диаметрах зон между дисками с цефподоксимом в комбинации с клавулановой кислотой и цефподоксимом больше 6 мм, с цефотаксимом в комбинации с клавулановой кислотой и цефотаксимом больше 3 мм, с цефтазидимом в комбинации с клавулановой кислотой и цефтазидимом больше 5 мм.

Метод серийных разведений в бульоне предполагает использование двойных серийных разведений препаратов в следующих диапазонах концентраций:



цефтазидима от 0,25 до 128,0 мг/л, цефтазидима с клавулановой кислотой от 0,25/4,0 до 128,0/4,0 мг/л; цефотаксима от 0,25 до 64,0 мг/л; цефотаксима с клавулановой кислотой от 0,25/4,0 до 64,0/4,0 мг/л. В исследование целесообразно включать оба цефалоспорины и их комбинации с клавулановой кислотой.

Постановка теста. Методика выполнения исследования (приготовление разведений антибиотиков в бульоне, микробной взвеси, инокуляция и инкубация) - стандартная.

Интерпретация результатов. Снижение МПК цефтазидима или цефотаксима не менее чем в 8 раз (на трех последовательных двукратных разведения) в присутствии ингибитора, в сравнении со значениями МПК соответствующих цефалоспоринов без ингибиторов, свидетельствует о продукции штаммом БЛРС.

Контроль качества. Отрицательный контроль. При тестировании контрольного штамма *E. coli*, не продуцирующего бета-лактамаз, соотношения МПК соответствующих цефалоспоринов III поколения к МПК их комбинации с клавулановой кислотой должны быть меньше 8. Положительный контроль. Для штамма *K. pneumoniae*, продуцирующего БЛРС, соотношения значений МПК цефалоспоринов и МПК их комбинаций с клавуланатом должны быть больше или равно 8;

#### 18.7. метод двойных дисков.

Хотя данный метод и не относится к хорошо стандартизованным, чувствительность, специфичность и простота выполнения позволяют рассматривать его приемлемым методом для рутинной практики. Метод предполагает использование доступных коммерческих дисков с цефалоспорином III поколения с амоксициллином в комбинации с клавулановой кислотой.

Метод «двойных дисков» представляет собой вариант классического ДДМ определения чувствительности, который позволяет выявить продукцию БЛРС по наличию расширенной зоны подавления роста вокруг диска с каким-либо цефалоспорином III поколения напротив диска, содержащего клавулановую кислоту (синергизм отмечается в участке пересечения зон диффузии двух дисков, расположенных на небольшом расстоянии друг от друга).

Постановка теста. Методика приготовления микробной взвеси, инокуляции и инкубации чашек не имеет отличий от стандартного ДДМ. Особенностью метода является то, что через 5 - 10 мин после инокуляции на поверхность агара накладывают диски с АБП: в центр - диск, содержащий клавулановую кислоту, обычно в виде комбинации амоксициллина с клавулановой кислотой (20/10 мкг), по бокам от него на расстоянии 20 и 30 мм между центрами дисков - диски с цефтазидимом (30 мкг) и цефотаксимом (30 мкг). Использование двух дисков каждого АБП, расположенных на разном расстоянии от диска с клавулановой кислотой, позволяет повысить эффективность обнаружения БЛРС.

Интерпретация результатов. Если тестируемый микроорганизм вырабатывает БЛРС (действие которых в большинстве случаев обратимо клавуланатом), зона подавления роста вокруг диска с цефалоспорином III поколения окажется «вытянутой» в сторону диска с амоксициллином с клавулановой кислотой. Причиной данного эффекта является дополнительное подавление роста микроорганизма в той зоне, куда диффундируют и клавулановая кислота и цефалоспорин III поколения. Тест сугубо качественный и требует определенных навыков при ин-

терпретации.

Контроль качества. Параллельно с анализом исследуемых культур тестируют контрольные штаммы. Ни один из традиционных микробиологических методов, основанных на оценке фенотипа микроорганизма, не обеспечивает выявление БЛРС в 100 % случаев. Ситуация существенно затрудняется при наличии у микроорганизмов нескольких детерминант устойчивости одновременно, что встречается достаточно часто. Например, при продукции БЛРС и гиперпродукции хромосомных бета-лактамаз класса С устойчивость последних к клавуланату маскирует присутствие БЛРС.

19. Определение чувствительности *P. aeruginosa*, *Pseudomonas* spp., *Acinetobacter* spp. и других неферментирующих бактерий (далее-НФБ):

19.1. при определении чувствительности НФБ следует иметь в виду, что ДДМ достаточно стандартизован лишь для *P. aeruginosa* и *Acinetobacter* spp. При исследовании *Stenotrophomonas maltophilia*, *Pseudomonas* spp. (кроме *P. aeruginosa*) и других НФБ, предпочтение следует отдавать методам серийных разведений. Рекомендательный перечень АБП, для определения чувствительности *P. aeruginosa*, *Pseudomonas* spp., *Acinetobacter* spp. и других НФБ приведен в приложении 11 к настоящей Инструкции по применению;

19.2. препараты первого ряда.

В первую очередь для оценки антибиотикочувствительности *Pseudomonas* spp. и *Acinetobacter* spp. следует использовать препараты, отличающиеся наибольшей природной активностью.

Цефтазидим. Является одним из основных АБП, используемых для лечения инфекций, вызываемых рассматриваемой группой микроорганизмов.

Цефепим. При сопоставимом с цефтазидимом уровне природной активности, в ряде случаев цефепим сохраняет активность в отношении микроорганизмов, устойчивых к цефтазидиму.

Гентамицин, амикацин. Аминогликозиды для монотерапии инфекций, вызываемых рассматриваемой группой бактерий, не применяются, однако во многих случаях являются необходимым компонентом комбинированных схем терапии. Целесообразность включения в перечень препаратов первого ряда амикацина и гентамицина обосновывается высокой частотой устойчивости к последнему антибиотику.

Ципрофлоксацин. Среди фторхинолонов ципрофлоксацин является препаратом выбора при лечении рассматриваемой группы инфекций.

Меропенем, имипенем. Меропенем характеризуются наибольшим уровнем активности в отношении рассматриваемой группы микроорганизмов, имипенем ему несколько уступает. Целесообразность включения обоих карбапенемов объясняется отсутствием между ними в некоторых случаях перекрестной резистентности;

19.3. дополнительные препараты.

Дополнительные препараты по уровню природной активности, как правило, уступают антибиотикам первого ряда, однако во многих случаях, прежде всего, по экономическим соображениям могут быть использованы в терапии. Кроме этого необходимо учитывать, что НФБ существенно различаются по уровню при-

родной чувствительности к АБП.

Азтреонам, цефоперазон. По основным свойствам близки к цефтазидиму.

Цефоперазон с сульбактамом, тикарциллин с клавулановой кислотой. Доступные ингибиторы не способны подавлять активность большинства бета-лактамаз, распространенных среди *P. aeruginosa*, и в силу этого комбинированные препараты не обладают существенными преимуществами в сравнении с исходными антибиотиками.

Цефоперазон с сульбактамом (а также ампициллин с сульбактамом) могут иметь реальное значение в лечении инфекций, вызываемых *Acinetobacter spp.*, благодаря наличию у сульбактама собственной активности в отношении данного микроорганизма.

При инфекциях, вызываемых *Stenotrophomonas mahophilia*, клиническое значение имеет ко-тримоксазол и тикарциллин с клавулановой кислотой. Микроорганизм обладает природной устойчивостью ко всем бета-лактамам, кроме тикарциллина с клавулановой кислотой.

Карбенициллин. В силу выраженной токсичности и высокой частоты устойчивости применение карбенициллина даже для лечения инфекций, вызываемых *P. aeruginosa*, следует признать нецелесообразным. Очевидно, что «неферментирующие» микроорганизмы нельзя рассматривать как единую группу с точки зрения их природной чувствительности к антибиотикам. Оценка антибиотико-чувствительности редких видов «неферментирующих» микроорганизмов требует индивидуального подхода. Поскольку тяжелые инфекции, вызываемые псевдомонадами, являются показанием для назначения комбинированной терапии, целесообразно при выдаче ответа указывать на наиболее эффективную с микробиологической точки зрения комбинацию АБП. Критерии интерпретации результатов определения чувствительности *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas spp.*, *Acinetobacter spp.* и других НФБ: пограничные значения диаметров зон подавления роста (мм) и МПК (мг/л) АБП приведены в приложении 12 к настоящей Инструкции по применению.

## 20. Определение чувствительности *Staphylococcus spp.*:

20.1. при оценке чувствительности *Staphylococcus spp.* в первую очередь необходимо тестировать препараты, имеющие основное клиническое значение: бета-лактамы, макролиды, фторхинолоны, аминогликозиды и ванкомицин. Рекомендуемый перечень АБП для определения чувствительности *Staphylococcus spp.* приведен в приложении 13 к настоящей Инструкции по применению. Критерии интерпретации результатов определения чувствительности *Staphylococcus spp.* (пограничные значения диаметров зон подавления роста и МПК АБП) приведены в приложении 14 к настоящей Инструкции по применению.

Бета-лактамы. Препаратами выбора для лечения стафилококковых инфекций (вызванных как *Staphylococcus aureus*, так и коагулазонегативными стафилококками) являются бета-лактамы АБП, следовательно, в первую очередь необходимо определять чувствительность стафилококков к этим препаратам. Устойчивость стафилококков к бета-лактамам АБП связана либо с продукцией бета-лактамаз, либо с наличием дополнительного пенициллино-связывающего белка (далее - ПСБ2а). Выявление и дифференцирование этих двух механизмов рези-

стентности позволяет надежно прогнозировать активность всех бета-лактамовых антибиотиков без непосредственной оценки чувствительности к каждому из данных препаратов. При этом необходимо учитывать следующие закономерности: штаммы *Staphylococcus* spp., лишенные механизмов резистентности, чувствительны ко всем бета-лактамовым АБП; бета-лактамазы (пенициллиназы) *Staphylococcus* spp. способны гидролизовать природные и полусинтетические пенициллины, за исключением оксациллина и метициллина. Чувствительность или резистентность к бензилпенициллину является индикатором активности природных и полусинтетических амино-, карбокси- и уреидопенициллинов. Остальные бета-лактамы с потенциальной антистафилококковой активностью (антистафилококковые пенициллины, цефалоспорины I, II и IV поколений и карбапенемы) сохраняют активность в отношении бета-лактамазпродуцирующих штаммов; штаммы *Staphylococcus* spp, обладающие ПСБ2а, клинически устойчивы ко всем бета-лактамовым АБП. Маркером наличия ПСБ2а является устойчивость к оксациллину и метициллину. Такие штаммы исторически получили название метициллин-резистентных стафилококков.

Метициллин в настоящее время в клинической практике и в лабораторной диагностике не применяется, его практически полностью вытеснил оксациллин, соответственно появился термин «оксациллино-резистентность», являющийся полным синонимом термина «метициллин-резистентность».

Таким образом, определение чувствительности *Staphylococcus* spp. к бета-лактамовым АБП должно включать выполнение двух тестов определения чувствительности: к бензилпенициллину или выявления продукции бета-лактамаз (пенициллиназ); к оксациллину или выявления ПСБ2а или кодирующего его гена *mecA*;

20.2. определение чувствительности к бензилпенициллину или выявление продукции бета-лактамаз (пенициллиназ).

Определение чувствительности *Staphylococcus* spp. к бензилпенициллину несколько затруднено тем фактом, что синтез бета-лактамаз у этого микроорганизма является индуцибельным процессом (продукция фермента усиливается после контакта с антибиотиком). В результате этого при использовании стандартных методов серийных разведений и ДДМ возможно получение результатов ложной чувствительности. Решением данной проблемы может быть использование метода непосредственного выявления бета-лактамаз, основанного на использовании дисков с нитроцефином. Нитроцефин представляет собой хромогенный цефалоспорин, который легко гидролизуется под действием всех бета-лактамаз с образованием окрашенного продукта.

Постановка теста. Для проведения исследования используют чашку, на которой оценивали чувствительность исследуемого штамма *Staphylococcus* spp. к пенициллину и/или оксациллину ДДМ. С границы зоны ингибиции роста вокруг диска с оксациллином бактериологической петлей забирается незначительное количество культуры и наносится на предварительно увлажненный диск с нитроцефином. Диск инкубируют при комнатной температуре до 1 ч.

Интерпретация результатов. Появление красного окрашивания свидетельствует о продукции бета-лактамаз исследуемым штаммом микроорганизма. Штамм, продуцирующий бета-лактамазу, рассматривают как устойчивый к при-

родным и полусинтетическим пенициллинам (за исключением оксациллина), независимо от конкретных результатов тестирования к перечисленным АБП;

### 20.3. определение чувствительности к оксациллину.

При определении чувствительности к оксациллину стандартными методами необходимо учитывать некоторые особенности: для приготовления инокулюма используют только прямой метод суспендирования колоний; длительность инкубации до момента учета результатов определения чувствительности к оксациллину должна составлять не менее 24 ч.

Особенности тестирования ДДМ: необходимо использовать диски, содержащие 1 мкг оксациллина; при учете результатов необходимо обращать внимание даже на единичные мелкие колонии стафилококков, обнаруженные в пределах зоны подавления роста.

Особенности тестирования методами серийных разведений: в питательную среду целесообразно добавлять NaCl (до конечной концентрации 2 %).

Интерпретация результатов тестирования стафилококков к оксациллину.

Штаммы стафилококков, резистентные к оксациллину, должны рассматриваться как устойчивые ко всем бета-лактамам АБП. Результаты определения чувствительности стафилококков к оксациллину и к другим бета-лактамам АБП могут быть противоречивыми, при этом результаты определения чувствительности к оксациллину являются решающими. Определять чувствительность стафилококков к бета-лактамам АБП, кроме бензилпенициллина и оксациллина, нецелесообразно. Для метициллинрезистентных стафилококков характерно наличие ассоциированной резистентности к АБП других групп. Выявление у стафилококков множественной резистентности при чувствительности к оксациллину требует проведения повторных исследований. Следует обратить внимание на различия в критериях метициллинрезистентности для *S. aureus* и коагулазонегативных стафилококков. При получении сомнительных результатов необходимо использовать дополнительные методы (скрининг на агаре, прямое выявление гена *tesA* или белка ПСБ2а).

При выделении пенициллино- и метициллиночувствительных штаммов стафилококков, микроорганизм считается чувствительным ко всем бета-лактамам АБП, а препаратами выбора будут природные и аминопенициллины.

При выявлении продукции бета-лактамаз и чувствительности к оксациллину, микроорганизм является резистентным к природным пенициллинам, амино-, карбокси- и уреидо-пенициллинам, но чувствителен к оксациллину, ингибиторозащищенным пенициллинам и цефалоспорином I - II поколений, которые являются препаратами выбора в данном случае. В отношении данных штаммов будут также активны цефалоспорины IV поколения и карбапенемы, однако преимуществами в сравнении с препаратами выбора они не обладают.

При выявлении метициллинрезистентности штамм считается устойчивым ко всем бета-лактамам антибиотикам, для лечения необходимо использовать препараты других групп, из которых препаратами выбора считаются гликопептиды;

### 20.4. дополнительные методы выявления метициллинрезистентности.

Наиболее надежным методом выявления метициллинрезистентности у стафилококков является непосредственное определение наличия гена *tesA* молеку-

лярно-генетическими методами с помощью полимеразной цепной реакции (далее - ПЦР). Кроме того, разработан коммерческий метод выявления дополнительного ПСБ2а в реакции агглютинации.

В то же время, скрининг на агаре для выявления метициллинрезистентности является высокочувствительным и специфичным методом, легко выполнимым в условиях рутинной работы микробиологической лаборатории, однако он может быть использован только для штаммов *S. aureus*.

Постановка теста. Для проведения скрининга готовят чашки с агаром Мюллера-Хинтона, содержащие 4 % NaCl и 6,0 мкг/мл оксациллина. Хлористый натрий вносят в питательную среду в необходимом количестве до автоклавирования. Рабочий раствор оксациллина добавляют в питательную среду после автоклавирования и охлаждения среды до 45 - 50°C. Для приготовления рабочего раствора оксациллина используют субстанцию АБП с известной активностью.

Микробную взвесь следует готовить только методом прямого суспендирования из нескольких однотипных изолированных колоний стафилококка, выросших на чашке с неселективным питательным агаром, в стерильном физиологическом растворе и доводить до мутности 0,5 по Мак-Фарланду ( $1,5 \times 10^8$  КОЕ/мл).

Инокуляция. Для инокуляции чашек с агаром можно использовать два метода: с помощью микропипетки или с помощью стерильного ватного тампона.

Метод с помощью микропипетки. Готовят разведение 1 : 100 стандартного инокулюма, соответствующего стандарту мутности 0,5 по Мак-Фарланду для получения бактериальной взвеси, содержащей  $1,5 \times 10^6$  КОЕ/мл (например, добавить 0,1 мл стандартной суспензии к 9,9 мл стерильного физиологического раствора); с помощью микропипетки наносят каплю (10 мкл) разведенной стандартной суспензии на поверхность агара с оксациллином.

Метод с помощью тампона. Стерильный ватный тампон погружают в пробирку со стандартизированной суспензией (0,5 по Мак-Фарланду), затем отжимают избыток влаги о стенку пробирки; культуру наносят тампоном либо на ограниченную поверхность диаметром 10 - 15 мм), либо на всю поверхность агара с оксациллином в чашке Петри.

Инкубация. Штаммы *S. aureus* инкубируются при температуре 35°C в течение полных 24 ч, а коагулазанегативных стафилококков - в течение 48 ч.

Учет результатов. После инкубации чашки тщательно просматривают в проходящем свете: появление видимого роста более 1 колонии или вуалеобразного роста на месте нанесения культуры означает устойчивость данного штамма к оксациллину (метициллину); при отсутствии роста на месте нанесения культуры исследуемый штамм учитывается как чувствительный к метициллину (оксациллину); при сомнительных результатах, а также для штаммов, выделенных у больных с клинически неэффективной терапией и у больных с серьезными инфекциями, необходимо провести развернутое исследование с определением МПК к оксациллину и гена *tes A*.

Контроль качества. Исследование проводят при обязательном контроле роста испытуемых культур на агаре Мюллера-Хинтона с 4 % NaCl без оксациллина (культуру наносят так же, как на агар с оксациллином). Параллельно с исследуемыми тестируют также контрольные штаммы метициллин-чувствительных и ме-

тициллин-резистентных стафилококков.

Макролиды и линкозамиды. Макролиды и линкозамиды являются альтернативными препаратами для лечения стафилококковых инфекций. В исследование необходимо включать: один из представителей 14-, 15- и 16-членных макролидов и клиндамицин.

Приведенный набор препаратов определяется закономерностями перекрестной резистентности между антибиотиками данных подгрупп.

Фторированные хинолоны. В последнее время отмечается повышение интереса к фторхинолонам как к препаратам для лечения стафилококковых инфекций (особенно кожи и мягких тканей). Новые представители этой группы АБП (антипневмококковые фторхинолоны - левофлоксацин, спарфлоксацин, моксифлоксацин и др.) обладают повышенной активностью в отношении *Staphylococcus spp.* в сравнении с традиционными препаратами. Между перечисленными подгруппами препаратов нет полной перекрестной резистентности. Антипневмококковые препараты часто сохраняют активность в отношении штаммов, устойчивых к другим фторхинолонам.

Аминогликозиды. На практике необходимо учитывать некоторые особенности интерпретации результатов, полученных *in vitro*. Так, при детекции устойчивости к гентамицину выделенный штамм следует рассматривать как устойчивый ко всем аминогликозидам. В этой связи ген-тамицин должен включаться в набор для тестирования в обязательном порядке. В то же время крайне редко могут встречаться штаммы, устойчивые к другим аминогликозидам при чувствительности к гентамицину.

Ванкомицин. Ванкомицин является одним из препаратов выбора (наряду с оксазолидинонами) для лечения инфекций, вызываемых оксациллинрезистентными штаммами. Появление сообщений об устойчивости стафилококков к гликопептидам требует внимательного отношения к оценке результатов исследования.

Дополнительные препараты. Линезолид. Оксазолидиноны являются важным достижением в лечении инфекций, вызываемых оксациллин-резистентными штаммами, в том числе и устойчивыми к гликопептидам. В то же время, необходимо иметь в виду, что уже известно о формировании устойчивости к антибиотикам данной группы.

Другие препараты. Ко-тримоксазол, хлорамфеникол, фузидиевая кислота, тетрациклины, рифампицин. Значение перечисленных препаратов в лечении стафилококковых инфекций, вызванных метициллин-чувствительными штаммами, невелико, так они уступают по активности бета-лактамам. Их клиническая эффективность при инфекциях, вызываемых оксациллинрезистентными штаммами, изучена недостаточно.

Рифампицин, ко-тримоксазол и фузидиевую кислоту нельзя рекомендовать как средство монотерапии из-за высокой частоты селекции резистентности в процессе лечения.

Формировать конкретный набор антибиотиков для оценки антибиотикочувствительности стафилококков наиболее целесообразно на основании данных о частоте распространения в стационаре метициллин-резистентности. При отсутствии или низкой частоте метициллин-резистентности вполне доста-

точно ограничиться оценкой чувствительности к оксациллину (в плане надзора), макролидам и, возможно, еще к 1-2 препаратам, реально применяемым в конкретном стационаре для лечения стафилококковых инфекций. В случае же высокой частоты распространения метициллинрезистентности в исследование необходимо включать достаточно широкий круг антибиотиков;

21. определение чувствительности *Enterococcus* spp:

21.1. энтерококки характеризуются природной устойчивостью ко многим АБП (цефалоспорином, аминогликозидам), а клиническое значение наблюдаемой *in vitro* чувствительности к тетрациклину, хлорамфениколу, макролидам и рифампицину окончательно не определено. Перечень АБП для определения чувствительности *Enterococcus* spp. приведен в приложении 15 к настоящей Инструкции по применению.

При решении вопроса о необходимости определения чувствительности *Enterococcus* spp. к АБП крайне важно оценить клиническую значимость данных микроорганизмов. Так, энтерококки, выделенные из нестерильных локусов организма, особенно в составе ассоциаций, чаще всего следует рассматривать как контаминирующие или колонизирующие микроорганизмы, соответственно, определять чувствительность таких штаммов к АБП нецелесообразно. Проводить определение чувствительности необходимо для штаммов *Enterococcus* spp., выделенных из крови и других в норме стерильных жидкостей и тканей организма, а также из мочи. При этом, подходы к определению чувствительности данных микроорганизмов и наборы АБП для тестирования несколько различаются в зависимости от источника выделения штаммов, согласно приложению 15 к настоящей Инструкции по применению.

Пенициллин и ампициллин. Данные антибиотики являются препаратами выбора для лечения энтерококковых инфекций. Между пенициллином и ампициллином отмечается перекрестная резистентность. Полученные результаты можно экстраполировать на ингибиторозащищенные аминопенициллины и уреидопенициллины. Поскольку известны случаи резистентности энтерококков к пенициллинам, связанные с продукцией бета-лактамаз, резистентные штаммы следует исследовать на продукцию пенициллиназы в тесте с нитроцефином.

Аминогликозиды. Несмотря на то, что энтерококки обладают природной устойчивостью к аминогликозидам, данный класс АБП широко применяется в комбинированной терапии генерализованных энтеро-кокковых инфекций. Целесообразность таких схем лечения объясняется выраженным синергизмом между аминогликозидами и ампициллином или ванкомицином. Однако синергизм проявляется только в том случае, если МПК аминогликозидов не превосходит 500 мкг/мл для гентамицина, 1000 мкг/мл для стрептомицина. Данное обстоятельство требует проведения скрининга (методом серийных разведений или ДДМ) на наличие у энтерококков высокого уровня резистентности к стрептомицину и гентамицину.

Ванкомицин. Ванкомицин является препаратом выбора для лечения инфекций, вызванных штаммами, резистентными к бета-лактамам и аминогликозидам. В ряде географических регионов мира устойчивость энтерококков к ванкомицину является серьезной клинической проблемой. Имеются сообщения о выделении штаммов ванкомицинорезистентных энтерококков и в Республике Беларусь. Для



выявления устойчивости энтерококков к ванкомицину целесообразно проводить целенаправленный скрининг.

Линезолид. Препарат является средством выбора для лечения инфекций штаммами, устойчивыми к ванкомицину. Линезолид также рассматривается в качестве альтернативы ванкомицину при лечении инфекций, вызываемых штаммами, устойчивыми к бета-лактамам и аминогликозидам.

Другие препараты. В отношении ванкомицин-резистентных энтерококков, возможно оценивать активность тетрациклинов, хлорамфеникола, эритромицина и рифампина. Для штаммов энтерококков, выделенных при ИМП, целесообразно исследовать чувствительность к следующим антибиотикам: пенициллину или ампициллину; фторхинолонам; тетрациклинам; нитрофуранам; фосфомицину. Критерии интерпретации результатов определения чувствительности *Enterococcus* spp. (пограничные значения диаметров зон подавления роста и МПК АБП) приведены в приложении 16 к настоящей Инструкции по применению;

21.2. скрининг для выявления высокого уровня резистентности к аминогликозидам у энтерококков.

Скрининг можно проводить в агаре или бульоне.

Питательная среда. Агар или бульон на сердечно-мозговом экстракте. Питательная среда готовится в соответствии с инструкцией производителя. После автоклавирования и охлаждения до 45 - 50°C в среду асептически добавляют растворы АБП до следующих конечных концентраций: гентамицин для скрининга в агаре и бульоне - 500 мг/л; стрептомицин-для скрининга в агаре - 2000 мг/л, для скрининга в бульоне - 1000 мг/л.

Приготовление микробной взвеси, инокуляция и инкубация. Микробную взвесь готовят путем суспендирования изолированных колоний из 24-часовой культуры, выращенной на неселективных средах до концентрации 0,5 по Мак-Фарланду. Для скрининга на агаре на поверхность среды наносят 10,0 мкл суспензии. Для скрининга в бульоне в среду вносят инокулюм до конечной концентрации  $5 \times 10^5$  КОЕ/мл. Инкубацию проводят при температуре 35°C: для гентамицина в течение полных 24 ч, для стрептомицина - до 48 ч.

Учет результатов. Исследуемый штамм рассматривается как резистентный при следующих условиях: при скрининге на агаре - рост более 1 колонии; при скрининге в бульоне - любой видимый рост.

Контроль качества. Для контроля качества используют штаммы чувствительных и резистентных энтерококков;

21.3. скрининг для выявления ванкомицинорезистентности у энтерококков.

Скрининг осуществляется на агаре.

Питательная среда. Агар на сердечно-мозговом экстракте. Питательная среда готовится в соответствии с инструкцией производителя. После автоклавирования и охлаждения до 45 - 50°C в среду асептически добавляют раствор ванкомицина до конечной концентрации 6,0 мг/л.

Приготовление микробной взвеси, инокуляция и инкубация. Микробную взвесь готовят путем суспендирования изолированных колоний из 24-часовой культуры, выращенной на неселективных средах до концентрации 0,5 по Мак-Фарланду. Для скрининга на поверхность агара наносят 10,0 мкл суспензии. Ин-

кубацию проводят при температуре 35°C в течение полных 24 ч.

Учет результатов.

Исследуемый штамм рассматривается как резистентный при росте более одной колонии на агаре с ванкомицином.

Контроль качества.

Для контроля качества используют штаммы чувствительных и резистентных энтерококков.

22. Определение чувствительности микроорганизмов со сложными питательными потребностями.

Определение чувствительности микроорганизмов со сложными питательными потребностями является методически одной из наиболее трудных задач, т. к. в ряде случаев требует одновременного использования метода серийных разведений и ДДМ, особой тщательности в выполнении всех процедур, начиная от приготовления питательных сред и инокулюма и заканчивая проведением контроля качества. В то же время эффективность эмпирической антибактериальной терапии многих инфекций, вызываемых микроорганизмами этой группы, хорошо предсказуема. Учитывая данные факты, при оценке необходимости определения чувствительности микроорганизмов данной группы к АБП следует объективно оценить соотношение стоимости и эффективности (клинической значимости) таких исследований, а также сопоставить стоимость полноценного материально-технического оснащения с доступными ресурсами.

Попытки даже незначительной модификации стандартных методов (замена дорогостоящих реагентов на более дешевые) могут привести к получению ошибочных, недостоверных результатов, способных ввести в заблуждение.

23. Определение чувствительности *Streptococcus* spp:

23.1. для определения чувствительности стрептококков используют следующие питательные среды: для методов серийных разведений в бульоне необходимо использовать бульон Мюллера-Хинтон с добавлением 2,0 - 5,0% лизированной лошадиной крови. Кровь лизируют замораживанием - оттаиванием с последующим центрифугированием для освобождения от теней эритроцитов; для методов серийных разведений в агаре и ДДМ используют агар Мюллера-Хинтона с добавлением 5 % дефибрированной бараньей крови. Данные добавки асептически вносят в питательную основу после автоклавирования и охлаждения до 48 - 50°C;

23.2. определение чувствительности *Streptococcus pneumoniae*.

Бета-лактамы антибиотики (в частности пенициллин) являются препаратами выбора для терапии пневмококковых инфекций. В то же время критерии интерпретации результатов определения чувствительности пневмококков к данным препаратам постоянно пересматриваются в связи с появлением новых клинических и экспериментальных данных об эффективности различных бета-лактамов при пневмококковых инфекциях, вызванных штаммами с различным уровнем чувствительности к пенициллину.

Механизм резистентности *S. pneumoniae* к пенициллину и другим бета-лактамам антибиотикам обусловлен изменением пенициллинсвязывающих белков (далее-ПСБ) клеточной стенки. В результате ступенчатых мутаций уменьшается сродство ПСБ к бета-лактамам антибиотикам.

При этом установлено, что при лечении инфекций дыхательных путей, вызванных штаммами *S. pneumoniae* с промежуточным уровнем резистентности к пенициллину, бета-лактамы антибиотики остаются клинически эффективными, но применение их при менингите приводит к неудаче терапии.

В связи с этим, при разработке критериев интерпретации результатов определения чувствительности *S. pneumoniae* к бета-лактамам антибиотикам, было проведено подразделение штаммов по источникам выделения (инфекции дыхательных путей, ликвор) и пересмотрены критерии оценки чувствительности к амоксициллину, цефотаксиму и цефтриаксону. Критерии интерпретации результатов определения чувствительности к пенициллину не пересмотрены.

Следует обратить внимание на несколько важных особенностей определения чувствительности *S. pneumoniae*: невозможность определения чувствительности к бета-лактамам антибиотикам (пенициллину, аминопенициллинам, цефалоспорином, карбапенемам) ДДМ; невозможность определения чувствительности *S. pneumoniae* к АБП методом разведений в агаре.

Поэтому определение чувствительности пневмококков к пенициллину и другим бета-лактамам антибиотикам подразумевает последовательное (выделение *S. pneumoniae* из нестерильных локусов) или од-новременное (при тяжелых инфекциях, выделении пневмококков из крови и ликвора) выполнение двух исследований: скрининга с диском, содержащим 1,0 мкг оксациллина, с целью выявления возможной пенициллинорезистентности. Скрининговый метод позволяет разделить микроорганизмы на две группы: группу чувствительных штаммов и группу, в которую входят часть чувствительных, а также умеренно-резистентные и резистентные штаммы пневмококков; определение МПК пенициллина и других бета-лактамов АБП методом разведений в бульоне или с помощью Е-тестов у штаммов, отнесенных ко второй группе по результатам скрининга;

23.3. скрининг на наличие пенициллинорезистентности у штаммов *S. pneumoniae*.

Постановка теста. Методика проведения исследования не отличается от обычной процедуры определения чувствительности пневмококков к АБП ДДМ.

Интерпретация результатов. При выявлении диаметра зоны подавления роста штамма пневмококка вокруг диска с 1 мкг оксациллина больше или равного 20 мм, *S. pneumoniae* расценивается как чувствительный ко всем бета-лактамам АБП.

При выявлении диаметра зоны подавления роста меньше 20 мм необходимо определение МПК всех бета-лактамов АБП (пенициллина, аминопенициллинов, цефалоспоринов II - IV поколений, карбапенемов) методами серийных разведений в бульоне или с помощью Е-тестов.

Макролиды и линкозамиды. Вторыми по значимости в лечении пневмококковых инфекций являются макролидные и линкозамидные АБП. Оценка чувствительности *S. pneumoniae* к перечисленным АБП возможна как ДДМ, так и методом серийных разведений. В связи с разнообразием механизмов устойчивости *S. pneumoniae* к макролидам в повседневной практике могут встречаться различные варианты перекрестной резистентности микроорганизмов к АБП данной группы.

В практических целях для характеристики чувствительности *S. pneumoniae* к рассматриваемой группе АБП достаточно оценить к эритромицину и клинда-

мицину что позволяет дифференцировать два основных фенотипа: MLSB - перекрестная устойчивость ко всем макролидам, линкозамидам и стрептограминам В, обусловленная метилированием мишени действия препаратов; М - устойчивость к 14- и 15-членным макролидам (сохранении чувствительности к 16- членным макролидам, линкозамидам и стрептограминам), обусловленная активным выведением АБП.

Фторхинолоны. Традиционные фторхинолоны (пемфлоксагин, офлоксацин, ципрофлоксацин и ломефлоксацин) не являются адекватными для лечения пневмококковых инфекций, соответственно оценивать чувствительность к данным препаратам нецелесообразно. В последние годы в лечении пневмококковых инфекций важное место заняли антипневмококковые фторхинолоны (левофлоксацин, спарфлоксацин, моксифлоксацин и гатифлоксацин). Частота устойчивости к перечисленным препаратам минимальна, однако поскольку между ними не наблюдают полной перекрёстной резистентности, возникает необходимость включения в исследование всей группы.

АБП других групп. Из АБП других групп, для лечения пневмококковых инфекций применяют ко-тримоксазол, хлорамфеникол, тетрациклины. Однако роль перечисленных препаратов в последние годы резко снижается в связи с нарастанием устойчивости, меньшей клинической эффективностью в сравнении с бета-лактамами, макролидами и антипневмококковыми фторхинолонами, также значительным числом нежелательных эффектов.

Для лечения тяжелых пневмококковых инфекций, вызванных штаммами с высоким уровнем устойчивости к АБП других групп, в ряде случаев рекомендуется ванкомицин.

Критерии интерпретации результатов определения чувствительности *S.pneumoniae* (пограничные значения диаметров зон подавления роста и МПК АБП) приведены в приложении 17 к настоящей Инструкции по применению;

#### 23.4. определение чувствительности *Streptococcus* spp. группа «viridans».

Проводить определение чувствительности штаммов стрептококков группы «viridans», выделенных из нестерильных локусов, в рутинной практике нецелесообразно. У штаммов, выделенных из стерильных в норме локусов организма, необходимо, в первую очередь, исследовать чувствительность к пенициллину. Воспроизводимые результаты при определении чувствительности стрептококков группы «viridans» к пенициллину удается получить только при помощи метода серийных разведений, ДДМ не пригоден для этой цели.

Штаммы, чувствительные к этому антибиотику, следует расценивать, как чувствительные ко всем бета-лактамам антибиотикам. Часть штаммов, устойчивых к пенициллину, могут сохранять чувствительность к некоторым цефалоспорином III поколения (цефотаксиму и цеф-триаксону), IV поколения (цефепиму) и карбапенемам.

Определенный интерес может представлять изучение чувствительности стрептококков группы «viridans» к эритромицину и другим макролидам, клиндамицину, тетрациклину и хлорамфениколу, однако, клиническое значение получаемых при этом данных не определено.

В случае сниженной чувствительности или резистентности зеленающих

стрептококков к пенициллину при выдаче результатов тестирования целесообразно рекомендовать проведение комбинированной терапии бета-лактамами с аминогликозидами, которые проявляют синергизм при совместном применении с бета-лактамами, несмотря на отсутствие у аминогликозидов собственной значимой активности в отношении стрептококков;

#### 23.5. определение чувствительности бета-гемолитических стрептококков.

К бета-гемолитическим стрептококкам относятся микроорганизмы, принадлежащие к различным серологическим группам по Лансфельд (А, В, С, G). Среди них наибольшее клиническое значение имеют стрептококки группы А (*Streptococcus pyogenes*) и группы В (*Streptococcus agalactiae*).

Препаратами выбора для лечения инфекций, вызванных бета-гемолитическими стрептококками, являются бета-лактамы, причем достоверных случаев устойчивости к АБП данной группы не описано. Не описана и устойчивость к ванкомицину. Следовательно, оценивать чувствительность к указанным АБП в рутинной практике нецелесообразно.

При выделении из нестерильных локусов необходимость в оценке чувствительности возникает только для *S. pyogenes* и *S. agalactiae*. Примерный перечень препаратов для определения чувствительности этих микроорганизмов включает: макролиды (эритромицин) и линкосамиды (клиндамицин). С целью мониторинга антибиотико-резистентности возможно определение чувствительности к хлорамфениколу и левофлоксацину. Для бета-гемолитических стрептококков, выделенных из стерильных локусов, необходимо определять чувствительность ко всем вышеперечисленным препаратам одновременно.

Рекомендуемый перечень АБП рекомендуемых для определения чувствительности *S. pneumoniae*, стрептококков группы «viridans» и бета-гемолитических стрептококков приведен в приложении 18 к настоящей Инструкции по применению.

Критерии интерпретации результатов определения чувствительности *Streptococcus* spp. (кроме *S. pneumoniae*) (пограничные значения диаметров зон подавления роста и МПК АБП) приведены в приложении 19 к настоящей Инструкции по применению.

#### 24. Определение чувствительности *Haemophilus influenzae*.

Питательные среды. Для определения чувствительности *Haemophilus* spp. используют специальную питательную среду, содержащую необходимые для гемофилов факторы роста. Данную среду можно приготовить в лаборатории на основе среды Мюллера-Хинтона: среду готовят на основе бульона или агара Мюллера-Хинтон. После растворения основы в нее добавляют дрожжевой экстракт (до конечной концентрации 5 мг/мл) и раствор гематина (до конечной концентрации 15 мг/л). Для приготовления основного раствора гематина 50 мг порошка помещают в 100,0 мл 0,01N NaOH (0,01 моль/л) и нагревают при тщательном перемешивании до полного растворения. В подготовленную для автоклавирования среду на 1 л вносят 30,0 мл основного раствора гематина; после автоклавирования и охлаждения основы до 48 - 50°C в нее асептически вносят раствор никотинамид аденин динуклеотида (далее-НАД) до конечной концентрации 15 мг/л. Раствор НАД стерилизуют фильтрацией через мембранные фильтры с размером пор 0,45 мкм; при определении чувствительности к сульфаниламидам и тримето-

приму в охлажденную до 48-50°C среду асептически вносят также раствор тимидин фосфорилазы до конечной концентрации 0,2 единицы на миллилитр.

*Haemophilus spp.* характеризуются природной чувствительностью к большинству распространенных антибиотиков, в том числе, и к бета-лактамам. Практически важным исключением является отсутствие активности в отношении *Haemophilus spp.* у цефалоспоринов I поколения. Наибольшее значение имеет приобретенная резистентность к ампициллину, обусловленная продукцией плазмидных бета-лактамаз TEM-1 и ROB-1. Кроме ампициллина данные ферменты частично гидролизуют цефалоспорины I поколения, но не активны в отношении препаратов II-III поколений.

Известны штаммы *H. influenzae*, устойчивость которых к ампициллину связана с изменением мишени действия  $\beta$ -лактамных антибиотиков (пенициллинсвязывающих белков) или снижением проницаемости наружной клеточной стенки. Данные штаммы получили название бета-лактамазонегативные ампициллинорезистентные (далее-БЛНАР) и считаются нечувствительными к ингибиторозащищенным пенициллинам и таким цефалоспорином, как цефаклор, цефуроксим, цефиксим, цефтибутен.

До настоящего времени не получено клинических штаммов *H. influenzae*, устойчивых к цефалоспорином III - IV поколений и карбапенемам.

Для выявления ампициллинорезистентности у гемофильной палочки в рутинной лабораторной практике достаточно определения чувствительности к ампициллину ДДМ и теста на продукцию  $\beta$ -лактамаз с нитроцефином.

Данные два теста позволяют подразделить штаммы на ампициллиночувствительные,  $\beta$ -лактамазопродуцирующие ампициллинорезистентные (чувствительные к ингибиторозащищенным пенициллинам и цефалоспорином II - IV поколений) и БЛНАР, которые следует расценивать как резистентные к ингибиторозащищенным пенициллинам и некоторым цефалоспорином. При этом тестирование с диском, содержащим ингибиторозащищенные пенициллины, например, амоксициллин/клавуланат, не позволяет отличить БЛНАР от ампициллиночувствительных штаммов *H. influenzae*.

Макролидные антибиотики отличаются невысоким уровнем активности в отношении *Haemophilus spp.*, при этом между ними выявляются незначительные различия (наибольшая активность характерна для азитромицина). Низкий уровень активности макролидов связан с наличием у этого микроорганизма фоновой активности механизмов активного выведения. Подавляющее большинство штаммов *H. influenzae* с микробиологической точки зрения относятся к «дикий» популяции, лишенной дополнительных детерминант резистентности к данным АБП. Однако, *in vivo*, при приеме в рекомендуемых дозах концентрации макролидов в органах и тканях оказываются недостаточными для обеспечения эрадикации патогена. Учитывая приведенные факты, обоснованность критериев чувствительности *H. influenzae* к азитромицину и кларитромицину вызывает сомнения.

Устойчивость к фторхинолонам среди *H. influenzae* встречается редко, однако частота встречаемости штаммов с повышенными значениями МПК фторхинолонов возрастает, что обосновывает необходимость тестирования данных АБП. Наиболее вероятно, что между отдельными представителями данной группы существует перекрестная резистентность, характерная и для других грамотрица-

тельных бактерий.

Рекомендуемый перечень АБП для определения чувствительности *N. influenzae* представлен в приложении 20 к настоящей Инструкции по применению.

Критерии интерпретации результатов определения чувствительности *N. influenzae* (пограничные значения диаметров-зон подавления роста и МПК АБП) приведены в приложении 21 к настоящей Инструкции по применению.

#### 25. Определение чувствительности *Neisseria gonorrhoeae*.

Оценка антибиотикочувствительности *N.gonorrhoeae* представляет собой достаточно сложную методическую проблему. Методы определения чувствительности гонококков в бульоне недостаточно надежны, поэтому следует использовать только метод разведений в агаре или ДДМ.

Питательные среды. Для определения чувствительности *N.gonorrhoeae* используют гонококковый агар, состоящий из гонококковой агаровой основы и комплексной питательной добавки (далее - КПД) следующего состава:

Глюкоза	100 г
L-цистеингидрохлорид	25,9 г
L-глутамин	10 г
L-цистин	1,1 г
Аденин	1 г
Никотинамидадениндинуклеотид	0,25 г
Витамин В12	0,1 г
Тиамин пирифосфат	0,1 г
Гуанин гидрохлорид	0,03 г
Fe(NO <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> · 6H <sub>2</sub> O	0,02 г
Парааминобензойная кислота	0,013 г
Тиамин гидрохлорид	3 г

При тестировании карбапенемов и клавулановой кислоты необходимо использовать добавку, не содержащую цистеин.

Все ингредиенты растворяют в небольшом количестве дистиллированной воды и затем доводят объем до 1 л КПД, стерилизуют фильтрацией через бактериальный фильтр 0,02 мкм. КПД нельзя хранить и автоклавировать, необходимо использовать *ex tempore*. Полученную смесь асептически вносят в GC агар после автоклавирования и охлаждения до 48 - 50°C в количестве 1,0 % (объем/объем). Агар разливают в чашки Петри без добавления АБП для ДДМ и с добавлением АБП для метода разведения в агаре.

Средствами выбора для лечения гонореи являются бета-лактамы антибиотиков. Однако среди штаммов *N. gonorrhoeae* широко распространена резистентность к пенициллину, тетрациклам и макролидам. В ряде регионов Земного шара отмечают резкое возрастание частоты резистентности гонококков к фторированным хинолонам. Для практики крайне важно то, что до сих пор достоверно не описано случаев резистентности гонококков к цефалоспорином III поколения, что позволяет рассматривать цефалоспорины III поколения (цефотаксим и цефтриаксон) как препараты выбора для лечения гонореи.

Таким образом, на практике оценивать антибиотикочувствительность гонококков следует только в тех случаях, когда для лечения невозможно или неце-

лесообразно использовать цефалоспорины III поколения. Такие ситуации складываются при наличии у пациентов аллергии к бета-лактамам или при смешанных гонорейно-хламидийных инфекциях, а также для эпидемиологического мониторинга.

В набор для тестирования *N. gonorrhoeae* рекомендуется включать фторхинолоны (офлоксацин или ципрофлоксацин), тетрациклины, спектиномицин. Дополнительно для более полной характеристики штаммов и эпидемиологического мониторинга целесообразно изучать чувствительность к пенициллину и цефалоспорином II - III поколений. Критерии интерпретации результатов определения чувствительности *Neisseria gonorrhoeae* (пограничные значения диаметров зон подавления роста и МПК) приведены в приложении 22 к настоящей Инструкции по применению.

26. В последнее время для оценки антибиотикочувствительности микроорганизмов широкое распространение получили методы серийных разведений с различными способами детекции бактериального роста с применением автоматизированного и визуального учета.

26.1. Метод серийных разведений. Как правило, используют готовые коммерческие стерильные полистироловые планшеты, в лунки которых внесены лиофильно высушенные в бульоне убывающие концентрации антибиотиков. После вскрытия планшета согласно инструкции конкретного диагностикума стандартизованную суспензию испытуемой культуры в одинаковой дозе асептически вносят в соответствующие ряды лунок, закрывают крышкой и инкубируют при оптимальной температуре. После инкубирования отмечают рост (помутнение бульона) в тех лунках планшета, где антибиотик не действует. При наличии помутнения бульона в контроле культуры и опытных лунках определяют величину МИК.

26.2 Метод пограничных концентраций можно считать усеченным методом серийных разведений. Испытуемую культуру вносят только в две лунки (пробирки), где находится высокая (С) и низкая (с) концентрации антибиотика. Концентрация «С» соответствует границе между устойчивыми и умеренно-устойчивыми штаммами, а концентрация «с» - границе между умеренно-устойчивыми и чувствительными штаммами. Если после инкубации рост отсутствует в обеих лунках, штамм относят к чувствительным, если только в лунке с концентрацией «С» - к умеренно-устойчивым штаммам, а если в обеих лунках имеется рост, штамм относят к устойчивым. Результат этого исследования имеет полуколичественное выражение, однако методика отличается простотой и экономичностью.

Интерпретация результатов различных модификации метода разведений возможна визуальная и с помощью специальных микробиологических анализаторов. Автоматизированные микробиологические системы позволяют регистрировать рост, проводить ускоренную идентификацию и оценку антибиотикочувствительности микроорганизмов. Детекция и учет результатов базируется на колориметрии, спектрофотометрии, флуориметрии, т.е. определяется изменение показаний окислительно-восстановительного индикатора и оптической плотности бактериальной суспензии, свидетельствующие о росте.

Широкий выбор панелей для идентификации и лекарственной чувствительности, используемых автоматизированной системой для тестирования, позволяет выбрать подходящий набор антибактериальных препаратов, чувствительность к



которым может быть клинически значимой. Внедрение в практику таких систем позволило сократить время исследований и трудозатраты, стандартизировать методику.

## ГЛАВА 7

### АНАЛИЗ ВИДОВОГО СОСТАВА ЭТИОЛОГИЧЕСКИ ЗНАЧИМЫХ МИКРООРГАНИЗМОВ И ОЦЕНКА ИХ АНТИБИОТИКОРЕЗИСТЕНТНОСТИ

27. Эпидемиологический надзор за антимикробной резистентностью представляет собой систематический постоянный процесс сбора и анализа данных для количественной оценки распространенности антибиотико-резистентности и ее временной динамики.

Цель и задачи. Целью проведения эпидемиологического надзора за антимикробной резистентностью является получение информации, необходимой для разработки и внедрения более эффективных подходов к лечению инфекций, сдерживанию появления и распространения антимикробной резистентности. Рекомендации по организации наблюдения за антибиотико-резистентностью разработаны ВОЗ и Исследовательской группой Европейского общества микробиологии и инфекционных болезней.

#### 28. Общие принципы.

При эпидемиологическом надзоре за антибиотико-резистентностью микроорганизмов основное внимание следует уделять: инфекционным заболеваниям, встречающимся с высокой частотой, сопровождающимся высокой летальностью, а также тем нозологическим формам, при которых инфекция, вызванная резистентными штаммами возбудителя, приводит к достоверному снижению эффективности терапии; инфекционным заболеваниям, склонным к эпидемическому распространению, что может приводить к возникновению вспышек (шигеллез, сальмонеллез и др.); получению и анализу данных по заболеваемости и смертности, связанной с инфекциями, вызванными резистентными штаммами.

Полученные эпидемиологические данные по уровню и характеру резистентности должны использоваться для: оценки временных тенденций и прогнозирования вероятности возникновения и распространения антимикробной резистентности с учетом ее механизмов, путей распространения, видовой принадлежности резистентных микроорганизмов, вызываемых ими нозологических форм инфекционных заболеваний, факторов риска и характеристик пациентов, предрасполагающих к возникновению инфекций, последствий их для пациента и системы здравоохранения (неэффективность терапии, удлинение сроков госпитализации, повышение стоимости лечения); информирования Министерства здравоохранения Республики Беларусь, управлений (комитетов) и отделов здравоохранения местных исполнительных и распорядительных органов о сложившейся ситуации с целью разработки стратегии по сдерживанию распространения антибиотикорезистентности, проведения надлежащих мероприятий по борьбе с распространением резистентных микроорганизмов; внедрения в практику работы микробиологических лабораторий соответствующих процедур и методов для своевременного и достоверного выявления резистентных микроорганизмов; обновления руководств по эмпирической антибактериальной терапии инфекций, изменения формуляров антимикробных препаратов.

## 29. Виды эпидемиологического надзора.

Существуют два основных временных подхода к проведению эпидемиологического надзора за антибиотикорезистентностью: постоянный мониторинг данных по антибиотикорезистентности; специальные (эпизодические) эпидемиологические исследования антибиотикорезистентности, касающиеся какой-либо отдельной проблемы. Достаточно часто необходимость выполнения специальных исследований диктуется данными, выявленными при проведении постоянного мониторинга антимикробной резистентности.

Помимо этого, выделяют два типа эпидемиологического надзора по степени охвата: всеобъемлющий (полный) эпидемиологический надзор предусматривает исследование антибиотико-резистентности определенного микроорганизма или возбудителей определенного инфекционного заболевания во всей популяции (т. е. включает в себя сбор данных обо всех случаях инфекции во всей популяции). Учитывая, что проведение подобного надзора требует вовлечения большого числа организаций и специалистов различного профиля, обычно удается собрать только основную информацию об анализируемых случаях (например, демографические данные пациентов, сведения о локализации инфекции, виде клинического материала и фенотипе резистентности); сигнальный (неполный) эпидемиологический надзор подразумевает сбор данных на ограниченной территории или у определенной части популяции для получения данных, которые могут служить индикаторами состояния антибиотикорезистентности во всей популяции в целом. При этом обследуемая популяция должна быть репрезентативной для всей популяции. Данный тип эпидемиологического надзора является более предпочтительным при необходимости проведения длительного и детального сбора данных.

По методике выполнения эпидемиологический надзор может быть: пассивным, основанным на поступлении отчетов с мест (когда не предпринимается специальных усилий по получению данных из перво-источника); активным, при котором затрачиваются регулярные усилия для получения данных по антимикробной резистентности из первоисточника.

В зависимости от используемого подхода к сбору данных, эпидемиологический надзор также может быть: рутинным, включающим регулярное, систематическое получение определенного набора данных; расширенным, включающим получение дополнительных данных, в соответствии с заранее определенным планом.

Выбор вида эпидемиологического надзора определяется конкретными заранее установленными целями и задачами исследования.

Эпидемиологический надзор за возникновением и распространением антибиотикорезистентности не ограничивается только сферой медицинской практики. Подобные эпидемиологические исследования распространения антимикробной резистентности могут проводиться у бактерий, резистентность которых может представлять потенциальную угрозу для человека, выделенных из объектов окружающей среды, от сельскохозяйственных животных, из пищевых продуктов.

## 30. Выбор штаммов микроорганизмов для включения в исследование.

При проведении рутинного эпидемиологического надзора за антибиотикорезистентностью далеко не всегда представляется возможным и рациональным тестирование всех выделенных микроорганизмов. Вследствие этого, при

выборе микроорганизмов для включения в системы эпидемиологического надзора, могут быть использованы следующие подходы: определение чувствительности всех штаммов определенного вида микроорганизмов, выделенных из определенного клинического материала; исследование определенного вида клинического материала (например, полученного от пациентов с неэффективностью терапии).

Первый подход чаще используют для изучения динамики резистентности, уже распространённой в данной области или организации здравоохранения, а второй - для своевременного выявления возможного возникновения и распространения резистентности, представляющей потенциальную или теоретическую угрозу для данной области или организации здравоохранения. Рекомендуемый перечень микроорганизмов для включения в программу эпидемиологического надзора за антибиотикорезистентностью приведен согласно приложению 23 к настоящей Инструкции по применению.

### 31. Принципы проведения эффективного эпидемиологического надзора.

Для эффективного проведения эпидемиологического надзора на каждом уровне его проведения должен регистрироваться минимально необходимый объем информации. Мероприятия, разрабатываемые на основе полученных данных, должны соответствовать принципам доказательной медицины.

Эффективность эпидемиологического надзора за инфекциями, вызванными резистентными микроорганизмами, зависит от: получения качественных клинических образцов от пациентов с инфекциями; успешного выделения возбудителя инфекции; адекватного определения чувствительности к антимикробным препаратам; качественного сбора, объединения и анализа данных; своевременного использования полученной информации для внедрения практических мероприятий.

Таким образом, получение достоверных данных зависит от использования единых правил забора клинического материала, критериев и определений инфекционных заболеваний, стандартизации методов выделения, идентификации и определения чувствительности микроорганизмов, интерпретации полученных результатов, соответствия работы лабораторий единым стандартам качества выполнения исследований.

### 32. Клинический материал.

Забор и последующее исследование клинического материала для эпидемиологического надзора должно проводиться по единой методологии. Методики забора материала должны быть приемлемыми и выполнимыми для пациента и медицинского персонала, обладать малым риском получения ложноотрицательных и ложноположительных результатов.

В то же время необходимо учитывать, что исследования образцов, полученных из стерильных в норме источников (кровь, спинномозговая жидкость) имеют значительно более высокую ценность, чем, например, мазок с поверхности кожи.

Однако, для некоторых микроорганизмов (например, *S. pneumoniae* или *H. influenzae*) исследование чувствительности штаммов, колонизирующих носоглотку, коррелирует с резистентностью штаммов, вызывающих инфекции (острый средний отит, синусит).

Поэтому решение вопроса о возможности использования материалов сани-

тарной микробиологии (смывы с оборудования, поверхностей, анализ микробной обсемененности воздуха, воды и пр.), поверхностных культур, колонизирующих кожные покровы, слизистые оболочки, желудочно-кишечный тракт пациента (носительство), должно приниматься в зависимости от эпидемиологической ситуации, целей и задач проведения исследования, видов выделяемых микроорганизмов, нозологической структуры пациентов, определенных характеристик обследуемых лиц (пациенты с факторами риска, медицинский персонал), возможностей лаборатории.

### 33. Вид инфекции.

Инфекции часто классифицируют в зависимости от условий их возникновения: внебольничные или нозокомиальные (госпитальные). Это имеет существенное значение для проведения эпидемиологического надзора, т. к. спектр возбудителей и их резистентность к АБП существенно различаются.

### 34. Методы выделения и идентификации.

Для получения сравнимых данных о частоте выделения определенных микроорганизмов и об этиологической структуре определенных нозологических форм инфекционных заболеваний выделение и идентификация микроорганизмов должны проводиться в соответствии с техническими нормативными правовыми актами.

### 35. Методы определения чувствительности.

По возможности, предпочтение должно быть отдано количественным методам определения чувствительности, позволяющим получить значения МПК АБП в отношении исследуемого штамма микроорганизма. В случае использования ДДМ очень важным является регистрация не только качественных показателей (категорий чувствительности микроорганизма: чувствительный - Ч, штамм с промежуточной чувствительностью - П или резистентный - Р), но количественных показателей диаметров зон подавления роста.

Выбор набора АБП для тестирования также является очень важным и детально рассмотрен в соответствующих разделах. В большинстве случаев для проведения рутинного эпидемиологического надзора за антибиотикорезистентностью достаточно определения чувствительности к АБП, приведенным в списке препаратов первого ряда для тестирования различных видов микроорганизмов. Кроме того, при проведении эпидемиологического надзора за антибиотикорезистентностью большое значение имеет проведение лабораторией специальных тестов для выявления отдельных видов резистентности (например, детекция БЛРС, скрининг на агаре с оксациллином и солью для выявления метициллинрезистентных стафилококков).

При наличии практической необходимости и возможности, а также в целях научных исследований, набор АБП для проведения эпидемиологического надзора за антибиотикорезистентностью может быть увеличен, в том числе и за счет применения скрининга в бульоне или на чашках с агаром, содержащих определенные концентрации антибиотиков, рекомендуемые в качестве «пороговых» концентраций для выявления штаммов, подозрительных на наличие резистентности, при скрининговых эпидемиологических исследованиях.

Определение чувствительности микроорганизмов к АБП должно проводиться в соответствии с настоящими Методическими рекомендациями. При по-

лучении необычных фенотипов антибиотикорезистентности: умеренный или высокий уровень резистентности *S. aureus* к ванкомицину; резистентность *S. ruogenes* к пенициллину или другим  $\beta$ -лактамам; резистентность *S. maltophilia* к ко-тримоксазолу; резистентность *H. influenzae* к цефалоспорином III поколения; чувствительность *Klebsiella spp.*, *P. aeruginosa* к ампициллину тестирование необходимо повторить.

При подтверждении полученных результатов рекомендуется обращаться за консультациями в лаборатории, занимающиеся изучением антибиотикорезистентности.

Методы молекулярно-генетического выявления резистентности доказали свою эффективность в отношении некоторых возбудителей (например, определение тесА гена с помощью ПЦР у штаммов стафилококков). В будущем эти методы будут применяться более широко.

### 36. Методы оценки клонального родства штаммов.

В настоящее время известны два основных механизма распространения антибиотикорезистентности: распространение генетических детерминант резистентности с подвижными генетическими элементами и распространение клонов резистентных бактерий, а также их сочетания. Дифференцировка указанных механизмов имеет важное значение для планирования и проведения мероприятий по сдерживанию распространения резистентности.

Методы типирования, используемые для оценки родства микроорганизмов можно разделить на фенотипические (основанные на изучении антибиограмм, био-, серо- и фаготипировании, иммуноблотинге и электрофорезе белков) и генотипические (основанные на изучении плазмидного профиля, рестрикционном анализе плазмидной и хромосомной ДНК, риботипировании, электрофорезе макрорестриктов хромосомной ДНК в пульсирующем поле, амплификации нуклеиновых кислот, а так же на секвенировании отдельных фрагментов генома).

Приведенные методы различаются по таким характеристикам как воспроизводимость, разрешающая способность, трудоемкость проведения и особенности интерпретации результатов. Для двух из генотипических методов (электрофорез макрорестриктов хромосомной ДНК в пульсирующем поле и мультилокусное секвенирование) международными группами специалистов разработаны стандартные протоколы, что позволяет получать в различных лабораториях полностью сопоставимые данные и анализировать распространение резистентных клонов в различных географических регионах, а также в пределах всего Земного шара. Использование генотипических методов позволило выявить клоны некоторых резистентных микроорганизмов (метициллинрезистентных стафилококков, *S. pneumoniae*), распространение которых приняло глобальный характер.

### 37. Поддержание стандартов качества.

Для обеспечения достоверности результатов лаборатории, участвующие в программах по эпидемиологическому надзору за антимикробной резистентностью должны иметь адекватную систему внутреннего контроля качества своей работы.

### 38. Дополнительные сведения.

Для получения достоверной информации в процессе эпидемиологического надзора за антибиотикорезистентностью получаемые данные о чувствительности

выделенного штамма микроорганизма должны быть взаимосвязаны с определенным случаем заболевания у пациента (демографические данные, вид инфекции, наличие факторов риска, результат лечения).

Минимальный рекомендуемый набор данных для проведения эпидемиологического надзора за антибиотикорезистентностью должен включать: уникальный идентификационный код пациента (например, инициалы, номер истории болезни, и т. п.); дату рождения пациента; пол пациента; место жительства; тип организации здравоохранения; название отделения, клиники и пр.; тип отделения стационара (терапевтическое, хирургическое и пр.); дату поступления пациента; основные симптомы или особенности клинической картины заболевания; инфекционное заболевание, выявленное у пациента; дату возникновения симптомов инфекции или установления диагноза; характер инфекции (внебольничная или нозокомиальная); вид клинического материала; дату и время забора материала; данные о предшествующей антибиотикотерапии; данные об антимикробной терапии, проводимой в настоящее время; сведений об исходе заболевания.

На практике проведение эпидемиологического надзора за антибиотикорезистентностью обычно подразумевает использование микробиологических данных, получаемых на регулярной основе в рутинной практике, использование дополнительных сведений о пациенте, которые возможно собрать, с их последующей обработкой, анализом и представлением результатов анализа.

### 39. Анализ и представление данных по антибиотикорезистентности.

Для анализа больших объемов информации, собранной при проведении эпидемиологического мониторинга за антибиотикорезистентностью, рекомендуется использовать специальные компьютерные программы позволяющие создавать в микробиологических лабораториях базы данных, содержащие необходимую информацию, анализировать ее и представлять результаты эпидемиологического мониторинга. Дополнительным преимуществом большинства программ является наличие встроенной экспертной системы, сигнализирующей о выявлении необычных фенотипов резистентности.

Помимо перечисленной выше информации, для проведения анализа и расчета соответствующих эпидемиологических показателей могут потребоваться данные медицинской статистики.

Для больничных организаций здравоохранения: количество коек в целом и по различным отделениям стационара; число случаев госпитализации; среднее число дней госпитализации в целом и по различным отделениям стационара; количество микробиологических исследований в целом и по различным отделениям стационара.

Для организаций здравоохранения амбулаторно-поликлинического профиля: количество врачей, направляющих образцы для микробиологического исследования; численность обслуживаемого населения; среднее число посещений; количество микробиологических исследований.

Перечисленные статистические данные могут использоваться: в качестве контроля получаемых результатов эпидемиологического мониторинга (например, ожидаемое число штаммов микроорганизмов определенного вида, выделенных за определенный период времени); для стратификации результатов (например, сравнительные показатели частоты метициллинрезистентности в различных ста-

ционарах, в зависимости от количества коек или числа случаев госпитализации); в качестве знаменателя при расчете статистических показателей (например, частота внебольничной пневмонии, вызванной пенициллинорезистентным штаммом *S. pneumoniae*, на 100 случаев госпитализации, частота метициллинрезистентности на 1000 койко-дней); для экстраполяции результатов, полученных в определенной части популяции на всю популяцию в целом, используя республиканские или областные данные медицинской статистики (например, общую численность населения, численность по возрастам).

40. Процедуры для выявления и исключения из анализа повторных изолятов.

Для получения достоверных данных по антибиотикорезистентности в анализ следует включать только первый штамм микроорганизма одного вида, выделенный у пациента из определенного очага инфекции. Все идентичные первому штаммы микроорганизма, выделенные при последующих микробиологических исследованиях клинического материала, полученного из очага инфекции у пациента, должны быть исключены из анализа.

Для установления идентичности штаммов с целью выявления повторных изолятов используют несколько критериев: временной - в исследование включается только первый выделенный изолят данного вида микроорганизма, причем независимо оттого, отмечалось или нет развитие резистентности данного микроорганизма к какому-либо АБП во время лечения; фенотип чувствительности - при этом в анализ может быть включен повторный изолят данного вида микроорганизма, при условии доказанных значительных отличий в профиле его антибиотикочувствительности к какому-либо АБП, по сравнению с первым изолятом. Минимальные отличия в антибиотикочувствительности скорее всего являются проявлением фенотипической вариабельности экспрессии и определенного механизма резистентности, или следствием некоторых методических проблем при определении чувствительности, не могут служить основанием для включения повторного изолята в анализ.

Кроме этих предлагаются и другие критерии для выявления повторных изолятов, однако они не превосходят по точности, достоверности и удобству использования приведенные в настоящих Методических рекомендациях и не рекомендуются руководствами Всемирной организации здравоохранения (далее - ВОЗ), Европейского комитета по определению чувствительности к антибиотикам (далее - EUCAST) и Национального комитета по клиническим лабораторным стандартам США (далее - NCCLS).

41. Виды представления данных по антибиотикорезистентности:

41.1. данные по антибиотикорезистентности определенного микроорганизма или группы микроорганизмов к определенному АБП могут быть представлены в следующем виде.

Частотное распределение популяции микроорганизмов по степени чувствительности (по МПК или по диаметру зоны подавления роста), представленное в табличном или в графическом (в виде гистограммы) варианте. Этот вид представления данных является наиболее точным и показательным. На основании данных о степени чувствительности (распределении значений МПК) можно рассчитать кумулятивные показатели чувствительности популяции штаммов к опре-

деленному АБП: МПК<sub>50</sub> (МПК, подавляющей 50 % штаммов исследуемой популяции микроорганизмов, МПК<sub>90</sub> (МПК, подавляющей 90 % штаммов исследуемой популяции микроорганизмов) и диапазон значений МПК.

Частоты встречаемости резистентных (Р) штаммов, штаммов с промежуточной чувствительностью (П) и чувствительных (Ч) штаммов в исследуемой популяции микроорганизмов. Подобные качественные данные являются менее показательными, чем количественные показатели частотного распределения штаммов по степени чувствительности и не позволяют выявить ранние тенденции в возникновении и распространении антибиотикорезистентности.

Частоты встречаемости резистентных к определенному АБП микроорганизмов или определенных механизмов резистентности при определенных нозологических формах инфекций, в зависимости от возраста пациентов, пола пациентов, в определенной популяции пациентов, в течение определенного интервала времени;

41.2. результаты эпидемиологического надзора за антибиотикорезистентностью могут быть представлены в виде показателей различной степени сложности: простые- частота (%) резистентности к определенному АБП у микроорганизма данного вида, например, частота (%) выделения метициллинорезистентных *S. aureus* (далее-MRSA) среди всех исследованных штаммов *S. aureus*; средней степени сложности-частота (%) резистентности к определенному АБП у микроорганизма данного вида, выделенных из определенного клинического материала, например, частота (%) выделения ципрофлоксацин-резистентных штаммов *E. coli*, выделенных из мочи; сложные - частота (%) резистентности при инфекции определенного вида, например, частота (%) выделения ципрофлоксацинрезистентных штаммов *E. coli* при внебольничных инфекциях мочевыводящих путей; очень сложные - частота инфекций определенного вида, вызванных определенным резистентным микроорганизмом в указанном подразделении, например, частота случаев бактериемии, вызванных MRSA, и развившихся в отделении интенсивной терапии, на 1000 дней пребывания в стационаре.

По возможности, частоты резистентности должны быть представлены в виде числа случаев в определенной популяции в течение определённого промежутка времени.

42. Практические рекомендации по проведению анализа данных и представлению его результатов.

Если число штаммов одного вида менее 10, то суммарные данные по их чувствительности представлять не рекомендуется. Для представления подобных результатов для последующей разработки стандартов эмпирической терапии существует несколько подходов: объединение нескольких видов одного рода (например, представление данных по микроорганизмам всего рода *Shigella-Shigella spp.*); объединение данных по чувствительности за несколько предшествующих лет; объединение данных по чувствительности нескольких организаций здравоохранения, находящихся в данной области; использование ранее опубликованных данных.

43. Использование полученной информации.

Основной целью эпидемиологического надзора является предоставление информации в Министерство здравоохранения Республики Беларусь, управления



(комитеты) и отделы здравоохранения местных исполнительных и распорядительных органов для разработки надлежащих мероприятий по контролю и сдерживанию развития и распространения антибиотикорезистентности, оптимизации антибактериальной терапии инфекций определенной локализации у различных категорий пациентов. В зависимости от уровня проведения эпидемиологического надзора за антибиотикорезистентностью, его результаты могут быть представлены для внутренней информации врачам и администрации определенной организации здравоохранения, в виде информации для организаций здравоохранения всех уровней, публикации данных по антибиотикорезистентности на республиканском уровне, а также для интеграции их в Европейскую и Международную системы данных.

Приложение 1  
к Инструкции по применению «Методы определения чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препаратам»

Растворители и разбавители, используемые для приготовления основных растворов АБП

АБП	Растворитель	Разбавитель
1	2	3
Ампициллин	Фосфатный буфер 0,1 моль/л рН 8,0	Фосфатный буфер 0,1 моль/л рН 6,0
Амоксициллин	Фосфатный буфер 0,1 моль/л рН 6,0	Фосфатный буфер 0,1 моль/л рН 6,0
Азитромицин	95 %-ный этанол или ледяная уксусная кислота	Питательная среда
Азтреонам	Натрия бикарбонат насыщенный раствор	Вода
Цефазолин	Фосфатный буфер 0,1 моль/л рН 6,0	Фосфатный буфер 0,1 моль/л рН 6,0
Цефалотин	Фосфатный буфер 0,1 моль/л рН 6,0	Вода
Цефуроксим	Фосфатный буфер 0,1 моль/л рН 6,0	Вода
Цефтазидим	Натрия карбонат	Вода
Цефепим	Фосфатный буфер 0,1 моль/л рН 6,0	Фосфатный буфер 0,1 моль/л рН 6,0
Имипенем	Фосфатный буфер 0,01 моль/л рН 7,2	Фосфатный буфер 0,01 моль/л рН 7,2
Азитромицин	95 %-ный этанол или ледяная уксусная кислота	Питательная среда
Эритромицин	95 %-ный этанол или ледяная уксусная кислота	Вода
Клоритромицин	95 %-ный этанол или ледяная уксусная кислота	Фосфатный буфер 0,1 моль/л рН 6,5
Хлорамфеникол	95 %-ный этанол	Вода

1	2	3
Налидиксовая кислота, эноксацин, норфлоксацин, офлоксацин, левофлоксацин	1/2 объема воды, затем добавлять по каплям 0,1 моль/л раствор NaOH до растворения	Вода
Нитрофурантоин	Фосфатный буфер 0,1 моль/л рН 8,0	Фосфатный буфер 0,1 моль/л рН 8,0
Рифампин	Метанол	Вода
Сульфаниламиды	1/2 объема горячей воды и минимальное количество 2,5 моль/л раствора NaOH	Вода
Триметоприм	0,05 N раствор соляной кислоты до 10 % от конечного объема	Вода

Приложение 2  
к Инструкции по применению  
«Методы определения чув-  
ствительности микрооргани-  
змов к антибактериальным  
препаратам»

Допустимые диапазоны значений МПК (мг/л) контрольных штаммов  
микроорганизмов с обычными питательными потребностями

АБП	S. aureus ATCC 29213	E. faecalis ATCC 29212	E. coli ATCC 25922 E. coli ATCC 35218*	P. aeruginosa ATCC 27853
1	2	3	4	5
Бензилпенициллин	0,25-2	1-4	-	-
Ампициллин	0,5-2	0,5-2	2-8	-
Ампициллин/суль- бактам	-	-	2/1-8/4 8/4-32/16*	-
Амоксицил- лин/клавуланат	0,12/0,06- 0,5/0,25	0,25/0,12- 1,0/0,5	2/1-8/4 4/2-16/8*	-
Оксациллин	0,12-0,5	8-32	-	-
Тикарциллин/кла- вуланат	0,5/2-2/2	16/2-64/2	4/2-16/2 8/2-32/2*	8/2-32/2
Цефазолин	0,25-1	-	1-4	-
Дефалотин	0,12-0,5	-	4-16	-
Цефаклор	1-4	-	1-4	-
Цефамандол	0,25-1	-	0,25-1	-
Цефуроксим	0,5-2	-	2-8	-
Цефокситин	1-4	-	2-8	-
Цефиксим	8-32	-	0,25-1	-
Цефподоксим	1-8	-	0,25-1	-
Цефтибутен	-	-	0,12-0,5	-
Цефоперазон	1-4	-	0,12-0,5	2-8
Цефотаксим	1-4	-	0,03-0,12	8-32
Цефтазидим	4-16	-	0,06-0,5	1-4
Цефтриаксон	1-8	-	0,03-0,12	8-64
Цефепим	1-4	-	0,016-0,12	1-8
Азтреонам	-	-	0,06-0,25	2-8
Имипенем	0,016-0,06	0,5-2	0,06-0,25	1-4

Меропенем	0,03-0,125	2-8	0,008-0,06	0,25-1
Эртапенем	0,06-0,25	4-16	0,004-0,016	2-8
Налидиксовая кислота	-	-	1-4	-
Норфлоксацин	0,5-2	2-8	0,03-0,12	1-4
Ципрофлоксацин	0,12-0,5	0,25-2	0,004-0,016	0,25-1
Офлоксацин	0,12-1	1-4	0,015-0,12	1-8
Ломефлоксацин	0,25-2	2-8	0,03-0,12	1-4
Левифлоксацин	0,06-0,5	0,25-2	0,008-0,06	0,5-4
Спарфлоксацин	0,03-0,12	0,12-0,5	0,004-0,16	0,5-2
Моксифлоксацин	0,016-0,12	0,06-0,5	0,008-0,06	1-8
Гатифлоксацин	0,003-0,12	0,12-1	0,008-0,03	0,5-2
Гемифлоксацин	0,008-0,03	0,016-0,12	0,004-0,016	0,25-1
Амикацин	1-4	64-256	0,5-4	1-4
Гентамицин	0,12-1	4-16	0,25-1	0,5-2
Нетилмицин	< 0,25	4-16	< 0,5-1	0,5-8
Тобрамицин	0,12-1	8-32	0,25-1	0,25- 1
Канамицин	1-4	16-64	1-4	-
Эритромицин	0,25-1	1-4	-	-
Азитромицин	0,5-2	-	-	-
Кларитромицин	0,12-0,5	-	-	-
Клиндамицин	0,06-0,25	4-16	-	-
Телитромицин	0,06-0,25	0,016-0,12	-	-
Хлорамфеникол	2-8	4-16	2-8	-
Тетрациклин	0,121	8-32	0,5-2	8-32
Доксициклин	-	-	0,5-2	-
Рифампицинн	0,004-0,016	0,5-4	4-16	16-64
Нитрофурантоин	8-32	4-16	416	-
Ко-тримоксазол (1/19)	< 0,5/94	< 0,5/9,5	< 0,5/9,5	8/152-32/608
Ванкомицин	0,5-2	1-4	-	-
Линезолид	1-4	1-4	-	-
Фосфомицин**	0,5-4	32-128	0,5-2	2-8

\* Данные приведены для методов серийных микроразведений в бульоне.

\*\* При оценке чувствительности к фосфомицину необходимо использовать метод серийных разведений в агаре, в среду необходимо добавлять глюкозо-6-фосфат до концентрации 25 мкг/мл.

Приложение 3  
к Инструкции по применению  
«Методы определения чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препаратам»

Допустимые диапазоны значений диаметров зон подавления роста (мм)  
контрольных штаммов микроорганизмов с обычными питательными  
потребностями

АБП	Содержание в диске, мкг	E. coli ATCC 25922; E. coli ATCC 35218*	S. aureus ATCC 25923	P. aeruginosa ATCC 27853
1	2	3	4	5
Бензилпенициллин	6 (10ЕД)	-	26-37	-
Ампициллин	10	16-22	27-35	-
Ампициллин/сульбактам	10/10	19-24 13-19*	29-37	-
Амоксицил-лин/клавуланат	20/10	18-24 17-22*	28-36	-
Оксациллин	1	-	18-24	-
Тикарциллин/клавуланат	75/10	24-30 21-25*	29-37	20-28
Цефазолин	30	21-27	29-35	-
Цефалотин	30	15-21	29-37	-
Цефаклор	30	23-27	27-31	-
Цефамандол	30	26-32	26-34	-
Цефуроксим	30	20-26	27-35	-
Цефокситин	30	23-29	23-29	-
Цефиксим	5	23-27	-	-
Цефподоксим	10	23-28	19-25	-
Цефтибутен	30	27-35	-	-
Цефоперазон	75	28-34	24-33	23-29
Цефотаксим	30	29-35	25-31	18-22
Цефтазидим	30	25-32	16-20	22-29
Цефтриаксон	30	29-35	22-28	17-23
Цефепим	30	31-37	23-29	24-30
Азтреонам	30	28-36	-	23-29
1	2	3	4	5

Имипенем	10	26-32	-	20-28
Меропенем	10	28-34	29-37	27-33
Эртапенем	10	29-36	24-31	13-21
Налидиксовая к-та	30	22-28	-	-
Норфлоксацин	10	28-35	17-28	22-29
Ципрофлоксацин	5	30-40	22-30	25-33
Офлоксацин	5	29-33	24-28	17-21
Ломефлоксацин	10	27-33	23-29	22-28
Левифлоксацин	5	29-37	25-30	19-26
Спарфлоксацин	5	30-38	27-33	21-29
Моксифлоксацин	5	28-35	28-35	17-25
Гатифлоксацин	5	30-37	27-33	20-28
Гемифлоксацин	5	29-36	27-33	19-25
Амикацин	30	19-26	20-26	18-26
Гентамицин	10	19-26	19-27	16-21
Нетилмицин	30	22-30	22-31	17-23
Тобрамицин	10	18-26	19-29	19-25
Канамицин	30	17-25	19-26	-
Эритромицин	15	-	22-30	-
Азитромицин	15	-	21-26	-
Кларитромицин	15	-	26-32	-
Клиндамицин	2	-	24-30	-
Телитромицин	15	-	24-30	-
Хлорамфеникол	30	21-27	19-26	-
Тетрациклин	30	18-25	24-30	-
Доксициклин	30	18-24	23-29	-
Рифампицин	5	8-10	26-34	-
Нитрофурантоин	300	20-25	18-22	-
Котримоксазол (1/19)	1,25/23,75	23-29	24-32	-
Ванкомицин	30	-	17-21	-
Линезолид	30	-	25-32	-
Фосфомицин**	200	22-30	25-33	-

\* Данные приведены для методов серийных микроразведений в бульоне.

\*\* При оценке чувствительности к фосфомицину в питательную среду необходимо добавлять глюкозо-6-фосфат до концентрации 25 мкг/мл.

Приложение 4  
к Инструкции по применению  
«Методы определения чув-  
ствительности микрооргани-  
змов к антибактериальным  
препаратам»

Допустимые диапазоны значений МПК (мг/л) контрольных штаммов  
микроорганизмов со сложными питательными потребностями

АБП	<i>S. pneumoniae</i> * АТСС 49619	<i>H. influenzae</i> * АТСС 49247 (АТСС49766) 49766)	<i>N. gonorrhoeae</i> ** АТСС 49226
1	2	3	4
Бензилпенициллин	0,25-1	-	0,25-1
Ампициллин	0,06-0,25	2-8	-
Ампициллин/ сульбактам	-	2/1-8/48	-
Амоксициллин	0,03-0,12	-	-
Амоксициллин/ кла- вуланат	0,03/0,016- 0,12/0,06	2/1-16/8	-
Цефаклор	1-4		-
Цефуроксим	0,25-1	(0,25-1)	0,25-1
Цефотаксим	0,003-0,012	0,12—0,5	0,015-0,06
Цефтазидим	-	0,12-1	0,03-0,12
Цефтриаксон	0,03-0,12	0,06-0,25	0,004-0,016
Цефепим	0,03-0,25	0,5-2	0,016-0,06
Имипенем	0,03-0,12	(0,25-1)	-
Меропенем	0,06-0,25	(0,03-0,12)	-
Эртапенем	0,03-0,25	(0,016-0,06)	-
Эритромицин	0,03-0,12	-	-
Азитромицин	0,06-0,25	1-4	-
Кларитромицин	0,03-0,12	4-16	-
Клиндамицин	0,03-0,12	-	-
Телитромицин	0,004-0,03	1-4	-



1	2	3	4
Норфлоксацин	2-8	-	-
Ципрофлоксацин	-	0,004-0,03	0,001-0,008
Офлоксацин	1-4	0,016-0,06	0,004-0,016
Ломефлоксацин	-	0,03-0,12	0,008-0,03
Левифлоксацин	0,5-2	0,008-0,03	-
Спарфлоксацин	0,12-0,5	0,004-0,016	0,004-0,016
Моксифлоксацин	0,06-0,25	0,008-0,03	-
Гатифлоксалин	0,12-0,5	0,004-0,03	0,002-0,016
Хлорамфеникол	2-8	0,25-1	-
Рифампин	0,015-0,06	0,25-1	-
Тетрациклин	0,12-0,5	4-32	0,25-1
Котримоксазол	0,12/2,4-1/19	0,03/0,59- 0,25/4,75	-
Ванкомицин	0,12-0,5	-	-
Линезолид	0,5-2	-	-

\* Для *S. pneumoniae*, *H. influenzae* результаты приведены для метода серийных микро-разведений в бульоне.

\*\* Для *N. gonorrhoeae* результаты приведены для метода серийных разведений в агаре.

Приложение 5  
к Инструкции по применению  
«Методы определения чув-  
ствительности микрооргани-  
змов к антибактериальным  
препаратам»

Допустимые диапазоны значений диаметров зон подавления роста (мм)  
контрольных штаммов микроорганизмов со сложными питательными  
потребностями

АБП	Содержа- ние в дис- ке, мкг	<i>S. pneumoniae</i> ATCC 49619	<i>H. influenzae</i> ATCC 49247 (ATCC 49766)	<i>N. gonorrhoeae</i> ATCC 49226
1	2	3	4	5
Бензилпенициллин	10 ЕД	24-30	-	26-34
Ампициллин	10	30-36	13-21	-
Амоксидиллин/кла- вуланат	20/10	-	15-23	-
Ампициллин/суль- бактам	10/10	-	14-22	-
Оксациллин	1	≤12	-	-
Цефаклор	30	24-32	(25-31)	-
Цефуросим	30		(28-36)	
Цефотаксим	30	31-39	31-39	38-48
Цефтазидим	30	-	27-35	35-43
Цефтриаксон	30	30-35	31-39	39-51
Цефепим	30	28-35	25-31	37-46
Имипенем	10	-	21-29	-
Меропенем	10	28-35	20-28	-
Эртапенем	10	28-35	20-28	27-33
Эритромицин	15	25-30	-	-
Азитромицин	15	19-25	13-21	-
Кларитромицин	15	25-31	11-17	-
Клиндамицин	2	19-25	-	-
Телитромицин	15	27-33	17-23	-

1	2	3	4	5
Норфлоксацин	10	15-21	-	-
Ципрофлоксацин	5	-	34-42	48-58
Офлоксацин	5	16-21	31-40	43-51
Ломефлоксацин	10	-	33-41	45-54
Левифлоксацин	5	20-25	32-40	-
Спарфлоксацин	5	21-27	32-40	43-51
Моксифлоксацин	5	25-31	31-39	-
Гатифлоксацин	5	24-31	33-41	45-56
Хлорамфеникол	30	23-27	31-40	-
Рифампин	5	25-30	22-30	-
Тетрациклин	30	27-31	14-22	30-42
Нитрофурантоин	300	23-29	-	-
Ко-тримоксазол	1,25/23,75	20-28	24-32	-
Ванкомицин	30	20-27	-	-
Линезолид	30	25-34	-	-

Приложение 6  
к Инструкции по применению  
«Методы определения чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препаратам»

Критерии интерпретации результатов определения чувствительности  
Микроорганизмов семейства Enterobacteriaceae: пограничные значения  
диаметров зон подавления роста (мм) и МПК (мг/л) АБП

АБП	Содержание в диске, мкг	Диаметр зон подавления роста (мм)			МПК (мг/л)		
		Р	П	Ч	Р	П	Ч
1	2	3	4	5	6	7	8
<b>Бета-лактамы</b>							
Ампициллин	10	13	14-16	≥17	≥32	16	≤8
Ампициллин/сульбактам	10/10	≤11	12-14	≥15	≥32/16	16/8	≤ 8/4
Амоксициллин/клавуланат	20/10	≤13	14-17	≥18	≥32/16	16/8	≤ 8/4
Тикарциллин/клавуланат	75/10	≤ 14	15-19	≥20	≥ 128/2	32/2-64/2	≤16/2
Цефалотин	30	≤14	15-17	≥18	≥32	16	≤8
Цефазолин	30	≤14	15-17	≥18	≥32	16	≤8
Цефаклор	30	≤ 14	15-17	≥18	≥32	16	≤8
Цефамандол	30	≤14	15-17	≥18	≥32	16	≤8
Цефуроксим Na	30	≤14	15-17	≥18	≥32	16	≤8
Цефуроксим аксетил	30	≤14	15-22	≥23	≥32	8-16	≤4
Цефокситин	30	≤ 14	15-17	≥18	≥32	16	≤8
Цефотетан	30	≤12	13-15	≥16	≥64	32	≤16
Цефметазол	30	≤12	13-15	≥16	≥64	32	≤ 16
Цефоперазон	75	≤ 15	16-20	≥21	≥64	32	≤16
Цефотаксим	30	≤14	15-22	≥23	≥64	16-32	≤8
Цефтриаксон	30	≤13	14-20	≥21	≥64	16-32	≤8
Цефтазидим	30	≤14	15-17	≥18	≥32	16	≤8
Цефиксим	5	≤15	16-18	≥19	≥4	2	≤1
Цефподоксим	10	≤ 17	18-20	≥21	≥8	4	≤2
Цефтибутен	30	≤17	18-20	≥21	≥32	16	≤8

1	2	3	4	5	6	7	8
Цефепим	30	≤14	15-17	≥18	≥32	16	≤8
Азтреонам	30	≤15	16-21	≥22	≥32	16	≤8
Имипенем	10	≤13	14-15	≥16	≥16	8	≤4
Меропенем	10	≤13	14-15	≥16	≥16	8	≤4
Эртапенем	10	≤15	16-18	≥19	≥8	4	≤2
Аминогликозиды							
Канамицин	30	≤13	14-17	≥18	≥64	32	≤16
Гентамицин	10	≤12	13-14	≥15	≥16	8	≤4
Тобрамицин	10	≤12	13-14	≥15	≥16	8	≤4
Нетилмицин	30	≤12	13-14	≥15	≥32	16	≤8
Амикацин	30	≤14	15-16	≥17	≥64	32	≤16
Хинолоны							
Налидиксовая кислота	30	≤13	14-18	≥19	≥32	-	≤16
Норфлоксацин	10	≤12	13-16	≥17	≥16	8	≤4
Пефлоксацин	5	≤15	16-21	≥22	≥8	4	≤1
Офлоксацин	5	≤12	13-15	≥16	≥8	4	≤2
Ципрофлоксацин	5	≤15	16-20	≥21	≥4	2	≤1
Ломефлоксацин	10	≤18	19-21	≥22	≥8	4	≤2
Левофлоксацин	5	≤13	14-16	≥17	≥8	4	≤2
Гатифлоксацин	5	≤14	15-17	≥18	≥8	4	≤2
Тетрациклины							
Тетрациклин	30	≤14	15-18	≥19	≥16	8	≤4
Доксициклин	30	≤12	13-15	≥16	≥16	8	≤4
Другие препараты							
Хлорамфеникол	30	≤12	13-17	≥18	≥32	16	≤8
Котримоксазол	1,25/23,75	≤10	11-15	≥16	≥4/76	-	≤2/38
Нитрофурантоин	300	≤14	15-16	≥17	≥128	64	≤32
Фосфомицин*	200	≤12	13-15	≥16	≥256	128	≤64

\* Для определения МПК фосфомицина необходимо использовать метод серийных разведений в агаре, при определении чувствительности к этому антибиотику как методом серийных разведений в агаре, так и ДДМ, в питательную среду необходимо вносить 25 мг/л глюкозо-6-фосфата.

Приложение 7  
к Инструкции по применению  
«Методы определения чув-  
ствительности микроorganiz-  
мов к антибактериальным  
препаратам»

Рекомендуемый перечень АБП для определения чувствительности  
микроорганизмов семейства Enterobacteriaceae, выделенных  
при внекишечных инфекциях

Препараты первого ряда	Дополнительные препараты
Ампициллин Ингибиторозащищенный пени- циллин (ампициллин/сульбактам или амоксициллин/клавуланат) Цефалоспорин III поколения (це- фотаксим или цефтриаксон) Цефтазидим Гентамицин Фторхинолон	Карбапенем (имипенем или меро- пенем) Цефепим Цефоперазон/сульбактам Тикарциллин/клавуланат Второй цефалоспорин III поколе- ния (цефтриаксон или цефотаксим) Цефкситин Амикацин Цефуроксим Оральные цефалоспорины II- III поколений

Приложение 8  
к Инструкции по применению  
«Методы определения чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препаратам»

Рекомендуемый перечень АБП для определения чувствительности микроорганизмов семейства Enterobacteriaceae, выделенных при кишечных инфекциях

Препараты первого ряда	Дополнительные препараты
Ампициллин Ко-тримоксазол Норфлоксацин или ципрофлоксацин или офлоксацин	Цефотаксим или цефтриаксон Хлорамфеникол Тетрациклин или доксициклин

Приложение 9  
к Инструкции по применению  
«Методы определения чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препаратам»

Рекомендуемый перечень АБП для определения чувствительности микроорганизмов семейства Enterobacteriaceae, выделенных при внебольничных ИМП

Препараты первого ряда	Дополнительные препараты
Ампициллин Амоксициллин/клавуланат Ко-тримоксазол Норфлоксацин Ципрофлоксацин или офлоксацин	Фосфомицин Нитрофурантоин Цефуроксим Цефотаксим или цефтриаксон Гентамицин Амикацин

Приложение 10  
к Инструкции по применению  
«Методы определения чув-  
ствительности микроorganiz-  
мов к антибактериальным  
препаратам»

Критерии выявления штаммов *Klebsiella* spp. и *E. coli*, предположительно  
продуцирующих БЛРС

АБП	Диаметр зоны подавления роста, мм	МПК, мг/л
Цефподоксим	$\leq 17$	$\geq 8,0$
Цефтазидим	$\leq 22$	$\geq 2,0$
Азтреонам	$\leq 27$	$\geq 2,0$
Цефотаксим	$\leq 27$	$\geq 2,0$
Цефтриаксон	$\leq 25$	$\geq 2,0$

Приложение 11  
к Инструкции по применению  
«Методы определения чув-  
ствительности микроorganiz-  
мов к антибактериальным  
препаратам»

Рекомендуемый перечень АБП для определения чувствительности  
*P. aeruginosa*, *Pseudomonas* spp., *Acinetobacter* spp. и других НФБ

Препараты первого ряда	Дополнительные препараты
Цефтазидим Цефепим Имипенем или меропенем Гентамицин Амикацин Ципрофлоксацин	Цефоперазон Азтреонам Цефоперазон/сульбактам Ампициллин/сульбактам (для <i>Acinetobacter</i> spp.) Тобрамицин Тикарциллин/клавуланат (для <i>S. maltophilia</i> ) Триметоприм/сульфаметоксазол (для <i>S. maltophilia</i> )



Приложение 12  
к Инструкции по применению «Методы определения чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препаратам»

Критерии интерпретации результатов определения чувствительности *P. aeruginosa*, *Pseudomonas* spp., *Acinetobacter* spp., и других НФБ\*: пограничные значения диаметров зон подавления роста (мм) и МПК (мг/л) АБП

АБП	Содержание в диске, мкг	Диаметр зон подавления роста (мм)			МПК (мг/л)		
		Р	П	Ч	Р	П	Ч
1	2	3	4	5	6	7	8
<b>Бета-лактамы</b>							
Ампициллин/сульбактам	10/10	≤11	12-14	≥15	≥32/16	16/8	≤8/4
Тикарциллин/клавуланат**							
<i>P. aeruginosa</i>	75/10	≤14	-	≥15	≥128/2	-	≤64/2
<i>Acinetobacter</i> spp.	75/10	≤14	15-19	≥20	-	-	-
Цефоперазон	75	≤15	16-20	≥21	≥64	32	≤16
Цефотаксим	30	≤14	15-22	≥23	≥64	16-32	≤8
Цефтриаксон	30	≤13	14-20	≥21	≥64	16-32	≤8
Цефтазидим	30	≤14	15-17	≥18	≥32	16	≤8
Цефепим	30	≤14	15-17	≥18	≥32	16	≤8
Азтреонам	30	≤15	16-21	≥22	≥32	16	≤8
Имипенем	10	≤13	14-15	≥16	≥16	8	≤4
Меропенем	10	≤13	14-15	≥16	≥16	8	≤4
<b>Аминогликозиды</b>							
Гентамицин	10	≤12	13-14	≥15	≥16	8	≤4
Тобрамицин	10	≤12	13-14	≥15	≥16	8	≤4
Нетилмицин	30	≤12	13-14	≥15	≥32	16	≤8
Амикацин	30	≤14	15-16	≥17	≥64	32	≤16

1	2	3	4	5	6	7	8
<b>Хинолоны</b>							
Норфлоксацин	10	≤12	13-16	≥17	≥16	8	≤4
Пефлоксацин	5	≤12	13-16	≥17	≥8	4	≤2
Офлоксацин	5	≤12	13-15	≥16	≥8	4	≤2
Ципрофлоксацин	5	≤15	16-20	≥21	≥4	2	≤1
Левифлоксацин	5	≤13	14-16	≥17	≥8	4	≤2
Ломефлоксацин	10	≤18	19-21	≥22	≥8	4	≤2
<b>Другие препараты</b>							
Хлорамфеникол	30	≤12	13-17	≥18	≥32	16	≤8
Котримоксазол	1,25/23,75	≤10	11-15	≥16	≥4/76	-	≤2/38
Тетрациклин	30	≤14	15-18	≥19	≥16	8	≤4
Доксициклин	30	≤12	13-15	≥16	≥16	8	≤4

\* ДДМ стандартизирован только для *P.aeruginosa* и *Acinetobacter* spp. При определении чувствительности других НФБ необходимо использовать методы серийных разведений.

\*\* Метод серийных разведений не стандартизован для определения чувствительности *Acinetobacter* spp. к тикарцилину/клавуланату.

Приложение 13  
к Инструкции по применению  
«Методы определения чув-  
ствительности микроorganiz-  
мов к антибактериальным  
препаратам»

Рекомендуемый перечень АБП для определения чувствительности  
*Staphylococcus spp.*

Препараты первого ряда	Дополнительные препараты*
Бензилпенициллин или тест с нитроцефином для выявления бета-лактамаз Оксациллин Эритромицин Линкомицин или клин- дамицин Ципрофлоксацин или ле- вофлоксацин Гентамицин Ванкомицин	Тетрациклин или доксициклин Рифампицин Фузидин Триметоприм/сульфаметоксазол Хлорамфеникол Линезолид Нитрофураны**

\* Рекомендуется тестировать при высокой частоте метициллинрезистентности в организации здравоохранения, или при выявлении резистентности к препаратам первого ряда.

\*\* Рекомендуется тестировать при инфекциях мочевыводящих путей.

Приложение 14  
к Инструкции по применению  
«Методы определения чув-  
ствительности микрооргани-  
змов к антибактериальным  
препаратам»

Критерии интерпретации результатов определения чувствительности  
*Staphylococcus spp.*: пограничные значения диаметров  
зон подавления роста (мм) и МПК (мг/л) АБП

АБП	Со- держа- ние в диске, мкг	Диаметр зон подавле- ния роста (мм)			МПК (мг/л)		
		Р	П	Ч	Р	П	Ч
1	2	3	4	5	6	7	8
<b>Бета-лактамы*</b>							
Бензилпенициллин	10 ЕД	≤ 28	-	≥ 29	≥ 0,25	-	≤ 0,12
Оксациллин** <i>S.aureus</i> Коагулазонегативные стафилококки	1	≤ 10	11-12	≥ 13	≥ 4	-	< 2
	1	≤ 17	-	≥ 18	≥ 0,5	-	≤ 0,25
<b>Аминогликозиды</b>							
Канамицин	30	≤ 13	14-17	≥ 18	≥ 64	32	≤ 16
Гентамицин	10	≤ 12	13-14	≥ 15	≥ 16	8	≤ 4
Тобрамицин	10	≤ 12	13-14	≥ 15	≥ 16	8	≤ 4
Нетилмицин	30	≤ 12	13-14	≥ 15	≥ 32	16	≤ 8
Амикацин	30	≤ 14	15-16	≥ 17	≥ 64	32	≤ 16
<b>Хинолоны</b>							
Норфлоксацин	10	≤ 12	13-16	≥ 17	≥ 16	8	≤ 4
Эноксацин	10	≤ 14	15-17	≥ 18	≥ 8	4	≤ 2
Пефлоксацин	5	≤ 15	16-21	≥ 22	≥ 8	4	≤ 1
Офлоксацин	5	≤ 12	13-15	≥ 16	≥ 8	4	≤ 2
Ципрофлоксацин	5	≤ 15	16-20	≥ 21	≥ 4	2	≤ 1
Ломефлоксацин	10	≤ 18	19-21	≥ 22	≥ 8	4	≤ 2
Левовфлоксацин	5	≤ 13	14-16	≥ 17	≥ 8	4	≤ 2

1	2	3	4	5	6	7	8
Спарфлоксацин	5	≤15	16-18	≥19	≥ 2	1	≤ 0,5
Гатифлоксацин	5	≤14	15-17	≥18	≥ 8	4	≤ 2
Тетрациклины							
Тетрациклин	30	≤14	15-18	≥19	≥ 16	8	≤ 4
Доксициклин	30	≤12	13-15	≥16	≥ 16	8	≤ 4
Миноциклин	30	≤14	15-18	≥19	≥ 16	8	≤ 4
Макролиды							
Эритромицин	15	≤13	14-22	≥23	≥ 8	1-4	≤ 0,5
Кларитромицин	15	≤ 13	14-17	≥ 18	≥ 8	4	≤ 2
Азитромицин	15	≤13	14-17	≥18	≥ 8	4	≤ 2
Линкозамиды							
Линкомицин	15	≤17	17-20	≥21	≥ 8	4-8	≤ 2
Клиндамицин	2	≤14	15-20	≥21	≥ 4	1-2	≤ 0,5
Гликопептиды							
Ванкомицин	30	-	-	≥15	≥ 32	8-16	≤4
Другие препараты							
Хлорамфеникол	30	≤12	13-17	≥18	≥ 32	16	≤ 8
Котримоксазол	1,25/ 23,75	≤10	11-15	≥16	≥ 4/76	-	≤ 2/38
Нитрофурантоин	300	≤14	15-16	≥17	≥ 128	64	≤ 32
Рифампицин	5	≤16	17-19	≥20	≥ 4	2	≤ 1
Фузидин	10	≤15	15-21	≥22	≥ 32	4-6	<2
Линезолид	30	-	-	≥21	-	-	≤ 4

\* В практических лабораториях оценивать чувствительность *Staphylococcus spp.* к бета-лактамам кроме бензилпенициллина и оксациллина нецелесообразно.

\*\* Штаммы, устойчивые к оксациллину должны однозначно рассматриваться как устойчивые ко всем доступным бета-лактамам.

Приложение 15  
к Инструкции по применению  
«Методы определения чув-  
ствительности микроorganiz-  
мов к антибактериальным  
препаратам»

Рекомендуемый перечень АБП для определения чувствительности  
Enterococcus spp.

Enterococcus spp., выделенные при тяжелых и генера- лизованных инфекциях	Enterococcus spp., выделенные при ИМП
Пенициллин или ампициллин Стрептомицин (выявление высоко- го уровня резистентности) Гентамицин (выявление высокого уровня резистентности) Ванкомицин Линезолид	Пенициллин или ампициллин Ципрофлоксацин Норфлоксацин Нитрофурантоин Фосфомицин

Приложение 16  
к Инструкции по применению «Методы определения чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препаратам»

Критерии интерпретации результатов определения чувствительности *Enterococcus* spp.: пограничные значения диаметров зон подавления роста (мм) и МПК (мг/л) АБП

АБП	Содержание в диске, мкг	Диаметр зон подавления роста (мм)			МПК (мг/л)		
		Р	П	Ч	Р	П	Ч
1	2	3	4	5	6	7	8
Бета-лактамы							
Бензилпенициллин	10 ЕД	≤14	-	≥15	≥16	-	≤ 8
Ампициллин	10	≤16	-	≥17	≥16	-	≤ 8
Другие препараты							
Хлорамфеникол	30	≤12	13-17	≥ 18	≥ 32	16	≤ 8
Эритромицин	15 мг	≤13	14-22	≥23	≥28	4-1	≤ 0,5
Тетрациклин	30	≤14	15-18	≥19	≥16	8	≤ 4
Доксициклин	30	≤12	13-15	≥16	≥16	8	≤ 4
Ципрофлоксацин	5	≤15	16-20	≥21	≥4	2	≤ 1
Норфлоксацин	10	≤12	13-16	≥ 17	≥16	8	≤ 4
Левифлоксацин	5	≤13	14-16	≥ 17	≥8	4	≤ 2
Гатифлоксацин	5	≤14	15-17	≥18	≥8	4	≤ 2
Нитрофурантоин	300	≤ 14	15-16	≥17	≥128	64	≤ 32
Ванкомицин	30	≤ 14	15-16	≥17	≥32	8-16	≤ 4
Линезолид	30	≤ 20	21-22	23	8	4	≤ 2
Фосфомицин	200	≤ 12	13-15	16	256	128	≤ 64
Стрептомицин (высокий уровень)	300	6	7-9	≥ 10	≥1000* ≥2000**	-	<1000* <2000**
Гентамицин (высокий уровень)	120	6	7-9	≥ 10	≥ 500	-	< 500

\* Критерии высокого уровня резистентности при использовании метода разведения в бульоне.

\*\* Критерии высокого уровня резистентности при использовании метода разведения в агаре.

Приложение 17  
к Инструкции по применению «Методы определения чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препаратам»

Критерии интерпретации результатов определения чувствительности  
*S. pneumoniae*: пограничные значения диаметров зон  
подавления роста (мм) и МПК (мг/л) АБП\*

АБП	Содержание в диске, мкг	Диаметр зон подавления роста (мм)			МПК (мг/л)		
		Р	П	Ч	Р	П	Ч
1	2	3	4	5	6	7	8
<b>Бета-лактамы</b>							
Бензилпенициллин	1 мкг оксациллина	-	-	≥20	≥2	0,12-1	≤0,06
Амоксициллин	-	-	-	-	≥8	4	≤2
Амоксициллин / клавуланат	-	-	-	-	≥8/4	4/2	≤2/1
Цефотаксим -	-	-	-	-	≥4	2	≤1
Цефотаксим (при менингите)	-	-	-	-	≥2	1	≤0,5
Цефтриаксон	-	-	-	-	≥4	2	≤1
Цефтриаксон (при менингите)	-	-	-	-	≥2	1	≤0,5
Цефепим	-	-	-	-	≥4	2	≤1
Цефепим (при менингите)	-	-	-	-	≥2	1	≤0,5
Имипенем	-	-	-	-	≥1	0,25-0,5	≤0,12
Меропенем	-	-	-	-	≥1	0,5	≤0,25
Эртапенем	-	-	-	-	≥4	2	≤1



1	2	3	4	5	6	7	8
Макролиды и Линкозамиды							
Эритромицин	15	≤15	16-20	21	≥1	0,5	≤0,25
Кларитромицин	15	≤16	17-20	21	≥1	0,5	≤0,25
Азитромицин	15	≤13	14-17	18	≥1	1	≤0,5
Линкомицин	15	<17	17-20	21	>8	4-8	≤2
Клиндамицин	2	≤15	16-18	19	1	0,5	≤0,25
Другие препараты							
Тетрациклин	30	≤18	19-22	23	8	4	≤2
Офлоксацин	5	≤12	13-15	16	8	4	≤2
Левифлоксацин	5	≤13	14-16	17	8	4	≤2
Спарфлоксацин	5	≤15	16-18	19	2	1	≤0,5
Моксифлоксацин	5	≤14	15-17	18	4	2	≤1
Гатифлоксацин	5	≤17	18-20	21	4	2	≤1
Хлорамфеникол	30	≤20	-	21	8	-	≤4
Котримоксазол	1,25/23,75	≤15	16-18	19	4/76	1/19- 2/38	≤0,5/9,5
Рифампицин	5	≤16	17-18	19	4	2	≤1
Ванкомицин	30	-	-	17	-	-	≤1
Линезолид	30	-	-	21	-	-	2

\* При оценке чувствительности к бета-лактамам антибиотикам ДДМ не позволяет получить воспроизводимые результаты, необходимо использовать метод серийных разведений в бульоне; ДДМ (с диском, содержащим 1 мкг оксациллина) применим только для скрининга на наличие пенициллинрезистентности у штаммов пневмококков; штаммы, чувствительные к пенициллину, следует считать чувствительными ко всем бета-лактамам антибиотикам; при подозрении на наличие пенициллинрезистентности по результатам теста с оксациллином необходимо определить МПК пенициллина и других бета-лактамов антибиотиков методом серийных разведений в бульоне; критерии интерпретации результатов определения МПК применимы только для метода серийных разведений в бульоне.

Приложение 18  
к Инструкции по применению  
«Методы определения чув-  
ствительности микрооргани-  
змов к антибактериальным  
препаратам»

Рекомендуемый перечень АБП для определения чувствительности  
*S. pneumoniae*, стрептококков группы «viridans» и бета-гемолитических  
стрептококков

Источ- ник вы- деления	<i>S. pneumoniae</i>	<i>Streptococcus</i> spp. (группа «viridans»)	<i>S. pyogenes</i> , <i>S. agalactiae</i> и другие бета-гемолитические стрептококки
Несте- рильные локусы	Препараты выбора: скрининг на пени- циллинрезистентность (диск 1 мкг оксацилли- на), эритромицин, линкомкцин или клин- дамицин, тетрациклин или доксициклин, котримоксазол До- полнительные АБП: пенициллин*, цефо- таксим*, или цефтри- аксон*, левофлоксацин	Нет	Препараты выбора: эритро- мицин, клиндамицин Дополнительные АБП: хло- рамфеникол, левофлоксацин
Кровь, ликвор	Препараты выбора: скрининг на пени- циллинрезистентность (диск 1 мкг оксацилли- на), пенициллин*, це- фотаксим*, (цефтриак- сон*), карбапенемы*, ванкомицин лево- флоксацин, хлорамфе- никол, рифампицин	Препараты выбора: пени- циллин*, цефо- таксим* или цефтриаксон*, клиндамицин, хлорамфеникол	Препараты выбора: эритро- мицин, клиндамицин, хло- рамфеникол, левофлоксацин

\* Для исследования возможно использовать только метод серийных разведений в бульоне.

Приложение 19  
к Инструкции по применению  
«Методы определения чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препаратам»

Критерии интерпретации результатов определения чувствительности *Streptococcus* spp. (кроме *S. pneumoniae*): пограничные значения диаметров зон подавления роста (мм) и МПК (мг/л) АБП

АБП	Содержание в диске, мкг	Диаметр зон подавления роста (мм)			МПК (мг/л)		
		Р	П	Ч	Р	П	Ч
Бета-лактамы*							
Бензилпенициллин**	10 ЕД	≤19	20-27	≥28	≥4	0,25-2	≤0,12
Ампициллин**	10	≤18	19-25	≥26	≥8	0,5	≤0,25
Цефотаксим	30	≤25	26-27	≥28	≥2	1	≤0,5
Цефтриаксон	30	≤24	25-26	≥27	≥2	1	≤0,5
Макролиды и линкозамиды							
Эритромицин	15	≤15	16-20	≥21	≥1	0,5	≤0,25
Кларитромицин	15	≤16	17-20	≥21	≥1	0,5	≤0,25
Азитромицин	15	≤13	14-17	≥18	≥2	1	≤0,5
Клиндамицин	2	≤15	16-18	≥19	≥1	0,5	≤0,25
Другие препараты							
Тетрациклин	30	≤18	19-22	≥23	≥8	4	≤2
Офлоксацилин***	5	≤12	13-15	≥16	≥8	4	≤2
Левифлоксацин	5	≤13	14-16	≥17	≥8	4	≤2
Гатифлоксацин	5	≤17	18-20	≥21	≥4	2	≤1
Хлорамфеникол	30	≤17	18-20	≥21	≥16	8	≤4
Ванкомицин	30	-	-	≥17	-	-	≤1
Линезолид	30	-	-	≥21	-	-	≤2

\* Штаммов *S. pyogenes*, *S. agalactiae*, устойчивых к пенициллину не описано.

\*\* Критерии диско-диффузионного метода применимы только для β-гемолитических стрептококков.

\*\*\* Критерии диско-диффузионного метода и метода серийных разведений применимы только для β-гемолитических стрептококков.

Приложение 20  
к Инструкции по применению  
«Методы определения чув-  
ствительности микроorganiz-  
мов к антибактериальным  
препаратам»

Рекомендуемый перечень АБП для определения чувствительности  
*H.influenzae*

Препараты выбора	Дополнительные АБП
Ампициллин Ампициллин/сульбактам или амоксициллин/клавуланат и/или тест с нитроцефином для выявления продукции бета-лактамаз	Тетрациклин или доксициклин Ко-тримоксазол Хлорамфеникол Фторхинолоны Цефотаксим или цефтриаксон

Приложение 21  
к Инструкции по применению «Методы определения чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препаратам»

Критерии интерпретации результатов определения чувствительности *H. influenzae*: пограничные значения диаметров зон подавления роста (мм) и МПК\* (мг/л) АБП

АБП	Содержание в диске, мкг	Диаметр зон подавления роста (мм)			МПК (мг/л)		
		Р	П	Ч	Р	П	Ч
1	2	3	4	5	6	7	8
Бета-лактамы**							
Ампициллин	10	≤18	19-21	≥22	≥4	2	≤1
Ампициллин/ сульбактам	10/10	≤19	-	≥20	≥4/2	-	≤2/1
Амоксициллин/ клавуланат	20/10	≤19	-	≥20	≥8/4	-	≤4/2
Цефаклор	30	≤16	17-19	≥20	≥32	16	≤8
Цефамандол	-	-	-	-	≥16	8	≤4
Цефуроксим	30	≤16	17-19	≥20	≥16	8	≤4
Цефотаксим	30	-	-	≥26	-	-	≤2
Цефтриаксон	30	-	-	≥26	-	-	≤2
Цефтазидим	30	-	-	≥26	-	-	≤2
Цефтибутен	30	-	-	≥28	-	-	≤2
Цефиксим	5	-	-	≥21	-	-	≤1
Цефподоксим	10	-	-	≥21	-	-	≤2
Цефепим	30	-	-	≥26	-	-	≤2
Азтреонам	30	-	-	≥26	-	-	≤2
Имипенем	10	-	-	≥16	-	-	≤4
Меропенем	10			≥20			≤0,5
Эртапенем	10			≥19			≤0,5

1	2	3	4	5	6	7	8
Макролиды							
Кларитромицин	15	≤ 10	11-12	≥13	≥32	16	≤58
Азитромицин	15	-	-	≥12	-	-	≤4
Хинолоны							
Ципрофлоксацин	5	-		≥21	-	-	≤1
Офлоксацин	5	-	-	≥16	-	-	≤2
Левифлоксацин	5	-	-	≥17	-	-	≤2
Спарфлоксацин					-	-	≤0,25
Моксифлоксацин	5	-	-	≥18	-	-	≤1
Гатифлоксацин	5	-	-	≥ 18	-	-	≤1
Другие препараты							
Тетрациклин	30	≤25	26-28	≥29	≥ 8	4	≤ 2
Хлорамфеникол	30	≤25	26-28	≥ 29	≥ 8	4	≤2
Рифампицин	5	≤16	17-19	≥20	≥ 4	2	≤1
Ко-тримоксазол	1,25/23,75	≤10	11-15	≥ 16	≥ 4/76	1/19- 2/38	≤ 0,5/ 9,5

\* Критерии интерпретации результатов тестирования с определением МПК применимы только для метода серийных разведений в бульоне.

\*\* Для прогнозирования чувствительности к бета-лактамам антибиотикам целесообразно проводить непосредственное выявление выработки бета-лактамаз в тесте с нитроцефином. Описаны штаммы устойчивые к ампициллину, но не продуцирующие бета-лактамазы, их следует расценивать как устойчивые к защищенным пенициллинам и цефалоспорином II поколения.

Приложение 22  
к Инструкции по применению  
«Методы определения чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препаратам»

Критерии интерпретации результатов определения чувствительности *N. gonorrhoeae*: пограничные значения диаметров зон подавления роста (мм) и МПК (мг/л) АБП

АБП	Содержание в диске, мг	Диаметр зон подавления роста (мм)			МПК (мг/л)		
		Р	П	Ч	Р	П	Ч
<b>Бета-лактамы*</b>							
Бензилпенициллин**	10	≤26	27-46	≥47	≥2	0,12-1	≤0,06
Цефметазол	30	≤27	28-32	≥33	≥8	4	≤2
Цефотетан	30	≤19	20-25	≥26	≥8	4	≤2
Цефокситин	30	≤23	24-27	≥28	≥8	4	≤2
Цефуроксим	30	≤25	26-30	≥31	≥4	2	≤1
Цефотаксим	30	-	-	≥31	-	-	≤0,5
Цефтриаксон	30	-	-	≥35	-	-	≤0,25
Цефиксим	5	-	-	≥31	-	-	≤0,25
Цефподоксим	10	-	-	≥29	-	-	≤0,5
Цефтазидим	30	-	-	≥31	-	-	≤0,5
Цефепим	30	-	-	≥31	-	-	≤0,5
<b>Другие препараты</b>							
Тетрациклин***	30	≤30	31-37	≥38	≥2	0,5-1	≤0,25
Ципрофлоксацин	5	≤27	28-40	≥41	≥1	0,12-0,5	≤0,06
Офлоксацин	5	≤24	25-30	≥31	≥2	0,5-1	≤0,25
Ломефлоксацин	10	≤26	27-37	≥38	≥2	0,25-1	≤0,12
Гатифлоксацин	5	≤33	34-37	≥38	≥0,5	0,25	≤0,125
Спектиномицин	100	≤14	15-17	≥18	≥128	64	≤32

\* Критерии интерпретации результатов определения чувствительности по значению МПК применимы только для метода серийных разведений в агаре.

\*\* Предпочтительно поводить непосредственное выявление продукции бета-лактамаз с использованием теста с нитроцефином, положительный результат теста свидетельствует о резистентности штамма к пенициллину, ампициллину, амоксициллину.

\*\*\* Выявление устойчивости к тетрациклину свидетельствует о резистентности к доксициклину.

Приложение 23  
к Инструкции по применению  
«Методы определения чув-  
ствительности микроorganiz-  
мов к антибактериальным  
препаратам»

Рекомендуемый перечень микроорганизмов для включения в программу  
эпидемиологического надзора за антибиотикорезистентностью

В амбулаторно-поликлинической практике	В стационарах
<p>Escherichia coli Proteus mirabilis Salmonella spp. (включая S.typhi, S.paratyphi, S.typhimurium, S.enteritidis) Shigella spp. Klebsiella pneumoniae и K.oxytoca Haemophilus influenzae Campylocacter jejuni и C.coli Neisseria meningitides Neisseria gonorrhoeae Moraxella catarrhalis Staphylococcus aureus Streptococcus pneumoniae Streptococcus pyogenes Streptococcus agalactiae Enterococcus faecalis u faecium</p>	<p>Escherichia coli Proteus mirabilis Salmonella spp. (включая typhi, paratyphi, typhimurium, enteritidis) Shigella spp. Klebsiella pneumoniae и K.oxytoca Enterobacter cloacae и E.aerogenes Serratia marcescens Citrobacter freundii Morganella morganii Pseudomonas aeruginosa Acinetobacter baumannii Stenotrophomonas maltophilia Burkholderia cepacia Haemophilus influenzae Campylocacter jejuni и C.coli Neisseria meningitides Neisseria gonorrhoeae Moraxella catarrhalis Staphylococcus aureus Staphylococcus epidermidis Staphylococcus haemolyticus Streptococcus pneumoniae Streptococcus pyogenes Streptococcus agalactiae Enterococcus faecalis u faecium Bacteroides fragilis Clostridium difficile</p>



## ИНФОРМАЦИОННЫЕ ДАННЫЕ

1. Настоящая Инструкция по применению подготовлена на основе Методических указаний «Определение чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препаратам», разработанных: Центральным научно-исследовательским институтом эпидемиологии Минздрава России (Н.А. Семина, С.В. Сидоренко); Государственным научным центром по антибиотикам Минздрава России (С.П. Резван, С.А. Грудина); Научно-исследовательским институтом антимикробной химиотерапии Смоленской государственной медицинской академии Минздрава России (Л.С. Страчунский, О.У. Стецюк, Р.С. Козлов, М.В. Эйдельштейн); Кафедрой микробиологии и химиотерапии Российской медицинской академии последипломного образования Минздрава России (Е.А. Ведьмина, Л.Г. Столярова, И.В. Власова); Федеральной службой по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека Минздрава России (З.С. Середа), утвержденных Главным государственным санитарным врачом Российской Федерации - Первым заместителем Министра здравоохранения Российской Федерации Г.Г. Онищенко 4 марта 2004 г.

2. Адаптирована специалистами ГУ «Республиканский центр гигиены, эпидемиологии и общественного здоровья» Министерства здравоохранения Республики Беларусь (Т.И. Сероокая, А.М. Марейко), ГУ «Научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии» МЗ РБ (Л.П. Титов, Т.С. Ермакова), ГУО «Белорусская медицинская академия последипломного образования» (О.В. Тонко).

3. Введена взамен «Методических указаний по определению чувствительности микроорганизмов к антибиотикам методом диффузии в агар с использованием дисков», утв. Заместителем Главного государственного санитарного врача СССР В.Е. Ковшило 10 марта 1983 г. № 2675-83.

## ОГЛАВЛЕНИЕ

## Инструкция по применению «Методы определения чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препаратам»

	стр.
Глава 1 Область применения .....	2
Глава 2 Общие сведения .....	2
Глава 3 Показания для исследования чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препаратам .....	2
Глава 4 Методы определения чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препаратам .....	4
Глава 5 Контроль качества определения чувствительности .....	14
Глава 6 Определение чувствительности отдельных групп бактерий к антибактериальным препаратам и интерпретация результатов .....	17
Глава 7 Анализ видового состава этиологически значимых микроорганизмов и оценка их антибиотикорезистентности .....	41
Приложение 1 Растворители и разбавители, используемые для приготовления основных растворов АБП .....	50
Приложение 2 Допустимые диапазоны значений МПК (мг/л) контрольных штаммов микроорганизмов с обычными питательными потребностями .....	52
Приложение 3 Допустимые диапазоны значений диаметров зон подавления роста (мм) контрольных штаммов микроорганизмов с обычными питательными потребностями.....	54
Приложение 4 Допустимые диапазоны значений МПК (мг/л) контрольных штаммов микроорганизмов со сложными питательными потребностями .....	56
Приложение 5 Допустимые диапазоны значений диаметров зон подавления роста (мм) контрольных штаммов микроорганизмов со сложными питательными потребностями .....	58
Приложение 6 Критерии интерпретации результатов определения чувствительности Enterobacteriaceae: пограничные значения диаметров зон подавления роста (мм) и МПК (мг/л) АБП .....	60
Приложение 7 Рекомендуемый перечень АБП для определения чувствительности Enterobacteriaceae, выделенных при внекишечных инфекциях .....	62
Приложение 8 Рекомендуемый перечень АБП для определения чувствительности Enterobacteriaceae, выделенных при кишечных инфекциях .....	63
Приложение 9 Рекомендуемый перечень АБП для определения чувствительности Enterobacteriaceae, выделенных при внебольничных ИМП .....	63
Приложение 10 Критерии выявления штаммов Klebsiella spp. и E. coli, предположительно продуцирующих БЛРС .....	64
Приложение 11 Рекомендуемый перечень АБП для определения чувствительности P. aeruginosa, Pseudomonas spp., Acinetobacter spp. и других НФБ .....	64
Приложение 12 Критерии интерпретации результатов определения чувствительности P. aeruginosa, Pseudomonas spp., Acinetobacter spp., и других НФБ: пограничные значения диаметров зон подавления роста (мм) и МПК (мг/л) АБП .....	65

Приложение 13 Рекомендуемый перечень АБП для определения чувствительности <i>Staphylococcus spp</i> .....	67
Приложение 14 Критерии интерпретации результатов определения чувствительности <i>Staphylococcus spp.</i> : пограничные значения диаметров зон подавления роста (мм) и МПК (мг/л) АБП .....	68
Приложение 15 Рекомендуемый перечень АБП для определения чувствительности <i>Enterococcus spp</i> .....	70
Приложение 16 Критерии интерпретации результатов определения чувствительности <i>Enterococcus spp.</i> : пограничные значения диаметров зон подавления роста (мм) и МПК (мг/л) АБП .....	71
Приложение 17 Критерии интерпретации результатов определения чувствительности <i>S. pneumoniae</i> : пограничные значения диаметров зон подавления роста (мм) и МПК (мг/л) АБП .....	72
Приложение 18 Рекомендуемый перечень АБП для определения чувствительности <i>S. pneumoniae</i> , стрептококков группы «viridans» и бета-гемолитических стрептококков .....	74
Приложение 19 Критерии интерпретации результатов определения чувствительности <i>Streptococcus spp.</i> (кроме <i>S. pneumoniae</i> ): пограничные значения диаметров зон подавления роста (мм) и МПК (мг/л) АБП .....	75
Приложение 20 Рекомендуемый перечень АБП для определения чувствительности <i>H. influenzae</i> .....	76
Приложение 21 Критерии интерпретации результатов определения чувствительности <i>H. influenzae</i> : пограничные значения диаметров зон подавления роста (мм) и МПК (мг/л) АБП .....	77
Приложение 22 Критерии интерпретации результатов определения чувствительности <i>N. gonorrhoeae</i> : пограничные значения диаметров зон подавления роста (мм) и МПК (мг/л) АБП .....	79
Приложение 23 Рекомендуемый перечень микроорганизмов для включения в программу эпидемиологического надзора за антибиотикорезистентностью	80