

УДК [579.086.04+616.98]-036.22

Сравнение результатов определения чувствительности к антибиотикам грамотрицательных аэробных бактерий диско-диффузионным методом на среде АГВ и агаре Мюллера – Хинтон

О.У. Стецюк, Г.К. Решедько

НИИ антимикробной химиотерапии, Смоленск, Россия

Представлены результаты сравнительного определения чувствительности грамотрицательных аэробных бактерий к ряду антибиотиков диско-диффузионным методом (ДДМ) на отечественной питательной среде АГВ и агаре Мюллера – Хинтон (МХА) с целью оценки возможности использования для тестирования АГВ – применения международных критериев интерпретации результатов, разработанных для МХА.

Показано, что среда АГВ не соответствует требованиям ВОЗ, предъявляемым к питательным средам для определения чувствительности, по таким ключевым параметрам, как содержание катионов Ca^{2+} , Mg^{2+} и тимидина, составляющих >100, >40 и >20 мг/л, в отличие от рекомендованных ВОЗ – ≤50, ≤25 и <0,03 мг/л соответственно.

Несоответствие состава среды АГВ требованиям, предъявляемым ВОЗ к питательным средам для определения чувствительности; отсутствие современных отечественных стандартов интерпретации и выявленные существенные различия результатов, получаемых на АГВ и на МХА, делают невозможным использование АГВ для тестирования чувствительности синегнойной палочки к имипенему, аминогликозидам и фторхинолонам, а также энтеробактерий – к триметоприму/сульфаметоксазолу.

Ключевые слова: определение чувствительности, диско-диффузионный метод, питательные среды, *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas aeruginosa*.

Comparison of Results of Antimicrobial Susceptibility Testing of Gram-negative Aerobic Bacteria by Disc Diffusion on Mueller-Hinton Agar and AGV Medium

O.U. Stetsiouk, G.K. Reshedko

Institute of Antimicrobial Chemotherapy, Smolensk, Russia

Results of the comparative susceptibility testing of Gram-negative aerobic bacteria by disc diffusion method on Mueller-Hinton Agar (MHA) and the AGV medium that are widely used for susceptibility testing in Russia, are

presented. The aim of the study was to assess the possibility of use of AGV instead of MHA for susceptibility testing by disc diffusion.

AGV was shown not to comply with WHO requirements for susceptibility testing media by several key parameters (Ca^{2+} , Mg^{2+} , and thymidine concentrations that are >100, >40 and >20 mg/L, respectively, whereas WHO recommends <50, <25 and <0,03 mg/L, respectively).

Inconsistency of AGV composition to WHO require-

Контактный адрес:
Ольга Ульяновна Стецюк
Эл. почта: olga@antibiotic.ru

ments for susceptibility testing media, lack of the updated Russian recommendations for susceptibility testing and significant discrepancies of the results obtained on AGV and MHA make it impossible to use AGV for susceptibility testing of *Pseudomonas aeruginosa* to

Введение

Определение чувствительности микроорганизмов к антибиотикам необходимо проводить для каждого возбудителя инфекции, если его чувствительность не может быть достоверно предсказана на основании его идентификации и знаний о его природной чувствительности или резистентности к антимикробным препаратам [1]. Результаты определения чувствительности *in vitro* служат основой для назначения этиотропной антибиотикотерапии, а также для разработки схем эмпирической антибактериальной терапии, создания формуляра антибиотиков [2], сокращения затрат на лечение [3].

Диско-диффузионный метод (ДДМ) является наиболее простым полуколичественным методом определения чувствительности микроорганизмов к антибиотикам и широко используется в практической работе микробиологических лабораторий. Однако на результаты определения чувствительности *in vitro* любым методом влияют многие факторы, такие как состав, *pH* [4], толщина слоя агара в чашке Петри [5] и влажность питательной среды, содержание в ней двухвалентных катионов Ca^{2+} , Mg^{2+} , Zn^{2+} (особенно при тестировании *Pseudomonas aeruginosa*) [6, 7], тимины и тимидина [8], условия культивирования (температура, атмосфера), скорость диффузии антибиотика в агар и т.д. [9].

Поэтому при определении чувствительности возбудителей к антибиотикам необходимо использовать специальные питательные среды, строго соблюдать условия тестирования, проводить внутренний контроль качества [1, 10].

В настоящее время нормативным документом, определяющим процедуру исследования чувствительности микроорганизмов к антибиотикам, в России остаются «Методические указания по определению чувствительности микроорганизмов к антибиотикам методом диффузии в агар с использованием дисков» (Минздрав СССР, 1983 г. [11]). Этот документ содержит критерии интерпретации результатов определения чувствительности «непривередливых» микроорганизмов на специальной среде АГВ только к 23 антибиотикам, многие из которых уже не используются в клинической практике. В большинстве стран мира для тестирования используется другая питательная среда – Mueller – Hinton Agar (агар Мюллера – Хинтон – МХА) [12],

imipenem, aminoglycosides, and fluoroquinolones, as well as of Enterobacteriaceae to trimethoprim/sulfamethoxazole.

Key words: susceptibility testing, disc diffusion, media, *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas aeruginosa*.

для которой разработаны и регулярно пересматриваются критерии интерпретации результатов определения чувствительности к большому числу (>70) современных антибактериальных препаратов и контрольные значения диаметров зон подавления роста для референтных штаммов [1, 2, 10].

Производство агара Мюллера – Хинтон в нашей стране на сегодняшний день не налажено, а закупка импортной среды для многих российских лабораторий затруднительна по экономическим соображениям. Для отечественной среды АГВ не разработаны критерии интерпретации результатов определения чувствительности ко многим современным антибактериальным препаратам (ингибиторозащищенным пенициллинам, цефалоспорином, карбапенемам, фторхинолонам, современным аминогликозидам и макролидам). Это зачастую делает невозможным правильную клиническую интерпретацию результатов тестирования на среде АГВ и может в конечном итоге неблагоприятно влиять на качество лечения пациентов.

Цель настоящего исследования – сравнить результаты определения чувствительности грамотрицательных бактерий к современным антибактериальным препаратам диско-диффузионным методом на АГВ и МХА и на основании этого оценить возможность использования отечественной питательной среды АГВ вместо МХА для тестирования с применением международных критериев интерпретации результатов, разработанных для МХА.

Материал и методы исследования

В работе были использованы клинические штаммы микроорганизмов, выделенные в бактериологических лабораториях Смоленска и других городов России (Москвы, Новосибирска, Краснодара и Казани). Штаммы были идентифицированы стандартными методами с использованием биохимических тестов и коммерческих систем для идентификации API 20E, API 20NE (bioMerieux, Франция).

Чувствительность микроорганизмов была определена к 11 современным антибактериальным препаратам 6 различных классов: ингибиторозащищенным пенициллинам (ампициллину/сульбактаму, амоксициллину/клавуланату, тикарциллину/клавуланату); антисинегнойному цефалоспорино III поколения – цефоперазону; карбапенемному

антибиотику – имипенему; аминогликозидам (нетилмицину и амикацину); фторхинолонам (ципрофлоксацину, норфлоксацину и офлоксацину); антагонистам синтеза фолиевой кислоты – триметоприму/сульфаметоксазолу.

Все штаммы микроорганизмов, включенные в исследование, обладали известным профилем антибиотикорезистентности, определенным путем предварительного тестирования. Выбор видов микроорганизмов определялся спектром активности исследуемых антибиотиков. Выборочная совокупность штаммов была репрезентативной, т.е. представляла реально наблюдаемую в клинике картину антибиотикочувствительности микроорганизмов. В исследование были включены и штаммы, имеющие экстремальные значения чувствительности (высокочувствительные или высокорезистентные к исследуемому антибиотику).

В одинаковых условиях параллельно проводили тестирование микроорганизмов на питательной среде АГВ (Махачкала, Россия) и на МХА (BBL, США) диско-диффузионным методом в соответствии с рекомендациями Национального комитета по клиническим лабораторным стандартам (NCCLS), США: использовали микробную взвесь одинаковой оптической плотности, одинаковые партии коммерческих дисков с антибиотиками, единую методику инокуляции чашек, одинаковые условия инкубации.

При проведении исследования использовали среду АГВ двух различных серий для оценки воспроизводимости результатов, получаемых на этой питательной среде. Каждый штамм микрооргани-

мов тестировали дважды на каждой из серий среды АГВ и на МХА для оценки воспроизводимости результатов во времени.

Схема исследования представлена на рис. 1.

В качестве контрольных использовали штаммы ATCC, рекомендованные NCCLS: *Escherichia coli* ATCC 25922, *E. coli* ATCC 35218 и *Enterococcus faecalis* ATCC 29212. Тестирование контрольных штаммов проводили ежедневно параллельно определению чувствительности клинических штаммов, не менее 5 раз на каждой серии АГВ и на МХА.

Статистический анализ результатов проводили по методу Альтмана [13]. При сравнении результатов определения чувствительности микроорганизмов к антибиотикам, полученных на разных сериях среды АГВ и на МХА, как несовпадение результатов рассматривали различие в диаметрах зон подавления роста более ± 3 мм. При статистическом анализе определяли следующие показатели:

- воспроизводимость во времени результатов тестирования на одной серии каждого из агаров, для чего были вычислены парные разности в диаметрах зон подавления роста для каждого штамма, полученные в разные дни, их средние значения и стандартные отклонения для МХА и каждой серии АГВ (см. рис. 1);
- воспроизводимость результатов определения чувствительности на разных сериях среды АГВ, для этого также были рассчитаны парные разности, их средние значения и стандартные отклонения. Воспроизводимость метода оценивалась величиной стандартного отклонения от среднего значения разности парных результатов: чем меньше стандартное отклонение, тем лучше воспроизводимость метода.



Рис. 1. Схема проведения исследования.

Таблица 1. Методика сравнения результатов определения чувствительности, полученных на среде АГВ и референтной среде МХА

		Результат определения чувствительности на референтной среде МХА		
		Ч	У/Р	Р
Результат определения чувствительности на среде АГВ	Ч	Согласие	Малые ошибки	Очень большие ошибки
	У/Р	Малые ошибки	Согласие	Малые ошибки
	Р	Большие ошибки	Малые ошибки	Согласие

Примечание. Ч – чувствительные, У/Р – умереннорезистентные, Р – резистентные штаммы.

Допустимой считалась величина стандартного отклонения $\leq 1,5$ мм;

– пригодность среды АГВ для определения чувствительности с использованием критериев интерпретации результатов NCCLS определяли по среднему значению (M) разности результатов, полученных на АГВ и МХА, стандартному отклонению (σ) и 95% интервалу согласия ($M \pm 2\sigma$) (см. рис. 1). Допустимыми считали значение $s \leq 1,5$ мм и границы 95% интервала согласия в пределах ± 3 мм;

– кроме того, рассчитывали количество и степень ошибок в интерпретации результатов на АГВ в сравнении с МХА. Допустимым считалось возникновение не более 5% малых, 3% больших (ложная резистентность) и 1,5% очень больших (ложная чувствительность) ошибок в интерпретации результатов определения чувствительности на среде АГВ в сравнении с референтной средой МХА (табл. 1) [14].

Результаты и обсуждение

Использованные клинические штаммы микроорганизмов

В соответствии с требованиями руководств по оценке методов исследований в клинической микробиологии [15], разработке критериев интерпретации результатов и по контролю качества при определении чувствительности микроорганизмов к антибиотикам *in vitro* [16] исследования подобного рода должны включать до 100 (а в некоторых случаях до 300–500 и более) штаммов микроорганизмов раз-

личных видов. Выборочная совокупность бактерий должна представлять реально наблюдаемую картину распределения штаммов микробной популяции по степени чувствительности к антибактериальному препарату. При этом должно быть протестировано не менее 35 изолятов с известной резистентностью к исследуемому антибиотику [15].

Как видно из табл. 2, число исследованных штаммов микроорганизмов для оценки возможности использования среды АГВ вместо МХА составило от 100 до 236, в зависимости от спектра активности исследуемого антимикробного препарата, что можно считать достаточным для выполнения задач, поставленных в данной работе.

Анализ полученных результатов был проведен отдельно для двух групп микроорганизмов – *Enterobacteriaceae* и *P. aeruginosa*.

Воспроизводимость результатов тестирования во времени

Воспроизводимость результатов во времени является косвенным показателем, позволяющим судить о стандартизованности выполнения процедуры тестирования, и о том, насколько при выполнении данного исследования было исключено влияние различных посторонних факторов на результаты определения чувствительности микроорганизмов к антибиотикам.

Для исследованных групп микроорганизмов диаметры зон подавления роста, полученные при первом и втором тестировании на МХА и на каждой серии АГВ, были близки (σ в большинстве случаев $\leq 1,5$ мм).

Как видно из табл. 3, воспроизводимость результатов во времени при двукратном тестировании штаммов различных видов микроорганизмов ко всем антибактериальным препаратам, кроме триметоприма/сульфаметоксазола, на МХА и среде АГВ двух серий была хорошей. Значения s составили: для МХА – от 0,40 до 1,25 мм, для АГВ-1 – от 0,42 до 1,20 мм, АГВ-2 – от 0,36 до 1,41 мм. При определении чувствительности штаммов энтеробактерий к триметоприму/сульфаметоксазолу на МХА воспроизводимость результатов во времени также была высокой – значение s составило 0,81 мм.

Таким образом, полученные значения стандарт-

Таблица 2. Антибиотики и число клинических штаммов микроорганизмов, включенных в исследование

Антибиотики	Число штаммов		
	<i>Enterobacteriaceae</i>	<i>P. aeruginosa</i>	Всего
Ампициллин/сульбактам	101	–	101
Амоксициллин/клавуланат	100	–	100
Тикарциллин/клавуланат	104	50	154
Цефоперазон	101	50	151
Имипенем	136	100	236
Нетилмицин	136	100	236
Амикацин	115	27	142
Ципрофлоксацин	101	54	204
Норфлоксацин	101	54	204
Офлоксацин	104	43	207
Триметоприм/сульфаметоксазол	50	–	110

ного отклонения подтверждают достаточно хорошую воспроизводимость результатов тестирования во времени и удовлетворительное качество определения чувствительности.

Более значительные различия в диаметрах зон подавления роста при определении чувствительности энтеробактерий к триметоприму/сульфаметоксазолу на среде АГВ двух серий (σ от 2,13 до 2,53 мм), вероятно, связаны с недопустимо высоким содержанием в агаре тимина и тимидина, что привело к получению переменных результатов тестирования в разные дни.

Воспроизводимость результатов тестирования на разных сериях среды АГВ

Сравнение результатов тестирования, полученных на разных сериях среды АГВ, представлено в табл. 4. Как видно из представленных данных, стандартные отклонения от средней величины разности значений, полученных при тестировании «непривередливых» микроорганизмов на двух различных сериях АГВ для всех антибактериальных препаратов, за исключением триметоприма/сульфаметоксазола, были незначительны (<1,5 мм) и находились в пределах 0,37–0,94 мм.

При определении чувствительности энтеробактерий к триметоприму/сульфаметоксазолу были получены более значительные различия в диаметрах зон подавления роста на разных сериях среды АГВ, что может свидетельствовать о недостаточной стандартизации ее состава по содержанию тимина и тимидина.

Результаты определения чувствительности к другим антибиотикам, существенно не отличавшиеся при тестировании на разных сериях среды АГВ, показывают, что по остальным параметрам (рН, содержание катионов и т.д.) состав исследованных се-

рий данной питательной среды достаточно стабилен. Это обеспечивает хорошую воспроизводимость результатов определения чувствительности на разных партиях агара к антимикробным препаратам различных классов, за исключением антифолатов.

Сравнение результатов определения чувствительности к антибиотикам на АГВ и МХА

Enterobacteriaceae

Диаметры зон подавления роста, полученные на АГВ при тестировании контрольных штаммов *E. coli* ATCC 25922, *E. coli* ATCC 35218 и клинических штаммов *Enterobacteriaceae* к антибактериальным препаратам различных классов, за исключением триметоприма/сульфаметоксазола, были сходны со значениями на референтном агаре МХА. Результаты представлены в табл. 5.

Так, при сравнении результатов определения чувствительности этих бактерий на АГВ и МХА ко всем антибиотикам, кроме ципрофлоксацина и триметоприма/сульфаметоксазола, результаты для 95% протестированных штаммов не отличались более чем на 3 мм, что можно считать допустимым для данного метода исследования.

Несколько большие значения, полученные при определении чувствительности к ципрофлоксацину (границы 95% интервала согласия от –2,76 до 3,36 мм), могут быть связаны с очень высокой активностью этого антибиотика в отношении большинства исследованных штаммов, с образованием зон подавления роста большого диаметра и, следовательно, большим разбросом результатов тестирования.

Для оценки качества выполнения тестирования и возможного влияния питательной среды на результаты было выполнено 5-кратное определение

Таблица 3. Воспроизводимость во времени результатов определения чувствительности к антибиотикам на МХА, АГВ-1 и АГВ-2

Антибиотики	Микроорганизмы	Число штаммов	Стандартное отклонение σ , мм		
			МХА	АГВ-1	АГВ-2
Ампициллин/сульбактам	<i>Enterobacteriaceae</i>	101	1,20	1,01	1,21
Амоксициллин/клавуланат	<i>Enterobacteriaceae</i>	100	0,66	0,78	0,60
Тикарциллин/клавуланат	<i>Enterobacteriaceae</i>	104	1,18	0,98	1,41
	<i>P. aeruginosa</i>	50	0,67	0,88	0,77
Цефоперазон	<i>Enterobacteriaceae</i>	101	0,82	1,04	1,03
	<i>P. aeruginosa</i>	50	0,46	0,52	0,60
Имипенем	<i>Enterobacteriaceae</i>	136	1,25	1,20	1,20
	<i>P. aeruginosa</i>	100	0,98	1,05	0,81
Нетилмицин	<i>Enterobacteriaceae</i>	136	1,25	1,07	1,08
	<i>P. aeruginosa</i>	100	0,75	0,87	0,97
Амикацин	<i>Enterobacteriaceae</i>	115	0,77	0,79	0,87
	<i>P. aeruginosa</i>	27	0,40	0,42	0,36
Ципрофлоксацин	<i>Enterobacteriaceae</i>	101	0,78	1,06	0,98
	<i>P. aeruginosa</i>	54	0,84	1,00	1,06
Офлоксацин	<i>Enterobacteriaceae</i>	104	0,73	0,79	0,90
	<i>P. aeruginosa</i>	43	0,41	0,43	0,40
Норфлоксацин	<i>Enterobacteriaceae</i>	101	0,74	0,88	0,97
	<i>P. aeruginosa</i>	54	0,78	1,00	1,02
Триметоприм/сульфаметоксазол	<i>Enterobacteriaceae</i>	50	0,81	2,53	2,13

Таблица 4. Воспроизводимость результатов определения чувствительности микроорганизмов к антибиотикам на разных сериях среды АГВ

Антибиотики	Стандартные отклонения σ от средних значений разности АГВ-2 – АГВ-1, мм			
	<i>Enterobacteriaceae</i>		<i>P. aeruginosa</i>	
	N	σ	N	σ
Ампициллин/сульбактам	202	0,83	–	–
Амоксициллин/клавуланат	200	0,83	–	–
Тикарциллин/клавуланат	208	0,94	100	0,52
Цефоперазон	202	0,85	100	0,52
Имипенем	272	0,64	200	0,85
Нетилмицин	272	0,66	200	0,59
Амикацин	230	0,79	54	0,37
Ципрофлоксацин	202	0,69	108	0,73
Норфлоксацин	202	0,75	108	0,75
Офлоксацин	208	0,75	86	0,46
Триметоприм/сульфаметоксазол	100	1,94	–	–

Примечание. Здесь и в табл. 5 и 8: N - число тестирований

чувствительности соответствующих контрольных штаммов на разных сериях среды АГВ и на МХА. Результаты тестирования контрольных штаммов *E. coli* ATCC 25922 и *E. coli* ATCC 35218 приведены в табл. 6.

Как видно из представленных данных, все результаты определения чувствительности к антибактериальным препаратам контрольных штаммов кишечной палочки на МХА находятся в пределах допустимых NCCLS значений, что является показате-

Таблица 5. Сравнение результатов определения чувствительности *Enterobacteriaceae* к антибиотикам на среде АГВ и МХА

Антибиотик	N	Bias (M), мм	σ , мм	Границы 95% интервала согласия, мм	
				нижняя	верхняя
Ампициллин/сульбактам	404	-0,27	1,15	-2,57	2,03
Амоксициллин/клавуланат	400	-0,09	1,17	-2,43	2,25
Тикарциллин/клавуланат	416	-0,36	1,21	-2,78	2,06
Цефоперазон	404	0,31	1,12	-1,93	2,55
Имипенем	544	0,06	0,89	-1,72	1,84
Нетилмицин	544	-0,24	1,11	-2,46	1,98
Амикацин	460	-0,44	0,91	-2,26	1,38
Ципрофлоксацин	404	0,30	1,53	-2,76	3,36
Норфлоксацин	404	0,12	1,36	-2,60	2,84
Офлоксацин	416	0,13	1,00	-1,87	2,13
Триметоприм/сульфаметоксазол	200	-18,02	13,26	-44,54	8,50

лем удовлетворительного качества тестирования. Для всех антибактериальных препаратов, кроме триметоприма/сульфаметоксазола, диаметры зон подавления роста контрольных штаммов на АГВ также соответствовали требованиям NCCLS. При определении чувствительности контрольного штамма *E. coli* ATCC 25922 к триметоприму/сульфаметоксазолу диаметры зон подавления роста оказались меньше допустимых, что может быть объяснено высоким содержанием тимина и тимидина в среде АГВ, нивелирующим антимикробное действие сульфаниламидов и триметоприма.

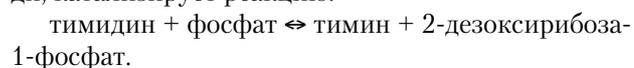
При сравнении результатов тестирования штаммов *Enterobacteriaceae* с определением числа и степени расхождений в интерпретации результатов для всех антибактериальных препаратов, кроме триметоприма/сульфаметоксазола, очень больших ошибок выявлено не было, а процент больших и малых ошибок в большинстве случаев находился в допустимых пределах (табл. 7).

Более высокая частота малых ошибок при определении чувствительности к ампициллину/сульбактаму и амоксициллину/клавуланату, вероятно, связана с тем, что в исследуемых популяциях микроорганизмов был высокий процент штаммов с промежуточным уровнем резистентности к этим антибактериальным препаратам (около 30%).

Высокая частота больших ошибок (ложной резистентности) при интерпретации результатов тестирования к триметоприму/сульфаметоксазолу также подтверждает непригодность среды АГВ для определения чувствительности к антифолатам вследствие высокого нестандартизированного содержания тимина и тимидина.

Для подтверждения этого на среде АГВ был протестирован контрольный штамм *E. faecalis* ATCC 29212, который служит маркером содержания тимина и тимидина в питательных средах для определения чувствительности. Согласно рекомендациям NCCLS [1], среда считается пригодной для определения чувствительности к сульфаниламидным антибиотикам и триметоприму, если при тестировании чувствительности этого контрольного штамма к котримоксазолу образуются зоны подавления роста диаметром 20 мм или более. Так, при тестировании *E. faecalis* ATCC 29212 на МХА была получена зона подавления роста 21 мм вокруг диска с триметопримом/сульфаметоксазолом, а на среде АГВ различных серий зон подавления роста не было получено.

Показано, что тимидин в концентрации 0,1 мг/л снижает антимикробную активность сульфаниламидов, триметоприма и их комбинаций *in vitro* [17–19]. Это объясняется тем, что антифолаты действуют как ингибиторы синтеза нуклеиновых кислот, а наличие свободного тимидина в питательной среде приводит к нивелированию их действия. В большинстве случаев добавление лизированной лошадиной крови приводит к улучшению качества среды для определения чувствительности к сульфаниламидам и триметоприму. Фермент тимидинфосфорилаза, содержащийся в эритроцитах лошади, катализирует реакцию:



Для большинства бактерий (за исключением *E. faecalis*) тимин, по сравнению с тимидином, является более слабым антагонистом действия антифолатов. Снижение концентрации тимидина в среде под влиянием лизированной лошадиной крови

Таблица 6. Сравнение результатов тестирования контрольных штаммов *E. coli* ATCC 25922 и *E. coli* ATCC 35218 на АГВ и МХА

Антибиотики	Диаметр зоны подавления роста, мм					
	<i>E. coli</i> ATCC 25922			<i>E. coli</i> ATCC 35218		
	NCCLS	МХА	АГВ	NCCLS	МХА	АГВ
Ампициллин/сульбактам	20–24	23–24	22–24	13–19	16–17	17–18
Амоксициллин/клавуланат	19–25	21–23	20–24	18–22	18–20	18–21
Тикарциллин/клавуланат	25–29	26–29	26–29	21–25	21–24	21–24
Цефоперазон	28–34	30–31	31–32	–	–	–
Имипенем	26–32	29–31	29–32	–	–	–
Нетилмицин	22–30	25–26	24–27	–	–	–
Амикацин	19–26	20–23	21–25	–	–	–
Ципрофлоксацин	30–40	36–40	36–40	–	–	–
Норфлоксацин	28–35	30–35	31–35	–	–	–
Офлоксацин	29–33	30–31	30–33	–	–	–
Триметоприм/сульфаметоксазол	21–28	23–27	14–20	–	–	–

Таблица 7. Интерпретация результатов тестирования *Enterobacteriaceae* по их чувствительности к антибиотикам на среде АГВ и МХА

Антибиотики	Согласие, %	Ошибки, %		
		малые	большие	очень большие
Ампициллин/сульбактам	88,1	11,9	0	0
Амоксициллин/клавуланат	93,2	6,8	0	0
Тикарциллин/клавуланат	96,1	3,9	0	0
Цефоперазон	96,5	3,5	0	0
Имипенем	100	0	0	0
Нетилмицин	95,6	3,7	0,7	0
Амикацин	97,3	2,4	0,3	0
Ципрофлоксацин	97,0	3,0	0	0
Норфлоксацин	97,0	3,0	0	0
Офлоксацин	95,0	5,0	0	0
Триметоприм/сульфаметоксазол	33,0	4,3	62,7	0
Допустимые пределы, %	>90,5	<5	<3	<1,5

или непосредственно тимидин-фосфорилазы ведет к восстановлению образования зон подавления роста этими антибиотиками [8, 20–23].

Для ориентировочной оценки содержания тимидина в питательной среде АГВ в нее было добавлено 5% лизированной лошадиной крови. Несмотря на это, был отмечен видимый рост бактерий вокруг диска с триметопримом/сульфаметоксазолом. По мнению R. Fegone с соавт. [17], это свидетельствует о наличии высоких (>25 мг/л) концентраций тимидина. При этом или концентрация тимидина превышает количество тимидин-фосфорилазы ли-

зированной лошадиной крови, или тимин в высокой концентрации служит антагонистом действия антифолатов.

Pseudomonas aeruginosa

При тестировании чувствительности контрольного штамма *P. aeruginosa* ATCC 27853 и клинических штаммов синегнойной палочки к исследуемым антимикробным препаратам, обладающим антисинегнойной активностью, было отмечено, что вид используемой для тестирования питательной среды существенно не влияет на результаты определения

Таблица 8. Сравнение результатов определения чувствительности *P. aeruginosa* к антибиотикам на АГВ и МХА

Антибиотики	N	Bias (M), мм	σ , мм	Границы 95% интервала согласия, мм	
				нижняя	верхняя
Тикарциллин/клавуланат	200	0,49	1,34	-2,19	3,17
Цефоперазон	200	0,32	0,80	-2,56	2,04
Имипенем	400	-1,92	1,69	-5,30	1,46
Нетилмицин	400	3,26	3,18	-3,10	9,62
Амикацин	108	1,74	1,79	-1,84	5,32
Ципрофлоксацин	216	1,16	1,89	-2,62	4,94
Норфлоксацин	216	1,11	1,82	-2,53	4,75
Офлоксацин	172	1,17	1,79	-2,41	4,75

чувствительности ДДМ к тикарциллину/клавуланату и цефоперазону (табл. 8).

Однако, значительные величины стандартных отклонений от средних значений и широкие 95% интервалы согласия, полученные при сравнении диаметров зон подавления роста штаммов синегнойной палочки вокруг дисков с имипенемом, нетилмицином, амикацином и фторхинолонами (ципрофлоксацином, норфлоксацином и офлоксацином) на среде АГВ и МХА, указывают на то, что состав среды АГВ оказывает существенное влияние на результаты определения чувствительности к перечисленным антибактериальным препаратам.

При определении чувствительности к аминогликозидам (нетилмицину и амикацину) и фторхинолонам (ципрофлоксацину, норфлоксацину и офлоксацину) на среде АГВ было обнаружено положительное смещение результатов относительно референтного агара Мюллера – Хинтон. Таким образом, на среде АГВ при тестировании чувствительности синегнойной палочки к указанным аминогликозидам и фторхинолонам формируются зоны подавления роста большего диаметра, чем на МХА. Это может приводить к получению ложно-чувствительных результатов и недооценке резистентности к этим антимикробным препаратам при тестировании на АГВ с использованием международных критериев интерпретации результатов, разработанных для МХА.

В отличие от тикарциллина/клавуланата и цефоперазона, результаты определения чувствительности к которым не зависят от вида используемой питательной среды, и от аминогликозидов и фторхинолонов, изменения активности которых при тестировании *in vitro* описаны выше; при определении чувствительности к имипенему на АГВ были получены меньшие зоны подавления роста, чем на МХА. Отрицательное смещение результатов на АГВ, в

сравнении с МХА, указывает на возможность получения ложной резистентности к имипенему у штаммов синегнойной палочки при тестировании на АГВ.

Результаты тестирования контрольного штамма *P. aeruginosa* ATCC 27853 подтверждают данные, полученные при определении чувствительности клинических штаммов (табл. 9). Так, все диаметры зон подавления роста контрольного штамма синегнойной палочки вокруг дисков с тикарциллином/клавуланатом и цефоперазоном как на МХА, так и на АГВ, соответствовали требуемому NCCLS диапазону значений. При тестировании чувствительности контрольного штамма к имипенему на среде АГВ были получены меньшие зоны подавления роста, чем на МХА; при определении чувствительности к нетилмицину, амикацину и фторхинолонам (ципрофлоксацину, норфлоксацину и офлоксацину) – большие. Зоны подавления роста контрольного штамма на АГВ не соответствовали указанным в стандартах NCCLS.

Известно, что основным фактором, способным повлиять на показатели чувствительности *in vitro* синегнойной палочки к аминогликозидам, является содержание двухвалентных катионов Ca^{2+} и Mg^{2+} в питательной среде для определения чувствительности [6, 7, 24]. Все подобные работы, выполненные в 70-е – 80-е годы, изучали влияние концентрации данных катионов на результаты определения чувствительности к самому распространенному антибиотику из группы аминогликозидов – гентамицину. Результатом подобных исследований стала разработка международных требований к содержанию катионов в питательных средах для определения чувствительности [25].

Вторым фактором, способным изменить результаты определения чувствительности к аминогликозидам при тестировании *in vitro*, является pH пита-

Таблица 9. Сравнение результатов тестирования контрольного штамма *P. aeruginosa* ATCC 27853 на среде АГВ и МХА

Антибиотики	Диаметр зоны подавления роста, мм		
	NCCLS	МХА	АГВ
Тикарциллин/клавуланат	20–28	21–25	22–27
Цефоперазон	23–29	25–26	26–27
Имипенем	20–28	22–24	19–22
Нетилмицин	17–23	20–21	25–27
Амикацин	18–26	19–25	23–28
Ципрофлоксацин	25–33	27–31	34–36
Норфлоксацин	22–29	25–29	31–34
Офлоксацин	17–21	18–21	20–24

тельной среды. Известно, что аминогликозиды, молекулы которых несут положительный заряд, проявляют большую активность в щелочной среде. В соответствии с рекомендациями производителей рН агара Мюллера – Хинтон должен быть $7,3 \pm 0,1$ [26], а среды АГВ – $7,4 \pm 0,2$ [11].

Снижение *pH* и повышенное содержание двухвалентных катионов оказывают аналогичное антагонистическое действие на активность фторхинолонов (например, ципрофлоксацина и энноксацина) в отношении штаммов синегнойной палочки [27–29] при определении чувствительности *in vitro*. В кислой среде происходит снижение активности не только ципрофлоксацина, но и норфлоксацина и офлоксацина [30]. Кроме того, в исследовании Birkenhead с соавт. [31] было показано влияние избыточного количества катионов цинка и никеля в среде для определения чувствительности на активность имипенема *in vitro*.

Нами был проведен химический анализ *pH* и определение катионов Ca^{2+} , Mg^{2+} и Zn^{2+} методом атомной абсорбционной спектрофотометрии в МХА (серия 1000Н9DGUH) и АГВ (серии 32475 и 39643), использованных для тестирования этих антимикробных препаратов. Результаты показали, что рН агаров соответствовали рекомендациям производителей и составляли соответственно 7,2, 7,6 и 7,6. Содержание катионов кальция и магния в МХА также практически соответствовало требованиям и составило 56,1 и 11,34 мг/л соответственно, цинка – 56,1 мг/л. В питательной среде АГВ двух серий содержание различных катионов в два и более раз превышало аналогичные показатели МХА и составило: Ca^{2+} – 100,2 и 100,2 мг/л; Mg^{2+} – 40,13 и 42,84 мг/л, Zn^{2+} – 155 и 155 мг/л соответственно. Следует подчеркнуть, что различные исследованные серии среды АГВ были практически идентичны по катионному составу и рН.

Однако, следует признать, что избыточное, не соответствующее международным требованиям [25], содержание катионов Ca^{2+} и Mg^{2+} в отечественной питательной среде АГВ не позволяет объяснить различия результатов (в сравнении с МХА) при определении чувствительности штаммов синегнойной палочки к аминогликозидам и фторхинолонам.

Учитывая, что двухвалентные катионы, встраиваясь в клеточную стенку псевдомонад, снижают ее проницаемость, делая штамм более резистентным к антибактериальным препаратам, размер зон подавления роста вокруг дисков с аминогликозидами и фторхинолонами на среде АГВ должен быть меньше, а не больше, чем на МХА.

Несколько более высокие значения рН среды АГВ по сравнению с МХА также не позволяют объяснить полученные результаты, так как различия в ионной силе сред на 0,2–0,4 (в диапазоне 7,2–7,6) не способны вызвать значительных изменений активности перечисленных антимикробных препаратов (аминогликозидов, фторхинолонов, имипенема) [32].

Аналогичные результаты были получены в 1985 г. С.П. Резван и С.А. Грудиной (Государственный научный центр по антибиотикам, Москва) при сравнении результатов определения чувствительности к аминогликозидным антибиотикам (стрептомицину, канамицину и гентамицину) на средах АГВ (вариант «Унимикон-Ч») и МХА. На АГВ были получены большие зоны подавления роста, чем на МХА, при тестировании чувствительности штаммов синегнойной палочки к указанным аминогликозидам (неопубликованные данные).

Для того чтобы определить, с чем связаны отличия в диаметрах зон подавления роста на АГВ и МХА, в этом исследовании дополнительно определяли МПК аминогликозидных антибиотиков мето-

Таблица 10. Интерпретация результатов тестирования чувствительности *P. aeruginosa* к антибиотикам на среде АГВ и МХА

Антибиотики	Согласие, %	Ошибки, %		
		малые	большие	очень большие
Тикарциллин/клавуланат	91,0	9,0	0	0
Цефоперазон	97,5	2,5	0	0
Имипенем	90,5	8,0	0,5	0
Нетилмицин	66,0	17,0	0	17,0
Амикацин	88,5	8,0	0	3,5
Ципрофлоксацин	90,0	9,5	0	0,5
Норфлоксацин	90,0	9,5	0	0,5
Офлоксацин	88,5	10,0	0	1,5
Допустимые пределы, %	>90,5	<5	<3	<1,5

дом разведения в агаре на сравниваемых средах. При этом было установлено, что значения МПК аминокликозидов в отношении исследованных штаммов, полученные на МХА и АГВ, были близки. Поэтому было высказано предположение, что различия в диаметрах зон подавления роста связаны не с влиянием катионов или pH на активность аминокликозидов или питательной среды на скорость роста микроорганизмов, а с различиями в скорости диффузии антибиотиков в агаровом геле.

Несмотря на то, что в нашей работе не удалось выявить истинную причину полученных различий результатов тестирования чувствительности синегнойной палочки к указанным антибиотикам на АГВ и МХА, следует подчеркнуть, что попытки использовать критерии NCCLS для интерпретации результатов определения чувствительности *P. aeruginosa* на среде АГВ недопустимы. Подобная тактика может приводить к получению ошибочных результатов, следствием чего будет назначение неадекватной антибактериальной терапии при синегнойной инфекции у пациентов. Так, при определении чувствительности *P. aeruginosa* на АГВ в сравнении с МХА было выявлено недопустимо большое количество ошибок в интерпретации результатов: малых – при тестировании тикарциллина/клавуланата, имипенема, ципрофлоксацина, норфлоксацина и офлоксацина; малых и очень больших – при тестировании нетилмицина и амикацина (табл. 10).

При определении чувствительности синегнойной палочки на АГВ частота ошибок в интерпретации результатов находилась в допустимых пределах только в случае цефоперазона. Высокая частота малых ошибок при определении чувствительности к тикарциллину/клавуланату, вероятно, вызвана тем, что в исследуемой популяции *P. aeruginosa* большое количество штаммов имело промежуточ-

ный уровень резистентности к этому антибиотику (около 20%).

С клинической точки зрения особенно неблагоприятно получение ложно-чувствительных результатов (очень больших ошибок) при определении чувствительности синегнойной палочки к аминокликозидам (нетилмицину и амикацину), так как пациенту может быть назначен неэффективный препарат на основе ошибочных результатов микробиологического исследования.

Заключение

Полученные данные свидетельствуют о том, что несоответствие состава среды АГВ требованиям, предъявляемым ВОЗ к питательным средам для определения чувствительности [34]; отсутствие современных отечественных стандартов интерпретации и выявленные существенные различия результатов, получаемых на АГВ и МХА, делают невозможным использование АГВ для тестирования чувствительности синегнойной палочки к имипенему, аминокликозидам (нетилмицину и амикацину) и фторхинолонам (ципрофлоксацину, норфлоксацину и офлоксацину), энтеробактерий – к триметоприму/сульфаметоксазолу (табл. 11).

Попытки использовать среду АГВ с применением международных критериев интерпретации результатов, разработанных для МХА, при определении чувствительности к перечисленным препаратам приводят к тому, что результаты анализов, выдаваемые бактериологическими лабораториями, не только мало полезны для клинической практики, но, более того, могут повлечь за собой назначение неадекватной и неэффективной терапии.

Тестирование чувствительности к антимикробным препаратам из группы антифолатов (сульфаниламидам и триметоприму) на среде АГВ обус-

Таблица 11. Результаты определения возможности использования среды АГВ для определения чувствительности к антибиотикам грамотрицательных аэробных бактерий ДДМ с применением международных критериев интерпретации результатов, разработанных для МХА

Антибиотики	<i>Enterobacteriaceae</i>	<i>P. aeruginosa</i>
Ампициллин/сульбактам	Да	–
Амоксициллин/клавуланат	Да	-
Тикарциллин/клавуланат	Да	Да
Цефоперазон	Да	Да
Имипенем	Да	Нет
Нетилмицин	Да	Нет
Амикацин	Да	Нет
Ципрофлоксацин	Да	Нет
Норфлоксацин	Да	Нет
Офлоксацин	Да	Нет
Триметоприм/сульфаметоксазол	Нет	-

ловливает получение ложно-резистентных результатов в 50–70% случаев вследствие недопустимо высокого содержания в агаре тимина и тимидина. Следовательно, в лабораториях, использующих среду АГВ для определения чувствительности микроорганизмов к триметоприму/сульфаметоксазолу, отмечается гипердиагностика резистентности к нему, что может приводить к заниженной оценке потенциальной эффективности этого антимикробного препарата клиницистами, например, для лечения неосложненных инфекций мочевыводящих путей.

Таким образом, несмотря на определенные возможности использования среды АГВ для тестирования чувствительности некоторых видов «непривередливых» микроорганизмов к ряду антимикробных препаратов ДДМ с использованием международных критериев интерпретации результатов, выявленные существенные ограничения требуют либо модификации состава среды АГВ (в соответствии с требованиями ВОЗ) и разработки отечественных стандартов и критериев интерпретации результатов определения чувствительности, либо перехода рос-

сийских микробиологических лабораторий на использование агара Мюллера – Хинтон.

Мы считаем бесперспективным продолжение промышленного производства среды АГВ и нецелесообразным разработку отечественных стандартов оценки чувствительности, так как это потребует больших материальных затрат и длительного времени. Реальным выходом из сложившейся ситуации является использование международно признанной питательной среды Мюллера–Хинтон со стандартизированным содержанием катионов и низкой концентрацией тимидина. Стоимость этой среды, предлагаемой известными в мире микробиологическими компаниями, на порядок выше стоимости АГВ, однако состав МХА не защищен патентами, и она может быть свободно воспроизведена.

На основании этого мы призываем отечественные микробиологические компании наладить производство агара Мюллера – Хинтон и ходатайствуем перед Минздравом России об издании официальных рекомендаций по использованию для определения чувствительности только агара Мюллера – Хинтон, а не среды АГВ.

Литература

1. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; eleventh informational supplement. 2001: 21 (1).
2. World Health Organization. Manual on antimicrobial resistance and susceptibility testing. Geneva: World Health Organization; 1997.
3. Paladino J.A., Zimmer G.S., Schentag J.J. The economic

- potential of dual individualization methodologies. *Pharmacoeconomics* 1996; 10: 539-45.
4. Houang E.T., Hince C., Howard A.J. The effect of composition of culture media on MIC values of antibiotics. In: Russel A.D., Quesnel L.B., editors. *Antibiotics: assessment of antimicrobial activity and resistance*. The Society of Applied Bacteriology Technical series No. 18. London: Academic Press; 1983. p. 31-48.
5. Bauer A.W., Kirby W.M.M., Sherris J.C., Turck M.

- Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *Am J Clin Pathol* 1966; 45: 493-6.
6. D'Amato R.F., Thornsberry C., Baker C.N. Effect of calcium and magnesium ions on the susceptibility of *Pseudomonas* species to tetracyclin, gentamicin, polymixin B and carbenicillin. *Antimicrob Agents Chemother* 1975; 7: 596-600.
 7. Чайковская С.М., Навашин С.М., Точеная Н.П. Изменения чувствительности микроорганизмов к антибиотикам под влиянием ионов двухвалентных металлов. *Антибиотики* 1978; (2):118-22.
 8. Bushby S.R.M. Trimethoprim-Sulfamethoxazole: *in vitro* microbiological aspects. *J Infect Dis* 1973; 128:S442-S462.
 9. Cooper K.E. The theory of antibiotic inhibition zones. In: Kavanagh F., editor. *Analytical microbiology*. New York: Academic Press; 1964. p. 1-86.
 10. Vandepitte J., Engbaek K., Piot P., Heuck C.C. *Basic laboratory procedures in clinical bacteriology*. Geneva: World Health Organization; 1991.
 11. Методические указания по определению чувствительности микроорганизмов к антибиотикам методом диффузии в агар с использованием дисков. М.: Министерство здравоохранения СССР; 1983.
 12. Mueller J.H., Hinton J. A protein-free medium for isolation of *Gonococcus* and *Meningococcus*. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*. 1941; 48:330-3.
 13. Altman D.G. Some common problems in medical research. In: Altman D.G., editor. *Practical statistics in medical research*. London: Chapman & Hal; 1991. p. 396-439.
 14. Jorgensen J.H. Selection criteria for antimicrobial susceptibility testing system. *J Clin Microbiol* 1993; 31: 2841-4.
 15. Elder B.L. Verification and validation of procedures in the clinical microbiology laboratory. *Clin Microbiol Newsletter* 1997; 19:153-6.
 16. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Development of *in vitro* susceptibility testing criteria and quality control parameters. Approved guideline. NCCLS Document M23-A. 1994:14(9).
 17. Ferone R., Bushby S.R.M., Burchall J.J. Identification of Harper-Crawston factor as thymidine phosphorylase and removal from media of substances interfering with susceptibility testing to sulfonamides and diamino pyrimidines. *Antimicrob Agents Chemother* 1975; 7:91-8.
 18. Koch A.E., Burchal J.J. Reversal of antimicrobial activity of trimethoprim by thymidine in commercially prepared media. *Appl Microbiol* 1971; 22:812-7.
 19. Stokes A., Lacey R.W. Effect of thymidine on activity of trimethoprim and sulfamethoxazole. *J Clin Pathol* 1978; 31:165-71.
 20. Bauer A.W., Sherris J.C. The determination of sulfonamide susceptibility of bacteria. *Chemotherapy* 1964; 9:1-19.
 21. Harper G.J., Crawston W.C. *In vitro* determination of sulfonamide sensitivity of bacteria. *J Pathol Bacteriol* 1945; 57:59-66.
 22. Jones C. Effect of minimal amounts of thymidine on activity of trimethoprim/sulfamethoxazole against *Staphylococcus epidermidis*. *Antimicrob Agents Chemother* 1987; 31:144-7.
 23. Then R., Angehrn P. Nature of the bactericidal action of sulfonamides and trimethoprim, alone and in combination. *J Infect Dis* 1973; 128:498-501.
 24. Garrod L.P., Waterworth P.M. The effect of medium composition on the apparent sensitivity of *Pseudomonas aeruginosa* to gentamicin. *J Clin Pathol* 1969; 22:534.
 25. Technical recommendations for *in vitro* susceptibility testing. Report of the Comite de l'Antibiogramme de la Societe Francaise de Microbiologie. *Clin Microbiol Infect* 1996; 2:S11-S25.
 26. Atlas R.M., Parks L.C. *Handbook of microbiological media*. 2nd ed. Boca Raton: CRC Press; 1997.
 27. Blaser J., Dudley M.N., Gilbert D., Inner S.H. Influence of medium and method on the *in vitro* susceptibility of *Pseudomonas aeruginosa* and other bacteria to ciprofloxacin and enoxacin. *Antimicrob Agents Chemother* 1986; 29:927-29.
 28. Blaser J., Luthy R. Comparative study of antagonistic effects of low pH and cation supplementation on *in vitro* activity of quinolones and aminoglycosides against *Pseudomonas aeruginosa*. *J Antimicrob Chemother* 1988; 22:15-22.
 29. Sabath L.D. Antagonism of antimicrobial agents by products of inflammation. In: Sabath L.D., editor. *Action of antibiotics in patients*. Bern: Hans Huber Publishers; 1982. p. 74-82.
 30. Smith J.T., Ratcliffe N.T. Activity of 4-fluoroquinolone antibacterials at physiological pH values. In: *Recent advances in chemotherapy, Antimicrobial section 2: Proceedings of the 14th International Congress of Chemotherapy, 1985*. Kyoto, Japan. 1985. p. 1861-2.
 31. Birkenhead D., Hawkey P.M., Taylor M.J. The effect of ionic Zn (Zn^{++}) and Nickel (Ni^{++}) on susceptibility of *Stenotrophomonas maltophilia* to carbapenems. *Proceedings of the 35th International Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 1995*. San Francisco, USA, 1995. Abstract D 21.
 32. Konig C., Simmen H.P., Blaser J. Effect of pathological changes of pH, pO_2 and pCO_2 on the activity of antimicrobial agents *in vitro*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1993; 7:519-26.
 33. World Health Organization Expert Committee on Biological Standardization. WHO Technical Report Series 610. Annex 5. Geneva: World Health Organization; 1977. p. 144-78.