

УДК 579.862.2.044:615.33

## Выделение, идентификация и определение чувствительности к антибиотикам *Streptococcus pneumoniae*\*

В методических рекомендациях приведены общие сведения об одном из основных возбудителей внебольничных бактериальных инфекций – *Streptococcus pneumoniae* (пневмококке). Подробно обсуждаются забор клинического материала, селективные и неселективные питательные среды для выделения, морфологические и фенотипические подходы к идентификации. Особое внимание уделено правилам пригото-

вления и хранения реагентов. Рассмотрены преимущества и недостатки различных методов определения чувствительности пневмококков к современным антимикробным препаратам, а также приведены критерии интерпретации полученных результатов на основе международных рекомендаций (NCCLS).

Для врачей-микробиологов, эпидемиологов, лаборантов.

## Isolation, Identification and Antimicrobial Susceptibility Testing of *Streptococcus pneumoniae*

These guidelines are focused on one of the most frequent bacterial pathogen causing community-acquired infections – *Streptococcus pneumoniae*. Collection of clinical specimens, selective and non-selective media for isolation, morphological and phenotypic approaches to identification are described in details. A special attention is drawn to

preparation and storage of different reagents. Advantages and disadvantages of different susceptibility testing methods are highlighted. Criteria for interpretation of results based on international guidelines (NCCLS) are presented.

These guidelines are designed for microbiologists, epidemiologists, and laboratory assistants.

### Используемые аббревиатуры

АГВ – агар Гивенталья–Ведьминой  
АРП – антибиотикорезистентные пневмококки  
КА – кровяной агар  
КОЕ – колониеобразующие единицы

ЛК – лизированная кровь  
МПК – минимальная подавляющая концентрация  
МХА – агар Мюллера–Хинтон  
МХБ – бульон Мюллера–Хинтон  
ПРП – пенициллинорезистентные пневмококки

ПСБ – пенициллинсвязывающие белки  
АТСС – Американская коллекция типовых культур  
NCCLS – Национальный комитет по клиническим лабораторным стандартам США

Авторский коллектив:

О.И. Кречикова (Центр Госсанэпиднадзора по Смоленской области),

Р.С. Козлов, Т.М. Богданович, О.У. Стецюк, М.М. Суворов (НИИ антимикробной химиотерапии

Смоленской государственной медицинской академии),

Л.К. Катосова (Научный центр здоровья детей РАМН),

Л.А. Вишнякова, М.Е. Фаустова (Институт пульмонологии Санкт-Петербургского государственного медицинского университета им. И.П. Павлова).

Под редакцией Л.С. Страчунского (НИИ антимикробной химиотерапии Смоленской государственной медицинской академии).

\*Рекомендованы Межрегиональной ассоциацией по клинической микробиологии и антимикробной химиотерапии (МАКМАХ), Научно-исследовательским институтом антимикробной химиотерапии Смоленской государственной медицинской академии.

## Введение

Пневмококк (*Streptococcus pneumoniae*) – микроорганизм, колонизирующий верхние отделы дыхательных путей и являющийся одним из основных возбудителей менингита, среднего отита, синусита, внебольничной пневмонии у детей и взрослых. В более редких случаях пневмококк может вызывать инфекции другой локализации (эндокардит, септический артрит, первичный перитонит, флегмоны и др.).

Терапия пневмококковых инфекций на протяжении десятилетий основывалась на использовании пенициллина вследствие его высокой активности в отношении возбудителя. В 1965–1967 гг. в США и Австралии были выделены пенициллинорезистентные пневмококки (ПРП), сообщения о появлении и распространении которых резко возросли в последние годы. ПРП часто устойчивы к макролидам, триметоприму/сульфаметоксазолу, а в отдельных случаях – к цефалоспорином III поколения. Именно поэтому, с практической точки зрения, более целесообразно использовать термин “антибиотикорезистентные пневмококки” (АРП).

Появление и распространение АРП серьезно осложняет выбор антибактериальной терапии, что придает особую важность правильному и своевременному бактериологическому исследованию.

## Общая характеристика пневмококков

*S. pneumoniae* является представителем рода *Streptococcus*, семейства *Streptococcaceae*, в который входят грамположительные, каталазо- и оксидазоотрицательные шаровидные бактерии (кокки), являющиеся факультативными анаэробами, рост которых усиливается при повышении со-

держания углекислого газа в атмосфере инкубации до 5–7%.

Строение клеточной стенки стрептококков типично для грамположительных бактерий. Ее основой является пептидогликан со встроенными углеводами, тейхоевыми кислотами, липопротеинами и поверхностными белками.

Для пневмококков характерно наличие мощной полисахаридной капсулы, которая выполняет защитную функцию, препятствуя опсонизации и последующему фагоцитозу. Существует по крайней мере 90 различных капсульных типов *S. pneumoniae*, но большинство (>90%) инвазивных заболеваний вызывается 23 серотипами, которые входят в широко используемую в настоящее время полисахаридную вакцину.

## Бактериологическая диагностика пневмококковой инфекции

Материалом для бактериологического исследования служат кровь, спинномозговая и плевральная жидкости, аспираты из синуса и среднего уха, мокрота и др.

При поступлении на исследование мокроты особое внимание следует обратить на оценку качества доставленного образца. Критериями пригодности мокроты для бактериологического исследования является наличие более 25 сегментоядерных лейкоцитов и не более 10 эпителиальных клеток в поле зрения при просмотре, как минимум, 20 полей зрения мазка, окрашенного по Граму (под увеличением  $\times 100$ ).

## Принципы выделения пневмококка из клинического материала

Для выделения пневмококка из клинического материала необходимо соблюдать следующие условия.

**Использование приемлемых питательных сред.** Пневмококк является “привередливым” микроорганизмом, требующим для роста на искусственных питательных средах высокого содержания аминного азота и нативного белка животного происхождения.

**Наличие в среде дефибрированной крови.** Кровь необходима не столько для обогащения среды нативными белками, сколько для использования возможности идентификации гемолитической реакции пневмококка. Потребность пневмококка в белках может быть обеспечена добавлением сыворотки крови животных (лошади, барана).

**Инкубация в атмосфере с повышенным содержанием CO<sub>2</sub>.** Наиболее распространенным методом создания повышенной концентрации CO<sub>2</sub> является использование эксикатора, в который помещается зажженная свеча, которая при горении утилизирует кислород. Когда она гаснет, концентрация CO<sub>2</sub> достигает 3%. Однако наиболее эффективным является применение CO<sub>2</sub>-термостата.

Исследуемый материал засевают на агар с добавлением 5% дефибрированной крови барана, лошади, крупного рогатого скота или человека\*.

**Цитратная кровь непригодна для исследования.**

В качестве основы для приготовления кровяного агара (КА) используют колумбийский агар (Columbia agar), агар для бруцелл (Brucella agar), основу для КА (Blood agar base), эритрит агар, ГРМ-агар и др.\*\*

Вероятность выделения пневмококка из мокроты увеличива-

\* В России в ряде лабораторий имеется опыт использования эритроцитной массы из крови человека вместо дефибрированной крови.

\*\* Способ приготовления основы КА на отечественных питательных средах изложен в Приложении.

ется при использовании селективных сред, содержащих добавки, ингибирующие рост сапрофитных грамотрицательных микроорганизмов (нейссерий, гемофильных палочек и др.). Такой средой, например, является агар Columbia CNA, селективными добавками в котором являются колистин и налидиксовая кислота. Другой вариант – среда с добавлением гентамицина в конечной концентрации 5 мг/л (см. Приложение).

### Принципы идентификации пневмококков

Идентификация пневмококков проводится на основании:

- морфологических особенностей роста;
- фенотипических характеристик;
- антигенной структуры (серологический метод).

### Морфологическая характеристика

Гемолитическая реакция стрептококков на КА является отправной точкой в идентификации пневмококков. Различают 3 основных типа гемолитической реакции:

- $\alpha$ -гемолиз (частичный гемолиз эритроцитов) – зеленое окрашивание агара вокруг колонии;
- $\beta$ -гемолиз (полный гемолиз эритроцитов) – зона полного просветления вокруг колонии;
- $\gamma$ -гемолиз (или отсутствие гемолиза).

*S. pneumoniae* –  $\alpha$ -гемолитический (зеленящий) стрептококк, который по морфологическим признакам роста трудно отличим от других  $\alpha$ -гемолитических (“зеленящих”) стрептококков – *S. mitis*, *S. oralis*, *S. sanguis*, *S. parva-sanguis*, *S. gordonii*.

Пневмококки при росте на КА могут давать несколько типов колоний, что зависит от степени выраженности капсулы. Колонии с

сильно развитой капсулой, например серотипа 3, могут иметь несколько миллиметров в диаметре и быть настолько слизистыми, что напоминают каплю масла на агаровой поверхности; их идентификация не представляет существенных проблем. Колонии штаммов с менее выраженной капсулой имеют небольшие размеры, а их выделение сопряжено с определенными трудностями.

Использование стереомикроскопа с увеличением  $7 \times 2,5$  позволяет увидеть характерные морфологические особенности роста пневмококка – сероватый оттенок колоний, выпуклую поверхность и влажную “сметанообразную” консистенцию, что существенно облегчает его идентификацию. При длительной инкубации (48 ч) центральная часть колонии может опускаться, давая характерную блюдцеобразную форму, что объясняется действием пневмококковых аутолизинов. Колонии некоторых штаммов могут полностью уплощаться, образуя поверхность “шляпки гвоздя”.

### Фенотипические методы идентификации

Дальнейшая идентификация *S. pneumoniae* проводится стандартными фенотипическими методами, основными из которых являются **чувствительность к оптохину и лизис в присутствии солей желчи**.

### Чувствительность к оптохину

**Принцип.** Метод основан на способности оптохина (этилгидрокупреина гидрохлорида) селективно подавлять рост пневмококка в отличие от других зеленящих стрептококков.

#### Материалы:

1) агар с добавлением 5% дефибрированной крови (основы см. раздел “Питательные среды”);

2) диски, содержащие 5 мкг оптохина (optochin test, “БиоМерье”; Тахо Р, BBL).

**Процедура.** Произвести посев 1 колонии  $\alpha$ -гемолитического стрептококка, подозрительного по морфологии на пневмококк, штрихом на сектор КА. Поместить диск с оптохином на засеянную поверхность и инкубировать в течение 18–24 ч при температуре 35°C в атмосфере с 5–7%  $\text{CO}_2$ .

**Интерпретация результата.** Зона задержки роста  $\geq 14$  мм (диск диаметром 6 мм) или  $\geq 16$  мм (диск диаметром 10 мм) свидетельствует о наличии *S. pneumoniae*. Зона задержки роста  $< 14$  мм ( $< 16$  мм) требует подтверждения испытуемой культуры на принадлежность к *S. pneumoniae* в тесте лизиса в присутствии солей желчных кислот.

**Ограничения метода.** Примерно 4–5% пневмококков резистентны к оптохину, а рост некоторых “зеленящих” стрептококков подавляется оптохином (с образованием узкой зоны задержки роста).

**Контроль качества.** Цель: контроль качества дисков с оптохином. Контрольные штаммы: положительный контроль – *S. pneumoniae* ATCC 49619, отрицательный контроль – *S. salivarius* ATCC 13419 (или любой зеленящий стрептококк).

Методика постановки и интерпретация результатов соответствует описанной выше.

### Лизис в присутствии солей желчных кислот

**Принцип.** Соли желчи (в особенности дезоксихолат натрия и таурохолат натрия) обладают способностью избирательно лизировать колонии *S. pneumoniae* на агаре или в бульоне. Метод основан на активации пневмококковых аутолизинов – ферментов, участвующих в син-

тезе клеточной стенки. Соли желчных кислот активируют аутолизисы большинства штаммов, что приводит к визуальному лизису *S. pneumoniae* в течение 0,5–2 ч. Наиболее стандартизованным является пробирочный метод, который описан ниже.

**Материалы.** Существует несколько вариантов проведения теста лизиса в присутствии солей желчных кислот. Используется 10% раствор дезоксихолата натрия, приготовленный следующим образом:

дезоксихолат натрия – 1 г;  
стерильная дистиллированная вода\* – 9 мл;  
рН – 7,0.

Раствор стерилизуется на водяной бане 5 мин. Хранится в холодильнике в темной емкости. При выпадении осадка (при снижении рН <6,5) реагент не пригоден для дальнейшего использования.

**Процедура.** Приготовить суспензию исследуемого штамма в 1–2 мл стерильной дистиллированной воды (или 0,9% раствора хлорида натрия) до мутности 1 по стандарту МакФарланда. Половину полученной суспензии перенести в другую пробирку, равную по диаметру.

К пробирке, маркированной словом “Тест”, добавить 3–4 капли 10% раствора дезоксихолата натрия, а к другой, с маркировкой “Контроль” – 3–4 капли 0,9% раствора хлорида натрия. Тщательно встряхнуть пробирки и инкубировать 0,5–2 ч при температуре 35°C, после чего следует визуально сравнить мутность микробной суспензии в 2 пробирках.

**Интерпретация.** Просветление жидкости в пробирке “Тест”

по сравнению с пробиркой “Контроль” свидетельствует о принадлежности культуры к *S. pneumoniae*.

**Ограничения теста.** Примерно 86% пневмококков полностью лизируются в присутствии солей желчи. Для штаммов с неполным лизисом может потребоваться использование других тестов, например серологических.

Использование нативной, сухой или медицинской желчи не обеспечивает достоверных результатов, поскольку такая желчь не стандартизована по содержанию желчных кислот.

**Контроль качества.** Цель: контроль качества раствора дезоксихолата натрия. Контрольный штамм: положительный контроль – *S. pneumoniae* ATCC 49619, отрицательный контроль – *S. salivarius* ATCC 13419 или любой зеленающий стрептококк.

Методика постановки и интерпретация соответствуют описанной выше.

### **Альтернативные методы идентификации**

Наряду с фенотипическими существуют альтернативные методы идентификации *S. pneumoniae*, самым распространенным из которых является серологический. Тест основан на выявлении пневмококковых капсульных полисахаридных антигенов с использованием поливалентной специфической пневмококковой сыворотки.

Имеются коммерческие диагностические наборы для выполнения латекс-агглютинационного теста, например “Slidex pneumokit” фирмы “биоМерье”. Этот метод может использоваться для ускоренного выявления пневмококка непосредственно с чашки первичного посева.

### **Определение чувствительности к антимикробным препаратам**

Определение чувствительности пневмококка к антибактериальным препаратам сопряжено с определенными трудностями. До настоящего времени в России этому уделялось недостаточно внимания. В “Методических указаниях по определению чувствительности микроорганизмов методом диффузии в агар с использованием дисков” Минздрава СССР (1983), в методическом письме Минздрава РСФСР «Определение антибиотикочувствительности микроорганизмов диско-диффузионным методом» (1984) и “Методических указаниях по определению чувствительности стрептококков к антибиотикам” (1985) Минздрава СССР методика тестирования не описана и не приведены интерпретационные критерии для пневмококков.

Рекомендуемая этими документами среда АГВ не пригодна для определения чувствительности пневмококка к ингибиторам фолиевой кислоты, так как содержит повышенное количество тимидина и тимина, за счет которых восполняется потребность бактериальной клетки в этих веществах, используемых при синтезе нуклеиновых кислот. В результате устраняется ингибирующий эффект сульфаниламидов и триметоприма, что проявляется как ложная резистентность пневмококка к этим препаратам.

В настоящее время большинство исследователей при определении чувствительности микроорганизмов к антибиотикам руководствуется стандартами NCCLS – Национального комитета по клиническому лабораторному стандарту США. Вследствие этого основные исследования чувствительности пневмококков к анти-

\* Вместо дистиллированной воды можно использовать стерильный 0,9% раствор хлорида натрия или бульон с рН = 7,4.

биотикам проводятся в соответствии с этими рекомендациями.

Обязательным является определение чувствительности пневмококков к пенициллину, эритромицину, триметоприму/сульфаметоксазолу (I группа). Определение чувствительности к другим препаратам, например тетрациклину, офлоксацину и ванкомицину, проводится только при необходимости (наличии резистентности к препаратам I группы и др.). При системных инфекциях и при резистентности к пенициллину в обязательный набор антибиотиков для определения чувствительности входят цефалоспорины III поколения (цефотаксим или цефтриаксон).

Наибольшее значение имеет резистентность *S. pneumoniae* к пенициллину, который на протяжении десятилетий являлся препаратом выбора при лечении пневмококковых инфекций.

**Особенности определения чувствительности к пенициллину.** Механизм резистентности *S. pneumoniae* к пенициллину и другим  $\beta$ -лактамам обусловлен изменением пенициллинсвязывающих белков (ПСБ) клеточной стенки. В результате ступенчатых мутаций уменьшается сродство ПСБ к  $\beta$ -лактамам антибиотикам.

Штаммы *S. pneumoniae*, чувствительные к пенициллину, могут иметь сниженную чувствительность к цефалоспорином и наобо-

рот. Иногда ПРП обладают резистентностью к цефалоспорином III поколения (цефотаксиму и цефтриаксону).

По величине МПК пенициллина пневмококков можно разделить на 3 группы:

- чувствительные – МПК  $\leq 0,06$  мг/л;
- умеренно резистентные – МПК 0,12–1 мг/л;
- резистентные – МПК  $\geq 2$  мг/л.

**Для определения чувствительности пневмококка к пенициллину проводят “скрининг” диско-диффузионным методом с дисками, содержащими 1 мкг оксациллина.**

Не рекомендуется использовать диски, содержащие пенициллин, так как он не всегда выявляет умеренно резистентные штаммы, поскольку зоны подавления роста пенициллином у таких штаммов перекрывают значения для чувствительных штаммов.

Определение чувствительности пневмококка к другим антибиотикам (за исключением амоксициллина, ампициллина, карбапенемов, цефалоспоринов) проводится с использованием соответствующих дисков.

#### Материалы:

1) агар Мюллера – Хинтона (МХА) с добавлением 5% дефибринированной бараньей крови;

2) стандартные диски с антибиотиками – 1 мкг оксациллина, 15 мкг эритромицина, 1,25/23,75 мкг

триметоприма/сульфаметоксазола, 30 мкг тетрациклина, 30 мкг хлорамфеникола, 5 мкг офлоксацина;

3) стерильный 0,9% раствор натрия хлорида;

4) стандартные стерильные тампоны;

5) стандарт мутности 0,5 по МакФарланду ( $1,5 \times 10^8$  КОЕ/мл).

**Процедура.** МХА готовится по прописи на этикетке. После добавления 5% дефибринированной крови агар разливается по чашкам с толщиной слоя агара 4 мм (на чашку диаметром 100 мм требуется 25 мл агара, на чашку диаметром 90 мм – 20 мл). Суспензию готовят на 0,9% растворе натрия хлорида до мутности 0,5 по стандарту МакФарланда из 18–24-часовой культуры *S. pneumoniae*, выращенной на КА. Для инокуляции используют стерильные ватные тампоны. Тампон погружают в пробирку с суспензией, отжимают избыток инокулюма о стенки пробирки и наносят на поверхность агара штрихами в 3 направлениях под углом 60°, не внося дополнительного количества суспензии.

На нанесенную культуру помещают диски с антибиотиками, на чашку диаметром 100 мм – не более 6 дисков.

У штаммов, выделенных из крови, спинномозговой жидкости, одновременно определяют МПК пенициллина и цефотаксима (или цефтриаксона).

Таблица 1. Критерии интерпретации чувствительности пневмококков диско-диффузионным методом на агаре Мюллера – Хинтона с 5% дефибринированной бараньей кровью

Антибиотик	Количество антибиотика в диске, мкг	Диаметр зоны задержки роста, мм		
		Резистентный	Умеренно резистентный	Чувствительный
Пенициллин (диск с оксациллином)	1	–	–	$\geq 20$
Эритромицин	15	$\leq 15$	16–20	$\geq 21$
Тетрациклин	30	$\leq 18$	19–22	$\geq 23$
Триметоприм/сульфаметоксазол	1,25/23,75	$\leq 15$	16–19	$\geq 20$
Хлорамфеникол	30	$\leq 20$	–	$\geq 21$
Офлоксацин	5	$\leq 12$	13–15	$\geq 16$

Таблица 2. Критерии интерпретации чувствительности пневмококков диско-диффузионным методом на среде АГВ с добавлением 5% дефибринированной человеческой крови

Антибиотик	Количество антибиотика в диске, мкг	Диаметр зоны подавления роста, мм		
		Резистентный	Умеренно резистентный	Чувствительный
Пенициллин (диск с 1 мкг оксациллина)	1	–	–	≥20
Азитромицин	15	≤13	14–17	≥18
Кларитромицин	15	≤16	17–20	≥21
Клиндамицин	2	≤15	16-18	≥19
Офлоксацин	5	≤12	13-15	≥16

Тестирование диско-диффузионным методом не дает достоверных результатов при определении чувствительности *S. pneumoniae* к цефалоспорином, ампициллину, амоксициллину, карбапенемам .

Чашки инкубируют в течение 20–24 ч при температуре 35°C в атмосфере с 5–7% CO<sub>2</sub> .

**Учет результатов.** Зона задержки роста измеряется с помощью линейки или каллипера, причем необходимо измерять диаметр (не радиус!) зоны подавления роста. Конечной точкой считается расстояние, в зоне которого нет роста микроорганизмов. По величине зоны задержки роста вокруг дисков интерпретируют полученные результаты (табл. 1).

### Интерпретация результатов:

1) пневмококки, имеющие зону задержки роста ≥20 мм, являются чувствительными (МПК <0,06 мг/л) к пенициллину и считаются чувствительными к ампициллину, амоксициллину, амоксициллину/клавуланату, ампициллину/сульбактаму, цефаклору, цефуроксиму, цефтриаксону, имипенему, меропенему;

2) пневмококки с зоной задержки роста ≤19 мм не всегда являются резистентными к пенициллину (около 12% *S. pneumoniae* с зоной задержки роста ≤19 мм имеют МПК в диапазоне

0,03–0,06 мг/л), поэтому необходимо определение МПК к пенициллину методом серийных разведений или Е-тестами.

### Использование среды АГВ для определения чувствительности *S. pneumoniae*

Принимая во внимание, что МХА недоступен для многих лабораторий, было проведено исследование возможности использования отечественной питательной среды АГВ, обогащенной 5% дефибринированной человеческой крови (в соответствии со сложившейся практикой), вместо МХА с 5% дефибринированной бараньей кровью для определения чувствительности пневмококков к антибиотикам диско-диффузионным методом с использованием рекомендованных NCCLS критериев интерпретации результатов.

Показано, что при определении чувствительности пневмококков на среде АГВ диско-диффузионным методом к пенициллину (с использованием диска, содержащего 1 мкг оксациллина), макролидам (кларитромицину, азитромицину), клиндамицину и офлоксацину диаметры зон подавления роста существенно не отличаются от полученных на МХА с 5% дефибринированной бараньей крови. Чувствительность контрольного штамма *S. pneumoniae* ATCC 49619 к этим антибиотикам также находилась в требуемых NCCLS диапазонах значений.

Следовательно, при отсутствии МХА определение чувствительности пневмококков к оксациллину, кларитромицину, азитромицину, клиндамицину, офлоксацину диско-диффузионным методом можно проводить на среде

Таблица 3. Допустимые диапазоны значений диаметров зон подавления роста для контрольного штамма *S. pneumoniae* ATCC 49619

Антибиотик	Диаметр зоны задержки роста <i>S. pneumoniae</i> ATCC 49619, мм
Пенициллин (диск с оксациллином)	8–12
Эритромицин	25–30
Азитромицин	19–25
Кларитромицин	25–31
Тетрациклин	27–31
Триметоприм/сульфаметоксазол	20–28
Хлорамфеникол	23–27
Офлоксацин	16–21
Клиндамицин	19–25

Таблица 4. Тестируемые антибиотики и диапазон разведений

Антибиотик	Диапазон разведений, мг/л	Стартовая концентрация, мг/л
Бензилпенициллин	0,008–8	16
Цефотаксим	0,008–8	16
Цефтриаксон	0,008–8	16

АГВ и использовать для интерпретации результатов критерии NCCLS (табл. 2)\*.

**Среда АГВ не пригодна для определения чувствительности пневмококков к триметоприму/сульфаметоксазолу, поскольку содержит повышенное количество тимина и тимидина, снижающие их антимикробную активность *in vitro*.** Это объясняется тем, что антифолаты действуют как ингибиторы синтеза тимидина, а наличие свободного тимидина в питательной среде нивелирует их действие.

**Контроль качества.** Используется *S. pneumoniae* ATCC 49619. Методика постановки и учета соответствует методике работы с испытуемым штаммом. Результаты оцениваются по критериям, изложенным в табл. 3.

### **Определение минимальной подавляющей концентрации**

Определение МПК широко используется при изучении чувствительности пневмококков к антибиотикам. Особое значение определение МПК имеет при исследовании пневмококков, выделенных у пациентов с менингитом, так как даже умеренная резистентность к пенициллину, которую не всегда можно выявить диско-диффузионным методом, ведет к снижению клинической эффективности пенициллина. Кроме этого, как уже указыва-

лось, определение чувствительности *S. pneumoniae* к цефалоспорином возможно только путем определения МПК.

### **Метод серийных разведений в бульоне**

#### **Макрометод**

Метод серийных разведений в бульоне позволяет определить МПК без значительных материальных затрат. Тестирование небольшого количества штаммов в рутинной практике целесообразно выполнять макрометодом.

#### **Материалы:**

1) стерильный бульон Мюллера – Хинтона со стабилизированным катионным составом (по ионам  $Ca^{++}$ ,  $Mg^{++}$ ) с добавлением 5% лизированной крови лошади (МХБ ЛК); использование крови лошади предпочтительно, так как она содержит тимидинфосфорилазу, благодаря которой среда пригодна для тестирования сульфаниламидов и триметоприма;

2) субстанции антибиотиков с известной активностью;

3) стерильные пробирки размером 13×100 мм или 14×140 мм;

4) стерильные пипетки;

5) дозирующие пипетки со стерильными наконечниками;

6) стандарт мутности 0,5 по МакФарланду.

**Процедура.** Тестирование проводится в объеме 1 мл каждого разведения антибиотика с конечной концентрацией пневмококка примерно  $5 \times 10^5$  КОЕ/мл.

**Приготовление серийных разведений антибиотика.** Серийные разведения антибиотика

готовятся из “стартового” раствора на бульоне Мюллера – Хинтона с 5% лизированной лошадиной кровью (табл. 4).

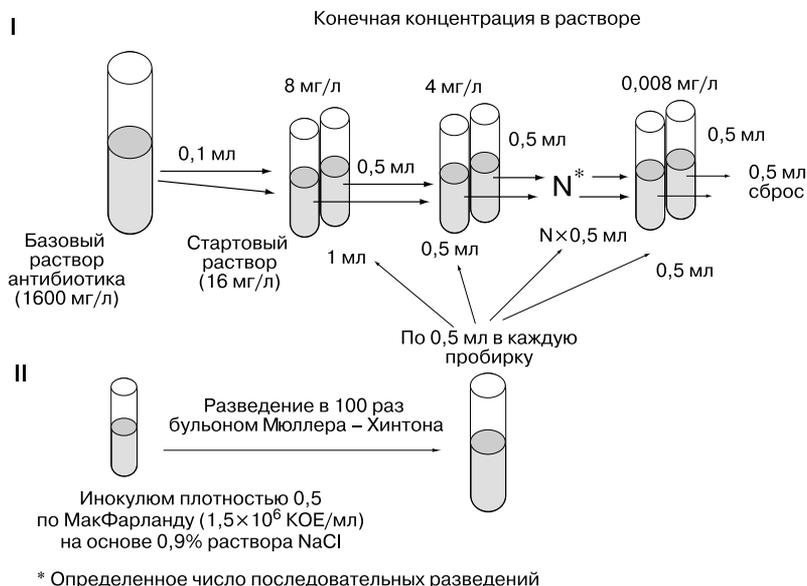
Бульон Мюллера – Хинтона разливается по 0,5 мл в каждую пробирку. В последующем при внесении тестируемой бульонной культуры пневмококка концентрация крови снижается до 2,5%. Лизированную кровь получают многократным (2–3 раза) замораживанием и размораживанием дефибрированной крови. Количество пробирок определяется необходимым диапазоном разведений антибиотика и увеличивается на одну для постановки “отрицательного” контроля.

Базовый раствор антибиотика готовится из навески химически чистой субстанции препарата путем растворения ее в рассчитанном количестве растворителя для получения концентрации 1600 мкг/мл. Использование лечебных препаратов недопустимо.

Подробно методика приготовления базового раствора изложена в “Приложении”. Стартовый раствор антибиотика, приготовленный из базового раствора (рис.1), 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 антибиотика в бульон 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 получается ряд пробирок с растворами антибиотиков, концентрации которых отличаются в соседних пробирках в 2 раза. Одновременно готовится второй ряд серийных разведений антибиотика для тес-

\* Для рокситромицина и мидекамина критерии интерпретации результатов определения чувствительности пневмококков NCCLS не разработаны.



**Рис. 1.** Алгоритм постановки теста с одной испытуемой культурой

тирования контрольного штамма пневмококка.

#### Приготовление инокулюма.

Для приготовления инокулюма используют суточную культуру пневмококка на кровяном агаре. Колонии пневмококка суспендируют в стерильном 0,9% растворе натрия хлорида до мутности, эквивалентной 0,5 по стандарту МакФарланда. Последующее разведение этой суспензии в 100 раз готовится на бульоне Мюллера – Хинтона, после чего концентрация пневмококка составит примерно  $10^6$  КОЕ/мл.

По 0,5 мл инокулюма вносят в каждую пробирку, содержащую по 0,5 мл соответствующего разведения антибиотика, и в одну пробирку с 0,5 мл бульона Мюллера – Хинтона без антибиотика („отрицательный“ контроль). Конечная концентрация пневмококка в каждой пробирке достигнет необходимой – примерно  $5 \times 10^5$  КОЕ/мл. Инокулюм должен быть внесен в пробирки с разведениями антибиотика не позднее 30 мин с момента приготовления.

**Постановка теста.** Алгоритм постановки теста с одной испы-

туемой культурой приведен на рис. 1.

**Инкубация.** Пробирки с тестируемыми штаммами, кроме пробирки „отрицательный“ контроль, инкубируются в обычной атмосфере при температуре  $35^\circ\text{C}$  20–24 ч. Пробирка „отрицательный“ контроль помещается в холодильник при температуре

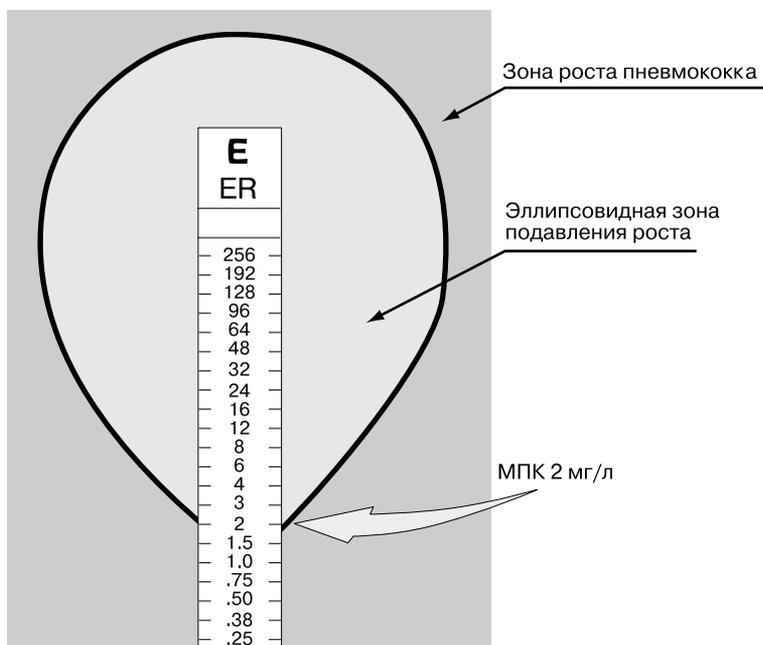
$+4^\circ\text{C}$ , где хранится до учета результатов.

**Учет результатов.** Для определения наличия роста пневмококка пробирки с посевами просматриваются в проходящем свете. Рост культуры в присутствии антибиотика сравнивается с референтной пробиркой („отрицательный“ контроль), содержащей исходный инокулюм и хранившейся в холодильнике. МПК определяется по наименьшей концентрации антибиотика, которая подавляет видимый рост пневмококка.

#### Микрометод

В случае необходимости определения МПК у 8 и более штаммов целесообразно использовать микрометод. Он позволяет тестировать одновременно большое количество штаммов к нескольким антибиотикам.

Тестирование проводится в объеме 0,1 мл, что позволяет значительно сократить количество расходного материала. Методика не имеет отличий от макрометода, за исключением объема, но



**Рис. 2.** Определение МПК с помощью E-тестов

Таблица 5. Критерии интерпретации результатов определения чувствительности пневмококков методами разведений или Е-тестов

Антибиотик	МПК, мг/л		
	Резистентный	Умеренно резистентный	Чувствительный
Бензилпенициллин	≥2	0,12–1	≤0,06
Цефотаксим	>0,25	–	≤0,25
Цефтриаксон	>0,25	–	≤0,25

Таблица 6. Допустимые диапазоны значений МПК для контрольного штамма *S. pneumoniae* ATCC 49619 (NCCLS, 2000)

Антибиотик	Значения МПК для <i>S. pneumoniae</i> ATCC 49619, мг/л
Бензилпенициллин	0,25–1
Цефотаксим	0,06–0,25
Цефтриаксон	0,03–0,12

требует дополнительного оснащения лаборатории многоканальными пипетками, микротитровальными плашками (с круглым или коническим дном) со стерильными крышками, специальным устройством с непрямой подсветкой для учета результатов. Рост микрофлоры в присутствии антибиотика сравнивается с ростом культуры в ячейке без антибиотика.

Каждая партия тестируемых штаммов сопровождается внутренним контролем с использованием контрольного штамма *S. pneumoniae* ATCC 49619.

#### Метод Е-тестов

Е-тест представляет собой пластиковую полоску размером 5×50 мм с нанесенным градиентом концентрации антибиотика (0,002–32, 0,016–256 или 0,063–1024 мг/л в зависимости от препарата). Метод основан на диффузии антибиотиков в агар и позволяет определять значение МПК. Зона задержки роста имеет форму эллипса, размеры которого увеличиваются от меньшей концентрации антибиотика на полоске к большей (рис. 2).

#### Материалы:

1) МХА с добавлением 5% дефибринированной **бараньей или лошадиной крови**; при тестировании триметоприма/сульфаметоксазола используют **лошадиную кровь**;

2) полоски Е-тестов с антибиотиками;

3) стерильный бульон Мюллера–Хинтона;

4) стандартные стерильные тампоны;

5) стандарт мутности 0,5 и 1 по МакФарланду.

**Процедура** приготовления МХА и нанесения культуры аналогична таковой при дискодиффузионном методе. Для **слизистых штаммов** пневмококков бактериальную взвесь готовят до мутности 1 по стандарту МакФарланда. Поверхность микробного газона должна быть сухой, для чего Е-тесты наносят не ранее, чем через 15 мин от момента нанесения газона. Полоски Е-тестов помещаются на поверхность агара пластиковой поверхностью с отметками градиента концентраций кверху. На чашку диаметром 90 мм наносят не более 2 полосок. Посевы инкубируют в течение

20–24 ч при температуре 35°C в атмосфере CO<sub>2</sub>.

**Учет результатов.** Результаты могут быть учтены, если испытуемая культура выросла плотным газоном. Если рост слабый, необходимо продлить термостатирование. В случае “разреженного” роста газона тестирование нужно повторить, проверив качество агара и инокулюма. Результаты учитываются в отраженном свете и/или под лупой, чтобы хорошо рассмотреть край роста. Учитывается зона **полного** подавления роста. Величина МПК определяется значением концентрации, на уровне которой эллипс пересекается со шкалой полоски.

**Интерпретация.** Метод Е-тестов определяет МПК исходя из непрерывного градиента концентраций, включая значения между двукратными разведениями. Для определения категории чувствительности полученные значения следует округлять до ближайших значений двукратных разведений. Например:

1) для чувствительных штаммов значения МПК пенициллина ≤0,06 мг/л; методом Е-тестов определена МПК 0,064 мг/мл, результат интерпретируется как чувствительный;

2) МПК умеренно резистентных штаммов ≥0,1 – ≤1 мг/л; методом Е-тестов определена МПК 0,094 мг/л, результат интерпретируется как умеренно резистентный.

Критерии интерпретации результатов определения чувстви-

тельности к некоторым антибиотикам приведены в табл. 5.

**Контроль качества.** Используется *S. pneumoniae* ATCC

49619. Методика постановки и учета соответствует методике работы с испытуемым штаммом. Результаты интерпретируются

по приведенным ниже критериям (табл. 6).

Приложение 1

## Кровяной агар для выделения *S. pneumoniae* с использованием отечественных питательных агаров

В качестве агаровой питательной основы можно использовать эритроцит-агар, сухой питательный агар, ГРМ-агар (сухой), ГРМ-агар № 1 (сухой), АГВ. При выборе агаровой основы особое внимание обращают на рН среды. Среда с рН ниже 7 не пригодна

для выделения пневмококка. Оптимальная рН среды –  $7,2 \pm 0,2$ .

Навеску агара берут в количестве, указанном на этикетке. После стерилизации агар охлаждают до температуры  $45^\circ\text{C}$ , добавляют 10% инактивированной лошадиной сыворотки, 3% эритро-

цитной массы или 5% дефибрированной крови.

Приготовленная таким образом среда подлежит внутреннему контролю на «чувствительность» и ростовые свойства.

**Контроль качества.** Используется *S. pneumoniae* ATCC 49619.

Приложение 2

## Приготовление базового раствора антибиотика

Базовые растворы готовятся из химически чистых антибиотиков. При тестировании пневмококка к пенициллину, цефотаксиму, цефтриаксону используют субстанции с известной активностью (но не лечебные препараты!).

### Пенициллин

□ Пенициллин G (бензилпенициллин), мол. масса = 372,5 ( $\text{C}_{16}\text{H}_{17}\text{N}_2\text{O}_4\text{SK}$  – пенициллина калиевая соль).

□ Пенициллин G (бензилпенициллин), мол. масса = 356,4 ( $\text{C}_{16}\text{H}_{17}\text{N}_2\text{O}_4\text{SNa}$  – пенициллина натриевая соль).

□ Пенициллин G (бензилпенициллин), мол. масса = 909,1 ( $\text{C}_{32}\text{H}_{36}\text{O}_8\text{S}_2 \cdot \text{C}_{16}\text{H}_2\text{ON}_2$  – пенициллина бензатиновая соль); пенициллин G (бензилпенициллин).

□ Пенициллин G (бензилпенициллин), мол. масса = 570,7 ( $\text{C}_{16}\text{H}_{18}\text{N}_2\text{O}_4\text{S} \cdot \text{C}_{13}\text{H}_2\text{ON}_2\text{O}_2$  – пенициллина прокаинового соли).

### Цефотаксим

□ Цефотаксим, мол. масса = 477,4 ( $\text{C}_{16}\text{H}_{16}\text{N}_5\text{O}_7\text{S}_2\text{Na}$  – цефотаксима натриевая соль).

### Цефтриаксон

□ Цефтриаксон, мол. масса = 554,59 ( $\text{C}_{18}\text{H}_{16}\text{N}_8\text{Na}_2\text{O}_7\text{S}_3 \cdot 3\frac{1}{2}\text{H}_2\text{O}$  – цефтриаксона динатриевая соль гемигептагидрат).

В качестве растворителей для этих субстанций используется стерильный физиологический раствор. Навеску для базового раствора определяют исходя из расчета, что при добавлении 100 мкл его к 0,9 мл бульона получается стартовый раствор антибиотика с концентрацией в 2 раза больше, чем максимальная тестируемая концентрация. Ре-

комендуемый диапазон тестируемых концентраций пенициллина, цефотаксима, цефтриаксона – от 0,008 мг/мл до 8 мкг/мл. Следовательно, концентрация стартового раствора должна быть 16 мкг/мл, а базового – 1600 мкг/мл.

При расчетах следует учитывать наличие в субстанции балластной части, которая в некоторых солях антибиотиков составляет значительную долю. Активность субстанции указана на упаковке и выражается либо в процентном содержании действующего веще-

Таблица 7. Условия и сроки хранения базовых растворов антибиотиков

Субстанция	Условия и сроки хранения		Растворитель
	+4°C	-20°C	
Бензилпенициллин	7 дней	3 мес	Стерильный 0,9% раствор NaCl или стерильная дистиллированная вода
Цефотаксим	10 дней	>3 мес	Стерильный 0,9% раствор NaCl или стерильная дистиллированная вода
Цефтриаксон	10 дней	3 мес	Стерильный 0,9% раствор NaCl или стерильная дистиллированная вода

ства, либо в миллиграммах действующего вещества на 1 г субстанции. Во втором случае для того чтобы вычислить процентное содержание активного вещества, необходимо значение активности, выраженное в мг/г, разделить на 10. Если активность субстанции не указана на упаковке, ее условно принимают за равную 100 %.

Методика расчета серийных разведений антибиотика приведена в изложенных ниже примерах.

### Пример 1

Необходимо приготовить серийные разведения натриевой соли пенициллина с диапазоном разведений от 8 до 0,008 мкг/мл. Объем базового раствора – примерно 50 мл.

$$m_{\text{теор.}(г)} = \frac{C_{\text{макс. (мкг/мл)}} \times V_{\text{осн. (мл)}}}{500 \times A},$$

где  $m_{\text{теор.}}$  – теоретическая мас-

са навески с учетом активности субстанции,  $V_{\text{осн.}}$  – объем базового раствора,  $A$  – активность субстанции, выраженная в процентах,  $m_{\text{теор.}} = 8 \text{ (мкг/мл)} \times 50 \text{ (мл)} / 500 \times 100 = 0,008 \text{ (г)}$ .

Как правило, абсолютно точно взвесить необходимое количество антибиотика не удастся. В таком случае для того чтобы получить базовый раствор нужной концентрации, необходимо варьирование объемом растворителя. Этот объем рассчитывают по следующей формуле:

$$m_{\text{теор.}(г)} = \frac{m_{\text{практ.}(г)} \times V_{\text{теор.}(мл)}}{m_{\text{теор.}(г)}},$$

где  $V_{\text{практ.}}$  – практический объем растворителя,  $V_{\text{теор.}}$  – теоретический объем растворителя,  $m_{\text{практ.}}$  – практическая масса навески.

$V_{\text{практ.}} = 0,00854 \text{ (г)} \times 50 \text{ мл} / 0,008 \text{ (г)} \approx 53,4 \text{ (мл)}$ .

### Пример 2

Необходимо приготовить серийные разведения натриевой соли цефотаксима с диапазоном от 8 до 0,06 мкг/мл. Субстанция антибиотика содержит 89% действующего вещества. Объем базового раствора – примерно 50 мл.

Расчет:

$$m_{\text{теор.}} = 8 \text{ (мкг/мл)} \times 50 \text{ (мл)} / 500 \times 89 \approx 0,009 \text{ (г)},$$

$$V_{\text{практ.}} = 0,0092 \text{ (г)} \times 50 \text{ мл} / 0,009 \text{ (г)} \approx 51,1 \text{ (мл)}.$$

Приготовленный базовый раствор разливается в стерильных условиях небольшими объемами (для тестирования 1, 2, 3 ... N штаммов) и хранится при температуре +4°C или -20°C в течение сроков, указанных в табл. 7.