

УДК 579.086

Особенности определения чувствительности микроорганизмов диско-диффузионным методом

Г.К. Решедько, О.У. Стецюк

НИИ антимикробной химиотерапии, Смоленск, Россия

Этиотропную антибактериальную терапию клиницисты проводят с учетом результатов бактериологического исследования, включающего выделение возбудителя из клинического материала, его идентификацию и определение чувствительности к антибиотикам. Для определения чувствительности в большинстве российских лабораторий используется дискодиффузионный метод. Тестирование с использованием этого метода является технологически простым, результаты хорошо воспроизводимы. Однако существует ряд особенностей, которые могут приводить к получению неправильных результа-

тов. В данной работе освещены особенности диско-диффузионного метода, указаны возможные причины получения ошибочных результатов, даны практические рекомендации по улучшению качества исследований с использованием этого метода определения чувствительности возбудителей к антибиотикам в бактериологических лабораториях.

Ключевые слова: определение чувствительности, микробиологическая диагностика, антибиотикорезистентность, диско-диффузионный метод.

Specificities of The Susceptibility Testing by Disk-Diffusion Method

G.K. Reshedko, O.U. Stetciouk

Institute of Antimicrobial Chemotherapy, Smolensk, Russia

The approach to administration of antimicrobials is often based on the results of microbiological studies that include microorganism isolation, identification and, most important, susceptibility testing. Majority of microbiological laboratories in Russia for the susceptibility testing use disk-diffusion method. This method is technically simple and has good reproducibility. But at the same time there are some specific features that may lead to incorrect

results. In present article the main specificities of disk-diffusion method as well as common sources of incorrect results are indicated, practical recommendations for the improvement of quality of susceptibility testing by disk-diffusion method are given.

Key words: susceptibility testing, microbiological diagnostic, antimicrobial resistance, disk-diffusion method.

Контактный адрес:
Галина Константиновна Решедько
214019, Смоленск, а/я 5
Эл. почта: galina@antibiotic.ru

Введение

Из всех методов определения чувствительности бактерий к антибиотикам *диско-диффузионный метод* (ДДМ) является наиболее распространенным.

Частота использования ДДМ может быть объяснена такими его преимуществами, как технологическая доступность тестирования, низкая стоимость, гибкость (то есть возможность определять чувствительность к тем антибиотикам, которые требуются в данной клинической ситуации), высокая воспроизводимость результатов при соблюдении условий тестирования и приготовления расходных материалов [1].

Клиницисты ожидают от микробиологов корректных данных о чувствительности выделенных патогенов к антибиотикам, так как некачественно выполненное микробиологическое исследование ведет не только к необоснованным материальным затратам, но и самое главное – к нерациональному назначению антибиотиков, ухудшению исхода болезней, увеличению длительности госпитального лечения и стоимости лечения.

Принцип диско-диффузионного метода определения чувствительности

При определении чувствительности ДДМ на поверхность агара в чашке Петри наносят бактериальную суспензию тестируемого микроорганизма определенной плотности, затем помещают диски, содержащие антибиотик. Диффузия антибиотика в агар приводит к формированию зоны подавления роста микроорганизмов вокруг дисков [2].

Результат учитывается по величине диаметра зоны подавления роста вокруг диска, измеренной в миллиметрах (рис. 1).

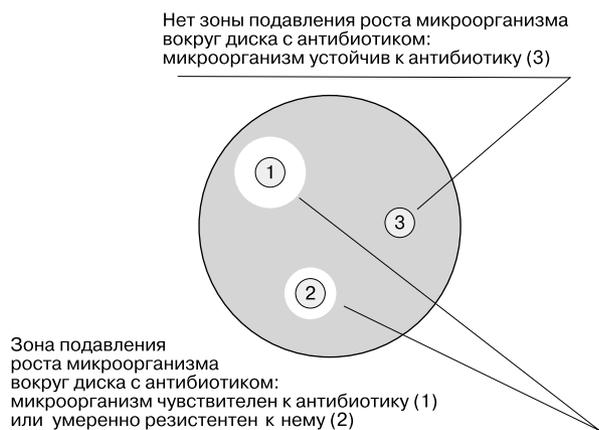


Рис. 1. Определение чувствительности микроорганизмов ДДМ

Интерпретация получаемых результатов

На основании полученных диаметров зон подавления роста микроорганизма вокруг дисков с антибиотиками тестируемые штаммы подразделяют на чувствительные, умеренно резистентные и резистентные.

Для разграничения этих трех категорий чувствительности (или резистентности) между собой используют так называемые пограничные значения (*breakpoints*) диаметров зон подавления роста микроорганизмов. Пограничные значения не являются неизменными величинами. Они могут пересматриваться с течением времени в зависимости от получения новых данных о механизмах антибиотикорезистентности [3].

Следует отметить, что диаметры зон подавления роста микроорганизмов вокруг дисков с антибиотиками в определенных пределах обратно пропорциональны концентрации антибиотиков, подавляющей рост бактерий.

Таким образом, размер зоны подавления роста позволяет косвенно судить о концентрации антибиотика, подавляющей рост данного штамма микроорганизма.

Существуют два подхода к интерпретации результатов определения чувствительности: *микробиологический* и *клинический* [4]. Микробиологическая интерпретация основана на анализе распределения значений концентрации антибиотика, подавляющей жизнеспособность бактерий. Основой клинической интерпретации является предполагаемый эффект от антибактериальной терапии.

Чувствительные микроорганизмы. К чувствительным с микробиологической точки зрения микроорганизмам относят бактерии наиболее чувствительной (дикой, или природной) субпопуляции и не имеющие приобретенных механизмов резистентности [5].

Клинически к чувствительным относят бактерии (с учетом параметров, полученных *in vitro*), если при лечении стандартными дозами антибиотика инфекций, вызванных этими микроорганизмами, наблюдается хороший терапевтический эффект [5].

При отсутствии достоверной клинической информации подразделение на категории чувствительности базируется на совместном учете данных, полученных *in vitro*, и фармакокинетики, то есть на концентрации антибиотика, достигаемой в месте инфекции (или в сыворотке крови).

Резистентные микроорганизмы. При микробиологической интерпретации к резистентным относят микроорганизмы, имеющие приобретенные механизмы резистентности [5].

О клинической резистентности речь идет в случае, если нет эффекта от антибактериальной терапии при использовании общепринятых максимально допустимых терапевтических доз антибиотика [5].

Микроорганизмы с промежуточной резистентностью. С точки зрения микробиологии к бактериям с промежуточной резистентностью

относят субпопуляцию, находящуюся в соответствии со значениями *минимальной подавляющей концентрации* (МПК) между чувствительными и резистентными микроорганизмами [5].

Клинически промежуточная резистентность бактерий подразумевается в случае, если инфекции, вызванные такими штаммами, могут иметь различный терапевтический исход. Так, лечение может быть успешным, если антибиотик используется в максимальной терапевтической дозе и/или если инфекция локализуется в месте, где антибактериальный препарат способен создавать высокую концентрацию, например в моче [5]. Часто штаммы с промежуточной резистентностью и резистентные бактерии объединяют в одну категорию нечувствительных микроорганизмов.

Необходимо отметить, что клиническая интерпретация чувствительности бактерий к антибиотикам является относительно условной, поскольку исход терапии зависит не только от активности антибактериального препарата *in vitro* в отношении возбудителя инфекции, но и от ряда других факторов, например от локализации инфекции, фармакокинетики антибиотика и т. д. В связи с этим при назначении антибиотикотерапии клиницист должен руководствоваться не только результатами определения чувствительности, но и знаниями в области клинической фармакологии антимикробных препаратов.

Причины получения ошибочных результатов определения чувствительности диско-диффузионным методом

К возможным источникам ошибок при определении чувствительности ДДМ можно отнести причины, связанные:

- 1) с агаром, используемым для определения чувствительности;
- 2) с дисками, содержащими антибиотики;
- 3) с бактериальной суспензией;
- 4) с условиями тестирования.

Питательная среда. Агар, используемый для определения чувствительности ДДМ, должен соответствовать определенным требованиям. Он должен поддерживать хороший рост всех быстрорастущих микроорганизмов, иметь стабильную рН и стандартное содержание различных компонентов. Среда не должна влиять на активность антибиотика, а диффузия антибиотика в агар должна быть равномерной. Осмотическое давление среды не должно изменяться при добавлении крови или других добавок. И, наконец, разные партии агара должны давать воспроизводимые результаты.

Особенности среды АГВ. Обычно в большинстве

российских лабораторий для определения чувствительности микроорганизмов к антибиотикам используют отечественную среду АГВ. Среда АГВ имеет ряд особенностей, ограничивающих ее применение для тестирования.

Вариабельность рН разных партий агара может приводить к неправильным результатам определения чувствительности к ряду антибиотиков, таких, как аминогликозиды, макролиды и линкомицин [6, 7].

Среда АГВ не стандартизирована по содержанию двухвалентных катионов Ca^{2+} , Mg^{2+} , Zn^{2+} , что обуславливает ошибки при тестировании *Pseudomonas aeruginosa* к аминогликозидам, фторхинолонам и имипенему. Так, в исследовании при тестировании контрольного штамма *P. aeruginosa* ATCC 27853 к аминогликозидам (нетилмицину и амикацину) и фторхинолонам (ципрофлоксацину, норфлоксацину, офлоксацину и пефлоксацину) на среде АГВ с использованием дисков производства компаний «bioMerieux» (Франция) и BBL (США) были получены диаметры зон подавления роста большего размера, чем на референтном агаре Мюллера–Хинтона.

Таким образом, некоторые нечувствительные клинические штаммы *P. aeruginosa* на среде АГВ могут быть ошибочно оценены как чувствительные, что приводит к недооценке резистентности к этим антимикробным препаратам [8].

При тестировании контрольного штамма *P. aeruginosa* ATCC 27853 к имипенему на среде АГВ были получены меньшие зоны подавления роста, чем на агаре Мюллера–Хинтона, что указывает на возможность получения ложной резистентности к имипенему у штаммов *P. aeruginosa* при тестировании на АГВ [8].

Среда АГВ также не стандартизирована по содержанию тимина и тимидина. В связи с этим она непригодна для определения чувствительности всех бактерий к сульфаниламидам и триметоприму. При проверке пригодности сред для определения чувствительности к сульфаниламидам и триметоприму используется контрольный штамм *Enterococcus faecalis* ATCC 29212. Это связано с тем, что энтерококки способны утилизировать экзогенные фолаты.

При стандартизованном содержании в среде тимина и тимидина при определении чувствительности этого контрольного штамма к ко-тримоксазолу образуются зоны подавления роста диаметром 20 мм или более. Однако при определении чувствительности указанного контрольного штамма на среде АГВ различных серий зоны ингибиции не образовывались [8].

Низкая способность поддерживать рост ряда микроорганизмов ограничивает использование АГВ как агара-основы для тестирования *Haemophilus influenzae*. Так, при тестировании клинических штаммов гемофильной палочки на среде АГВ с добавками (гематин и НАД) отмечен более слабый рост этого микроорганизма (что привело к образованию больших зон подавления роста вокруг дисков со всеми антибактериальными препаратами, кроме антифолатов), чем на референтной среде НТМ, и существенно затрудняло учет полученных результатов.

Напротив, на шоколадном агаре, приготовленном на основе среды АГВ, рост штаммов *H. influenzae* был лучше, чем на среде НТМ, зоны подавления роста вокруг дисков с антибиотиками были меньше. При определении чувствительности к ко-тримоксазолу на среде АГВ с добавками и на шоколадном агаре АГВ диаметры зон подавления роста были значительно меньше, чем на среде НТМ [8].

Получение подобного результата может быть объяснено высоким содержанием антагонистов антифолатов (тимина и тимидина) в среде АГВ, что приводит к нивелированию антимикробного действия сульфаниламидов и триметоприма при тестировании.

Таким образом, как шоколадный агар на основе АГВ, так и среда АГВ с добавками не могут быть использованы для определения чувствительности к антибиотикам гемофильной палочки.

Кроме того, среда АГВ непригодна для выявления метициллинорезистентности штаммов *Staphylococcus* spp. методом скрининга. Так, при сравнении среды АГВ и агара Мюллера–Хинтон (обе среды с добавлением 6 мг/л оксациллина и 4% NaCl) было обнаружено отсутствие роста 24,5% метициллинорезистентных стафилококков на скрининговой среде АГВ через 24 ч и 16% – через 48 ч по сравнению с ростом на референтной среде Мюллера–Хинтон.

Дополнительным подтверждением непригодности среды АГВ для скрининга метициллинорезистентности у стафилококков было отсутствие роста на данной среде контрольного метициллинорезистентного штамма *Staphylococcus aureus* ATCC 43300 как через 24 ч, так и через 48 ч инкубации [9].

Особенности приготовления чашек с агаром для определения чувствительности ДДМ. Для получения корректных результатов определения чувствительности ДДМ необходимо не только использовать качественную питательную среду, но и соблюдать правила приготовления чашек с агаром.

Важными параметрами являются толщина и равномерность слоя агара в чашке Петри. Стандартная толщина агара в чашке должна составлять

4,5±0,5 мм, для чего в чашку диаметром 90 мм добавляют 20 мл агара, а при диаметре чашки 100 мм – 25 мл. С увеличением толщины слоя агара уменьшаются диаметры зон подавления роста в различной степени для разных антибиотиков, что может быть ошибочно расценено как резистентность.

Напротив, при недостаточной толщине агара в чашке Петри может происходить отраженная диффузия антибиотиков от дна чашки Петри, что приводит к формированию больших зон подавления роста (рис. 2), и является более неблагоприятным с клинической точки зрения, так как штамм может быть ошибочно оценен как чувствительный.

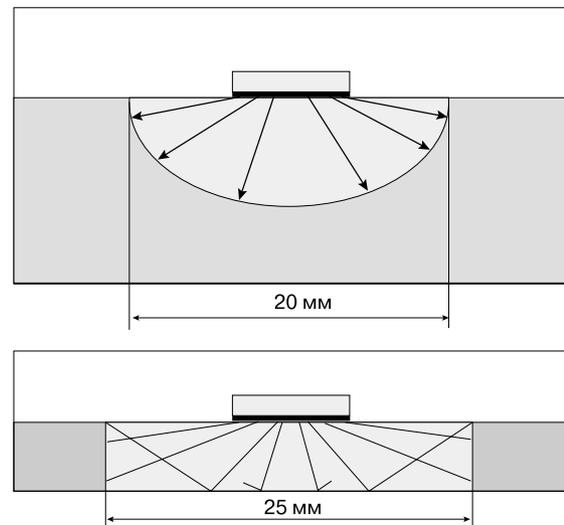


Рис. 2. Влияние толщины агара в чашке Петри на результаты определения чувствительности ДДМ

Диски с антибиотиками для определения чувствительности, используемые для тестирования, должны быть коммерческого производства и правильно храниться.

Диски отечественного производства, а также некоторых зарубежных производителей, к сожалению, не всегда стандартизированы, особенно содержащие цефалоспорины и карбапенемы. Кроме того, отечественные диски могут содержать концентрации антибиотиков, для которых не разработаны критерии интерпретации результатов. Вследствие этого бактериологи затрудняются оценивать результаты, получаемые при определении чувствительности микроорганизмов с помощью таких дисков.

В настоящее время в России можно приобрести качественные диски с антибиотиками двух ведущих зарубежных компаний – «bioMérieux» (Франция) и BBL (США). Эти диски стандартизированы и содержат антибиотики в количествах, для которых разработаны критерии интерпретации.

Иногда в отечественных лабораториях пользует

ются дисками собственного изготовления. Однако для этого необходимо использовать специальные субстанции антибиотиков с известной активностью, которых лаборатории, как правило, не имеют. Использовать же для изготовления дисков антибиотика в формах, предназначенных для клинического применения, нельзя, так как в них содержатся примеси и нет указания на активность действующего вещества.

Основные проблемы, связанные с дисками, содержащими антибиотики, возникают при неправильном их хранении или использовании. Для длительного хранения дисков необходимы морозильные камеры, поддерживающие температуру -20°C . Те диски, которые непосредственно используются для тестирования, можно непродолжительное время хранить в холодильнике при температуре $+4-8^{\circ}\text{C}$.

Самым важным условием является защита дисков от влаги, поскольку при ее попадании снижается активность антибиотиков, что приводит к неправильным результатам определения чувствительности. Для поддержания определенной влажности при хранении дисков используются герметично закрывающиеся контейнеры с добавлением влагопоглотителя. Для предотвращения образования конденсата на поверхности дисков после извлечения из холодильника перед тестированием их необходимо оставить в герметичной упаковке при комнатной температуре на 30–60 мин [5].

Особенности использования бактериальной суспензии. Проблемы, связанные с бактериальной суспензией, можно разделить на две категории:

- 1) чистота исследуемого штамма;
- 2) гомогенность и плотность приготовленной суспензии.

Для приготовления суспензии необходимо использовать чистую суточную культуру одного штамма микроорганизма. Контаминация тестируемого микроорганизма может приводить к ошибочным результатам определения чувствительности. Плотность инокулюма должна быть эквивалентна стандарту мутности 0,5 по McFarland, что примерно составляет $1,5 \times 10^8$ КОЕ/мл. При использовании более плотной бактериальной суспензии можно получить ложную резистентность [10].

При использовании инокулюма недостаточной плотности у тестируемого микроорганизма может быть отмечена ложная чувствительность [10]. Так, например, штаммы MRSA с гетерогенным типом экспрессии метициллинорезистентности при недостаточной плотности бактериальной суспензии могут не выявляться [11]. Неоднородная бактериальная суспензия обуславливает неравномерный рост

микроорганизма на поверхности агара, что существенно затрудняет учет полученного результата, а в некоторых случаях он бывает невозможным.

Режим инкубации при определении чувствительности. При определении чувствительности бактерий ДДМ также необходимо соблюдать условия тестирования: атмосферу и температурный режим. Так, если во время тестирования «непривередливые» микроорганизмы инкубируют в обычной атмосфере, то при определении чувствительности таких микроорганизмов, как *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, инкубацию необходимо проводить в CO_2 -инкубаторе в присутствии 5–10% CO_2 .

Температура инкубации при тестировании должна быть $35-36^{\circ}\text{C}$, причем непременным условием является способность термостатов постоянно поддерживать эту температуру на определенном уровне [5].

Внутренний контроль качества определения чувствительности. Для обеспечения надлежащего качества определения чувствительности в лаборатории необходимо проводить внутренний контроль качества.

Внутренний контроль качества представляет собой постоянный мониторинг качества реагентов, работы оборудования, выполнения лабораторных процедур и включает обучение персонала, разработку методических руководств, проверку качества питательных сред и т. д. [12, 13, 14].

Для внутреннего контроля качества определения чувствительности в лаборатории необходимо использовать контрольные штаммы микроорганизмов. Контрольные штаммы представляют собой генетически стабильные микроорганизмы, обладающие определенными фенотипами чувствительности. В большинстве бактериологических лабораторий используют контрольные штаммы *Американской коллекции типовых культур* (АТСС).

Все используемые для контроля качества микроорганизмы должны иметь соответствующую документацию, содержащую характеристику штаммов. К основному набору контрольных штаммов относятся:

- *Escherichia coli* ATCC 25922 – для тестирования бактерий, относящихся к семейству энтеробактерий;
- *Escherichia coli* ATCC 35218 – для тестирования энтеробактерий к ингибиторозащищенным бета-лактамам;
- *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 – для тестирования *Pseudomonas* spp. и других неферментирующих бактерий;
- *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 – для тестирования *Staphylococcus* spp.;
- *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 – для тестирования *Enterococcus* spp.;

– *Haemophilus influenzae* ATCC 49247 – для тестирования *H. influenzae*;

– *Streptococcus pneumoniae* ATCC 49619 для тестирования *S. pneumoniae* и *Streptococcus* spp.

Контрольные штаммы необходимо тестировать параллельно с определением чувствительности клинических изолятов. Тестирование контрольных штаммов проводят вначале ежедневно, затем, при получении корректных результатов, в течение 30 последовательных дней. Допустимо еженедельное тестирование.

Кроме того, необходимо тестирование контрольных штаммов при получении новой партии агара или новой партии дисков с антибиотиками.

При определении чувствительности контрольных штаммов диаметры зон подавления роста должны попадать в определенные диапазоны, которые указаны в таблицах используемых стандартов [5, 15]. Если при тестировании контрольных штаммов диаметры зон подавления роста попадают в допустимый диапазон, то результаты определения чувствительности клинических штаммов можно считать корректными и использовать для выбора антибактериальной терапии. В противном случае необходимо выяснить причину получения ошибочного результата и повторно определить чувствительность контрольного и клинических штаммов.

Определенными ориентирами для выяснения причин получения некорректных результатов могут служить следующие ситуации. Если при тестировании контрольного штамма все диаметры зон подавления роста микроорганизма на одной чашке Петри не попадают в допустимые диапазоны, то это может быть обусловлено плохим качеством агара или нарушением процедуры приготовления чашек с агаром (толщина агара больше или меньше допустимой, неровная и/или неоднородная поверхность), использованием нестандартизированных дисков с антибиотиками, а в редких случаях – изменением свойств самого контрольного штамма.

При получении некорректных результатов тестирования чувствительности только к одному антибиотику причиной, как правило, является нестандартное содержание антибиотика в диске. Причиной может быть также особенность используемой среды, например, при определении чувствительности синегнойной палочки к аминогликозидам на среде АГВ, как это описано выше.

Нормативные документы

В России основным документом, определяющим процедуру тестирования, являются «Методи-

ческие указания по определению чувствительности микроорганизмов к антибиотикам методом диффузии в агар с использованием дисков» Минздрава СССР (1983). Однако этот документ не охватывает определение чувствительности к современным антибактериальным препаратам. В нем отсутствуют методики тестирования микроорганизмов со сложными питательными потребностями (стрептококки, пневмококки, гемофильная палочка) и выявления таких клинически значимых механизмов резистентности, как метициллинорезистентность у стафилококков, пенициллинорезистентность у пневмококков, продукции β -лактамаз расширенного спектра у энтеробактерий.

В большинстве бактериологических лабораторий мира используют документ, разработанный Национальным комитетом по клиническим лабораторным стандартам США [5]. Эти стандарты содержат рекомендации по определению чувствительности различных видов микроорганизмов, в том числе бактерий со сложными питательными потребностями. В них приведены критерии интерпретации результатов определения чувствительности к большому набору антибиотиков, включая новые современные препараты, количество антибиотика, которое должно содержаться в диске. Большое место отводится проведению внутреннего контроля качества определения чувствительности.

Эти стандарты пересматриваются 1–2 раза в год и переиздаются ежегодно. При их обновлении учитываются данные больших многоцентровых эпидемиологических исследований и результаты клинических испытаний.

Заключение

Таким образом, ДДМ определения чувствительности бактерий к антибиотикам, несмотря на свою простоту и доступность, имеет ряд особенностей, которые необходимо хорошо знать и учитывать в работе. Гарантией получения корректных результатов при тестировании являются подготовленность медицинского персонала и обязательное проведение внутреннего контроля качества.

Использование качественных материалов, точное выполнение всех лабораторных процедур и совершенствование навыков клинической интерпретации результатов тестирования обеспечат получение достоверных данных о чувствительности микроорганизмов, необходимых для выбора адекватной антибактериальной терапии пациентов с инфекционными заболеваниями.

Литература

1. Vandepitte J., Engbaek K., Piot P., Heuck C.C. Basic laboratory procedures in clinical bacteriology. Geneva: World Health Organization; 1991.
2. Barry A.L., Thornsberry C. Susceptibility tests: Diffusion test procedures. In: Murray P., editor. Diffusion test procedures. Washington D.C.: ASM Press; 1993.
3. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Development of *in vitro* susceptibility testing criteria and quality control parameters. Approved guideline. NCCLS Document M23-A. 1994; 12 (16).
4. Сидоренко С.В. Клиническое значение резистентности микроорганизмов к антимикробным препаратам. Рос мед вести 1998; 1:28-34.
5. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; eleventh informational supplement. 2001; 21(1).
6. Sabath L.D., Toftegaard I. Rapid microassays for cand gentamicin when present together and the effect of pH and of each on antibacterial activity of each other. Antimicrob Agents Chemother 1974; 6:54-9.
7. Zinner S.H., Sabath L.D. Casey J.I., et al. Erythromycin plus alkalization in treatment of urinary infections due to gram-negative bacilli. Lancet 1971:1267.
8. Стецюк О.У. Зависимость фармакодинамических параметров антибиотиков от условий определения чувствительности бактериальных возбудителей внебольничных и госпитальных инфекций [диссертация]. Смоленск; 2000.
9. Dekhnich A., Stratchounski L., Stetsiouk O. Comparison of oxacillin-supplemented AGV agar and Mueller-Hinton agar for detection of methicillin-resistance in *Staphylococcus aureus*. Proceedings of 9th ECCMID; 1999; Berlin, Germany. Abstract P0109.
10. Гивенталь Н.И., Ведьмина Е.А., Богданова Л.Ф., и др. Об унификации методов определения чувствительности микроорганизмов к антибиотикам. Полуколичественная и количественная оценка результатов диффузионного теста. Антибиотики 1980; 6:420-4.
11. Swenson J.M., Hindler J.A., Peterson L.R. Special phenotypic methods for detecting antibacterial resistance. In: Murray P.R., Jo Baron E., Pfaller M.A., Tenover F.C., Tenover F.C., editors. Manual of Clinical Microbiology. 7th ed. Washington, D.C: ASM Press; 1999. p. 1563-78.
12. Михайлова В.С., Гаранина Е.Н., Макарова Н.А. Обеспечение качества в лабораториях клинической микробиологии (бактериологии). Клиническая диагностика 1995; 4:19-21.
13. European Committee for Clinical Laboratory Standards. Standard for quality assurance. Part I: Terminology and general principles. ECCLS Document. 1985; 2(1).
14. European Committee for Clinical Laboratory Standards. Standard for quality assurance. Part II: Internal quality control in microbiology. ECCLS Document. 1985; 2(4).
15. August M.J., Hindler J.A., Huber T.W., et al. Quality control and quality assurance practices in clinical microbiology. Weissfeld A.S., editor. Cumulative Techniques and procedures in Clinical Microbiology 3A. Washington D.C.: American Society For Microbiology; 1990.