



**Методы определения
активности антибиотиков и
чувствительности к ним
микробов.**

Кафедра лабораторной диагностики ИПО БГМУ
Цветкова А.В.



Определение антибиотикорезистентности

3 этап. **Выбор методов проведения исследования и контроля качества.**



Определение антибиотикорезистентности

Методические указания
МУК 4.2.1890-04

«Определение чувствительности
микроорганизмов к
антибактериальным препаратам»

Определение антибиотикорезистентности. Диско-диффузионный метод.

Основан на диффузии антибиотика с бумажного носителя в агар с исследуемым микроорганизмом и формировании зоны ингибиции роста чувствительных микроорганизмов.

Определение антибиотикорезистентности. Диско-диффузионный метод.

Этапы:

1. Приготовление ПС
2. Приготовление суспензии исследуемого микроорганизма
3. Нанесение инокулюма на поверхность ПС
4. Наложение дисков с антибиотиками
5. Инкубация
6. Учет результатов
7. Интерпретация

Определение антибиотикорезистентности. Диско-диффузионный метод.

Приготовление ПС.

Используются:

- Агар Мюллер-Хинтона
- АГВ

- Толщина слоя агара 4 мм(на чашку диам. 100 мм требуется 25 мл агара, на чашку диам. 90 мм – 20).
- Чашки подсушенные
- Чашки предпочтительнее использовать немедленно. Допускается хранение в запаянных полиэтиленовых пакетах в холодильнике при 4-8 С* в течение 5 сут.

Определение антибиотикорезистентности. Диско-диффузионный метод.

Приготовление суспензии исследуемого микроорганизма:

- ❖ Используется суточная культура исследуемых м/о.
- ❖ Концентрация $1,5 \cdot 10^8$ КОЕ/мл, что соответствует степени мутности 0,5 стандарта Мак-Фарланда.

Определение антибиотикорезистентности. Диско-диффузионный метод.

Нанесение инокулюма на поверхность ПС:

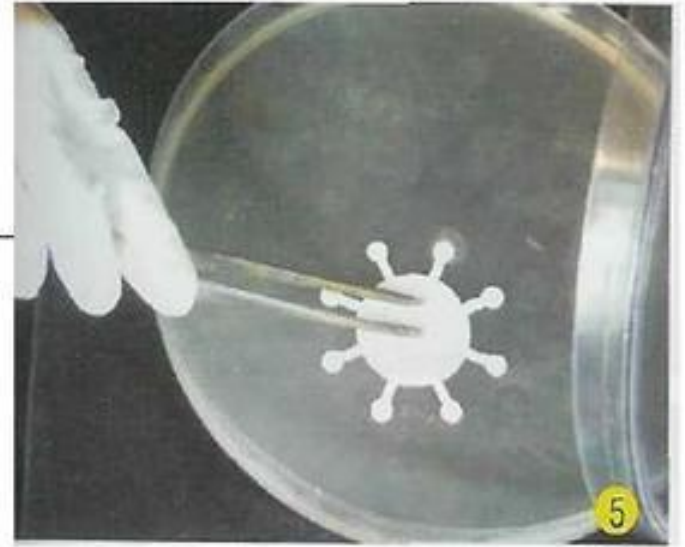
Производится с помощью ватных тампонов -
помещение в инокулюм, отжим о стенки
пробирки и высеив на ПС штриховыми
движениями

Определение антибиотикорезистентности. Диско-диффузионный метод.

Наложение дисков с а/б:

- ❖ В течении 15 минут
- ❖ Срок годности дисков
- ❖ Соблюдение контроля качества дисков

Октодиски

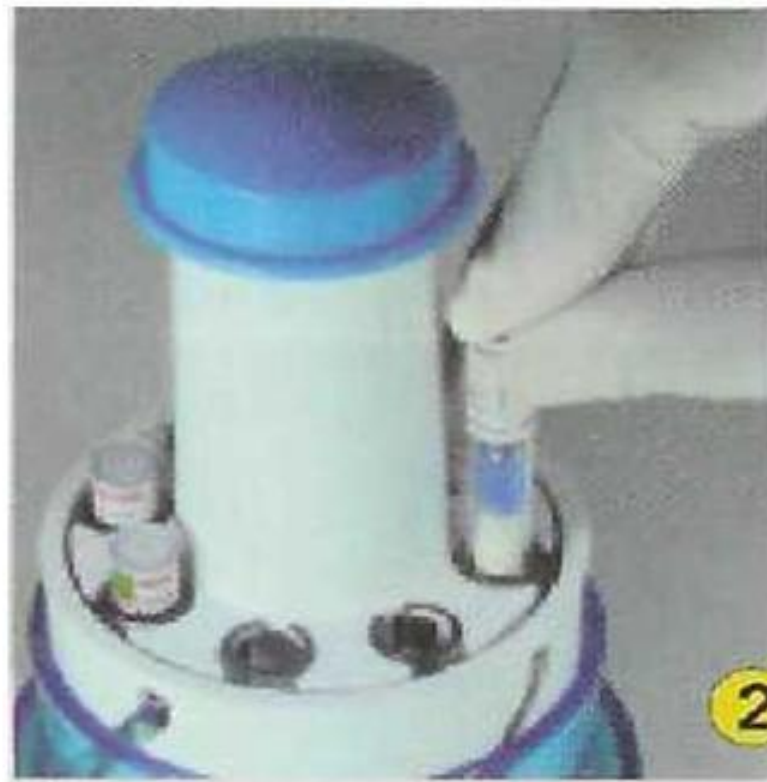


Аппликация дисков

Флаконы с дисками следует извлекать из холодильника за 1 ч до начала работы

- Аппликацию дисков проводят с помощью стерильного пинцета или автоматического диспенсера.
- Расстояние от диска до края чашки и между дисками должно быть 15-20 мм.
- На одну чашку диаметром 100 мм следует помещать не более 6 дисков с АБП.
- Диски должны равномерно контактировать с поверхностью агара, для чего их следует аккуратно прижать пинцетом.

Диско-диффузионный метод. Диспенсоры



Определение антибиотикорезистентности. Диско-диффузионный метод.

Инкубация



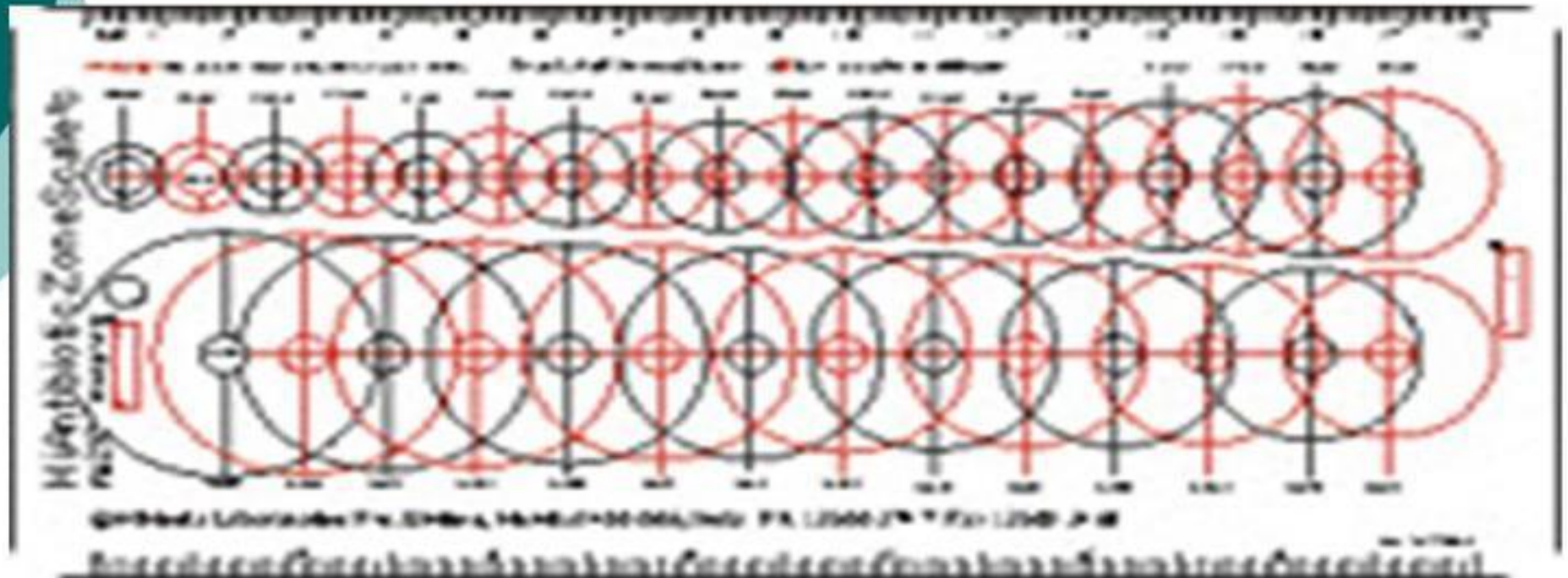
Определение антибиотикорезистентности. Диско-диффузионный метод.

Учет результатов

- По измерению зоны ингибиции роста м/о
- помещают кверху дном на темную матовую поверхность так, чтобы свет падал на них под углом в 45 град.
- Диаметр зон задержки роста измеряют с точностью до 1 мм



Измерение зоны ингибиции Линейка лекало



Контроль качества определения чувствительности

Внутренний контроль качества исследования.

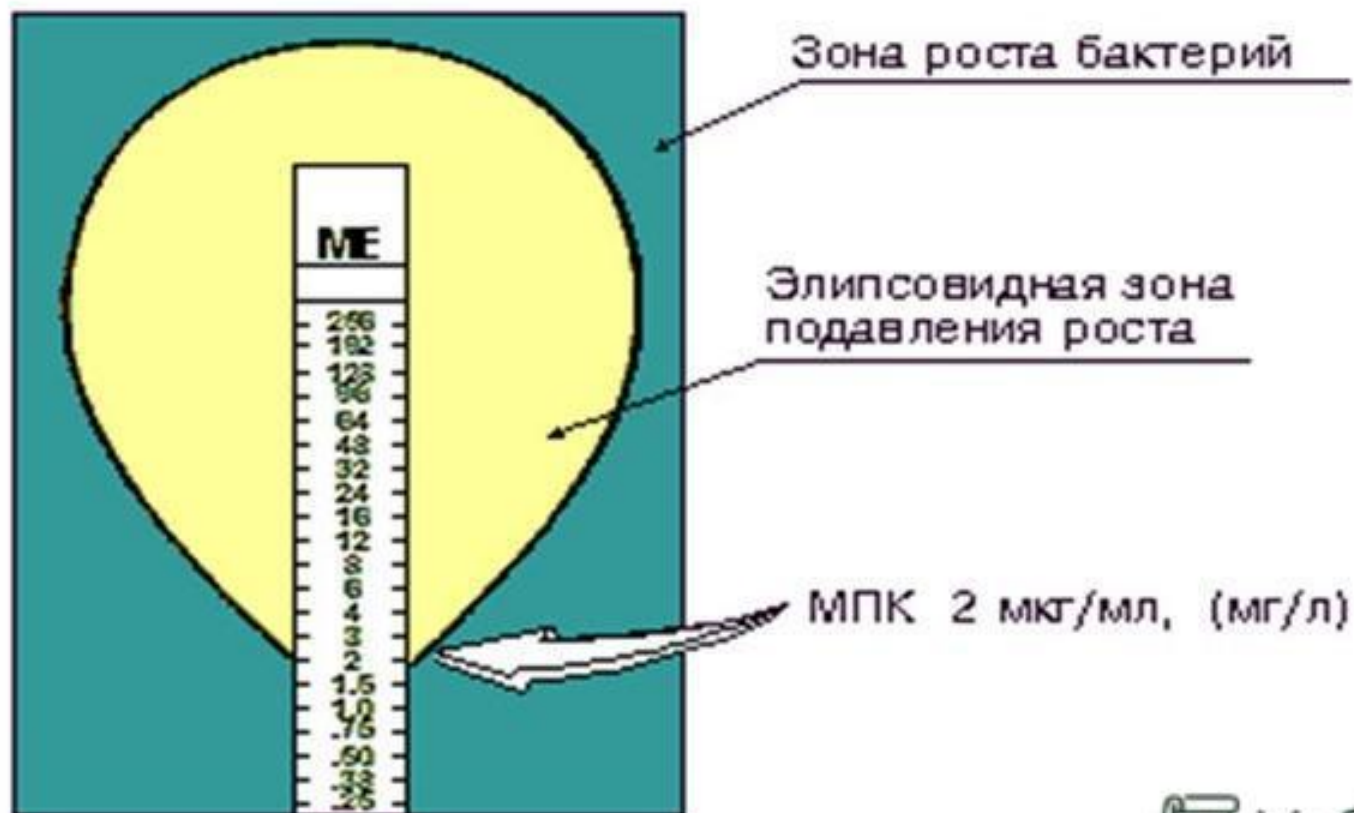
- Достоверность результатов исследования чувствительности микроорганизмов к АБП зависит от следующих основных параметров:
 - состава питательной среды;
 - соответствия реальной активности используемых антибиотиков (или их содержания в дисках) паспортным характеристикам
 - соблюдения стандартности выполнения всех лабораторных процедур.

Определение антибиотикорезистентности. Е-тест

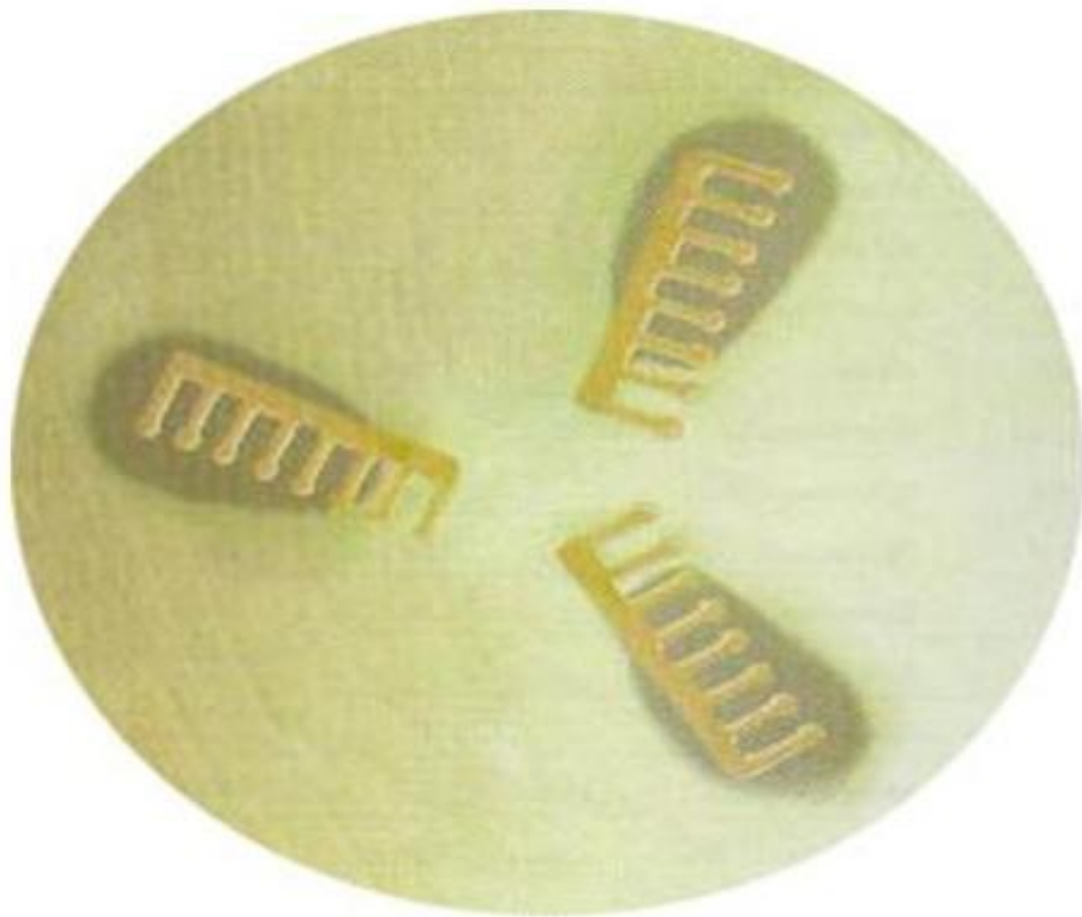
- модификация диско-диффузионного метода.
- используют полоску Е-теста, содержащую градиент концентраций антибиотика от максимальной к минимальной
- 15 разведений антибиотика размещены с помощью инновационной технологии сухой химии на пластмассовой полоске.
- В месте пересечения эллипсовидной зоны подавления роста с полоской Е-теста получают значение минимальной подавляющей концентрации (МПК).

Определение антибиотикорезистентности.

Е-тест



E-тест



Автоматизированные системы



БЛРС

- БЛРС- термин объединяет большое число бактериальных ферментов, отличающихся способностью расщеплять оксимино-в-лактамы наряду с пенициллинами и ранними цефалоспорины и проявляют чувствительность к ингибиторам (клавулановой кислоте, сульбактаму и тазобактаму).

Выявление БЛРС у штаммов *Enterobacteriaceae*

- только на штаммы *Klebsiella* spp. и *E. coli*.
- Стандартные диски цефотаксима и цефтазидима (30 мкг) или диска с цефподоксимом (10 мкг), а также диски, содержащие комбинации: цефотаксим + клавуланат или цефтазидим + клавуланат (30/10 мкг) или цефподоксим + клавуланат (10/10 мкг).
- В исследование целесообразно включать одновременно и диски с цефотаксимом и диски с цефтазидимом и их комбинациями с клавуланатом.

Выявление БЛРС у штаммов Enterobacteriaceae

- Методика приготовления микробной взвеси и инокуляции чашек с агаром стандартные.
- На поверхность агара накладывают диски с цефалоспоридами и их комбинациями с клавулановой кислотой.
- Чашки инкубируют в термостате при 35 град. С в течение 18-20 ч.

Интерпретация результатов

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

Метод двойных дисков

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

Метод двойных дисков

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

Интерпретация результатов

- Если тестируемый микроорганизм вырабатывает БЛРС (действие которых в большинстве случаев обратимо клавуланатом), зона подавления роста вокруг диска с цефалоспорином III поколения окажется "вытянутой" в сторону диска с амоксициллином/клавуланатом.
- Причиной данного эффекта является дополнительное подавление роста микроорганизма в той зоне, куда диффундируют и клавуланат и цефалоспорин III поколения. Тест сугубо качественный и требует определенных навыков при интерпретации.

КРИТЕРИИ ИНТЕРПРЕТАЦИИ РЕЗУЛЬТАТОВ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ S. PNEUMONIAE:

Антибактериальные препараты	Содержание в диске (мкг)	Диаметр зон подавления роста (мм)		
		Р	П	Ч
Эритромицин	15	≤ 15	16-20	≥ 21
Кларитромицин	15	≤ 16	17-20	≥ 21
Азитромицин	15	≤ 13	14-17	≥ 18
Линкомицин	15	< 17	17-20	≥ 21
Клиндамицин	2	≤ 15	16-18	≥ 19

✓ Энтеробактерии

✓ Неферментирующие бактерии

✓ Стафилококки

✓ Энтерококки

✓ Стрептококки

✓ Гемофильная палочка

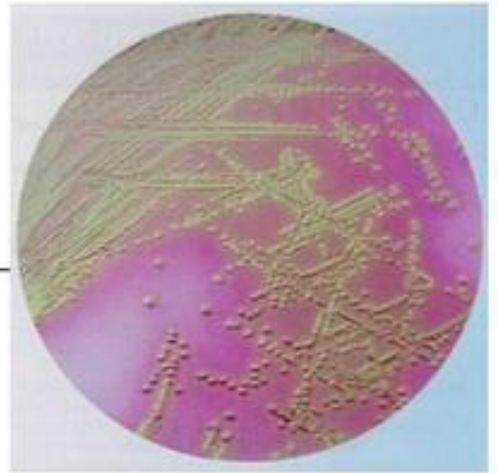
✓ Гонококки

✓ М/о со сложными пит.
потребностями



MyShared

Enterobacteriaceae



Самостоятельные наборы необходимы для:

- м/о, выделенных при гнойно-воспалительных заболеваниях различной локализации
- Возбудителей кишечных инфекций
- м/о, выделенных при инфекциях МПС

М/о, выделенные при гнойно-воспалительных заболеваниях различной локализации

- Аминопенициллины
- Защищенные аминопенициллины
- Цефалоспорины III поколения
- Цефтазидим
- Аминогликозид
- Фторхинолон

Дополнительно

- Имипенем или меропенем
- Цефепим, амикацин
- Цефоперазон/сульбактам
- Цефуроксим

Возбудители кишечных инфекций

- Ампициллин
- Ко-тримоксазол
- Норфлоксацин или
- Ципрофлоксацин или
- Офлоксацин
- Цефотаксим

Дополнительно

- Цефотаксим или цефтриаксон
- Тетрациклин или доксициклин
- хлорамфеникол



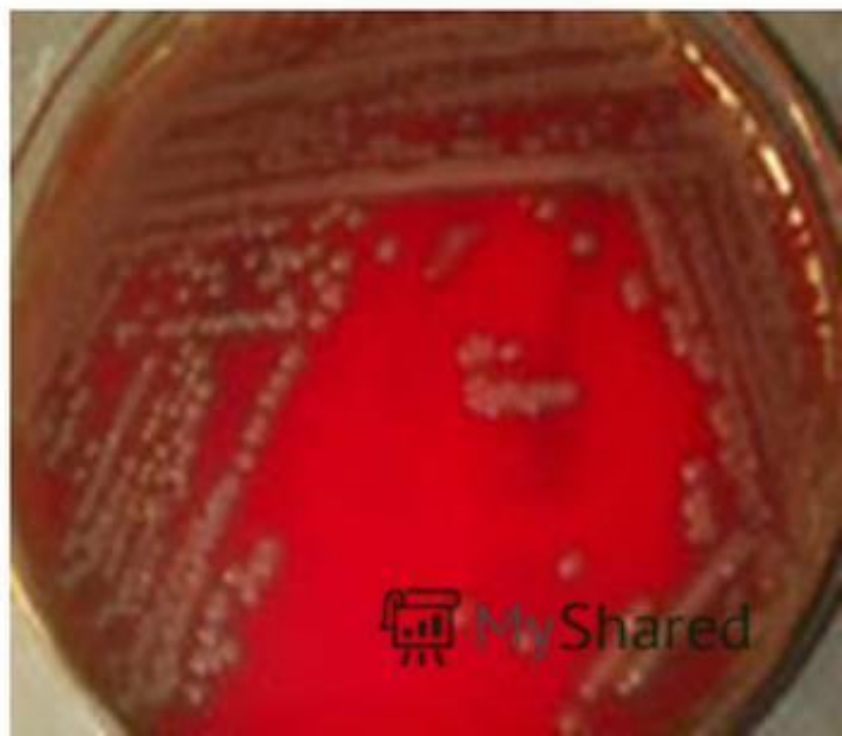
Стафилококки

- Оксациллин
- Защищенные пенициллины
- Макролиды
- Линкозамиды
- Тетрациклины
- Аминогликозиды
- Хлорамфеникол
- Ванкомицин
- Фузидин
- нитрофураны



Пневмококки

- В-лактамы
- Макролиды
- Линкозамиды
- Ко-тримоксазол
- Хлорамфеникол
- Тетрациклины
- ванкомицин



Контрольные штаммы

- Для энтеробактерий:
 - *E. coli* ATCC 25922
 - *P. aeruginosa* ATCC 25923
- Для НФБ - *P. aeruginosa* ATCC 27853
- Для стафилококков
 - *S. aureus* ATCC 29213-сер. развед., ATCC 25923- для ДДМ
- Для энтерококков
 - *E. faecalis* ATCC 29212- для сер.разв., *S. aureus* ATCC 25923-для ДДМ
- Для пневмококков
 - *S. pneumoniae* ATCC 46619

*Спасибо
за внимание!*

