

Танальский Д. В.

*Гомельский государственный медицинский университет,
Беларусь*

Бильский И. А.

*Гомельский государственный медицинский университет,
Беларусь*

СТАНДАРТНЫЕ ДИСКИ КАК ИСТОЧНИК АНТИБИОТИКОВ ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ МИНИМАЛЬНЫХ ПОДАВЛЯЮЩИХ КОНЦЕНТРАЦИЙ

Метод последовательных микроразведений в бульоне является референтным фенотипическим методом определения антибиотикочувствительности микроорганизмов. Процедура тестирования регламентируется стандартом ISO 20776-1:2006 [**Ошибка! Источник ссылки не найден.**]. Существует ряд объективных причин, сдерживающих широкое применение метода в повседневной практике микробиологических лабораторий: необходимость использования дорогостоящих чистых субстанций антибиотиков, различных растворителей, низкотемпературных морозильников для хранения основных растворов. Большинство микробиологических лабораторий не проводят определение истинных значений минимальных подавляющих концентраций (МПК), ограничиваясь диско-диффузионным методом или использованием автоматизированных систем. В условиях глобального распространения экстремально-антибиотикорезистентных грамотрицательных бактерий знание истинных значений МПК антибиотиков может стать крайне важным для проведения адекватной этиотропной терапии.

Цель — оценить возможность использования стандартных дисков в качестве источника антибиотиков для определения МПК методом последовательных микроразведений.

Материалы и методы. Определение МПК для 9 антибиотиков (азтреонама, амикацина, имипенема, колистина, меропенема, тобрамицина, цефепима, цефтазидима, ципрофлоксацина) выполняли методом последовательных разведений в бульоне Мюллера–Хинтона (BD, США) в стерильных 96-луночных полистироловых планшетах (SARSTEDT, Германия). Тестирование проводили в отношении штаммов микроорганизмов из Американской коллекции типовых культур *E. coli* ATCC 25922 и *P. aeruginosa* ATCC 27853 с известными референтными значениями МПК. Исследование выполняли в соответствии со стандартом ISO 20776-1:2006 [1], за исключением этапа приготовления рабочих растворов антибиотиков.

Рабочие растворы антибиотиков готовили в бульоне Мюллера–Хинтона (МХБ) в стерильных пробирках эппендорф, помещая в бульонную среду необходимое для получения заданной концентрации количество стандартных бумажных дисков (BD Sensi-Disc, США). Схема приготовления рабочих растворов представлена на рисунке.

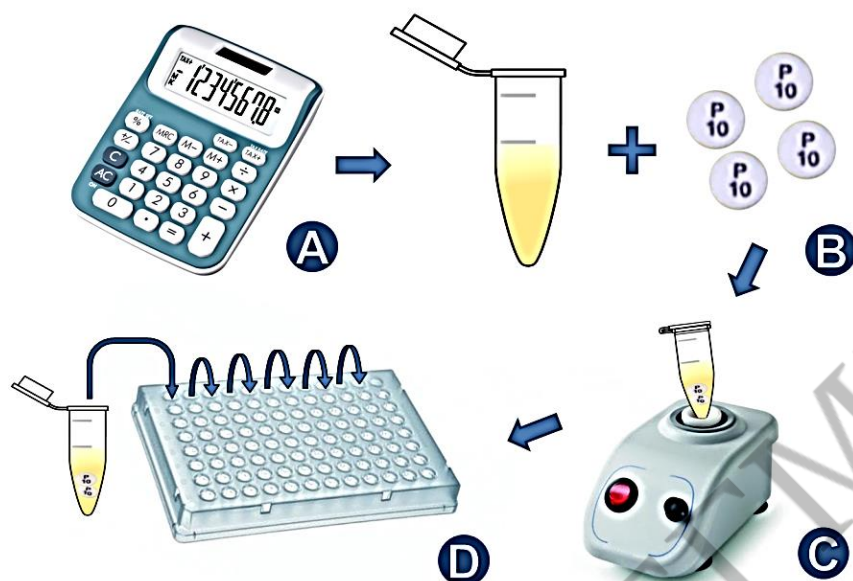


Рис. Схема приготовления рабочего раствора антибиотика и последовательных разведений с использованием стандартных дисков:

A — расчет необходимого объема питательной среды и количества дисков; *B* — внесение МХБ и необходимого количества дисков с антибиотиками; *C* — 30-секундное вортексирование; *D* — внесение 50 мкл полученного рабочего раствора в лунку ряда 1 полистиролового планшета и приготовление двукратных последовательных разведений

Концентрацию рабочего раствора рассчитывали исходя из необходимой максимальной концентрации в ряду последовательных разведений, учитывая фактор разбавления при последующей инокуляции. Требуемый объем МХБ рассчитывали по формуле:

$$V = \frac{nM}{C},$$

где V — необходимый объем питательной среды, n — количество дисков с антибиотиком, M — содержание антибиотика в одном диске, C — требуемая концентрация антибиотика в рабочем растворе.

После погружения дисков в пробирку с питательной средой выполняли 30-секундное вортексирование для быстрой элюции антибиотика в раствор. Во все лунки 96-луночного планшета вносили по 50 мкл МХБ. В лунки ряда 1 вносили 50 мкл рабочего раствора антибиотика. С использованием 8-канального дозатора путем последовательного смешивания и переноса 50 мкл жидкости из лунок ряда 1 к лункам ряда 11 готовили двукратные разведения антибиотика. Лунки ряда 12 использовались в качестве контроля роста культуры. Вносили в лунки 1–12 по 50 мкл МХБ, предварительно инокулированного суспензией 0,5 МакФарланд исследуемого штамма. Финальный объем в каждой из лунок составлял 100 мкл, концентрация микробных клеток $5 \cdot 10^5$ КОЕ*мл⁻¹. Планшеты инкубировали 18 ± 2 ч при 35 °С. Учет результатов проводили визуально.

Исследования выполнялись в 6 независимых повторах, в каждом из которых тестирование МПК для каждого из антибиотиков проводилось четырехкратно. Исследование выполнялось квалифицированным персоналом лаборатории, имеющим

значительный опыт определения чувствительности к антибиотикам методами разведений. Для оценки возможности внедрения предложенного метода в лабораториях клинической микробиологии параллельно выполнено определение МПК группой исследователей, не имеющих предыдущего опыта использования метода последовательных разведений (студенты 3 курса медицинского университета). Предварительная подготовка заключалась в однодневном обучении навыкам пипетирования и приготовления последовательных разведений. После обучения студентами самостоятельно было выполнено по 8 определений МПК 9 антибиотиков для двух контрольных штаммов.

Результаты и обсуждение. Всего получено 576 индивидуальных значений МПК, из них 78,5 % относились к категории целевых значений, 20,8 % — к категории допустимых значений, 0,7 % — к категории недопустимых значений. Точность получаемых результатов предсказуемо различалась в сравниваемых группах исследователей (83,3 % значений МПК, соответствующих целевым значениям в группе «Микробиологи» и 63,9 % — в группе «Студенты»), вместе с тем в группе «Студенты» полученные значения МПК выходили за пределы допустимого диапазона только в 5,6 % определений.

На основании проведенных исследований разработан лабораторный протокол для определения МПК антибиотиков для энтеробактерий, *A. baumannii* и *P. aeruginosa* методом последовательных разведений с использованием стандартных дисков в качестве источника антибиотиков.

Заключение. Предложенный метод использования стандартных дисков в качестве источника антибиотиков для приготовления рабочих растворов значительно упрощает процедуру тестирования методом последовательных микроразведений и делает ее доступной для большинства микробиологических лабораторий. Показана высокая согласованность результатов определения МПК с референтными значениями МПК антибиотиков для контрольных штаммов, даже в случае выполнения исследований персоналом, не имеющим достаточного опыта работы.

ЛИТЕРАТУРА

1. ISO 20776-1:2006 «Clinical laboratory testing and in vitro diagnostic test systems — Susceptibility testing of infectious agents and evaluation of performance of antimicrobial susceptibility test devices». Part 1 : Reference method for testing the in vitro activity of antimicrobial agents against rapidly growing aerobic bacteria involved in infectious diseases.