

А.Н. КОСИНЕЦ, Е.А. КОНОПЕЛЬКО,
С.Д. ФЕДЯНИН, В.К. ОКУЛИЧ

**ТЕСТ-СИСТЕМЫ «АБ-СТАФ»,
«АБ-ПСЕВ», «АБ-ЭНТЕР»
ДЛЯ ЭКСПРЕСС-ОЦЕНКИ
ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ
МИКРООРГАНИЗМОВ К
АНТИБИОТИКАМ**

УО «Витебский государственный
медицинский университет»,
Республика Беларусь

Гнойно-воспалительные заболевания и осложнения занимают значительное место в структуре хирургической заболеваемости [9].

Применение новых современных антибиотиков (АБ) не только не снижает актуальность проблемы эффективного лечения гнойно-воспалительных процессов, но и способствует появлению и распространению множественной устойчивости микроорганизмов к ним [6, 9, 11].

Важную роль в этиологической диагностике, профилактике и лечении гнойно-воспалительных заболеваний имеет бактериологическое исследование. Оно позволяет идентифицировать микроорганизм – возбудитель хирургической инфекции, определить его спектр чувствительности к АБ, что необходимо для правильного выбора АБ и разработки схем эмпирической терапии [2, 9].

В этиологической структуре гнойно-воспалительных заболеваний и осложнений, по данным Республиканского научно-практического центра «Инфекция в хирургии», которые, в общем, совпадали с литературными, ведущая роль принадлежит микроорганизмам представителям рода *Staphylococcus* (53,42 %), реже - семейств *Enterobacteriaceae*

(22,92%) и *Pseudomonadaceae* (16,59 %), что и обусловило необходимость создания тест-систем для определения чувствительности к АБ данных групп возбудителей [2, 3, 4, 10, 12].

В настоящее время клиники Республики Беларусь располагают большим набором АБ, который включает представителей практически всех групп. Для проведения рациональной антибактериальной терапии необходимо точное и быстрое определение чувствительности к широкому спектру АБ [9, 11]. Использование тест-систем для этих целей является наиболее целесообразным, оно позволяет упростить и ускорить проведение исследований, расширить спектр определяемых АБ, получить достоверные и воспроизводимые результаты [5, 8].

Современные стандартизованные методы определения чувствительности к АБ подразделяются на диффузионные (метод бумажных дисков) и методы серийных разведений в жидкой или плотной питательной среде [1, 15, 17]. Им присущи определённые достоинства и недостатки.

Метод бумажных дисков наиболее распространён. Он позволяет определить чувствительность одного штамма с использованием одной чашки к шести АБ. Однако полуколичественный учёт, жёсткие требования к питательной среде и методике постановки, несоблюдение которых часто приводит к ошибкам, являются его существенными недостатками. Кроме того, число АБ, к которым изучают чувствительность, явно недостаточно для клинических целей, так как спектр доступных АБ препаратов, используемых в лечении хирургических инфекций, вызванных стафилококками, энтеробактериями и псевдомонадами, значительно шире (от 20 до 30) [1, 5, 9, 15]. Метод диффузии в агар положен в основу отечественных тест-систем «ЭнтероСенс-тест» для определения чувствительности энтеробактерий к АБ и представляет собой набор бумажных дисков [13].

**Концентрации АБ в лунках планшета
(в мкг/мл или г/л после внесения питательной среды)
для тест-систем «АБ-СТАФ», «АБ-ЭНТЕР» и «АБ-ПСЕВ»**

Номер лунки	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Обозначения АБ для рядов:	Тест-система «АБ-СТАФ»											
- А, С, Е, G	Пен 0,125	Окс 2	А+К 4	А+С 8	Цфз 8	Цфт 8	Цфм 4	Имп 4	Мер 4	Эр 1	Ази 4	Лин 8
- В, D, F, Н	Кли 4	Офл 1	Пеф 1	Цип 1	Риф 2	Ген 4	Ами 8	Нет 8	Док 7	Кот 4	Ван 7	К
Обозначения АБ для рядов:	Тест-система «АБ-ЭНТЕР»											
- А, С, Е, G	Амо 4	А+С 4	А+К 4	Цфз 8	Цфр 8	Цфт 8	Цфм 2	Азт 4	Ими 8	Мер 8	Эри 0,5	Ази 2
- В, D, F, Н	Лин 2	Кли 0,5	Кан 8	Ген 4	Нет 4	Ами 8	Док 4	Хло 8	Офл 2	Цип 1	Кот 2	К
Обозначения АБ для рядов:	Тест-система «АБ-ПСЕВ»											
- А, С, Е, G	Цеф 16	Цеф 64	Цфм 4	Цфм 32	Азт 4	Азт 32	Ими 4	Ими 16	Мер 4	Мер 8	Ген 4	Ген 8
- В, D, F, Н	Ами 8	Ами 16	Нет 8	Нет 16	Офл 2	Офл 8	Цип 1	Цип 4	Кот 2	Кот 8	Кар 128	К

Другим доступным методом является метод серийных разведений в жидкой питательной среде, который из-за сложности методики постановки и большого расхода питательных сред не нашёл широкого применения в практической бактериологии. Определение чувствительности с его помощью является наиболее точным, но относительно трудоёмким и дорогим [1, 5, 16]. Методика определения чувствительности методом серийных микроразведений с использованием одной или двух пороговых концентраций препарата положена в основу тест-систем таких производителей, как: Becton Dickinson (США), BioMerieux (Франция), SY-Lab (Австрия), Dade (США), TERMO-Labsystems (Финляндия), ГНЦА Российской Федерации [5, 14, 15]. Однако они недоступны для подавляющего большинства отечественных лабораторий из-за

высокой стоимости – более 4\$ за определение чувствительности одного штамма микроорганизма [9].

Цель работы – разработать тест-системы для определения чувствительности стафилококков, энтеробактерий и псевдомонад к АБ и оценить эффективность их применения.

Нами разработаны «АБ-СТАФ», «АБ-ЭНТЕР», «АБ-ПСЕВ» тест-системы, предназначенные для оценки чувствительности, соответственно, стафилококков, энтеробактерий и псевдомонад к АБ в полужидкой питательной среде.

Основой систем является планшет, который содержит 8 рядов по 12 лунок и позволяет определять чувствительность 4-х микроорганизмов к 23 АБ в тест-системах «АБ-СТАФ» и «АБ-ЭНТЕР» и к 12 - в тест-системе «АБ-ПСЕВ». Последняя лунка каж-

дого четного ряда не содержит АБ и служит для определения положительного контрольного роста. В каждой лунке содержится АБ в пороговой концентрации (для тест-систем «АБ-СТАФ» и «АБ-ЭНТЕР»), а для

системы «АБ-ПСЕВ» в двух лунках содержатся две пороговые концентрации препарата. АБ в виде растворов вносили в лунки, после чего планшет высушивали в специальных условиях.

Таблица 2
Сокращенные названия АБ, используемых в тест-системах «АБ-СТАФ», «АБ-ЭНТЕР» и «АБ-ПСЕВ»

Тест-система «АБ-СТАФ»		Тест-система «АБ-ЭНТЕР»		Тест-система «АБ-ПСЕВ»	
АБ	Сокращенное название	АБ	Сокращенное название	АБ	Сокращенное название
Пенициллин	Пен	Амоксициллин	Амо	Цефоперазон	Цеф
Оксациллин	Окс	Ампициллин + сульбактам	А+С		
Амоксициллин + клавуланат	А+К	Амоксициллин + клавуланат	А+К	Цефепим	Цфм
Ампициллин + сульбактам	А+С	Цефазолин	Цфз		
Цефазолин	Цфз	Цефуросим	Цфр	Азтреонам	Азт
Цефотаксим	Цфт	Цефотаксим	Цфт		
Цефепим	Цфм	Цефепим	Цфм	Имипенем	Ими
Имипенем	Имп	Азтреонам	Азт		
Меропенем	Мер	Имипенем	Ими	Меропенем	Мер
Эритромицин	Эр	Меропенем	Мер		
Азитромицин	Ази	Эритромицин	Эр	Гентамицин	Ген
Линкомицин	Лин	Азитромицин	Ази		
Клиндамицин	Кли	Линкомицин	Лин	Амикацин	Ами
Офлоксацин	Офл	Клиндамицин	Кли		
Пефлоксацин	Пеф	Канамицин	Кан	Нетромицин	Нет
Ципрофлоксацин	Цип	Гентамицин	Ген		
Рифампицин	Риф	Нетилмицин	Нет	Офлоксацин	Офл
Гентамицин	Ген	Амикацин	Ами		
Амикацин	Ами	Доксициклин	Док	Ципрофлоксацин	Цип
Нетромицин	Нет	Хлорамфеникол	Хло		
Доксициклин	Док	Офлоксацин	Офл	Ко-тримоксазол	Кот
Ко-тримоксазол	Кот	Ципрофлоксацин	Цип		
Ванкомицин	Ван	Ко-тримоксазол	Кот	Карбенициллин	Кар
Контрольная лунка	К	Контрольная лунка	К	Контрольная лунка	К

Состав питательной «среды АБ»

bio-Trupcase	17 г
bio-Soyase	3 г
Глюкоза	2,5 г
NaCl	5 г
K ₂ HPO ₄	2,5 г
Ca ⁺⁺	50 мг
Mg ⁺⁺	20 мг
Агар	1,4 г
Дистиллированная вода	до 1000 мл
pH	7,3

Список АБ в тест-системах разработан и составлен нами в результате проведенного исследования, которое позволило установить наиболее часто используемые препараты в хирургических отделениях Республики Беларусь.

Пороговые концентрации АБ в лунках планшета (в мкг/мл или г/л после внесения питательной среды) для тест-систем «АБ-СТАФ», «АБ-ЭНТЕР» и «АБ-ПСЕВ», представлены в таблице 1.

Сокращённые названия АБ, используемых в тест-системах «АБ-СТАФ», «АБ-ЭНТЕР» и «АБ-ПСЕВ» представлены в таблице 2.

Для культивирования микроорганизмов нами разработана питательная среда АБ, состав которой представлен в таблице 3.

Как видно из таблицы 3, основой данной среды является трипсозо-соевый агар, который, как показали проведенные нами исследования, обладает следующими пре-

Компоненты тест-систем «АБ-СТАФ», «АБ-ПСЕВ» и «АБ-ЭНТЕР»

Наименование компонента	Количество
Планшет с АБ	1 шт.
Питательная среда АБ	4 флакона
Стерильный раствор хлорида натрия с массовой долей 0,9%	4 флакона или стандартных ампулы
Наконечники стерильные для автоматических дозаторов вместимостью 200 мкл	4 шт.
Стандартный образец оптической плотности 0,5 оптических единиц (<i>McFarland</i>)	1 шт. (4мл).
Пакетик с силикагелем	1 шт.

имуществами по сравнению с другими питательными средами: на нём хорошо растут стафилококки, энтеробактерии, псевдомонады, и он наиболее оптически прозрачен, что весьма важно для визуального и инструментального учёта.

С целью сокращения времени постановки опыта разработанные тест-системы выпустили в виде комплектов, в состав которых входят компоненты, представленные в таблице 4, и инструкция по применению.

Выделение микроорганизмов - возбудителей гнойно-воспалительных процессов осуществляли согласно общепринятым методикам [7]. Идентификация штаммов производилась с помощью автоматизированного, биохимического анализатора АТВ Expression фирмы «bioMérieux» (Франция).

Для постановки опыта по определению чувствительности готовили взвесь микроорганизмов. Для этого бактериологической петлей вносили одну или более колоний стафилококков, энтеробактерий или псевдомонад, выращенных в течение 18-24 ч при 37°C на МПА или селективной среде (для стафилококков - ЖСА, для энтеробактерий – Эндо, для псевдомонад – Эндо или ЦПХ), в ампулу (флакон) с 2 мл стерильного раствора хлорида натрия с массовой долей 0,9%. Оптическая плотность взвеси в ампуле после внесения микроорганизма должна соответствовать 0,5 оптических единиц (*McFarland*). Это достигалось: путем измерения на денситометре или на спектрофотометре при длине волны 550 нм - 0,125 OD (составляет $1,5 \times 10^8$ КОЕ/мл) или сравнения со стандартом оптической плотности 0,5 оптических единиц (*McFarland*).

Переносили в ампулу с питательной АБ средой 50 мкл приготовленной взвеси бактерий (для тест-системы «АБ-СТАФ») или 5 мкл (для тест-систем «АБ-ПСЕВ» и «АБ-ЭНТЕР» соответственно), тщательно перемешивали. Вносили в каждую лунку план-

шета, содержащего лиофильно высушенные АБ, по 135 мкл питательной среды АБ с микроорганизмами ($\approx 10^7$ КОЕ/мл). Планшет накрывали крышкой и инкубировали 18-24 ч при 35-37°C в термостате.

После инкубации производили визуальный или инструментальный учёт. При визуальном учёте при наличии роста в лунке (для тест-систем «АБ-СТАФ» и «АБ-ЭНТЕР») штамм считали резистентным, а при отсутствии роста – чувствительным к определённому АБ. Для тест-системы «АБ-ПСЕВ» при отсутствии роста в лунках с 1^{-й} и 2^{-ой} концентрацией АБ штамм считали чувствительным, при наличии роста в лунках с 1^{-й} и 2^{-ой} концентрацией штамм считали устойчивым, при наличии роста в лунке с 1^{-й} концентрацией, но отсутствии в лунке со 2^{-ой} концентрацией штамм обладал промежуточной чувствительностью.

Инструментальный учёт производился с помощью комплексной системы «КАН», включающей иммуноферментный анализатор АИФ М/340 – мультискан, компьютер с программным обеспечением, тест-системы и принтер.

Постановка опыта выполняется так же, как и при визуальном учёте, только после инкубации планшета в термостате он помещается в АИФ М/340 и производится измерение оптической плотности раствора в лунках. Сигнал поступает в компьютер, который обрабатывает эти данные и выдаёт готовый результат на мониторе в виде антибиотикограммы. В результате проведенных исследований нами установлено, что положительным следует считать результат при оптической плотности $\geq 0,4$ OD, а отрицательным - $< 0,23$ OD. Антибиотикограмму удобнее для использования распечатать на принтере.

Разработанные тест-системы обладают следующими преимуществами: при определении чувствительности методом серийных разведений АБ в жидкой или плотной

питательной среде большие временные затраты идут на взвешивание АБ и приготовление серийных разведений. При использовании тест-систем пороговые концентрации АБ готовятся заблаговременно и нет необходимости разводить АБ перед каждым определением чувствительности, что снижает трудозатраты в лаборатории и сокращает время постановки опыта оценки чувствительности с 3-4 часов до 15 минут без привлечения дополнительного персонала.

Комплектация систем позволяет осуществлять постановку опыта сразу же после вскрытия комплекта, а возможность визуального и инструментального учета с помощью комплексной системы «КАН» создаёт значительные удобства для пользователя.

Стандартизованный подход к комплектации тест-систем, наличие в них лиофильно высушенных АБ позволяет увеличить их срок годности до года с момента выпуска и создаёт возможности для организации промышленного производства.

Кроме того, разработанные тест-системы позволяют снизить стоимость определения чувствительности одного штамма к АБ примерно с 4 (при использовании импортных систем) до 1 доллара США.

Тест-системы прошли санитарно-гигиенические испытания в Республиканском центре гигиены и эпидемиологии, а также клинические испытания в Витебском областном центре гигиены и эпидемиологии, кафедре микробиологии Гродненского государственного медицинского университета и в Белорусском научно-исследовательском институте эпидемиологии и микробиологии, которые показали возможность их практического применения. Так, внутрианализная и межанализная воспроизводимость результатов со стандартными штаммами составила для тест-систем: «АБ-СТАФ» - 94%, «АБ-ЭНТЕР» - 95%, «АБ-ПСЕВ» - 91%. При сравнении результатов, полученных с помощью тест-систем и методом бу-

мажных дисков, отмечалось несовпадение результатов, колеблющееся в пределах 0-4,95%. Корреляция результатов с системами фирмы *BioMerieux* по совпадающим в списках АБ составила 0,9 (для тест-системы «АБ-ПСЕВ»), 0,92 (для тест-системы «АБ-ЭНТЕР») и 0,91 (для тест-системы «АБ-СТАФ»).

Получены регистрационные документы, утверждённые Белорусским государственным научно-исследовательским институтом стандартизации и сертификации и Министерством здравоохранения Республики Беларусь на тест-систему для определения чувствительности к АБ стафилококков («АБ-СТАФ» система), ТУ РБ 300002704.003 – 2004г. № Мн-7.2487/7.002-0402; энтеробактерий («АБ-ЭНТЕР» система), ТУ РБ 300002704.004 – 2004г. № Мн-7.3516/7.002-0402; псевдомонад («АБ-ПСЕВ» система), ТУ РБ 300002704.005 – 2004г. № Мн-7.3517/7.002-0402.

Произведено 211 тест-систем «АБ-СТАФ», 165 - «АБ-ЭНТЕР» и 129 «АБ-ПСЕВ». Результаты определения чувствительности микроорганизмов к АБ с помощью тест-систем использованы для разработки схем эмпирической антибиотикотерапии наиболее распространённых гнойно-воспалительных заболеваний и осложнений в Республиканском научно-практическом центре «Инфекция в хирургии».

Таким образом, разработанные нами тест-системы характеризуются большим разнообразием АБ, относительной дешевизной, простотой в изготовлении, позволяют повысить эффективность труда персонала лаборатории, снизить стоимость анализа и могут найти широкое применение для определения чувствительности штаммов возбудителей хирургической инфекции в бактериологических лабораториях различного профиля.

ЛИТЕРАТУРА

1. Ермакова Т.С., Титов Л.П. Методы и системы определения чувствительности мик-

- роорганизмов к антибиотикам // БелНИИ-ЭМ - практическому здравоохранению. - Мн., 2000. - С. 73-81.
2. Ерюхин И.А., Гельфанд Б.Р., Шляпников С.А. Хирургические инфекции. - СПб: Питер, 2003. - 864 с.
3. Илюкевич Г.В. Антимикробная химиотерапия в хирургии. - Мн., 2003. - 150с.
4. Карпищенко А.И. Медицинские лабораторные технологии. - СПб., 2002. -Т.2. - с. 245-293.
5. Меньшиков В.В. Частные аналитические технологии. - М., 2003. -Т.4. - с. 139-213.
6. Навашин П.С., Фомина И.П. Рациональная антибиотикотерапия. - М., 1982. - 496 с.
7. Об унификации микробиологических (бактериологических) методов исследования, применяемых в клинко-диагностических лабораториях лечебно-профилактических учреждений: Приказ министерства здравоохранения СССР №535. - М., 1985.
8. Окулич В.К., Федянин С.Д., Конопелько Е.А. Разработка тест-систем для определения чувствительности микроорганизмов к антибиотикам // Роль антропогенных и природных патогенов в формировании инфекционных и неинфекционных болезней человека: Материалы международной конференции 8-9 октября 2002 года. - Минск, 2002. - 453 с.
9. Скала Л.З., Сидоренко С.В., Нехорошева А.Г., Резван С.П., Карп В.П. Практические аспекты современной клинической микробиологии. - М., 1997. - 184 с.
10. Страчунский Л.С., Белоусов Ю.Б., Козлов С.Н. Практическое руководство по антиинфекционной химиотерапии. - М., 2002. - 300 с.
11. Стручков В.И., Гостищев В.К., Стручков Ю.В. Хирургические инфекции. - М., 1991. - 560 с.
12. Тец В.В. Микроорганизмы и антибиотики. Сепсис. - СПб., 2003. - 154 с.
13. Титов Л.П., Ермакова Т.С., Паньшина Е.Ф. Создание отечественных тест-систем «Энтеро-сенс» для мониторинга чувствительности клинических изолятов энтеробактерий к антибиотикам методом диффузии в агар // Иммунопатология, аллергология, инфектология. - 2000. - №3 - С. 139-140.
14. Altwegg M., Zollinger J. Antimicrobial susceptibility testing of Enterobacteriaceae, Aeromonas spp. and Plesiomonas shigelloides with the ATB system // Journal of Microbiological Methods, 7. - 1987. - P. 111-114.
15. Balows A., Hausler W.J., Herrmann K.L., Isenberg H.D., Shadomy H. Manual of Clinical Microbiology. - Fifth Edition /- Washington, D.C. - 1991. - 1363 p.
16. NCCLS. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard Sixth Edition (2003). NCCLS document M7-A6.
17. Vandepitte J., Engbaek K., Piot P., Heuk C.C. Основные методы лабораторных исследований в клинической бактериологии / ВОЗ. Женева, 1994.

Поступила 15.11.2005 г.