

**Министерство здравоохранения Российской Федерации**  
**Научно-методический центр Минздрава РФ по мониторингу антибиотикорезистентности**  
**Научно-исследовательский институт антимикробной химиотерапии**  
**Смоленской государственной медицинской академии**  
**Центральный научно-исследовательский кожно-венерологический институт**

УТВЕРЖДАЮ

Председатель секции по эпидемиологии,  
инфекционным болезням и вирусологии  
Ученого совета МЗ РФ, академик РАМН,  
Профессор \_\_\_\_\_ Покровский В.И.  
" 20 " декабря 2002 г., протокол № 5

**ОПРЕДЕЛЕНИЕ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ**  
**ГОНОКОККОВ К АНТИБАКТЕРИАЛЬНЫМ ПРЕПАРАТАМ**

Пособие для врачей

Смоленск, 2002 г.

Пособие разработано НИИ антимикробной химиотерапии Смоленской государственной медицинской академии, Научно-методическим центром Минздрава РФ по мониторингу антибиотикорезистентности, Центральным научно-исследовательским кожно-венерологическим институтом.

**Авторский коллектив:**

С.В. Сехин, Д.Л. Вознесенский, М.М. Васильев, А.А. Кубанов

**Под редакцией:**

А.А. Кубановой, Л.С. Страчунского

**Рецензенты:**

А.Ф. Мороз, профессор, д.м.н., ведущий научный сотрудник НИИ эпидемиологии микробиологии им. Н.Ф. Гамалеи, заслуженный деятель науки

А.М. Савичева, профессор, д.м.н., НИИ акушерства и гинекологии им. Д.О. Отта  
РАМН

В пособии описано определение чувствительности гонококков к антибактериальным препаратам методами серийных разведений в агаре и диско-диффузионным, а также метод выявления  $\beta$ -лактамаз. Пособие предназначено для лабораторий, занимающихся проблемами резистентности, бактериологов, дерматовенерологов, акушеров-гинекологов.

## ВВЕДЕНИЕ

Гонорея, несмотря на наличие эффективных противогонококковых препаратов, считается трудно контролируемым заболеванием. Ежегодно в мире диагностируется около 60 миллионов случаев гонококковой инфекции [1].

Выбор препаратов для лечения гонореи, как правило, производится эмпирически, на основании локальных данных о резистентности гонококков к антибиотикам. В настоящее время растёт количество штаммов, устойчивых к традиционным препаратам для лечения гонореи (пенициллины, тетрациклины, спектиномицин, фторхинолоны и др.).

Так, распространённость устойчивости к пенициллину составляет от 15,6% в США до 98% во Вьетнаме [2, 3]. К тетрациклину в США устойчивы от 6% до 25,6% штаммов *N.gonorrhoeae*, а в Южной Корее – до 100% [3, 4, 5]. В Испании, Финляндии, Франции, Великобритании 100% штаммов сохраняют чувствительность к спектиномицину [6, 5]. На Филиппинах и в Таиланде встречаемость устойчивых к данному препарату штаммов составляет от 8 до 8,9% [5]. Устойчивость к фторхинолонам в настоящее время является значительной проблемой в Африке, Юго-Восточной Азии и Австралии. Частота обнаружения гонококков, резистентных к ципрофлоксацину на Филиппинах достигает более 70%, в Японии - 42,2%, в Израиле - 64% [3, 7, 8]. В США частота выделения устойчивых к ципрофлоксацину гонококков колеблется от 1,3% до 16% [9]. Как показывают микробиологические и клинические данные последних лет, из всех противогонококковых препаратов только цефтриаксон остаётся полностью эффективным антибиотиком. В США, после внедрения в практику режимов терапии гонореи с использованием цефтриаксона, уровень резистентности гонококков к пенициллину значительно снизился [10].

Существует несколько методов определения чувствительности *N.gonorrhoeae* к антибактериальным препаратам. К качественным относятся методы, основанные на выявлении с помощью ПЦР специфических генетических маркеров, кодирующих резистентность к определённым классам антибиотиков. К полуколичественным относится диско-диффузионный метод. К количественным методам определения чувствительности относятся разведения в агаре и метод Е-тестов. Количественные методы позволяют выявить минимальную подавляющую концентрацию (МПК) антибиотика, т.е. наименьшую концентрацию антибиотика при которой подавляется видимый рост тестируемого микроорганизма. Кроме того, для выявления штаммов, продуцирующих фермент  $\beta$ -лактамазу, разрушающую многие пенициллины

(пенициллин, ампициллин, амоксициллин и др.), используется тест с нитроцефином (хромогенным цефалоспорином).

Как правило, определение чувствительности проводится не с целью лечения определенного пациента, а для эпидемиологического мониторинга резистентных штаммов на определённой территории, для разработки рекомендаций по эмпирическому выбору антибактериальных препаратов при гонококковой инфекции.

Согласно рекомендациям Всемирной организации здравоохранения, если уровень резистентности *N.gonorrhoeae* к антибактериальному препарату составляет более 5%, он не может рутинно применяться для эмпирической терапии гонореи [11, 12]. В США используется еще более строгий критерий - 3% [13].

Рекомендуемая панель антибиотиков для тестирования гонококков включает наиболее характерных представителей различных групп препаратов, применяемых для лечения этих инфекций. К ним относятся пенициллин, цефтриаксон, тетрациклин, ципрофлоксацин, спектиномицин.

### **ПОКАЗАНИЯ К ПРИМЕНЕНИЮ МЕТОДА**

Определение чувствительности клинических штаммов гонококков к антибактериальным препаратам, наиболее часто используемым для лечения гонококковой инфекции.

### **ПРОТИВОПОКАЗАНИЯ К ПРИМЕНЕНИЮ МЕТОДА**

Противопоказаний к применению метода нет.

### **МАТЕРИАЛЬНО-ТЕХНИЧЕСКОЕ ОБЕСПЕЧЕНИЕ МЕТОДА**

1. Стандартные оборудование и материалы микробиологической лаборатории
2. Термостат с повышенным содержанием CO<sub>2</sub> (3-5%) (US Autoflow № NU-4750 по каталогу Nuairge, США или IG 150 № 41300099 по каталогу Jouan, Франция).
3. Стандарт мутности 0,5 по МакФарланду (готовится в лаборатории<sup>\*</sup>)
4. Агар GC Agar Base (№ 11275 по каталогу BBL, США)
5. Комплексная питательная добавка PolyVitex (№ 55651 по каталогу BioMerieux, Франция)

---

<sup>\*</sup> Clinical microbiology procedures handbook / Isenberg HD, ed. in chief. - Washington, DC: American Society for Microbiology, 1992. - 2358 p.

6. Бумажные диски Cefinase (№ 31650 по каталогу BBL, США)
7. Субстанции антибиотиков с известной активностью
  - пенициллин G натриевая соль (№ P-3032 по каталогу Sigma-Aldrich, США)
  - цефтриаксона натриевая соль (№ C-5793 по каталогу Sigma-Aldrich, США)
  - тетрациклин (№ T-3383 по каталогу Sigma-Aldrich, США)
  - ципрофлоксацин (№ 199020 по каталогу ICN Pharmaceuticals, США)
  - спектиномицин (№ S-9007 по каталогу Sigma-Aldrich, США)
8. Диски с антибиотиками
  - пенициллин 10 ЕД (№ 54492 по каталогу BioMerieux, Франция)
  - цефтриаксона натриевая соль 30 мкг (№ 54662 по каталогу BioMerieux, Франция)
  - тетрациклин 30 мкг (№ 54882 по каталогу BioMerieux, Франция)
  - ципрофлоксацин 5 мкг (№ 54932 по каталогу BioMerieux, Франция)
  - спектиномицин 100 мкг (№ 231637 по каталогу BBL, США)
9. Контрольный штамм *Neisseria gonorrhoeae* ATCC® 49226\*\*
10. Контрольный штамм *Staphylococcus aureus* ATCC® 29213\*\*
11. Контрольный штамм *Haemophilus influenzae* ATCC® 10211\*\*

## ОПИСАНИЕ МЕТОДА

### 1. Определение чувствительности гонококков методом разведения в агаре

Референтным методом определения чувствительности гонококков является метод серийных разведений в агаре. Принцип метода заключается в посеве тестируемых штаммов на чашки с питательной средой, содержащей серийные разведения антибиотиков. Существуют различные модификации данного метода, однако, наиболее широко используемой является разработанная Национальным комитетом по клиническим и лабораторным стандартам США (National Committee for Clinical and Laboratory Standards – NCCLS) [14].

---

\*\* ATCC – American Type Culture Collection - Американская коллекция типовых культур микроорганизмов

## **1.1. Питательная среда**

Для постановки чувствительности используется гонококковый агар, состоящий из гонококковой агаровой основы (GC Agar Base, BBL) и 1% комплексной питательной добавки (КПД) (PolyVitex, BioMerieux) без гемоглобина. При тестировании карбапенемов и клавулановой кислоты необходимо использовать добавку, не содержащую цистеин.

Агар готовится следующим образом [15]:

- Агаровая основа (72 г) растворяется в 1000 мл дистиллированной воды на водяной бане и автоклавировается в течение 15 мин при температуре 120°C;
- После автоклавирования раствор остужают примерно до 50°C, после чего тщательно смешивают с 10 мл КПД и разливают в чашки Петри с добавлением антибиотиков и контрольные чашки без антибиотиков;
- После застывания агар оставляют для подсушивания при комнатной температуре на 10-12 часов.

Питательную среду после добавления КПД нельзя автоклавировать.

Чашки с серийными разведениями антибиотиков готовятся за день до постановки чувствительности и оставляются при комнатной температуре в темном месте для подсушивания. Чашки с готовым агаром без антибиотиков можно хранить в герметичных пластиковых пакетах при 4°C в течение не более 2 недель до использования.

Некоторые штаммы гонококков плохо растут на среде без гемоглобина. В таких случаях их необходимо 2-3 раза культивировать на данной среде перед постановкой чувствительности. Если гонококки хранились в морозильной камере или в лиофилизированном виде, то перед тестированием их необходимо рассеять на любой неселективной питательной гонококковой среде (гонококковый шоколадный агар, «Питательная среда для выделения гонококка сухая»), а затем сделать 2-3 пассажа на агаре для определения чувствительности без антибиотиков. Для тестирования всегда используются чистые 24-часовые агаровые культуры.

## **1.2. Приготовление серийных разведений антибиотиков**

При определении чувствительности используются только химически чистые субстанции антибиотиков с известной активностью. Использование лечебных препаратов недопустимо. Для приготовления серийных разведений антибиотика вначале готовится базовый раствор с наивысшей концентрацией. В качестве

растворителя для пенициллина, спектиномицина, цефтриаксона и ципрофлоксацина используется стерильная дистиллированная вода, а для тетрациклина – этанол. Точность всех измерений и манипуляций является критическим моментом, влияющим на качество и достоверность получаемых данных. Поэтому для взвешивания субстанций необходимо использовать электронные лабораторные весы с точностью до 4 знака, для измерения объёмов – калиброванные дозаторы и пипетки.

*При приготовлении чашек Петри, диаметром 90 мм в 1 мл раствора, вносимого в чашку, куда будет добавлено затем 19 мл агара, должно содержаться количество антибиотика в мг, необходимое для получения конечной концентрации в мг/л.*

Необходимое количество субстанции антибиотика (АБ) рассчитывается по формуле [14]:

$$m \text{ АБ теор. (мг)} = \frac{20 \times C (\text{мг/л}) \times V \text{ теор. (л)}}{A (\%)} \times 100\%$$

*m АБ теор.* – расчётная (теоретическая) навеска антибиотика;

*20* – коэффициент, равный объёму агара в чашке Петри в мл;

*C* – концентрация антибиотика, равная верхней границе ряда МПК;

*V теор.* – объём растворителя для растворения теоретической навески;

*A* – активность антибиотика (количество активного вещества, содержащегося в субстанции)

Взвесить точно расчётное количество порошка практически невозможно. Поэтому готовят близкую к расчётной навеску, а затем пересчитывают количество необходимого растворителя [14]:

$$V \text{ практ. (л)} = \frac{m \text{ АБ практ. (мг)} \times V \text{ теор. (л)}}{m \text{ АБ теор. (мг)}}$$

*V практ.* – объём растворителя для растворения практической навески;

*m АБ практ.* – полученная навеска антибиотика;

*m АБ теор.* – расчётная (теоретическая) навеска антибиотика;

*V теор.* – объём растворителя для растворения теоретической навески;

После приготовления базового раствора готовится серия двойных разведений, т.е. каждое следующее разведение делают в 2 раза менее концентрированным. Общепринятым является использование двойных разведений, начиная с концентрации 1 мг/л в большую и меньшую стороны. Для этого из 1 мл базового раствора смешивают

с 1 мл стерильной воды, затем 1 мл получившегося раствора смешивают с 1 мл стерильной воды и т.д. Для приготовления серии разведений используются любые стерильные химически инертные лабораторные ёмкости с завинчивающимися крышками объёмом не менее 10 мл (для удобства размешивания).

Серия разведений должна включать в себя пограничные концентрации и допустимые диапазоны МПК для контрольных штаммов (табл. 1).

**Таблица 1. Рекомендуемые серии разведений антибиотиков для определения чувствительности *N.gonorrhoeae***

Препарат	Концентрация АБ в мг/л											
	0,015	0,03	0,06	0,125	0,25	0,5	1	2	4	8	16	32
<b>Пенициллин</b>	0,015	0,03	0,06	0,125	0,25	0,5	1	2	4	8	16	32
<b>Цефтриаксон</b>	0,0005	0,001	0,002	0,004	0,008	0,015	0,03	0,06	0,125	0,25	0,5	1
<b>Тетрациклин</b>	0,015	0,03	0,06	0,125	0,25	0,5	1	2	4	8	16	32
<b>Ципрофлоксацин</b>	0,002	0,004	0,008	0,015	0,03	0,06	0,125	0,25	0,5	1	2	4
<b>Спектиномицин</b>	0,25	0,5	1	2	4	8	16	32	64	128	256	512

При приготовлении стандартных пластиковых чашек диаметром 90 мм необходимо к 1 мл раствора антибиотика добавить 19 мл разогретого до 50°C жидкого агара. Чашки предварительно маркируются с указанием препарата и его концентрации. Очень важно тщательно перемешивать агар до того, как он начнёт застывать для равномерного распределения антибиотика по всей толще питательной среды. Перемешивание производится на горизонтальной поверхности последовательно плавными круговыми движениями чашки по часовой стрелке, против часовой стрелки вверх, вниз, вправо, влево по 3-4 раза. После приготовления чашек агар должен затвердеть в горизонтальном положении. Нельзя резко передвигать, переносить чашки до полного застывания агара. Кроме чашек с антибиотиками, параллельно готовятся также чашки без них для контроля роста гонококков.



### 1.3. Инокуляция чашек с агаром

Для инокуляции чашек с антибиотиками из суточных культур готовятся суспензии микроорганизмов, которые должны содержать примерно  $1,5 \times 10^8$  КОЕ/мл. Для контроля и стандартизации суспензии используется стандарт мутности 0,5 МакФарланд [16].

Для приготовления стандарта мутности необходимо:

0,048 М  $\text{BaCl}_2$  (1,175% раствор  $\text{BaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$ )

0,18 М (0,36 N)  $\text{H}_2\text{SO}_4$  (1% раствор)

Способ приготовления:

- Добавить 0,5 мл 0,048 М  $\text{BaCl}_2$  (1,175% раствор  $\text{BaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$ ) к 99,5 мл 0,18 М (0,36 N)  $\text{H}_2\text{SO}_4$  (1% раствор);
- Проверить оптическую плотность приготовленного стандарта мутности с помощью спектрофотометра с длиной светового пути 1 см и подходящей кюветой для определения поглощения. Поглощение при длине волны 625 нм должно быть 0,08-0,10 для стандарта мутности 0,5 по МакФарланду;
- Разлить по 4-6 мл полученной взвеси в пробирки с хорошо закручивающимися крышками такого же размера и качества, как и те, что используются для приготовления инокулюма;
- Плотнo закрыть пробирки и хранить их в темном месте при комнатной температуре;
- Интенсивно взболтать приготовленный стандарт мутности непосредственно перед использованием;
- Стандарт мутности необходимо обновлять или проверять его оптическую плотность ежемесячно.

Для приготовления суспензии гонококков после инкубации в течение 18-24 ч с поверхности агара забираются несколько колоний стерильным тампоном или петлей, и переносятся в прозрачную пробирку, содержащую стерильный 0,9% NaCl. Пробирка взбалтывается на лабораторном шейкере, и её мутность сравнивается со стандартом 0,5 МакФарланд (его необходимо предварительно встряхнуть) на фоне тёмного поля с белыми продольными полосками. Если пробирка прозрачнее стандарта, то необходимо добавить бактерии, если более мутная – физиологический раствор. После достижения одинаковой со стандартом мутности концентрация микроорганизмов составляет примерно  $1,5 \times 10^8$  КОЕ/мл.

Не позднее 15 мин после приготовления суспензии необходимо произвести посев на агар с серийными разведениями. Для инокуляции следует перенести на поверхность агара 1-2 мкл полученной суспензии. Это можно сделать с помощью калиброванных петель или с помощью различного рода репликаторов. Репликаторы

представляют собой плашку с определённым количеством лунок (каждая объёмом около 1 мл), куда стерильными пипетками (отдельными для каждого штамма) наливается бактериальная суспензия, и головку со стержнями (соответствующими лункам) из металла или полимерных материалов. Диаметр стержней обычно равен 3 мм, и они переносят на агар 1-2 мкл взвеси микроорганизмов, что соответствует  $10^4$  КОЕ/точку. Стержни опускаются в лунки с суспензией, набирают стандартный объём жидкости и делают отпечаток на чашке. Таким образом инокулируется вся серия чашек с различными концентрациями. Перед инокуляцией следует приготовить схему лунок для дальнейшего считывания и регистрации результатов.

#### **1.4. Учёт результатов определения чувствительности**

Результаты определения чувствительности считываются через 20-24 ч инкубации в указанных условиях. Если по истечении данного времени рост микроорганизмов в точках инокуляции сомнительный, то инкубацию можно продлить ещё в течение 18-24 ч. Минимальной подавляющей концентрацией считается наименьшая концентрация антибиотика при которой отсутствует рост гонококка. При этом необходимо дифференцировать наличие роста со следами высохшей суспензии. Также не учитывается как наличие роста единичная колония. Интерпретацию результатов производят в соответствии с критериями, специально разработанными экспертными комитетами в результате сопоставления данных по чувствительности микроорганизмов, получаемых *in vitro*, с фармакокинетическими свойствами антибиотиков, клиническим и микробиологическим эффектами, получаемыми в исследованиях *in vivo* (табл. 2) [14]. Штаммы, устойчивые к используемым для тестирования представителям групп антибиотиков, также будут резистентны и к остальным препаратам из этих групп. Так, если гонококки устойчивы к пенициллину, то неэффективными против них будут и другие природные и полусинтетические пенициллины, цефалоспорины I поколения. Штаммы, резистентные к тетрациклину, также устойчивы к доксициклину. Резистентность к цiproфлоксацину распространяется на все фторхинолоны II поколения (офлоксацин, ломефлоксацин, норфлоксацин, пефлоксацин). В настоящее время не существует данных в отношении перекрёстной устойчивости гонококков к цефалоспорином III-IV поколений, так как до сих пор не выявлены резистентные к ним штаммы.

**Таблица 2. Критерии интерпретации результатов определения чувствительности *N.gonorrhoeae* к антибиотикам методом разведений в агаре**

Препарат	МПК (мг/л)			Примечания
	Ч*	У-Р*	Р*	
Пенициллин	≤ 0,06	0,12-1	≥ 2	
Цефтриаксон	≤ 0,25	–	–	Не разработаны критерии резистентности
Тетрациклин	≤ 0,25	0,5-1	≥ 2	
Ципрофлоксацин	≤ 0,06	0,12-0,5	≥ 1	
Спектиномицин	≤ 32	64	≥ 128	

\* Ч – чувствительный; У-Р – умеренно-резистентный; Р – резистентный

При анализе полученных результатов к группе клинически резистентных относятся как микробиологически резистентные, так и умеренно-резистентные штаммы.

### **1.5. Контроль качества**

При постановке теста необходимо каждый раз проводить контроль качества с помощью референтного штамма *N.gonorrhoeae* ATCC® 49226, для которого известен профиль чувствительности к антибиотикам. Для этого в первую и последнюю лунки плашки инокулятора помещается суспензия данного штамма. При нахождении результатов определения чувствительности контрольного штамма в допустимых пределах (табл. 3) в обеих точках можно учитывать и регистрировать результаты тестируемых штаммов. Для контроля также в 1-2 лунки плашки репликатора наливается стерильный 0,9% NaCl (тот, который использовался для приготовления бактериальной суспензии). Если в точках его инокуляции нет роста каких-либо бактерий, то раствор не был контаминирован, и можно учитывать результаты тестирования.

**Таблица 3. Допустимые пределы МПК для *N.gonorrhoeae* ATCC® 49226 [14]**

<b>Препарат</b>	<b>МПК (мг/л)</b>
Пенициллин	0,25-1
Цефтриаксон	0,004-0,016
Тетрациклин	0,25-1
Ципрофлоксацин	0,001-0,008
Спектиномицин	8-32

## **2. Определение чувствительности гонококков диско-диффузионным методом**

Принцип этого метода основан на способности антибиотиков диффундировать из пропитанных ими бумажных дисков в питательную среду, угнетая рост микроорганизмов, посеянных на поверхности агара. В качестве дисков с антибиотиками следует использовать только стандартизированные диски качественного производства, например, BioMerieux (Франция).

### **2.1. Питательная среда**

Для диско-диффузионного метода используется такая же, как и для разведений в агаре питательная среда, но при тестировании карбапенемов и клавулановой кислоты нет необходимости использовать не содержащую цистеин добавку. Очень важным моментом является толщина слоя агара в чашке. Она должна составлять  $4,5 \pm 0,5$  мм. Для этого в чашку Петри диаметром 90 мм добавляют строго 20 мл, диаметром 100 мм – 25 мл агара, а диаметром 150 мм – 60 мл агара.

### **2.2. Инокуляция чашек с агаром**

Подготовка штаммов и бактериальной взвеси производится по тем же правилам, что и для серийных разведений в агаре. Суспензия также наносится на поверхность агара не позднее 15 минут после приготовления с помощью стерильного ватного тампона, который после погружения в суспензию отжимается о стенки пробирки для удаления избытка жидкости. Посев производится штриховыми движениями в 3 разных направлениях (поворачивая чашку Петри на  $60^\circ$ ) для получения равномерного роста.

### 2.3. Нанесение дисков с антибиотиками

Незамедлительно после инокуляции агара, на его поверхность помещаются диски с антибиотиками (не более 4 дисков на чашку диаметром 90-100 мм и не более 9 – диаметром 150 мм) с помощью пинцета или автоматического аппликатора (диспенсера). Условия инкубации те же, что и при предыдущем методе.

### 2.4. Учёт результатов определения чувствительности

Учёт результатов производится через 20-24 ч в отражённом свете путём измерения диаметра зоны подавления роста линейкой или каллипером. Интерпретацию проводят в соответствии с критериями, представленными в таблице 4 [14].

**Таблица 4. Критерии интерпретации результатов определения чувствительности *N.gonorrhoeae* к антибиотикам диско-диффузионным методом**

Препарат	Тип диска	Диаметр зоны подавления роста (мм)			Примечания
		Ч	У-Р	Р	
Пенициллин	10 ЕД	≥ 47	46-27	≤ 26	При диаметре ≤ 19 мм высока вероятность выработки штаммом β-лактамазы
Цефтриаксон	30 мкг	≥ 35	–	–	Не разработаны критерии резистентности
Тетрациклин	30 мкг	≥ 38	37-31	≤ 30	При диаметре ≤ 19 мм высока вероятность плазмидной резистентности
Ципрофлоксацин	5 мкг	≥ 41	40-28	≤ 27	
Спектиномицин	100 мкг	≥ 18	17-15	≤ 14	

Как и при использовании метода серийных разведений, к клинически резистентным относятся и резистентные, и умеренно-резистентные штаммы по результатам тестирования *in vitro*.

### 2.5. Контроль качества

Контроль качества также осуществляется при каждом определении чувствительности с использованием контрольного штамма *N.gonorrhoeae* ATCC® 49226 (табл. 5) [14].

**Таблица 5. Допустимые пределы зон подавления роста *N.gonorrhoeae* АТСС® 49226**

Препарат	Диаметр зоны подавления роста (мм)
Пенициллин	26-34
Цефтриаксон	39-51
Тетрациклин	30-42
Ципрофлоксацин	48-58
Спектиномицин	23-29

Результаты определения чувствительности считаются достоверными, если зоны задержки роста для контрольного штамма укладываются в допустимые пределы.

### **3. Определение продукции $\beta$ -лактамаз гонококками**

Наиболее достоверным и удобным методом выявления ферментов, разрушающих  $\beta$ -лактамы является использование нитроцефина. Это синтетический цефалоспорин для лабораторного использования, изменяющий окраску со светло-жёлтого на розовый или красный в присутствии  $\beta$ -лактамаз.

Для постановки теста используются диски, пропитанные нитроцефином – Cefinase (BBL, США) [16]. Диск помещается на чистую чашку Петри и смачивается дистиллированной водой. Несколько колоний одного штамма гонококков помещается на диск. При изменении цвета с жёлтого на розовый или красный в течение 5 с – 15 мин тест расценивается как положительный. При отсутствии изменения окраски диска через 15 мин – как отрицательный.

В качестве положительного контроля используется *Staphylococcus aureus* АТСС® 29213, а в качестве отрицательного – *Haemophilus influenzae* АТСС® 10211.

### **ЭФФЕКТИВНОСТЬ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ МЕТОДА**

Эффективность использования данных методов была подтверждена при исследовании чувствительности к различным антибиотикам более 350 клинических штаммов *N.gonorrhoeae*, собранных в Смоленске и Москве (табл. 7) [17, 18, 19].

**Таблица 7. Антибиотикорезистентность *N.gonorrhoeae* в России**

Препарат	Количество резистентных штаммов, %		
	Смоленск, 2000 г.	Москва, 2000 г.	Смоленск, 2001 г.
Пенициллин	38,4	43,9	69,2
Цефтриаксон	0	0	0
Тетрациклин	62,8	73,7	90,4
Ципрофлоксацин	1,2	7	0
Спектиномицин	3,5	22,8	3,8

Полученные данные свидетельствуют об утрате пенициллином своей роли в лечении гонококковой инфекции. В связи с перекрёстной резистентностью для лечения гонореи также не могут применяться ампициллин, амоксициллин, бициллины.

Очень высокий уровень резистентности к тетрациклину не допускает его применения, как и доксицилина (перекрёстная устойчивость), при инфекциях, вызываемых *N.gonorrhoeae*.

Учитывая отсутствие устойчивых к цефтриаксону клинических штаммов, а также его хорошую переносимость, минимальное количество противопоказаний, возможность применения во всех возрастных группах, у беременных он может быть рекомендован в качестве препарата выбора для лечения гонококковой инфекции.

Ципрофлоксацин и спектиномицин могут применяться для лечения гонореи только после выяснения локального профиля резистентности гонококков.

Таким образом, применение методов, описанных в данном пособии, позволит унифицировать определение чувствительности гонококков к антибиотикам в бактериологических лабораториях различных регионов России, наладить систему сбора гонококков и мониторинг их антибиотикорезистентности.

Накопление и систематизация отечественных данных по чувствительности гонококков к антибиотикам будет служить основой для выработки рекомендаций по антибактериальной терапии гонококковой инфекции в Российской Федерации.

## Литература:

1. Ison CA, Dillon J, Tapsall JW. The epidemiology of global antibiotic resistance among *Neisseria gonorrhoeae* and *Haemophilus ducreyi* // Lancet. - 1998. - Vol. 351, Suppl III. - P. 8-11.
2. Fox KK, Knapp JS, Holmes KK, et al. Antimicrobial resistance in *Neisseria gonorrhoeae* in the United States, 1988-1994: the emergence of decreased susceptibility to the fluoroquinolones // J Infect Dis. - 1997. - Vol. 175, № 6. - P. 1396-1407.
3. WHO. The Gonococcal Antimicrobial Surveillance Programme (GASP) // Weekly Epidemiological Rec. - 1997. - Vol. 72, №5. - P. 25-27.
4. Division of STD/HIV Prevention. Sexually Transmitted Disease Surveillance, 1995 / U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service. - Atlanta: Centers for Disease Control and Prevention, 1996. - 134 p.
5. Tapsall J. Antimicrobial resistance in *Neisseria gonorrhoeae*. - Sydney, Australia: WHO Collaborating Centre for STD and HIV, 2001. - 58 p.
6. Berron S., Vazquez J.A., Gimenez M.J., et al. In vitro susceptibilities of 400 Spanish isolates of *Neisseria gonorrhoeae* to gemifloxacin and 11 other antimicrobial agents // Antimicrob Agents Chemother. - 2000. - Vol. 44, № 9. - P. 2543-2544.
7. Knapp J.S. *Neisseria gonorrhoeae* resistant to ciprofloxacin and ofloxacin // Sex Transm Dis. - 1998. - Vol. 25, - № 8. - P. 425-426.
8. Dan M., Poch F., Shneinberg B. High prevalence of high-level ciprofloxacin resistance in *Neisseria gonorrhoeae* in Tel Aviv, Israel: correlation with response to therapy // Antimicrob Agents Chemother. - 2002. - Vol. 46, №6. - P. 1671-1673.
9. Gordon SM, Carlyn CJ, Doyle LJ, et al. The emergence of *Neisseria gonorrhoeae* with decreased susceptibility to ciprofloxacin in Cleveland, Ohio: epidemiology and risk factors // Ann Intern Med. - 1996. - Vol. 125, № 6. - P. 465-70.
10. Knapp JS. Antimicrobial resistance in *Neisseria gonorrhoeae* in the United States // Clinical Microbiology Newsletter. - 1999. - Vol. 21, №1. - P. 1-7.
11. World Health Organization. STD Treatment Strategies. - Geneva: WHO, 1989. - 30 p.
12. World Health Organization. Management of sexually transmitted diseases. - Geneva: WHO, 1997. - 47 p.
13. Centers for Disease Control and Prevention. Antibiotic-resistant strains of *Neisseria gonorrhoeae*: policy guidelines for detection, management and control // MMWR. - 1987. - Vol. 36, Suppl. 5. - P. 1-18.



14. NCCLS. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twelfth Informational Supplement. NCCLS Document M100-S12. - 2002. - 136 p.
15. Atlas R.M. Handbook of microbiological media / 2nd ed. – Philadelphia: CRC Press, Inc., 1997. - 1706 p.
16. Clinical microbiology procedures handbook / Isenberg HD, ed. in chief. - Washington, DC: American Society for Microbiology, 1992. - 2358 p.
17. Страчунский Л.С., Сехин С.В., Борисенко К.К. и др. Чувствительность гонококков к антибиотикам и выбор антибактериальных препаратов при гонококковой инфекции // ИППП. - 1999. - № 2. - С. 26-29.
18. Чувствительность *N.gonorrhoeae* в России. Available on URL: <http://www.antibiotic.ru/index.php?doc=94>
19. Сехин С.В. Оптимизация диагностики и антибактериальной терапии гонореи у женщин // Дисс. канд. мед. наук. - Смоленск. - 2002. - 125 с.