

УДК 616.327-002

## ***Streptococcus pyogenes*: характеристика микроорганизма, выделение, идентификация и определение чувствительности к антибактериальным препаратам**

К.В. Шпынев, О.И. Кречикова, В.А. Кречиков, Р.С. Козлов

НИИ антимикробной химиотерапии, Смоленск, Россия

*Streptococcus pyogenes* ( $\beta$ -гемолитический стрептококк серогруппы А) – один из наиболее распространенных возбудителей бактериальных инфекций человека. Отмеченное в последние десятилетия изменение эпидемиологии стрептококковых инфекций, проявляющееся ростом заболеваемости тяжелыми инфекциями (некротизирующий фасцит, синдром токсического шока), повышает интерес к инфекциям, вызываемым *S. pyogenes*, и методам их лабораторной диагностики.

В статье рассматривается эпидемиология инфекций, вызываемых *S. pyogenes*, дается общая характеристика микроорганизма и детально описываются факторы вирулентности.

Также в статье приводится современная классификация бета-гемолитических стрептококков, описываются современные методы выделения и идентификации *S. pyogenes*. Кроме того, помимо детального описания методов определения чувствительности микроорганизма к антимикробным препаратам приводится характеристика механизмов резистентности, знание которых позволяет правильно интерпретировать результаты.

**Ключевые слова:** *Streptococcus pyogenes*, бета-гемолитический стрептококк группы А, выделение, идентификация, определение чувствительности.

### ***Streptococcus pyogenes*: Characteristics of the Pathogen, Isolation, Identification and Susceptibility Testing**

K.V. Shpynev, O.I. Kretchikova, V.A. Kretchikov, R.S. Kozlov

Institute of Antimicrobial Chemotherapy, Smolensk, Russia

*Streptococcus pyogenes* (group A streptococcus) is one of the most important bacterial pathogen in human. In light of recent reports suggesting global changes in the epidemiology of streptococcal infections, and given the increase in severe clinical manifestations of GAS infection, attention to GAS infections and its laboratory diagnosis is in the rise.

This paper describes epidemiology of GAS infections, general characteristics of the pathogen, and virulence

factors. Modern classification of beta-hemolytic streptococci and methods of isolation and identification of *S. pyogenes* are also described. Susceptibility testing and mechanisms of antimicrobial resistance are characterized.

**Key words:** *Streptococcus pyogenes*, group A beta-hemolytic streptococcus, isolation, identification, susceptibility testing.

Контактный адрес:  
Шпынев Константин Вячеславович  
214019, г. Смоленск, а/я 74

**Введение**

Заболевания, вызываемые стрептококками, были описаны задолго до того времени, когда стрептококки были выявлены и идентифицированы. Стрептококки впервые были обнаружены в тканях человека при рожистом воспалении и раневых инфекциях Т. Бильротом в 1874 г. [1]

*Streptococcus pyogenes* ( $\beta$ -гемолитический стрептококк серогруппы А – БГСА) – один из наиболее распространенных возбудителей бактериальных инфекций человека. *S. pyogenes* вызывает такие заболевания как тонзиллофарингит, скарлатина, импетиго, рожистое воспаление, флегмоны, некротизирующий фасцит, миозит, артрит, синдром токсического шока. К иммунологически опосредованным осложнениям инфекций относятся острая ревматическая лихорадка и гломерулонефрит. Отмеченное в последние десятилетия изменение эпидемиологии стрептококковых инфекций, проявляющееся ростом заболеваемости тяжелыми инфекциями (некротизирующий фасцит, синдром токсического шока) [2], повышает интерес к инфекциям, вызываемым *S. pyogenes*, и методам их лабораторной диагностики.

**Эпидемиология [3]**

**Естественный резервуар.** *S. pyogenes* вызывает инфекции только у человека. Кожа и слизистые оболочки человека служат естественным резервуаром данного микроорганизма, а больные или носители являются единственным источником инфекции.

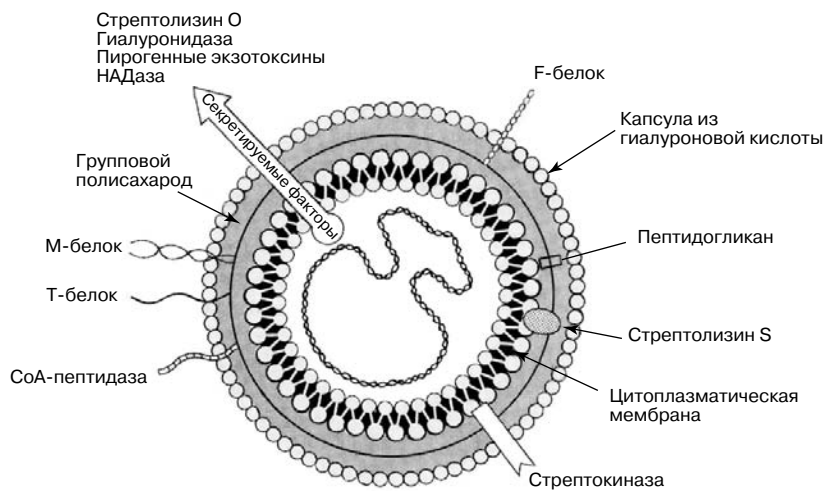
**Передача** происходит воздушно-капельным путем или при непосредственном контакте. В орга-

низованных коллективах возможны вспышки заболеваний. Эпидемические вспышки фарингита и скарлатины возможны при употреблении инфицированного непастеризованного молока или пищи.

**Заболеваемость.** Наиболее высокая заболеваемость фарингитами/тонзиллитами, вызываемыми *S. pyogenes*, отмечается у детей младше 10 лет в осенне-весенний период. Бессимптомное носительство возбудителя в ротоглотке также более распространено среди детей (15–20%) по сравнению с взрослыми (5%). Импетиго наиболее характерно для детей 2–5 лет, чаще в летнее время. Скарлатина в 90% случаев наблюдается у детей 2-8 лет, и, как и фарингит, чаще в зимние месяцы. Инвазивные инфекции чаще отмечаются у новорожденных и пожилых.

**Общая характеристика**

*S. pyogenes* является представителем рода *Streptococcus* (семейство *Streptococcaceae*), в который входят грамположительные, неподвижные, неспорообразующие, каталазо- и оксидазоотрицательные кокки, являющиеся факультативными анаэробами, рост которых усиливается при повышении содержания CO<sub>2</sub> в атмосфере инкубации до 5–7%. Микроорганизмы прихотливы, для их выращивания обычно используются питательные среды с добавлением крови. Строение клеточной стенки *S. pyogenes* типично для грам(+) бактерий (рис. 1). Ее основой является пептидогликан и тейхоевые кислоты со встроенными белками. Антигенное разнообразие полисахарида клеточной стенки положено в основу серологической классификации  $\beta$ -гемо-



**Рис. 1.** Схематическое изображение строения клетки *S. pyogenes*, поверхностных и секретируемых факторов вирулентности [3].

литических стрептококков. Имеется капсула из гиалуроновой кислоты, окружающая клетку микроорганизма и играющая важную роль в патогенезе инфекций [3].

Помимо капсулы, к факторам вирулентности микроорганизма относятся поверхностные белки (М-белок, F-белок, фактор опалесценции, стрептолизин S, стрептокиназа, С5а-пептидаза) и продукты, секретируемые в окружающую среду (стрептолизин О, гиалуронидаза, НАДаза, пирогенные экзотоксины) [3].

### Классификация

С появлением микроскопии были выявлены кокки, объединенные в цепочки (Т. Бильрот, 1874 г.), откуда и пошло название вида (от греч. *streptos* – цепочка), а в последующем – рода. Позже стрептококки были разделены в зависимости от проявляемых гемолитических свойств (Д. Браун, 1919 г.). По типу определяемого на кровяных средах лизиса эритроцитов все стрептококки подразделяются на следующие типы:

- $\alpha$ -гемолитические (зеленящие), вызывающие частичный гемолиз;
- $\beta$ -гемолитические, вызывающие полный гемолиз;
- $\gamma$ -гемолитические (негемолитические), не вызывающие гемолиза [1].

Р. Ленсфильд (1933 г.) предложила серологическую классификацию  $\beta$ -гемолитических стрептококков. В основу ее классификации положены антигенные свойства полисахарида клеточной стенки (группового полисахарида), экстрагируемого с помощью кислоты. Различие антигенов определило существование 20 **серогрупп**. Групповой полисахарид не является фактором патогенности стрептококков [1].

В пределах серогруппы по типоспецифическому антигену можно выделить **серотипы**. В роли типоспецифического антигена может выступать, например, важнейший фактор патогенности, обеспечивающий защиту микроорганизма от фагоцитоза – М-белок (классификация предложена Р. Ленсфильд). Также в роли типоспецифического антигена может быть использован не имеющий патогенных свойств Т-белок (классификация предложена Ф. Гриффитом). Так, в серогруппе А на основании антигенных свойств М-белка выделяют более 100 серотипов, а по антигенным свойствам Т-белка – более 20 серотипов. Типирование БГСА (по М- и Т-белку) проводится в научных целях в рамках эпидемиологических исследований [3].

Ферментативная активность стрептококков положена в основу видовой классификации.

Известные на сегодняшний день виды  $\beta$ -гемолитических стрептококков и их биохимические свойства приведены в табл. 1.

Видовая идентификация обычно в повседневной практике не проводится из-за ее относительной трудоемкости и низкого клинического значения. Более простой путь идентификации – использование гемолитических (определение типа гемолиза) и антигенных (определение серогруппы) свойств микроорганизмов. Полезным также является использование «ключевых» фенотипических свойств, описанных ниже.

Между различными классификациями существует сложная взаимосвязь. При определении серологических свойств  $\beta$ -гемолитических стрептококков можно выделить 20 серогрупп. При этом некоторые из групповых антигенов могут определяться и у зеленящих стрептококков. Микроорганизмы различных видов могут иметь одинаковые групповые антигены, а штаммы одного вида – разные групповые антигены. Например, зеленящие стрептококки группы *anginosus* (ранее называемой *S. milleri*) – *S. anginosus*, *S. constellatus*, *S. intermedius* – могут содержать любой из групповых антигенов А, С, G или F. Серогруппа В, наоборот, представлена только одним видом *S. agalactiae*.

Бета-гемолитические стрептококки серогруппы А, в основном, представлены видом *S. pyogenes*, поэтому эти два понятия часто рассматриваются как синонимы. Но к  $\beta$ -гемолитическим стрептококкам серогруппы А могут быть также отнесены некоторые штаммы *S. dysgalactiae* subsp. *equisimilis* и группы *anginosus*. Штаммы *S. dysgalactiae* subsp. *equisimilis* могут продуцировать групповой антиген А, С, G или L, причем представители серогруппы А этого вида чрезвычайно редки. В группе *anginosus*  $\beta$ -гемолитические стрептококки, принадлежащие к серогруппе А, также встречаются редко.

Главным фенотипическим отличием *S. pyogenes* является образование относительно крупных (>0,5 мм в диаметре) колоний на кровяном агаре. Другие виды  $\beta$ -гемолитических стрептококков серогруппы А образуют очень мелкие колонии с зоной гемолиза, в 10 и более раз превышающей размер колоний [4].

### Факторы вирулентности

В патогенезе инфекций, вызываемых *S. pyogenes*, имеют значение капсула, элементы клеточной стенки микроорганизма и секретируемые факторы. Благодаря перечисленным факторам вирулентности обеспечивается адгезия к клеткам человеческого организма, устойчивость к фагоцитозу,

Таблица 1. Виды  $\beta$ -гемолитических стрептококков и их биохимические свойства

Вид	Серогруппа	Вас	PYR	Cam	VP	Hip	Arg	Esc	Str	Sbl	Trc	Rib	Источник
<i>S. pyogenes</i>	A	+	+	-	-	-	+	v	-	-	NA	-	Человек
<i>S. agalactiae</i>	B	-	-	+	-	+	+	-	-	-	NA	NA	Человек, корова
<i>S. dysgalactiae</i> subsp. <i>dysgalactiae</i> <sup>A</sup>	C	-	-	-	-	-	+	v	-	v	+	+	Животные
subsp. <i>equisimilis</i> <sup>B</sup>	A, C, G, L	-	-	-	-	-	+	+	-	-	+	+	Человек, животные
<i>S. equi</i> subsp. <i>equi</i>	C	-	-	-	-	-	+	v	+	-	-	NA	Животные
subsp. <i>zoepidemicus</i>	C	-	-	-	-	-	+	v	+	+	v	NA	Животные, человек
<i>S. canis</i> <sup>B</sup>	G	-	-	+	-	-	+	+	-	-	v	NA	Собака, человек
<i>S. anginosus</i> (группа) <sup>C</sup>	A, C, G, F, нет	-	-	-	+	-	+	+	-	-	+	NA	Человек
<i>S. constellatus</i> subsp. <i>pharynges</i>	C	-	-	-	+	-	+	+	-	-	+	NA	Человек
<i>S. porcinus</i>	E, P, U, V, нет, новая	-	+	+	+	v	+	+	-	+	+	NA	Свинья, человек
<i>S. iniae</i>	Нет	-	+	+	-	-	-	+	+	-	NA	NA	Дельфин, рыбы, человек
<i>S. phocae</i>	C, F	+	-	-	-	-	-	-	-	-	NA	NA	Тюлень
<i>S. didephhis</i>	Нет	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	NA	Опоссум

Примечание: Вас – чувствительность к бацитрацину (+); устойчивость к бацитрацину (-); PYR – пирролидонилариламинидаза; Cam – пирролидонилариламинидаза; VP – реакция Фоггеса-Проксауэра; Hip – гидролиз гипурата; Arg – дезаминирование аргинина; Esc – гидролиз эскулина; Str – гидролиз крахмала; Sbl, Trc, Rib – кислотообразование в бульоне с сорбитолом, трегалозой и рибозой соответственно; «+» – положительная реакция >95%; «v» – отрицательная реакция >95%; «-» – отрицательная реакция >95%; NA – реакция не применяется.

A – *S. dysgalactiae* subsp. *dysgalactiae* не относится к  $\beta$ -гемолитическим стрептококкам и включен в таблицу только из таксономических соображений;  
 B – для дифференцировки *S. canis* и *S. dysgalactiae* subsp. *equisimilis* необходимо провести тесты на  $\alpha$ -галактозидазу,  $\beta$ -галактозидазу и  $\beta$ -глюкуронидазу. *S. canis* дает положительные тесты на  $\alpha$ - и  $\beta$ -галактозидазу и отрицательный на  $\beta$ -глюкуронидазу, *S. dysgalactiae* subsp. *equisimilis* дает противоположные результаты;  
 C – группа *anginosus* объединяет  $\beta$ -гемолитические штаммы видов *S. anginosus*, *S. constellatus* и *S. intermedius*, так как данных о проценте штаммов, содержащих каждый из групповых антигенов, недостаточно.

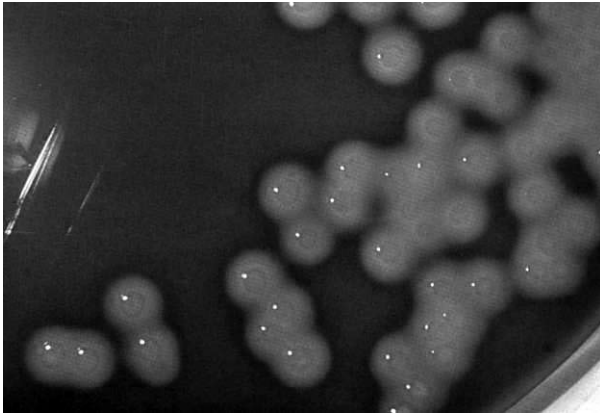


Рис. 2. Слизистые колонии *S. pyogenes* на кровяном агаре.

проникновение и распространение в тканях, их повреждение.

**Капсула.** Наиболее поверхностной структурой микроорганизма является капсула, состоящая из гиалуроновой кислоты. О важности роли капсулы свидетельствует тот факт, что штаммы *S. pyogenes*, лишённые капсулы, значительно менее устойчивы к фагоцитозу и менее вирулентны. Гиалуроновая кислота капсулы идентична гиалуроновой кислоте, входящей в состав основного вещества соединительной ткани человека. Именно благодаря этому сходству капсула выполняет присущие ей функции: повышает адгезивные свойства и устойчивость микроорганизма к фагоцитозу. Штаммы, имеющие толстую капсулу, образуют слизистые колонии на кровяном агаре (рис. 2), хотя отчасти слизистый вид колоний может быть обусловлен обильной продукцией М-белка [3].

**Клеточная стенка** стрептококков состоит из пептидогликана и встроенных в него молекул липотейхоевой кислоты, участвующей в процессе адгезии. Главной функцией клеточной стенки является поддержание структурной прочности микробной клетки.



Рис. 3. Схематическое изображение строения БГСА.

Периплазматические тейхоевые кислоты, располагающиеся между клеточной стенкой и цитоплазматической мембраной, представляют собой групповой полисахарид (рис. 3), антигенные свойства которого используются в классификации  $\beta$ -гемолитических стрептококков и идентификации БГСА. Этот антиген не является поверхностной структурой, поэтому требуется проводить его экстракцию. Групповой полисахарид не является фактором патогенности [3].

**Поверхностные белки.** Некоторые белки клеточной оболочки (М-белок, F-белок) являются важнейшими факторами патогенности БГСА. М-белок представляет собой белок с биспиральной конформацией, выступающий с поверхности микроорганизма (см. рис. 1). М-белок защищает микроорганизм от фагоцитоза, поскольку способен нарушать регуляцию этого защитного механизма [5]. Существует множество вариантов строения М-белка. Типирование стрептококков группы А на основании антигенных свойств М-белка было предложено Р. Ленсфильд. Выделяют более 90 серотипов БГСА по антигенным свойствам М-белка.

При инфицировании определенным М-серотипом *S. pyogenes* в организме вырабатываются типоспецифические (взаимодействующие только с данным типом М-белка) антитела, которые в дальнейшем защищают от инфицирования этим же серотипом микроорганизма. Способность М-белка ингибировать фагоцитоз исчезает в присутствии типоспецифических антител [3].

F-белок (фибронектин-связывающий белок) играет важную роль в адгезии микроорганизма к эпителиальной клетке, связываясь с фибронектином на ее поверхности [6].

T-белок имеет сходство в строении с М-белком, однако не имеет антифагоцитарных свойств и не является фактором патогенности. Антигенные свойства T-белка используются для типирования штаммов БГСА. Ф. Гриффит разработал систему типирования стрептококков группы А по свойствам T-белка [3].

**Opacity factor (OF)** представляет собой фермент липопроотеиназу, расщепляющий липопроотеины сыворотки крови. Роль его в патогенезе инфекций неясна. Липопроотеины растворимы в воде, плазме. При расщеплении липопротеинов липиды освобождаются из связи с белками. В лабораторных условиях появление свободных липидов в сыворотке проявляется феноменом опалесценции. Возможно проведение типирования *S. pyogenes* по признаку наличия или отсутствия OF-фактора (OF<sup>+</sup> и OF<sup>-</sup>) [3].

Стрептолизин S является ферментом, связанным с поверхностью микроорганизма. Роль в патогенезе инфекций окончательно не выяснена. Известно, что стрептолизин S оказывает цитотоксический эффект при контакте *S. pyogenes* с клеткой [7]. В лабораторных условиях цитолитическое действие стрептолизина S, определяемое по лизису эритроцитов кровяного агара вокруг колоний микроорганизма, используется для идентификации.

Стрептокиназа представляет собой фермент, активирующий антисвертывающую систему крови человека, вызывая тем самым растворение тромбов [8]. Вероятно, он имеет значение в распространении возбудителя по организму.

C5a-пептидаза представляет собой фермент, расщепляющий C5a компонент комплемента, который является важнейшим опсоином. При расщеплении C5a фагоцитоз идет значительно менее интенсивно. C5a-пептидаза обладает иммуногенными свойствами, в организме образуются антитела к этому ферменту [3].

**Секретируемые факторы: стрептолизин O, гиалуронидаза, НАДаза, пирогенные экзотоксины.** Фермент стрептолизин O вызывает лизис любых клеток инфицированного организма, а также активирует лейкоциты и эндотелиальные клетки к продукции цитокинов, играющих важную роль в воспалительной реакции макроорганизма [9]. Стрептолизин O иммуногенен, после инфекции титр антител к этому ферменту (антистрептолизин O) возрастает. По уровню антител можно судить о перенесенной недавно инфекции, вызванной *S. pyogenes* [3]. В лабораторных условиях цитолитическое действие стрептолизина O, определяемое по лизису эритроцитов кровяного агара вокруг колоний микроорганизма, используется для идентификации.

Фермент гиалуронидаза вызывает разрушение гиалуроновой кислоты, которая составляет основное вещество соединительной ткани человека, что способствует распространению возбудителя в тканях, особенно при инвазивных инфекциях. Повышение титра антител к этому антигену (антигиалуронидазы) может быть использовано для подтверждения недавно перенесенной инфекции [3].

**Никотин-аденин-динуклеотидаза (НАДаза)** непосредственно влияет на лейкоциты, ослабляя их способность к таксису и фагоцитозу [10]. НАДаза продуцируется многими, но не всеми штаммами *S. pyogenes* [3].

Экзотоксины А, В и С вызывают лихорадку, подавляют синтез антител [11]. С действием экзотоксинов связано развитие скарлатины и синдрома стрептококкового токсического шока [12]. Развитие, как скарлатины, так и стрептококко-

вого токсического шока, обусловлено генерализованным поражением сосудов, возникающим в результате неадекватной реакции иммунной системы на экзотоксины, являющиеся суперантигенами. Ответ на суперантигены проявляется значительным увеличением количества Т-лимфоцитов, которые в избытке продуцируют регуляторные и эффекторные вещества – цитокины (интерлейкин-1, интерлейкин-6, фактор некроза опухоли и др.). Наблюдается феномен цитокинового взрыва. Избыточное количество цитокинов обуславливает развитие лихорадки и шока, повреждаются сосуды и ткани собственного организма [13]. Кроме того, экзотоксин В (цистеиновая протеиназа) активирует кининовую систему, которая в обычных условиях регулирует тонус сосудов. В результате ее активации происходит расширение сосудов и повышается их проницаемость [14], что является важным компонентом развития шока.

Гены, кодирующие экзотоксины А и С, могут передаваться бактериофагами, поэтому возможно превращение штамма *S. pyogenes*, не продуцирующего токсин, в штамм, продуцирующий его (феномен лизогенной конверсии) [15]. Ген экзотоксина В имеется у всех штаммов [16]. Количество продуцируемых экзотоксинов А, В и С значительно варьирует между различными штаммами, механизм регуляции их синтеза не выяснен.

### **Бактериологическая диагностика инфекций**

Материалом для бактериологического исследования служат мазок из ротоглотки, раневое отделяемое, аспираты из очага поражения, биоптаты тканей, кровь и др.

**Принципы выделения *S. pyogenes* из клинического материала.** Для выделения *S. pyogenes* из клинического материала необходимо соблюдать следующие условия.

**Использование приемлемых питательных сред.** *S. pyogenes* является «привередливым» микроорганизмом, требующим для роста на искусственных питательных средах высокого содержания аминокислот и нативного белка животного происхождения.

**Наличие в среде дефибрированной крови.** Кровь необходима не только для обогащения среды нативными белками, но и для определения типа гемолиза, что важно для идентификации.

Исследуемый материал засевают на агар с добавлением 5% дефибрированной крови барана, лошади или крупного рогатого скота. Использование человеческой крови крайне нежелательно, так как в ней содержатся антитела к М-белку, С5а-пептидазе,

стрептолизину О, гиалуронидазе, НАДазае и другим факторам вирулентности *S. pyogenes*. Воздействие антител на растущие микроорганизмы приводит к изменениям морфологии колоний, зоны гемолиза, что затрудняет работу. В человеческой крови могут содержаться антибиотики, влияющие на рост *S. pyogenes*.

*Цитратная кровь не пригодна для исследования!*

В России в ряде лабораторий имеется опыт использования эритроцитарной массы из крови человека вместо дефибринированной крови. Однако использование эритроцитарной массы затрудняет определение основного морфологического признака –  $\beta$ -гемолиза.

В качестве основы для приготовления *кроваго агара* (КА) используют агар Коламбия (Columbia agar), основу для кровавого агара (Blood agar base) или ГРМ-агар №1.

Возможно использование селективных питательных сред, например, кровавого агара с гентамицином (5 мкг/мл) или с добавлением полимиксина Е и налидиксовой кислоты (Columbia CNA Agar).

**Техника посева.** Необходимо тщательно нанести исследуемый материал на 1/6 поверхности агара в чашке, затем с помощью петли провести посев штрихом в четырех квадрантах. Следует сделать проколы вглубь агара в нескольких местах (как в засеянных, так и незасеянных участках чашки) без прожигания петли (рис. 4). Рост микроорганизмов в толще КА (т.е. в условиях ограниченного доступа кислорода) сопровождается максимально выраженной гемолитической реакцией, обусловленной действием как устойчивого к кислороду стрептолизина S, так и кислородочувствительного стрептолизина О.

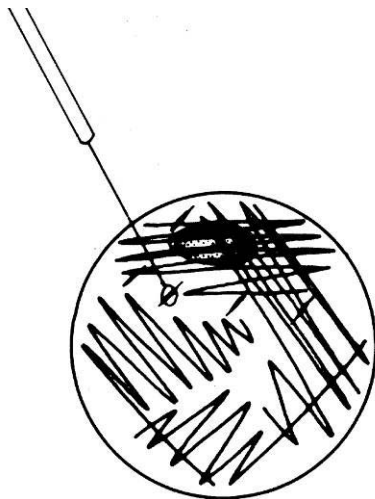


Рис. 4. Техника посева *S. pyogenes*.

**Инкубация.** При использовании КА без добавления антимикробных компонентов чашки можно инкубировать в условиях обычной атмосферы. При использовании селективных сред чашки инкубируются в атмосфере с 5-7% содержанием  $\text{CO}_2$ .

Простым и распространенным методом создания повышенной концентрации  $\text{CO}_2$  является использование эксикатора, в который помещается зажженная свеча. При горении поглощается кислород и образуется  $\text{CO}_2$ . Когда свеча гаснет, концентрация  $\text{CO}_2$  достигает 3%. Однако наиболее предпочтительным является применение  $\text{CO}_2$ -термостата.

Оптимальная температура инкубации – 35-37°C. Если после инкубации в течение 24 ч нет роста, следует инкубировать чашку еще в течение 24 ч и только затем делать оценку.

### Принципы идентификации

Идентификация *S. pyogenes* проводится на основании:

- морфологических особенностей роста;
- фенотипических характеристик;
- антигенной структуры (серологический метод).

### Морфологическая характеристика

Гемолитическая реакция является отправной точкой в идентификации. Для *S. pyogenes* обязательно наличие  $\beta$ -гемолиза – зоны полного просветления шириной 2–3 мм вокруг колонии (рис. 5).

Гемолиз обусловлен действием стрептолизин О и S. В связи с тем, что стрептолизин О экскретируется во внешнюю среду и диффундирует в агар, именно он обуславливает формирование широкой зоны  $\beta$ -гемолиза вокруг колоний. Фермент явля-

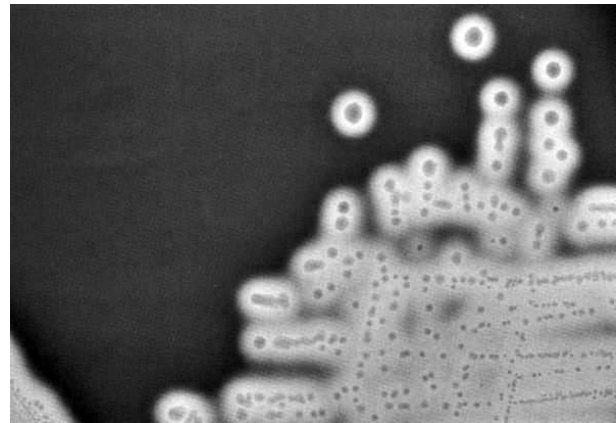


Рис. 5. Зона  $\beta$ -гемолиза вокруг колоний *S. pyogenes* на кровавом агаре.

ется кислородолабильным (не активен в присутствии кислорода), поэтому инкубирование чашек в анаэробных условиях дает более выраженные зоны гемолиза. В этом случае гемолиз обусловлен действием стрептолизинов О и S. Близкие к анаэробным условия создаются при размножении микроорганизмов в толще агара, для чего при посеве на кровяной агар делаются уколы. Стрептолизин S является кислородостабильным ферментом, связанным с поверхностью микроорганизма. Он не диффундирует в агар. При инактивации стрептолизина О (в присутствии кислорода) стрептолизин S обеспечивает формирование очень узкой зоны гемолиза, так как разрушаются только эритроциты, контактирующие с колонией микроорганизма [3].

*S. pyogenes* образует 3 типа колоний [17]:

- *матовые*: круглые колонии серовато-белого цвета 1-2 мм в диаметре с характерным слегка приподнятым центром;

- *слизистые*: колонии правильной круглой формы, блестящие, напоминающие своим видом капельки росы, диаметром 2-2,5 мм. Такие колонии образуют штаммы *S. pyogenes*, продуцирующие большое количество гиалуроновой кислоты (см. рис. 2);

- *гладкие*: относительно небольшие (1 мм в диаметре) колонии сферической формы с ровным краем и блестящей влажной поверхностью.

Микроорганизмы других видов рода *Streptococcus*, относящиеся к  $\beta$ -гемолитическим стрептококкам серогруппы А, формируют очень мелкие колонии, зона гемолиза вокруг них значительно превышает размеры колоний.

### Фенотипические методы идентификации

Дальнейшая идентификация *S. pyogenes* проводится стандартными фенотипическими методами: каталазная реакция, определение чувствительности к бацитрацину и PYR-тест [0].

Из всех  $\beta$ -гемолитических стрептококков только *S. pyogenes* дает положительный PYR-тест и является чувствительным к бацитрацину. Другие виды могут давать положительный результат в одном из тестов (см. табл. 1).

### Каталазная реакция

**Принцип.** Бактерии, продуцирующие каталазу, разлагают пероксид водорода с образованием воды и кислорода. Выделение кислорода сопровождается образованием пузырьков.

**Процедура.** С помощью петли перенесите колонию микроорганизмов на предметное стекло. Материал должен определяться на стекле невооруженным глазом. При переносе культуры с КА

следует уделить внимание тому, чтобы частицы питательной среды не были перенесены на предметное стекло. Поместите 1 каплю 3% раствора пероксида водорода на материал на предметном стекле и наблюдайте, не выделяется ли газ в виде пузырьков. При необходимости можно использовать увеличительное стекло. Пузырьки газа лучше визуализируются на темном фоне.

**Интерпретация результата.** Положительная реакция проявляется быстрым появлением пузырьков газа. Слабоположительная реакция характеризуется образованием 1 или 2 пузырьков. При отрицательной реакции в течение 20 с не происходит выделения газа. *S. pyogenes* дает отрицательную каталазную реакцию.

**Ограничения метода.** Эритроциты содержат каталазу, поэтому чтобы не получить ложноположительного результата, необходимо избегать попадания частиц КА на предметное стекло (ложноположительного результата можно избежать при тестировании культуры, выросшей на шоколадном агаре). Использование петли из определенных металлов может привести к ложноположительному результату. Нельзя использовать старую культуру (более >24 ч), поскольку это может привести к ложноотрицательному результату для каталаза(+) микроорганизмов.

**Контроль качества.** Цель: контроль качества реактива. Контрольные штаммы: положительный контроль – *Staphylococcus aureus* ATCC® 25923, отрицательный контроль – *Streptococcus pyogenes* ATCC® 19615. Контролю подлежит каждая вновь поступившая партия реактива. Методика постановки и интерпретация результатов соответствует описанной выше.

### Чувствительность к бацитрацину

**Принцип.** Тест основан на способности бацитрацина в определенной концентрации селективно подавлять рост *S. pyogenes*, не оказывая влияния на рост других стрептококков.

**Процедура.** Провести посев одной или нескольких морфологически сходных колоний  $\beta$ -гемолитического стрептококка, подозрительного по морфологии на *S. pyogenes*, штрихом на сектор КА. Поместить диск с бацитрацином на засеянную поверхность и инкубировать в течение 18–24 ч при температуре 35°C.

**Интерпретация результата.** Зона задержки роста  $\geq 12$  мм ориентировочно свидетельствует о наличии *S. pyogenes*.

**Ограничения метода.** Стрептококки групп С и G также чувствительны к бацитрацину, но для подавления их роста нужна более высокая кон-



центрация антибиотика. Поэтому важен выбор диска с содержанием бацитрацина именно 0,04 ЕД. Имеются сообщения из некоторых стран о выделении штаммов *S. pyogenes*, резистентных к бацитрацину. Однако в России до настоящего времени подобных сообщений не было.

**Контроль качества.** Цель: контроль качества дисков с бацитрацином. Контрольные штаммы: положительный контроль – *Streptococcus pyogenes* ATCC® 19615 (зона задержки роста  $\geq 12$  мм), отрицательный контроль – *Staphylococcus aureus* ATCC® 25923 (зона задержки роста 6 мм). Методика постановки и интерпретация результатов соответствует описанной выше.

#### РУР-тест

**Принцип.** В присутствии фермента *пирролиндонилпептидазы* (РУР-азы), продуцируемого *S. pyogenes*, происходит разложение *L-пирролиндонил- $\beta$ -нафтиламида* (РУР). Являющийся продуктом гидролиза  $\beta$ -нафтиламид при добавлении реагента (0,01% циннамальдегид) дает красное окрашивание.

**Процедура.** С помощью пинцета перенесите диск, импрегнированный РУР, на чашку Петри. Увлажните диск стерильной водой, избегая попадания избытка воды. С помощью стерильной палочки перенесите несколько колоний микроорганизмов с КА на поверхность диска и подождите 2 мин. Добавьте 1 каплю реагента и наблюдайте за изменением цвета.

**Интерпретация результата.** Положительная реакция: появление красного окрашивания в течение 1 мин. Отрицательная реакция: изменения цвета не происходит. Слаборозовое окрашивание расценивается как отрицательный результат. *S. pyogenes* дает положительный результат РУР-теста.

**Ограничения метода.** При нанесении на диск перед проведением теста избыточного количества воды может быть получен ложноотрицательный результат.

Данный тест широко не используется в России.

**Контроль качества.** Цель: контроль качества реактивов. Контрольные штаммы: положительный контроль – *Streptococcus pyogenes* ATCC® 19615, отрицательный контроль – *Streptococcus agalactiae* ATCC® 12386. Контролю подлежит каждая вновь поступившая партия реактивов. Методика постановки и интерпретация результатов соответствует описанной выше.

#### Серологический метод идентификации

**Принцип.** Серологический метод основан на выявлении группового полисахарида клеточной

стенки. Этот полисахарид не является поверхностной структурой клеточной стенки. Для взаимодействия со специфическими антителами, содержащимися в сыворотке, необходимо провести экстракцию антигена (см. рис. 3). Экстракция может быть проведена с помощью кислоты или ферментов. Реакция взаимодействия антигена с антителом визуализируется по видимой агглютинации (тесты коаггутинации и латекс-агглютинации), по изменению цвета (хроматографический тест), либо по другим изменениям в зависимости от конкретной тест-системы.

**Процедура.** Исследование проводится в соответствии с инструкцией на конкретную тест-систему.

**Интерпретация результата** проводится в соответствии с инструкцией на конкретную тест-систему.

**Ограничения метода.** Антиген серогруппы А может обнаруживаться у некоторых штаммов *S. dysgalactiae* subsp. *equisimilis* и группы *anginosus*.

**Контроль качества.** Коммерческие тест-системы содержат положительные и отрицательные контрольные образцы.

Точная идентификация *S. pyogenes* требует проведения как минимум двух подтверждающих тестов при выделении  $\beta$ -гемолитических каталазоотрицательных грам(+) кокков, располагающихся в мазке парами и цепочками: определение чувствительности к бацитрацину, выявление группового антигена А или РУР-тест.

#### Механизмы резистентности *S. pyogenes* к антибактериальным препаратам

**Макролиды, линкозамиды.** Выделяют 2 механизма приобретенной резистентности *S. pyogenes* к макролидным антибиотикам:

- модификация (метилирование или мутация) мишени действия;
- активное выведение (эффлюкс) антибиотика из бактериальной клетки.

**Модификация мишени действия** [18]. Основной мишенью действия макролидов и линкозамидов является 50S субъединица бактериальной рибосомы. Несмотря на различия в структуре, все эти антибиотики имеют общий участок связывания с рибосомой. Резистентность возникает в результате метилирования 23S-субъединицы рРНК. Известно около 20 генов (*erm* – erythromycin ribosome methylation), кодирующих фермент метилазу, они ассоциированы с транспозонами и могут локализоваться как на плазмидах, так и на хромосомах. Метилирование рибосом нарушает связывание антибиотика с мишенью и сопровождается перекрестной устойчивостью к макролидам, линкозамидам

и стрептограмину В – так называемый MLS<sub>B</sub>-фенотип резистентности. При этом уровень устойчивости высок (МПК > 32–64 мг/л).

Описано два варианта синтеза метилаз: конститутивный и индуцибельный. При конститутивном типе синтез фермента не зависит от внешних условий, и соответственно бактерии проявляют устойчивость ко всем макролидам и линкозамидам. При индуцибельном типе синтеза фермента для его начала необходима индукция. Синтез стрептококковых метилаз индуцируется всеми макролидами и линкозамидами (в разной степени), соответственно микроорганизмы проявляют устойчивость ко всем перечисленным антибиотикам.

Индуцибельный MLS<sub>B</sub>-фенотип резистентности у *S. pyogenes* может быть выявлен с помощью фенотипического метода – метода двойных дисков, описание которого приводится ниже.

Снижение чувствительности к макролидам/линкозамидам может быть вызвано также мутациями в генах рибосомальных белков L4 и L22, приводящими к нарушению связывания антибиотиков с мишенью.

**Активное выведение макролидов и линкозамидов** осуществляется транспортной системой, кодируемой *mf*-геном [19]. Соответствующий белок-транспортер выводит 14- и 15-членные макролиды и обеспечивает невысокий уровень резистентности (МПК от 1 до 32 мг/л). Линкозамиды и 16-членные макролиды сохраняют активность.

По результатам исследования ПЕГАС II в России в 2004–2005 гг. распространенность нечувствительных к макролидам штаммов *S. pyogenes* не превышала 10% (к азитромицину – 9,6%, эритромицину – 8,8%, кларитромицину – 4,5% штаммов). Мидекамицин и спирамицин демонстрировали более высокую активность *in vitro* по сравнению с 14- и 15-членными макролидами: распространенность нечувствительных штаммов в 2004–2005 гг. составила 0,3% для обоих представителей 16-членных макролидов. Таким образом, макролиды сохраняют сравнительно высокую активность в отношении *S. pyogenes*. К клиндамицину в 2004–2005 гг. было чувствительно 99,4% штаммов [20].

Описанная структура резистентности к макролидам и линкозамидам позволяет предположить, что основным механизмом резистентности среди циркулирующих в России штаммов *S. pyogenes* является активное выведение.

**Фторхинолоны.** Резистентность *S. pyogenes* к фторхинолонам обусловлена модификацией мишеней действия – двух бактериальных ферментов: ДНК-гиразы и топоизомеразы IV, играющих важную роль в репликации бактериальной ДНК.

Каждый из ферментов состоит из четырех субъединиц. ДНК-гираза состоит из двух *gyrA* и двух *gyrB* субъединиц (соответствующие гены *gyrA* и *gyrB*); топоизомераза IV – из субъединиц *parC* и *parE* (соответствующие гены *parC* и *parE*). Гены обоих ферментов локализованы на бактериальной хромосоме. В результате мутаций в соответствующих генах и аминокислотных замен в молекулах ферментов происходит снижение сродства фторхинолонов к ферментам и повышение МПК препаратов [21].

По результатам исследования ПЕГАС II в России не выявлено штаммов *S. pyogenes*, резистентных к респираторным фторхинолонам [20].

**Тетрациклины.** Резистентность к тетрациклинам связана с активным выведением антибиотика из микробной клетки. Детерминанты резистентности (гены *tetO*, *tetM*) обычно локализованы на плазидах, что обеспечивает их быстрое внутри- и межвидовое распространение [22, 23].

Резистентность к тетрациклинам среди клинических штаммов *S. pyogenes* в России в 2004–2005 гг. составляла 47,1% [20], что не позволяет рассматривать препараты данной группы как средства выбора для лечения инфекций.

**Хлорамфеникол.** Ферментативная инактивация (ацетилирование) является основным механизмом резистентности к хлорамфениколу. Гены ферментов – хлорамфениколацетилтрансфераз, как правило, локализованы на плазидах и входят в состав транспозонов в ассоциации с генами устойчивости к другим антимикробным препаратам [21].

Хлорамфеникол сохраняет относительно высокую активность в отношении *S. pyogenes*. В 2004–2005 гг. резистентными в России были 13,4% штаммов [20].

**Бета-лактамы, ванкомицин, линезолид.** Штаммов *S. pyogenes*, резистентных к β-лактамам антибиотикам, ванкомицину и линезолиду, не описано.

### Определение чувствительности к антибактериальным препаратам

Определение чувствительности *S. pyogenes* к антибактериальным препаратам (АБП) проводится в соответствии с «Методическими указаниями по определению чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препаратам» (МУК 4.2.1890–04) [24].

Определение чувствительности *S. pyogenes* является методически одной из наиболее трудных задач, так как требует особой тщательности в выполнении всех процедур, начиная от приготовления питательных сред и инокулюма и заканчивая проведением контроля качества. В то же время эффективность

эмпирической антибактериальной терапии инфекций, вызываемых данным микроорганизмом, не имеющим резистентности к  $\beta$ -лактамам антибиотикам, хорошо предсказуема. Учитывая эти факты, при решении вопроса о необходимости определения чувствительности *S. pyogenes* к АБП следует объективно оценить соотношение стоимости и эффективности (клинической значимости) такого исследования, а также сопоставить стоимость полноценного материально-технического оснащения с доступными ресурсами.

Попытки даже незначительной модификации стандартных методов могут привести к получению ошибочных, недостоверных результатов, которые могут ввести в заблуждение и микробиологов, и клиницистов.

Препаратами выбора для лечения инфекций, вызванных *S. pyogenes*, являются  $\beta$ -лактамы, причем достоверных случаев устойчивости к препаратам данной группы не описано. Не описана также и устойчивость к ванкомицину. Следовательно, оценивать чувствительность к указанным препаратам в рутинной практике нецелесообразно.

При выделении из нестерильных локусов обязательным является определение чувствительности *S. pyogenes* к эритромицину и клиндамицину. С целью мониторинга антибиотикорезистентности возможно определение чувствительности к хлорамфениколу и левофлоксацину. Для штаммов *S. pyogenes*, выделенных из стерильных локусов, необходимо определять чувствительность ко всем вышеперечисленным препаратам одновременно.

### Определение чувствительности диско-диффузионным методом

**Процедура.** Агар Мюллера–Хинтон (МХА) готовится по прописи на этикетке. После автоклавирования колбы с питательной средой помещаются на водяную баню при 48–50°C, где выдерживаются до достижения указанной температуры, после чего в них асептически вносят дефибрированную баранью кровь до итоговой концентрации 5%.

Затем агар разливается по чашкам с толщиной слоя агара 4 мм (на чашку диаметром 100 мм требуется 25 мл агара, на чашку диаметром 90 мм – 20 мл).

**Приготовление инокулюма и инокуляция.** Суспензию готовят на 0,9% растворе натрия хлорида до мутности 0,5 по МакФарланду из 18–24-часовой культуры *S. pyogenes*, выращенной на КА.

Для инокуляции используют стерильные ватные тампоны. Тампон погружают в пробирку с суспензией, отжимают избыток инокулюма о стенки пробирки и наносят на поверхность агара штрихами в 3 направлениях под углом 60°, не внося дополнительного количества суспензии.

На нанесенную культуру помещают диски с АБП.

Определить фенотип возможной резистентности к макролидам и линкозамидам (выявить индуцибельный тип резистентности к 16-членным макролидам и линкозамидам) позволяет метод двойных дисков. Метод заключается в размещении дисков с эритромицином (15 мкг) и клиндамицином (2 мкг) на поверхности агара таким образом, чтобы расстояние между краями дисков составляло 12 мм.

**Инкубация.** Чашки инкубируют в течение 20–24 ч при температуре 35°C в атмосфере с 5–7% CO<sub>2</sub>.

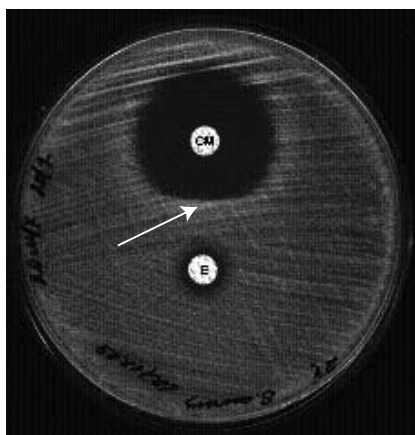
**Интерпретация результатов.** Зона задержки роста измеряется с помощью линейки или каллипера, причем необходимо измерять диаметр (*не радиус!*) зоны подавления роста. Конечной точкой считается расстояние, в зоне которого нет роста микроорганизмов. Результаты интерпретируют по величине зоны задержки роста вокруг дисков в соответствии с критериями, приведенными в табл. 2.

Особое внимание необходимо уделить форме зоны задержки роста вокруг диска с клиндамицином. Если зона задержки роста имеет правильную круглую форму, чувствительность к клиндамицину интерпретируется в соответствии с критериями, приведенными в табл. 2. В том случае, если зона задержки роста имеет «D-образную» форму с сужением в области прилегания диска с эритро-

Таблица 2. Критерии интерпретации результатов определения чувствительности *S. pyogenes*: пограничные значения диаметров зон подавления роста и МПК антибактериальных препаратов (МУК 4.2.1890–04)

Антибактериальный препарат	Содержание в диске, мкг	Диаметр зон подавления роста, мм			МПК, мг/л		
		Р	П	Ч	Р	П	Ч
Эритромицин	15	≤15	16–20	≥21	≥1	0,5	≤0,25
Клиндамицин	2	≤15	16–18	≥19	≥1	0,5	≤0,25
Хлорамфеникол	30	≤17	18–20	≥21	≥16	8	≤4
Левофлоксацин	5	≤13	14–16	≥17	≥8	4	≤2

**Примечание:** Р – резистентность, П – промежуточная чувствительность, Ч – чувствительность.



**Рис. 6.** Феномен индуцибельной резистентности к клиндамицину: зона задержки роста вокруг диска с клиндамицином имеет «D-образную» форму с сужением (показано стрелкой) в области прилегания диска с эритромицином.

мицином, исследуемый штамм должен расцениваться как резистентный, поскольку имеет место индуцибельный MLS<sub>B</sub>-фенотип резистентности (рис. 6).

**Контроль качества.** Используется *S. pneumoniae* ATCC® 49619. Методика постановки и учета результатов соответствует методике работы с испытуемым штаммом. Результаты оцениваются по критериям, изложенным в табл. 3.

### Определение минимальной подавляющей концентрации

#### Метод серийных разведений в бульоне

##### Макрометод

Метод серийных разведений в бульоне позволяет определить *минимальную подавляющую концентрацию* (МПК) без значительных материальных затрат. Тестирование небольшого количества штаммов в рутинной практике целесообразно выполнять макрометодом.

**Принцип** метода заключается в посеве тестируемых микроорганизмов в пробирки с питательным

бульоном, содержащим последовательные двойные разведения АБП.

**Процедура.** Тестирование проводится в объеме 1 мл каждого разведения АБП с конечной концентрацией микроорганизмов примерно  $5 \times 10^5$  КОЕ/мл.

**Приготовление серийных разведений АБП.** Серийные разведения АБП готовятся из базового раствора на *бульоне Мюллера–Хинтона* (МХБ) с 5% лизированной лошадиной крови. Лизированную кровь получают многократным (2–3 раза) замораживанием и размораживанием дефибрированной крови с последующим центрифугированием для освобождения от теней эритроцитов.

Количество пробирок определяется необходимым диапазоном разведений АБП и увеличивается на одну для постановки «отрицательного» контроля. Для приготовления стартового раствора АБП в одну пробирку вносится 0,9 мл бульона. В остальные пробирки вносится по 0,5 мл бульона.

Базовый раствор АБП готовится из навески химически чистой субстанции препарата путем растворения ее в рассчитанном количестве растворителя и разбавителя. *Использование лечебных препаратов для приготовления базовых растворов недопустимо!*

В связи с тем, что АБП существенно различаются по растворимости, в ряде случаев возникает необходимость использовать различные вещества для первичного растворения препаратов (растворители) и для доведения их до заданной концентрации (разбавители). В тех случаях, когда растворитель и разбавитель являются разными веществами, для растворения АБП необходимо использовать минимально возможное количество растворителя.

Растворители и разбавители для эритромицина, клиндамицина, хлорамфеникола и левофлоксацина приведены в табл. 4.

Навеску для базового раствора определяют, исходя из расчета, что при добавлении 100 мкл базового раствора к 0,9 мл бульона получается стартовый раствор АБП с концентрацией, в 2 раза большей, чем максимальная тестируемая концентрация. Рекомендуемые диапазоны тестируемых концентра-

**Таблица 3. Допустимые диапазоны диаметров зон подавления роста для контрольного штамма *S. pneumoniae* ATCC® 49619 (МУК 4.2.1890–04)**

Антибактериальный препарат	Содержание в диске, мкг	Диаметр зон подавления роста (в мм) для контрольного штамма <i>S. pneumoniae</i> ATCC® 49619
Эритромицин	15	25–30
Клиндамицин	2	19–25
Хлорамфеникол	30	23–27
Левофлоксацин	5	20–25

Таблица 4. Растворители и разбавители для приготовления базовых растворов антибактериальных препаратов (МУК 4.2.1890–04)

Антибактериальный препарат	Растворитель	Разбавитель
Эритромицин	95% этанол или ледяная уксусная кислота	Вода
Клиндамицин	Вода	Вода
Хлорамфеникол	95% этанол	Вода
Левифлоксацин	1/2 объема воды, затем добавлять по каплям раствор NaOH (0,1 моль/л) до растворения	Вода

Таблица 5. Рекомендуемые диапазоны тестируемых концентраций антибактериальных препаратов

Антибактериальный препарат	Минимальная концентрация, мг/л	Максимальная концентрация, мг/л
Эритромицин	0,016	8
Клиндамицин	0,008	8
Хлорамфеникол	0,03	32
Левифлоксацин	0,06	4

ций эритромицина, клиндамицина, левифлоксацина и хлорамфеникола приведены в табл. 5. Например, концентрация стартового раствора эритромицина должна быть 16 мг/л, а базового – 160 мг/л.

При расчетах следует учитывать наличие в субстанции балластной части, которая в некоторых солях антибиотиков составляет значительную долю. Активность субстанции указана на упаковке и выражается либо в процентном содержании действующего вещества, либо в миллиграммах действующего вещества на 1 г субстанции. Во втором случае, для того чтобы вычислить процентное содержание активного вещества, необходимо значение активности, выраженное в мг/г, разделить на 10. Если активность субстанции не указана на упаковке, ее условно принимают за 100%.

Приготовленный базовый раствор разливают в стерильных условиях небольшими объемами (для тестирования 1, 2, 3 ... N штаммов). Базовые растворы необходимо хранить при температуре не выше  $-20^{\circ}\text{C}$  (сроки хранения отдельных АБП при этой температуре существенно различаются). Оптимальными условиями для хранения базовых растворов АБП является температура  $-60^{\circ}\text{C}$  и ниже, длительность – не более 6 мес.

После извлечения из холодильника перед открытием флаконов с базовыми растворами их необходимо довести до комнатной температуры для предотвращения конденсации влаги. Размороженные базовые растворы должны быть использованы для приготовления рабочих растворов, повторное замораживание не допускается.

Стартовый раствор АБП получают добавлением 0,1 мл базового раствора к 0,9 мл бульона (рис. 7)

и тщательным перемешиванием. Затем стартовый раствор в количестве 0,5 мл при помощи микропипетки со стерильным наконечником вносят в первую пробирку, содержащую 0,5 мл бульона. Тщательно перемешивают и новым стерильным наконечником переносят 0,5 мл раствора АБП в бульоне во вторую пробирку, содержащую первоначально 0,5 мл бульона. Эту процедуру повторяют, пока не будет приготовлен весь необходимый ряд разведений. Из последней пробирки 0,5 мл бульона удаляют.

Таким образом, получается ряд пробирок с растворами АБП, концентрации которых отличаются в соседних пробирках в 2 раза. Одновременно готовится второй ряд серийных разведений АБП для тестирования контрольного штамма.

**Приготовление инокулома и инокуляция.** Для приготовления инокулома используют суточную культуру *S. pyogenes*, выросшую на КА. Колонии суспендируют в стерильном 0,9% растворе натрия хлорида до мутности, эквивалентной 0,5 по МакФарланду (примерно  $1,5 \times 10^8$  КОЕ/мл). Далее проводится разведение этой суспензии на МХБ в 150 раз (к 7,45 мл МХБ добавить 0,05 мл микробной взвеси), после чего концентрация *S. pyogenes* составляет примерно  $1,0 \times 10^6$  КОЕ/мл (см. рис. 7).

По 0,5 мл инокулома вносят в каждую пробирку, содержащую по 0,5 мл соответствующего разведения АБП, и в одну пробирку с 0,5 мл МХБ без АБП («отрицательный» контроль). Конечная концентрация микроорганизмов в каждой пробирке достигнет необходимой – примерно  $5 \times 10^5$  КОЕ/мл. Инокулом должен быть внесен

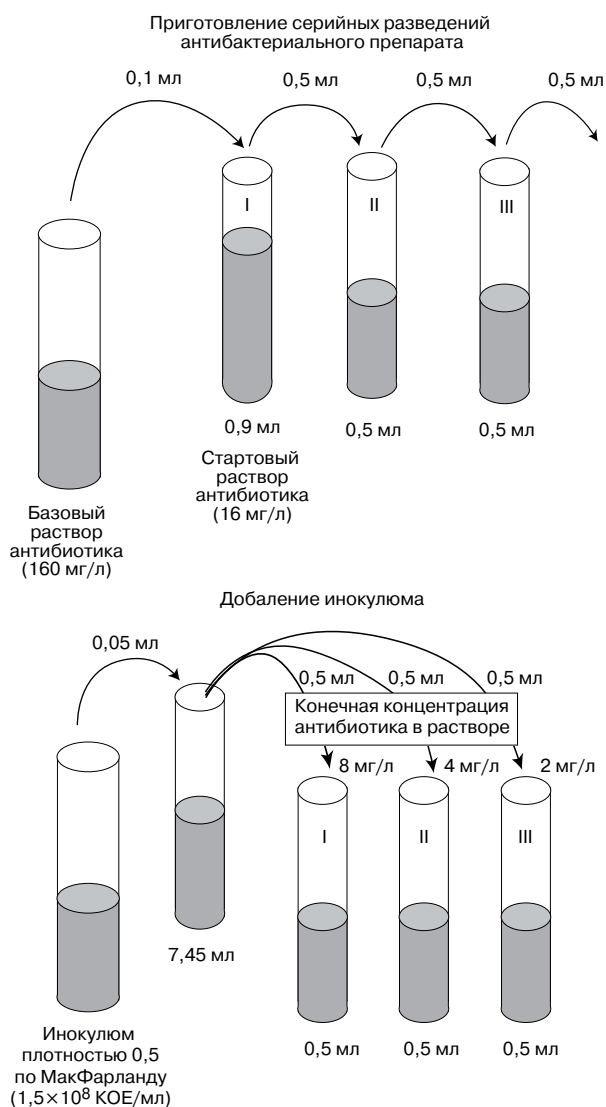


Рис. 7. Алгоритм постановки теста с одной испытуемой культурой.

в пробирки с разведениями АБП не позднее 30 мин с момента приготовления.

Алгоритм постановки теста с одной испытуемой культурой приведен на рис. 7.

**Инкубация.** Пробирки с тестируемыми штаммами, кроме пробирки с «отрицательным» кон-

тролем, инкубируются в обычной атмосфере при температуре 35 °С в течение 20–24 ч. Пробирка с «отрицательным» контролем помещается в холодильник при температуре 4 °С, где хранится до учета результатов.

**Интерпретация результата.** Для определения наличия роста микроорганизмов пробирки просматриваются в проходящем свете. Рост культуры в присутствии АБП сравнивается с референтной пробиркой («отрицательный» контроль), содержащей исходный инокулюм и хранившейся в холодильнике. МПК определяется по наименьшей концентрации АБП, которая подавляет видимый рост *S. pyogenes*. Интерпретация результата проводится в соответствии с критериями, приведенными в табл. 2.

**Контроль качества.** Каждая партия тестируемых штаммов сопровождается внутренним контролем с использованием контрольного штамма *S. pneumoniae* ATCC® 49619. Допустимые значения МПК для контрольного штамма приведены в табл. 6.

#### Микрометод

В случае необходимости определения МПК у 8 и более штаммов, целесообразно использовать микрометод. Он позволяет исследовать одновременно чувствительность к нескольким АБП большого количества штаммов. Тестирование проводится в объеме 0,1 мл, что позволяет значительно сократить количество расходных материалов. Методика не имеет отличий от макрометода, за исключением объема, но требует дополнительного оснащения лаборатории многоканальными пипетками, микротитровальными плашками (с круглым или коническим дном) со стерильными крышками, специальным устройством с непрямой подсветкой для учета результатов.

Весьма экономичным и простым в исполнении является вариант метода серийных микроразведений, основанный на использовании двух пороговых концентраций АБП. Методика позволяет получить качественные результаты (т. е. распределить штаммы по чувствительности на категории: чувствительные, промежуточные, резистентные).

Таблица 6. Допустимые диапазоны значений МПК для контрольного штамма *S. pneumoniae* ATCC® 49619 (МУК 4.2.1890–04)

Антибактериальный препарат	Допустимые значения МПК, мг/л
Эритромицин	0,03–0,12
Клиндамицин	0,03–0,12
Левифлоксацин	0,5–2
Хлорамфеникол	2–8

### Метод серийных разведений в агаре

Метод серийных разведений в агаре позволяет одновременно определить МПК для партии штаммов (от 15 до 36 клинических и контрольных штаммов в зависимости от используемой модели инокулятора).

**Принцип** метода заключается в посеве определенного количества тестируемых микроорганизмов на чашки Петри с агаром, содержащим последовательные двойные разведения АБП.

**Процедура приготовления серийных разведений АБП.** Из базового раствора исследуемого АБП готовят рабочий раствор с концентрацией, в 10 раз превосходящей максимальную из используемых в конкретном исследовании (с учётом последующего 10-кратного разведения агаризованной средой). Затем готовят серию двукратных разведений рабочего раствора. Таким образом, концентрация АБП в каждой последующей пробирке должна быть в 2 раза меньшей, чем в предыдущей. Методика приготовления серийных разведений аналогична изложенной в разделе «Метод серийных разведений в бульоне».

**Питательная среда.** Сухая агаризованная питательная среда растворяется и автоклавируется в соответствии с инструкцией изготовителя. После автоклавирования колбы с питательной средой помещаются на водяную баню при 48–50 °С, где выдерживаются до достижения указанной температуры, после чего в них асептически вносят рабочие растворы АБП (1 часть рабочего раствора АБП на 9 частей расплавленного агара) и дефибрированную баранью кровь до итоговой концентрации 5%. Затем среду тщательно перемешивают и разливают по предварительно маркированным чашкам Петри, толщина слоя питательной среды в которых должна быть 3–4 мм.

Вторым способом приготовления чашек Петри с агаром, содержащим разведения АБП, является смешивание питательной среды и раствора АБП непосредственно в чашке Петри. Для приготовления стандартных пластиковых чашек диаметром 90 мм необходимо к 2 мл раствора АБП добавить 18 мл разогретого до 50 °С жидкого агара с дефибрированной бараньей кровью. Чашки предварительно маркируются с указанием препарата и его концентрации. Очень важно тщательно перемешивать агар до того, как он начнёт застывать для равномерного распределения АБП по всей толще питательной среды. Перемешивание производится на горизонтальной поверхности последовательно плавными разнонаправленными круговыми движениями чашки. После приготовления чашек агар

должен затвердеть в горизонтальном положении. Нельзя резко передвигать, переносить чашки до полного застывания агара.

Параллельно с чашками Петри, содержащими АБП, для контроля роста готовят чашки Петри без АБП. Чашки оставляют при комнатной температуре для застывания и подсушивания на 10–12 ч.

Приготовленные указанным способом чашки Петри предпочтительнее использовать немедленно, однако допускается хранение в запаянных полиэтиленовых пакетах при 4–8 °С в течение 5 суток.

**Приготовление инокулюма и инокуляция.** Конечная посевная доза *S. pyogenes* на поверхности питательной среды должна составлять 10<sup>4</sup> КОЕ. Поскольку коммерческие инокуляторы или стандартная бактериологическая петля диаметром 3,0 мм переносят 1–2 мкл жидкости, концентрация микроорганизмов в исходной суспензии должна быть 10<sup>7</sup> КОЕ/мл. Приблизительно такую концентрацию можно получить при разведении стандартной микробной суспензии, соответствующей стандарту 0,5 по МакФарланду в 10 раз. Полученную суспензию необходимо инокулировать на поверхность агара с помощью многоканального устройства в течение 15 мин после приготовления, при этом образуется пятно диаметром 5–8 мм. Необходимо инокулировать всю серию чашек. Контрольная чашка без АБП должна инокулироваться последней.

**Инкубация.** После инокуляции чашки оставляют на 1 час при комнатной температуре для подсушивания, далее переворачивают и инкубируют при температуре 35 °С в течение 18–24 ч в атмосфере с 5–7% CO<sub>2</sub>.

**Учет результатов.** Учет результатов проводят, поместив чашку на темную, не отражающую свет поверхность, с помощью прозрачного трафарета, наложенного на чашку. Для правильной ориентации трафарета при инокуляции в определенном месте чашки ставится метка. При учете результатов просматриваются чашки всего диапазона разведений, начиная с минимальной концентрации. МПК определяется по наименьшей концентрации АБП, подавляющей видимый рост *S. pyogenes*. Для дифференцировки нежного роста от налета, оставшегося после инокуляции, в ряде случаев целесообразно использовать увеличение. Появление единственной колонии на чашке с концентрацией на 1 разведение выше, чем явная МПК, можно не учитывать. Результат оценки антибиотикочувствительности имеет смысл учитывать только при подтверждении чистоты культуры (см. Контроль качества).

Культурам, у которых не наблюдается роста даже на чашке с самой низкой концентрацией АБП в серии





- Manual of clinical microbiology. 7<sup>th</sup> ed. Washington: ASM Press; 1999.
22. Speer B.S., Shoemaker N.B., Salyers A.A. Bacterial resistance to tetracycline: mechanisms, transfer, and clinical significance. Clin Microbiol Rev 1992; 5:387-99.
23. Matsumoto M., Sakae K., Ohta M., et al. Molecular mechanisms of high level tetracycline-resistance in group A streptococcal isolates, T serotypes 4 and 11. Int J Antimicrob Agents 2005; 25:142-7.
24. Определение чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препаратам. Методические указания МУК 4.2.1890-04. Клинический микробиологический журнал 2004; 6:306-59.