

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

УТВЕРЖДАЮ

Первый заместитель Министра

Е.Л.Богдан

29.04.

2026 г.

Регистрационный № 093-1225

МЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ KLEBSIELLA PNEUMONIAE И PSEUDOMONAS AERUGINOSA К КОЛИСТИНУ (инструкция по применению)

УЧРЕЖДЕНИЯ-РАЗРАБОТЧИКИ: государственное научное учреждение «Институт физиологии Национальной академии наук Беларуси», государственное учреждение «Минский городской центр гигиены и эпидемиологии»

АВТОРЫ: д.м.н., профессор Тапальский Д.В., к.м.н., доцент Карпова Е.В., Левшина Н.Н., Ромашко Ю.В.

Минск, 2025

В настоящей инструкции по применению (далее — инструкция) изложен микробиологический метод определения чувствительности к колистину клинически значимых грамотрицательных бактерий (*Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*), который может быть использован в комплексе медицинских услуг, направленных на диагностику вызванных ими бактериальных инфекций.

Справочно:

*Метод, изложенный в настоящей инструкции, является модификацией теста элюции антибиотика из дисков в бульон (CBDE — Colistin Broth Disk Elution) и представляет собой аналог метода пограничных концентраций для определения одной пороговой концентрации (2 мг/л для *Klebsiella pneumoniae* или 4 мг/л для *Pseudomonas aeruginosa*).*

Инструкция предназначена для врачей-лаборантов микробиологических лабораторий, иных врачей-специалистов организаций здравоохранения, оказывающих медицинскую помощь пациентам с диагностированными инфекциями, вызванными *Klebsiella pneumoniae* и *Pseudomonas aeruginosa*

1. ПОКАЗАНИЯ К ПРИМЕНЕНИЮ МЕТОДА

Инфекционные заболевания, вызванные *Klebsiella pneumoniae* и *Pseudomonas aeruginosa*.

2. ПРОТИВОПОКАЗАНИЯ К ПРИМЕНЕНИЮ

Отсутствуют

3. ПЕРЕЧЕНЬ НЕОБХОДИМЫХ МЕДИЦИНСКИХ ИЗДЕЛИЙ, РЕАКТИВОВ И РАСХОДНЫХ МАТЕРИАЛОВ

3.1. Медицинские изделия:

- стерилизатор паровой;
- стерилизатор воздушный;
- дистиллятор, обеспечивающий качество дистиллированной воды в соответствии с ГОСТ 6709-72;
- холодильник бытовой (+2...+8 °С);
- термостат (35±1 °С);
- вортекс;
- денситометр (измеритель оптической плотности суспензий);

- автоматические дозаторы лабораторные переменного объема: 1-10 мл
- пробирки стеклянные (например, ПБ-2-16-150) с вентилируемыми пробками;
- штативы для пробирок;
- емкости для дезинфекции отработанного биологического материала;
- инструменты лабораторные (пинцеты, петли микробиологические).

3.2. Реактивы, реагенты и питательные среды:

- катион-сбалансированный бульон Мюллера-Хинтона (САМНВ);
- вода дистиллированная;
- натрий хлористый, х.ч. по ГОСТ 4233-77 (для приготовления 0,85% стерильного физиологического раствора);
- диски с колистином сульфатом, содержащие 10 мкг антибиотика.

3.3. Расходные материалы:

- тампоны-зонды хлопковые;
- наконечники для автоматических дозаторов 1-10 мл;
- чашки Петри полистироловые, диаметр 90 мм, стерильные;
- крафт бумага или крафт-пакеты для стерилизации.

3.4. Контрольные культуры микроорганизмов:

- *Escherichia coli* ATCC 25922 (чувствительный к колистину, целевое значение МПК 0,5-1 мг/л);
- *Pseudomonas aeruginosa* 27853 (чувствительный к колистину, целевое значение МПК 1-2 мг/л).

3.5. Средства индивидуальной защиты и дезинфектанты:

- халат лабораторный;
- перчатки латексные или нитриловые;
- раствор антисептика, предназначенный для обработки рук персонала;
- раствор дезинфицирующий для инактивации биологического материала.

4. ОПИСАНИЕ ТЕХНОЛОГИИ ПРИМЕНЕНИЯ МЕТОДА

Метод, изложенный в настоящей инструкции, реализуется поэтапно в соответствии с рисунком приложения.

4.1 Культуры микроорганизмов

Для исследования используются чистые суточные культуры *Klebsiella pneumoniae* или *Pseudomonas aeruginosa*, выделенные из клинического материала от пациентов при проведении микробиологического исследования.

4.2 Приготовление бульонной среды с колистином

4.2.1 Внести в стерильную пробирку 5 мл стерильного катион-сбалансированного бульона Мюллера-Хинтона (САМНВ).

4.2.2 Асептично с помощью стерильного пинцета, внести в пробирку 1 диск, содержащий 10 мкг колистина сульфата (для определения чувствительности *Klebsiella pneumoniae*), либо 2 диска, содержащих 10 мкг колистина сульфата (для определения чувствительности *Pseudomonas aeruginosa*).

4.2.3 Пробирку вортиксировать в течение 10 секунд для начала процесса элюции.

4.2.4 Выдержать пробирку при комнатной температуре в течение 30 минут для обеспечения полной элюции антибиотика из диска. Допускается подготовка пробирок накануне (за 16-24 часа) с последующим хранением при температуре +2...+8 °С.

4.2.5 Концентрация колистина в бульоне после высвобождения из диска составляет 2 мг/л для определения чувствительности *Klebsiella pneumoniae* либо 4 мг/л для определения чувствительности *Pseudomonas aeruginosa*.

4.2.6 Приготовить пробирку отрицательного контроля, содержащую 5 мл стерильного САМНВ без диска с колистином.

4.3 Приготовление стандартизованного инокулюма

4.3.1 Использовать чистую 18-24-часовую культуру исследуемого микроорганизма, выросшую на плотной питательной среде.

4.3.2 Стерильной бактериологической петлей или тампоном-зондом перенести несколько морфологически идентичных колоний в стерильный физиологический раствор (0,85% NaCl).

4.3.3 Суспензию перемешать на вортексе. С помощью денситометра измерить оптическую плотность суспензии и довести её до стандарта 0,5

по МакФарланду (приблизительно $1,5 \times 10^8$ КОЕ/мл) путём добавления при необходимости либо стерильного физиологического раствора (0,85% NaCl), либо дополнительных колоний исследуемого микроорганизма.

4.4 Инокуляция

4.4.1 Внести 25 мкл стандартизованной суспензии в пробирку с бульоном, содержащим колистин.

4.4.2 Внести 25 мкл стандартизованной суспензии в пробирку отрицательного контроля (бульон без антибиотика).

4.4.3 Конечная расчетная концентрация микробных клеток в пробирках составляет приблизительно $7,5 \times 10^5$ КОЕ/мл.

4.5 Инкубация

Пробирки инкубировать в термостате при температуре 35 ± 1 °С в аэробных условиях в течение 16-18 часов. После инкубации визуально оценить наличие роста (помутнения) в каждой пробирке.

4.6 Учет и интерпретация результатов

4.6.1 Чувствительный (S): Отсутствие видимого роста в пробирке с колистином при наличии роста в пробирке отрицательного контроля (МПК ≤ 2 мг/л при исследовании чувствительности *Klebsiella pneumoniae*, МПК ≤ 4 мг/л при исследовании чувствительности *Pseudomonas aeruginosa*).

4.6.2 Устойчивый (R): Наличие видимого роста в пробирке с колистином и в пробирке отрицательного контроля. (МПК > 2 мг/л при исследовании чувствительности *Klebsiella pneumoniae*, МПК > 4 мг/л при исследовании чувствительности *Pseudomonas aeruginosa*).

4.6.3 Результат считается недостоверным, если отсутствует рост в пробирке отрицательного контроля. Исследование необходимо повторить.

4.7 Контроль качества

4.7.1. Контроль качества следует выполнять для концентрации колистина сульфата 2 мг/л с использованием контрольных культур *Escherichia coli* ATCC 25922 (должен быть чувствительным, S) и *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 (должен быть чувствительным, S).

4.7.2 Контрольные культуры должны обрабатываться в тех же условиях, что и исследуемые культуры.

4.7.3 Частота проведения контроля качества устанавливается внутренними регламентами лаборатории, но не реже одного раза в неделю, а также при поступлении каждой новой партии дисков или бульона.

4.8 Оформление заключения

В микробиологическом заключении указать результат определения чувствительности к колистину, интерпретационную категорию и пограничную концентрацию, для которой выполнялось тестирование.

4.8.1. При исследовании чувствительности *Klebsiella pneumoniae*:

Чувствительность (S) – МПК \leq 2 мг/л

Устойчивость (R) – МПК $>$ 2 мг/л

4.8.2. При исследовании чувствительности *Pseudomonas aeruginosa*:

Чувствительность (S) – МПК \leq 4 мг/л

Устойчивость (R) – МПК $>$ 4 мг/л

5. ПЕРЕЧЕНЬ ВОЗМОЖНЫХ ОСЛОЖНЕНИЙ ИЛИ ОШИБОК ПРИ ВЫПОЛНЕНИИ И ПУТИ ИХ УСТРАНЕНИЯ

Осложнения отсутствуют.

Возможные ошибки и пути их устранения:

Недостовверный результат отрицательного контроля (отсутствие роста). Связан с нежизнеспособным инокулятом или ошибками при приготовлении суспензии. Необходимо повторить тест с использованием свежей культуры.

Неполная элюция антибиотика из диска. Следует строго соблюдать время выдерживания пробирки при комнатной температуре (30 мин) или использовать метод приготовления накануне.

Использование нестандартизованного инокулюма. Приводит к неточному определению конечной концентрации клеток и может повлиять на результат. Необходим обязательный контроль оптической плотности суспензии денситометром.

Нарушение условий хранения дисков с колистином или бульона. Может привести к снижению активности антибиотика. Следует соблюдать условия и сроки хранения, указанные производителем.

Контаминация пробы. Необходимо строго соблюдать правила асептики на всех этапах работы.

Приложение к инструкции по применению
«Метод определения чувствительности
Klebsiella pneumoniae и
Pseudomonas aeruginosa к колистину»

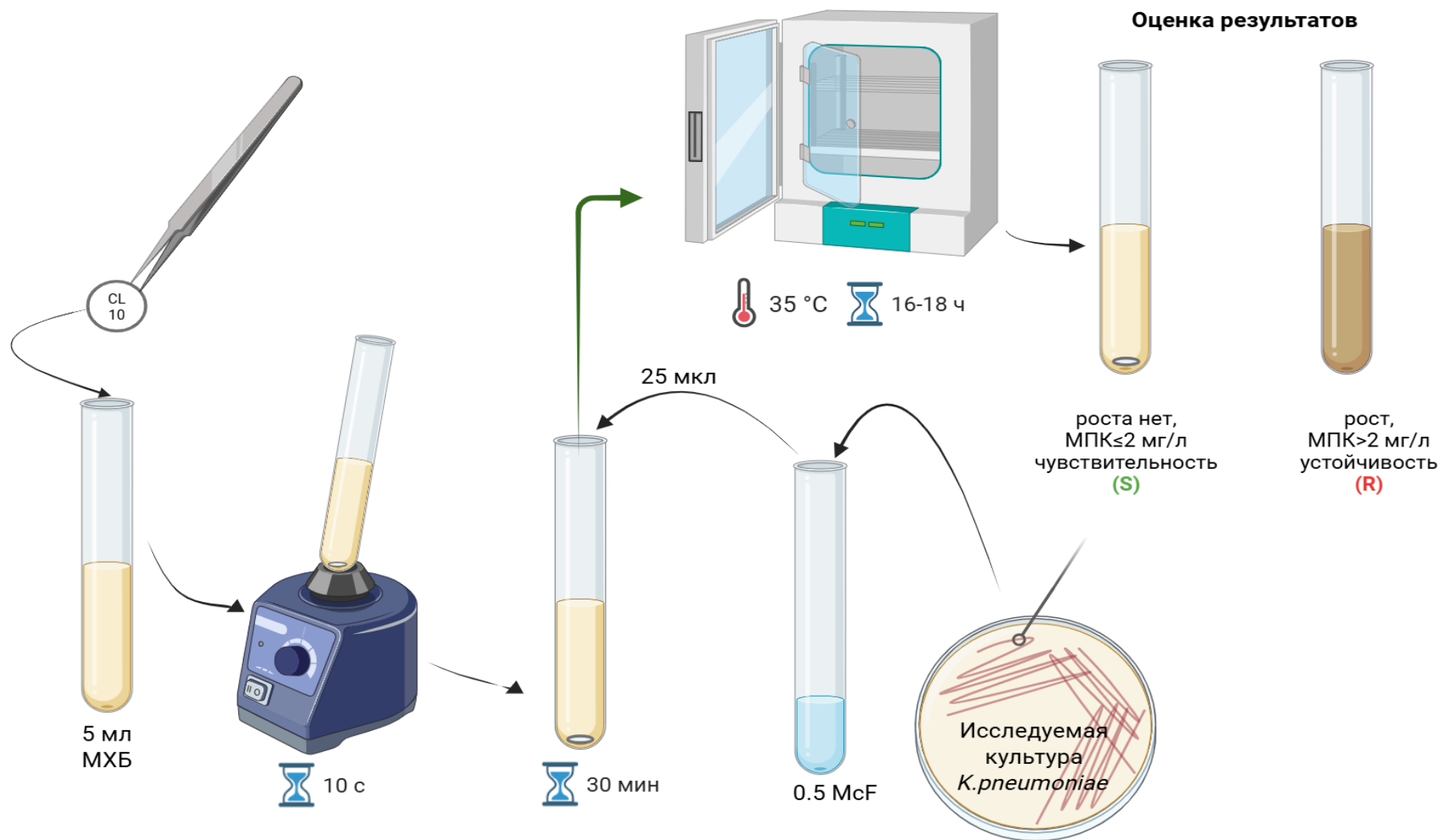


Рисунок – Схема определения чувствительности *Klebsiella pneumoniae* к колистину