

Определение чувствительности холерного вибриона к антибиотикам

(теория)

По степени чувствительности к
АБ-м различают следующие
группы микробов (МК):

- **Чувствительные** – рост МК в организме больного прекращается при использовании терапевтических доз АБ;
- **Умеренно чувствительные** - требуется концентрация максимальных доз АБ;

- **Устойчивые** – рост МК прекращается при концентрациях АБ в организме намного больше терапевтических.

Минимальная подавляющая концентрация АБ (МПК)

Это наибольшее разведение АБ
в питательной среде, которое
вызывает гибель возбудителя.

Методы определения чувствительности холерного вибриона к АБ:

- **Метод дисков** (диффузии в агар, Кэрри-Бауэра) – скорее качественный, чем количественный, но диаметры зон задержки роста МК вокруг дисков АБ коррелируют со значениями минимальной подавляющей концентрации (МПК) АБ в мл питательной среды.

- **Метод серийных разведений АБ в жидкой и плотной питательной среде – количественный, более точен и надежен.**

Метод диффузии в агар

- Используют среды Мюллера-Хинтона, АГВ, отконтролированный питательный агар рН 7,2-7,4, содержащий определенную концентрацию ионов кальция и магния.
- Чашки для розлива среды устанавливают на горизонтальной поверхности. В чашку наливают 25-30 мл расплавленного агара, перед употреблением агар подсушивают.

Описание метода

- В качестве микробной взвеси используют 3-4-х часовую бульонную культуру или 18-20-часовую агаровую концентрацией 100 млн.кл/мл, приготовленную в ФР. Ее наносят на агар в количестве 1-2 мл, равномерно распределяют, а избыток отбирают пипеткой.

- На подсушенные чашки равномерно пинцетом или диспенсором помещают диски АБ, не более 6-ти на одну чашку, и прижимают к агару.
- Инкубация при 37° С 14-18 часов.
- **УЧЕТ** на темной матовой поверхности, куда чашки выкладывают вверх дном. Измеряют диаметр зон задержки роста АБ с точностью до 1 мм, учитывая диаметр дисков.
- **Интерпретация** результатов по таблице.

Метод серийных разведений.

- **Принцип метода:**

изучают рост МК в ряду пробирок или чашек с питательной средой с различными концентрациями АБ.

Определяют **минимальную подавляющую концентрацию (МПК)** АБ в мл среды, которая вызывает гибель возбудителя.

Этапы:

- Приготовление растворов АБ;
- Приготовление питательных сред с АБ;
- Приготовление суспензии исследуемого МК, ее нанесение на среду;
- Инкубация;
- Учет и интерпретация результатов.

Приготовление растворов АБ

- **Основные** (концентрированные) растворы АБ готовят из препаратов с известной активностью (инъекционных форм) в концентрации 1000 мкг/мл выше.
- Из них делают **рабочие растворы** для приготовления сред.
- Для каждого АБ необходимы определенный растворитель и вещество для разведения его до определенной концентрации.

- Основные растворы АБ хранят при $T^{\circ} -20^{\circ} - -60^{\circ}$ не более 6 месяцев.
- Рабочие растворы АБ готовят из основных путем 2-кратных разведений.
- Реальные концентрации рабочих растворов АБ должны учитывать факт разбавления АБ в питательной среде (1:10 в плотной и 1:2 в жидкой).
- При добавлении в агар растворы АБ разводят дистиллированной водой, в бульон- бульоном.

МЕТОД СЕРИЙНЫХ РАЗВЕДЕНИЙ АБ В АГАРЕ

Приготовление питательных сред с АБ

- Сухую среду готовят и автоклавируют.
- Горячую среду помещают в колбах на водяную баню при 48-50° С.
- По достижении этой T° в среду стерильно вносят рабочие растворы АБ (1 часть р-ра АБ на 9 частей агара) и разливают по чашкам. Чашки остывают при комнатной T°.
- Делают контрольные чашки без добавления АБ.

Приготовление суспензии исследуемого микроба

- Выращивают 3 - 4-х часовую бульонную культуру холерного вибриона и разводят в 10 раз.
- ИЛИ: Натирают взвесь из 24-х часовой агаровой культуры в ФР по стандарту 5 ед. и разводят в 100 раз.
- Готовую суспензию наносят на поверхность агара петлей №3 или репликатором. При этом образуется пятно диаметром 5 – 8 мм. Инкубация при 37° 16 – 20 часов.

Учет

- За МПК принимают минимальную концентрацию АБ, вызывающую полное подавление видимого роста МК (отыскивают чашки с отсутствием роста МК).
- Результаты интерпретируют с учетом данных в таблице. Штаммы относят к чувствительным, устойчивым или промежуточным.

Метод серийных разведений в бульоне

- Рабочие растворы АБ разводят в бульоне в двойных концентрациях и разливают в ряд пробирок по 1 мл.
- Готовят суспензию исследуемого МК из бульонной или взвеси агаровой культуры путем разведения бульоном до концентрации 1 млн. кл/мл и вносят по 1 мл в пробирки с растворами АБ.

- **Контроли:**

1. Чистоту культуры определяют высевам на чашку ЩА;

2. Контроль роста МК в среде без добавления АБ.

- Инкубация при 37° С 16 – 20 часов.

- **УЧЕТ** визуальный или с использованием спектрофотометра.

За МПК принимают
минимальную концентрацию АБ
в среде, подавляющую
видимый рост микроба.

- Выгоднее определять чувствительность холерного вибриона к АБ методом серийных разведений в агаре, так как на 1 чашке можно изучить свойства нескольких штаммов.

Спасибо за внимание

