

## **Ускоренные и экспресс-методы определения чувствительности-устойчивости микроорганизмов к антибиотикам**

*БГМУ*

Важное значение в лечении и профилактике инфекционных заболеваний принадлежит химиотерапии и химиопрофилактике, эффективность которых в значительной степени зависит от чувствительности микроорганизмов к антимикробным препаратам. Среди химиотерапевтических средств, используемых для лечения больных с гнойно-септическими инфекциями, ведущее место занимают антибиотики. Главным препятствием для эффективной антибиотикотерапии является устойчивость возбудителей заболеваний к антибиотикам. С увеличением продолжительности применения того или иного антибиотика и эмпирическим подходом в лечении росла частота устойчивых форм и уровень устойчивости в микробных популяциях, в результате введения в практику новых препаратов расширился спектр устойчивости и сформировались множественно устойчивые штаммы [8,28,32,33,34]. Установлена высокая частота устойчивости у больных с внутрибольничными гнойно-септическими заболеваниями к пенициллинам (в том числе и к полусинтетическим), тетрациклинам, макролидам, цефалоспорином I и II поколений, некоторым аминогликозидам [2, 4,11,16,31].

Формирование резистентности к антибиотикам у микроорганизмов происходит за счет генетических рекомбинаций (конъюгация, трансдукция, трансформация, транспозиция), реже – мутаций и контролируется хромосомными и внехромосомными факторами (плазмиды, транспозоны, инсерционные последовательности) [1,14,19,23,27].

Приобретенная резистентность к антибиотикам у бактерий проявляется чаще продукцией ферментов, инактивирующих или модифицирующих антибактериальные препараты – пенициллины, цефалоспорины и карбапенемы (бета-лактамазы), аминогликозиды (ацетилтрансферазы, фосфорилазы), хлорамфеникол (ацетилтрансфераза) [17,31,32].

Среди других биохимических механизмов устойчивости к антибиотикам у микроорганизмов установлено снижение проникновения или ускорение удаления препаратов из клетки (тетрациклины, хинолоны и др.), изменения связывающей способности антибиотиков молекулами мишеней бактерий – изменения структур ДНК-гиразы (хинолоны), РНК-полимеразы (рифампицин), 50S субъединицы рибосом (макролиды), пенициллинсвязывающих белков (пенициллины) [23,26,27,34].

Высокая частота устойчивости возбудителей гнойно-септических заболеваний к антибиотикам и изменение спектра и уровня устойчивости микробных популяций в течение болезни обуславливают необходимость определения их чувствительности перед назначением препарата и в процессе лечения. При использовании классических методов определения чувствительности микроорганизмов к антибиотикам-метода серийных разведений в жидкой или плотной питательной среде, а также метода бумажных дисков – ответ может быть получен не ранее чем через 18 часов от начала исследования (с учётом времени, необходимого для выделения чистых культур – через 48-72 ч.)

Эффективность химиотерапии повышается при раннем назначении этиотропного лечения, которое можно обеспечить использованием методов и средств быстрого определения чувствительности к антибиотикам возбудителей заболеваний. Проведено ряд исследований, достоверно подтверждающих преимущества ускоренных методов. Так, в исследованиях Varenfanger [20] и Doern с соавт. [24] показано, что сокращение среднего времени исследования от 44,4 до 39,2 ч. сопровождалось сокращением койко-дня с 12,6 до 10,7 суток, снижением средней стоимости лечения пациента с 6677 до 4927 долларов США и летальности – от 9,6% до 7,9%.

Разработанные для этой цели методы могут быть разделены на ускоренные, в которых исследуются выделенные чистые культуры возбудителей и экспресс-методы, позволяющие устанавливать антибиотикограмму возбудителей непосредственно в нативном материале или первичном посеве, т.е. без выделения чистых культур [10,12].

Ускоренные методы определения чувствительности микроорганизмов к химиопрепаратам дают возможность получить ответ спустя 2-6 ч. от начала исследования чистых культур. По принципу и механизму реакций, возникающих в результате действия антибиотиков, можно выделить 5 групп ускоренных методов, которые основаны на:

- 1) выявлении изменений ферментативной активности бактерий;
- 2) выявлении изменений окислительно-восстановительного потенциала среды развивающимися микроорганизмами;
- 3) цитоморфологической оценке изменений бактериальных клеток и формирования микроколоний;
- 4) определении изменений оптической плотности среды растущей популяцией или включения радиоизотопов в микробные клетки;
- 5) использовании специальных питательных сред с ростовыми стимуляторами [6,7,10].

Сущность методов 1-й группы заключается в следующем: в мясо-пептонный бульон с глюкозой добавляют антибиотик в необходимой концентрации, а затем засевают испытуемый штамм микробов. Устойчивые к данному антибиотику микроорганизмы усваивают глюкозу, что проявляется изменением кислотно-щелочного потенциала (рН) среды. Для определения изменений рН среды предложено использовать индикаторы, которые изменяют свой цвет при снижении рН – феноловый красный, индикатор Андрее и бромтимоловый синий.

Методы 2-й группы, получившие наибольшее распространение, основаны на выявлении изменений окислительно-восстановительного потенциала среды ( $\text{rH}_2$ ) развивающимися микроорганизмами в присутствии антибиотиков с помощью биологических или химических редокс-индикаторов. После 3 1/2 – 4 ч роста большинство бактерий создают в среде приблизительно одинаковый  $\text{rH}_2$  – потенциал, колеблющийся от 25 до 23. В связи с этим для определения чувствительности бактерий разных видов возможно использование одних и тех же индикаторов. Микроорганизмы, которые устойчивы к антибиотику, растут и размножаются в среде и снижают  $\text{rH}_2$  – потенциал, в результате чего индикатор, добавленный к питательной среде, изменяет свой цвет. Чувствительные микроорганизмы в зоне диффузии антибиотиков не размножаются и не изменяют  $\text{rH}_2$ , вследствие этого цвет среды вокруг дисков не изменяется.

В качестве таких индикаторов нашли применение резузарин, суспензии человеческих, кроличьих или бараньих эритроцитов, 2,6-дихлорфенолиндофенол,

2,3,5-трифенилтетразолий хлорид, водные растворы красной кровяной соли и железоаммиачных квасцов, метиленовый синий, водный голубой с розоловой кислотой, молибденовокислый аммоний, соли азотной кислоты.

Цитоморфологические ускоренные методы основаны на том принципе, что микроорганизмы, чувствительные к антибиотикам при 3-4-часовом росте на средах с химиопрепаратами, не увеличивают размеров микробной клетки или не образуют микроколоний на специальных препаратах с питательными средами. Необходимость использования в методах этой группы либо специальных препаратов для установления изменений величины клеток, либо микрокамер, целлофановых пластинок или мембранных фильтров с последующим микроскопическим изучением формирования на них микроколоний в световом, фазово-контрастном или люминесцентном микроскопах делает эти методы трудоемкими и требующими специального технического оснащения.

Предложены ускоренные методы, основанные на выявлении динамики оптической плотности культур в присутствии антибиотика с помощью нефелометра или спектрофотометра. Разработка системы автоматизации процесса регистрации подавления микробного роста антимикробными препаратами позволила создать различные приборы-автоматы (АТВ Expression, MIC-2000, MS-2, Autobac и др.), обеспечивающие стандартность исследования и ускоренное получение антибиотикограмм.

Пятая группа ускоренных методов основана на использовании специальных питательных сред с ростовыми стимуляторами для достижения быстро регистрируемых изменений в среде. В качестве таких стимуляторов используют экстракт бычьего сердца и глюкозу, кровь и глюкозу, индолилмасляную и индолилуксусную кислоты, гибереллин.

Для лечебной и эпидемиологической практики большой интерес представляют экспресс-методы определения чувствительности микроорганизмов к антибиотикам, которые позволяют устанавливать антибиотикограмму возбудителя непосредственно в нативном материале или в первичном посеве, то есть без выделения чистой культуры, что сокращает время анализа до нескольких часов. Разработано несколько модификаций экспресс-метода, в основном для определения чувствительности к антибиотикам возбудителей опасных инфекционных заболеваний (ОИЗ) в первичном посеве исследуемого материала с помощью иммунологических реакций-метода флюоресцирующих антител, реакции непрямой гемагглютинации (РНГА), иммуноферментного метода. Основу модификаций эспресс-анализа антибиотикочувствительности составляет регистрация с помощью специфических антител действия препаратов на рост и размножение популяции возбудителя в смешанной культуре, то есть в ассоциации с сопутствующей микрофлорой.

Различными исследователями [3,5,15] показано, что использование иммунофлюоресцентной методики для экспресс-определения антибиотикочувствительности позволяет устанавливать при первичном посеве материала антибиотикограмму возбудителей холеры, чумы, сибирской язвы через 8-12 часов, туляремии и бруцеллеза – через 18-24 часа. Необходимыми условиями анализа являлись: содержание в 1 мл материала не менее  $5 \cdot 10^5$  –  $10^7$  микробных клеток и до  $4 \cdot 10^4$ -сопутствующей микрофлоры, использование специальных питательных сред, соблюдение температурных режимов инкубации посевов. Результаты анализа оценивали с помощью иммунофлюоресцентной микроскопии по

шкале, разработанной на основе зависимости функции от процента ингибиции микробного роста.

Более удобным методическим приемом экспресс-анализа антибиотикочувствительности возбудителей ОИЗ оказалась РНГА. Так по данным Л.Н. Фестер с соавт. [18] и В.Н. Метлиной с соавт. [13] для анализа с использованием РНГА минимальное содержание возбудителя в пробе должно быть не ниже  $2 \times 10^5$  микробных клеток в 1 мл, время инкубации посевов в зависимости от вида возбудителя составляло 10-22 часа. О чувствительности возбудителей к антибактериальным препаратам свидетельствует не менее, чем четырехкратное снижение титра антигена соответствующего возбудителя в опытных (с определенной концентрацией антибиотика) посевах по сравнению с контрольными (без антибиотика). Близкие условия и сроки проведения анализа получены и при использовании иммуноферментного твердофазного метода [9,13].

М.И. Леви с соавт. [12] предложили экспресс-метод определения чувствительности к антибиотикам возбудителей гнойно-септических инфекций. Для экспресс-анализа использован метод серийных разведений антибиотиков в цветной питательной среде, содержащей 0,002% индикатора бромкрезолпурпурного и 0,5% глюкозы. При росте устойчивых к антибиотикам микроорганизмов снижается рН питательной среды и индикатор изменяет свой цвет, чувствительные к антибиотикам микроорганизмы цвет среды не изменяют. Исследования проводили в пластмассовых планшетах, в луночках которых приготавливали разведения антибиотиков на цветной питательной среде. В контрольные лунки вносили только цветную питательную среду. Гнойное отделяемое из ран больных забирали ватным тампоном, смоченным цветной питательной средой, готовили разведения материала и по 0,05 мл добавляли в луночки планшетов с различными разведениями антибиотиков. Планшеты помещали в термостат до изменения исходного цвета питательной среды в контрольных лунках (без антибиотиков) в желтый (обычно 3-6 часов). Затем учитывали результаты анализа. Сохранение исходного цвета питательной среды в опытной луночке свидетельствовало о чувствительности микрофлоры к данной концентрации антибиотика, появление желтого цвета – об устойчивости микрофлоры к такой концентрации препарата.

Принципиально новый метод экспрессного определения лекарственной устойчивости микроорганизмов разработан на основе использования реакции ДНК-ДНК гибридизации [21,22,35]. Принцип метода заключается в применении ДНК-зондов, выявляющих у микробов генетические детерминанты, кодирующие плазмидную или хромосомную резистентность микробной популяции к определенным типам или группам антибиотиков. ДНК-зонды метятся радиоактивной, люминесцентной или ферментной меткой. При использовании ДНК-зондов не требуется выделение чистой культуры микробов или подрачивания материала на питательных средах, что значительно сокращает сроки исследования.

Чувствительность реакции ДНК-ДНК гибридизации может быть значительно повышена при предварительном использовании полимеразной цепной реакции, в которой за 30-40 циклов в течение часа из одного ДНК-фрагмента можно получить до 108 ампликонов. После накопления ДНК и ее рестрикции эндонуклеазами генетический анализ фрагментов проводят в реакции ДНК-ДНК гибридизации [26,30,31]. Благодаря высокой специфичности и чувствительности совместного применения полимеразной цепной реакции и метода молекулярной гибридизации

обеспечивается возможность получения результатов в течение 6-8 часов от начала исследования нативного материала. Однако, необходимость наличия сложного и дорогостоящего оборудования и реактивов ограничивает использование методов молекулярной диагностики в практике.

Выводы:

1. Экспресс-методы позволяют оценить чувствительность-устойчивость к антибиотикам возбудителей гнойно-септических инфекций непосредственно в патологическом материале – в моче, мокроте и гное.

2. Экспресс-методы оценки чувствительности-устойчивости микроорганизмов к антибиотикам характеризуются достаточной чувствительностью, обеспечивают получение результатов, сопоставимых с таковыми, полученными с помощью классических методов.

3. Применение экспресс-методов в клинических лабораториях позволяет получить результаты в течение 3-4 часов, что обеспечивает раннее назначение этиотропной антибиотикотерапии.

4. Ускоренное определение чувствительности к антибиотикам чистых культур микроорганизмов устанавливает минимальную ингибирующую концентрацию препарата в день получения чистых культур, что способствует назначению эффективного препарата в дозе, необходимой для проведения рациональной антибиотикотерапии.

1. Вильямс Д. Резистентность к бета-лактамам антибиотикам // Антибиотики и химиотерапия. – 1997. – Т. 42, № 10. – С. 5-9.

2. Горбунов В.А., Титов Л.П. Резистентность к антибактериальным препаратам грамотрицательных бактерий, выделенных от больных с гнойно-воспалительными заболеваниями // Медицинские новости. – 1998.-№ 2. – С. 55-57.

3. Губина Е.А., Желудков М.М., Дьяков С.И. и др. Иммунофлюоресцентный экспресс-метод определения антибиотикочувствительности бруцелл // Антибиотики и химиотерапия. – 1989.-№ 2. – С. 109-112.

4. Деревянко И.И., Ходырева Л.А. Анализ этиологической структуры мочевой инфекции и антибиотикорезистентность ее возбудителей // Антибиотики и химиотерапия. – 1997. – Т. 42, № 9. – С. 27-32

5. Дьяков С.И., Лебедева И.К., Лисин В.В. и др. Новая иммунофлюоресцентная методика экспрессного определения антибиотикочувствительности микробов // Антибиотики. – 1982.-№ 10. – С. 41-46.

6. Дьяков С.И., Ильина Н.Ю., Лебедева И.К. Методы быстрого определения чувствительности микробов к антибиотикам // Антибиотики. – 1983.-№ 7. – С. 545-554.

7. Дьяков С.И., Лебедева И.К., Сидоренко С.В. Современные методы и средства быстрого определения чувствительности возбудителей опасных инфекционных заболеваний к антибиотикам и химиопрепаратам // Военно-медицинский журнал. – 1996.-№ 3. – С. 44-47.

8. Ерофеев В.В., Батуров А.В., Шарма Б.Р. Оптимизация антимикробной терапии у больных в отделении реанимации // Вестник интенсивной терапии. – 1995.-№ 2. – С. 37-41.

9. Желудков М.М., Губина Е.А. Разработка экспрессных методов определения антибиотикочувствительности бруцелл // Актуальные проблемы химиотерапии бактериальных инфекций: Матер. науч. конф. – М., 1991. – С. 214-216.

10. Змушко Л.С., Адарченко А.А. Ускоренные методы определения чувствительности микроорганизмов к антибиотикам (обзор литературы) // Лабораторное дело. – 1980.-№ 8. – С. 576-579.
11. Косинец А.Н., Окулич В.К. Проблемы при лечении противобактериальными препаратами в хирургической практике // Новости хирургии. – 1998. – Т. 9, № 2. – С. 70-72.
12. Леви М.И., Сучков Ю.П., Слизкова В.Г. Экспресс-метод отбора предпочтительных антибиотиков для лечения больных гнойно-септическими инфекциями // Дезинфекционное дело. – 1999.-№ 4. – С. 21-27.
13. Метлин В.Н., Яковлев А.Г., Дьяков С.И. Ускоренное определение чувствительности к антибактериальным препаратам возбудителей сапа и милоидоза с помощью твердофазного иммуноферментного анализа // Актуальные проблемы химиотерапии бактериальных инфекций. – М., 1991. – С. 433-434.
14. Митрохин С.Д., Сутормина Т.М., Ритчик Т.А. и др. Антибиотикорезистентность госпитальных штаммов в многопрофильной больнице // Клинический вестник. – 1996.-№ 4. – С. 17-19.
15. Проскурин В.А., Лебедева И.К., Буравцева Н.П. и др. Методические особенности использования иммунофлюоресцентного метода для экспрессного определения чувствительности сибиреязвенного микроба к антибиотикам // Антибиотики и мед. биотехнология. – 1987.-№ 2. – С. 130-133
16. Сидоренко С.В. Перспективы контроля распространения антибиотикорезистентности // Антибиотики и химиотерапия. – 1998. – Т. 43, № 7. – С. 3-6.
17. Сидоренко С.В. Происхождение, эволюция и клиническое значение антибиотикорезистентности // Антибиотики и химиотерапия. – 1999. – Т. 44, № 12,-С. 19-22.
18. Ферстер Л.Н., Жаркова В.А., Храпова Н.П. и др. Изучение возможности использования РНГА для определения чувствительности возбудителей сапа и милоидоза к антибиотикам // Антибиотики и мед. биотехнология. – 1986.-№ 6. – С. 454-456.
19. Amyes S.B., Gemmel C.G. Antibiotic resistance // J. Med. Microbiol. – 1997. – Vol. 46, N 6. – P. 436-470.
20. Barenfanger J. Clinical and financial benefits of rapid bacterial identification and antimicrobial susceptibility testing // J. Clin. Microbiol. – 1999. – Vol. 37. – P. 1415-1418.
21. Bergeron M.G., Ouellette M. Preventing antibiotic resistance using rapid DNA based diagnostic tests // Infect. Cont. and Hosp. Epidemiol. – 1998. – Vol. 19, N 8. – P. 560-564.
22. Bingen E. Applications of molecular methods to epidemiologic investigations of nosocomial infections in a Pediatric hospital // Infect. Cont. and Hosp. Epidemiol. – 1994. – Vol. 15, N 7. – P. 488-492.
23. Cohen M. Emerging problems of antimicrobial resistance // Ann. Emergency Med. – 1994. – Vol. 24, N 3. – P. 5-9.
24. Doern G., Vautour R., Gaudet M., Levy B. Clinical impact of rapid in vitro susceptibility testing // J. Clin. Microbiol. – 1994. – Vol. 32. – P. 175-176.
25. Frankel G. Detection of Shigella in feces using DNA amplification // J. Infect. Dis. – 1990. – Vol. 161, N 6. – P. 1252-1256.

26. Hancock R.E. The role of fundamental research and biotechnology in funding solutions to the global problem of antibiotic resistance // *Clin. Infect. Dis.* – 1997. – Vol. 24, N 1/-P. 148-150.
27. Jacques A.F. Consequences of bacterial resistance to antibiotics in medical practica // *Clin. Infect. Dis.* – 1997. – Vol. 24, N 1. – P. 17-18.
28. Joshi N., Milfred D. The use and misuse of new antibiotics // *Arch. Intern. Med.* – 1995. – Vol. 155, N 5. – P. 569-577.
29. Johb J.F., Rice L.B. The microbial genetics of antibiotic cycling // *Infect. Contr. and Hosp. Epidemiol.* – 2000. – Vol. 21, N 1 (Suppl.). – P. 22-31.
30. Lee Y.L., Thrupp L. Genotyping by restriction endonuclease analysis compared to phenotyping by antibiogram for typing methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains colonizing patients in a nursing home // *Agents Chemother.* – 1986. – Vol. 24, N 5. – P. 721-725.
31. Meyer R. Antibiotica-resistenzen weltweit of dem Vormach // *Internist prax.* – 1994. – Bd. 34, N 1. – S. 197-208.
32. O'Brien T.F. The global epidemic nature of antimicrobial resistance and the used to monitor and manage it locally // *Clin. Infect. Dis.* – 1997. – Vol. 24, N 1. – P. 2-8.
33. Schaumann R., Shah P.M., Heller F. et al. Experience with imipenem in internal medicine – I postmarketing surveillance study // *Eur. J. Med. Res.* – 1997. – Vol. 24, N 3. – P. 93-96.
34. Thornberry C. Trends in antimicrobial resistance among today's bacterial pathogens // *Pharmacotherapy.* – 1995. – Vol. 15, N 1. – P. 1-2.
35. Tenover F. Studies of antimicrobial resistance genes using DNA-probes // *Antimicrob. Agents Chemother.* – 1986.-Vol. 24, N 5. – P. 721-725