

ГЛАВА 5 | ОПРЕДЕЛЕНИЕ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ К АНТИБИОТИКАМ ОБЛИГАТНО АНАЭРОБНЫХ БАКТЕРИЙ

Автор был не очень удивлен, когда в одном из зарубежных изданий встретил полную упрека фразу — в клинических учреждениях даже микробиологи мало уделяют внимания чувствительности облигатно анаэробных бактерий к антимикробным препаратам [77]. Не будет преувеличением сказать, что в отечественных клиниках дело обстоит не лучше (по меньшей мере). Более того, если в Северной Америке и Европе составлены и используются соответствующие распорядительные документы (стандарты), включающие в себя критерии чувствительности (устойчивости) некоторых облигатных анаэробов к антибиотикам, то у нас они пока не внедрены. Вряд ли подобная ситуация может быть признана приемлемой. И для этого есть ряд оснований. Во-первых, облигатно анаэробные бактерии, являясь доминирующей микрофлорой человеческого тела, достаточно часто служат основной причиной возникновения заболевания или фактором, отягчающим его течение. Во-вторых, патология, вызванная анаэробными бактериями, нередко носит крайне тяжелый характер, сопровождаясь обширной гибелью тканей, токсикозом, органопатологией. В-третьих, смешанный характер анаэробно-аэробной микрофлоры часто делает выбор антибактериальных препаратов трудной проблемой. Наконец, облигатно анаэробные бактерии могут быть устойчивы ко многим антибиотикам. Одни из них конститутивно резистентны к большинству препаратов (например, так называемая группа *Bacteroides fragilis*). С другой стороны, не редка индуцированная устойчивость анаэробных бактерий к антибиотикам, делающая бесполезными еще вчера высокоэффективные лекарственные средства [24, 25, 77, 78, 88, 89].

Однако, надо сразу же подчеркнуть, что под общим названием облигатно анаэробные бактерии, объединены очень и очень разные микроорганизмы [108]. Они коренным образом отличаются не только по таксономическим признакам (это не является объектом обсуждения в данной публикации), но и по чувствительности к

противомикробным препаратам, по частоте и степени возникновения среди них вторично (индуцированно) резистентных клеток. Последнее заслуживает краткого обобщения, поскольку самым непосредственным образом влияет как на показания к тестированию чувствительности, так и на существенные особенности методологии определения чувствительности.

Из огромного мира облигатно анаэробных бактерий в свете обсуждаемой проблемы, естественно, прежде всего, интересны те из них, которые болезнетворны. Для доминирующей части родов и видов анаэробов их роль в этиологии заболеваний человека не установлена или о такой возможности упоминают как об исключении. Заметим, что и о чувствительности (резистентности) таких микроорганизмов известно мало. Тем более не приходится говорить о методической стороне вопроса. С другой стороны есть определенное число родов облигатно анаэробных бактерий, чья патогенность достаточно высока. Среди них бактериоды, фузобактерии, превотеллы, пропионибактерии, клостридии и нек. др. В лечении инфекций, вызванных этими микроорганизмами, антибиотики играют важную роль, в некоторых ситуациях — решающую [25, 57, 133, 200]. Поэтому возникает несколько вопросов: 1) какова конститутивная устойчивость облигатно анаэробных бактерий к антибиотикам, или, если сформулировать вопрос применительно к лечебной практике, какие антибиотики можно использовать для лечения инфекций, вызванных каждой из групп анаэробов — возбудителей заболеваний; 2) какова реальная угроза возникновения вторичной (индуцированной) устойчивости анаэробных бактерий к антимикробным препаратам и, соответственно, какие микроорганизмы и к каким антибиотикам требуют определения чувствительности; 3) каковы методы тестирования чувствительности анаэробов к антимикробным препаратам, их информативность; 4) какие методы определения чувствительности стандартизованы; 5) для каких микроорганизмов имеются критерии чувствительности; с помощью каких методов эти показатели определяются? Без ответа на эти вопросы трудно говорить о том, как определять чувствительность анаэробных бактерий к антимикробным препаратам.

Обсуждая поднятые проблемы, прежде всего, целесообразно обратиться к бактериодам, наиболее значительным представителям резидентной микрофлоры человека. Практически нет ни одной слизистой полости человека, населенной т. н. «нормальной» мик-

то и микробиологическая служба должна быть готова к проведению подобных исследований.

Сама по себе постановка вопроса очевидна — раз есть показания к определению чувствительности облигатно анаэробных бактерий (во всяком случае, многих из них) к антибиотикам, то должна быть и адекватная техника проведения исследования. О том, что от методологии зависит его результативность, точность, говорить не приходится. Но вот тут все оказалось не так просто, как хотелось бы. Тестирование облигатных анаэробов в силу их ростовых требований предполагает использование иных, более сложных и затратных, приемов, чем это принято для аэробных и факультативно анаэробных бактерий. Прежде всего, не приемлем диск-диффузионный метод, самый доступный и самый часто применяемый в микробиологической практике. Он не обеспечивает точность и воспроизводимость результатов. По опыту автора, в частности, ряд видов клостридий и бактероиды не позволяют получить газон необходимой плотности; в одних случаях он разрежен, а в других (при работе с клостридиями) бывает избыточен. Края зон часто размыты или, наоборот, есть рост внутри зоны. Для получения информативного результата в этих случаях требуются повторные исследования. Понятно, что все это для повседневной практики мало приемлемо. Более надежен оказался метод серийных разведений. Некоторые его варианты принято считать стандартными, что позволило включить их в зарубежные методические рекомендации. Однако, и в этом случае речь идет о методике, имеющей свои существенные отличия от той, что принята для исследования аэробных и факультативно анаэробных бактерий. Эти «отличия» не вошли в отечественные методические указания. Далее речь пойдет о тех вариантах методических приемов, которые достаточно апробированы и приняты в мировой практике микробиологических исследований [90, 164, 200]. Их два: это метод серийных разведений в плотной питательной среде в адаптации для анаэробных бактерий и метод микроразведений в жидкой питательной среде также приспособленный для исследования анаэробов.

Определение МПК в агаризованной питательной среде используют достаточно часто, особенно при изучении чувствительности к антибиотикам бактероидов. Поскольку именно бактероиды являются наиболее требовательными микроорганизмами среди большинства других облигатно анаэробных бактерий, в дальнейшем, формулируя условия проведения исследований,

приведенные положения будут ориентированы на потребности данных микроорганизмов.

Выбор питательной среды. Первое и особо значимое условие для анализа — «богатая» питательная среда. Классическая для определения чувствительности плотная среда Мюллера-Хинтон для этой цели непригодна (так же, как и среда АГВ). В мировой практике были исследованы многие обогащенные питательные среды. Наибольшее признание получила агаризованная среда для бруцелл — Бруцелл-агар с добавками. В отечественной практике существует эритрит-агар, тоже для выделения и культивирования бруцелл. Его пропись отличается от рекомендуемого Бруцелл-агара, используемого для определения чувствительности анаэробов. Вот ее рецепт: в варианте (их несколько), предложенном американскими микробиологами, именно для определения чувствительности анаэробов к антибиотикам (г/л):

Панкреатический перевар казеина	10,0
Пептический перевар мяса	10,0
Глюкоза	1,0
Дрожжевой экстракт	2,0
Натрия хлорид	5,0
Натрия бисульфит	0,1
Агар-агар	15,0
Раствор гемина	1 мл
Раствор витамина К ₁	1 мл

Растворяют при нагревании навеску (43 г сухого вещества и 2 мл добавок) в литре дистиллированной воды. Автоклавируют 15 мин. при 121 °С. Охлаждают до 50 °С и разливают по колбочкам или большим пробиркам, если предполагают, что питательная среда не будет использована сразу же. В пробирках среда может храниться в холодильнике при 2–6 °С до одного месяца. Перед употреблением в расплавленную и охлажденную среду добавляют гемолизированную (лаковую) кровь и раствор антибиотика (см. далее — технику исследования). При внесении среды в емкости для хранения следует предусмотреть ее объем, достаточный для внесения в чашку Петри (одна концентрация — одна чашки Петри со средой), т. е. в зависимости от диаметра чашки Петри (90–100 мм) 15–17 мл среды. Последний объем предпочтителен (см. далее). Для приготовления раствора гемина делают навеску вещества и раст-

Метод серийных разведений в плотной питательной среде является наиболее надежным и универсальным при определении чувствительности облигатно анаэробных бактерий к антибиотикам. Однако, у него есть серьезный недостаток — он целесообразен тогда, когда исследуется много культур. Если их мало, он оказывается излишне трудоемким и затратным. Поэтому как альтернативный предложен еще один метод — **определение МПК для анаэробных бактерий в жидкой питательной среде**, т. е. методом серийных разведений в варианте микроразведений. Этот метод имеет официальное признание (в частности, за рубежом есть соответствующий стандарт). Используя планшет с тем или иным количеством ячеек можно исследовать чувствительность к антибиотикам любого количества культур, в том числе и единичных. Тем не менее, этот метод имеет свои недостатки. Пока он найден приемлемым для бактериоидов группы *B. fragilis*, поскольку только для этой группы микроорганизмов определены критерии чувствительности. Малый объем питательной среды, даже богатой и восстановленной, не оптимальный вариант для роста «капризных» анаэробных бактерий. Чтение получаемого результата, т. е. наличие или отсутствие роста в питательной среде ячейки, задача не всегда простая, если учесть, что облигатно анаэробные бактерии, в том числе бактериоиды, могут давать плохо различимый рост или образовывать его в виде осадка, или давать только придонное помутнение среды. Отсюда предложение, правда, не прижившееся, но, безусловно, имеющее весомые предпосылки, вводить в питательную среду индикатор, чтобы судить о наличии роста еще и по изменению цветности.

Определение чувствительности облигатных анаэробов к антимикробным препаратам методом микроразведений имеет много общего с таким же методом определения чувствительности факультативно анаэробных и аэробных бактерий (он приведен в отечественных МУК). Есть и определенные отличия.

Прежде всего, что естественно, это питательная среда. Основная рекомендуемая жидкая питательная среда это бруцелла-бульон, обогащенный гемином, витамином K_1 и лизированной (лаковой) кровью. Пропись среды представлена выше (естественно, агар-агар должен быть исключен). Именно эта среда считается наиболее надежной, обеспечивающей воспроизводимые результаты при серийном титровании антибиотика и, далее, росте культуры. Следует упомянуть также обогащенный вариант тиог-

ликолевой среды, используемой для культивирования микроба с целью получения инокулюма. Тиогликолевая среда обогащается витамином K_1 , геминном и лаковой кровью. Однако, для жидких питательных сред с целью осветления предпочтительно использовать не цельную, а осветленную, разведенную пополам водой (50%) кровь. Процедура приготовления заключается в следующем. Смешивают цельную дефибрированную кровь со стерильной дистиллированной водой в соотношении 1 : 1. Затем полученную жидкость замораживают при -20°C или ниже в морозильной камере. Убеждаются, что кровь замерзла полностью. Извлекают емкость с раствором крови и дают оттаять. Повторяют процедуру до полного лизиса эритроцитов. Поскольку для жидкой питательной среды лизис клеток крови очень важен, процедуру (замораживание—оттаивание) иногда приходится повторять до 5–7 раз. Затем лаковую кровь центрифугируют 20–30 мин при 10–12 тыс. оборотов. Для внесения в питательную среду используют надосадочную жидкость, которую осторожно извлекают так, чтобы исключить попадание в нее осадка. Преципитат, если его вносят в питательную среду, ограничивает или исключает возможность прочтения результата исследования (роста микроба или его отсутствия). Если супернатант содержит элементы осадка или не прозрачен, целесообразно повторить центрифугирование. Естественно, что все процедуры получения надосадочной жидкости должны проводиться при строгом соблюдении стерильности. Для жидкой питательной среды достаточно 5% лаковой крови, т. е. 5 мл крови на 100 мл среды.

Прежде чем готовить инокулюм и разведения антибиотиков исследователь должен определиться: в каком объеме в лунку планшета он намерен вводить и то, и другое. Общий объем жидкости в лунке не может быть менее 0,1 мл (в противном случае результат «не читаем») и, с учетом конструкции планшета, он не может быть более 0,3 мл. Как заполнить лунку, решает сам исследователь. В некоторых работах авторы предпочитали все разведения и инокуляцию делать в обычных пробирках с последующим переносом нужного объема в лунки. Но, по сути, это «тройной» труд. Чаще используют иные варианты. В лунку вносят одно из разведений антибиотика, а затем добавляют инокулюм в объеме 0,01 или 0,02 мл; превышением объема жидкости на 10% пренебрегают, как не влияющим на конечный результат исследования. Такая методика вошла в некоторые зарубежные стандарты и используется наиболее часто. Наконец, не-