

ГЛАВА

7

ДИСК-ДИФфуЗИОННЫЙ МЕТОД ИЗУЧЕНИЯ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ БАКТЕРИЙ К АНТИБИОТИКАМ: КОММЕНТАРИИ И ДОПОЛНЕНИЯ

Казалось бы, обозначенная тема так хорошо знакома любому микробиологу и медицинскому, и ветеринарному. Диск-диффузионный метод определения чувствительности к антибиотикам микроорганизмов, возбудителей заболеваний человека и животных — это повседневная лабораторная практика, это «заурядный» многократно повторяемый прием аналитического исследования, к тому же регламентируемый методическими указаниями в нашей стране и стандартами за рубежом [3, 9, 49, 50, 67]. И, тем не менее, пожалуй, нет ничего более противоречивого. С одной стороны метод прост, доступен, не требует больших трудозатрат и сложных дорогостоящих расходных материалов. Наконец, он действительно достаточно часто обеспечивает столь необходимую базовую информацию о чувствительности микроба к антибиотикам, позволяя выбрать для терапии больного нужный препарат, т. е. препарат, способный обеспечить лечебный эффект (во всяком случае, в той степени, в какой он зависит именно от этиотропного лекарственного средства). В то же время при всей внешней простоте метод базируется на сложном переплетении физических, химических и биологических процессов, а это для достаточной воспроизводимости результата требует совпадения качественных показателей расходных материалов, точного, можно сказать скрупулезного соблюдения всех манипуляций при реализации исследования. И при всем при этом он во многих случаях не информативен, а если и пригоден, то дает лишь качественный (не количественный) показатель чувствительности (устойчивости). Диск-диффузионный метод вторичен, он является, своего рода, отражением метода серийных разведений в упрощенном варианте (но только, если под словом упрощенный иметь в виду трудозатраты).

Безусловно, метод дисков еще долго будет доминировать при определении чувствительности возбудителей инфекций к антимикробным препаратам. Поэтому очень важно знать и понимать

все детали этого исследования. Без умелого и критичного его использования результаты анализа могут оказаться и бесполезными, и, даже, вредными.

Как хорошо известно любому врачу, суть метода заключается в том, что носитель антибиотика (диск, таблетка, полоска, имbibированные этим препаратом) помещается на поверхность засеянного микробом питательного агара. Антимикробный препарат переходит (диффундирует) из носителя в агар, действует на микроб, подавляя его размножение вокруг носителя, и эту образующуюся зону подавления роста микроба замеряют. По величине зоны судят о чувствительности или устойчивости микроба. Казалось бы, все просто. На самом деле не трудно представить себе, какие процессы идут в питательной среде. Для простоты будем называть среду гелем (что вполне корректно). Во-первых, это диффузия антибиотика из носителя в гель. Как только диск (или иной носитель) накладывают на поверхность среды, начинается переход из него антимикробного препарата в гель, который продолжается несколько часов. Диффузионный процесс достаточно сложное физическое явление, зависящее от свойств геля самым радикальным образом. Это очень важно помнить, поскольку определяет особые требования к питательной среде, к ее характеристикам, которые всегда должны быть одними и теми же. Питательная среда должна быть стандартна в самом строгом смысле слова. Попав в гель, антибиотик подвергается воздействию и микроба, и компонентов среды, и временного фактора (не все антибиотики стабильны в водной фазе, некоторые со временем теряют свою активность). Процесс инактивации антибиотика в результате воздействия влажности, температуры, рН среды и т. д., обозначен как «пассивная инактивация». Одновременно идет т. н. «активная инактивация» — результат воздействия на антибиотик микроба, его ферментов и метаболитов. Параллельно происходит рост популяции тестируемого микроба, образование «газона». Это достаточно сложное биологическое явление. Микробиологам хорошо известно, что оно чрезвычайно зависимо от тех условий, в которых идет размножение микроба. И опять следует упомянуть качество питательной среды, роль ее компонентов, т. е. всего того, что дает популяции возможность в тот или иной срок пройти все фазы роста. Очевидно, что процесс может в одних случаях идти быстро, в других, наоборот, медленно. Кроме того, образование газона — это функция величины инокулюма, это влияние

температуры инкубации, это зависимость от того или иного варианта аэрации и от ряда других «технических мелочей», которые необходимо учитывать [7, 11, 19]. Вот эти процессы (физический, химический, биологический) связаны в один узел. Они не просто идут параллельно. Они должны во всех случаях происходить одинаково, настолько сходно, насколько это позволяет тщательно выполненное микробиологическое исследование. Всякое изменение любого из названных факторов в буквальном смысле делает невозможным получение воспроизводимых и сравнимых результатов. А это, в свою очередь, означает, что критерии чувствительности («табличные» данные) перестают «работать», становятся не информативными.

Прежде чем перейти к практическим аспектам диск-диффузионного метода, напомним, что все данные, все требования, приведенные далее, это итог работ, которые были начаты еще в 50-е годы прошлого века. Теории процесса зонообразования посвятили свои исследования К. Соорег с соавторами (1955 г.). Им принадлежит математическое описание того, как образуется зона. К. Соорег, а позднее А. Barry вместе со своими соавторами поэтапно изучили воздействие на этот процесс многочисленных факторов, которые могут повлиять на зонообразование, на качество и размер зоны подавления роста микроба. Разностороннее изучение этих вопросов в нашей стране было выполнено сотрудниками Санкт-Петербургского (ранее Ленинградского) института антибиотиков, а позднее Научно-исследовательского центра фармакотерапии. Особое внимание отечественными исследователями было уделено влиянию на зонообразование компонентов питательных сред, разработке теории диффузионного процесса противогрибных соединений, критическому осмыслению сопоставимости получаемых результатов при использовании метода дисков. Поэтому приведенные ниже замечания и рекомендации — это результат не только обобщения мирового опыта определения чувствительности микроорганизмов к антибиотикам диск-диффузионным методом, но и тех разработок, которые были выполнены отечественными специалистами [5, 6, 11, 13, 15].

Напомним схему этого исследования при условии, что микроб выделен и имеется его «суточная» культура [9, 49]:

- приготовление питательной среды;
- приготовление инокулюма;

- нанесение инокулюма на поверхность питательной среды, разлитой в емкости (обычно чашки Петри);
- наложение на поверхность засеянной питательной среды дисков с антибиотиками;
- инкубация чашек с засеянной средой и наложенными дисками в термостате;
- чтение результата;
- оформление микробиологического заключения (антибиотикограммы) и передача его лечащему врачу.

Эта хорошо известная любому клиническому микробиологу схема приведена для того, чтобы выделить узловые вопросы для последующего обсуждения. Первым таким объектом по многим причинам должна быть питательная среда, ее состав и качество компонентов.

Питательные среды, используемые при определении чувствительности микроорганизмов к антибиотикам диск-диффузионным методом

Не будет большим преувеличением сказать, что питательная среда является ключевым элементом исследования. Все названные выше процессы, диффузия антибиотика, рост культуры, действие антибиотика на микроб с образованием зоны подавления роста, — все это происходит в питательной среде. А раз так, то всякое изменение питательной среды, ее свойств, ее состава, способно радикально отразиться на результате исследования. Фигурально говоря, оно может превратить чувствительный к антибиотикой микроб в устойчивый и наоборот.

Прежде всего, о каких питательных средах идет речь. Отечественные микробиологи многие годы пользовались и пользуются сегодня средой АГВ (агаром Гивенталья-Ведьминой). Надо отдать должное этим двум видным микробиологам школы З. В. Ермольевой. Их простая по составу среда позволила значительный период времени, когда контакты с западной наукой были ограничены, решать в нашей стране проблему определения чувствительности микроорганизмов к антибиотикам. В основу этой среды был взят т. н. питательный агар, т. е. то, что обычно микробиологи называют мясо-пептонным агаром. К сожалению, сегодня понятие мясо-пеп-

тонный агар стало очень размытым. Разные производители вместо мяса определенного качества часто используют суррогатные источники белка, а это делает питательную среду недостаточно стандартной или просто нестандартной. Критерии чувствительности для этой среды (фактически, нескольких сред) нельзя признать убедительно отработанными. В мировой практике при определении чувствительности микробов к антибиотикам методом дисков используют несколько питательных сред. Наибольшее распространение получил агар Мюллера-Хинтон. В последние годы эту питательную среду все чаще используют отечественные лаборатории. И это следует признать правильным, поскольку предлагаемые российскими методическими указаниями показатели чувствительности (устойчивости) практически повторяют некоторые зарубежные стандарты, в которых эта питательная среда является базовой. А раз так, то и условия, в которых производится тестирование в нашей стране (состав питательной среды в первую очередь), должны быть тождественны.

Судьба этой среды любопытна. Ее авторы видный американский микробиолог J. Muller и его сотрудница J. Hinton в 1941 г. и в мыслях не имели (да и не могли иметь), что созданная ими среда для работы с нейссериями может быть пригодна еще для каких-либо целей. Испытания временем как питательная среда для нейссерий предложенная пропись не выдержала и представляет собой сегодня разве только что исторический интерес. А вот в процессе выбора (лучше сказать отбора) питательной среды для определения чувствительности микроорганизмов к антибиотикам диск-диффузионным методом она оказалась, по мнению американских исследователей, предпочтительной: простая по составу, экономически и технологически доступная, обеспечивающая рост значительной части распространенных возбудителей инфекций, не препятствующая диффузии в гель большинства антимикробных препаратов, позволяющая со статистически достаточной достоверностью воспроизводить получаемые результаты. По совокупности свойств среда Мюллера-Хинтон была признана наиболее приемлемой. Хотя никто не считает, что она оптимальна, и это признают даже сами разработчики стандартов определения чувствительности, но агар Мюллера-Хинтон используют в мире чаще других. В некоторых случаях среда не пригодна для определения чувствительности или требуется внесение в ее пропись добавочных компонентов. Об этом далее.

1. Перед использованием флакон с дисками должен быть извлечен из холодильника за полтора–два часа до применения дисков; температура наносимых на поверхность среды дисков должна быть адекватна комнатной.
2. При нахождении упаковок с дисками на рабочем столе необходимо исключить воздействие на них источников тепла и прямых солнечных лучей.
3. Если диски помещены во флакон, извлекать их следует обезжелезанным пинцетом, не горячим и не влажным. Брать диски следует осторожно, чтобы не повредить картон.
4. Чтобы избежать эффекта прединкубации диски целесообразно наносить на поверхность засеянного тестируемым микробом агара в течение первых 15 минут после инокуляции.
5. Нанесенный на поверхность питательной среды диск следует слегка прижать к агару. Недопустимо, чтобы контакт какого-либо участка диска со средой был не полным, или чтобы он для различных участков диска был разным.
6. Диски на поверхности питательной среды должны быть размещены таким образом, чтобы исключить контакт антибиотика, диффундирующего в гель из одного диска, с антибиотиком из другого диска, а также, чтобы зона подавления роста микроба вокруг одного диска не перекрывала зону вокруг соседнего диска. Поэтому на поверхность питательной среды в чашке диаметром 90 мм целесообразно наносить не более 5 дисков, а при диаметре 100 мм — 6 дисков. Диски помещают по кругу на равном расстоянии друг от друга в 2,4–2,5 см от центра чашки. Применение трафарета, подкладываемого под чашку со средой, очень упрощает задачу (если не используют диспенсер).

Рассматривая практику применения дисков с антимикробными препаратами необходимо отметить еще несколько моментов, касающихся входного контроля качества дисков. Не секрет, что на медицинском рынке присутствуют диски разных производителей, иногда не прошедших соответствующую регистрацию. Некоторые из них очень привлекательны в экономическом плане. Каждая приобретаемая партия дисков для определения чувствительности микроорганизмов к антимикробным препаратам должна иметь паспорт, оформленный по определенным правилам. Прежде всего, в паспорте должно быть указано — на ос-

новании какого регламентирующего документа выпущена данная серия дисков. Далее должны быть приведены качественные показатели дисков, среди которых для микробиолога особо важны контрольные размеры зон подавления роста международно-признанных референс-штаммов микроорганизмов. Они должны соответствовать существующим критериям чувствительности этих штаммов. Если в последующем при внутрилабораторных исследованиях возникнут разночтения с этими показателями (и они не будут связаны с внутренними дефектами работы в лаборатории), возникнут серьезные основания для рекламации.

Естественно, что при внутрилабораторном контроле следует обратить внимание и на чисто визуально выявляемые дефекты: наличие погнутых дисков, дисков с обрубленным или бахромчатым краем, отсутствие обозначения на диске (если это не предусмотрено — например, при постановке экспериментальной серии дисков, что должно быть отражено в паспорте) и др.

И еще один важный показатель качества дисков — возможность хранения, его продолжительность. Как уже упоминалось, не все антибиотики сходны по способности длительно сохранять свою противомикробную активность. Она может быть и год, и несколько лет. Диски с менее, чем один год, сроком хранения изготавливать не принято, хотя в экспериментальном периоде освоения их производства это возможно. На стабильность антибиотиков в дисках отрицательно влияет несовершенная технология производства самих дисков. Это не простой процесс. Поэтому неперенное требование к паспортным данным на каждую серию дисков — указание даты изготовления и срока годности. Диски с предельным (завершающимся) сроком годности приобретать целесообразно только в исключительных случаях, а использовать диски с истекшим сроком годности не следует. Положительный результат проверки качества дисков, чей срок годности истек, не может служить основанием для его продления, поскольку реальных критериев для установления возможного периода продления срока годности не существует.

Пожалуй, наибольшее количество вопросов возникает у исследователя тогда, когда он переходит к измерению диаметра зоны подавления роста микроба. Если край зоны четкий, хорошо просматривается в отраженном или проходящем свете, то все решается достаточно просто: с помощью линейки, или кронциркуля, или с использованием специального автоматического при-

бора измерение осуществляется быстро и, как правило, надежно. Но так бывает не всегда. Край зоны может быть нечетким, размытым или представлять собой «террасу» — просматриваются не один, а два края зоны. В последнем случае также есть варианты, например, может быть зона полного подавления роста и зона, край которой представляет собой вуалеобразный рост, после которого идет хорошо просматриваемый газон с четким краем зоны частичного подавления роста. Край зоны может представлять собой валик интенсивного роста, переходящий в нечеткой чуть видный рост, протяженность которого, иногда, трудно уловить. Возможен очевидный рост изолированных колоний, как у края зоны, так и внутри зоны и т. д. Вот тут-то и возникает естественный вопрос, что измерять, где начинается та зона, диаметр которой следует учитывать. Серьезность этой ситуации состоит в том, что в зависимости от того, что считать истинным краем зоны ее диаметр может меняться настолько значительно, что фактически одна и та же зона ингибиции может быть показателем и чувствительности, и устойчивости микроба к антимикробному препарату. Эта проблема заслуживает обсуждения хотя бы потому, что в одних документах ее или не обсуждают, или говорят о ней слишком бегло, а в ряде случаев трактовка может и не совпадать.

Общее положение, о котором не спорят, сводится к тому, что измерению подлежит зона полного подавления роста — от одного ее края до другого, которую можно определить невооруженным глазом. С такой формулировкой трудно не согласиться, кроме последнего требования, касающегося запрета на то, чтобы использовать увеличительное стекло. Далее будет показано, что в отдельных случаях оно может быть необходимо.

Проследим последовательность тех действий, которые позволяют корректно учесть полученный результат исследования. Первое, с чего целесообразно начать, об этом уже упоминалось, необходимо оценить микробный рост, газон, образовавшийся на поверхности питательной среды: он, напомним, не должен быть ни чрезмерно плотным, ни разреженным или, тем более, с «проплешинами». Сливающиеся, но как бы видимые колонии — это оптимальный вариант газона. Колонии обязаны быть однотипными; если в газоне отмечены не типичные колонии, островки морфологически отличающегося роста, то, скорее всего, речь идет о контаминации посторонней микрофлорой. Такие чашки подлежат выбраковке, а исследование необходимо повторить.

ментирующей документации EUCAST особо подчеркивается значение качества агара Мюллера-Хинтон при определении чувствительности к ампициллину бактерий сем. *Enterobacteriaceae*. Предложено игнорировать их рост у края зоны (вторая зона) и определять диаметр только по наружному краю зоны, а не по краю внутреннего кольца. При смене серии среды этот феномен может и не проявиться.

Одной из причин ошибок при тестировании культур, чья чувствительность определяется на плотной питательной среде с добавлением крови, является наложение зоны гемолиза на зону подавления роста. Исследователю необходимо присмотреться, чтобы отличить край зоны гемолиза, особенно альфа-гемолиза, от края зоны подавления роста. Вопреки утверждению, приведенному выше, использование увеличительного стекла в данном случае может оказаться очень полезным. Заметим, что это не единственное исключение. Нередко микробиолога ставит в тупик размытость края зоны, неопределенность ее края. Это не вторая зона и не рост мелких колоний у края зоны, это «плавный» плохо различимый переход от газона к зоне подавления роста. В этой ситуации линза также может быть полезна, хотя далеко не всегда. Единственный выход (как представляется автору) проявлять в этом случае осторожность и ограничить размер зоны теми пределами, в которых отсутствие микробного роста является очевидным.

Итак, микробиолог, определяющий чувствительность выделенных им микробов — возбудителей заболеваний человека, как бы делит их на две группы: чувствительных и устойчивых к тому или иному антибиотику. Для этого, выполнив соответствующие исследования, он заглядывает в табличные данные, где ему конкретно указано: если МПК равно или меньше такой-то величины (в ЕД или мкг на мл или мг/л) — микроб чувствителен, если МПК больше некоей концентрации, — то устойчив. Это, естественно, если исследователь использовал метод серийных разведений. Но куда чаще микробиолог использует «метод дисков». И в этом случае он тоже смотрит в таблицы и на основании увиденного утверждает: раз диаметр зоны подавления роста микроба равен или больше такой-то величины (в мм), то микроб чувствителен, но если диаметр меньше, — то устойчив. Казалось бы все просто и очевидно. Однако, очень важно для понимания весомости такого заключения — чувствителен, устойчив, часто еще и промежуточен по чувствительности — ясно представлять себе, откуда взя-

лись эти цифры. Кто и как их устанавливает. Почему, например, если диаметр зоны подавления роста кишечной палочки вокруг диска с ампициллином равен или больше 17 мм, то микроб чувствителен, а если 13 мм (или менее), то устойчив. В этом частном случае между двумя радикальными для заключения величинами еще есть хоть какой-то промежуток (14–16 мм), когда микроб признается «промежуточным» по чувствительности. Микробиологу, по сути, оставляется возможность сделать выбор между тем — рекомендовать или не рекомендовать антибиотик для лечения больного. А ведь как часто такого выбора у него нет. Если диаметр зоны подавления роста палочки синезеленого гноя вокруг диска с пиперациллином 17 мм — микроб устойчив, а если 18 мм — уже чувствителен. Таких табличных данных много: и для разных антибиотиков, и для разных микробов. Что такое в микробиологии различие в 1 мм, насколько ничтожна эта разница, любой микробиолог хорошо знает. И в этой непростой ситуации он должен сказать лечащему врачу — может или не может тот лечить больного тем или иным препаратом, следует ждать лечебного эффекта от антибиотика или его, эффекта, скорее всего, ждать не приходится. И все это, повторимся, на основании различия в диаметре зоны подавления роста микроба всего в 1 мм! Тем не менее, с реально существующей ситуацией микробиологу надо считаться и строго следовать установленным правилам. Но и понимать, с чем имеешь дело, тоже надо. А чтобы понимать, следует ясно представлять себе, откуда берутся эти «табличные данные» — критерии чувствительности (или устойчивости) микроба.

Тут мы подходим к такому важнейшему понятию, как *break-point*. С английского его можно перевести как «точка отсчета», «точка перехода», «критическая концентрация» и т. п. Дело не в переводе, а в том, что речь идет о важнейшем критерии. От этой точки начинается отсчет: по одну ее сторону микробы чувствительны, по другую — устойчивы. Для определенной пары — антибиотик/микроб могут быть две точки (две *break-points*): все показатели до первой точки — микроб чувствителен. Поле второй — микроб устойчив, а те, что между первой и второй точкой — микроб промежуточен по чувствительности. Очевидно, что *break-point* это подавляющие концентрации, измеряют их в ЕД или мкг/мл. Пытались (и не раз) представить эти точки отсчета в мм, т. е. как диаметр зоны подавления роста. Однако большинство исследователей (и автор в том числе) считает, что называть диаметр зоны

подавления роста микроба «точкой отсчета» не корректно: и потому, что диаметр зоны это только отражение подавляющей концентрации, и потому, что он всего лишь качественный (а не количественный, как МПК) показатель и, наконец, что особенно важно, он плохо укладывается в схему установления break-point.

Итак, как же определяют этот показатель, этот критерий чувствительности. Попробуем представить процесс как пошаговую схему (хотя обычно многое делается параллельно). Все начинается с поиска ответа на вопрос: сколько нужно исследуемого антибиотика, чтобы прекратить рост микробов определенных родов и видов. Определяют МПК для многих и многих штаммов микроорганизмов разных таксономических групп. По некоторым стандартам их должно быть около 150 одного вида (рода), не менее (естественно, что чем больше, тем лучше). Учитывают и литературные данные. В сумме накапливается довольно большая информация, которая позволяет говорить, что для большинства штаммов одного вида или одного рода микроорганизмов подавляющие концентрации конкретного антибиотика лежат в таких-то пределах. Для подавления репродукции популяции микроба, как правило, достаточно антибиотика в такой-то концентрации (-яx). Первый шаг сделан. Если бы определялась т.н. «микробиологическая чувствительность», которая фиксирует некую абстрактную, не приложимую к человеку величину, на этом можно было бы поставить точку. Но ведется поиск не просто подавляющей микроб концентрации, а концентрации, которая бы обеспечивала лечебный эффект, т.е. такой, которая подавляла бы размножение микроба в организме больного (а не в пробирке). Поэтому второй этап определения break-point предполагает сопоставление полученных данных с результатами изучения фармакокинетики антибиотика в организме человека и животного. Нужно реально представлять себе, сколько антибиотика может быть в крови и тканях, когда антибиотик вводят в организм человека, причем обязательно в такой дозе, которая была бы безопасна для человека, которая не привела бы к проявлениям повреждающего действия лекарства на макроорганизм. Сопоставляемые концентрации в крови и тканях человека должны быть для него безопасны (а для этого надо предварительно установить, какие опасны). Таким образом, для установления точек отсчета, установления break-point, необходимы не только фармакокинетические, но и фармакологические данные. Все в равной степени важно, весь комплекс клинической информации.