

М. С. Поляк

**ЛАБОРАТОРНОЕ
ОБЕСПЕЧЕНИЕ
АНТИБИОТИКОТЕРАПИИ**

Санкт-Петербург
ООО «Анатолия»
2012

УДК 615.33
П 54

Автор:
Поляк Марк Соломонович — доктор мед. наук, профессор

Научный редактор:
В. И. Сухаревич — доктор биол. наук, профессор

Поляк М. С.

П 54 Лабораторное обеспечение антибиотикотерапии. — СПб.:
ООО «Анатолия», 2012. — 256 с., илл.

ISBN 978-5-7452-0047-2

Книга является важным дополнением к ранее опубликованной автором монографии «Антибиотикотерапия. Теория и практика». В новом издании рассматриваются лабораторные методы, результаты применения которых способны существенно расширить основания для правильного выбора антимикробного лекарственного средства, его дозы и пути введения в организм, особенно при терапии больных с тяжелой патологией инфекционной природы. Акцент сделан на методологии, которая доступна любой микробиологической службе лечебного учреждения. Среди рассматриваемых методически приемов определение чувствительности микроорганизмов к бактерицидному (летальному) и сочетанному действию антибиотиков, определение активности бета-лактамаз грамотрицательных бактерий, в т.ч. не улавливаемой стандартными методами анализа, определение чувствительности к антибиотикам облигатно анаэробных бактерий и др.

Книга предназначена для клинических микробиологов, клинических фармакологов и врачей, интересующихся лабораторным обеспечением определения лечебного потенциала антимикробных лекарственных средств.

ISBN 978-5-7452-0047-2

© Поляк М. С., 2012
© ООО «Анатолия», 2012

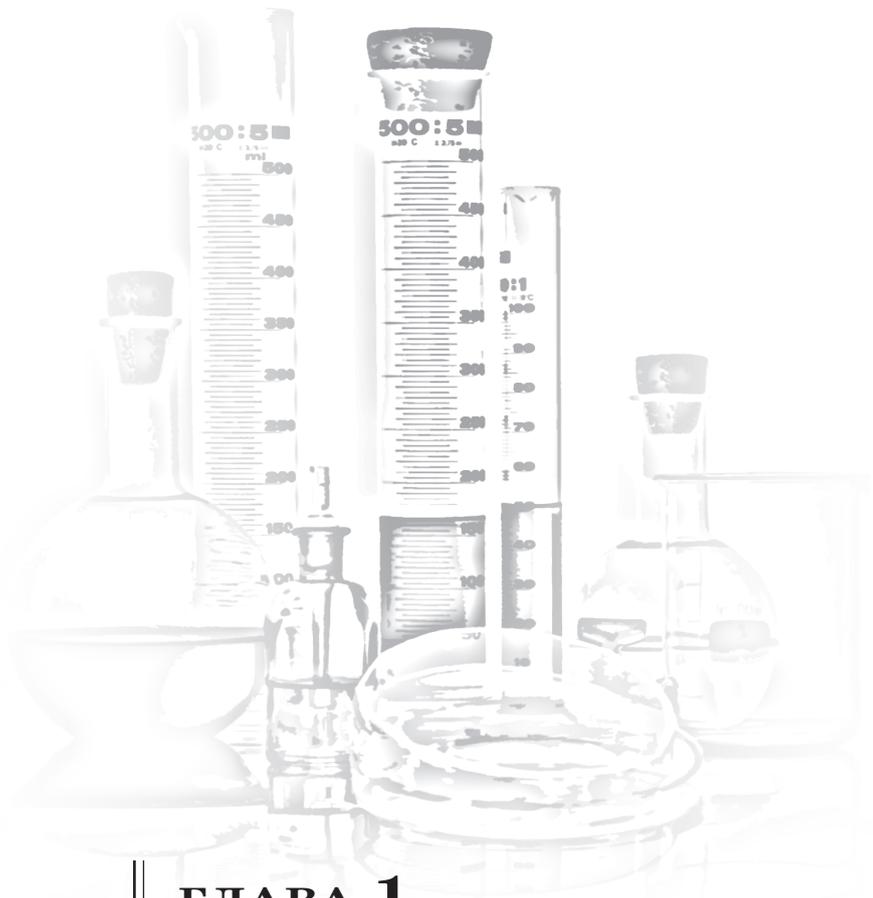
ПРЕДИСЛОВИЕ

Эту книгу автор рассматривает как необходимое дополнение к предшествующему изданию (Антибиотикотерапия. Теория и практика. С.-Пб., 2010 г.). В нем декларировалась необходимость повышения роли микробиологической службы в лечебном процессе и, прежде всего, тогда, когда речь идет о тяжелой патологии микробной природы. Микробиолог обязан предоставить лечащему врачу максимально возможную информацию о возбудителе и его чувствительности к антимикробным препаратам, а клиницист — использовать ее для оптимизации выбора антибиотического препарата или сочетания антимикробных средств, а также дозы и пути введения лекарства в организм больного. За редким исключением в отечественной практике принято ограничиваться определением чувствительности микроба к антибиотикам, т. е. возможности достижения бактериостатического действия препарата на возбудитель. При этом наиболее часто (а во многих клинических учреждениях исключительно) прибегают только к диск-диффузионному методу определения этого показателя. В принципиальном плане подобный критерий оценки и методология его определения возражений не вызывают. Для них есть свои показания. Но очевидно, что информация, получаемая таким образом, лимитирована. Она достаточна, когда заболевание не угрожает жизни больного, не ведет к его инвалидизации. Но она может быть недостаточной, если антибиотикотерапия призвана решить вопрос о жизни и смерти человека, о тяжелых последствиях, к которым патология способна привести. В этих случаях необходимо углубленное изучение микроба, а оно осуществляется иными методами. Поэтому в книге рассматривается определение чувствительности возбудителя к летальному (бактерицидному) действию антибиотиков и к сочетанному действию препаратов. Приводятся методы выявления такой устойчивости бактерий к бета-лактамам антибиотикам, которая обычными микробиологическими приемами выявляется далеко не всегда. Характеризуются методы работы с облигатно анаэробными бактериями, чувствительность к антибиотикам которых имеет ряд

существенных особенностей. Эти и другие методики не привлекли должного внимания отечественной микробиологической службы, к тому же запрос на результаты их использования со стороны лечащих врачей минимален, большей частью из-за недостаточного знакомства с высокой клинической значимостью таких исследований.

Приведенными в книге методами лабораторного обеспечения противомикробной терапии, их круг далеко не исчерпывается. Отобраны только те, которые могут в той или иной степени считаться устоявшимися, стандартными. А также (и это особенно важно) критерием целесообразности их описания является техническая доступность: все приведенные в книге методики могут быть использованы микробиологической лабораторией практически любого медицинского учреждения.

Автор не считал целесообразным и корректным приводить те методы определения чувствительности микроорганизмов к антибиотикам, которые даны в отечественных МУК. Это утвержденный и, по сути, обязательный документ. В этом издании даны только детализация некоторых этапов исследования и комментарии общего плана, не вошедшие в официальный документ.



ГЛАВА 1.

**ПРОБЛЕМЫ АНТИБИОТИКОТЕРАПИИ:
ПОЧЕМУ РОЛЬ МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОЙ СЛУЖБЫ
ДОЛЖНА РАСТИ (вместо введения)**

В наше время никому не надо доказывать, что антибиотикотерапия является важнейшим компонентом борьбы с бактериальными и грибными инфекциями. Она стала традиционной и (что вряд ли является положительным) обыденной. Врачу сегодня трудно представить себе, какими грозными были 60–70 лет тому назад многие инфекции. Они вызывали тогда такую же тревогу и у больного, и у врача, какую сегодня вызывают онкопатология или тяжелые сердечнососудистые заболевания. И это не удивительно: инфекции в те времена прочно занимали первое место среди причин летальных исходов. Подчеркнем, в данном случае речь идет не о вирусных заболеваниях, а о бактериальных и грибных инфекциях. Сегодня медицина располагает относительно длинным списком противобактериальных и противогрибных лекарственных средств. Эти препараты очень разные. Они отличаются друг от друга по многим параметрам [12, 16, 17]: по спектру противомикробного действия, по распространенности устойчивых к ним микроорганизмов; антимикробные соединения очень различны по повреждающему действию на человека и по фармакокинетическим свойствам, т. е. по способности поддерживать достаточные, как принято говорить, «лечебные» концентрации в организме человека в целом и пораженных тканях в частности.

Казалось бы, медицина хорошо вооружена, когда речь идет о бактериальных и грибных инфекциях. Но возникает закономерный вопрос, почему в медицинской литературе (по преимуществу зарубежной) все чаще и чаще звучит тревога за судьбу антибиотиков, за будущее противомикробной терапии [41, 65, 68, 75, 114, 181]; почему в ряде стран парламентарии создают комиссии и комитеты, рассматривающие эту проблему, причем в эти структуры входят наиболее авторитетные политики (в т. ч. сегодняшний президент США в его бытность сенатором) [181].

Тем не менее, предпринимаемые меры специалисты считают недостаточными и малоэффективными [34, 181]. Парадокс заклю-

чается в том, что чем больше изучают антибиотики, механизмы их действия на микроб и контрмеханизмы защиты микробов от действия антимикробных препаратов, тем чаще приходится убеждаться в том, что их многообразие и сложность способны прямым образом влиять на эффективность лечебного процесса, на эффективность противомикробной терапии. Постичь результаты такого взаимодействия очень часто лабораторная служба не может, но, не менее часто, даже при наличии такой возможности, это не стало потребностью, практикой, не является сферой интересов ни клиницистов, ни лаборантов.

Какие же проблемы выделяют? Попробуем кратко остановиться лишь на наиболее остро обсуждаемых.

Первая и наиболее очевидная — рост числа антибиотикоустойчивых штаммов большинства возбудителей инфекционных заболеваний [27, 68, 83, 95, 103, 139]. Это общемировая и наиболее часто дискутируемая тенденция, причем, что необходимо подчеркнуть, именно тенденция. В разные промежутки времени и в разных регионах число резистентных штаммов может меняться, причем не только в сторону увеличения, но и уменьшения [128]. Многое зависит от продуманности политики в утилизации антибиотиков тех или иных групп, интенсивности использования отдельных антибиотиков, свойств самих антибиотиков. Обычно, когда говорят об антибиотикорезистентности, имеют в виду феномен, определяемый такими «традиционными» механизмами, как образование ферментов, разрушающих или трансформирующих молекулу антимикробного препарата (бета-лактамазы, аминогликозидтрансферазы и др.), модификация клеточных структур-мишеней для антибиотиков и нек. др. [12]. Обратим внимание на то, что эта устойчивость определяется т.н. классическими методами (серийных разведений, дисков, Е-тестом). Однако, в последние годы серьезное внимание привлекла резистентность бактерий к антимикробным препаратам, механизм которой иной, и, что важно, эта устойчивость часто не улавливается при тестировании с использованием т.н. традиционных методов. Это вторая и очень тревожная проблема, которая на сегодняшний день нашла лишь частичное решение. Впервые такая устойчивость была описана давно, в шестидесятые годы прошлого столетия, когда микробиологи столкнулись с т.н. эффектом переживания (персистенции) бактерий в силу изменения их метаболической активности. Сегодня «персистенция» имеет ряд вариантов, между которыми не всегда возможно уловить раз-

ницу: это т. н. малые колонии, адаптивная устойчивость, фенотипическая устойчивость, эффект больших концентраций и нек. др. [35, 66, 113, 176, 195, 202]. Во всех случаях речь идет о способности части клеток популяции возбудителя пережить антибиотическую атаку за счет, образно говоря, «впадения в спячку» — изменения метаболических процессов в клетке, делающей ее нечувствительной к антибиотику. По завершению этой «атаки» активность клетки восстанавливается. Об этом необходимо упомянуть в данном издании, прежде всего потому, что установить подобную устойчивость традиционными методами невозможно. Ее изучают специальными, порой методически спорными приемами и это удел исследовательских, а не клинических лабораторий. К проблеме «персистенции» бактерий тесно примыкает еще один механизм устойчивости микроорганизмов (и бактерий, и грибов) к противомикробным средствам — это образование т. н. биопленок [59, 93, 125]. Некоторые авторы просто относят биопленки к феномену персистенции. Суть его заключается в том, что микробная популяция, сталкиваясь с неблагоприятным воздействием внешних факторов, в том числе с действием препаратов, образует полисахаридную структуру, защищающую клетки. Эта «полимерная крепость» на определенной стадии является достаточно ригидным и плохо преодолеваемым барьером для лекарственных средств. Как полагают, сами микробы в биопленке метаболически менее активны. Все это вместе взятое делает микроб менее чувствительным к антибиотикам. Однако, посев таких микроорганизмов на питательные среды возвращает их к исходному состоянию, в том числе и по чувствительности к антибиотикам. Образование биопленок, это удел вегетации микроба *in vivo*. Стандартных методов витральных исследований чувствительности бактерий в биопленках к антибиотикам, доступных клиническим лабораториям лечебных учреждений, нет.

Многообразие механизмов защиты микробов от повреждающего действия бета-лактамовых антибиотиков иллюстрирует их способность образовывать ферменты, гидролизующие бета-лактамовое кольцо [42]. Число таких гидролаз неуклонно увеличивается. Эти бета-лактамазы различны и по структуре, и по активности в отношении отдельных групп бета-лактамовых (пенициллинов, пенициллиназоустойчивых пенициллинов, цефалоспоринов, монобактамов, карбапенемов), и по чувствительности к ингибиторам (в том числе имеющих значение для лечебного процесса). Эти вопросы обсуждаются в специальной главе данной книги. Сегодня трудно дать ис-

черпывающий ответ на вопрос, являются ли эти новые ферменты результатом мутационных процессов, то есть действительно новыми, или их синтез запрограммирован в геноме микробной клетки бактерий и речь идет об их активации, которая вызвана воздействием соответствующих структур (антибиотиков-депрессоров). В плане обсуждаемой в данном издании проблемы главное заключается в том, что номенклатура бета-лактамаз растет по мере использования в клинике новых групп бета-лактамных антибиотиков, что их синтез делает микроб защищенным от действия бета-лактамов и что традиционные методы определения чувствительности далеко не всегда решают проблему установления резистентности микроба к антибиотикам, вызванной такими ферментами. Более того, технически это не всегда возможно, во всяком случае, теми методами, которые доступны микробиологам лечебных учреждений. Применительно к таким группам ферментов, как бета-лактамазы расширенного спектра (БЛРС), как AmpC-бета-лактамазы и карбапенемазы (металло-бета-лактамазы) это все же достижимо, и далее, в специальной главе, методология их выявления приведена. Для БЛРС даны дополнительные приемы их выявления с учетом существующих рекомендаций в МУК [9].

Проблема устойчивости грамотрицательных бактерий к бета-лактамным антибиотикам, механизм которой связан с образованием бета-лактамаз, видимо, уместно связать с таким тревожащим явлением, как полирезистентность этой группы микроорганизмов. Она неизменно привлекает внимание вот уже много лет, причем последние годы не исключение. При этом речь идет о микроорганизмах самой разной таксономической принадлежности: это и семейство *Enterobacteriaceae*, и т. н. неферментирующие бактерии, и группа НАСЕК и др. [69, 106, 110, 147, 149, 174]. Опасения вызывают резистентность и к «старым», и к относительно новым группам противомикробных препаратов (например, фторхинолонам и карбапенемам) и, в целом сужающийся круг препаратов, которые можно использовать при инфекциях, вызванных грамотрицательными бактериями [38, 71, 130, 160, 187]. Подчеркивается, что распространение устойчивости явно (и существенно) опережает создание новых эффективных противомикробных средств [187]. Особенно это относится к проблеме терапии инфекций, вызванных палочками синезеленого гноя [69, 130, 139, 140]. Единственно, что можно отметить в плане той тематики, которой посвящена эта книга, это то, что традиционные методы определения чувствитель-

ности к антибиотикам грамотрицательных бактерий, как правило, пригодны. А вот критерии чувствительности для многих представителей этой группы микроорганизмов отсутствуют или требуют уточнения. Процесс пересмотра критериев чувствительности («табличных показателей») идет, но к сожалению без участия отечественных специалистов.

К проблемам устойчивости отдельных родов микроорганизмов к антибиотикам (помимо образования грамотрицательными бактериями бета-лактамаз), которые активно обсуждаются, причем не одно десятилетие, относятся т. н. «метициллинрезистентность» стафилококков (в первую очередь *S. aureus*), ванкомицинрезистентность энтерококков и множественная устойчивость пневмококков, которую иногда принято трактовать через пенициллинрезистентность.

Казалось бы «метициллинрезистентность» стафилококков проблема настолько давняя, что вполне можно было бы ее закрыть. Тем не менее, она остается и, что важно, приобретает новые черты. «Метициллинрезистентность» — это общая характеристика (с не самым удачным термином) полирезистентности микроорганизма, прежде всего, ко всем бета-лактамным антибиотикам. Установив ее, микробиолог тем самым исключает применение всех трех групп бета-лактамов, обладающих противостафилококковым действием (пенициллинов, цефалоспоринов, карбапенемов). Заодно предполагается вероятная устойчивость штамма к макролидам и аминогликозидам, а также, нередко, к большинству других антибиотиков, кроме гликопептидных препаратов, фосфомицина и нек. т. н. «новых», о чем далее [40, 53, 95, 186]. Поэтому решение этой задачи видели в поиске таких антибиотиков, которые были бы активны в отношении «метициллинрезистентных» стафилококков. Ванкомицин считали и с оговорками считают и ныне наиболее перспективным и доступным. Одновременно решалась и решается проблема выявления «метициллинрезистентных» стафилококков микробиологами [18, 117, 135]. Все эти вместе взятые усилия определяются тем общепризнанным фактом, что «метициллинрезистентность» стафилококков безусловно негативно влияет на эффективность бета-лактамов при инфекциях, вызванных таким микробом, а раз так, то бета-лактамные антибиотики должны быть исключены из лечебного процесса. Это декларируется достаточно категорично [53, 72, 166, 186]. Однако, применительно к деятельности микробиологической службы следует обратить внимание на два обстоятельства, отражающих результаты исследований последнего десятилетия

тия. «Метициллинрезистентные» стафилококки — группа отнюдь не однородная; она включает в себя культуры разные не только по чувствительности к антибиотикам (и не только бета-лактамной структуры), но и по механизму резистентности, по патогенности и вирулентности. В частности, особую разновидность представляют собой госпитальные штаммы «метициллинрезистентных» стафилококков. Они чувствительны, как правило, к узкому кругу антимикробных препаратов, а степень их резистентности к пенициллинам, цефалоспорином, тетрациклинам, макролидам и аминогликозидам заметно большая, чем у «метициллинрезистентных» стафилококков иного происхождения. Но есть еще один очень чувствительный момент, на котором настаивают некоторые исследователи. Доказывают, что «метициллинрезистентность» госпитальных штаммов стафилококков рекомендуемыми методами не улавливается; те методики, что приведены в методических документах, пригодны только когда «метициллинрезистентные» стафилококки принадлежат к негоспитальным штаммам. При этом тяжесть патологии не имеет значения. Она может быть значительной, вызванной высоковирулентным штаммом. Но при этом у вновь поступившего в стационар крайне тяжелого больного «метициллинрезистентность» возбудителя будет иной (в том числе выявляемой), чем у менее тяжелого пациента, но пораженного госпитальным штаммом, чью «метициллинрезистентность» не удастся установить. Микробиолог, выделив стафилококк от больного, как правило взрослого, не ребенка, пребывающего определенный период времени на больничной койке, с патологией, явно стафилококковой природы (поражением кожи и мягких тканей, сепсис, остеомиелит, внутрибольничная пневмония, осложнившая послеоперационный период или иную патологию и т. п.) и, что особенно важно, с множественной устойчивостью к антибиотикам разных групп, имеет право считать штамм «метициллинрезистентным» вне зависимости от результатов тестирования на эту характеристику. А это в свою очередь предполагает необходимость определения чувствительности микроба к определенной группе противостафилококковых антибиотиков, не бета-лактамов. Среди них те, что нашли клиническое применение в нашей стране: ванкомицин, линезолид [21, 82, 94, 180] и те препараты, опыт использования которых у нас пока незначителен: даптомицин, тигециклин, телитромицин, миноциклин, цефтобипрол, цефтаролин [23, 32, 36, 64, 116, 134, 152, 162, 185, 197]. Впрочем, целесообразность применения двух последних при ин-

фекциях, вызванных госпитальными штаммами стафилококков, еще требует подтверждения, хотя сами препараты интересны как первые бета-лактамы антибиотики (цефалоспорины), активные в отношении «метициллинрезистентных» стафилококков. В последние годы ситуация осложнилась еще больше в связи с появлением штаммов стафилококка, малочувствительных и, даже, устойчивых к ванкомицину [175, 179, 182].

Говоря о «метициллинрезистентности» следует обратить внимание на еще одну сторону проблемы, имеющей прямое отношение к деятельности клинических микробиологов. В некоторых сообщениях, методически достаточно выверенных, обращено внимание на то, что для этих стафилококков МПК бета-лактамов могут меняться мало или просто не изменяться, но, зато, существенно возрастать МБК. Потенциал летального действия антибиотика на микроб резко меняется — бактерицидный препарат переходит в ранг антибиотиков бактериостатического действия. Очевидно, что этот факт имеет, по меньшей мере, два следствия. Хотя микроб формально остается чувствительным к антибиотическому средству, фактически его эффективность при терапии тяжелых инфекций снижается, поскольку у таких больных иммунитет очень часто дефектен. А без него бактериостатическое действие антибиотика на возбудителя недостаточно, остается незавершенным элиминация патогена со всеми вытекающими последствиями для течения заболевания, для его пролонгации. Не менее важной в этой связи представляется существующая практика оценивать чувствительность микроба к антибиотику лишь теми методами, которые дают сведения только о способности (или неспособности) антибиотика прекращать репродукцию микроорганизма. Таков предел возможностей и метода серийных разведений, и, тем более, метода дисков. Для оценки летального (бактерицидного, фунгицидного) действия антимикробных лекарственных средств предложены иные методики. Они дают важную информацию, причем, естественно, не только в случае «метициллинрезистентности» стафилококков, но и при терапии практически любой патологии, если она протекает тяжело или на фоне очевидной иммуносупрессии.

Не менее острой, но более дискуссионной является проблема резистентности к антибиотикам *Streptococcus pneumoniae*. Пневмококки достаточно частый возбудитель многих, в том числе тяжелых инфекций, включая сепсис, поражения костей и мягких тканей, заболеваний носоглотки, мозговых оболочек и мн. др. Особо

подчеркивается его роль в происхождении пневмонии. Многие и многие годы неизменным правилом было применение бензилпенициллина при любой инфекции пневмококковой природы. В его основе было убеждение в том, что возбудитель чувствителен к этому антибиотику. Сомнения возникли с появлением сообщений о постепенном нарастании числа устойчивых к бета-лактамам штаммов пневмококка, в том числе и в первую очередь к бензилпеницилину [4, 30, 101, 105, 111]. В 90-х годах прошлого века в странах Северной Америки и Европы, а затем во многих других регионах земного шара было зафиксировано появление до 20–25 % штаммов пневмококков с МПК более 4 мкг/мл, т. е. резистентных к бензилпеницилину. В последующий период, т. е. в 21 веке, эта тенденция сохранилась [111, 150]. Одновременно было зафиксировано увеличение количества резистентных штаммов пневмококка к еще одной достаточно популярной группе антибиотиков при пневмококковых инфекциях — к т. н. 14-членным макролидам, к эритромицину в первую очередь. В этом случае речь уже шла о 30% устойчивых к антибиотику культур. Впрочем, цифры могли быть и несколько меньшими, и большими, но, в среднем, это не меняло тот факт, что резистентность к пенициллинам и макролидам достигла опасного для терапии порога. К тому же, названными двумя группами антибиотиков проблема не исчерпывалась. Росло число устойчивых штаммов к цефалоспорином I–II поколений, тетрациклинам, триметоприму-сульфаметоксазолу, т. е. к тем антимикробным препаратам, которые привычно рассматривались при пневмококковых инфекциях, как антибиотики резерва [54].

Возникла коллизия, о которой уже упоминалась выше: проблему резистентности *S. pneumoniae* к антимикробным лекарственным средствам можно было трактовать в двух плоскостях: как вопрос о перспективе пенициллинотерапии (т. е. возможно или нет применять самый надежный антибиотик при патологии пневмококковой природы) и как проблему полирезистентности возбудителя, предполагающей применение иных антибиотиков, к которым пневмококк сохранял чувствительность. В этом таилось определенное противоречие, коль скоро потенциал бензилпенициллина рассматривался как базовый. Дискуссия привела к решению, которое автор позволил себе рассматривать как по меньшей мере спорное: использовать при терапии пневмококковых заболеваний, прежде всего воспаления легких, сочетание бензилпенициллина (или другого бета-лактамида) и эритромицина. Сомнение базируется, прежде всего, на

том, что именно резистентность пневмококков к этим антибиотикам (а эта резистентность не имеет тенденции к снижению) и породила саму проблему; зачем же ее удваивать? Есть, безусловно, достаточно активные антимикробные препараты иных групп, в частности фторхинолоны т. н. 4-го поколения (моксифлоксацин, гатифлоксацин и др.), кетолид телитромицин (по сути «близкий родственник» эритромицина и кларитромицина), есть тетрациклины, которые активны в отношении *S. pneumoniae*, устойчивость к ним пневмококков ограничена и, что важно, чья эффективность при пневмококковых заболеваниях доказана в клинике. Но есть и еще один довод, позволяющий обсуждать целесообразность сочетанного применения бензилпенициллина и эритромицина. Автор и на основании обширного литературного материала, и собственных данных убежден в реальности конкурентного действия (антагонизма) между т. н. бактерицидными и бактериостатическими антибиотиками. Верно то, что для его проявления (как и для синергидного действия) нужны определенные условия, что конкурентное действие проявляется не так уж часто. Но оно может быть, оно показано и в витральных исследованиях, и в опытах на животных, т. е. в однотипных, доказательных условиях и, этот фактор врач просто не имеет право сбрасывать со счетов при том, что никакой реальной необходимости в таком сочетании нет. Впрочем, весомой представляется позиция тех и клиницистов, и экспериментаторов, которые не склонны преувеличивать саму проблему устойчивости пневмококков к бензилпенициллину [47, 48, 54, 111]. Ими постулируются два тезиса. Первый: возникновение резистентности пневмококков к пенициллину не связано напрямую с интенсивностью применения этого антибиотика в клинике. Это типично для антимикробных препаратов иных групп (того же эритромицина), но не для пенициллина, когда речь идет об устойчивости к нему *S. pneumoniae*. И второе: степень устойчивости микроба к этому антибиотику не велика. Для этого определили МПК многих штаммов пневмококка, отнесенных к резистентным, и нашли, что подавляющие концентрации балансируют на грани контрольных цифр. Как известно, пенициллины обладают очень низким потенциалом органотропного действия (прямого токсического действия). Это позволяет варьировать дозу бензилпенициллина в широких пределах (и не только его, но и других пенициллинов). Поэтому преодолеть барьер устойчивости, создать концентрацию в крови и многих тканей, в т. ч. легочной, заметно большие, чем т. н. breakpoints, вполне реально. Это и доказы-

вали авторы в своих исследованиях, причем в клинике при терапии больных с пневмококковой пневмонией. Их убеждение — пенициллин остается основным противопневмококковым антибиотиком.

В этой связи представляется уместным обратить внимание на ту роль, которую в этом случае сыграла микробиологическая служба, и на методологию, использованную при тестировании чувствительности возбудителя. И для утверждения бензилпенициллина, чья «жизнь» при пневмококковой инфекции продлена, и для его рационального использования в дальнейшем необходима микробиологическая служба. Более того, диск-диффузионный метод определения чувствительности в этом случае приемлем только тогда, когда пневмококк по формальным признакам чувствителен. Только метод серийных разведений с установлением МПК способен ответить на вопрос — можно или нет использовать бензилпенициллин, несколько увеличив его дозу (а может быть и без этого). Эта же мысль будет подчеркиваться и далее: не следует ограничиваться лишь «методом дисков», его информативность лимитирована. При всех негативных моментах, метод серийных разведений дает более значимую информацию, она первична, она позволяет дать количественную характеристику чувствительности (резистентности) микроба к антимикробному препарату. Результат исследования оставляет и у микробиолога, и у клинициста возможность думать, анализировать, привлекать фармакокинетические данные, обоснованно выбирать дозу и путь введения препарата в организм больного. Естественно, что это имеет отношение не только к терапии пневмококковых процессов.

Проблема устойчивости энтерококков к ванкомицину (ванкомицинрезистентность) в свете перспективы антибиотикотерапии вызванных ими инфекций имеет более драматичные черты, чем приведенная выше полирезистентность пневмококков. Это объясняется достаточно очевидным и хорошо известным фактом: число антибиотиков, активных при энтерококковых инфекциях катастрофически мало и всякое выбывание из их числа лечебного препарата, тем более с бактерицидным потенциалом, ставит перед лечащим врачом почти неразрешимую задачу [16, 17, 44]. Чем лечить? Базовыми антибиотиками для терапии заболеваний, вызванных *E. faecalis* и *E. faecium*, долго считали да и сейчас считают ампициллин и, с оговорками, бензилпенициллин, а также их сочетания с аминогликозидами, которые использовали почти в обязательном порядке. Так было до начала 90-х годов прошлого века, когда был

зафиксирован рост числа энтерококков, устойчивых к пенициллинам. При этом механизм резистентности мог быть различным, связанным и с образованием бета-лактамаз, и с изменением клеточной мишени (пенициллинсвязывающих белков). Удалось проследить очевидное влияние устойчивости микроба к пенициллинам на недостаточную эффективность проводимой терапии, если использовали эти антибиотики. Сочетанное их применение с аминогликозидами лишь частично способствовало преодолению возникшей проблемы. Однако, появление штаммов энтерококков, высокорезистентных к антибиотикам аминогликозидной группы, лишило и такой перспективы. Ванкомицин оказался, по сути, единственным бактерицидным антибиотиком, который позволил при его внутривенном введении и при параллельном использовании гентамицина (внутримышечно или внутривенно) решать проблему антибиотикотерапии энтерококковых инфекций. Но так могло быть только до возникновения ванкомицинрезистентности. Собственно говоря, устойчивость энтерококков к ванкомицину не новость, штаммы, резистентные к антибиотику, были выделены еще двадцать лет назад [44]. Дело не в самом феномене, а в количестве устойчивых культур и в степени резистентности, которые заметно возросли в наше время [87]. Ванкомицинрезистентность это генетически обусловленное явление и она кодируется разными генами. От этого зависит и степень устойчивости, и ее перекрестный характер. Возникает резистентность к другим гликопептидам [44, 76, 121]. Более того, генетический материал может быть передан от одной клетки другой, от энтерококков одного вида клеткам другого. Таким образом, не только селективное давление антибиотикотерапии приводит к устойчивости клеток энтерококка к ванкомицину, но и эпидемический процесс. Известны клетки микроба, устойчивые к 500 и более мкг/мл антибиотика. Причем они могут вегетировать не только у человека, но и животных. Допускается передача резистентных штаммов от животных человеку, и наоборот. Если возникает ситуация, при которой энтерококк, возбудитель процесса, устойчив и к пенициллину, и к ванкомицину, круг антибиотиков, которые могут быть использованы оказывается очень невелик. С одной стороны он включает такие известные лекарственные средства, как доксициклин, линезолид, хлорамфеникол (левомицетин), но их активность должна быть непременно подтверждена тестом на чувствительность к этим антибиотикам возбудителя. Их эффективность не всегда очевидна. Микроб может быть также чувствителен к другим гликопептидам, даптомицину и квинаприс-

тин — дальфопристину [44, 54, 132, 168]. Но с ними отечественные специалисты мало знакомы. Кроме того и к этим антибиотикам энтерококки могут быть резистентны [183]. При энтерококковой инфекции мочевыводящих путей может оказаться активным фурадонин (нитрофурантоин). Обсуждается перспектива применения тигециклина — антибиотика, близкого к тетрациклину.

Какой бы антимикробный препарат не оказался пригодным, во всех случаях очевидна важная роль микробиологического обеспечения антибиотикотерапии энтерококковых заболеваний.

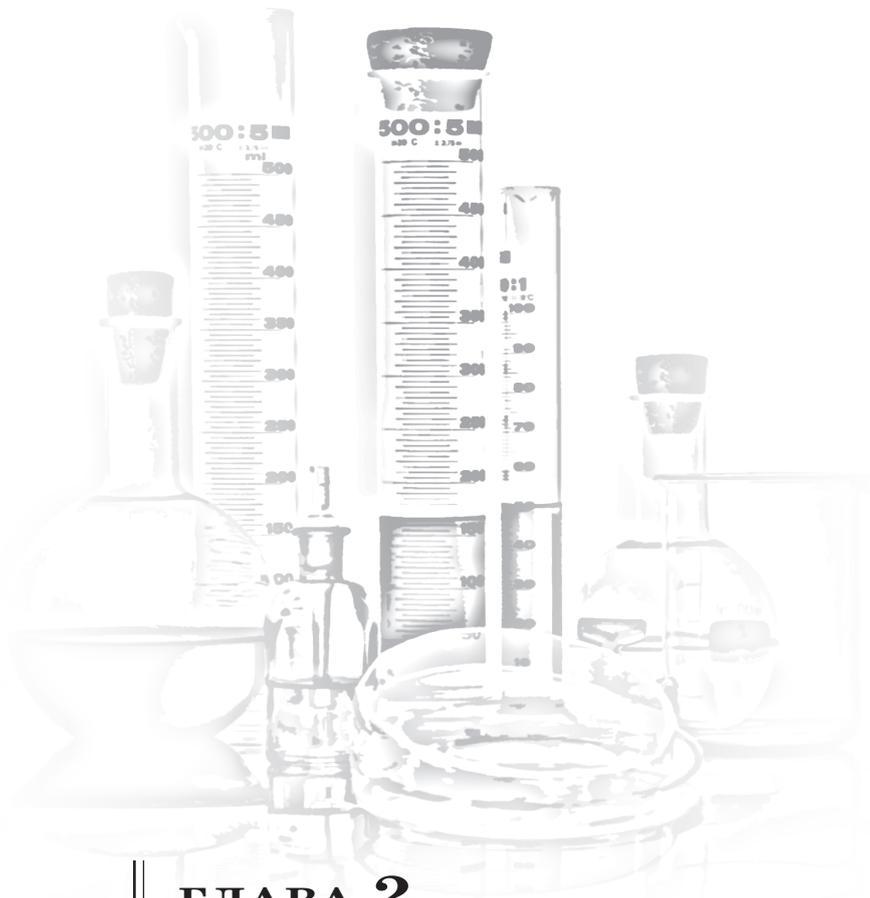
Ванкомицин не самый удобный объект для тестирования чувствительности к нему энтерококков. Антибиотик плохо диффундирует в питательный агар, а малый диаметр зон задержки роста тестируемого микроба может быть источником ошибок, особенно когда речь идет о пограничных величинах, т. е. если надо отличить чувствительный штамм от промежуточного по чувствительности, и промежуточный от резистентного. Исследования, проведенные микробиологами НИЦФ [12, 13, 15], показали, что процесс диффузии ванкомицина из дисков в гель происходит значительно, в несколько раз, медленнее, чем таких антибиотиков, как гентамицин и ампициллин, он многостадийен — можно выделить период увеличения концентрации антибиотика в определенной точке геля, период стабильного поддержания концентрации и, далее, ее убывания. Не менее важный фактор, способный существенно повлиять на точность анализа при пограничных значениях размеров диаметров зон подавления роста энтерококков, это отсутствие параллелизма в зависимости «концентрация — размер зоны» при тестировании различных штаммов рода энтерококков. Это обстоятельство не учитывается при определении break-points, хотя оно имеет весьма большое значение для сравнимости получаемых результатов. Все эти данные, вместе взятые, позволяют считать, что в любом спорном случае, когда размеры диаметра зон подавления роста микроба вокруг диска с ванкомицином близки к контрольным, и, тем более, когда речь идет о помощи больному с тяжелым вариантом энтерококковой инфекции, следует шире прибегать к методу серийных разведений. Ныне существующие критерии чувствительности-резистентности, устанавливаемые этим методом $\leq 4-8-16-\geq 32$ мкг/мл, достаточно широкие по диапазону, дают более точную информацию, чем диск-диффузионный метод.

И еще одна рекомендация, которая представляется рациональной применительно к тестированию энтерококков. Как уже

подчеркивалось, терапия выраженной патологии энтерококковой природы предполагает применение комбинации антибиотиков; это или сочетание ампициллина (бензилпенициллина) с гентамицином (стрептомицином) или сочетание ванкомицина с гентамицином. Как хорошо известно микробиологам, пользующимся методической документацией, о рациональности сочетания предложено судить по одному признаку — отсутствует или нет высокая резистентность штамма энтерококка к аминогликозидам (т. е. к гентамицину и стрептомицину). Если отсутствует, то они пригодны для сочетанного применения с пенициллинами или ванкомицином, если нет, энтерококк высокоустойчив к аминогликозидам, то применение сочетаний бесполезно (а с учетом повреждающего действия этих антибиотиков на человека даже вредно). О том, что подобная информация носит достаточно условный характер, говорить не приходится: и высокие концентрации аминогликозидов в дисках, и очень высокие для метода серийных разведений явно спорны. В этой связи уместно напомнить отечественным микробиологам о наличии методологии оценки чувствительности микроорганизмов к сочетанному действию антимикробных препаратов. Их, по меньшей мере, две из числа тех, чья технология проведения исследования вошла в методические рекомендации. Одна из этих методик (т. н. «перекрестного титрования» или «шахматной доски») представляется несложной, информативной и доступной любой микробиологической лаборатории клинических учреждений. Обе основные методики определения сочетанного действия антибиотиков на микроб приведены в данном издании. Подчеркнем еще раз, эта рекомендация, прибегать к такому тестированию, не касается «обычных», «стандартных» случаев протекания энтерококковой инфекции. Но если вспомнить, что энтерококк один из основных возбудителей эндокардита, что он причина сепсиса, абдоминальных (хирургических) инфекций, тяжелых заболеваний мочеполового тракта, то основания для разностороннего определения чувствительности микроба к сочетанию антибиотиков — это реальность, причем очень и очень весомая.

Заслуживает краткого упоминания еще одна проблема, которая, казалось бы, не относится прямо к деятельности медицинской службы, но она самым непосредственным образом влияет на ситуацию с антибиотиками и антибиотикотерапией. Более того, речь идет о факторе, заставляющем врачей, и клиницистов, и лаборантов, задуматься об их роли в сохранении противомикробной

терапии на том уровне эффективности, который достигнут сегодня (хотя бы). Речь идет о том, что в последние годы поиск и внедрение в практику новых противобактериальных и противогрибных препаратов по сути приблизились к очень опасной отметке. Каждый новый препарат и редок, и очень дорог (можно сказать — слишком дорог). И при этом из того, что находят, трудно назвать какое-либо новое соединение, которое бы внесло что-то значительное в эффективность лечебного процесса: прорывных антибиотиков уже давно нет. И то, и другое (цена создания нового соединения, низкая результативность поиска) побудили многие фармацевтические фирмы ограничить или, даже, отказаться от этого направления их деятельности. Стало невыгодно. Куда заманчивее выбрасывать на аптечный рынок препараты для борьбы с сердечнососудистыми или онкологическими заболеваниями, которыми лечат многие месяцы, а то и годы (а следовательно и потребный объем выпуска велик) и которые, как правило, обеспечивают лишь частичный эффект (что означает возможность перманентно пополнять номенклатуру однотипных лекарств). В ряде стран это тревожная ситуация активно обсуждается. Остается надеяться, что государственные структуры найдут способ побудить создателей лекарственных средств уделить проблеме поиска противомикробных (противобактериальных и противогрибных) препаратов большее внимание. В противном случае сочетание растущей устойчивости бактерий и грибов, возбудителей заболеваний человека и животных, к антибиотикам и отсутствие новых противомикробных лекарственных достаточно эффективных средств способно, действительно, отбросить человечество на сто лет назад, пусть даже частично. А это катастрофа. Помнить об этом врачам стоит хотя бы для того, чтобы каждый на своем месте делал все, дабы предупредить такое развитие событий. Надежное и углубленное обеспечение лечебного процесса лабораторными данными, системное участие микробиологической службы в изучении эпидемиологии резистентности, — из числа важнейших элементов сохранения потенциала антимикробных лекарственных средств и в наше время, и в будущем.



ГЛАВА 2.

**КЛИНИЧЕСКАЯ ЗНАЧИМОСТЬ И ОПРЕДЕЛЕНИЕ
МИНИМАЛЬНОЙ БАКТЕРИЦИДНОЙ КОНЦЕНТРАЦИИ
(ЛЕТАЛЬНОГО ДЕЙСТВИЯ) АНТИБИОТИКОВ**

Минимальной бактерицидной концентрацией (МБК) или минимальной летальной концентрацией (как принято за рубежом) называют то наименьшее количество антибиотика, которое подавляет жизнеспособность 99,9% клеток инокулюма в витральных исследованиях. Обратим внимание на несколько принципиальных моментов. Во-первых, как очевидно, речь идет о способности антимикробного вещества убивать микроб. Не подавлять его репродукцию, а именно лишать микроб возможности пережить антибиотическую атаку с последующим восстановлением его физиологической активности, в частности, патогенности. Почему это важно, чуть ниже. Во-вторых, что имеет большое значение для понимания сути методики, речь идет о бактерицидном действии на инокулюм. Это существенная оговорка, коль скоро она определяет детали тестирования, несколько осложняющие процедуру определения МБК (о чем тоже далее). Наконец, обсуждается именно лабораторное «пробирочное», исследование, т. е. такой анализ, который может и должен осуществляться в любой микробиологической лаборатории клинического учреждения, если только последнее (клиника) оказывает помощь тяжелым больным с инфекционной патологией.

Определение бактерицидного действия антибиотиков (и их сочетаний) в обыденной жизни микробиологических лабораторий не является частым исследованием (если говорить о мировой практике в целом). Но, тем не менее, при наличии показаний оно осуществляется. Без особого преувеличения можно сказать, что отечественная микробиологическая служба это исследование, как правило, игнорирует. А вот с этим согласиться трудно, потому что есть такие клинические ситуации, такие патологические состояния, когда лечить больного с учетом бактерицидного потенциала антимикробного препарата является полезным (по меньшей мере).

И лечащие врачи, и клинические микробиологи не так редко, как хотелось бы, сталкиваются с тем, что антибиотик, выбранный для терапии с учетом чувствительности к нему микроба-возбуди-

теля, тем не менее оказывается недостаточно эффективным или полностью неэффективным с вытекающими отсюда драматическими последствиями для больного. Среди ряда причин (а их, к сожалению, достаточно) [12, 171, 184] важное место занимает отсутствие бактерицидного действия. Оно традиционным определением чувствительности микроба к антибиотикам не улавливается. В то же время при ряде заболеваний бактерицидное действие является очень и очень нужным, а может быть даже решающим фактором для достижения лечебного эффекта.

Современная антибиотикотерапия в большинстве случаев осуществляется таким образом, что ее действие реализуется преимущественно за счет бактериостатического эффекта. Антимикробный препарат подавляет рост микробной популяции, не дает ей увеличиваться. Значительная часть клеток возбудителя при этом гибнет, а остальных «добивают» собственные факторы защиты больного, то, что принято называть факторами иммунитета. В значительной части случаев этого вполне достаточно и больной благополучно преодолевает болезнь. Но это, как известно, бывает не всегда. По сути, синергидное действие антимикробного соединения и защитных сил макроорганизма достижимо только тогда, когда оба механизма полноценны. Выверенное дозирование, грамотный учет чувствительности возбудителя к назначаемому препарату позволяют обеспечить эффективность первой половины тандема. У врача есть объективная возможность быть в той или иной степени точным. А вот как быть с факторами иммунитета? Как, каким образом грамотно оценить их потенциал? Вот тут вопросов больше, чем ответов. Особенно, когда речь идет о рядовом лечебном учреждении. Справедливо обращают внимание на нейтропению — этот показатель, безусловно, дает основание говорить о неблагоприятии с иммунными механизмами защиты больного. А вот иных, доступных, методически простых в получении критериев, таких, которые можно использовать в любой больнице и обеспечивать при этом надежную информацию, фактически нет. Могут (и вполне справедливо) указать на роль анамнестических данных. Больные, которые ранее получали цитотоксичные препараты, подвергались по любой причине лучевой терапии или оказались в зоне повышенной радиации, перенесли тяжелое длительно текущее заболевание, длительно находились в тяжелых условиях существования и т. д. всегда или почти всегда в той или иной мере имеют функционально неполноценный иммунитет. Но достаточ-

но часто любой врач сталкивается с таким течением заболевания, с такой патологией, когда есть все основания полагать сниженную сопротивляемость макроорганизма, но, какова ее степень, какова причина, как этот фактор влияет на прогноз течения инфекционной патологии, остается судить только очень и очень приблизительно. Что греха таить. Сплошь и рядом врач об этом не думает или, лучше сказать, лишен возможности думать, потому что объективных данных о состоянии иммунитета у него нет, а получить их или невозможно, или для этого требуется слишком много времени. А если, даже, и получит, то, как ими распорядиться, что использовать для коррекции иммунитета? И вот в этой ситуации, и быстрее, и надежнее использовать не просто терапевтический потенциал антибиотиков, а возможность достижения с помощью противомикробных препаратов гибели патогена, т. е. бактерицидного действия. Это далеко не простая задача, но ее решение реально, в том числе с помощью лабораторной службы.

Так как же можно обеспечить бактерицидное действие антибиотиков (или их сочетаний)? Есть две возможности, традиционные для противомикробной терапии: эмпирическая терапия с применением т. н. бактерицидных антибиотиков и лабораторно обоснованное лечение препаратом (препаратами), к бактерицидному действию которого (которых) возбудитель чувствителен.

Разделение антибиотиков на бактерицидные и бактериостатические получило широкое распространение. К первым относят пенициллины, цефалоспорины, карбапенемы (т. е. все бета-лактамы), аминогликозиды, фторхинолоны, гликопептиды. Ко вторым — макролиды, тетрациклины, фосфомицин и нек. др. [16, 17, 22, 63]. Полагают, что к бактерицидным препаратам относятся те, у которых различие между минимальной подавляющей концентрацией (МПК) и минимальной бактерицидной (летальной) концентрацией (МБК) не более 2–4-х кратное. Зачастую существующими методами их определения различия просто не улавливаются, МПК и МБК совпадают. Иное дело бактериостатические антибиотики; при соответствующем тестировании различие между МПК и МБК может быть и 8-и кратным, и 16ти кратным, и, даже большим. Считают, что если возбудитель чувствителен к бактерицидному антибиотику, то в организме человека достигнуть летальной концентрации проще — ведь разница между МПК и МБК не велика. Микроб, в частности, потому и называют чувствительным, что фармакокинетика антибиотика обеспечивает концентрации в крови больного

близкие к МПК или превышающие МПК. Иное дело, когда речь идет о бактериостатическом препарате: различие между МПК и МКБ может быть столь велико, что достичь в организме человека летальных концентраций окажется невозможным. В такой градации, безусловно, есть своя логика. Да и жизнь это подтверждает. Предпочтительный лечебный потенциал пенициллинов у больных с тяжелой инфекцией (при условии, что возбудитель к ним чувствителен), в частности, при сепсисе или эндокардите, сомнений не вызывает. Это тем более так, если учесть возможность широкого дозирования этих антибиотиков в силу их относительно низкого прямого токсического действия, т.е. увеличением дозы создание больших (читай, бактерицидных) концентраций в организме больного реально. Тем не менее, в разделении антибиотиков на бактериостатические и бактерицидные есть немало условного. И тот, и другой эффект (подавляющий и летальный) это функция концентрации действующего начала и экспозиции, а это такие характеристики, которые в организме человека динамичны, переменны. И т.н. бактерицидные антибиотики могут действовать бактериостатически, и т.н. бактериостатические препараты способны подавлять жизнеспособность микробной популяции. Предсказать все это в каждом частном случае трудно, порой невозможно. Поэтому необходимо иметь какую-то объективную информацию. Это и результаты исследования фармакокинетики используемого антибиотика у данного конкретного больного, это и оценка чувствительности возбудителя заболевания к бактерицидному действию применяемого препарата. О последнем и идет речь в данном разделе.

Прежде всего, необходимо сразу же подчеркнуть одно важное обстоятельство, на которое часто в негативном плане ссылаются некоторые микробиологи. Речь идет о, якобы, чрезмерной трудоемкости, сложности исследования. Это не так. Методически определение бактерицидного действия антибиотика на микроб несложно и доступно любой микробиологической лаборатории. Оно не требует ни специального оборудования, ни особых питательных сред или реактивов. Определение чувствительности микроба к бактерицидному действию антибиотика, выполненное в разных лабораториях и с разной целью, показало — это доступное микробиологическое исследование, для которого требуются традиционные навыки и обычные материалы, принятые в повседневной микробиологической практике [61, 136, 169, 190]. Что верно, — оно на один шаг более трудоемко, чем определение чувствитель-

ности «методом дисков». Но и определять этот показатель следует только тогда, когда речь идет о терапии тяжелого инфекционного процесса, причем не просто тяжелого, но и с плохой динамикой. Информация о бактерицидном потенциале антибиотика, кроме того, важна при лечении больных с выраженным подавлением белой крови или иными очевидными и существенными признаками иммунной недостаточности. Это узкий круг больных, для которых выверенная антибиотикотерапия может оказаться единственным шансом на спасение. Имеет ли право микробиолог отказывать в этом шансе больному? Вопрос скорее риторический. Но ведь на практике это так и есть. Подчеркнем еще раз. Определение чувствительности микроба-возбудителя к бактерицидному действию антибиотика — это не рядовой анализ, а элемент тех мероприятий, которые необходимы для лечения больных с тяжелой инфекцией при ее неблагоприятном течении. Вопрос о необходимости такого анализа решают совместно лечащий врач и микробиолог.

Можно выделить два основных метода определения бактерицидной активности: это метод серийных разведений с последующим высевом (метод определения МБК) и определение динамики гибели микроба в среде с антибиотиком (определение кривой гибели микроба) [86, 138, 153, 173]. Есть несколько вариантов этих методологий, которые целесообразно рассмотреть в рамках основного метода. Поскольку речь идет о практическом аспекте проблемы выявления бактерицидности, далее акцент будет сделан на определении МБК, как наиболее доступном для любой микробиологической лаборатории методе.

Поскольку в отечественных методических указаниях по определению чувствительности микроорганизмов к антибиотикам о бактерицидной активности не упоминается, остановимся на методической стороне вопроса подробно, базируясь на международном опыте и практике исследовательской микробиологической службы Санкт-Петербургского (Ленинградского) института антибиотиков.

Определение МБК можно условно разделить на два этапа. Первый — определение МПК в классическом варианте, но с некоторыми отличиями от существующих МУК. Второй этап — использование результатов первого этапа исследования для постановки теста на выявление уже самого МБК (см. схему 2.1). Можно сказать иначе: первый этап, это применение метода серийных разведений в жидкой питательной среде, позволяющий определить МПК, а второй этап — это мерный высеv из пробирок, в которых рост отсутст-

вует, на плотную питательную среду с последующим учетом числа образовавшихся колоний. Вот об этих этапах и пойдет речь. Вначале все традиционно. Выбирается один из двух вариантов метода серийных разведений: метод макроразведений (в обычных микробиологических пробирках) или микроразведений (в планшетах с лунками). Начнем с макроразведений антимиicrobialного вещества в питательной среде. Готовят ряд пробирок от первой до 14-й включительно. Первые 12 — это «рабочие». В них будут разведения антибиотика в питательной среде. Две последние пробирки — контрольные. Одна из них (пусть это будет 14-я) контроль питательной среды на стерильность. В ней не будет ни культуры, ни антибиотика, и роста не должно быть. А 13-я пробирка — это контроль культуры, в ней питательная среда без антибиотика, но инокуляция будет произведена; культура, если она полноценна, должна дать рост.

Основные этапы исследований (схема его дана на рис. 2.1) следующие. Начинают с приготовления раствора антимиicrobialного вещества. Напомним, что исходный раствор в наиболее частом варианте содержит 1280 мкг/мл антибиотика. Почему эта концентрация целесообразна понятно — она позволяет в одной из пробирок рабочего ряда получить 1 мкг/мл (общепринятая, хотя совсем не обязательная, контрольная точка). От нее концентрации расходятся в обе стороны: в большую — 2; 4; 8; 16; 32; 64; 128 мкг/мл и в меньшую 0,5; 0,25; 0,125; 0,06 мкг/мл, итого 12 разведений. Может возникнуть вопрос, зачем так много разведений. Действительно, достаточно часто их может быть меньше. В данном случае приведен максимальный вариант, который может быть необходим при оценке МБК. Такая необходимость может возникнуть при тестировании некоторых микроорганизмов. Например, при определении чувствительности к бактерицидному действию антипсевдомонадных пенициллинов палочки синезеленого гноя.

Следующий этап: разливаем питательную среду по пробиркам. Сразу возникает два принципиальных вопроса: какую среду и сколько. Отечественные МУК для определения МПК рекомендуют бульон Мюллера-Хинтон. Эта питательная среда используется во многих странах, но не везде. Например, согласно требованиям Британского стандарта, рекомендован Изо-Сенситест бульон. Все зависит от того, какие критерии чувствительности используются (какие «табличные» данные контрольных МПК приведены в стандарте той или иной страны), а они оттитрованы на определенной питательной среде. Поскольку в Российских МУК указана жидкая

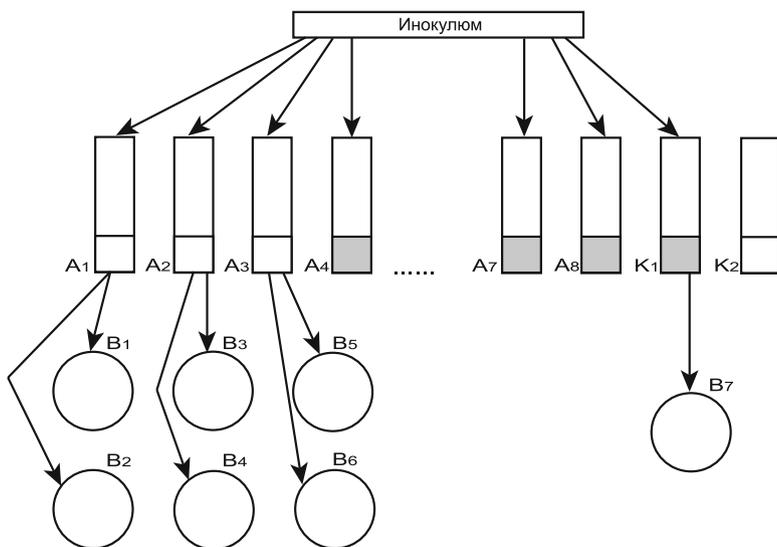


Рис. 2.1. Схема определения минимальной бактерицидной концентрации

Комментарии к рисунку:

A₁; A₂; A₃; A₄;... A₇; A₈ — Пробирки с двукратно убывающими концентрациями антибиотиков.

K₁ — Контроль роста культуры.

K₂ — Контроль стерильности питательной среды.

B₁; B₂; B₃; B₄; B₅; B₆ — Чашки Петри с плотной питательной средой, на которые делают высев из пробирок без видимого роста культуры (A₁; A₂; A₃).

B₇ — Чашка Петри с плотной питательной средой, на которую делают высев из пробирки K₁ для проверки чистоты культуры.

среда Мюллера-Хинтон, остановимся на ней, тем более, что собственных критериев чувствительности (МПК) у нас просто нет, они взяты из зарубежных стандартов, полученных в исследованиях с использованием этой среды.

Теперь к вопросу о том, сколько питательной среды внести в каждую пробирку. Напомним, что для определения МПК (не МБК) отечественные методические указания предлагают следующую схему: в каждой пробирке 0,5 мл бульона, содержащего определенную концентрацию антибиотика, и 0,5 мл взвеси микроба в той же питательной среде. Итого — 1 мл среды на пробирку. Не будем повторять те манипуляции, которые даны в МУК. Остановимся в деталях на рекомендациях, которые предложены в ряде других ме-

тодических документах и которые, по опыту и убеждению автора, приемлемы и удобны в работе (при определении МБК). Итак, в штативе 14 пробирок. Стерильной пипеткой вносим в первую пробирку 1,8 мл жидкой среды Мюллера-Хинтон, а в остальные пробирки со 2-й по 14-ю — по 1 мл среды. В первую пробирку стерильной пипеткой добавляем 0,2 мл раствора антибиотика, содержащего 1280 мкг/мл. Нетрудно обчислить ту концентрацию, которая при этом будет в первой пробирке. Если в 1 мл 1280 мкг антимикробного препарата, то в 0,1 мл будет в десять раз меньше — 128 мкг, а в 0,2 мл — 256 мкг. Но это количество антибиотика добавлено в 1,8 мл среды в первой пробирке. $1,8 + 0,2 \text{ мл} = 2 \text{ мл}$. На 2 мл внесено 256 мкг, значит, в 1 мл — 128 мкг. То, что необходимо для первой пробирки — 128 мкг/мл. Перемешали — покрутили пробирку в ладонях. Это же можно сделать пипеткой, набирая и выливая жидкую среду (всего 3–4 раза). Однако, одно условие — без пузырей, не забирать весь объем, только аккуратное перемешивание. Берем новую стерильную пипетку. Переносим 1 мл среды из первой во вторую пробирку. Перемешиваем. Во второй пробирке уже есть один мл среды. Теперь там 2 мл питательной среды, но из первой пробирки перенесено 128 мкг. Получается на 2 мл 128 мкг, т. е. 64 мкг/мл. Меняем пипетку и переносим из второй пробирки в третью 1 мл среды. Теперь уже в третьей пробирке на 2 мл будет 64 мкг, т. е. 32 мкг/мл. И так до 12-й пробирки включительно: меняем пипетку, переносим 1 мл, аккуратно встряхиваем (перемешиваем). Нетрудно подсчитать, что в 12 пробирке будет 0,06 мкг/мл антибиотика. Из 12-й пробирки забираем 1 мл среды и выливаем ее — не переносим в следующую, а именно выливаем. В 12-й пробирке, как и во всех предыдущих должен быть 1 мл питательной среды с антибиотиком. Выполнен первый этап — приготовлен ряд серийных разведений антибиотика. Пришел черед инокуляции. Надо приготовить взвесь микробных клеток необходимой плотности. Для этого есть несколько приемов. Самый распространенный вариант тот, который, в частности, предусмотрен отечественными МУК при определении МПК. Берется суточная культура микроорганизма на скошенном агаре или на поверхности агара в чашке (в том числе в виде изолированных колоний) и приготавливается взвесь в изотоническом растворе хлорида натрия по стандарту мутности 0,5 McFarland. Одно маленькое, но важное замечание — не следует использовать культуры, давшие рост на селективной или дифференциально-диагностической средах. Это должен быть обычный питательный агар, который в обы-

ходе называют «мясо-пептонным». Главное, чтобы в нем не содержались вещества, способные повлиять на обменные процессы в микробной клетке. В полученной взвеси микроба будет содержаться около 150 млн микробных клеток в мл ($1-2 \cdot 10^8$ КОЕ/мл). Далее отечественные МУК по определению МПК предлагают развести эту взвесь в 100 раз питательным бульоном (1 мл + 99 мл); теперь в 1 мл будет 1–2 млн клеток ($1-2 \cdot 10^6$ КОЕ/мл) и эту взвесь по 0,5 мл вносить в каждую из ряда пробирок с разведением антибиотика по 0,5 мл (0,5 мл раствора антибиотика + 0,5 мл взвеси микроба — в каждой пробирке по 1 мл). Эта предлагаемая отечественным стандартом определения МПК методика может быть воспроизведена и при определении МБК, как этап оценки чувствительности микроба к бактерицидному действию антибиотика. Однако, в свете сказанного выше предлагается иной подход, который принят в практике микробиологов некоторых зарубежных государств и который представляется автору достаточно взвешенным. При его реализации исходят из достаточно весомого посыла: какие клетки используются для инокуляции, живые или мертвые, каково соотношение в инокулируемой взвеси тех и других? Микробиолог, приготавливая взвесь по стандарту мутности, полагает, что эта взвесь содержит живые клетки. Так и написано во всех стандартах, МУК, инструкциях, — $1-2 \cdot 10^8$ КОЕ/мл, если используют стандарт McFarland 0,5. Каждая клетка, будь она посеяна на агаризованную среду, должна дать колонию. Следует возражение критиков — это не так. Суточная культура большинства тех видов микроорганизмов, которые тестируют на чувствительность (для которых есть критерии чувствительности) через сутки давно прошли фазу логарифмического роста популяции и в лучшем случае существует баланс между живыми и погибшими клетками. Это, во-первых. Кроме того, физиологическая активность клеток в этот период роста популяции также прошла свой пик. Говорить о преобладании активных живых клеток во взвеси не приходится. Для установления МБК это не вполне приемлемо. Предлагается методика, которая, действительно, способствует стандартизации инокулюма и которая может оказаться полезной именно при определении МБК, когда важно иметь достаточное количество живых клеток. Заключается она в следующем. Готовят, как обычно, взвесь микроба по стандарту 0,5 McFarland, но не в физиологическом растворе, а в жидкой питательной среде (бульоне Мюллера-Хинтон, если пользуются именно им). Это первый шаг. Теперь, важное отличие. В 1–2 пробирки наливают по 5,0 мл бульо-

на Мюллера-Хинтон, желательно такого, в котором сбалансировано количество ионов кальция и магния. Впрочем, это не строгое пожелание. И вот в эти пробирки с жидкой питательной средой вносят по 0,1 мл микробной взвеси, т. е. делают посев микроба. Если речь идет о нейссериях, гемофильной палочке или иных «капризных» микроорганизмах, можно взять в качестве посевной дозы и 0,2 и 0,3 мл. Главное, чтобы в течение ближайших часов начался рост популяции. Встряхивая, перемешивают культуру, и инкубируют посев при 35–37 °С. Очень желательно, чтобы инкубация шла при постоянном перемешивании, т. е. на качалках, или при периодическом встряхивании пробирок руками (но не до образования пены и пузырей). Уже через 4–6 часов многие микроорганизмы дают видимый рост, который можно сравнить со стандартом мутности 0,5 McFarland. Ни в коем случае не следует доводить дело до выраженной плотности биомассы. Это должна быть «дымка», близкая по плотности к стандарту McFarland 0,5. Если это так, инкубацию прекращают, доводят плотность взвеси до стандартной величины (по стандарту 0,5 McFarland) с помощью изотонического (физиологического) раствора хлорида натрия и переносят 0,3 мл взвеси в 9,7 мл бульона Мюллера-Хинтон. Нетрудно подсчитать, что в этом случае взвесь будет содержать около $(4-5) \cdot 10^6$ КОЕ/мл. Если 0,1 мл содержит $1,5 \cdot 10^7$ КОЕ/мл, 0,3 мл — $4,5 \cdot 10^7$ КОЕ/мл, то при разведении в 10 раз (0,3 + 9,7 мл) и будут $(4-5) \cdot 10^6$ КОЕ/мл. Перемешиваем аккуратным встряхиванием, и посевной материал готов. Не следует хранить инокулом, нельзя допускать, чтобы начался процесс роста популяции. В течение ближайших 15 минут после приготовления взвесь должна быть использована для внесения в пробирки ряда с серийным разведением антибиотика. Итак, теперь реализуем этап посева (инокуляции) — вносим по 0,1 мл инокулома во все пробирки с первой по тринадцатую (но не в четырнадцатую — контроль среды). Напомним, что все они содержат по 1 мл питательной среды (а не по 0,5 мл, как в МУК). Первые 12 пробирок — «рабочие», с антибиотиком, 13-я — контроль посева (культуры), они инокулируются. Важно отметить, что в каждую пробирку внесено около 500 тыс. микробных клеток: если в заготовленной взвеси $(4-5) \cdot 10^6$ КОЕ/мл, то в 0,1 мл — $(4-5) \cdot 10^5$ КОЕ и это на 1 мл среды в каждой пробирке ряда (дополнительными 10 % объема среды можно пренебречь — экспериментально доказано, что на результат такой дополнительный объем не влияет). Обязательно запомним цифру $(4-5) \cdot 10^5$. В питательную среду с антибиотиком внесено от 400 000 до 500 000 КОЕ. Вспом-

ним первую фразу главы: за бактерицидную концентрацию принимают ту из них, которая обеспечивает гибель 99,9% клеток или, по некоторым другим требованиям 99,99% клеток. Т.е. живыми может остаться не более 0,1–0,01% от внесенных в питательную среду микробов. Если 100% это $5 \cdot 10^5$, то 1% это 5000 клеток, 0,1% — 500, а 0,01% — 50 клеток, т.е. если антибиотик оставляет в живых менее 500 или 50 клеток, следовательно, его концентрация может быть признана бактерицидной. Любой микробиолог хорошо понимает, насколько малы эти цифры и как много причин способны повлиять на эти величины. Вот почему так важно, чтобы исследование было максимально возможно стандартизовано (что в микробиологии очень сложно).

Итак, производится инокуляция. Есть несколько рекомендаций, направленных именно на то, чтобы ограничить возможность «разброса» результатов. Уже упоминалось о том, что должен быть минимальным временной разрыв между приготовлением инокулюма и посевом. Поскольку для инокуляции используют всего лишь 0,1 мл взвеси, лучше пользоваться микропипеткой такого объема (а не миллилитровой пипеткой с соответствующими делениями по 0,1 мл). Естественно, что для каждой пробирки лучше использовать отдельную пипетку. Взвесь микроба следует вводить в столбик бульона под мениск, т.е. не на стенку пробирки (что часто делают), а непосредственно в питательную среду. После введения, необходимо аккуратно перемешать инокулюм в среде вращательными движениями или непосредственно во время введения частично забирая среду и возвращая ее обратно пипеткой без пузырьков, пены и брызг. Так следует поступать с каждой пробиркой, кроме 14-й, являющейся контролем стерильности питательной среды.

Далее следует инкубация в термостате в течение 18–20 часов при 35–36 °С, после чего штатив с пробирками изымают и учитывают первый (в данном случае промежуточный) результат — МПК; пробирки, в которых есть очевидный (даже самый слабый) рост, в данном исследовании бактерицидности интереса не представляют. Внимание должно быть сосредоточено на пробирках с прозрачной питательной средой. Их тоже надо, прежде всего, проверить: нет ли осадка на дне пробирки, который фактически отражает наличие роста (только с седиментацией клеток). Целесообразно убедиться в том, что это рост той культуры, которую исследуют. Для этого можно сделать мазок, окрашенный по Граму, из контрольной пробирки (тринадцатой — контроль культуры) или из одной «ра-

бочей» пробирки с отчетливым микробным ростом. Существует вполне оправданная рекомендация еще перед использованием взвеси микроба делать высев на чашку с питательным агаром. Причем не просто взвеси, а разведенной таким образом, чтобы получить через 20 часов изолированные, хорошо просматриваемые колонии.

Итак, просматривают все контроли. Тщательно в проходящем свете исследуют на отсутствие роста те пробирки, в питательной среде которых нет очевидного помутнения, и устанавливают ту из них, в которой отсутствует рост и меньше всего антибиотика, т.е. определяют самую малую концентрацию, обеспечившую подавление размножения микроба (МПК). Повторимся, на этом заканчивается первая половина исследования. Оно, фактически, мало чем отличается от определения МПК. Последовательность все та же самая. Теперь второй этап. Объектом исследования становятся только те пробирки, в которых нет видимого роста. Задача заключается в том, чтобы определить, в питательной среде какой из них присутствуют живые клетки исследуемого микроба, сколько их, а в каких пробирках живых клеток не осталось. Процедура несложная, традиционная для микробиолога — высев на плотную питательную среду. Для большинства микроорганизмов высев производят на кровяной агар, но, естественно, если микроб требует специальной питательной среды, может быть использована иная адекватная ростовым потребностям данного микроба питательная среда. Для этого заготавливают чашки с плотной питательной средой. Можно использовать по одной чашке на одну пробирку с отсутствием видимого роста в питательном бульоне. Например, если рост отсутствует в пробирках с первой по четвертую, то заготавливают 4 чашки. Но это минимум. Поскольку при определении числа колоний может быть получен пограничный результат ($\pm 0,1\%$ клеток от инокулюма), лучше посев делать на 2–3 чашки из каждой пробирки, т.е. иметь по 2–3 показателя числа колоний для каждого разведения антибиотика, способного подавить размножение микроба. В некоторых зарубежных стандартах двойной посев является требованием. По двум цифрам устанавливают среднюю величину. Итак, далее производится непосредственно высев. Стерильными пипетками (лучше микропипетками на 0,1 мл) забирают из каждой пробирки без видимого роста по 0,1 мл бульона и переносят на чашку. Другой вариант — по 0,01 мл. Шпателем распределяют жидкость по поверхности агара. Естественно, что для каждого посева требуются своя пипетка и свой шпатель. Чашки переворачивают и поме-

щают в термостат. Далее инкубация. Существует рекомендация (она вошла в некоторые методические издания) делать посев на одну чашку с плотной питательной средой сразу из 3 или 4 пробирок. Для этого чашку делят на сектора, а посев производят микропипеткой (по 0,01 мл), т. е. производят посев 0,01 мл бульона. Жидкость (ее лучше подсушить 20–30 секунд) распределяют шпателем по сектору. При всей допустимости такой «экономии», первый вариант, посев 0,1 или 0,01 мл на чашку, представляется предпочтительным.

Настал черед обсудить требования к инкубации. Ее продолжительность нельзя рассматривать жестко. В большинстве случаев достаточно суток. Например, когда тестируют эшерихии, клебсиеллы и мн. др. грамотрицательные палочки. Главное, чтобы колонии на поверхности кровяного агара были хорошо различимы. Но допустимо или, зачастую, даже необходимо дать колониям «подрасти». Ошибиться в данном случае невозможно. Просто следует обеспечить рост не контаминантам (это исключает возможность учета результата исследования), а тому микробу, который исследуется. Для некоторых микроорганизмов, подвергнутых «антибиотической атаке», двухсуточная инкубация это потребность, в т. ч. стафилококкам и стрептококкам. Для гемофильных бактерий, нейссерий обычно требуется и большая инкубация, не менее 3 суток. Главное — регулярно просматривать чашки с засеянной средой и принимать решение о продлении инкубации в соответствии с реалиями роста колоний. Когда инкубация прекращается и есть очевидный рост исследуемого микроба, подсчитывают количество колоний. Это важный момент при установлении МБК. Самая простая ситуация, когда отсутствует рост колоний на той чашке, на которую был сделан высев из первой пробирки с отсутствующим видимым ростом. Это значит, что МПК и МБК совпали. Такой результат вполне возможен, например, когда определяют чувствительность к бактерицидному действию пенициллинов на стрептококки, клостридии, листерии, или сочетаний бета-лактамов с аминогликозидами на эшерихии и нек. др. бактерии. Но когда рост колоний есть, надо их считать и суммировать с учетом всех разведений и объемов, которые были использованы. Не следует понимать фразу «самая простая ситуация», как математически корректную. С точки зрения статистики, совпадение МПК и МБК, отсутствие роста колоний это негативный момент, эффект не может не быть вариабелен. Он обязан при повторах быть таким. Тут статистики безусловно правы. Но в данном случае, из чисто практических соображений,

на все «статистические нюансы» можно закрыть глаза. Поскольку на главный вопрос, какова чувствительность микроба к бактерицидному действию антибиотика (-ов), с достаточной долей уверенности допустим ответ — она близка к подавляющему действию, МПК и МБК сходны. А это именно то, что нужно и для выбора антибиотика при лечении тяжелой патологии, и для уточнения его дозы. Иное дело, когда на поверхности питательной среды есть рост колоний. Подчеркнем еще раз, рост именно того микроба, который тестируется (в этом не должно быть сомнений, в противном случае исследование бессмысленно). А такой вариант, когда при высеве из пробирки, в которой нет видимого роста, на чашках образуется несколько колоний, очень и очень не редок. Это может быть всего несколько колоний, даже только одна или две, но у микробиолога возникает естественный вопрос: принимать их во внимание или нет, считаться ли с ними при определении МБК или такой рост игнорировать. Если да, то МБК может возрасти значительно, настолько, что достижение бактерицидного действия при лечении больного окажется бесперспективным. Этот вопрос буквально «мучил» всех тех, кто разрабатывал стандартизованный метод определения МБК. И не случайно. Возникает ряд вопросов. Если может быть рост отдельных клеток тестируемого микроба, то что брать за критерий бактерицидности, сколько КОЕ может быть игнорировано и при каких условиях эксперимента. Большинство авторов взяло за критерий 0,1 % клеток — то количество, которое может остаться в живых. 99,9 % клеток должно погибнуть. Некоторые авторы сочли, что летальный эффект должен распространиться на 99,99 % клеток. Естественное сомнение — почему 99,9 % или 99,99 %? Можно назвать и иную цифру: и меньшую, и большую. Вот на этот вопрос ответа нет. Критерий один, клеток должно быть мало, очень мало; практически могут остаться только те из них, устойчивые, что почти всегда присутствуют в популяции и которыми с определенной натяжкой можно пренебречь как фактором, исключая возможность достижения бактерицидного эффекта. Т. е., что очевидно, присутствует элемент случайности, который должен быть лимитирован, чтобы свести к минимуму возможность неправильного суждения. На помощь пришла статистика. В ряде работ и практического, и теоретического плана, выполненных в 80-х годах (наверное, первым следует упомянуть исследование R. Pearson с соавт., 1980) [145], были предложены те допустимые количества КОЕ, которые можно не учитывать при установлении МБК. Авто-

ры использовали т. н. распределение Пуассона, которое очень часто в практической жизни (по самым разным поводам) применяют для оценки допустимости того или иного события с возможной ошибкой не чаще 5% случаев (или в 1% случаев, если требования к предсказуемости события особенно велики). Важным критерием для этого статистического метода является однотипность условий, при которых реализуется событие, их стереотипность или, если вспомнить одно из основных требований к методам определения чувствительности — их стандартность. То, как должно проводиться исследование, приведено выше. Авторы исходили из того, что высеив производится на две чашки с плотной питательной средой и что объем посева должен быть 0,01 мл инокулюма на каждую чашку. В своих исследованиях они варьировали только величину инокулюма, который вносили в пробирку с питательной средой, содержащей антибиотик, т. е. то количество КОЕ/мл, которое принимают за 100% клеток посевного материала и от которого для установления МБК должно было оставаться не более 0,1% клеток. Результаты статистической обработки полученных данных были объединены в таблицу, которую нет надобности приводить полностью. Разные авторы в сокращенном варианте приводили ее в работах методического плана, она фигурирует в очень урезанном виде и в стандартах. Приведем главные ее цифры, которые микробиолог может использовать при определении МБК без математических выкладок. Итак, напомним условия — две чашки, высеив на каждую производится в объеме 0,01 мл из пробирок без видимого роста. После инкубации на чашках подсчитывают количество колоний исследуемого микроба. И вот тут и заглянем в таблицу R. Pearson с соавт. Она предусматривает два варианта: достоверность в 95% случаев и в 99% случаев (5% и 1% возможных выпадающих значений), в мировой практике обычно используют первый вариант (хотя никто не препятствует быть более требовательным). Итак, первый вариант, - выберем несколько наиболее вероятных ситуаций: конечный инокулюм (тот, который в пробирке с антибиотиком) — 10^5 КОЕ/мл, количество колоний суммарно не может быть больше 4. Если больше, концентрация антибиотика в этой пробирке не может быть МБК; меньше — да, может, а больше — нет. Инокулюм $2 \cdot 10^5$ — предел 8 колоний, $3 \cdot 10^5$ — 15 колоний, $4 \cdot 10^5$ — 20 колоний, $5 \cdot 10^5$ — 25 колоний, $6 \cdot 10^5$ — 29 колоний. Повторимся, это предельные цифры; если колоний больше, то концентрация антибиотика в пробирке не является летальной,

о бактерицидном действии свидетельствует только указанное предельное количество или меньше. Перечислим эти же показатели для 99% вероятности: 10^5 КОЕ/мл — 3 колонии, $2 \cdot 10^5$ — 8 колоний, $3 \cdot 10^5$ — 15 колоний, $4 \cdot 10^5$ — 18 колоний, $5 \cdot 10^5$ — 22 колонии, $6 \cdot 10^5$ — 25. Напомним (см. выше), что конечный инокулом составляет $(4-5) \cdot 10^5$ КОЕ/мл, т. е. 400 000–500 000 микробных клеток. Поэтому для исследователя основной показатель — не более 25 клеток на двух чашках с питательным агаром (или на двух секторах — если чашку делили на таковые).

Многие микробиологи используют для посева не 0,01 мл, а 0,1 мл. Для этой цели приведенные выше показатели бактерицидного действия не пригодны — изменено важнейшее условие эксперимента, объем посевного материала, и для этого случая была предложена методика статистической обработки получаемых данных (ее предложили J. Anhalt и соавторы в 1980 г.). Не вдаваясь в детали обсчета можно назвать следующие контрольные цифры: бактерицидность может быть признана достоверной, если при инокуле 400 000 КОЕ/мл ($4 \cdot 10^5$) на чашке с питательным агаром будет не более 43 колоний тестируемого микроба, а при инокуле 500 000 КОЕ/мл ($5 \cdot 10^5$) — не более 64 колоний. Т. е. за МБК могут быть признаны те концентрации антибиотика, при которых число выросших колоний не превышает означенные количества (все это при 95% вероятности результата). Итак, за МБК принимают то наибольшее разведение антибиотика (ту его наименьшую концентрацию), которое подавляет размножение микроба (т. е. равную или большую МПК) и которое при посеве на плотную питательную среду из каждой пробирки с отсутствием видимого роста ограничивает число колоний указанными контрольными цифрами.

На этом и заканчивается исследование с использованием метода определения сначала МПК в пробирках, с затем МБК, с использованием макроразведений.

Кроме методики макроразведений, МПК определяют еще и в планшетах, т. е. иным вариантом метода серийных разведений с применением микроразведений. И этот вариант метода тоже может быть использован для определения МБК. Не все признают его корректным — слишком ограничен объем питательной среды в лунке (ячейке) для посева на плотную питательную среду. Тем не менее, в ряде методических пособий он приведен, у него есть не только противники, но и сторонники.

Определение МБК с использованием микроразведений в первой половине исследования осуществляется так же, как обсуждалось выше, но в варианте с малым объемом питательной среды. Был период, когда минимизировали объем бульона, готовя такой же ряд, что описан в этой же главе, но в малых пробирках (преципитационных). Незначительная экономия питательной среды не компенсировала неудобства в работе с маленькими пробирками. От этого отказались. Упрощающим проведение исследования и, по мнению некоторых, даже экономящих время (не говоря уже об объеме используемого бульона), сочли применение вместо пробирок планшетов с лунками (ячейками). Такие планшеты часто используют в иммунологических исследованиях. Планшеты должны отвечать нескольким очевидным требованиям: 1) они должны быть стерильны; 2) каждая ячейка (лунка) должна быть вместительной настолько, чтобы по меньшей мере 0,1 мл питательной среды помещался в ней без угрозы ее выплескивания при перемещении планшета и перемешивания содержимого в лунке; 3) лунок (ячеек) в одном ряду планшета должно быть столько, сколько необходимо для полноценного проведения анализа; 4) целесообразно, чтобы планшет имел несколько рядов ячеек (лунок); это удобно, когда МПК и МБК определяют к нескольким антибиотикам; кроме того, может потребоваться продолжить опытную серию разведений, используя ячейки следующего ряда. Заметим сразу же, категорически не рекомендуется использовать один планшет для определения МБК и МПК нескольких штаммов, т. е. один планшет только для одного микроба.

Теперь о других компонентах исследования. Питательная среда — та же, что упоминалась выше: наиболее используемым является бульон Мюллера-Хинтон (со стандартизованным содержанием ионов кальция и магния), а для требовательных микробов — соответствующие жидкие питательные среды. Они приведены в отечественных МУК по определению чувствительности бактерий к антибиотикам. Для высева необходима плотная питательная среда: качественная, без добавок, способных повлиять на рост бактерий. Для большинства микробов такой средой является питательный агар с добавлением 5% крови (см. выше). Естественно, что для микроорганизмов с особыми требованиями к ростовым факторам, требуются специальные питательные среды. Повторим уже высказанное ранее суждение: для высева пригодна любая питательная среда, в максимальной степени обеспечивающая рост тестируемого микроба на поверхности среды. Единообразие в данном

случае не является необходимым. Но оно, безусловно, необходимо в рамках однотипных исследований и если ставятся контрольные опыты с референс-культурами. И еще одно обстоятельство. При использовании микроразведений надо запастись микропипетками. Они всегда желательны, в том числе и тогда, когда МПК и МБК определяют вариантом макроразведений. Но при микроразведениях без них просто не обойтись. Допускаемая некоторыми микробиологами работа с помощью пастеровских пипеток (каплями, «на глазок») в данном случае неприемлема.

Сама процедура определения МБК в варианте микроразведений также имеет два этапа: определение МПК методом серийных разведений в ячейках планшета и определение МБК высевом из ячеек с отсутствующим видимым ростом микроба на плотную питательную среду. Условия проведения исследования практически повторяют приведенные выше. Такое же количество разведений (концентраций) антибиотика, как правило, не более 12, от 0,06 до 128 мкг/мл. Напомним, что одна из концентраций должна быть МПК, две менее этой величины (хотя для определения МБК они не нужны, но это контроль для МПК и «подстраховка» на случай сдвига МПК в убывающую сторону). Естественно, что главное — это концентрации, большие, чем МПК. Вот их то и должно быть достаточно. Микробиолог, зная фармакокинетические особенности антибиотика и, исходя из величины МПК, волен сам определить, какие разведения необходимы. Но, как правило, большие, чем 128 мкг/мл, они не бывают или, что точнее, не имеют практического смысла. Делают навеску антибиотика и его разведения так, как это приведено выше.

Приготовление инокулюма (но не инокуляция) для тестирования чувствительности микроба к бактерицидному действию антибиотика с использованием микроразведений также не имеет каких-либо особенностей. Повторим основные этапы. Это посев исследуемой культуры на скошенный агар или плотную среду в чашке Петри. Или использование культуры, выросшей на чашке Петри при первичном посеве биосубстрата (для определения МБК это редкий вариант, но принципиально он возможен). Во всех случаях это должна быть монокультура. По стандарту мутности МакФарланда 0,5 готовят взвесь микроба в изотоническом растворе хлорида натрия или в жидкой среде Мюллера-Хинтон. 0,1 мл полученной взвеси переносят в 5 мл этой же питательной среды. Перемешивают (но так, чтобы не образовывалось пены или пузы-

рей). Подращивают культуру в термостате при 35–37 °С до образования видимого роста, периодически встряхивая (перемешивая) или, что предпочтительно, инкубируя сосуд с засеянной средой в качалке. Для большинства микроорганизмов достаточно около 6 часов роста в таких условиях, чтобы получить взвесь, адекватную по плотности стандарту мутности 0,5 МакФарланда. Естественно, что микробиолог волен сам прекратить рост культуры тогда, когда, по его мнению, плотность биомассы достигла нужной величины. Главное, вовремя прекратить процесс роста популяции, чтобы он остановился где-то в середине фазы логарифмического роста, пока число живых клеток является преобладающим. Избыточная плотность компенсируется разбавлением среды той же средой (что лучше) или изотоническим раствором хлорида натрия до получения взвеси, адекватной стандарту мутности. Далее все зависит от того, в каком объеме инокулюм будет вноситься в лунку (ячейку). В ней должно быть около $5 \cdot 10^5$ КОЕ/мл. Как известно, исходная взвесь содержит 150 млн. микробных клеток в мл ($1,5 \times 10^8$ КОЕ/мл), т. е. для посева необходимы последующие разведения инокулюма. А они определяются тем, какой выбор сделает исследователь. Объем питательной среды в лунке (ячейке) — 0,1 мл. Как уже упоминалось, дополнительный объем, который может вноситься в питательную среду с антибиотиком (будь она в пробирке или лунке) не должен составлять более 10% от этого объема, т. е., в данном случае, от 0,1 мл. Т. о. объем взвеси микроба (инокулята) не должен быть более 0,01 мл. К 0,1 мл раствора антибиотика в питательной среде, помещенного в лунку (ячейку), может быть добавлен 0,01 мл взвеси микроба или меньший объем без заметного влияния на активность антибиотика. Так и поступают: в ряде методических документов рекомендуют вносить в лунку 0,01 мл или 0,005 мл взвеси микроба. Существующие ныне микропипетки делают выбор того или иного объема доступным, простым в использовании. Однако, выбор объема вносит свои коррективы в разведение исходного инокулюма, приготовленного по стандарту McFarland $0,5-1,5 \cdot 10^8$ КОЕ/мл. Представим себе, что микробиолог сделал выбор в пользу 0,01 мл инокулюма, вносимого в лунку. Тогда следует взять 0,8–0,81 мл основной суспензии (т. е. около $1 \cdot 10^8$ клеток) и внести его в 24 мл питательной среды. В этом случае взвесь будет содержать около $(4,5-5,0) \cdot 10^6$ КОЕ/мл. Тогда, если в лунку будет внесено 0,01 мл этого разведения, то в ней будет приблизительно $(4,5-5,0) \cdot 10^4$ клеток. Может возникнуть воп-

рос, почему $(4,5-5,0) \cdot 10^4$, а не на 10^5 клеток (что декларировалось неоднократно). Но ведь и объем среды в лунке не 1 мл, а 0,1 мл, т. е. клеток должно быть в 10 раз меньше. В некоторых стандартах рекомендовано вносить 0,005 мл взвеси микроба. В этом случае, разведение основного инокулюма будет несколько иным. Приведем его в варианте, предложенном CLSI (стандарт М7), авторы документа предпочитают объем инокулюма 0,005 мл на лунку (ячейку). Взвесь микроба, приготовленную по стандарту McFarland 0,5, разводят в 10 раз, т. е. до $1,5 \cdot 10^7$ КОЕ/мл. Теперь очевидно, что если в лунку будет внесено 0,005 мл этой взвеси, то фактически в объем 0,1 мл (что есть в лунке) будет внесено около $5-6 \cdot 10^4$ КОЕ (на ячейку с 0,1 мл). На самом деле несколько больше, но авторы стандарта не считают это существенным, влияющим на результат определения МПК (и, соответственно, МБК).

Далее инкубация в течение периода, адекватного для роста данного рода (вида) микроорганизма, и учет результата с установлением МПК.

Теперь настала очередь второго этапа определения бактерицидной концентрации. Принцип тот же, что приведен выше — высев, но уже не из пробирок, а из ячеек (лунок), в которых отсутствует видимый рост микроба, на плотную питательную среду. Для этого, прежде всего, необходимо убедиться в том, что рост в той или иной ячейке действительно отсутствует. Он может быть и в виде взвеси, от плотной до очень слабой, трудноразличимой глазом, а может быть и в виде осадка, далеко не всегда отчетливо различимого в лунке. Поэтому содержимое лунок (ячеек) надо перемешать: встряхиванием, стеклянной палочкой, пипеткой — тем или иным образом, но так следует поступать с каждой ячейкой, в которой, предположительно, отсутствует рост тестируемого микроорганизма. После того, как все это было сделано, отбирают те лунки, из которых необходимо произвести высев. Готовят адекватное количество чашек с плотной питательной средой, в наибольшей степени способствующей росту данного микроба. Для большинства из них это питательный агар, обогащенный 5% лошадиной кровью. Но это может быть любая среда, гарантированно обеспечивающая размножение микробных клеток с образованием хорошо просматриваемых колоний. Посев должен быть мерным. Поскольку в лунке содержится 0,1 мл бульона, целесообразно микропипеткой перенести 0,1 мл содержимого лунки (ячейки) на поверхность плотной питательной среды. Дают подсохнуть

и шпателем равномерно распределяют посевной материал по поверхности агара. Для каждого посева (для содержимого каждой лунки) должна быть отдельная пипетка.

После этого следует инкубация чашек с посевом в перевернутом вверх дном виде в течение того срока, который гарантировано обеспечивает рост колоний. Как уже отмечено ранее, продолжительность инкубации не является объектом строгой стандартизации. Она должна быть достаточной. Однако, обычно для кишечных бактерий инкубационный период не превышает суток, для стафилококков, энтерококков и стрептококков — двое суток (для стрептококков и до 3 суток), а для остальных — не менее трех суток. Но, если в этом есть необходимость, то и более. Температура инкубации для тех бактерий, для которых определены критерии чувствительности, 35–37 °С. Если речь идет об исследовательской работе с микроорганизмами, для которых температурный режим инкубации иной, его исследователь выбирает самостоятельно. Важно, чтобы все чашки Петри (если их несколько) были расположены в термостате таким образом, чтобы температура для всех была сходной. Поэтому не рекомендуется собирать чашки в столбик, содержащий более 3–4 чашек.

Поскольку в данном описании высева использован, по сути, почти весь объем содержимого лунки — 0,1 мл, интерпретация полученного результата соответствует приведенной ранее.

Микробиолог вправе для посева брать и 0,01 мл, о чем также говорилось выше при обсуждении варианта макроразведений. Полученные при этом данные интерпретируются по R. Pearson с соавт., что также обсуждается в данном разделе настоящей главы.

Таковы основные этапы определения чувствительности микроорганизмов к бактерицидному действию антибиотиков. Попробуем выделить главное в обсуждаемой проблеме.

1. Определять минимальную бактерицидную концентрацию следует при такой патологии человека, когда летальное действие антимикробного препарата на возбудителя в значительной степени (если не решающим образом) определяет эффективность антибиотикотерапии. К таким заболеваниям могут быть отнесены сепсис, эндокардит, значительные деструктивные процессы различной локализации, инфекции у больной с выраженной иммунной недостаточностью.

2. Показания к тестированию чувствительности возбудителя заболевания к бактерицидному действию антибиотика определяет лечащий врач при обязательном участии клинического микробиолога.
3. Методология определения чувствительности микроба к бактерицидному действию антимикробного препарата является традиционной для микробиологической службы и доступна любой микробиологической группе клинической лаборатории лечебного учреждения.
4. Порядок определения МБК предусматривает два этапа исследования:
 - 4.1. Определение методом серийных разведений в жидкой питательной среде МПК (минимальной подавляющей концентрации) антибиотика;
 - 4.2. Высев из пробирок с бульоном, в которых отсутствует видимый рост микроба, на плотную питательную среду для определения наличия в среде выживших (перезживших) клеток.
5. Определение МБК требует строгой стандартизации исследования. На первом этапе анализа с установлением МПК особого внимания заслуживают точность приготовления рабочих растворов антибиотика (его двукратно убывающих концентраций) и качество жидкой питательной среды — бульона Мюллера-Хинтон. Ориентиром могут являться требования МУК по определению чувствительности микроорганизмов к антибиотикам. На втором этапе исследования важно соблюдать высокую точность при высеве определенного объема жидкой питательной среды на агаризованную питательную среду и обеспечить качество плотной питательной среды, на которой тестируемый микроб способен дать максимальный рост в минимальный промежуток времени. Для большинства бактерий это качественный кровяной питательный агар, но микробиолог вправе выбрать любую питательную среду с учетом ростовых свойств культуры. Главное, чтобы она была оптимальной.
6. При отсутствии каких-либо веских оснований, для определения МБК предпочтительно использовать вариант макроразведений метода серийных разведений в жидкой питательной среде.

Наконец, может быть самое сложное — как распорядиться полученным результатом. Бактерицидная концентрация (МБК) определена, что дальше? С МПК все просто, микробиолог заглянул в таблицы, сравнил полученную цифру с табличными данными и может дать заключение — микроб или чувствителен, или устойчив. Ориентир уже определен специальными исследованиями, и задача микробиолога лишь получить свою цифру, определить МПК. При оценке бактерицидного действия, при интерпретации МБК, так не получится. Никто критерии чувствительности микроорганизмов к бактерицидному действию антибиотиков не разрабатывал, контрольных МБК не существует. То, что принято обозначать как break-points для бактерицидного действия отсутствует. Что же делать, что сказать лечащему врачу, который ждет результата исследования?

В литературе, причем достаточно солидной, есть такое утверждение — если МБК отличается от МПК в два раза, можно рассчитывать на бактерицидный эффект (естественно, это тем более так, если МПК и МБК практически тождественны). В принципиальном плане это положение трудно оспорить, но при условии, что МПК не является пограничной величиной, чем меньше МПК по сравнению с контрольной концентрацией, тем справедливее подобное утверждение, и наоборот. И вот тут уместно вспомнить, что антибиотики можно условно разделить на три неравные группы. Есть те из них, которые можно вводить больному в широком диапазоне доз без угрозы проявления прямого (токсического) повреждающего действия антибиотика на человека. Автор предложил называть их антибиотиками широкого дозирования. Реально к ним относятся только многие пенициллины: вспомним, что бензилпенициллин, ампициллин, карбенициллин, пиперациллин, мезлоциллин, пенициллиназоустойчивые пенициллины, каждый по своему, но можно вводить парентерально и в дозе 150 мг/кг в сутки, и существенно большей не опасаясь прямого токсического действия на больного. По сравнению с пенициллинами дозирование цефалоспоринов более ограничено (назовем их антибиотиками ограниченного дозирования). Для многих цефалоспоринов доза в 150 мг/кг в сутки допустима, но большая — опасна. Для некоторых цефалоспоринов (цефоперазон, цефтазидим) допустимая доза в два раза меньше, хотя и для них прямое токсическое действие при дозе 100 мг/кг/сутки — редкое явление. Наконец, все остальные антибиотики относятся к препаратам строгого дозирования. Об этом важно помнить именно в связи с возможностью

достижения бактерицидного действия. Чем больше доза антибиотика, введенная больному, тем больше его концентрация в организме человека; чем больше концентрация, тем вероятнее бактерицидное действие антибиотика на микроб. Это не единственное, но очень важное условие. При всех оговорках, которые можно сделать, концентрация остается наиболее надежным ориентиром для оценки перспективы достижения бактерицидного эффекта. Итак, в распоряжении микробиолога есть МПК и, соответственно, заключение о чувствительности штамма к определенному антибиотику. Есть МБК, при которой антибиотик способен оказать на чувствительный к нему штамм (что обязательное условие) летальное действие. Теперь важно понять, насколько эти бактерицидные концентрации достижимы в организме человека. В идеале надо бы сравнивать и МПК и МБК с теми количествами препарата, которые достижимы в пораженных микробом тканях у конкретного больного. Теоретически, это реально, но даже в научных исследованиях к такой практике прибегают очень редко (трудоемко, не всегда обычно, иногда опасно для пациента, порой невозможно технически). Отсюда установившийся принцип — все сравнивать с концентрацией в крови. Напомним, что и существующие критерии чувствительности тоже основаны на фармакокинетике антибиотика только в крови, причем на усредненных показателях этих величин. Оценка, в том числе авторская, такой ситуации дана и в этой книге, и в других публикациях [12], но сегодня ориентир на концентрацию антибиотика в крови некоего «среднего» больного единственная возможность установить реальные, применимые на практике критерии чувствительности, и по МПК (что делается), и по МБК. Представим себе вполне реальную ситуацию, частный случай. Тяжелый больной. Патология вызвана золотистым стафилококком. Возбудитель заболевания чувствителен к пенициллиноустойчивым пенициллинам (оксациллин и пр.), т. е. не является «метициллинрезистентным». Оксациллин относится к числу основных антибиотиков, чье применение в таких случаях является вполне обоснованным. Тяжесть течения заболевания делает целесообразным определение МБК, и как ориентира для решения вопроса о целесообразности применения оксациллина, и для уточнения его дозы. МПК чувствительных к оксациллину штаммов стафилококка часто менее 1 мкг/мл. Допустим, что в данном случае она составляет 0,25 мкг/мл. Это первый показатель, первая отправная точка для оценки «перспективной МБК».

Тяжелые стафилококковые процессы не лечатся т. н. среднетерапевтическими дозами оксациллина. Обычно рекомендуют парентеральное введение 1–2 г антибиотика 4–6 раз в сутки, т. е. каждые 4–6 часов. А теперь вспомним, какие концентрации в крови бывают после введения таких доз оксациллина. Оказывается, при дозе 1 г, введенной внутримышечно, концентрация антибиотика в крови в течение первых 4 часов не снижается ниже 0,6 мкг/мл, а обычно бывает большей, и это при том, что первые два часа она колеблется в пределах от 18 до 4 мкг/мл. Если используют большую дозу антибиотика, 2 г на инъекцию, концентрации в крови увеличатся усреднено в 1,5 раза, а время обнаружения препарата в крови в терапевтически значимых количествах продлится, по меньшей мере, еще на 1–2 часа. Теперь можно сопоставить МПК и те концентрации, которые вполне могут быть бактерицидными (а оксациллин, как известно, относится именно к «бактерицидным антибиотикам») — МБК может быть и 0,5 мкг/мл, и 1,0 мкг/мл, и 2 мкг/мл (вряд ли большей — ведь концентрация 2 мкг/мл в 8 раз превышает МПК, а для бактерицидных антибиотиков большее различие не типично). Этот частный случай, когда различие между МПК и значимой в терапевтическом плане концентрацией может быть значительным, типичен для пенициллинов, т. е. для антибиотиков широкого дозирования. Нетрудно проследить, зная широко изученные для многих чувствительных штаммов бактерий разных родов и видов МПК бензилпенициллина, ампициллина, пиперациллина и др., что МБК при использовании больших доз антибиотиков могут быть сопоставимы с поддерживаемыми в организме человека концентрациями антибиотиков и при этом превышать МПК во много раз. Однако, чтобы реализовать подобные знания, надо определить не только МПК, но и МБК (что не является предметом внимания отечественной лабораторной службы).

Можно ли предложить контрольные концентрации, которые при определении МБК могли бы быть ориентиром для оценки чувствительности штамма к бактерицидному действию антибиотика? Сопоставление многочисленных фармакокинетических данных, контрольных цифр чувствительности бактерий к антибиотикам («табличных показателей» МПК) и повреждающего потенциала антибиотиков в отношении человека (или, можно сказать и по другому, — предела варьирования доз антибиотиков, вводимых больному) позволяет предложить, как рабочую, следующую трактовку МБК.

1. Для антибиотиков строгого дозирования, т.е. препаратов, которые можно использовать в строго определенной дозе, микроб может считаться чувствительным к бактерицидному действию только в тех случаях, если МБК не выходит за рамки контрольных МПК, т.е. той величины, которая характеризует возбудителя как чувствительного к данному лекарственному средству.
2. Для пенициллинов и цефалоспоринов, чья доза может быть большей, чем среднетерапевтическая, микроб следует рассматривать как чувствительный к бактерицидному действию антибиотика, если МБК не превышает контрольного значения МПК. Если МБК больше контрольной величины в 2 раза, то летальное действие на микроб может быть достигнуто при использовании предельно возможной дозы антибиотика. В практическом плане (и это следует подчеркнуть) последнее допущение можно рассматривать только применительно к препаратам, вводимым парентерально.

Некоторые пенициллины, такие как, бензилпенициллин, ампициллин, пиперациллин, оксациллин потенциально способны оказывать летальное действие на микроб и при большем различии МПК и МБК. Однако, реализовать такую возможность при лечении больного (без риска для больного) можно только при наличии и МБК, и данных по фармакокинетике препарата у данного больного. Это реально, но утилизируется такая возможность в практике лечебных учреждений исключительно редко.



ГЛАВА 3.

**БЕТА-ЛАКТАМАЗЫ:
ИХ ОПРЕДЕЛЕНИЕ КАК ФАКТОР ПОВЫШЕНИЯ
ЭФФЕКТИВНОСТИ АНТИБИОТИКОТЕРАПИИ**

Тема бета-лактамаз, продуцируемых многими часто встречающимися возбудителями распространенных инфекций, заслуживает особого внимания по ряду причин.

1. Эти ферменты являются основным фактором устойчивости ко многим, а в некоторых случаях ко всем бета-лактамным антибиотикам, т. е. к пенициллинам, цефалоспорином, монобактамам, карбапенемам, большинства грамотрицательных бактерий. Очевидно, что речь идет о резистентности к тем группам антибиотиков, которые являются основными (антибиотиками первого ряда) в лечении тяжелой инфекционной патологии.
2. Продуцентами бета-лактамаз, способных инактивировать бета-лактамные антибиотики, являются эшерихии, протеи, клебсиеллы, другие представители семейства *Enterobacteriaceae*, а также *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter spp.*, некоторые другие грамотрицательные палочки, т. е. возбудители таких тяжелых патологий, как сепсис, пневмония, перитонит, раневая инфекция, муковисцидоз и мн. др., в лечении которых антибиотики (прежде всего, бета-лактамы) занимают важнейшее место.
3. Образование бактериями бета-лактамаз, возникновение устойчивости бактерий к пенициллинам, цефалоспорином, карбапенемам и монобактамам, значительно ограничивает или, что более правильно и более часто, исключает возможность использования этих антибиотиков для лечения инфекций. При этом круг перспективных лечебных препаратов, эффективных и безопасных, резко, порой катастрофически сужается.
4. Способность грамотрицательных бактерий «приспособляться» к селективному давлению антибиотиков оказалась значительной, в том числе путем синтеза ими бета-лак-

маз новой структуры и иного спектра действия. Уже сегодня известно более 200 бета-лактамаз грамотрицательных бактерий, каждая из которых своеобразна по способности гидролизовать тот или иной бета-лактамыный антибиотик. Это может быть степень его инактивации, продолжительность процесса, избирательность по отношению к тому или иному соединению. Но во всех случаях их действие ставит под сомнение или исключает возможность клинической утилизации антибиотиков бета-лактамыной структуры для лечебных целей.

5. Синтез бета-лактамаз грамотрицательными бактериями и возникшая в этой связи их устойчивость к бета-лактамыным антибиотикам очень часто не может быть определена традиционными, привычными для лабораторной службы клинических учреждений т.н. фенотипическими методами, а, попросту говоря, методом дисков и методом серийных разведений. Нужны специальные методы. Они есть, но далеко не все из них достаточно стандартизованы и в большинстве случаев не получили формального признания, не «узаконены».
6. Наконец, есть еще одна проблема, которая, казалось бы, не связана напрямую с продукцией бета-лактамаз, но имеющая прямое отношение к логике антибиотикотерапии больных, возбудитель которых является продуцентом этих ферментов. Синтез грамотрицательными бактериями бета-лактамаз достаточно часто, в силу особенностей генетического кодирования ферментообразования, является отражением полирезистентности микроба к широкому кругу antimicrobных препаратов, в том числе не бета-лактамыной структуры. Т.е., о чем уже упоминалось выше, речь идет о перспективности антибиотикотерапии в целом, о поиске ответа на вопрос — что будет завтра?

Анализируя приведенные характеристики проблемы бета-лактамаз грамотрицательных бактерий, возбудителей тяжелых и распространенных заболеваний человека, можно выделить две ее важнейшие стороны. Одна имеет очевидный клинический смысл: как лечить больного, какой антибиотик выбрать, если возбудитель заболевания образует бета-лактамазы, ограничивающие или исключающие применение наиболее эффективных и относительно

безопасных антимикробных препаратов. Другая, относящаяся к деятельности лабораторной службы клинического учреждения, — как установить ферментообразование, как определить круг тех антибиотиков, которые с достаточной достоверностью можно рекомендовать лечащему врачу для борьбы с инфекцией. Найти ответ на эти вопросы задача сложная. Но решения необходимы, поскольку достаточно часто являются важнейшими для достижения успеха в терапии заболевания. Нет надобности говорить о том, что обе стороны проблемы — клиническая и лабораторная — тесно связаны. Роль лабораторной службы в данном случае исключительно велика. Об этом стоит напомнить хотя бы потому, что многие лаборатории отечественных лечебных учреждений неохотно используют методики тестирования образования бета-лактамаз. Назвать такие исследования частыми, пока, явное преувеличение.

Попытаемся далее привести кратко то основное, что сделано для решения проблемы. Прежде всего, необходимо вспомнить о каких ферментах идет речь, почему они стали объектом столь интенсивного изучения именно сейчас, когда, казалось бы, создана большая номенклатура антимикробных препаратов. Сделаем в этой связи несколько оговорок. Во-первых, речь пойдет только о бета-лактамазах грамотрицательных бактерий. Во-вторых, интенсивно изучаются бета-лактамазы лишь определенной группы грамотрицательных бактерий — это, прежде всего, несколько родов и видов семейства *Enterobacteriaceae* (*Escherichia coli*, *Klebsiella spp.*, *Enterobacter spp.*, *Citrobacter spp.*, *Salmonella spp.* и нек. др.), а также некоторые из т. н. неферментирующих бактерий (*Pseudomonas spp.*, *Acinetobacter spp.*) Особое внимание уделено *E. coli*, *K. pneumoniae*, *K. oxitoca*, *P. aeruginosa* как частым возбудителям инфекций человека и, что более важно, как очевидным продуцентам новых вариантов бета-лактамаз. Еще одна важная оговорка, центральное место в исследованиях занимают «бета-лактамазы расширенного спектра действия», БЛРС (в английском варианте ESBL — extended spectrum beta-lactamase (-s)). Почему это так заслуживает отдельного упоминания (о чем ниже). Однако, дело не ограничивается только БЛРС (ESBL). Есть еще несколько групп бета-лактамаз, имеющих серьезное клиническое значение, поскольку их продукция ведет к устойчивости возбудителей заболеваний. Она при лечении больного трудно преодолеваема простой сменой антибиотика и далеко не всегда диагностируема общепринятыми методами определения чувствительности бактерий к

антибиотикам. Кроме того, один и тот же микроб может продуцировать бета-лактамазы, принадлежащие к разным группам. Один фермент может маскировать действие другого, а в лечебном плане их суммарное действие еще более осложняет выбор антимикробного средства. Значит эти «другие» бета-лактамазы тоже нужно уметь выявлять. А для того, чтобы определять их присутствие, о них надо помнить, их надо уметь «увидеть». Очень не простой для диагноста клубок, и, отметим сразу, до сих пор далеко не запутанный. Тем не менее, и значимая информация есть, и методические подходы к выявлению бета-лактамаз, хотя и не для всех, но предложены. Один из них, касающийся БЛРС, даже вошел в отечественные методические указания. Теперь, после этих необходимых оговорок, остановимся на главном.

Прежде всего, закономерно поставить вопрос — какие бета-лактамазы известны. Т.е. речь идет о классификациях этих ферментов. Они есть (заметим — «они», их несколько). Сегодня наиболее часто упоминают две классификации. Одна из них, принадлежащая R. Ambler, группирует бета-лактамазы по их молекулярной структуре. Любопытный читатель нередко в литературе, где упоминаются бета-лактамазы, найдет указание на принадлежность фермента к классу А, В, С или D. Так распределил их R. Ambler, исходя из последовательности аминокислот в молекуле активного центра и некоторых других структурно-функциональных характеристик фермента [28]. Несколько иной подход был использован К. Bush с соавторами [42], которые попытались при классификации бета-лактамаз, не исключая их принадлежность к тому или иному молекулярному классу по R. Ambler, взять за основу спектр их действия на антибиотики бета-лактаманной структуры и чувствительность к ингибиторам бета-лактамаз [60].

Естественно, что каждая классификация интересна настолько, насколько она позволяет решить те или иные задачи: будь то научные, будь то чисто практические (или те, и другие). В таблицах 3.1 и 3.2 приведены характеристики ферментов, которые авторы дают на основе упомянутых выше подходов. Первая из них отражает взгляды стандартизаторов CLSI (США), которые использовали градацию R. Ambler; другая — предложена по классификации бета-лактамаз К. Bush и др. [42, 50, 51]. Их взвешенность, обоснованность ни в коей степени не вызывает сомнений. Табличные данные в достаточной мере отражают современные представления, сегодняшний уровень знаний о бета-лактамазах. Но есть один момент,

Таблица 3.1

**Бета-лактамазы грамотрицательных бактерий
(дано по [49] с незначительными изменениями)**

Класс	Активный центр	Представители
A	Серин	Большинство БЛРС, а также TEM-1, SHV-1, KPC
B	Цинк	Металло-бета-лактамазы: VIM, IMP, SPM
C	Серин	AmpC
B	Серин	OXA

Таблица 3.2

**Диагностические признаки бета-лактамаз
групп БЛРС, AmpC и металло-бета-лактамаз
[42, 50, 74, 99]**

Бета-лактамазы (БЛ)	Чувствительность к ингибиторам БЛ*					Антибиотики, инактивируемые БЛ**						
	Клавулановая кислота	ЭДТК	Клоксациллин	Борониевые кислоты	Ампициллин	Амоксициллин/клавулановая кислота	Азтреонам	Цефокситин	Цефотаксим	Цефтазидим	Цефепим	Карбапенемы***
БЛРС (ESBL)	+	-	-	-	+	-	+	-	+	+	+	-
AmpC-бета-лактамазы	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	- или ±	-
Металло-бета-лактамазы	-	+	-	-	+	+	±	+	+	+	+	+

* (+) — ингибирует; (-) — не ингибирует

** (+) — инактивирует; (-) — не инактивирует; (±) — инактивируют отдельные представители данной группы БЛ или процесс инактивации частичный и длительный

*** — имипенем, меропенем, эртапенем, дорипенем.

который нельзя не отметить. Как, каким образом использовать приведенные материалы в двух взаимосвязанных случаях: когда антибиотик выбирают для терапии больного и когда возбудитель, потенциальный продуцент бета-лактамазы, тестируется на чувствительность к бета-лактамамным антибиотикам.

Проблема, которая обсуждается в данной главе, касается именно вопросов микробиологической диагностики, получения той информации, на основе которой решается вопрос о выборе того или иного антибиотика для лечения больного человека. Если взять за основу эту чисто утилитарную посылку, то среди всего терминологического обилия бета-лактамаз целесообразно выделить три их группы, те три варианта ферментов, установление продукции которых микробом в той или иной мере доступно практической лаборатории и на основе чего микробиолог способен предупредить лечащего врача о возможной неэффективности лечебного препарата бета-лактаманной структуры. Это бета-лактамазы расширенного спектра действия (БЛРС, ESBL), это т. н. AmpC-бета-лактамазы, и, наконец, это металло-бета-лактамазы [39, 74, 99, 154, 198, 199]. Подчеркнем еще раз, выбор основан исключительно на сочетании практической целесообразности, методической доступности определения ферментов и возможности клинической утилизации аналитической информации.

Остановимся, кратко, на каждой из названных групп ферментов.

Как уже подчеркивалось, БЛРС сегодня привлекают наибольшее внимание. Интерес к ним возник еще в начале 80-х гг., когда было установлено: бактерии семейства *Enterobacteriaceae* могут быть устойчивы к цефалоспорином 3-го поколения (цефотаксим, цефтриаксон, цефтазидим и др.). Поиск механизма этого явления привел к выводу, что резистентность возникает в результате ферментативной инактивации антибиотиков; ферменты эти действуют так же, как уже известные бета-лактамазы, т. е. вызывают разрушение бета-лактаманного кольца в молекуле антибиотика. В начале речь шла о бета-лактамазах, образуемых клебсиеллами. Однако, вскоре после уже первых исследований, стало очевидным, что продуцентами могут быть многие роды и виды семейства *Enterobacteriaceae*, а также, что пока не нашло достаточного подтверждения, некоторые другие грамотрицательные бактерии, являющиеся возбудителями заболеваний человека. Как оказалось, имея несколько общих признаков, прежде всего, касающихся основных характеристик спектра действия, эти бета-лактамазы, тем не менее,

могут иметь отличия и по структуре, и по активности в отношении определенных субстратов и по спектру действия, прежде всего, в отношении представителей 3–4 поколений цефалоспоринов, и по степени чувствительности к действию ингибиторов бета-лактамаз. Сегодня число БЛРС превысило 150. И, тем не менее, несмотря на различия, им присущ ряд общих или близких характеристик. Это важно учитывать и с точки зрения диагностики, и при выборе антибиотика для терапевтических целей [97, 109, 129, 172, 192]. О каких свойствах БЛРС идет речь?

1. Основными продуцентами БЛРС являются бактерии семейства *Enterobacteriaceae*. Наиболее изучены ферменты, образующиеся *E. coli*, *K. pneumoniae*, *K. oxytoca*, *P. mirabilis*, что позволило предложить стандартизованный метод определения наличия или способности к образованию БЛРС этими микроорганизмами. Показана продукция БЛРС бактериями и других родов: *Enterobacter*, *Citrobacter*, *Salmonella*, *Kluyvera*.
2. БЛРС способны инактивировать бета-лактамы антибиотиков, в том числе широкоспектральные пенициллины (ампициллин, карбенициллин), цефалоспорины практически всех поколений (в том числе цефотаксим, цефтриаксон, цефтазидим, цефепим), монобактамы (азтреонам). Но они не гидролизуют карбапенемы (имипенем, меропенем и др.) и цефамицины (цефокситин, цефотетан). Устойчивость бактерий, продуцирующих БЛРС к цефалоспорином 3–4 поколений, не является однородной. В силу особенностей образуемых ферментов она может быть большей к одному из антибиотиков и меньшей или, даже, отсутствовать к другому. Существующие методы определения БЛРС не позволяют дифференцировать антибиотики по данному признаку. Поэтому сам факт выявления БЛРС предполагает исключение всех пенициллинов, цефалоспоринов и монобактамов из числа лекарственных средств, перспективных для терапевтических целей. Заключение об этом должно исходить от микробиологической службы.
3. Гены, кодирующие образование БЛРС, и гены, кодирующие устойчивость к антибиотикам иных структур (не бета-лактамов), часто соседствуют на плазидах. Образование БЛРС и устойчивость к таким антибиотикам, как аминоклиозиды, фторхинолоны, часто проявляются параллельно.

Поэтому полирезистентность бактерий является сигналом к тому, что культура способна образовывать БЛРС.

4. Важной (можно сказать центральной для диагностики) характеристикой БЛРС является их чувствительность к действию ингибиторов бета-лактамаз. Все бета-лактамазы можно разделить на две группы — чувствительные и устойчивые к действию ингибиторов этих ферментов. Хотя известно уже несколько десятков веществ, обладающих способностью блокировать действие бета-лактамаз, реально доступны и используются три соединения: клавулановая кислота, сульбактам и тазобактам. Все три имеют бета-лактамную структуру, все не обладают сколь-нибудь выраженными антимикробными свойствами и все вещества являются ингибиторами далеко не всех, но многих бета-лактамаз. В их число входят БЛРС. Поскольку грамотрицательные бактерии могут продуцировать бета-лактамазы, как чувствительные, так и устойчивые к действию трех названных ингибиторов, то сам факт ингибиции может служить важным признаком для дифференциации ферментов. БЛРС, продуцируемые бактериями семейства *Enterobacteriaceae*, относятся к числу чувствительных к ингибирующему действию клавулановой кислоты, сульбактама и тазобактама. Наиболее часто для выявления БЛРС используют клавулановую кислоту, хотя есть данные о том, что тазобактам в некоторых случаях более перспективен при постановке теста на образование БЛРС.
5. Синтез БЛРС часто сопровождается устойчивостью микроба-продуцента к действию бета-лактамных антибиотиков, выявляемой с помощью распространенных, привычных для микробиологов стандартных методов: серийных разведений и дисков. Их обычно принято называть фенотипическими методами. Однако, (и это следует подчеркнуть особо) такое происходит далеко не всегда. Образование БЛРС микробом — феномен динамичный; количество фермента меняется, оно увеличивается по мере селективного давления антимикробного средства. А фенотипические проявления резистентности (т.е. то, что определяется в лаборатории) напрямую зависят от количества фермента. Поэтому, параллелизм между ферментообразованием и проявлением устойчивости микроба к антибиотику при использовании традиционных методов выявляется далеко не всегда или слишком

поздно, уже как клинический (неэффективность антибиотика), а не как лабораторно установленный факт. Это значит, что о способности микроба продуцировать БЛРС надо думать загодя, или по косвенным признакам, или на основании прямых тестов, или (что и рекомендовано) того и другого.

6. Сказанное в предшествующем пункте означает, что для выявления БЛРС требуются особые, специальные аналитические исследования. А раз так, то эти тесты должны быть однотипны, информативны, доступны для любой микробиологической лаборатории, т.е. стандартизованы. Подобная работа ведется. Есть методология и критерии, разработанные CLSI (США), есть отечественные методические указания (они воспроизводят предшествующие), есть критерии, разработанные в Европе, которые не в полной мере совпадают с американскими (об этом ниже). Тем не менее, существующие «узаконенные» рекомендации, пока, лимитированы. Они разработаны для узкого круга продуцентов, о чем выше говорилось (см. п. 1). Они не позволяют в стандартизованном режиме оценивать продукцию иных бета-лактамаз, в том числе при синтезе микробом ферментов разных классов. А это важнейшие элементы для правильного выбора лечебного препарата. Однако, пусть не стандартизованные, но такие методики есть. Они не нашли формального признания, не вошли в утвержденную документацию, в чем-то они не совершенны. Но эти методики достаточно просты, и вполне могут дать ориентировочную информацию, важную и для микробиолога, и для лечащего врача.
7. Носителями штаммов, образующих БЛРС, прежде всего, является человек. Он основной источник распространения полирезистентных возбудителей, продуцентов ферментов. Сегодня речь идет не только о госпитальных штаммах. Грамотрицательные бактерии, образующие БЛРС, выделены от амбулаторных больных при ряде инфекций, в том числе мочеполового тракта, дыхательных путей и, даже, генерализованных. Продуценты БЛРС обнаружены у домашних животных, в продуктах питания и воде. Появились сообщения об их нахождении в дикой природе. Это говорит о распространении продуцентов БЛРС, причем больному человеку, получившему антибиотики, в этой цепочке придается первостепенное значение. Бесконтрольная, нерегла-

ментированная антибиотикотерапия — важнейшая причина возникновения и распространения БЛРС.

8. Наконец, центральный вопрос — почему этим бета-лактамазам уделяется особое внимание, почему они вызывают столь большую тревогу? Проблема антибиотикорезистентности сегодня стоит как никогда остро. Допускается возможность возвращения человечества в доантибиотический период. При всей излишней эмоциональности, для такого утверждения есть определенные основания. БЛРС в структуре этого явления занимают особое место: они многообразны, и их номенклатура существенно пополняется из года в год. Ферменты способны инактивировать практически все бета-лактамы антибиотики. Они не только активны по действию на цефалоспорины всех 4 поколений. Уже обнаружены БЛРС, гидролизующие новые препараты, такие как цефбипрол (цефалоспорин, действующий на «метициллинрезистентные» стафилококки). Но главное — образование этих ферментов делает бета-лактамы антибиотики не эффективными. Их синтез, носящий во многом системный, лавинообразный характер, исключает возможность терапии бета-лактамами тяжелых инфекций, для которых они много лет были терапевтическими средствами первого ряда.

Только продуманные эпидмероприятия, взвешенная тактика утилизации бета-лактамы антибиотиков, продуманная, регулируемая политика антибиотикотерапии в целом, как в отдельном клиническом учреждении, так и в регионе (что, пока, встречается крайне редко), способны ограничить рост антибиотикорезистентности, в том числе распространение штаммов, продуцирующих БЛРС. А для этого необходимо надежное микробиологическое обеспечение. Без микробиологической службы установить образование БЛРС невозможно, а следовательно клинические микробиологи должны уметь использовать существующие варианты методов определения бета-лактамаз (и не только расширенного спектра действия).

Некоторые из этих методических приемов детально описаны [62, 102, 158, 193] и приведены далее.

AmpC-бета-лактамазы — еще одна группа ферментов, гидролизующих бета-лактамы кольцо (амидную связь) в молекуле многих бета-лактамы антибиотиков. Среди возбудителей заболеваний человека образование этих бета-лактамаз широко распро-

странено, хотя их встречают несколько реже, чем БЛРС (ESBL). Факт продукции AmpC-бета-лактамаз микроорганизмами имеет большое клиническое значение, поскольку часто делает большую группу ведущих противомикробных лекарственных средств неэффективными, а их применение ошибочным [99, 142].

AmpC-бета-лактамазы имеют необычно длинную историю. Когда в 1940 г. E. Abraham и E. Chain обнаружили ферментативный характер разрушения пенициллина кишечной палочкой, они впервые столкнулись с AmpC-бета-лактамазами, которые, естественно, тогда так не называли. Напомним, что пенициллин еще не был тогда клинически значимым средством. Это название появилось спустя три десятка лет на основе разностороннего изучения структуры ферментов и кодирования их образования в хромосомном аппарате микробной клетки. С AmpC-бета-лактамазами часто связана и природная (конститутивная), и индуцированная (вторичная) резистентность многих бактерий к большинству широко применяемых антибиотиков бета-лактамной структуры (пенициллины, цефалоспорины, монобактамы) [58, 99, 154].

Для микробиологической службы определение AmpC-бета-лактамаз имеет серьезное значение по двум причинам. Установив образование микробом этих ферментов исследователь может моментно исключить из числа активных целую группу препаратов, порой вопреки результатам традиционного определения чувствительности микроорганизма к этим же антибиотикам. Во-вторых, это позволяет дифференцировать БЛРС от AmpC-бета-лактамаз. У них частично разный спектр действия на бета-лактамные структуры, но при обычном исследовании (скрининге) результат получается очень похожим. Выбор антибиотика для лечебных целей может в итоге оказаться ошибочным. В свою очередь это означает, что определение AmpC-бета-лактамаз важно не только для микробиолога, но и для лечащего врача. В конечном счете — для больного.

Попробуем кратко суммировать основные характеристики AmpC-бета-лактамаз в той мере, какой она определяется задачами микробиологического исследования их образования возбудителями заболеваний (т. е. важных для повседневной клинической практики) [60, 99, 154].

1. Основными продуцентами AmpC-бета-лактамаз являются преимущественно грамотрицательные бактерии, принадлежащие к разным семействам и родам. В этом они

несколько отличаются от БЛРС, продуцентами которых (во всяком случае, что убедительно доказано) являются представители семейства *Enterobacteriaceae*. AmpC-бета-лактамазы тоже образуются родами, входящими в это семейство. Но кроме того их образуют *Pseudomonas spp.* (в т.ч. *P.aeruginosa*), *Acinetobacter spp.*, *Aeromonas spp.*, *Chromobacterium violaceum*, *Mycobacterium smegmatis* и некоторые другие микроорганизмы, большинство из которых способны вызвать инфекционную патологию.

Перечень родов семейства *Enterobacteriaceae*, представители которых могут продуцировать AmpC-бета-лактамазы, велик. Исторически эти ферменты впервые были обнаружены у нескольких видов *Citrobacter spp.*, и *Enterobacter spp.* (в т.ч. *C.freundii* и *E.aerogenes*), а затем у многих штаммов *E.coli* и других видов эшерихий. Продуцентами ферментов оказались также штаммы родов *Erwinia*, *Morganella*, *Shigella*, *Salmonella*, *Providencia* и др. Ферментообразование отмечено и у нескольких видов, чьи патогенность не доказана.

2. С точки зрения интересов клиники, важнейшей характеристикой AmpC-бета-лактамаз является спектр их действия, т.е. какие антибиотики разрушают данные ферменты. В обобщенном виде это выглядит следующим образом: AmpC-бета-лактамазы гидролизуют (инактивируют) пенициллины, включая ампициллин, цефалоспорины 1–3 поколений, включая цефотаксим, цефтриаксон, цефтазидим, монобактамы, в т.ч. единственный применяемый в клинической практике — азтреонам. Особый вопрос — действие этих ферментов на цефалоспорин 4 поколения — цефепим. То, что AmpC-бета-лактамазы способны разрушать и этот антибиотик, сомнений нет. Однако, процесс его инактивации длительный, частичный и проявляется в снижении чувствительности бактерий к цефепиму далеко не всегда. Это позволяет использовать тест на чувствительность микроба к цефепиму для дифференциации бета-лактамаз. А вот вопрос о том, можно или нет использовать цефепим для лечения больного, если возбудитель образует AmpC-бета-лактамазы, остается открытым. К такой возможности относятся, по меньшей мере, с сомнением.

Еще одно замечание, о котором необходимо упомянуть, поскольку у следящих за литературными данными читате-

лей могут возникнуть вполне оправданные вопросы. Дело в том, что в предшествующем абзаце о спектре действия AmpC-бета-лактамаз сказано, что приведены обобщенные данные. Это существенная оговорка. Микробы могут образовывать разные AmpC-бета-лактамазы. Они хорошо изучены и каждый имеет свою маркировку. Ферменты отличаются друг от друга по структуре (хотя все они сериновые гидролазы), но, главное, они различны функционально: на тот или иной антибиотик бета-лактаманной структуры они могут действовать (разрушая антибиотик полностью или частично) или не действовать, скорость гидролиза (кинетические параметры) может быть различна. Соответственно МПК антибиотика в результате воздействия фермента может возрасти значительно, умеренно или вообще не меняться. Казалось бы, для клинической интерпретации результатов тестирования все это может быть очень важно. И это действительно так. Но на самом деле в условиях клинической микробиологической лаборатории провести дифференциацию бета-лактамаз данной группы (впрочем, как и всех остальных групп) очень трудно. Поэтому, в практической жизни проще судить об образуемых микробом бета-лактамазах по признакам группы, а не отдельных ее представителей. И вот в этой связи очень важны те признаки, которые дают такую возможность.

3. Как уже подчеркивалось выше, центральное место в дифференциации бета-лактамаз занимает их чувствительность к ингибиторам. Она у каждой группы своя. Вспомним, что важнейшим маркером для БЛРС (ESBL) является их чувствительность к нашедшим клиническое применение бета-лактаманым по структуре ингибиторам: клавулановой кислоте, сульбактаму и тазобактаму. Так вот, AmpC-бета-лактамазы устойчивы к этим ингибиторам, ни один из них, в том числе клавулановая кислота, на активность AmpC-бета-лактамаз не действует. Зато у них есть свои ингибиторы, в том числе бета-лактаманной структуры; среди доступных и наиболее часто используемых — хорошо известный антибиотик клоксациллин (напомним, что это полусинтетический пенициллин, близкий по своему спектру действия к оксациллину). Клоксациллин, как антибиотик, не действует на грамотрицательные бактерии, перечисленные выше.

Зато он обладает сродством к AmpC-бета-лактамазам, которые образуют те же самые грамотрицательные бактерии, и это «защищает» другие бета-лактамные антибиотики, пенициллины, цефалоспорины и монобактамы, от разрушающего действия ферментов. Клоксациллин самый доступный ингибитор для использования в диагностических целях микробиологами для определения AmpC-бета-лактамаз. Для дифференциации бета-лактамаз применяют также борониевые кислоты (фенилборониевую кислоту, аминофенолборониевую кислоту и др.). Интерес к ним в последние годы возрос. Они действуют так же, как клоксациллин — ингибируют AmpC-бета-лактамазы. А вот бета-лактамазы иных групп, в том числе БЛРС, клоксациллин и борониевые кислоты не ингибируют.

4. Штаммы, образующие AmpC-бета-лактамазы, получили широкое распространение. Они найдены у человека, домашних и диких животных, в продуктах питания, в кормах. Сообщения об их обнаружении поступили практически со всех континентов, из Европы, Азии, Африки, из стран Северной и Южной Америки, Австралии. Пожалуй, только Антарктида осталась в стороне (впрочем, автор не стремился охватить все публикации подобного рода). Гены, кодирующие ферментообразование, расположены и в хромосомном материале микробной клетки и на плазмидах. Последнее создает серьезные предпосылки для распространения устойчивости от штамма к штамму, в т.ч. межвидовой. Видимо, тем не менее, главным источником резистентных штаммов остается человек, которого лечат антибиотиками. Вчера это были преимущественно стационарные больные, сегодня больные не только стационаров, но и амбулаторные. Серьезную роль в этом играет антибиотикотерапия, точнее, не контролируемое, не продуманное использование антибиотиков.
5. Роль антибиотикотерапии бета-лактамными препаратами для проявления устойчивости, связанной с образованием AmpC-бета-лактамаз, особо демонстративна. Ее необходимо учитывать, в том числе при формировании тактики лабораторного (микробиологического) обслуживания больного. Гены, кодирующие образование AmpC-бета-лактамаз, встречаются в микробной клетке значительно чаще, чем

проявление антибиотикорезистентности, выявляемой стандартными методами. Образно говоря, гены есть, а устойчивости нет. Это происходит потому, что гены «не функционируют», они находятся в подавленном состоянии. А раз гены не функционируют, то и образование ферментов не происходит. Когда проводится антибиотикотерапия и микроб, соответственно, подвергается антибиотической атаке, одной из его ответных защитных мер — команда на активизацию действия гена. Происходит т. н. дерепрессия, из подавленного состояния ген переходит в активное. И, в силу полученной команды, клеточные структуры микроба начинают синтезировать бета-лактамазы. Такая последовательность событий (во многом универсальная) для продукции AmpC-бета-лактамаз особенно типична. А это важно и с лечебной точки зрения, и как фактор, определяющий последовательность действий микробиолога. Микробиологическое обеспечение должно быть повторным, динамичным, нацеленным на выявление этих ферментов. Это особенно важно, когда речь идет о тяжелой патологии, требующей длительной и повторной антибиотикотерапии. Причем, чем раньше будет установлен факт ферментообразования, тем лучше для больного, тем эффективнее лечение.

6. Все вышесказанное говорит о том, что проблема диагностики образования граммотрицательными бактериями AmpC-бета-лактамаз требует специальных методик. Фенотипические, стандартные методы в такой ситуации не всегда дают надежный результат или он оказывается запоздалым. Такие методики существуют, но их стандартизация пока недостаточна, да и критерии оценки результата исследования условны. Однако, это не означает их непригодность. Они способны дать важную информацию, позволяющую осуществить и выбор, и своевременную замену применяемого антимикробного препарата. Обзор этих методик дан далее.
7. И, наконец, последнее. Вернемся к вопросу — почему важно определять AmpC-бета-лактамазы, зачем следует дифференцировать различные группы ферментов, выделяя, в частности, AmpC-бета-лактамазы. Ответ на этот вопрос дан клиникой. Исследования показали, что устойчивость бактерий к бета-лактамам антибиотикам, возникающая вследствие образования AmpC-бета-лактамаз и часто проявляющаяся

на фоне уже проводимой антибиотикотерапии, существенно снижает эффективность лечения, увеличивает срок пребывания больного в палате интенсивной терапии и на больничной койке в целом, способствует возникновению осложнений; в результате стоимость лечения значительно возрастает. Естественно, что все это происходит, прежде всего, в том случае, если микробиологическая служба недостаточно оперативно и разносторонне выполняет свои функции.

Таким образом, разработка и использование методов определения AmpC-бета-лактамаз имеет серьезный клинический смысл. Этому посвящен ряд работ [26, 37, 99, 167, 194], направленных именно на то, чтобы решить проблему доступной методологии выявления ферментов, а также их отличий от других бета-лактамаз.

Еще одна группа ферментов, определяющая антибиотикорезистентность возбудителей заболеваний человека и заслуживающая внимания микробиологической службы (в том числе и потому, что она может быть выявлена в клинической лаборатории) — это металло-бета-лактамазы. Они названы так, поскольку в структуре активного центра содержится металл (цинк). Если о БЛРС известно уже более трех десятилетий, а с AmpC-бета-лактамазами микробиологи вообще столкнулись на заре антибиотической эры, то металло-бета-лактамазы более «молоды». Без большой натяжки можно сказать, что значительный интерес к ним возник с появлением проблемы устойчивости грамотрицательных бактерий к карбапенемам (имипенем, меропенем, эртапенем, дорипенем) [33, 70, 84, 148, 165, 192, 198]. Недаром и в 90х годах прошлого века, да и в наше время их часто называли и называют карбапенемазами, хотя ферменты, гидролизующие бета-лактамное кольцо в молекуле карбапенемов, не обязательно принадлежат к металло-бета-лактамазам. Эта группа ферментов вызывает особую настороженность. Вопросы, на которые сегодня еще трудно ответить, какое распространение они получают в будущем, какие виды микроорганизмов приобретут способность их продуцировать. Недаром, в одной из совместных работ, вышедшей из-под пера английских и французских авторов, ставится вопрос, не является ли появление металло-бета-лактамаз предвестником «бури» [198]. И дело не в своеобразии структуры этих ферментов, а в спектре их действия. По сути, он максимален. Суммарно, металло-бета-лактамазы могут инактивировать любой бета-лактамный антибиотик. Если способность их продуцировать приобретут

многие микроорганизмы, возбудители заболеваний человека, если распространение таких штаммов примет пандемические формы, человечество полностью лишится бета-лактамов, основной группы антимикробных лекарственных средств, замены которым, пока, не придумали. Поиск ингибиторов металло-бета-лактамаз, имеющих клиническое (лечебное) значение, противоэпидемические мероприятия могут лимитировать или приостановить распространение этого негативного процесса. Но для реализации подобных мер необходимо доступным и эффективным способом определять продукцию микробом металло-бета-лактамаз, идентифицировать именно их среди прочих бета-лактамаз, в том числе таких распространенных, как БЛРС или AmpC-бета-лактамаз. Реальность таких исследований показана, хотя еще многое надо сделать для их стандартизации. Обзор предложенных методических приемов представлен далее. Но, прежде всего, остановимся кратко на тех характеристиках металло-бета-лактамаз (МетБЛ), которые позволяют выявлять их и судить о свойствах этих ферментов.

1. Металло-бета-лактамазы способны продуцировать многие микроорганизмы, причем и грамотрицательные (это основная группа), и грамположительные (пока установлено для ограниченного количества родов). Перечень родов (видов) грамотрицательных бактерий достаточно велик: это т. н. неферментирующие бактерии (роды *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Stenotrophomonas*), это многие роды (виды) семейства *Enterobacteriaceae* (*Enterobacter spp.*, *Proteus spp.*, *Providencia spp.*, *Klebsiella spp.*, *Shigella flexner*, *Escherichia coli* и нек. др.). Среди грамположительных бактерий пока лишь некоторые виды бацилл.

Тем не менее, несмотря на столь «солидный» список продуцентов, исторически сложилось так, что наиболее частыми микроорганизмами, способными образовывать МетБЛ, оказались *P. aeruginosa* и *A. baumannii*. У исследователей изначально, особый интерес вызвала их устойчивость к карбапенемам. Эти же микроорганизмы в значительной степени привлекают внимание и сегодня, поскольку образование ими МетБЛ резко ухудшает перспективу терапии вызванных ими инфекций. В то же время довольно быстро нарастает число сообщений о МетБЛ, продуцентами которых являются представители сем. *Enterobacteriaceae*. Пока

число таких штаммов этих многочисленных родов и видов относительно невелико, устойчивость к карбапенемам хотя и нарастает, но еще не приняла драматического характера. Впрочем, «пестрота» в количественных показателях частоты выделения штаммов — продуцентов МетБЛ очень существенна: от десятых долей процента до 10%. И это сегодня, а что будет завтра? Отсюда и опасения «бури», которые упомянуты выше. Остановится ли этот процесс, удастся ли его остановить, ответы пока остаются «за скобками».

2. Как уже подчеркнуто выше, МетБЛ обладают максимально возможным спектром гидролизующего действия на антибиотики бета-лактамной структуры. Он включает все реально используемые в клинике группы антибиотиков — бета-лактамов: пенициллины, цефалоспорины (включая цефамицины), карбапенемы, монобактамы. Но, оговоримся, это если иметь в виду суммарный эффект. МетБЛ достаточно большая группа ферментов. Хотя наличие цинка в активном центре является для них общей обязательной характеристикой, тем не менее, структурно и функционально в той или иной степени МетБЛ различаются. Это, в частности, проявляется по способности к гидролизу бета-лактамного кольца у монобактамов (азтреонама): она может быть, а может и не быть. МетБЛ отличаются друг от друга и по действию на карбапенемы. Степень их инактивации разными ферментами этой группы может быть различной. Это важно иметь в виду, в частности, и потому, что фенотипически выявляемая устойчивость бактерий, продуцирующих МетБЛ, может быть различной; ее может и не быть, хотя фермент микроб образует. Действие МетБЛ способно проявиться по мере нарастания ее синтеза микробом на более поздних стадиях инфекционного процесса. Бактерии, как правило, образуют одну МетБЛ, но уже показано, что отдельные штаммы способны синтезировать два фермента. Как далее пойдет этот процесс можно лишь предполагать. Естественно, что чем больше МетБЛ синтезирует клетка, тем выше «потенциал» резистентности, тем менее вероятен клинический эффект при применении бета-лактамных антибиотиков.

Сам по себе факт образования микробами разных или нескольких (но не более двух) МетБЛ для повседневной практики микробиологических лабораторий клинических

- учреждений большого значения не имеет, поскольку доступных, простых в реализации методов их раздельного определения не существует. Все, что доступно, это установление самого факта их синтеза тестируемым микробом.
3. Выявление МетБЛ основано на их особой чувствительности к ингибиторам — она строго индивидуальна для данной группы. Решающую роль в этом отношении сыграло наличие цинка в активном центре фермента. Ни у одной из других групп бета-лактамаз активный центр металла не содержит. Если связать цинк с каким-либо чужеродным для фермента соединением, каталитическая активность бета-лактамазы окажется заблокированной. Такие соединения хорошо известны; это т. н. хелатообразующие агенты. Наиболее доступным веществом, обладающим подобным «захватывающим» действием, является этилендиаминтетрауксусная кислота, ЭДТК (в английской транскрипции EDTA). Это соединение, отдаленно напоминающее клешни краба, необратимо связывается «клешнями» с цинком в молекуле МетБЛ, и фермент полностью теряет свою активность (естественно, что слово «полностью» приемлемо только при адекватной концентрации и фермента, и ЭДТК). Иные группы бета-лактамаз ЭДТК не ингибирует, в том числе БЛРС и AmpC-бета-лактамазы (за некоторыми исключениями, которыми можно пренебречь). Подобным ингибирующим действием обладает ряд соединений, но для диагностических целей, как правило, используют ЭДТК и, что значительно реже, меркаптопропионовую кислоту. Есть любопытная информация о том, что можно получить ингибиторы не всех МетБЛ, а отдельных представителей этой группы ферментов. Если удастся внедрить эти соединения в практику, то не исключено, что в силу своеобразия спектра действия каждой из МетБЛ, некоторые бета-лактамные антибиотики можно будет использовать для лечебных целей в том случае, если возбудитель заболевания окажется продуцентом такого фермента. Но это в будущем. Пока речь идет о диагностике всей группы МетБЛ, суммарно. Их чувствительность к ингибитору — важнейший маркер ферментообразования.
 4. Естественный вопрос, зачем выявлять продукцию микробом МетБЛ? Влияют ли они на результативность терапии

бета-лактамами антибиотиками? Клинические данные, пока еще, правда, немногочисленные, определенно дают положительный ответ на этот вопрос. Образование МетБЛ делают перспективу антибиотикотерапии бета-лактамами препаратами не только сомнительной, но и опасной для больного. Можно считать доказанным, что если микроб устойчив к выбранному лечебному препарату из-за образования МетБЛ эффективность лечения резко падает, удлиняется время пребывания больного в стационаре, в том числе в палате интенсивной терапии, возникают рецидивы заболевания, требующих повторных курсов противомикробной терапии, возрастает стоимость лечения. И самое, в итоге, неприятное, — выбор антимикробных препаратов, особенно при тяжелом течении заболевания, становится непозволительно узким. Обеспечение полноценной терапией больного превращается в трудную, порой, нерешаемую задачу.

5. Сказанное в предшествующей фразе с особой остротой проявляется при госпитальных инфекциях. Образование МетБЛ кодируется генами, локализуемыми как в хромосомной субстанции, так и в плазидах. В первом случае диссеминации генного материала не происходит, а вот во втором она возможна. Насколько часто это происходит, сказать пока трудно. Но то, что идет процесс распространения штаммов, продуцирующих МетБЛ, сомнений не вызывает. На это указывают исследования, проведенные в Европе, Северной Америке, на Дальнем востоке. Поэтому, поисковые работы, направленные на выявление микроорганизмов, продуцирующих МетБЛ, имеют значение и для лечебного процесса, и для проведения противоэпидемических мероприятий, о необходимости которых в последние годы много говорят. Естественно, что выполнение всего комплекса исследований возможно только при условии использования надежных и, что очень важно, стандартизованных методов определения ферментов. Как уже подчеркивалось, для БЛРС это, пусть не очень удачно и не всегда надежно, но сделано; для определения AmpC-бета-лактамаз какое-то подобие стандартизации метода предусмотрено существующим стандартом CLSI. Металло-бета-лактамазы пока оказались вне этого процесса. Опубликован ряд методик, очень близких по технике исполнения к определению дру-

гих бета-лактамаз, но имеющих свои особенности [29, 31, 115, 155, 156, 189]; некоторые другие, по сути, являются не специфичными методиками, а универсальными [123, 143], но они нашли распространение при определении МетБЛ. Некоторые из этих методик будут приведены далее, хотя, подчеркнем еще раз, они, пока, не являются стандартизованными, не являются общепризнанными.

* * *

В данной работе не ставилась задача рассмотрения проблемы терапии инфекций, вызванных грамотрицательными бактериями, которые образуют бета-лактамазы различных групп, включая МетБЛ, БЛРС, AmpC-бета-лактамазы. Однако, выше не раз подчеркивалось, что их продукция серьезно ограничивает потенциал этиотропного лечения. Это ставит особые задачи перед лабораторной службой. Бета-лактамы антибиотики были и остаются основным семейством противомикробных лекарственных средств при лечении сепсиса, эндокардита, заболеваний легких и дыхательных путей, в том числе протекающих в тяжелой форме, перитонита, раневой инфекции и мн. др. Бета-лактамазы бактерий полностью или частично (но обязательно в значительной степени) исключают их из арсенала потенциально перспективных препаратов. Лечащий врач и, в еще большей степени, больной человек оказываются в драматичной ситуации. Вопрос, чем лечить, становится более, чем актуальным. Поиск ответа на него постоянно ведется, но решение далеко не всегда выглядит простым и, что еще хуже, оптимальным. Когда речь идет о возбудителе заболевания, образующем БЛРС, обычно называют карбапенемы (имипенем, меропенем и др.). Это приемлемый, хотя и дорогостоящий вариант. Полагают, что эффективными могут считаться цефамицины (цефокситин, цефотетан) и ампициллин с клавулановой кислотой, хотя их потенциал при тяжелой инфекции и высокой устойчивости бактерий к ампициллину далеко не всегда достаточен. В качестве антибиотиков резерва следует упомянуть амино-гликозиды, новые тетрациклины (тигециклин), полимиксины.

При инфекционном процессе, вызванном микробом, образующим AmpC-бета-лактамазы, цефамицины (цефокситин) уже не приемлемы. Эффективны карбапенемы и, чаще всего, цефепим (цефалоспорин IV поколения), хотя устойчивость возбудителя к

этому антибиотику возможна. Антимикробные препараты других групп, не бета-лактамы, которые потенциально приемлемы, перечислены выше (аминогликозиды и др.). Следует, однако, напомнить, что в силу общей локализации генов резистентности и к бета-лактамам, и к другим антибиотикам, микроб может быть устойчив не только к бета-лактамам, но и к аминогликозидам, и к фторхинолонам и нек. др. препаратам.

Наиболее сложен выбор антибактериальных антибиотиков при заболеваниях, которые вызваны продуцентами МетБЛ. Причина этого уже названа — способность к разрушению всех клинически значимых бета-лактаменных антибиотиков. Предлагаемые в этих случаях альтернативные препараты для терапии тяжелых инфекционных процессов выглядят не самыми надежными. Это полимиксины, чья токсичность, как утверждают сегодня, не так уж «страшна», но, тем не менее, она не позволяет назначать их в больших дозах, необходимых для достижения бактерицидного действия (что при септических процессах важно). Это аминогликозиды, о назначении которых тяжелым больным можно повторить все то же, что говорилось о полимиксинах. Называют среди альтернативных препаратов тигециклин, рифампицин, фторхинолоны. Во всех случаях о целесообразности их назначения можно судить только с учетом полноценных лабораторных данных.

Итак, определение бета-лактамаз, пусть не всех, но, тем не менее, играющих очень важную роль в развитии устойчивости грамотрицательных бактерий к антибактериальным препаратам, может помочь в проведении эффективной и клинически, и экономически, антибиотикотерапии. Теперь резонно было бы перейти к обсуждению чисто технических приемов, которые предлагаются для выявления БЛРС, AmpC- и МетБЛ. Однако, не в методическом, но в организационном плане, все обстоит не так просто. Дело в том, что отечественные микробиологи обязаны (и это верно) следовать официальным методическим указаниям (МУК 4.2.1890-04), в которых предусмотрено выявление БЛРС у штаммов *Enterobacteriaceae* т.н. «фенотипическими» методами, т.е. методом серийных разведений и диск-диффузионным методом. Эта установка, в целом, близка к рекомендациям, которые были приняты за рубежом до 2010г. Однако, существенное изменение критериев чувствительности грамотрицательных бактерий к бета-лактамам антибиотикам, сделанное за рубежом, внесло очень важные коррективы в сами показания для применения этих методик, фактически, для клинических целей сле-

лав специальные исследования ненужными. Вот эти разночтения следует обсудить. Напомним, что согласно МУК определение БЛРС включает два этапа. Первый предполагает выявление тех штаммов, которые потенциально могут быть продуцентами бета-лактамаз. Эти штаммы еще не устойчивы; если не думать о БЛРС, их вообще можно назвать чувствительными к бета-лактамным антибиотикам, но, тем не менее, и МПК (если используют метод серийных разведений), и диаметр зоны подавления роста микроба вокруг диска дают основание предполагать, что микроб обладает способностью образовывать БЛРС. Он по формальным критериям чувствителен, но при терапии антибиотиком бета-лактамной структуры это его свойство продуцировать фермент проявится устойчивостью возбудителя к применяемому препарату. Если такая потенциальная опасность реальна, и она установлена, переходят к исследованию, прямо направленному на выявление БЛРС. Значит есть этап, который ориентирован на обычные показатели, получаемые при стандартном определении чувствительности серийными разведениями или дисками (его так и называют — отборочный, скрининговый) и специальный (тестовый, подтверждающий). Вот для первого этапа и существуют или МПК, или диаметры зон подавления роста вокруг диска, которые являются показателями возможного ферментообразования. Они приведены в соответствующей таблице МУК. В чем же причина разночтений, о которых упомянуто выше? Очевидно, что БЛРС могут определять в трех случаях. Чаще всего это делают для правильного выбора лечебного препарата, т.е. для антибиотикотерапии. Кроме этого, тест важен для эпидемиологических исследований и, наконец, при решении научных проблем. Остановимся на первом, он наиболее очевиден и важен для практических лабораторий. Зададим себе вопрос, когда приведенные в таблице показатели потенциальной опасности образования БЛРС важны для микробиолога? Да тогда, когда они входят в противоречие с показателями чувствительности. Последние могут говорить о том, что микроб чувствителен к антибиотику, а первые нет, — могут образовываться БЛРС, и антибиотик не целесообразно применять. И не только его, а все те бета-лактамные препараты, которые разрушаются БЛРС. Возьмем частный случай. Определяем чувствительность *E. coli* к цефотаксиму методом серийных разведений, МПК — 4 мкг/мл; по табличным данным микроб чувствителен к данному антибиотику. Казалось бы, на этом можно и закончить исследования. Но, по данным МУК, если МПК равно 2 мкг/мл (или

более, например, 4 мкг/мл), то это показатель тревоги — тестируемый микроб может образовывать БЛРС. Значит надо ставить подтверждающее исследование. Или другой пример. Зона подавления роста *K. pneumoniae* вокруг диска с цефтриаксоном 21 мм. Смотрим в таблицу критериев чувствительности — микроб чувствителен к цефтриаксону. А теперь посмотрим, что утверждается по МУК об опасности образования БЛРС. Оказывается, если зона равна или менее 25 мм, есть основание опасаться БЛРС. Нужен прямой (подтверждающий) тест. Если проанализировать то, что приведено в таблице МУК, то окажется, что такие ситуации не исключение. Однако, в последние годы сначала европейцы, а затем и в США CLSI резко ужесточили требования к показателям чувствительности бактерий семейства *Enterobacteriaceae* к цефалоспорином и азтреонаму (см. табл. 3.3). Оказалось, что контрольная цифра для БЛРС может оказаться адекватной новому критерию промежуточной чувствительности или, даже, близкой к резистентности. Например, бактерии семейства *Enterobacteriaceae* чувствительны к цефотаксиму при МПК 1 мкг/мл, а контрольная цифра для штаммов, способных (потенциально) образовывать БЛРС — 2 мкг/мл. Аналогичны контрольные цифры и для цефтриаксона. Резистентность этой группы бактерий к цефподаксиму определяется той же МПК, что и «тревожная» концентрация для БЛРС. По мнению ряда специалистов, в этой связи тест на БЛРС становится ненужным. Есть, правда, и другие доводы и мнения. Забегая вперед заметим, что аналогичная ситуация сложилась не только с показаниями для определения БЛРС, но и карбапенемаз, что говорит о необходимости проведения более согласованной и динамичной политики в области изучения и контроля антибиотикорезистентности (в нашей стране особенно).

Естественный вопрос: так может быть действительно нет необходимости оценивать потенциал микробов-возбудителей по их способности продуцировать БЛРС; ведь это упростит и без того не простую жизнь клинических микробиологов. Пока, однако, во многих ситуациях ответ на этот вопрос остается отрицательным по нескольким причинам. Во-первых, далеко не везде введены в обиход новые критерии чувствительности (Россия, на момент написания книги, не исключение). Во-вторых, эти новые критерии охватывают далеко не все антибиотики цефалоспориновой группы и лишь косвенно, опосредованно, распространяются на другие цефалоспорины и пенициллины. Далее, число родов (видов) микроорганизмов, потенциальных продуцентов БЛРС, для которых су-

шествуют критерии, позволяющие оценивать их именно по этому признаку, более, чем лимитировано (по сути, всего 4 микроорганизма). В-четвертых, помимо определения чувствительности микроорганизмов с целью выбора антибиотика для лечения больного, очень важную роль подобные исследования имеют для оценки эпидемической ситуации и в отдельном лечебном учреждении, и в региональном масштабе. Такие данные могут быть получены только прямым определением бета-лактамаз. Еще один довод, на который обратило внимание в США Управление по пищевым продуктам и лекарствам, новые критерии чувствительности к цефалоспорином исключают возможность использования автоматических устройств, определяющих чувствительность к антибиотикам. Такие устройства используют и в нашей стране. Они запрограммированы на определенные показатели, а замена процессоров дело достаточно сложное и расходное. Автор позволит себе привести еще один довод, который не более, чем его частная точка зрения. Отечественная практика микробиологического обеспечения противомикробной терапии очень лимитирована (исключения не в счет). Для преодоления сложившейся ситуации подготовку специалистов и перечень их функций, выполняемых в рамках клинических лабораторий, следует расширить, причем существенно. Естественно, при обязательном надлежащем обеспечении всем необходимым для этих целей. Определение бета-лактамаз, в первую очередь БЛРС, — это важный составной элемент достаточного уровня клинически важных микробиологических исследований, полезных и для микробиолога, и, в еще большей степени, для врача, лечащего тяжелого больного.

Теперь целесообразно перейти к самому исследованию. Начнем с определения БЛРС. Первый, скрининговый этап не требует никаких дополнительных работ, кроме отбора культур по критерию потенциальной опасности продукции этими микробами БЛРС. Следует обратить внимание на три обстоятельства; первое заключается в том, что критерии этой «потенциальной опасности» разработаны только для 5 антибиотиков: цефподоксим, цефтазидим, цефотаксим, цефтриаксон, азтреонам. Второе, что следует подчеркнуть, концентрации антибиотиков в дисках, которые используют при определении БЛРС, ничем не отличаются от концентрации их же в тех дисках, что применяют при определении чувствительности. Т.о., если ставится «рутинный» тест на чувствительность микроба к антибиотикам, то следует не забыть использовать диски, необходимые для скрининго-

вой части исследования на БЛРС. И, наконец, третье важное обстоятельство; критерии отбора культур по способности образовывать БЛРС, приведенные в таблице, разработаны только для *Klebsiella pneumonia*, *K. oxytoca*, *E. coli* (всех 5 упомянутых антибиотиков) и *Proteus mirabilis* (только 3-х антибиотиков — цефподоксим, цефтазидим и цефотаксим). Скрининговая часть исследования пригодна только для этих микроорганизмов и только с этими антибиотиками. Если речь идет о микробах иных видов или родов, то может быть использован лишь последующий т. н. подтверждающий тест.

Определенные разночтения есть в подходе к отбору тех антибиотиков, которые необходимо использовать для тестирования на образование БЛРС. Отечественные МУК достаточно конкретно определяют: или два из перечисленных выше — цефподоксим и цефтазидим, или три (если нет диска с цефподоксимом) — цефтазидим, цефтриаксон, цефотаксим. Принцип — чем больше, тем лучше. Но как трактовать полученные результаты, они могут быть разными: для одного антибиотика МПК или зона подавления роста вокруг диска могут свидетельствовать о возможной продукции микробом БЛРС, но в этом же исследовании для другого антибиотика результат может быть прямо противоположным — опасности образования БЛРС нет. В данной ситуации самый надежный выход заключается в том, чтобы считать тест положительным, если МПК (или зона подавления роста культуры) хотя бы одного антибиотика свидетельствует о возможности ферментообразования. На образование БЛРС достаточно указания в опыте с одним антибиотиком, а два или три необходимы лишь для того, чтобы вероятность заметить подобный результат была выше. Если хотя бы один антибиотик подал «сигнал тревоги», надо переходить к подтверждающему исследованию.

Для подтверждающего теста могут быть использованы как метод серийных разведений, так и «метод дисков». Отечественные МУК допускают и то, и другое. В основе метода лежит уже упомянутая выше способность клавулановой кислоты, сульбактама и тазобактама ингибировать действие БЛРС и, тем самым, потенцировать активность бета-лактамных антибиотиков. В отечественных методических указаниях предлагается использовать клавулановую кислоту в сочетании с цефподоксимом, цефтазидимом, цефотаксимом. В последних зарубежных стандартах считается достаточным использовать два сочетания: цефтазидим с клавулановой кислотой и цефотаксим с клавулановой кислотой. Два других ингибитора бе-

та-лактамаз в принципиальном плане могут быть применены, но их использование с антибиотиками не стандартизовано и в этой связи для целей рутинных клинических исследований они не пригодны.

Нет надобности повторять текст отечественных МУК, они известны отечественным микробиологам. Приведем несколько иных вариантов соответствующих методик, тем более что принципы их построения и использования не противоречат друг другу, речь идет только о деталях. По стандарту CLSI 2010 г. достаточно использовать два набора дисков: первый с цефтазидимом 30 мкг и цефтазидимом 30 мкг + клавулановая кислота 10 мкг; второй набор — цефотаксим 30 мкг и цефотаксим 30 мкг + клавулановая кислота 10 мкг. Интересна одна особенность этой части обеспечения исследования. Разработчики стандарта допускают самостоятельное приготовление дисков с сочетаниями антибиотика (цефотаксима или цефтазидима) с клавулановой кислотой. Понять логику этого предложения можно. Клавулановая кислота в растворе недостаточно стабильна, а для приготовления дисков используется именно раствор ингибитора. В результате, при изготовлении дисков получить стабильный вариант — задача не простая. «Коммерческие» диски с цефотаксимом или цефтазидимом и клавулановой кислотой распространения не получили. Выход из ситуации — лабораторное их приготовление. Для этого используют: 1) стандартные диски с цефотаксимом 30 мкг и цефтазидимом 30 мкг; 2) раствор клавулановой кислоты 1000 мкг/мл (или, что то же самое, 1 мг/мл). Для приготовления раствора делают навеску клавулановой кислоты, причем в минимальном количестве препарата — несколько мг. В качестве растворителя используют изотонический раствор хлорида натрия или дистиллированную воду с рН, близким к нейтральному. Добавляют к навеске столько мл растворителя, сколько мг вещества в навеске. Например, если навеска 10 мг, то используют 10 мл растворителя, 5 мг — 5 мл и т. д. Получают раствор, содержащий 1 мг/мл или 1000 мкг/мл. В диске должно быть 10 мкг, клавулановой кислоты. Не трудно подсчитать, что если в 1 мл содержится 1000 мкг, то 10 мкг будет в 0,01 мл (10 мкл). Т. н. автоматические пипетки, обеспечивающие подобный объем раствора, сегодня вполне доступны. Можно пользоваться «по старинке» микропипетками, столь привычными для микробиологов старшего поколения. Итак, на диск с цефтазидимом и цефотаксимом наносят по 0,01 мл (10 мкл) раствора клавулановой кислоты. Дают около 30 минут, чтобы раствор всосался в диск. Контролируют степень

влажности диска, он может быть влажным, но не мокрым (что, как правило, и бывает). Диски готовы. Их нельзя хранить и следует использовать в течение первого часа после изготовления.

Последовательность действий в целом традиционная. Готовят чашки Петри с плотной средой Мюллера-Хинтон. Приготавливают обычный для определения чувствительности инокулом по стандарту мутности 0,5 McFarland (т. е. с содержанием около $1,5 \cdot 10^8$ КОЕ/мл). Инокулируют питательную среду. В течение 15 мин. накладывают на поверхность агара 4 диска с антибиотиками (цефотаксим, цефтазидим) и их сочетанием с клавулановой кислотой. Диски следует размещать таким образом, чтобы зоны подавления роста не накладывались друг на друга. Помещают чашки в термостат не позже, чем в последующие 15 минут в перевернутом виде. Инкубируют в течение 16–18 ч при 35–37°C после чего учитывают результат. Трактовка результата проста: если диаметр зоны подавления роста микроба вокруг диска с сочетанием цефтазидима с клавулановой кислотой или цефотаксима с клавулановой кислотой больше на 5 мм (или более), чем диаметр зоны подавления роста вокруг диска соответственно с цефтазидимом или цефотаксимом, то продукция БЛРС считается подтвержденной. Не имеет значения размер зоны, учитывают разницу в диаметрах; если она меньше 5 мм, тест на продукцию БЛРС считают отрицательным, если 5 мм и более — положительным. Не обязательно, чтобы оба антибиотика в сочетании с клавулановой кислотой давали такой эффект; достаточно, чтобы один из них обеспечивал разницу в диаметрах зон в 5 мм. В этом случае тест считается положительным. В рассматриваемых рекомендациях по установлению образования БЛРС серьезное внимание уделено контрольным испытаниям. Референс штаммы, которыми рекомендовано использовать, конкретны: это хорошо известная *E. coli* ATCC 25922, чувствительная к антибиотикам бета-лактамной структуры, и *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603. Сочетания в дисках антибиотиков с клавулановой кислотой практически не способствует увеличению зоны подавления роста микроба в опыте с *E. coli* ATCC 25922. Его или нет, или оно не превышает двух мм. Если используют штамм, *K. pneumoniae*, продуцирующий фермент, диаметр зоны увеличивается на 3 мм и более, если используют диск с цефотаксимом и ингибитором, зона увеличивается на 5 мм и более, если диск содержит цефтазидим с клавулановой кислотой.

Предлагаемый в обсуждаемом документе метод серийных разведений, подтверждающий (или не подтверждающий) образова-

ние микробом БЛРС, практически не отличается от рекомендованного метода отечественных МУК. Единственно, на что обращено внимание, — целесообразность при оценке качества исследования использовать культуру *K.pneumoniae* ATCC 700603, которая образует БЛРС. В соответствующих исследованиях МПК цефотаксима и цефтазидима, если их используют вместе с клавулановой кислотой, должны уменьшаться в 8 раз, т. е. происходит сдвиг на 3 пробирики. Например, если МПК цефалоспоринов 8 мкг/мл, а вместе с клавулановой кислотой 1 мкг/мл, то тест на БЛРС считают положительным, если 2 и 4 мкг/мл, то сомнительным или отрицательным. В качестве «отрицательного» контроля, используют *E. coli* ATCC 25922, для которой МПК цефотаксима и цефтазидима при их совместном использовании с клавулановой кислотой, не меняется или изменяется в 2–4 раза, что не считается показателем образования фермента.

Вернемся к определению БЛРС с помощью дисков. Преимущество двух приведенных выше очень близких по технологии вариантов диск-диффузионного метода заключается в том, что они стандартизованы. При всей противоречивости сложившейся ситуации в связи с недавними изменениями контрольных показателей чувствительности к бета-лактамам они дают возможность микробиологу формализовать свои исследования, придать им легитимность (а это во всем мире очень важная составляющая жизни любого врача). Но приведенными методиками далеко не ограничивается весь потенциал установления образования БЛРС. Есть несколько других подходов, простых и доступных, о которых следует упомянуть. В большинстве вариантов они построены на потенцирующем действии ингибиторов бета-лактамаз, клавулановой кислоты в первую очередь. Есть очень простое исследование, которое выполнимо в рамках обычного определения чувствительности микроба к антибиотикам. Когда речь идет о чувствительности бактерий семейства *Enterobacteriaceae* среди тех дисков, которые используют, обязательно присутствуют диски с цефотаксимом и/или цефтриаксоном, а также с сочетанием амоксициллина и клавулановой кислоты. В последнем диске с точки зрения диагностики БЛРС микробиолога интересует не антибиотик, а ингибитор. Диск с сочетанием амоксициллина и клавулановой кислоты помещают на расстоянии 3 см от диска с цефалоспориновым антибиотиком (от центра диска к центру другого). Если используют два диска (цефотаксим и цефтриаксон), то диск с амоксициллином и клавулановой

кислотой помещают между ними. Все остальные действия — как обычно (питательная среда, приготовление и использование инокулюма, инкубация и пр.). Когда через 16–18 ч определяют результат, обращают внимание на зону подавления роста микроба вокруг диска с цефотаксимом (или цефтриаксоном, или обоими). Может быть так, что зона меняет свои очертания, она теряет обычную округлость. Есть несколько вариантов. Или зона принимает вытянутую с одной стороны яйцевидную форму, причем ассиметричность расположена там, где диск соседствует с диском, содержащим клавулановую кислоту. Или между двумя зонами образуется своего рода «проплешина» (слабый рост или участок полного его отсутствия). Или зона вокруг диска с цефалоспориновым антибиотиком образует выброс, что-то вроде «протуберанца» и др. Во всех случаях это результат действия ингибитора бета-лактамаз, диффундирующего из диска с сочетанием (ампициллин и клавулановая кислота), подавляющего БЛРС и позволяющего антибиотику из

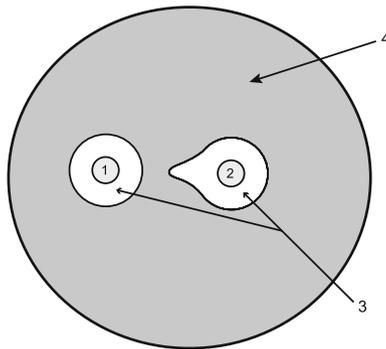


Рис. 3.1. Схема исследования на образование микроорганизмом БЛРС. Использование диска с амксициллином и клавулановой кислотой

Комментарии к рисунку:

1 — Диск с амксициллином и клавулановой кислотой (КК).

2 — Диск с антибиотиком цефалоспориновой группы 3го поколения (цефотаксим, цефтриаксон и др).

3 — Зона подавления роста.

4 — Микробный газон.

Деформация зоны подавления роста вокруг диска с антибиотиком цефалоспориновой группы (2) является результатом диффузии из диска с амксициллином и клавулановой кислотой (1) ингибитора (КК). Подавляется БЛРС, образуемая тестируемым микробом. Если микроб БЛРС не образует, деформации зоны подавления роста не происходит.

соседнего диска подавить рост культуры. Если подобная аномалия выражена отчетливо, можно с уверенностью утверждать — микроб образует БЛРС. К сожалению, когда фермента мало, эффект может быть нечетким и тогда трудно утверждать, есть ли он. Поэтому предлагают уменьшить расстояние между дисками до 2 см. Но в этом случае есть опасность наползания одной дозы на другую. А это тоже может затруднить чтение результата.

Заметим, что приведенный эффект достигим не только при использовании дисков с цефотаксимом и цефтриаксоном, но и с азтреонамом, цефтазидимом, цефепимом и нек. др. бета-лактамидами.

Предлагают таким же образом использовать диск только с клавулановой кислотой (10 мкг/диск). Он не дает зоны, как это бывает, когда используют ингибитор в сочетании с амоксициллином (эта зона иногда мешает чтению результата). Но тогда исследование носит специальный характер — появляется дополнительный диск. Некоторые результаты таких исследований приведены на рис. 3.1 и 3.2.

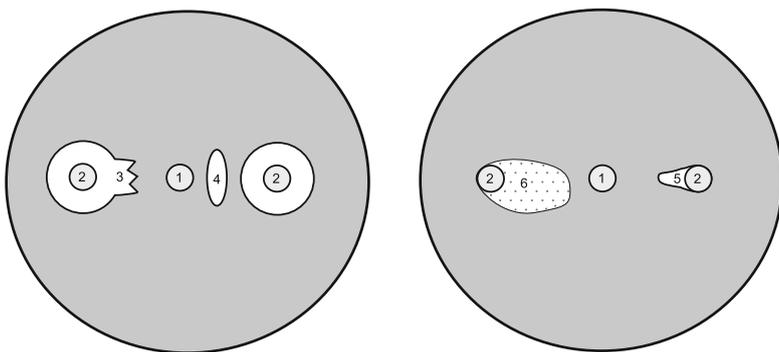


Рис 3.2. Схема определения БЛРС с использованием диска, пропитанного клавулановой кислотой. Варианты, подтверждающие ферментообразование микробом, образующим газон

Комментарии к рисунку:

1 — Диск с клавулановой кислотой (КК).

2 — Диск с антибиотиками, которые разрушают БЛРС.

3 — Деформация зоны подавления роста (образование «языка»).

4 — Дополнительная зона подавления роста микроба.

5 — Зона отсутствует, но со стороны диска с ингибитором участок подавления роста микроба.

6 — Зона отсутствует. Но со стороны диска с ингибитором участок частичного подавления роста микроба (внутри зоны разрозненные мелкие колонии или вуалеобразный рост).

Интересное предложение сделано разработчиками E-теста. Предложено с помощью одной полоски определять МПК антибиотика и антибиотика в сочетании с клавулановой кислотой. Препарат (цефотаксим, цефтазидим или др.) расположен на одном конце полоски, и он же с клавулановой кислотой — на другом. Соответственно деления с указанием концентраций также есть с одного и другого конца. Образуются две зоны. Если МПК с обеих сторон полоски совпадают — БЛРС нет. Если там, где антибиотик сочетается с клавулановой кислотой, зона подавления роста увеличивается на 3 деления (т. е. МПК уменьшается в 8 раз), это трактуется как очевидный признак образования фермента. Подобные приспособления для E-теста выпускаются как коммерческая продукция и получили определенное признание (в том числе, упоминаются в ряде методических пособий за рубежом).

Любопытный и очень демонстративный метод определения БЛРС был предложен в конце прошлого века К. Thomson с соавторами [193]. Он получил название Three-Dimensional Test. Авторы назвали его так, считая, что в нем к двухдисковому методу определения чувствительности добавляется еще один шаг. Поэтому на русский язык с определенной условностью можно перевести название метода как «трехшаговый». В чем его суть (далее будет дан вариант К. Thomson и С. Sanders)? Авторы использовали известный факт влияния плотности инокулюма (концентрации микробных клеток в инокулюме) на образование и, соответственно, активность бета-лактамаз. Чем больше концентрация клеток, тем вероятнее проявление гидролитического действия фермента, тем меньше будет проявляться действие антибиотика. А раз так, то и зона подавления роста вокруг диска будет уменьшаться. Вопрос заключается в том, как совместить на одной чашке два инокулюма, как дать возможность на одной и той же чашке с питательной средой вокруг одного и того же диска с антибиотиком проследить рост (или его отсутствие) одного и того же микроба, но с разным количеством клеток в инокулюме. Авторы предложили довольно простое решение. Готовят две взвеси изучаемого микроорганизма: одну (первый инокулюм) по стандартной методике (как для определения чувствительности), т. е. с содержанием микроба около $(1-2) \cdot 10^8$ КОЕ/мл (по стандарту мутности 0,5 McFarland). Второй инокулюм должен содержать на порядок, а лучше на два порядка клеток больше, т. е. от 10^9 до 10^{10} КОЕ/мл. Приготавливают чашку с плотной питательной средой — агаром Мюллера-Хинтон или иной средой, используемой для определения

чувствительности. Взяв стандартный инокулюм (первый) производят посев на поверхности агара культуры, так, как это делается для определения чувствительности микроба к антибиотикам. А далее производят несложную и необычную манипуляцию. Для нее необходимо тонкое и острое лезвие. Это может быть офтальмологический скальпель или половина лезвия от безопасной бритвы, зажатой в держателе (например, в зажиме Пеана), или что-либо подобное. Глазом определяют место, куда будет положен диск и в 3 мм от внутреннего края диска (т. е. по направлению к центру) проникают лезвием в питательную среду до дна чашки и производят разрез среды параллельно краю чашки циркулярно, по кругу. Образуется циркулярная щель. Вот в эту щель или с помощью автоматической пипетки, или Пастеровской пипеткой вводят культуру с высокой плотностью взвеси (инокулюм с содержанием 10^9 – 10^{10} КОЕ/мл). Естественно, что и рассекающее гель устройство, и пипетка должны быть стерильны. Желательно (хотя и не является строго обязательным), чтобы инокулюм 2 был в щели, но не попадал на поверхность среды. Теперь настала очередь дисков. Как отмечено выше их помещают так, чтобы край диска был на расстоянии 3 мм снаружи от циркулярной щели. Номенклатуру дисков выбирает сам исследователь, но для определения БЛРС желательно использовать диски как с теми антибиотиками, которые эти ферменты разрушают, так и с теми, что устойчивы к данной группе ферментов. Среди чувствительных — цефотаксим, цефтриаксон, цефтазидим, среди устойчивых — карбапенемы (меропенем, имипенем) и цефамицины (цефокситин). Уже подчеркивалось, что БЛРС — это целая группа бета-лактамаз, каждая из которых имеет свой спектр действия. Поэтому, чем больше дисков будет использовано, тем вероятнее проявление самого факта продукции фермента/-ов. Итак, диски разложены. Теперь инкубация в течение 16–18 ч и чтение результата. Есть две возможности. Первая, при отсутствии БЛРС, образуется зона подавления роста вокруг диска, которая типична, равномерна по диаметру вне зависимости от наличия щели. Последняя не помеха, т. к. ее края плотно прилегают друг к другу. Второй вариант. Зона образуется. Но она сплюснута у щели, не пересекает ее. Инокулированный разрез в питательной среде вследствие образования большого количества гидролитического фермента или нескольких ферментов, разрушающих антибиотик, становится препятствием для него. Диффузия препарата в гель прекращается и зона образуется только там, где фермента мало, недостаточно для разрушения препарата (рис. 3.3). При всей де-

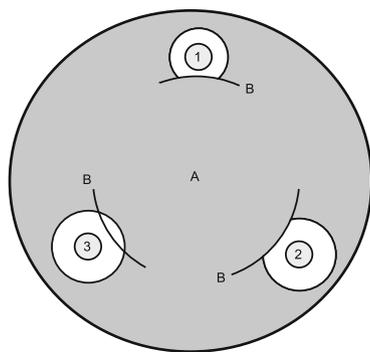


Рис. 3.3. Схема «трехшагового» метода определения продукции бета-лактамаз тестируемым микроорганизмом

Комментарии к рисунку:

1 и 2 — Диски с антибиотиками бета-лактамной структуры, разрушаемой бета-лактамазой (тест положителен, фермент образуется).

3 — Диск с антибиотиком бета-лактамной структуры, не разрушаемой бета-лактамазой (тест отрицателен, фермент не образуется).

А — Микробный газон по всей поверхности питательной среды при использовании инокулюма с меньшим содержанием микробных тел.

В — Щель к питательной среде, которую инокулируют взвесью микроба повышенной плотности.

монстративности тест имеет тот недостаток, что он неспецифичен. Бета-лактамазы не обязательно могут принадлежать к БЛРС, но и к другим группам (а это имеет значение для надежного выбора антимикробного препарата с лечебной целью). Отсюда рекомендация брать диски с разными бета-лактамными антибиотиками, а также с сочетанием одного из них с клавулановой кислотой. У некоторых авторов вызывает сомнение наличие самого разреза в питательной среде, как фактора, механически влияющего на диффузию антибиотика из диска в гель. Поэтому есть рекомендация для убедительности делать второй циркулярный разрез в питательной среде, ближе к стенке чашки в 3 мм от внешнего края диска, не заполняя при этом щель взвесью микроба.

БЛРС наиболее распространенные ферменты, разрушающие антибиотики соответствующей структуры, но, как уже подчеркивалось, они не единственные. А поскольку в тех случаях, когда возбудитель заболевания образует фермент той или иной группы требуется корректировка антибиотикотерапии, следовательно, мо-

жет возникнуть потребность в уточнении микробиологического диагноза, даже если использованный трехшаговый метод исследования (или любой другой) свидетельствует о наличии фермента. Поэтому остановимся на определении иных бета-лактамаз.

Начнем с определения AmpC-бета-лактамаз. В некоторых стандартах их рассматривают совместно с БЛРС [50], практически не разделяя. Возможно это связано с тем, что проблемы выбора лечебного препарата для терапии инфекций в случае, если возбудитель образует те или другие ферменты, решается сходным образом. Тем не менее, речь идет о разных бета-лактамазах. И определяют их различным способом. Напомним, что тест с клавулановой кислотой (равно как с сульбактамом и тазобактамом) для выявления AmpC-бета-лактамаз не пригоден. Как и в предыдущем случае все начинается со скринингового теста. Он не отличается по технике от той методики, что предложена для БЛРС. Но есть одно существенное различие. Редуцированная чувствительность к цефокситину дает основание предположить, что микроб образует не БЛРС, а AmpC-бета-лактамазы (или ферменты обеих групп, о чем далее). Пока контрольные цифры МПК или диаметра зоны подавления роста микроба для цефокситина, позволяющие предполагать наличие фермента, не установлены. Но сам факт устойчивости или промежуточной чувствительности микроба к цефокситину является указанием на возможность продукции AmpC-бета-лактамаз (БЛРС этот антибиотик не разрушают). Напомним, что МПК цефокситина для промежуточных по чувствительности представителей семейства *Enterobacteriaceae* 16 мкг/мл, а диаметр зоны подавления роста 15–17 мм, для устойчивых, соответственно, 32 мкг/мл и ≤ 14 мм. Теперь необходимо подтвердить (или отвергнуть) предположение об образовании возбудителем AmpC-бета-лактамаз. Среди существующих методик наиболее простыми и доступными для любой микробиологической лаборатории являются те из них, в которых используют специфические для AmpC-бета-лактамаз ингибиторы — антибиотик клоксациллин или т. н. борониевые кислоты. Ингибиторы можно вводить в плотную питательную среду или использовать имбибированные ими диски. Первый вариант более пригоден в научных и эпидемиологических исследованиях. Диски целесообразнее в клинических случаях, в общей системе оценки чувствительности возбудителя заболевания к антибиотикам. Некоторые авторы используют метод серийных разведений в жидкой питательной среде, включая

варианты микро- и макроразведений. Он также более приемлем для углубленных исследований.

Остановимся на диск-диффузионном методе — практичном и достаточно информативном. Для его реализации необходима чашка с плотной питательной средой. Обычно для этой цели используют агар Мюллера-Хинтон, поскольку параллельно в этом случае можно определять чувствительность исследуемого микроба к антибиотикам, используют диски. Инокулом (из суточной культуры тестируемого микроорганизма) готовят по стандартной методике с конечной концентрацией микроба $(1-2) \cdot 10^8$ КОЕ/мл. Диски с антибиотиками, которые необходимы в этом случае, выбирает сам исследователь. Наиболее часто используют диски с цефотаксимом 30 мкг, цефтриаксоном 30 мкг, цефтазидимом 30 мкг. Но могут использоваться диски с другими цефалоспоридами, пенициллинами и азтреонамом. Ингибитор АмрС-бета-лактамаз обычно применяют или в виде отдельного диска, или как диск и с ингибитором, и с антибиотиком (т. е. сочетанием того и другого в диске). Борониевые кислоты удобны тем, что они сами по себе не обладают выраженным противомикробным действием (их МПК для бактерий превышает 2–2,5 мг/мл) и, в то же время, их ингибирующий потенциал в отношении АмрС-бета-лактамаз достаточно выражен (при концентрации 300–500 мкг/диск) и специфичен. В качестве ингибиторов апробированы и могут быть использованы несколько борониевых кислот, в том числе аминифенилборониевая кислота (АФБК), тиофенилборониевая кислота, бензотофенборониевая кислота и др. В значительной части ранее выполненных исследований применяли АФБК с концентрацией 300–400 мкг на диск. Приготовление диска с борониевой кислотой несложно. Делают навеску вещества и растворяют ее таким образом, чтобы в 1 мл растворителя было 20 мг ингибитора. Борониевые кислоты растворимы в воде; если вещество растворяется плохо, то вначале раствор готовят, используя ДМСО (обычно для этого достаточно несколько капель растворителя), а затем добавляют воду до концентрации 20 мг/мл. Обычный стандартный диск впитывает 0,02 мл водного раствора. Используя автоматическую пипетку с соответствующим объемом или микропипетку наносят на диск (с антибиотиком или «пустой» — все зависит от варианта методики), 0,2 мл раствора борониевой кислоты, содержащего 20 мг/мл. Нетрудно подсчитать: если в 1 мл 20 мг, то в 0,1 мл — 2 мг. В 0,01 мл — 0,2 мг, т. е. 200 мкг; следовательно, в 0,02 мл будет 0,4 мг или 400 мкг. Эта та концентрация

АФБК, которая, как правило, достаточна для подавления активности AmpC-бета-лактамаз. После 20–30 минутной экспозиции раствор полностью всасывается в диск, и он может быть использован в исследовании. Далее инокулируют питательную среду по обычной методике — так, как это делают при определении чувствительности бактерий к антибиотикам. Теперь настала очередь наложить диски. Начнем с варианта, при котором используют диск с ингибитором (без антибиотика). Помещают диск с борониевой кислотой на поверхность засеянного агара так, чтобы справа и слева от него (или выше и ниже) можно было разместить диски с антибиотиками. На расстоянии 18 мм (от центра к центру диска) помещают диск с одним антибиотиком (например, цефтазидимом), а с другой стороны от диска с ингибитором также на расстоянии 18 мм помещают диск со вторым антибиотиком (например, цефотаксимом). Помещают чашку в термостат при 35–37 °С на 18 ч. После этого учитывают результат. Он может быть двояким. Если изучаемый микроб не образует AmpC-бета-лактамазы, то вокруг дисков с антибиотиками образуются округлой формы зоны подавления роста, т. е. обычные зоны, какие бывают при определении чувствительности микроба (если она есть) к антимикробным препаратам. Но возможен и другой вариант. Если тестируемый микроорганизм образует AmpC-бета-лактамазу, то диффундирующий из диска в гель ингибитор будет в той или иной мере подавлять активность фермента. Антибиотик не будет разрушаться там, где активность бета-лактамазы отсутствует или снижена. Рост микроба в этой области будет частично или полностью подавлен и, в результате, конфигурация зоны подавления роста микроба будет меняться. Зона окажется или вытянутой в сторону диска с ингибитором (яйцевидной), или появятся участки отсутствия роста иной формы (многое зависит от качества питательной среды, ее способности обеспечивать диффузию химического соединения в гель). Если этот эффект очевиден, образование AmpC-бета-лактамазы можно считать доказанным.

Второй вариант исследования включает применение диска с антибиотиком и диска с сочетанием антибиотика и борониевой кислоты. Он позволяет судить об эффекте на основании разницы в размерах зон подавления роста вокруг обоих дисков. Если микроб AmpC-бета-лактамазы не образует, зоны подавления роста вокруг двух дисков будут приблизительно равны. Если тестируемый микроорганизм продуцирует фермент, то зона вокруг диска с антибиотиком и ингибитором будет больше, поскольку активность фер-

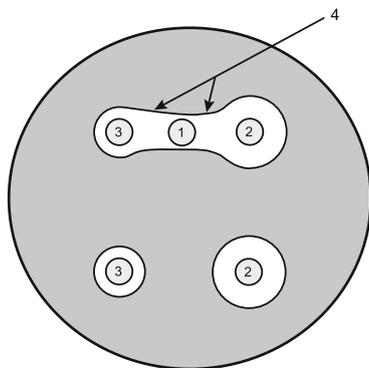


Рис. 3.4. Схема определения продукции AmpC бета-лактамаз микробом с помощью ингибитора ферментов (клоксациллина или борониевой кислоты)

Комментарии к рисунку:

1 — Диск с ингибитором.

2 и 3 — Диски с бета-лактамными антибиотиками, чувствительными к AmpC бета-лактамазам. Вверху — дополнительные участки подавления роста микроба, возникшие в результате действия ингибитора на ферменты. Внизу — действие тех же антибиотиков на микроб без ингибитора.

4 — Участки подавления роста микроба (тест положительн).

мента окажется подавленной: в этом случае действие антибиотика проявится в большей степени. Естественно возникает вопрос — какое увеличение диаметра зоны является информативным. Формализация критериев, которые можно было бы считать абсолютным показателем образования (или отсутствия) фермента, пока не произведена. Исследователи считают, что разница в диаметрах зон в 5 мм является убедительным свидетельством продукции AmpC-бета-лактамаз. Такой критерий представляется убедительным. Но не является ли он чрезмерным, это еще предстоит доказать. На рис. 3.4 приведен один из возможных результатов исследования.

Помимо «метода дисков» для определения AmpC-бета-лактамаз может быть использован метод серийных разведений. Исследование проводится по стандартной методике (как это предусмотрено отечественными МУК по определению чувствительности бактерий к антибиотикам). Могут быть использованы варианты макро- и микроразведений. Для бета-лактамных антибиотиков используют разведения от 0,125 до 128 мкг/мл, однако, пределы раз-

ведений и их количество могут меняться в зависимости от свойств тестируемого штамма и антимикробного препарата. Обязательны два ряда для каждого антибиотика: первый — в пробирках или лунках содержится питательная среда с двукратно убывающими концентрациями антибиотика. Второй ряд — в емкостях содержатся двукратно убывающие концентрации антибиотика и ингибитор, борониевая кислота, в одной и той же концентрации — 300–400 мкг/мл. Т.е. и в любой пробирке, и в любой лунке ряда количество ингибитора не меняется. Для тестирования штамма на способность образовывать AmpC-бета-лактамазу целесообразно использовать не менее двух антибиотиков бета-лактамной структуры. Наиболее часто такими объектами являются цефтазидим и цефотаксим (или цефтриаксон). Однако, это могут быть и другие препараты, включая цефепим, цефоперазон, азтреонам, пиперациллин и др. Т.о. при использовании метода серийных разведений каждый штамм требует 4 ряда: два опытных (разведения антибиотиков с добавлением ингибитора) и два контрольных (только разведения антибиотиков). После инкубации сравнивают МПК каждого антибиотика для данного микроорганизма: взятого в виде монопрепарата и использованного вместе с ингибитором. И в данном случае нет «узаконенных» показателей, нет документально подтвержденных критериев, но, по аналогии с контрольными показателями для оценки БЛРС, считается, что сдвиг МПК в сторону уменьшения при сочетании антибиотика и ингибитора на 3 пробирки (лунки) является свидетельством способности штамма образовывать AmpC-бета-лактамазу.

Применение клоксациллина, как ингибитора, в процессе выявления AmpC-бета-лактамаз осуществляется аналогичным образом. Используют агар Мюллера-Хинтон, на который производят посев взвеси исследуемой культуры с содержанием $(1-2) \cdot 10^8$ КОЕ/мл. Предварительно готовят диски с клоксациллином с содержанием 500 мкг/диск. В литературе есть предложения применять диски с другой концентрацией — от 300 до 500 мкг на диск, однако, чаще используют наибольшую концентрацию. Для определения чувствительности грамположительных бактерий к клоксациллину в дисках с этим антибиотиком надобности нет. Используют диски с оксациллином. Кроме того, концентрация клоксациллина, которая необходима для выявления AmpC-бета-лактамаз, слишком велика и не пригодна для определения чувствительности. Диски с содержанием клоксациллина 500 мкг выпускают некоторые зарубежные

фирмы, но распространения в нашей стране они не получили. Поэтому диски с 500 мкг/диск клоксациллина приходится готовить в лаборатории. Как уже отмечалось выше, полноценный диск впитывает около 0,02 мл воды (или водного раствора препарата). Поэтому в 0,02 мл растворителя должно быть 500 мкг клоксациллина. Для этого навеску антибиотика надо растворить так, чтобы в 1 мл было 25 мг препарата (т.е. 25 000 мкг). Тогда в 0,01 мл будет 250 мкг, а в 0,02 мл — 500 мкг. Этот раствор и наносят с помощью соответствующей автоматической пипетки или микропипетки на диск. За 30 минут происходит гарантированное полное всасывание раствора в диск (фактически процесс идет много быстрее) и диск может быть использован для определения присутствия AmpC-бета-лактамаз. Хранить диски, изготовленные в лаборатории, если отсутствуют соответствующий опыт их изготовления и необходимое оборудование, не рекомендуется. Впрочем, за ближайшие 7–10 дней с их активностью ничего не происходит, если диски не влажные и хранятся в рефрижераторе в укупоренном флаконе. Как и в случае с борониевыми кислотами клоксациллин можно использовать в диске, где уже есть бета-лактамный антибиотик (диск с сочетанием препаратов) и в виде диска только с ингибитором бета-лактамаз (т.е. с клоксациллином). В первом случае об образовании и активности фермента судят по разнице диаметров зон подавления роста тестируемого микроба вокруг диска только с антибиотиком и диска, в котором есть и антибиотик, и ингибитор. Если различия нет, AmpC-бета-лактамаза не образуется, если есть и увеличение диаметра зоны очевидно, то фермент присутствует. Насколько должна увеличиться зона, чтобы эффект считать достоверным, пока не договорились. Можно считать ферментообразование несомненным, если диаметр зоны увеличился на 5 мм и более. Если он возрос на 1–2 мм, этим фактом можно пренебречь. Промежуточные показатели говорят о необходимости дополнительных исследований. Можно считать убедительным мнение тех исследователей, которые предпочитают использовать отдельно диск с ингибитором и диск с антибиотиком. Они полагают такой тест более демонстративным. Особое внимание уделяется диску с цефокситином, в своем роде «маркерному» антибиотику при тестировании на продукцию AmpC-бета-лактамазы. Как уже говорилось, этот антибиотик разрушается данной группой ферментов. Грамотрицательные бактерии при таком механизме устойчивости могут не образовывать вокруг диска или образовывать небольшую зону

подавления роста. Располагают диск с ингибитором и с цефокситином на расстоянии 10 мм друг от друга. Если при использовании двух дисков зона подавления роста вокруг диска с цефокситином вытягивается в сторону диска с ингибитором или появляется зона подавления роста только со стороны диска с ингибитором, факт образования AmpC-бета-лактамазы можно считать доказанным. Другой диск с антибиотиком, который также обычно используют для этой же цели и располагают с другой стороны от диска с клоксациллином — диск с цефтазидимом. Сходный эффект влияния ингибитора на зонообразование вокруг диска с этим антибиотиком служит еще одним подтверждением наличия AmpC-бета-лактамаз. При работе с клоксациллином для выявления фермента (т. е. при его использовании как ингибитора) следует учитывать одну особенность, отличающую его от борониевых кислот. Как уже подчеркивалось, борониевые кислоты практически не обладают противомикробным действием, и зона подавления роста микроба вокруг диска с этими соединениями не образуется. В отличие от них клоксациллин, это антибиотик, взятый в большей концентрации, 500 мкг/диск. Такая и даже заметно меньшие концентрации недостижимы в организме человека и животных. Грамотрицательные палочки считаются устойчивыми к клоксациллину, поскольку в реально достижимых у человека концентрациях их жизнедеятельность не подавляется. Иное дело, когда *in vitro* идет диффузия в зараженный гель 500 мкг антибиотика. В таких случаях вокруг некоторых микроорганизмов (*E. coli*, *P. mirabilis*) может образоваться небольшая зона подавления роста микроба. Если диски расположены близко друг к другу, иногда это может мешать оценивать результаты исследования. Зоны, как бы, накладываются друг на друга. Проблема решается достаточно просто, диски следует «развести» на большее расстояние. Но, естественно, опыт для этого необходимо повторить.

Технология определения металло-бета-лактамаз (МетБЛ) имеет как много общего с уже упомянутыми методами определения БЛРС и AmpC-бета-лактамаз, так и свою специфику. В первом варианте она базируется на применении ингибиторов МетБЛ. Исследования проводятся по той же схеме, что и выявление двух других групп ферментов. Хотя, как уже говорилось, у каждой группы свои ингибиторы. Кроме того, часто прибегают к т. н. Hodge Test (ходж-тесту, ХТ). Условно, его можно назвать «тестом с помощником». Принцип метода сводится к тому, что исследуемый микроб, если он образует МетБЛ, помогает заведомо чувствительному штамму

преодолеть действие бета-лактаманного антибиотика. Если тестируемый микроб не образует МетБЛ, то подавление роста референтного штамма происходит, как сейчас модно говорить, «в штатном режиме». О том, каким образом это делается, чуть ниже. О ХТ необходимо говорить еще и потому, что в свой время он был включен в стандарт CLSI, т. е. получил статус официально признанного, стандартного. Тест достаточно демонстративен и может быть использован не только для определения МетБЛ, но, подбирая соответствующим образом референтную культуру и антибиотик, можно определять разные группы ферментов (что и делается). Однако, признание он нашел прежде всего как тест, с помощью которого можно определять карбапенемазы, т. е. те ферменты, которые чаще всего определяют устойчивость грамотрицательных бактерий к карбапенемам. МетБЛ составляют их основную (но не единственную) группу. Если при тестировании использовать в качестве антибиотического компонента именно карбапенемы (например, меропенем или эртапенем), а в качестве референтного штамма (заведомо чувствительного штамма) *E. coli* (например, ATCC 25922, которым должна располагать любая микробиологическая лаборатория), то исследование на МетБЛ окажется достаточно специфичным, информативным, хотя бы настолько, чтобы подтвердить нецелесообразность (или, наоборот, возможность) применения карбапенемов в лечебных целях у конкретного больного с учетом свойств выделенного возбудителя инфекции.

Последовательность действий при постановке ХТ не сложна и традиционна для микробиолога с технической точки зрения. Готовят чашку с агаром Мюллера-Хинтон. Приготавливают взвесь суточной культуры референтного штамма *E. coli* ATCC 25922 по стандарту 0,5 McFarland с последующим разведением 1:10 или без него, т. е. получают обычную взвесь микроба, какую используют при определении чувствительности любой культуры к антибиотикам — $(1-2) \cdot 10^8$ КОЕ/мл. Для исследования также необходима суточная культура тестируемого штамма на плотной питательной среде, лучше в чашке с ростом изолированных типичных (контролируемых глазом) колоний. Но, в принципиальном плане, это не так уж и важно. Может быть газон и на чашке, и на скошенном агаре в пробирке. Главное — культура должна быть чистой. Стандарт CLSI рекомендует для получения суточной культуры исследуемого микроба использовать кровяной агар. Очень желательно (и это предусмотрено зарубежным стандартом), что-

бы в исследовании использовали еще два референтных штамма. Один — образующий МетБЛ, а другой нет. В стандарте CLSI их называют: это *K. pneumoniae* ATCC BAA-1705, образующий фермент, и *K. pneumoniae* ATCC BAA-1706, не образующий МетБЛ. Безусловно, желательно использовать культуру с известными, хорошо установленными свойствами. Но это не принципиальный момент. Контроль можно осуществлять с любым штаммом, о котором известно, что он ферментообразующий или, наоборот, не образует фермента. Эти два контрольных штамма готовят так же, как тестируемый: суточный рост на плотной питательной среде. Наконец, последний элемент, который должен быть в наличии для постановки ХТ, — диск с меропенемом 10 мкг или эртапенемом 10 мкг.

Теперь можно переходить непосредственно к постановке исследования.

1. Инокулируют агар Мюллера-Хинтон взвесью культуры референтного штамма *E. coli* ATCC 25922.
2. В центр инокулированной поверхности накладывают диск с карбапенемом (меропенемом или эртапенемом).
3. Набирают петлей исследуемую культуру (3–5 колоний) и проводят штрих по поверхности агара от края диска по направлению к краю чашки длиной 20–25 мм. Такую же процедуру проводят с двумя другими контрольными штаммами — образующим и не образующим фермент. Т.о. на чашке от края диска будут идти три луча: один опытный, один контрольный, который должен дать положительный результат, и еще один контрольный, который должен дать отрицательный результат. Автору импонирует предложение делать 4 штриха: два опытных, дублирующих друг друга, и два уже названных контрольных. Два опытных луча полезны потому, что посев петлей практически не стандартизован по биомассе посевного материала и, в результате, эффект (есть, нет) может оказаться недостаточно четким. Когда есть два похожих результата, заключение делать проще.
4. Далее инкубация 16–18 ч при 35–37 °С и, завершение анализа, — чтение результата.

Каким он должен быть? Есть два очевидных итога. Первый — рост культуры *E. coli* ATCC 25922 (т.е. образование газона) и,

поскольку этот микроб чувствителен к карбапенемам, образуется зона подавления роста этой культуры вокруг диска. Если заглянуть в таблицу контрольных показателей качества исследования, то окажется, что зона вокруг диска с эртапенемом должна быть 29–36 мм, а вокруг диска с меропенемом — 28–34 мм. Теперь обратим внимание на рост тестируемой культуры и двух контрольных культур (*K. pneumoniae*, если именно их использовали), которые были посеяны штрихом (рис. 3.5). Все, что требуется, чтобы он был очевидным — должен быть выраженный луч роста каждой из культур. Теперь можно перейти к главному: обратим внимание на место пересечения штриха с краем зоны подавления роста. Там, где был посеян контрольный штамм, не образующий МетБЛ, ничего с этим «местом пересечения» не произошло. Теперь перенесем внимание на место пересечения края зоны подавления роста *E. coli* АТСС 25922 и роста штрихом контрольной культуры, образующей МетБЛ. Здесь газон *E. coli* деформирован, контрольный штамм как бы «вдавил» зону подавления роста. Вокруг штриха контроль-

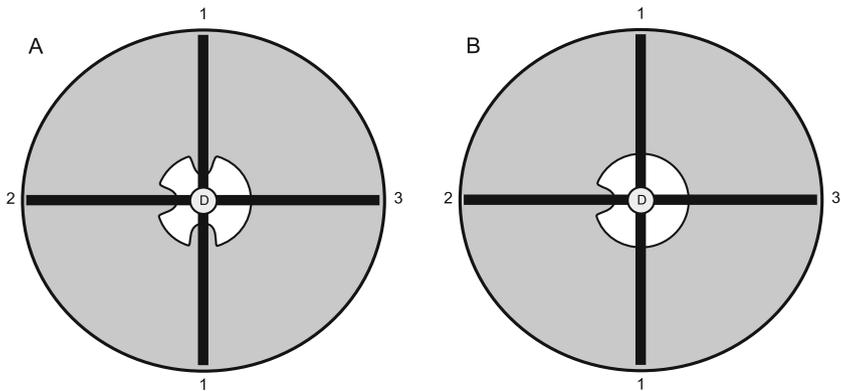


Рис. 3.5. Определение продукции бета-лактамаз с помощью Hodge test (схема)

Комментарии к рисунку:

A — Тест положительный.

B — Тест отрицательный.

D — Диск с антибиотиком бета-лактамидом, к которому чувствительна культура, образующая газон.

1 — Тестируемая культура (штрих до края диска).

2 — Контрольная культура, образующая бета-лактамазу (штрих).

3 — Контрольная культура, не образующая бета-лактамазу (штрих).

ной культуры образовался язычок дополнительного роста *E. coli* ATCC 25922. Механизм этого явления очевиден. Контрольная культура образует МетБЛ, фермент частично инактивирует антибиотик, диффундирующий из диска в питательную среду. Естественно, чем меньше антибиотика, тем более выражена инактивация (а именно так происходит у края зоны). В результате, кишечная палочка дает рост на том дополнительном участке, где антибиотик на нее уже не действует. Так формируется этот «язычок роста». Теперь настала очередь посеянного штрихом тестируемого штамма. Изменил ли он зону подавления роста? Если нет, если край зоны вокруг штриха не деформирован, то культура не образует МетБЛ. Но если вдоль штриха опытного штамма образовался участок дополнительного роста референтной культуры, если край зоны поэтому вдавлен внутрь зоны вокруг штриха, это подтверждает образование бета-лактамазы. Тест на образование фермента изучаемым микробом может считаться положительным. Но, подчеркнем еще раз, этот эффект достаточно часто, но не обязательно, обеспечивает именно МетБЛ. Может быть и бета-лактамаза иной группы. Поэтому вполне обоснованным можно считать применение не только ХТ, но и иных методов, о которых далее. Следует еще раз подчеркнуть, что особое внимание ХТ уделено, прежде всего, потому, что он формализован. Метод включен в стандарт CLSI, т. е. в документ, имеющий достаточное признание в мировой практике. Однако, ряд исследователей (автор принадлежит к их числу) рассматривают методы, основанные на применении ингибиторов, как не менее информативные и более специфичные, чем ХТ. А структура МетБЛ, наличие в их молекуле иона цинка, как раз и позволяет с высокой степенью надежности использовать хелатообразующие агенты для идентификации этой группы ферментов. Как отмечено выше, наиболее доступным и достаточно мощным ингибитором МетБЛ является ЭДТК (этилендиаминтетрауксусная кислота). ЭДТК можно вводить в диск с антибиотиком, что позволяет судить о наличии и активности фермента по разнице в диаметрах зон подавления роста тестируемого микроба при действии на него только антибиотика (первый диск) и антибиотика с добавлением ЭДТК (второй диск). Можно пользоваться отдельным диском с ингибитором, который увеличивает (деформирует) зону вокруг диска с антибиотиком. Возникает несколько вопросов. Во-первых, какие антибиотики выбрать. Теоретически можно использовать диски с любым антибиотиком бета-лактамной структуры. Однако, на се-

годняшний день большая часть убедительных исследований выполнена с карбапенемами, прежде всего, с меропенемом, а также с эртапенемом и имипенемом. Среди цефалоспоринов наиболее показательными оказались исследования с цефтазидимом. Следующий вопрос: какие концентрации ЭДТК целесообразны для имбибирования диска, т.е. сколько его должно быть в диске на момент наложения на засеянный агар? Четкого ответа на этот вопрос пока нет. Были апробированы диски с содержанием ЭДТК от 0,5 до 1,9 мг и, в зависимости от условий проведения исследования, во всех случаях был получен в той или иной мере выраженный эффект (потенцирование действия антибиотика в том случае, если исследуемый микроб образует МетБЛ). Лимитирующим обстоятельством является способность самой ЭДТК образовывать зону подавления роста некоторых культур микроорганизмов; далеко не всех, но тем не менее при большой концентрации реактива такой эффект может проявиться. А это при близком расположении дисков с ЭДТК и антибиотиком может помешать прочтению результата. Оптимальным, видимо, следует считать 1–1,5 мг в диске, хотя некоторые исследователи предпочитают 1,9 мг/диск.

Еще один момент, заслуживающий упоминания. Если ЭДТК, образуя зону подавления роста тестируемой культуры, не позволяет оценить образование МетБЛ с достаточной степенью надежности, к каким еще ингибиторам можно прибегнуть, можно ли заменить ЭДТК? Серьезное внимание привлекли т.н. тиоловые соединения, такие как меркаптопропионовая кислота, меркаптоуксусная кислота, меркаптоэтанол. Все они являются ингибиторами МетБЛ, причем для достижения эффекта достаточны сравнительно небольшие их количества (микрограммы). Однако, некоторые меркаптосоединения требуют осторожности при работе с ними в силу их токсичности. Кроме того, есть данные, что они не всегда обеспечивают точность анализа (Andrade et al., 2007). Тем не менее, многие авторы охотно используют эти соединения в своих исследованиях МетБЛ.

Наконец, какой из вариантов определения МетБЛ диск-диффузионным методом с использованием ингибитора представляется предпочтительным. Как уже подчеркивалось, ни один из методов не является пока формализованным, ни метод отдельного применения диска с антибиотиком и диска с ингибитором, ни вариант использования диска с комбинацией антибиотика и ингибитора. Условным преимуществом последнего является то, что исследо-

ватели нашли разницу в величине диаметра зон подавления роста при нанесении диска только с антибиотиком и диска с тем же антибиотиком и ингибитором на засеянную питательную среду в 5 мм вполне достижимой и достаточно убедительной, как свидетельство образования МетБЛ. Это только мнение отдельных авторов, это не утвержденный критерий, но, если исходить из опубликованных материалов, для подобного утверждения есть весомые основания. Скорее, можно думать, что меньшая разница в диаметрах зон подавления роста тоже имеет право считаться информативной. Схема результатов диск-диффузионного метода определения МетБЛ приведена на рис. 3.6 и 3.7.

Технология подобных исследований очень похожа на ту, что были приведены для бета-лактамаз иных групп. Среда — Мюллера-Хинтон агар. Инокулюм — $(1-2) \cdot 10^8$ КОЕ/мл. Инокуляция — обычная. Диски с антибиотиками — те же, что используют при определении чувствительности бактерий к антибиотическим препаратам (с меропенемом — 10 мкг/диск, имипенемом — 10 мкг/диск, цефтазидимом — 30 мкг/диск и т. д.). Сложнее обстоит вопрос с дисками, содержащих ингибиторы. Диски, изготовленные производителем,

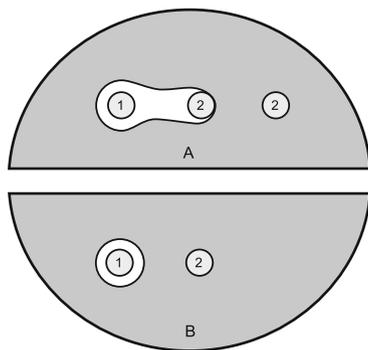


Рис. 3.6. Схема определения образования микробом металло-бета-лактамазы (МетБЛ)

Комментарии к рисунку:

1 — Диск с ЭДТК.

2 — Диск с имипенемом (меропенемом, эртапенемом).

А — Культура образует МетБЛ.

В — Культура не образует МетБЛ.

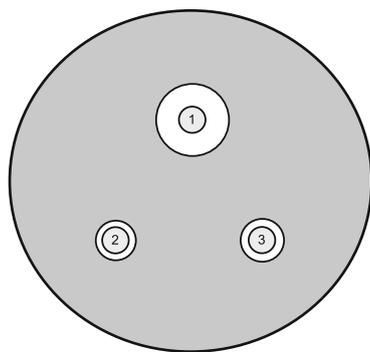


Рис. 3.7. Схема определения образования МетБЛ с помощью диска с сочетанием антибиотика и ингибитора (микроб МетБЛ образует).

Комментарии к рисунку:

1 — Диск с имипенемом и ЭДТК.

2 — Диск с имипенемом.

3 — Диск с ЭДТК.

на отечественный рынок практически не поступают. Поэтому с помощью несложной процедуры их готовят в лабораторных условиях. Напомним, что в диске должен быть 1 мг ЭДТК или более. Отечественные сорта картона в виде диска диаметром 6 мм впитывают не более 0,02 мл жидкости. Следовательно, в таком объеме должен быть 1 мг ингибитора. Следовательно, в 0,01 мл 0,5 мг. Далее простой расчет — в 0,1 мл — 5 мг, в 1 мл — 50 мг. Т.о. навеску ЭДТК следует растворить так, чтобы в 1 мл было 50 мг вещества. ЭДТК целесообразно растворять в слабощелочных растворах (следить, чтобы вода не была кислой) или использовать несколько капель щелочи для первичного растворения с последующим добавлением воды (не кислой, иначе может образоваться осадок). Получение растворов ЭДТК не является сложным. На диск 0,02 мл раствора наносят микропипеткой любой конструкции и дают раствору впитаться (на это нужно не более 30 минут). Если используют для исследования диск с антибиотиком и ингибитором, пропитывают раствором ЭДТК диск с выбранным для исследования антимикробным препаратом. Когда применяют два диска (с антибиотиком и ингибитором отдельно) пропитывают раствором ЭДТК стандартный диск диаметром 6 мм («пустой»). Диски наносят на поверхность засеянной питательной среды. В тех случаях, когда используют два диска, отдельно

с антибиотиком и другой с ингибитором, расстояние между ними (между их центрами) должно быть около 15 мм. Однако, оно может варьировать. Если известно, что микроб устойчив к антибиотику и зона подавления его роста вокруг диска с антибиотиком не образуется, расстояние между дисками можно уменьшить на 2–3 мм. Если диск с ингибитором сам по себе подавляет микроб (образуется зона подавления роста), то расстояние между дисками приходится увеличить. Иногда целесообразно использовать еще один диск с антибиотиком, контрольный, который накладывают вне зоны действия ингибитора. Он полезен тогда, когда эффективность взаимодействия двух препаратов неотчетлива. Но, часто, если образование МетБЛ является реальностью, в нем надобности нет.

Контрольный диск только с антибиотиком обязателен, если применяют диск с обоими веществами, антибиотиком и ингибитором. Их, естественно, наносят на поверхность агара так, чтобы контрольный и опытный диски не мешали друг другу, чтобы зона подавления роста вокруг одного из них не накладывалась на такую же зону вокруг другого диска.

После инкубации в течение 16–18 ч (до суток) учитывают результат. Он оценивается традиционно: об этом уже не раз упоминалось, когда рассматривали иные бета-лактамазы. Положительный результат — это образование «однобокой» зоны подавления роста вокруг диска с антибиотиком, которая направлена к диску с ингибитором (при первом варианте исследования). И это увеличение диаметра зоны подавления роста на 5 см и более вокруг диска с сочетанием антибиотика и ингибитора по сравнению с диаметром зоны вокруг диска только с антибиотиком. Отсутствие влияния ингибитора на зонообразование, это в первом случае — ничего с зоной вокруг диска с антибиотиком не происходит, во втором — диаметр зон вокруг диска с сочетанием антибиотика и ингибитором и диска только с антибиотиком совпадает. Результат негативный, ферменты не образуются. Впрочем, в последнем варианте исследования, если диаметр зон вокруг двух дисков отличается более, чем на 2 мм (но различие не достигает 5 мм) лучше опыт повторить, или с использованием другого метода, или увеличив на 50% концентрацию ЭДТК в диске с сочетанием препаратов.

Теперь, когда приведены методы определения МетБЛ, следует упомянуть ту ситуацию с показаниями для их использования, которая сложилась в силу изменения в некоторых странах критериев чувствительности (устойчивости) грамотрицательных бактерий

к карбапенемам. Оно произошло в середине 2010 г. и заключается в резком повышении требований к этим критериям. Если ранее МПК имипенема и меропенема для чувствительных штаммов были 4 мкг/мл (и менее), то по новым требованиям они должны быть 1 мкг/мл (или менее), т. е. требования к показателю чувствительности увеличились в 4 раза. В то же время по прежним критериям микроб считался устойчивым при МПК 16 мкг/мл и более, теперь — 4 мкг/мл и более. Еще большие требования предъявлены к критерию чувствительности к эртапенему. Ранее он составлял 2 мкг/мл, а теперь предложено ориентироваться на 0,25 мкг/мл (и менее). Ранее микроб считался устойчивым при МПК 8 мкг/мл, теперь — 1 мкг/мл. Введенные впервые критерии чувствительности к дорипенему адекватны новым показателям для меропенема и имипенема, т. е. изначально они столь же высоки, что и для других карбапенемов в новой редакции. Естественно, что аналогичная ситуация сложилась и с критериями чувствительности, определяемой диск-диффузионным методом. Иначе и быть не могло, поскольку диаметры зон подавления роста это отражение МПК, полученных иным способом. Если по «старому» стандарту диаметр зоны подавления роста имипенема и меропенема для чувствительных штаммов был 16 мм и более, то по новым требованиям он должен быть не менее 23 мм (т. е. на 7 мм больше), соответственно критерий устойчивости изменился с 13 мм и менее до 19 мм и менее. Такие же изменения произошли и для эртапенема. Если ранее для чувствительных штаммов был достаточен диаметр зоны подавления роста 19 мм, то теперь он возрос до 23 мм, а для устойчивых штаммов этот критерий изменился с 15 мм до 19 мм. Новые критерии чувствительности к дорипенему установлены столь же жесткими, как для меропенема и имипенема. Сложившаяся ситуация имеет прямое отношение к показаниям для определения МетБЛ. При новых показателях, приведенных выше, вероятность селекции устойчивых штаммов существенно возросла. Число тех из них, которые предположительно могли бы быть потенциальным продуцентом МетБЛ, но по формальным критериям характеризуется, как чувствительные, уменьшилось. При таких «жестких» показателях чувствительности (устойчивости) вероятность скрытых носителей гена карбапенемаз сокращается. Следовательно, по мнению ряда исследователей, надобность в определении МетБЛ становится малопродуктивной. Так ли это? Действительно, для тех стран, где эти критерии внедрены, исследования подобного рода в

**Динамика критериев чувствительности
к антибиотикам, определяемой методом
серийных разведений (по МПК в мкг/мл)
для бактерий сем. *Enterobacteriaceae***

Антибиотик	Россия, МУК 2004			США, CLSI* 2009			США, CLSI 2010			EUCAST** 2010		
	ч***	п	у	ч	п	у	ч	п	у	ч	п	у
Азтреонам	≤8	16	≥32	≤8	16	≥32	≤4	8	≥16	≤2	4-8	≥16
Цефазолин	≤8	16	≥32	≤8	16	≥32	≤1	2	≥4	–	–	–
Цефотаксим	≤8	16-32	≥64	≤8	16-32	≥64	≤1	2	≥4	≤1	2	≥4
Цефтриаксон	≤8	16-32	≥64	≤8	16-32	≥64	≤1	2	≥4	≤1	2	≥4
Цефтазидим	≤8	16-32	≥64	≤8	16	≥32	≤4	8	≥16	≤2	4-8	≥16
Цефтизоксим	–	–	–	≤8	16-32	≥64	<1	2	≥4	–	–	–
Цефепим	≤8	16	≥32	≤8	16	≥32	≤8	16	≥32	≤1	2-8	≥16
Имипенем	≤4	8	≥16	≤4	8	≥16	≤1	2	≥4	≤2	4-8	≥16
Меропенем	≤4	8	≥16	≤4	8	≥16	≤1	2	≥4	≤2	4-8	≥16
Эртапенем	≤2	4	≥8	≤2	4	≥8	≤0,25	0,5	≥1	≤0,5	1	≥2

* CLSI — Институт по клиническим лабораторным стандартам.

** EUCAST — Европейский комитет по тестированию чувствительности к антимикробным препаратам.

*** ч — чувствительные, п — промежуточные по чувствительности, у — устойчивые.

сугубо практических лабораториях (это надо подчеркнуть) становятся необязательными. Ответ микробиолога, передаваемый лечащему врачу, когда речь идет о продуцентах МетБЛ, и без того будет чаще всего негативным — возбудитель устойчив к карбапенемам. А почему устойчив, это для клинициста, как правило, не важно, ингибиторов МетБЛ, пригодных для введения больному, пока нет. Но, повторим, это верно там, где новые критерии чувствительности к карбапенемам стали обязательными. На момент написания этого издания в России подобные изменения в табличные данные не внесены. Но даже в тех странах, где он решен положительно, автоматические анализаторы чувствительности продолжают работать в прежнем режиме. А «перезагрузка» многих тысяч процессоров по всему миру — задача затратная и сложная. Наконец, для эпидемиологов, для научных работников, для клинических лабораторий, в которых простая констатация «чувствителен–резистентен» считается недостаточной (а важно понять, почему воз-

будитель резистентен, ведь это часто очень ценно, например, при БЛРС, с которыми можно бороться и при лечении больных с помощью лекарственных ингибиторов) информация о бета-лактамазах, в т. ч. МетБЛ, важна. А раз так, то владение методикой их определения остается актуальным.

В таблице 3.3 даны критерии чувствительности (по МПК), приведенные в нескольких документах (по состоянию на апрель 2012 г.). Они говорят об очевидной необходимости не только унификации самих показателей, но и методов их установления.



ГЛАВА 4.

**ТЕСТИРОВАНИЕ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ
МИКРООРГАНИЗМОВ К СОЧЕТАННОМУ ДЕЙСТВИЮ
АНТИБИОТИКОВ И ЕГО ЗНАЧЕНИЕ ДЛЯ КЛИНИКИ**

В данной главе речь пойдет об одном из наиболее противоречивых явлений в медицинской практике. С одной стороны сочетанное применение антимикробных препаратов, особенно при лечении тяжелых больных, это обычное явление. С другой стороны, целесообразность таких назначений оспаривается и, более того, когда речь идет о фиксированных сочетаниях антимикробных лекарственных средств, категорически отвергается. Врачи старшего поколения хорошо помнят, какое распространение имели многие комбинированные препараты (ампиокс — ампициллин и оксациллин, олететрин, олеморфоциклин — олеандомицин и тетрациклин или морфоциклин и др.). Эти сочетанные лекарственные формы были решительно исключены из номенклатуры, хотя имели много сторонников. Правда, есть исключения, которые лишь подтверждают правило. Сохранили свое значение сочетания бета-лактамидов с ингибиторами бета-лактамаз, один из компонентов которых по своему механизму действия не является, строго говоря, истинным антибиотиком (клавулановая кислота, сульбактам, тазобактам). Длительно сохраняет свои позиции только сочетанный препарат, включающий триметоприм и сульфаниламид (обычно, сульфаметоксазол), более известный под патентованным названием ко-тримоксазол.

Какой бы горячей не была дискуссия о том, нужно или не нужно применять сочетания антибиотиков [45, 104, 124, 144], практика остается неизменной, их используют. А раз так, то, естественно, возникают закономерные вопросы — какие реальные показания есть для такой фармакотерапии, и какова роль лабораторной службы в грамотном, обоснованном использовании сочетаний препаратов. Ответы на эти вопросы имеют тесную связь, о чем не всегда помнят.

Наиболее простое обоснование для сочетанной антибиотикотерапии, это, как раз, отсутствие микробиологических данных: возбудитель неизвестен, антибиотиков, обладающих универсальным действием, нет (чему можно только радоваться, поскольку о «нормальной» флоре человека тоже нельзя забывать), поэтому

есть очевидный соблазн использовать два (или три) антибиотика, чтобы спектр их противомикробного действия включал все вероятные микроорганизмы, способные вызвать данную патологию. В этом случае микробиолог может помочь в выборе оптимального сочетания только на основе эпидемиологического анализа данных о чувствительности микроорганизмов в конкретном стационаре (регионе) к антибиотикам. На этом базируется т. н. эмпирическая антибиотикотерапия.

Второе основание для назначения сочетания антибиотиков — смешанная микрофлора, необходимость подавления микроорганизмов разной таксономической принадлежности с различной чувствительностью к антимикробным препаратам. Это достаточно частый вариант в хирургической клинике (острые заболевания органов живота, раны, ожоги и др.). Терапевт нередко сталкивается с подобной ситуацией при патологии органов дыхания, особенно при хронических заболеваниях легких и дыхательных путей. О смешанной микрофлоре, как этиологическом факторе, приходится помнить гинекологам, отиатрам, офтальмологам, стоматологам. Роль микробиологической службы в этом случае очень велика. Из комплекса разных и по этиологической роли, и по патогенности, и по конститутивной чувствительности к противомикробным препаратам микроорганизмов следует выделить главные, определить их чувствительность к антибиотикам и, если в этом есть необходимость (о чем далее), оценить лабораторным путем целесообразность тех или иных сочетаний антибиотиков.

Еще одно показание к сочетанному применению антимикробных препаратов (третье по счету) — предупреждение развития вторичной устойчивости бактерий. Существует убеждение, подтвержденное экспериментально и, в меньшей степени, даже клинически, что если использовать два антибиотика с различным механизмом действия, то индуцированная резистентность микроба возникает реже или вообще не проявляется. Все это достаточно логично, закономерно. Хотя есть и прямо противоположное мнение (не очень подтвержденное ни экспериментально, ни клинически) — применение двух антибиотиков одновременно чревато устойчивостью уже не к одному, а к двум препаратам. В плане обсуждаемой проблемы, роли микробиологической службы в обосновании сочетанного применения антибиотиков, важно, однако, другое: отсутствие надежной, очевидной методики оценки предупреждающего действия двух препаратов на развитие устойчивости. Априорно такое действие

можно считать вполне допустимым, экспериментально его можно установить, но обосновать подобный феномен в лаборатории, дать какие-либо критерии целесообразности той или иной комбинации на основе лабораторного анализа невозможно. Во всяком случае, на данном отрезке времени. Микробиологическая служба обязана отслеживать развитие резистентности микроорганизмов у больного в процессе антибиотикотерапии, должна держать под контролем появление устойчивости микробов к антибиотикам в стационаре, и в этом их важная роль, в том числе для выбора сочетаний противомикробных соединений в терапевтических целях.

Упомянем четвертое показание для сочетанной антибиотикотерапии — самое неубедительное и не имеющее прямого отношения к микробиологическому обеспечению. Речь идет о предположении, что взяв для лечения больного два антибиотика в половинной (или просто в уменьшенной) дозе можно предупредить проявление их повреждающего действия на больного, сохранив при этом лечебный потенциал: действие на макроорганизм снижается, действие на микроорганизм сохраняется. Это мнение родилось еще в 50-е годы прошлого столетия и не нашло ни экспериментального, ни клинического подтверждения. Более того, создание в организме низких концентраций лечебного препарата чревато и снижением эффективности терапии, и развитием устойчивости возбудителя. А для компенсации этой потенциальной опасности с помощью уменьшенных концентраций другого антибиотика нет ни критериев, ни убедительных методик лабораторных исследований, подтверждающих такую возможность. Об этом показании к сочетанной антибиотикотерапии можно было бы не упоминать, если бы оно не перекочевало в некоторые публикации уже нашего времени.

Наконец, последняя (пятая) и, наверное, самая обсуждаемая причина, по которой принято назначать несколько антибиотиков, это попытка обеспечить их потенцированное действие на микроб — возбудитель заболевания. Далее проблема вариабельности эффекта, получаемого при воздействии на микробную клетку двух (или более) препаратов, будет обсуждаться специально. По сути дела, все представленные ниже лабораторные методики определения чувствительности микроба к сочетанному действию антибиотиков сводятся к ответу на вопрос: будет ли это действие потенцированным (синергидным), т. е. полезным, перспективным для лечебного процесса, или, наоборот, конкурентным, антагонистическим, способным снизить лечебный потенциал антибиотиков,

взятых вместе. Прогнозирование подобного действия в каждом конкретном (частном случае) — это целиком и полностью задача микробиологической лаборатории. Синергизм явление достаточно не частое, он проявляется только при сочетании определенного круга антимикробных соединений [46, 52, 85, 141, 159, 204]. То же самое можно сказать и об антагонистическом действии антибиотиков на микроб [73, 96, 100, 170, 191]. Но цена и того, и другого для больного может быть велика. И хотя методики оценки чувствительности микроба к сочетанному действию антибиотиков далеки от совершенства, знать их, уметь использовать в практической деятельности лабораторной службы, задача, заслуживающая самого серьезного внимания микробиологов.

Изучение чувствительности микроорганизмов к сочетанному действию антибиотиков не относится к разряду рутинных частых исследований. Показания к нему должны быть обоснованными, причем целесообразность каждого анализа — это результат совместного мнения микробиолога и лечащего врача. Более того, микробиолог вправе поставить под сомнение необходимость такого исследования в нескольких очевидных ситуациях.

1. Большинство моноинфекционных процессов. Исключение могут составлять лишь очень тяжело протекающие инфекции, если возможность синергидного действия дает надежду на повышение эффективности проводимого лечения.
2. Заболевание вызвано ассоциацией микроорганизмов, чувствительных к одним и тем же антибиотикам. Исключения могут быть в такой ситуации, которая приведена в п. 1.
3. Исследование не должно проводиться, если ставится вопрос о сочетании антибиотиков, несовместимых по их сочетанному действию на больного (например, нефротоксичных или гепатотоксичных). В этом случае вопрос должен решаться совместно с клиническим фармакологом.
4. Несовместимость антибиотиков по их сочетанному действию на микроб (т. е. антибиотиков антагонистов). Исключением может быть лишь нестандартная клиническая ситуация, требующая особого обсуждения и обоснования.

Возвращаясь к показаниям для сочетанного применения антимикробных препаратов нетрудно заметить, что большинство из них предполагает потребность в традиционных микробио-

логических исследованиях — определение чувствительности микроорганизма(-ов), возбудителя (-ей) заболевания, к антибиотикам. Исключение составляет то из них, в котором ставится вопрос о потенцированном действии сочетания антимикробных препаратов на микроб. Уже подчеркивалось, что оно может быть, а может и не быть. Именно потенцированное действие, его определение требует методически иного решения. Сочетанное действие двух (или более) препаратов на размножение и жизнеспособность микроорганизмов бывает разным. Используют четыре обозначения такого действия: оно может быть синергидным (потенцированным), суммарным (аддитивным), индифферентным и антагонистическим (конкурентным). Не все и не всегда используют эти термины в полном наборе, часто опускают аддитивное действие, иногда индифферентное. А вот два противоположных понятия — синергидное и антагонистическое действие, присутствуют всегда. В микробиологию они пришли от токсикологов, которые в первой половине прошлого столетия, изучая действие химических веществ на макроорганизм, пришли к заключению, что оно может быть синергидным или антагонистическим (S. Loewe, H. Muischne, 1926; C. Bliss, 1939). Помимо этого первые два автора ввели понятие суммарное (аддитивное) действие, а C. Bliss — индифферентное. В 50-е годы прошлого века эту терминологию переняли микробиологи для характеристики подавляющего действия нескольких препаратов на микробную популяцию. Особый толчок развитию этой тематики в микробиологии дала работа M. Lepper и H. Dowling, выполненная еще в 1951 г., в которой они утверждали, что лечение сочетанием хлортетрациклина и пенициллина больных (подчеркнем это) пневмококковым менингитом дает результаты хуже, чем терапия только пенициллином. Таким образом, декларировалась возможность конкурентного (антагонистического) действия двух антибиотиков, да еще в клинической практике. Естественно, что исследователи не могли пройти мимо этого факта и поток исследований, выполненных *in vitro* и *in vivo* (в эксперименте), позволил подтвердить возможность многообразного эффекта при действии сочетаний антибиотиков на микроб, в т. ч. уже перечисленных выше — синергидного, суммарного, индифферентного и антагонистического действия. Справедливости ради, надо отметить, что самым сложным оказалось доказать наличие того или иного действия в клинической практике, у больных. В экспериментальных условиях подобные эффекты проявлялись изменением МПК, снижением или

увеличением обсемененности тканей микробом и выживаемости экспериментальных животных. Такое различие между «клиникой» и экспериментальными исследованиями вполне объяснимо сложностью в подборе «однотипных» больных, многообразием клинических проявлений заболевания и вполне понятными и очевидными этическими соображениями при обследовании больных. Это надо подчеркнуть, поскольку существует мнение о сомнительности тех или иных эффектов при сочетанном действии антибиотиков.

Несколько слов о том, что вкладывается в понятия синергидного, антагонистического, индифферентного и суммарного действия нескольких антибиотиков на микроб. Далее подробнее будет рассмотрен метод учета полученных результатов исследования сочетанного действия антибиотиков на микроб *in vitro* с установлением индекса FICI (от англ. — fractional inhibitory concentration index). Будет показано, что оценка полученного эффекта с определенными оговорками имеет сравнительно объективный характер и результат не всегда представляется простым и очевидным. Если же подойти к критериям сочетанного действия схематично, упрощенно, то синергидное действие можно представить себе таким образом. Предположим, что МПК одного антибиотика для исследуемой культуры 1 мкг/мл, а другого антибиотика 2 мкг/мл. Но если два препарата используют вместе, то первого антибиотика достаточно 0,12 мкг/мл, а другого 0,25 мкг/мл. Т.е. в сочетании обоих препаратов оказалось достаточно в концентрациях, которые были не в 2 (как, казалось бы, было логичным), а в 8 раз меньшими. А вот если МПК оказались в этой же ситуации в два раза меньшими, т.е. в данном частном примере 0,5 и 1 мкг/мл, то эффект мог бы называться суммарным (аддитивным). Но в сочетании действие второго антибиотика могло бы и не отразиться на МПК первого, она как была, так и осталась бы 1 мкг/мл. В этом случае речь бы шла об индифферентном действии. Можно представить себе и еще одну ситуацию, когда присутствие второго антибиотика отрицательно повлияло на активность первого и МПК его увеличилось, скажем, до 2 мкг/мл (вместо 1 мкг/мл) или даже до больших цифр. И такое возможно. В этом случае речь идет об антагонизме (конкурентном действии). Естественно, если синергидный эффект достигим, лечебный потенциал антибиотикотерапии может оказаться выше, что, безусловно, желательно. Нужен ли суммарный эффект, — вопрос спорный, но, во всяком случае, он способен в ряде ситуаций положительно повлиять на результативность лечения. Безусловно нежелательно индифферент-

ное действие, которое ничего не дает для достижения лечебного эффекта, но чревато проявлением повреждающего действия ненужного лекарства (не говоря уже о финансово-организационной стороне вопроса). Уместно напомнить, что такое действие присуще сочетанию макролида и пенициллина, рекомендуемому при пневмониях [126]. А вот антагонизм — он просто не допустим. Применение двух препаратов с конкурентным действием для лечения больного, это врачебная ошибка. Установить совместимость препаратов может только микробиолог, а для этого он должен провести соответствующее исследование. И опять вспомним попытку лечить пневмококковый процесс сочетанием эритромицина и бета-лактамов, которое является весьма сомнительным.

Подчеркнем еще раз, приведенный выше пример — это сугубо частный случай. Понятно, что синергидное, антагонистическое и др. типы действия могут зависеть от многих причин. Например, от того, какова чувствительность культуры к препаратам, взятым в сочетании. В приведенном примере МПК близки, однако, они могут различаться, и чем больше различие, тем вероятнее индифферентное действие. Но важно не просто различие, *in vivo* это различие может быть купировано особенностями фармакокинетики антибиотиков или, наоборот, близкие МПК *in vitro*, могут оказаться неадекватными тем концентрациям, которые реальны *in vivo* [43, 120, 188]. Как показали авторские исследования *in vitro* при изучении действия сочетаний антибиотиков на клостридии, серьезное влияние на результат оказывает неоднородность популяции по чувствительности к каждому из антибиотиков, причем и в витальных исследованиях, и в экспериментах на животных. И синергидный, и любой другой эффект во многом зависит от механизма действия на микроб каждого из антибиотиков, взятых в сочетании.

Перечисленным не исчерпываются те условия и характеристики, которые могут повлиять на характер действия двух или более антимикробных препаратов. Детальнее автор рассматривает этот вопрос в предшествующем издании [12]. К сожалению, хотя проблема изучается давно, многое остается невыясненным, особенно, когда речь идет о лечебном процессе, о клинических проявлениях сочетанной антибиотикотерапии, об условиях, обеспечивающих тот или иной эффект у человека. Реальность, как уже подчеркивалось, заключается в том, что несколько антибиотиков одновременно используют часто, а вот обоснованием для этого редко бывают объективные, в том числе лабораторные, критерии. Поставим воп-

рос так, — что и как может дать микробиологическая лаборатория для рациональной сочетанной антибиотикотерапии? Ответ очевиден и, к сожалению, короток — она способна оценить чувствительность возбудителя к одновременному действию двух препаратов [43, 55, 137, 188].

Наиболее признанным, чаще применяемым способом определения чувствительности микроорганизмов к сочетанному действию антибиотиков является т. н. «метод шахматной доски», checkerboard array [137]. В русском переводе его чаще называют методом перекрестного титрования. Он был предложен еще в 60-е годы прошлого века в работах L. Garrod и D. Waterworth, L. Sabath и др. В основу был взят метод серийных разведений антибиотиков с определением МПК как каждого из препаратов, так и их сочетаний, взятых в разных концентрациях. Подчеркнем — именно в разных, что оказалось очень важно. К тому времени уже было известно (в т. ч. благодаря работам и отечественных специалистов), что синергизм или антагонизм могут проявляться при сочетании антибиотиков только в определенных концентрациях, иногда не многих, и не проявляться в других. При этом предсказать, какие из них меняют эффект, а какие нет, оказалось невозможно. Отсюда последовал вывод, определять активность сочетания антибиотиков следует при использовании разных концентраций и того, и другого препарата. Чтобы не пропустить эффект, препараты надо сочетать в самых различных вариантах концентраций. Нужна была система, и она была представлена в виде «шахматной доски». Представить себе принцип исследования несложно. Возьмем пробирки или лунки в планшетах в определенном количестве, например (только как пример) по 8 штук в 8 рядах: т. е. квадрат из 64 «шахматных» полей. На самом деле их может быть столько, сколько необходимо для корректного исследования, причем количество рядов по горизонтали может не совпадать с количеством рядов по вертикали. Определить это должен исследователь. Но, как пример, пусть будет 8×8 , тем более, что именно такой набор емкостей (пробирок, лунок) вполне приемлем для исследований. Обозначим лунки (пробирки) по горизонтали буквами: от А до З (рис. 4.1), а по вертикали цифрами. Чтобы не повторяться далее будем использовать только термин «лунки», хотя это могут быть и пробирки (или любая другая емкость, пригодная для титрования). А теперь вспомним игру «морской бой» и будем обозначать лунки набором из буквы и цифры. Лунки А1 и З8 — они будут контрольными: А1 — контроль роста культуры,

		Антибиотик X							
		А	Б	В	Г	Д	Е	Ж	З
Антибиотик Y	1	K_1	x	$2x$	$4x$	$8x$	$16x$	$32x$	$64x$
	2	y	$x+y$	$2x+y$	$4x+y$	$64x+y$
	3	$2y$	$x+2y$	$2x+2y$	$64x+2y$
	4	$4y$	$x+4y$	$64x+4y$
	5	$8y$	$8x+8y$
	6	$16y$
	7	$32y$	$x+32y$	$32x+32y$	$64x+32y$
	8	$64y$	$x+64y$	$2x+64y$	$32x+64y$	K_2

Рис. 4.1. Схема «шахматной доски» для определения чувствительности микроба к сочетанному действию антибиотиков X и Y

Комментарии к рисунку:

K_1 — Контроль культуры.

K_2 — Контроль среды.

X — Антибиотик 1.

x — Концентрация антибиотика X, мкг/мл.

Y — Антибиотик 2.

y — Концентрация антибиотика Y, мкг/мл.

$2x$ — Двойная концентрация.

$4x$ — Учетверенная концентрация и т. д. (например, 1, 2, 4, ..., 64 мкг/мл).

$2y$ — Двойная концентрация в мкг/мл и т. д.

Иллюстрация — см. следующий рисунок.

		Антибиотик X							
		А	Б	В	Г	Д	Е	Ж	З
Антибиотик Y	1	K_1	0,5	1,0	2,0	4,0	8,0	16,0	32,0
	2	1,0	0,5+1	1+1	2+1	4+1	8+1	16+1	32+1
	3	2,0	0,5+2	1+2	2+2	4+2	8+2	16+2	32+2
	4	4,0	0,5+4	1+4	2+4	4+4	8+4	16+4	32+4
	5	8,0	0,5+8	1+8	2+8	4+8	8+8	16+8	32+8
	6	16,0	0,5+16	1+16	2+16	4+16	8+16	16+16	32+16
	7	32,0	0,5+32	1+32	2+32	4+32	8+32	16+32	32+32
	8	64,0	0,5+64	1+64	2+64	4+64	8+64	16+64	K_2

Рис. 4.2. Частный пример титрования с использованием «шахматной доски» (см. рис. 4.1)

38 — контроль стерильности среды. Лунки от Б1 до З1 — в них приготавливают серии разведений антибиотика X: например, от 0,5 до 32 мкг/мл. Другого антибиотика в них не будет. Этот ряд позволяет определить МПК одного препарата — X. Теперь перейдем к лункам по вертикали — от А2 до А8. В них по возрастающей приготавливаем разведения антибиотика Y; например от 1 до 64 мкг/мл. В них тоже не будет другого антибиотика. Этот вертикальный ряд позволит определить МПК второго антибиотика Y, взятого как монопрепарат. Остались ряды Б2–32, Б3–33... Б8–37 (это, если по горизонтали) или Б2–Б8, В2–В8... 32–37 (это, если по вертикали). Почему в последнем ряду только 6 лунок, понятно, ведь лунка 38 одна из двух контрольных. Так вот в этих оставшихся 48 лунках антибиотики будут в сочетаниях. В каждой лунке концентрации каждого препарата будут адекватны тем, которые есть в первых рядах для каждого из антибиотиков. Покажем это на частном примере, приведенном выше (рис. 4.2). Антибиотик X взят в концентрациях от 0,5 до 32 мкг/мл. В лунках Б2; Б3; Б4; Б5; Б6; Б7; Б8 будет концентрация этого антибиотика 0,5 мкг/мл. В лунках В2; В3; В4... В8 — 1 мкг/мл; в лунках Г2... Г8 — 2 мкг/мл и т. д. до лунок 32–37, в которых концентрация антибиотика X будет 32 мкг/мл. Антибиотик Y взят в концентрациях от 1 до 64 мкг/мл. В лунки 2Б; 2В, 2Г; 2Д; 2Е; 2Ж и 2З будет концентрация этого антибиотика 1 мкг/мл. В лунках 3Б; 3В; 3Г... 3З — 2 мкг/мл. В лунках 4Б... 4З — 4 мкг/мл; и так до лунок 8Б–8Ж, в которых будет 64 мкг/мл антибиотика Y. В таблице приведены концентрации антибиотика X и Y в каждой лунке при перекрестном титровании в системе 8×8 (в мкг/мл).

Таким образом, создается упорядоченная система взятых в сочетании антибиотиков, при которой на микробную популяцию (инокулюм) действует стабильная концентрация одного антибиотика и двукратно меняющаяся концентрация другого. Естественно, что после выполнения этой части исследования, должно быть приготовление инокулюма, инокуляция и инкубация (о некоторых деталях обычных микробиологических приемов остановимся чуть ниже, когда будем говорить о процедурных вопросах исследования). Продолжим обсуждение, прежде всего, принципиальных моментов. После инкубации в одних лунках будет рост микроба, в других нет. Анализ этого («есть–нет») составляет, по сути, главное в определении сочетанного действия антибиотиков на микроб. Исследователь, естественно, в начале обращает внимание на контрольные лунки: в К1 должен быть рост, в К2 — рост должен отсутст-

зовать. Это традиционно. А вот дальше предстоит сравнить МПК каждого из двух антибиотиков (взятых в сочетании) и те МПК, которые образуются в результате действия сочетаний антибиотиков. Допустим, антибиотик X в приведенном выше частном примере активен в концентрации 4 мкг/мл, а антибиотик Y в концентрации 16 мкг/мл. Самый простой вариант сочетанного действия, если в рядах 1, 2, 3, 4 и 5 МПК будет там, где концентрация антибиотика X будет 4 мкг/мл; а далее (ряды 6, 7, 8) роста не будет, поскольку концентрация в этих лунках антибиотика Y составляет величину, адекватную МПК этого препарата. Действие может трактоваться, как индифферентное: присутствие второго антибиотика не влияет на активность первого, чья МПК меньше. Но эффект может быть другим. Представим себе, что в рядах первой половины рисунка, — например, со 2-го по 5-й произошел сдвиг вправо и минимальная концентрация антибиотика X, подавляющая рост микроба будет в сочетании не 4 мкг/мл, а 8 или 16 мкг/мл. Скажем в ряду втором МПК будет не в ячейке Д2, а в ячейке Е2, в 3-м ряду не в ячейке Д3, а в ячейке Ж3, так же и в 4-м ряду — в ячейке Ж4, в 5-м ряду — в ячейке Ж5. В результате действия двух антибиотиков эффективность антибиотика X уменьшилась, для подавления микроба его потребовалось в 2–4 раза больше. В этом случае приходится говорить о возможности антагонистического (конкурентного) действия. Насколько оно достоверно, чуть ниже. Нетрудно представить себе еще один вариант изменений МПК, — сдвиг влево. Он может быть ограниченным; например, в рядах 4 и 5 на одну ячейку. МПК антибиотика X будет не 4 мкг/мл, а 2 мкг/мл в сочетании с антибиотиком Y в концентрациях 4 и 8 мкг/мл другого препарата. Закономерно предполагать аддитивное (суммарное) действие двух антибиотиков, взятых в концентрациях, близких к МПК. Но сдвиг МПК влево может быть и значительным, не на «одну ячейку», а с уменьшением МПК более активного антибиотика в 4 и более раз. Вернемся к рисунку. Предположим, что в ряду 2 МПК будет не в ячейке Д2, а в ячейке Г2 (т. е. при сочетании 2 мкг/мл антибиотика X и всего лишь 1 мкг/мл антибиотика Y), в ряду 3 МПК будет в ячейке В, где антибиотика X и Y взяты в концентрациях соответственно 1 мкг/мл и 2 мкг/мл. В 4 и 5 рядах антибиотика X также окажется достаточно в концентрации 1 мкг/мл (ячейки В4 и В5). Т. о. для подавления микроба будет достаточно антибиотика X в концентрации в 4 раза меньше его МПК, если он взят в виде монопрепарата, но при условии, что второй антибиотик использован в количествах в 2–8 раз

меньше МПК. В этом случае закономерно думать о синергидном действии антибиотиков. Но одно дело предполагать, а другое быть уверенным в том, что, заключая исследование, информация о той или иной чувствительности микроба к двум антибиотикам установлена на основании сколь-нибудь объективных критериев. В истории антибиотикотерапии было несколько попыток придать полученным лабораторным данным о сочетанном действии антибиотиков объективный характер. Не все методы выдержали испытание временем. Остановимся на наиболее признанном.

При обосновании заключения о типе действия двух антибиотиков на микроб целесообразно пользоваться принятым микробиологами ряда стран т. н. индексом действия сочетания антибиотиков, FICI; его иногда обозначают как FIC, или индекс FIC, в том числе в русской транскрипции — ФИК (полное английское написание дано выше). Определяют его по формуле:

$$\frac{МПК_{AC}}{МПК_A} + \frac{МПК_{BC}}{МПК_B} = \text{индекс FIC, где}$$

МПК_{AC} — минимальная концентрация антибиотика А (в мкг/мл), взятого в сочетании с другим антибиотиком (Б);

МПК_A — минимальная подавляющая концентрация антибиотика А, взятого как монопрепарат (в мкг/мл);

МПК_{BC} — минимальная концентрация антибиотика Б (в мкг/мл), взятого в сочетании с другим антибиотиком (А);

МПК_B — минимальная подавляющая концентрация антибиотика Б, взятого как монопрепарат (в мкг/мл).

Например:

МПК антибиотика А для некоего микроба 1 мкг/мл; его концентрация в сочетании с другим антибиотиком Б — 0,25 мкг/мл. МПК антибиотика Б для того же микроба 2 мкг/мл; его концентрация в сочетании с другим антибиотиком А в том же ряду (это важно!) — 0,5 мкг/мл. Тогда

$$\text{Индекс FIC} = \frac{МПК_{AC}}{МПК_A} + \frac{МПК_{BC}}{МПК_B} = \frac{0,25}{1,0} + \frac{0,5}{2,0} = 0,25 + 0,25 = 0,5$$

Еще раз важно подчеркнуть, что индекс определяется для каждого ряда сочетаний двух антибиотиков, поскольку тот или иной эффект (синергидное действие или иное) проявляется только в определенном диапазоне концентраций, порой достаточно узком. Именно «порядный» обсчет индекса дает цельную картину того,

что можно ожидать при сочетанном применении антибиотиков. Естественно, что особую ценность имеют те цифры, которые близки к контрольным значениям МПК (break-points, «табличным» критериям). О том, как «распорядиться» этими индексами, сказано далее; заметим только, что о потенцированном действии можно говорить только при его величине не более 0,5, а об антагонистическом, конкурентном — более 4.

Теперь необходимо остановиться на технике исследования. Прежде всего, микробиолог должен сделать выбор: какой метод он предпочитает — микро- или макроразведений. Первый менее затратен. Если пользоваться многоканальными пипетками (особенно, при наличии навыка), время постановки исследования сокращается. По мнению ряда авторов микро-разведения предпочтительны при необходимости тестирования параллельно нескольких штаммов. Метод макроразведений более демонстративен, результат «читать» легче, что при условии частичного подавления роста культуры нередко бывает важным. Кроме того, точность при использовании определенных концентраций антибиотика в большом объеме растворителя выше (1 мл против 0,05–0,1 мл).

Следующий важный шаг — выбор тех разведений обоих препаратов, которые позволят определить эффект от сочетанного действия. Уместно напомнить, что и синергидное, и антагонистическое действие, как это было показано выше, предполагают сдвиг МПК в ту или иную сторону: синергизм в сторону уменьшения, антагонизм — увеличения. Разведения антибиотиков должны позволить это сделать. Естественно, что исходной точкой, от которой нужно двигаться концентрациям вправо (большие) — влево (меньшие) может быть только МПК монопрепарата, характеризующая чувствительность данного штамма к конкретному антибиотику. Если эта цифра есть, остальное достаточно просто — в каждом ряду должно быть, по меньшей мере, три разведения влево от МПК (т.е. меньшие концентрации) и три разведения вправо (т.е. большие, чем МПК). Это минимум — 3 разведения в большую и 3 в меньшую сторону, иначе об эффекте (синергидное действие, конкурентное действие) судить может оказаться трудно. Поскольку в отечественной практике метод серийных разведений с определением МПК используют редко, но возникает необходимость в определении чувствительности возбудителя к сочетанному действию антибиотиков, то за ориентир могут быть взяты МПК (табличные критерии), установленные для чувствительного к данному анти-

биотику микроба. Т. е. если на основании исследования с использованием диск-диффузионного метода установлено, что штамм чувствителен к антибиотику, то далее по таблице определяют МПК для чувствительного штамма и, ориентируясь на него, выбирают необходимые разведения. Этот прием «срабатывает» только в том случае, если истинная МПК близка к контрольной МПК (break-point). Но она может быть и меньшей, тогда синергизм не улавливается. Это надо учитывать. Величина диаметра зоны подавления роста, пусть условно, но дает такую возможность.

Следующий этап исследования — приготовление выбранных разведений каждого из антимикробных препаратов. Вне зависимости от того, какой вариант исследования был выбран, микро- или макро-разведений, они всегда должны быть приготовлены в отдельных емкостях и концентрации в этих пробах (разведениях) должны быть в два раза большими, чем те, которые будут в лунках или пробирках: ведь предстоит смешать два раствора антибиотиков и каждый из них должен использоваться в одном и том же объеме (это принципиально важно, условия для каждого препарата должны быть сходными). С учетом вероятных МПК чувствительных штаммов, выбор тех или иных концентраций для сочетаний лежит чаще всего в пределах 0,06–256 мкг/мл, причем надобность в крайних значениях возникает редко. Малые концентрации (менее 0,25 мкг/мл) обычно необходимы при изучении чувствительности грамположительных кокков к пенициллинам, большие (более 64 мкг/мл) при тестировании неферментирующих грамотрицательных бактерий к антипсевдомонадным пенициллинам. Обычно, для грамположительных бактерий достаточен ряд разведений от 0,25 до 32 мкг/мл, для грамотрицательных — от 0,5 до 64 мкг/мл. Впрочем, право исследователя самому выбирать те концентрации, которые он считает необходимыми в любом наборе, в т. ч. от самых малых до самых больших.

Повторим некоторые положения, уже изложенные в других разделах. Есть антибиотики, растворимые в воде и есть неводорастворимые в воде препараты. Первые растворяют в воде, а затем в жидкой питательной среде (или сразу в питательной среде), вторые — в органическом растворителе, затем в питательном бульоне. Органических растворителей должно быть не более 5 %, чтобы они не оказывали подавляющего действия на микроб.

Формально говоря, органические растворители требуются достаточно редко: для эритромицина — этанол, для метронидазола, амфотерицина В, нистатина — диметилсульфоксид (ДМСО),

для рифампицина — метанол (автор использует вместо метанола ДМСО с достаточно надежными результатами), для тетрациклина основания (не гидрохлорида) — 0,01 N раствор соляной кислоты. Фактически круг препаратов, требующих органических растворителей может оказаться шире: наиболее надежен ДМСО, который может быть заменен на диметилформамид (ДМФА). С таким вариантом, в частности, приходится сталкиваться при работе с фузидиевой кислотой, цефотетаном, противогрибными препаратами. Качественные исходные растворы доксициклина и триметоприма легче получить в 0,01–0,1 N растворе соляной кислоты, а всех макролидов — в этиловом спирте; его же можно использовать для растворения фузидиевой кислоты. Предложены таблицы по использованию растворителей для получения необходимых концентраций антибиотиков. Они были составлены более 40 лет назад Н. Ericsson и J. Sherris и приведены с сокращениями и изменениями в ряде изданий. Таблицы призваны упорядочить последовательность разведений (в том числе с использованием органических растворителей). Еще раз следует подчеркнуть: при использовании «шахматной доски» для установления типа сочетанного действия антибиотиков на микроб необходимо получить две серии промежуточных концентраций, которые будут в 2 раза больше «рабочих» — т. е. тех, что образуются в лунках (пробирках) при слиянии обоих препаратов.

Следующий этап — перенос разведений растворов антимикробных препаратов в лунки или пробирки. Начнем с микроразведений. В емкости, помеченные на схеме как А1 и 38 вносим по 0,1 мл питательной среды. Если ряд короче или шире, то контроль стерильности среды будет уже не 38 и помечен иначе, но во всех случаях это будет последняя лунка. И еще одно замечание. В зависимости от величины лунки объем может быть иной — 0,2 или 0,3 мл. Но в крайние (контрольные) лунки сразу же вносится полный объем питательной среды. А вот в остальные лунки, в те, в которые будут вноситься растворы антибиотиков, их объем будет половинный. В 1-й ряд, на примерной схеме это лунки от Б1 до 31 вносят по 0,05 мл питательной среды и по 0,05 мл соответствующего разведения первого препарата. Затем в ряд Б2–32 этот же антибиотик вносят по 0,05 мл в той же последовательности разведений. Просто питательная среда в них не вносится. И так до последнего 8 ряда, в котором крайняя лунка уже заполнена питательной средой и будет контрольной. Теперь в каждой «рабочей» лунке есть по 0,05 мл растворов первого антибиотика. Затем так же последовательно вво-

дят по 0,05 мл второго антибиотика в лунки первого вертикального ряда от А2 до А8 и туда же по 0,05 мл питательного бульона. Далее в той же последовательности вносят по 0,05 мл разведений второго антибиотика в лунки последующих рядов, и в них уже сочетаются два препарата в тех концентрациях, которые составляют перекрестную матрицу исследования. Этот этап завершен.

Вариант макроразведений реализуется так же, но объемы, естественно другие — в 10 раз большие, по 0,5 мл. Т. о. в пробирках будет по 1 мл питательной среды, содержащей разведения антибиотиков в той же самой последовательности. Правда, это при условии, что инокулюм будет составлять 10% от объема среды. Если он будет большим, то разведения будут иными (об этом далее).

Как уже было отмечено выше, и при микро-разведениях, и при макроразведениях удобно пользоваться многоканальной пипеткой («гребенкой»), но естественно, могут быть использованы обычные микро- и макроразведения. Главное это их стерильность и сменяемость.

Очередной этап процедуры — приготовление инокулюма и инокуляция. В зависимости от вариантов метода титрования инокулюм будет готовиться по-разному. При микро-разведениях исходная суспензия будет обычной — по стандарту 0,5 McFarland суточной культуры микроба. Получаем около $1,5 \cdot 10^8$ КОЕ/мл. Далее суспензия разводится в 31 раз, т. е. 1 мл суспензии добавляют к 30 мл растворителя (жидкой питательной среды). Образуется взвесь, содержащая около $5 \cdot 10^6$ КОЕ/мл. 0,01 мл этой взвеси вносят в каждую ячейку. В каждой из них будет около $5 \cdot 10^4$ КОЕ (клеток).

Несколько иначе осуществляют инокуляцию при варианте макроразведений. Есть две рекомендации. Первая близка к приведенной выше. Готовят взвесь по стандарту 0,5 McFarland из суточной культуры исследуемого микроба, т. е. получаем $1,5 \cdot 10^8$ КОЕ/мл. Далее следующее разведение также из расчета 1 + 30 мл (взвесь + питательный бульон), т. е. получаем около $5 \cdot 10^6$ КОЕ/мл. В пробирки с рабочими разведениями антибиотиков вносим 0,1 мл этой суспензии, т. е. в 1 мл будет $5 \cdot 10^5$ КОЕ/мл. Изменением объема на 10% как при микро-, так и макроразведениях считается возможным пренебречь. И это действительно так, — на результаты исследования добавление 0,01 мл на ячейку или 0,1 мл на пробирку с 1 мл среды не влияет.

Есть еще одно предложение, как инокулировать питательную среду при варианте макроразведений. Смысл этого предложения — увеличить объем инокулюма до размеров объема питательной сре-

ды, в которой содержатся антибиотики — т.е. по принципу 1+1. Все опять же начинается с приготовления взвеси по стандарту 0,5 McFarland, т.е. $1,5 \cdot 10^8$ КОЕ/мл. Далее 0,25 мл взвеси вносят в 25 мл бульона. Образуется взвесь, содержащая в 100 раз меньше клеток — около $1,5 \cdot 10^6$ КОЕ/мл. Затем 1 мл этой суспензии вносят в 1 мл питательной среды, содержащей антибиотик, т.е. доводят количество клеток до около $0,7 \cdot 10^6$ или около $7 \cdot 10^5$ КОЕ/мл. Это, практически та же величина, что в пересчете на мл образуется в ячейке при микроразведениях. В этом случае надо обратить внимание еще на одну особенность; такая инокуляция приводит к уменьшению концентрации антибиотиков в пробирках в 2 раза. А это уже серьезное изменение для учета результатов исследования. Поэтому поправку надо вносить на стадии подготовки разведений антибиотиков: концентрации должны быть не в 2 раза, а в 4 раза большими в тех емкостях, из которых питательную среду с антибиотиками разливают по пробиркам. Вполне реализуемо, хотя и не очень удобно.

В ряде методических пособий есть еще одна вполне обоснованная рекомендация. Для контроля культуры из рабочей взвеси рекомендуют делать высев на чашку с кровавым агаром. Рост колоний позволит подтвердить и чистоту культуры, и наличие необходимого количества клеток во взвеси. Поэтому посев надо делать так, чтобы на чашке было «читаемое» количество колоний. Если в упомянутых выше суспензиях было около $5-7 \cdot 10^5$ КОЕ/мл, то для посева нужно сделать разведение инокулюма еще в 200 раз и взять 0,1 мл для нанесения на поверхность агара с распределением посева шпателем.

Условия инкубации выбирают в соответствии с ростовыми потребностями тестируемой на чувствительность к сочетанному действию антибиотиков культуры. В большинстве случаев инкубируют при $35-37^\circ\text{C}$ в течение суток.

Завершающий этап исследования — учет результата с передачей заключения лечащему врачу. Об эффекте, естественно, судят по тому, есть рост или нет роста в той или иной лунке (пробирке) с определением МПК (монопрепарата или сочетаний препаратов). Когда рост или его отсутствие видны отчетливо, результат очевиден. Но нередко возникают и сложные ситуации: чуть заметное помутнение питательной среды, незначительный осадок на дне емкости. В ряде работ эти «чуть-чуть» предлагают игнорировать и считать, что именно в таких лунках или пробирках присутствует МПК. Авторская позиция, — трактовать такой результат в пользу

		Ампициллин (мкг/мл)									
		К ₁	0,5	1	2	4	8	16	32		
Гентамицин (мкг/мл)	0,125	Р	Р	Р	Р	Р	—	—	—	А	Обозначение клеток по вертикали
	0,25	Р	Р	Р	Р	Р	—	—	—	Б	
	0,5	Р	Р	Р	—	—	—	—	—	В	
	1	Р	—	—	—	—	—	—	—	Г	
	2	Р	—	—	—	—	—	—	—	Д	
	4	—	—	—	—	—	—	—	—	Е	
	8	—	—	—	—	—	—	—	—	Ж	
	—	—	—	—	—	—	—	—	—	К ₂	
		1	2	3	4	5	6	7	8	Нумерация клеток по горизонтали	

Рис. 4.3. Чувствительность к сочетанному действию двух антибиотиков (ампициллина и гентамицина), определенная по схеме «шахматной доски» (пояснения в тексте)

Комментарии к рисунку:

Р — Рост есть.

— — Роста нет.

К₁ — Контроль культуры, рост есть.

К₂ — Контроль питательной среды, роста нет.

негативного (рост есть), поскольку в таком случае трактовка идет на пользу более осторожного подхода к терапии, а это уже на благо больного. Особая сложность, зачастую, возникает при оценке результата в лунках. Как и в других подобных ситуациях с микроразведениями полезно использовать темный не глянцевый фон, увеличительное стекло (лучше с небольшим разрешением), менять угол наклона источника отраженного света, расположенного выше и чуть сзади контролера.

Целесообразно заранее заготовить протокол исследования, повторяющий матрицу с отдельными колонками для индексов действия в сочетании каждого антибиотика и суммы индексов, а также для заключения по каждой сумме индексов FIC (FICI). Итак, возвращаемся к индексу сочетанного действия. Как он считается, указано выше. Рассмотрим, как пример, частный случай учета результата исследования чувствительности микроба к сочетанному действию препаратов. Наиболее частое сочетание, используемое при лечении больных, это бета-лактамы антибиотик

(пенициллинового ряда или цефалоспорины) с аминогликозидным антибиотиком. Пусть это будет сочетание ампициллина и гентамицина, которое, безусловно, может быть используемо при тяжелой инфекции, вызванной *E.coli*. Представим себе, что для изучаемого штамма МПК ампициллина 8 мкг/мл (микроб чувствителен), а МПК гентамицина — 4 мкг/мл (микроб к этому антибиотику тоже чувствителен). Сочетание допустимо и потенциально может оказаться полезным. Результаты поставленного исследования оказались такими (рис. 4.3).

При сочетании ампициллина и гентамицина в концентрациях 8 мкг/мл и 0,125 мкг/мл эффект (подавление роста) определяется только ампициллином. Сочетанное действие индифферентное. При сочетании, в котором гентамицин был взят в концентрации 0,25 мкг/мл (строка В) ампициллина оказалось достаточно в количестве 4 мкг/мл. Т. о. МПК более активного антибиотика уменьшилось в 2 раза. Теперь есть, что посчитать.

$$\text{Индекс ДСА} = \frac{4}{8} + \frac{0,25}{4} = 0,5 + 0,06 = 0,56$$

ДСА — действие сочетания антибиотиков.

Запомним эту цифру и перейдем к следующей строке Г; в этом случае МПК сместилась на Г4, где ампициллина 2 мкг/мл, а гентамицина 0,5 мкг/мл. Считаем

$$\text{Индекс ДСА} = \frac{2}{8} + \frac{0,5}{4} = 0,25 + 0,125 = 0,375$$

Далее, следующая строка (Д), МПК в клетке Д2.

$$\text{Индекс ДСА} = \frac{0,5}{8} + \frac{1}{4} = 0,06 + 0,25 = 0,31$$

Теперь можно оценить полученные индексы (FICI, ДСА). Как уже говорилось выше, оценка степени «сдвигов» МПК позволило разработчикам предложить следующую трактовку индексов:

синергизм — индекс до 0,5;

индифферентность — индекс 0,51 до 4;

антагонизм — индекс более 4.

Что следует из приведенного примера: синергизм оказался потенциально возможен. Он проявился в ряду Г и Д. Некоторые авторы даже предложили такой критерий, как «потенциальный синергизм» (от 0,51 до 0,6), как в ряду В.

Для сравнения представим себе, что в строке (ряду) В МПК сместилась не влево, а вправо и переместилась в клетку В8. Посчитаем.

$$\text{Индекс ДСА} = \frac{32}{8} + \frac{0,25}{4} = 4 + 0,06 = 4,06$$

Это уже показатель конкурентного действия. Последнее является противопоказанием к использованию сочетания антимикробных препаратов. Заключение о результатах тестирования должно отражать любой из вариантов сочетанного действия.

Метод «шахматной доски», метод перекрестного титрования, как уже отмечалось, является наиболее используемым при определении чувствительности микроорганизмов к сочетанному действию антибиотиков. Но, тем не менее, он не оптимален и не единственный. Основной его недостаток (впрочем, как и недостаток всех реально существующих методов определения чувствительности микробов к противомикробным веществам) заключен в статичности, искусственности той системы, в которой происходит контакт микробных клеток с антибиотиком. А даже те ограниченные примеры, которые были приведены выше, говорят о многовариантности эффектов в зависимости от концентраций того и другого препарата. В организме человека изменения концентраций — это перманентный процесс, который в витральных исследованиях не учитывается. К тому же для разных антибиотиков он не является параллельным. Нельзя признать достаточной стандартность предложенной методики, тем более, что проблема тестирования качества такого исследования пока не решена. Видимо этим можно объяснить тот факт, что синергизм или антагонизм, установленный одним методом, не всегда выявляются другими методами исследования. К счастью, если это происходит, то тот или иной терминальный эффект заменяется на аддитивное или индифферентное действие, а не синергизм на антагонизм или антагонизм на синергизм.

Заслуживают краткой характеристики иные методы определения сочетанного действия антимикробных препаратов на микроорганизмы. Их несколько.

Диск-диффузионный метод. Нетрудно представить себе, что если на определенном расстоянии друг от друга поместить на засеянной микробом плотной питательной среде два диска с разными антибиотиками, то в зависимости от характера взаимодействия зоны подавления роста вокруг дисков могут быть деформирова-

ны. Если антибиотики, диффундирующие из дисков, синергисты, то размеры зон в той их части, которая направлены навстречу друг другу окажутся больше в месте соприкосновения этих зон или соединяться дополнительной перемычкой. На рисунке представлены некоторые из возможных вариантов потенцированного действия. Но может быть и наоборот. Если антибиотики антагонисты, то зоны в той их части, что направлены друг к другу будут сплюснены, перемычка между ними с отсутствующим подавлением роста окажется большей, чем должно было бы быть, и которая очевидна при индифферентном характере действия (рис. 4.4).

В техническом плане тест несложен. Все манипуляции традиционны: питательная среда, диски, инокулюм, инокуляция. Наиболее трудный вопрос — как расположить диски, чтобы характер взаимодействия был очевиден. Ориентиром могут быть данные, полученные при определении чувствительности микроба к антибиотикам диск-диффузионным методом. В идеале между зонами подавления роста микроба, образуемыми двумя препаратами, должен быть зазор в 2–3 мм. Информацию для возможности его получения можно извлечь только при наличии предварительных

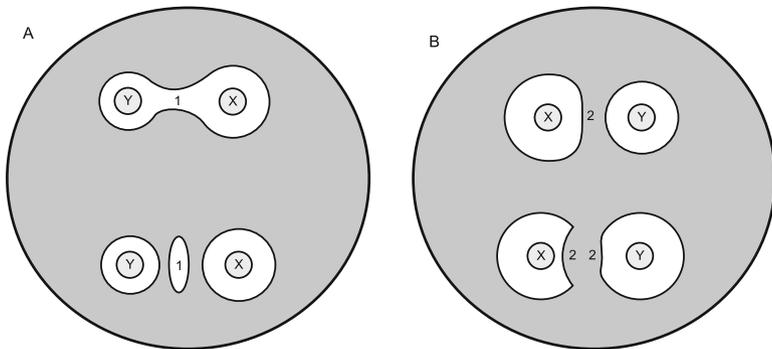


Рис 4.4. Варианты сочетанного действия антибиотиков на микроб, определенного диск-диффузионным методом (схема)

Комментарии к рисунку:

X, Y — Диски с антибиотиками.

1 — Зона дополнительного подавления роста микроба.

2 — Участок дополнительного роста микроба.

A — Варианты потенцированного (синергидного) действия.

B — Варианты антагонистического действия.

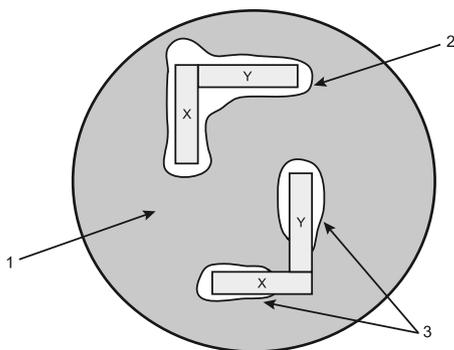


Рис 4.5. Схема синергидного и антагонистического действия антибиотиков X и Y при их диффузии из полосок в засеянный агар

Комментарии к рисунку:

X, Y — Полоски с антибиотиками X и Y.

1 — Микробный газон.

2 — Подавление роста микроба, синергидное действие.

3 — Подавление роста микроба, антагонистическое действие.

данных (понятно, что и они относительны). Ориентируясь на них, следует наложить диски. Можно использовать не одну, а 2–3 пары дисков, варьируя расстояние между ними. Это простой и, зачастую, эффективный прием.

Еще один вариант метода определения сочетанного действия основанный на диффузии антибиотиков в гель — использование полосок, пропитанных антибиотиками. Полоски накладывают под прямым углом на засеянный тестируемым микробом агар и через сутки оценивают результат. При индифферентном результате действия двух препаратов по периметру полосок образуется равномерная зона подавления роста микроба, в том числе и на стыке двух полосок. В случае антагонизма подавление роста вокруг угла, образуемого двумя полосками, не происходит или размер зоны уменьшается. При синергидном действии, наоборот, на стыке двух полосок зона подавления роста увеличивается (рис. 4.5).

При использовании диффузионного метода, как с дисками, так и полосками, эффект в некоторых случаях достаточно демонстративен и на этом основании вполне можно судить о целесообразности сочетания определенных антибиотиков или, наоборот, об их потенциальном конкурентном действии, что недопустимо. Однако возможности этого метода ограничены — антимикробные препа-

раты используют только в одной концентрации и это резко лимитирует возможность получения полноценной информации. Метод не стандартизован, критерии достоверности результата не разработаны. Будучи простым технически, диффузионный метод пригоден в скрининговых исследованиях, для получения предварительных результатов, но не более того.

Заметно большее признание получило определение зависимости между бактерицидным действием антибиотиков и временем экспозиции их воздействия на микроб (time-kill assay). Иногда такое исследование называют определением кривой зависимости «время — летальное действие» (time-kill curves, time-kill plots). Речь идет, по сути дела, об определении бактерицидного или фунгицидного действия антибиотиков и их сочетаний, но не в одной временной точке, обычно через сутки, как это представлено во многих методических публикациях (в т. ч. и в данном издании), а в динамике. Для применения такой методики есть ряд показаний, которые в настоящее время, в основном, касаются углубленных исследований новых антимикробных препаратов, а также тех проявлений резистентности бактерий, которые пока не вошли в число исследуемых в повседневной практике микробиологических лабораторий (т. н. «толерантность» микроорганизмов, «персистенция», «малые колонии» и т. п.). Единственная область, в которой определение кривой бактерицидного действия антибиотиков на микроб рассматривается как практически значимое, приближенное к повседневным интересам микробиологической службы, это, как раз, проблема сочетанного действия антимикробных препаратов на микроорганизм. Нельзя, однако, не признать, что этот метод остается вторичным, уступая в частоте использования «перекрестному титрованию», которое приведено выше.

В чем основное преимущество метода определения кривой зависимости «время — летальный эффект» очевидно. Определение чувствительности микроорганизмов к сочетанному действию антибиотиков показано тогда, когда речь идет о лечении тяжелых больных, когда, образно говоря, стоит проблема жизни и смерти человека. Но в такой ситуации важна не просто чувствительность микроба к используемому препарату, но и способность этого препарата убить микроб. Об этом достаточно подробно говорится в разделе, посвященном бактерицидному действию антибиотиков. Цепочка простая. У тяжелого больного иммунитет очень часто подавлен. Раз иммунитет неполноценен, то бактериостатическое

действие антибиотика не дополняется бактерицидным действием иммунной системы больного. Микроб переживает антибиотическую атаку и продолжает свою болезнетворную деятельность. Теперь вспомним, что перекрестное титрование позволяет определить МПК сочетания антибиотиков. МПК — это показатель их бактериостатического действия. Но при лечении тяжелых больных важно знать возможность достижения бактерицидного действия сочетания антибиотиков. Для этого можно сделать высеивание из пробирок при перекрестном титровании (что не получило широкого распространения) или прибегнуть к определению зависимости «время — летальный эффект», что более принято.

Важным предварительным условием для постановки этого теста является определение МПК каждого из используемых в сочетании антибиотиков. МПК — это та отправная точка, которая определяет концентрации, целесообразные для дальнейшей постановки исследования. Но речь идет о бактерицидном действии сочетания антибиотиков. Поэтому, в идеальном варианте, предпочтительны, как исходные, данные о бактерицидной концентрации, МБК. Поскольку МБК редко имеется в распоряжении исследователя, можно ограничиться и МПК. Рассматривая перспективу постановки данного исследования важно определить его цель: что предполагается, — исключить возможность антагонизма? Тогда следует использовать концентрации, большие, чем МПК. Это возможная, но достаточно редкая причина для анализа. Чаще речь идет о перспективе достижения потенцированного (бактерицидного) действия сочетания антибиотиков на микроб. В этом случае необходимы концентрации равные и меньшие МПК. Чтобы уловить синергидный бактерицидный эффект достаточно использовать половину МПК и одну четвертую МПК каждого из двух изучаемых в сочетании антибиотиков.

Принципиальная схема такого исследования:

1. Выбор жидкой питательной среды, адекватной по своим ростовым характеристикам тестируемому микробу.
2. Приготовление необходимых разведений антибиотиков, в том числе первого монопрепарата и второго монопрепарата (МПК; 0,5 МПК; 0,25 МПК); сочетаний антибиотиков (0,5+0,5 МПК; 0,25+0,25 МПК); все разведения («рабочие концентрации») делают в жидкой питательной среде.
3. Приготовление инокулюма и инокуляция т. о., чтобы в конечном итоге было около $6 \cdot 10^5$ КОЕ/мл. Инокуляции под-

лежат все пробирки с питательной средой, содержащей антибиотики, антибиотики, взятые в сочетании и контрольная (контроль культуры).

4. Инкубация; продолжительность определяется свойствами тестируемого микроба.
5. Мерный высев на чашки с плотной питательной средой в разведениях, обеспечивающих возможность учета числа колоний. Высев производят в выбранных исследователем временных точках, но не менее четырех.
6. Инкубация чашек с плотной питательной средой в течение периода, необходимого для роста колоний тестируемого микроба.
7. Учет числа колоний, выросших на плотной питательной среде.
8. Оценка результата исследования и передача полученных данных лечащему врачу.

По ряду пунктов можно сделать несколько замечаний. Для тестирования большинства родов (видов) микроорганизмов пригоден бульон Мюллера-Хинтон с т. н. контролируемым катионным составом, о котором говорится в отечественных МУК по определению чувствительности микроорганизмов к антимикробным препаратам. Это не исключает возможность и целесообразность использования иных питательных сред, если это определяется особенностями тестируемого микроба.

Поскольку заключение о результатах исследования строится исключительно на сравнении летального действия каждого из взятых препаратов с действием препаратов в сочетании, причем только в сравнимых концентрациях, то важно технически соблюсти такое соответствие концентраций. Это достигается использованием одного и того же базового разведения, а также одних и тех же промежуточных разведений каждого из антимикробных препаратов. Первое (базовое) разведение (т. е. получение раствора из субстанции с максимальной концентрацией) может быть выполнено с использованием дистиллированной воды или органического растворителя с последующим использованием воды (или без нее), но все последующие разведения, включая промежуточные, делаются в жидкой питательной среде. Поскольку органические растворители могут обладать противомикробными свойствами, их в рабочих растворах должно быть не более 2–5%, но оптимально от 1% и менее.

Точность при приготовлении инокулюма имеет особое значение — ведь число микробных клеток при посеве на завершающей стадии исследования не должно быть слишком большим, чтобы количество колоний после высева было считаемо. И их число не должно быть слишком малым и в контроле, и в опытных пробирках с засеянной средой, в которых антибиотик (монопрепарат) присутствует в бактериостатических концентрациях. В противном случае эффект от сочетанного действия останется не ясным. Приблизительное число колоний при посевах должно быть прогнозируемым (кроме, естественно, количества колоний в случае синергидного эффекта при действии сочетаний антибиотиков). Впрочем, это, во многом, умение микробиолога выбрать правильные разведения. И тут, как принято говорить, «возможны варианты». Главное, чтобы в конечном итоге на поверхности плотной питательной среды было не более 300 колоний — это предел, при котором подсчет их числа еще возможен. Для упрощения производства разведений и было предложено исходить из инокулюма, содержащего $3 \cdot 10^8$ КОЕ/мл (т. е. взвесь микроба по стандарту 1,0 McFarland).

Выше был назван верхний предел того количества колоний, который может быть на чашке, позволяющий определить их число. Но есть также и минимум колоний, который принято считать допустимым для учета. Некоторые авторы называют 10 КОЕ. Исходя из определенного опыта, следует, однако, согласиться с теми исследователями, которые считают 25–30 колоний на поверхности среды, как отражающие истинное содержание числа выживших клеток в источнике для посева, т. е. в жидкой питательной среде. Специальные эксперименты со стафилококками, эшерихиями, клостридиями подтверждают целесообразность и информативность соблюдения такого условия.

Практическая реализация подобных требований — задача не простая и ее решение может оказаться затратным. Наиболее логичный, хотя и трудоемкий, вариант — приготовление нескольких десятикратных разведений. Из основной пробирки переносят 0,1 мл во вторую, содержащую 0,9 мл изотонического раствора хлорида натрия или жидкой питательной среды, затем из этой пробирки 0,1 мл в следующую с теми же жидкостями, потом из третьей в четвертую и т. д. Сколько должно быть таких разведений, решает сам исследователь. Как правило, их должно быть не менее трех, но может быть существенно больше, особенно, когда речь идет о системе, содержащей малые количества МПК (1 : 2 или 1 : 4). Не-

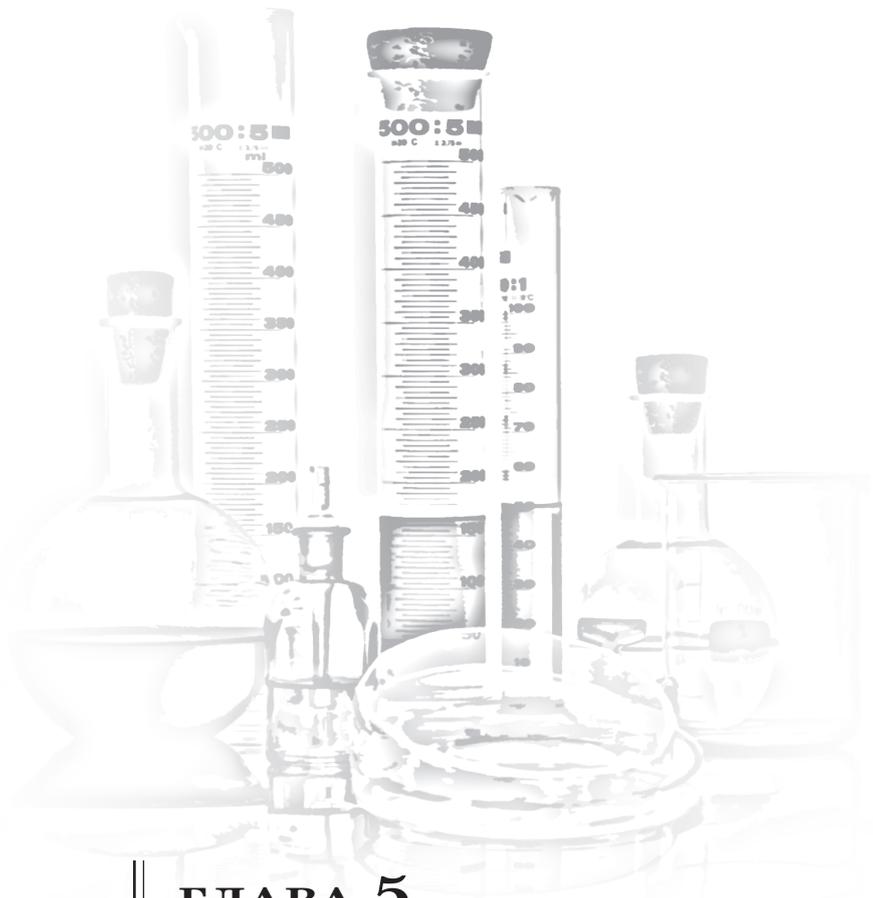
редко, когда в среде содержится только один препарат в концентрации, меньшей МПК, можно наблюдать видимый рост. Это требует поправки для двух первых разведений, которые должны быть не десятикратными, а стократными. Далее из каждой пробирки производят высев на две дублирующие чашки с плотной питательной средой. По 0,1 мл пробы наносят на поверхность агара пипеткой или мерной петлей и распределяют по поверхности. Чашки помещают в термостат для инкубации.

Еще один важный момент — продолжительность инкубации. Если речь идет о времени пребывания культуры в жидкой питательной среде, то обычно достаточно суток. В течение этого периода осуществляется высев на плотную питательную среду, как уже отмечено, в нескольких точках; например, через 4, 8, 12 и 24 ч. Возможен и более частый высев, каждые 2–3 часа. Но менее, чем в 4-х временных точках проводить посев нецелесообразно, информация о том, как быстро проявляется бактерицидное действие, весьма полезна. Более пеструю картину представляет собой время инкубации чашек с посевами. Культуры, подвергнутые действию антибиотиков, часто образуют видимые и типичные колонии значительно медленнее, чем при обычной вегетации на плотной питательной среде. Суток достаточно для эшерихий, клебсиелл, других представителей семейства *Enterobacteriaceae*, если посев произведен на питательный агар с добавлением крови. Такой же период достаточен для палочек синезеленого гноя и иных т. н. неферментирующих бактерий при их росте на кровяном агаре. Стафилококки на такой же питательной среде целесообразно инкубировать в течение двух суток, а энтерококки и стрептококки до трех суток. Такая продолжительность инкубационного периода должна быть вне зависимости от видимого роста в течение первых суток, поскольку число выросших позже колоний может заметно увеличиться. Гемофильные бактерии на шоколадном агаре со стимулирующей добавкой также требуют трехсуточной инкубации.

Рост как в жидкой, так и на плотной питательной среде осуществляют при 35–37°C, если нет причин для иного температурного режима. Итак, чашки извлечены из термостата, теперь необходимо оценить полученные результаты посевов. Традиционно, прежде всего, просматривают рост на чашках с посевом из контрольных (не содержащих антибиотики) пробирок. Типичное для роста культуры увеличение числа колоний характеризует качество питательной среды, техники посева и свойства самого микроорга-

низма. С этим надо считаться при оценке результатов исследования. Далее последовательно просматривают чашки с посевом из пробирок со средой, содержащей первый антибиотик в концентрации, равной МПК, половины МПК и четверти МПК. Подсчитывают число колоний, усредняют данные, полученные на двух (или более) чашках, умножают на разведения. Затем такую же процедуру производят с чашками, на которые произведен высеv из пробирок, содержащий второй антибиотик. Наконец, то же делают с чашками, на которые был произведен высеv из пробирок с сочетанием антибиотиков в питательной среде. Следующий шаг — сравнение усредненных данных по каждой временной точке. Если при действии сочетания антибиотиков число колоний не уменьшилось или снизилось в 10 раз, эффект расценивается, соответственно, как индифферентный или суммарный, если в 100 раз (т. е. на два десятичных логарифма), то действие взятых вместе антибиотиков может рассматриваться, как синергидное. Чем при меньшей концентрации антибиотиков, чем быстрее во времени проявляется потенцированное действие, тем вероятнее проявление синергизма при терапии больного, тем выше бактерицидный (фунгицидный) потенциал сочетания.

Но эффект может быть прямо противоположным. При сочетанном использовании антибиотиков число колоний окажется большим, чем при действии одного из антибиотиков. Если число выживших клеток будет больше на два порядка, это свидетельствует о конкурентном действии двух препаратов. Не имеет значения, в какой временной точке проявится антагонизм и при каких сочетаниях (МПК или части МПК). Во всех случаях это сигнал — совместное применение данных препаратов нецелесообразно.



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 бактероиды, 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 бактероидам, наиболее значительным представителям резидентной микрофлоры человека. Практически нет ни одной слизистой полости человека, населенной т. н. «нормальной» мик-

рофлорой, в которой не присутствовали бы эти бактерии, причем в значительном количестве. А в толстом кишечнике это не просто основная, но преобладающая микрофлора, составляющая не менее 90% биомассы. Бактероиды — существенная часть резидентных микроорганизмов полости рта и полового тракта. Их можно обнаружить на слизистой дыхательных путей. Бактероиды в целом нельзя отнести к высокопатогенным микроорганизмам. Но в определенных условиях, при попадании в поврежденные ткани, при сочетанном воздействии с микроорганизмами иных групп, при вегетации в больших количествах в нетипичном для их обитания месте, они способны вызвать тяжелейшую патологию, сопровождающуюся деструкцией тканевых образований и токсикозом.

В непростой и меняющейся таксономической характеристике бактериоидов как наиболее важную и с точки зрения патогенности, и в связи с проблемой антибиотикотерапии следует выделить те из них, которые, несколько условно, принято называть группой *Bacteroides fragilis*. К ней, помимо самой *B. fragilis*, относятся также виды *B. thetaiotaomicron*, *B. distasonis*, *B. ovatus*, *B. vulgatus* и еще ряд видов (всего их 23). В этиопатогенезе заболеваний человека особое место занимает, прежде всего, *B. fragilis*, относительно часто — *B. thetaiotaomicron*, реже — остальные виды. Достаточно сложно перечислить все патологии, в возникновении и течении которых важную роль способна играть *B. fragilis*. Прежде всего, это, естественно, заболевания органов живота (перитонит, внутрибрюшинные, забрюшинные и параректальные абсцессы, аппендицит, эндометрит и др.). Среди других — сепсис, абсцессы легких, эмпиема плевры, пневмония, раневые инфекции. При сепсисе вызванные бактериоидами абсцессы могут образоваться в паренхиматозных органах и мозге. В свете обсуждаемой проблемы, связанной с лабораторным обеспечением антибиотикотерапии, еще раз важно подчеркнуть, что *B. fragilis* (и это же относится к другим представителям т. н. группы *B. fragilis*) способна вызвать инфекционную патологию как монокультура, так и в ассоциации с другими бактериями, относящимися к факультативным и облигатным анаэробам. В частности, при патологии органов живота — с кишечными палочками, энтерококками, бактериоидами иных видов, фузобактериями и др. Естественно, что все это имеет большое значение и для диагностических манипуляций, и для адекватной оценки чувствительности возбудителя к антибиотикам. Остальные представители группы могут быть

выделены при патологии органов живота и малого таза, осложнениях послеоперационных ран, прежде всего брюшной стенки, промежности и нижних конечностей, бактериемии. Диагностируют их значительно реже, чем *B. fragilis*.

Следующий важный элемент, характеризующий группу *B. fragilis*, ее чувствительность к антимикробным препаратам. Это не просто важная характеристика, но и серьезная, часто трудно-решаемая клиническая проблема, потому что круг тех антибиотиков, которые реально *in vivo* способны подавить рост и (или) жизнеспособность бактериоидов, очень узок [77, 88, 89, 92, 98, 112, 163]. Более того, эти микроорганизмы могут быть вторично устойчивы к тем препаратам, которые обычно применяют при инфекциях, вызванных облигатно анаэробными бактериями, в том числе и в первую очередь бактериоидами. Таким образом, ответы на поставленные выше вопросы суммарно говорят о сложности проблемы антибиотикотерапии бактериоидных инфекций и о достаточно высокой роли лабораторной (микробиологической) службы в обеспечении ее продуманности, эффективности.

Если не принимать во внимание вторичную (индуцированную) устойчивость бактериоидов (здесь и далее под термином «бактериоиды» имеются в виду те виды, которые принадлежат к группе *B. fragilis*), а исходить из природной (конститутивной) чувствительности бактериоидов к антибиотикам, то к основным «антибактероидным» препаратам могут быть отнесены клиндамицин, метронидазол, цефокситин, карбапенемы (меропенем и др.), пенициллины в сочетании с ингибиторами бета-лактамаз. В последние годы серьезное внимание уделяют т. н. четвертому поколению фторхинолонов (моксифлоксацин, гатифлоксацин и нек. др.), которые, в отличие от большинства препаратов этой группы, могут подавлять бактериоиды в клинически значимых концентрациях. Остальные антибиотики, в т. ч. большинство пенициллинов и цефалоспоринов, аминогликозиды, макролиды и др., по действию на бактериоиды не активны, или (на что важно обратить внимание микробиологов) они могут действовать на микроб *in vitro*, но не *in vivo*. Однако повторим, это если речь идет о конститутивной чувствительности бактериоидов. Иное дело — вторичная устойчивость этих микроорганизмов — она, в целом, имеет тенденцию к росту, причем по отношению к некоторым антибиотикам существенному [178]. Прежде всего, это касается чувствительности к клиндамицину. По данным некоторых исследований сегодня от 10 до 48% штаммов бактериоидов

устойчиво к антибиотику [77, 79, 112, 163]. При этом уровень устойчивости может быть значительным — с МПК до 128 мкг/мл и более. Постепенно, хотя достаточно медленно, увеличивается число штаммов, устойчивых к сочетанию пенициллинов с ингибиторами бета-лактамаз (амоксциллин — клавулановая кислота, ампициллин — сульбактам, пиперациллин — тазобактам). Есть сообщения, что их число может достигать 10–48% [77]. Более благополучны данные об устойчивости *B. fragilis* к метронидазолу, тем не менее, около 1–3% клеток устойчиво к препарату [77, 88, 131]. Экспериментально показано, что индуцированная устойчивость микроба может быть значительной, при этом ингибирующая концентрация достигает 64–128 мкг/мл [157]. Устойчивость бактериоидов к карбапенемам также пока остается не частым явлением. Тем не менее, она возможна. Отмечено, что в последние годы МПК карбапенемов возрастают, достигая величин, превышающих показатели чувствительности или устойчивости бактериоидов [88, 92, 157, 201]. Отмечено, что штамм может быть устойчивым или малочувствительным к одному карбапенему, но чувствителен к другому. Не исключено, что это связано с недостаточной стандартизацией критериев чувствительности. Достаточно противоречивы данные об устойчивости бактериоидов к фторхинолонам последнего поколения, к тем из них, которые считаются активными в отношении облигатно анаэробных бактерий [151, 157, 177]. Можно считать доказанной возможность сравнительно частой устойчивости бактериоидов к левофлоксацину (до 25% выделенных культур), в пределах 5–10% выявлена резистентность к сатифлоксацину и моксифлоксацину.

Очевидно, что бактериоиды (речь идет о группе *B. fragilis*) могут быть устойчивы или малочувствительны практически ко всем антимикробным препаратам, которые считаются наиболее эффективными при инфекциях, вызванных этими микроорганизмами. Т.о. микробиолог стоит перед необходимостью решать достаточно непростую задачу — определить чувствительность очень требовательных микроорганизмов, бактериоидов, к антибиотикам. Естественно, перед этим микроб должен быть выделен, поскольку тестировать на чувствительность можно только чистую культуру этого «капризного» микроба. Методология подобного исследования разработана и будет представлена далее. Существуют критерии чувствительности бактериоидов к антибиотикам. Они не оптимальны, часто уточняются, но, тем не менее, существуют и должны быть используемы.

При рассмотрении вопросов антибиотикотерапии бактероиды часто включают в группу грамотрицательных облигатно анаэробных бактерий. Об этом важно помнить, поскольку в некоторых зарубежных стандартах критерии чувствительности (контрольные МПК) даны именно для такой группы микроорганизмов. Вместе с бактероидами в нее включены фузобактерии и превотеллы. Среди представителей этих двух родов также есть патогенные виды, и определение их чувствительности к антибиотикам имеет серьезное практическое значение.

Род *Prevotella* включает по меньшей мере 6 болезнетворных видов (*P. melaninogenicus*, *P. disiens*, *P. bivia*, *P. oris*, *P. buccae*, *P. leoscheii*). Ранее все эти микроорганизмы причислялись к бактероидам, но затем были выделены в самостоятельный род. Особенности чувствительности превотелл к антибиотикам, заметно отличающих их от ныне признанной группы *B. fragilis*, были одним из существенных побудительных мотивов для такого разделения уже на основе существующих генетических подходов. Превотеллы играют важную роль в возникновении патологии полости рта. Будучи представителями «нормальной» флоры кишечника и женских половых путей, они вызывают заболевания женских половых органов. Приведены наблюдения об их этиологической роли в патологии носоглотки, легких, внутрибрюшинной инфекции и нек. др. Чувствительность превотелл к антибиотикам изучена в меньшей степени, чем бактероидов. Для лечения вызванных ими заболеваний традиционно используют метронидазол, клиндамицин, сочетания ампициллина, амоксициллина или пиперациллина с ингибиторами бета-лактамаз, карбапенемы, цефокситин. Однако, многие штаммы чувствительны к бензилпенициллину, ампициллину (без ингибитора бета-лактамаз), пиперациллину, другим т. н. антипсевдомонадным пенициллинам, антибиотикам макролидной группы и тетрациклинам, фторхинолонам. В то же время ко всем перечисленным выше препаратам могут быть устойчивые варианты [24, 77, 81, 163, 201]. Известна способность образования превотеллами бета-лактамаз, гидролизующих как пенициллины, так и цефалоспорины. Показана возможность их устойчивости к метронидазолу и клиндамицину [77, 78].

Чувствительность превотелл к антибактериальным препаратам определяют так же, как и других облигатно анаэробных бактерий. В качестве критериев чувствительности рекомендуют использовать предложения, разработанные для грамотрицательных анаэробных микроорганизмов.

Фузобактерии, это еще одна группа болезнетворных анаэробных грамотрицательных палочек, в отличие от превотелл существующих в микробиологической таксономии самостоятельно длительный период. Они давно известны как возбудители тяжелых инфекций, хотя, фактически, являются составной частью нормальной микрофлоры полости рта, кишечника, гениталий. Среди патогенных видов *F. necrophorum*, *F. mortiferum*, *F. nucleatum*, *F. varium*. Фузобактерии являются возбудителями тяжелых гнойных внутриабдоминальных инфекций, в т. ч. межпетельных, внутривнутрипеченочных, параректальных абсцессов, перитонита. Известны септические процессы, возникновение которых связано с *F. necrophorum*, *F. mortiferum*, *F. nucleatum*, в том числе с образованием множественных абсцессов, включая абсцессы мозга и легких. Известен ряд других патологий, в этиологии которых фузобактерии играют важную роль и которые отличаются крайне тяжелым течением с деструкцией тканей и токсикозом.

В терапии подобных инфекций антибиотики занимают важнейшее место наряду с оперативным пособием (если оно возможно). В числе основных препаратов бензилпенициллин, который используют в больших дозах. Кроме того, считаются эффективными метронидазол, сочетания пенициллинов с ингибиторами бета-лактамаз, клиндамицин, карбапенемы, цефокситин. Устойчивость бактерий к этим и другим антибиотикам изучена недостаточно. Тем не менее, найдено, что фузобактерии способны продуцировать бета-лактамазы. Выделены штаммы, резистентные к метронидазолу, клиндамицину, карбапенемам [77, 89, 201]. Их число пока не велико. Техника определения чувствительности фузобактерий к антибиотикам и критерии чувствительности, по некоторым стандартам, общие для грамотрицательных анаэробных бактерий.

Вопрос о чувствительности (резистентности) к антибиотикам некоторых других грамотрицательных бактерий родов *Sutterella*, *Porphyromonas*, *Bilophila*, кокков *Veillonella* изучен мало. Исследователи, тестирующие данные микроорганизмы, исходят из общих положений, упомянутых выше.

Как известно, к облигатно анаэробным микроорганизмом принадлежит ряд грамположительных бактерий. Среди тех из них, которых можно выделить от человека, несколько родов, чья патогенность представляется сомнительной или чья этиологическая роль проявляется исключительно редко: например, бифидобактерии, анаэробные лактобактерии, эубактерии и нек. др. В то же время

не вызывает сомнений болезнетворность некоторых видов грамположительных анаэробных кокков, клостридий, пропионибактерий, анаэробных актиномицетов. Антибиотикотерапия вызванных ими инфекций является общепризнанным лечебным пособием. Отсюда необходимость в исследовании их чувствительности к антибиотикам. Несмотря на то, что изучение этой проблемы нельзя признать достаточным, тем не менее, есть определенные данные, позволяющие характеризовать в той или иной мере опасность резистентности этих микроорганизмов к антибиотикам.

Термин анаэробные грамположительные кокки охотно используется в медицинской литературе не случайно. Он отражает и те дискуссии, которые ведутся вокруг таксономической принадлежности ряда кокков, пептококков особенно, и выделение новых видов этих микроорганизмов. Определенная общность в антибиотикотерапии инфекций, вызванных анаэробными грамположительными кокками, тоже не может не учитываться. В этой связи будем рассматривать проблему чувствительности (резистентности) пептострептококков, пептококков, некоторых новых родов (*Finegoldia*, *Micromonas* и др.), объединив их в единую группу — грамположительные анаэробные кокки.

Роль этих микроорганизмов в патологии человека сомнений не вызывает. Их выделяют из абсцессов различной локализации, в том числе внутрибрюшинных, малого таза, шеи, при гнойных поражениях слизистых полостей носа, при гнойном отите, остеомиелите и при ряде других инфекционных поражениях тканей. Наконец, они могут вызвать сепсис, в том числе с образованием множественных гнойников. Наиболее часто микробиологи, выделяя культуру анаэробного кокковидного микроорганизма, относят ее к пептострептококкам. Но раз есть инфекционное начало, то и антимикробная терапия является показанной. Грамположительные кокки отличаются чувствительностью к широкому кругу антибиотиков. Они чувствительны к пенициллинам (бензилпенициллин, ампициллин, пиперациллин), к сочетанию пенициллинов с ингибиторами бета-лактамаз, цефалоспорином 1–2-го поколения (цефазолин, цефалотин, цефуроксим, цефаклор), антибиотикам макролидной группы (эритромицин, кларитромицин и др.), клиндамицину, хлорамфениколу, карбапенемам (имипенем и др.), последнему поколению фторхинолонов (гатифлоксацин, моксифлоксацин). К числу антибиотиков первого ряда, используемых при терапии инфекций, вызванных пептострептококками, относят бен-

зилпенициллин, ампициллин, клиндамицин. Однако, анаэробные грамположительные кокки часто выделяют в ассоциации с другими микроорганизмами и это может внести существенные уточнения в выбор противомикробного лекарственного средства. Естественно, что важнейшим показанием для выбора того или иного антибиотика является вторичная устойчивость возбудителя. А она оказалась возможной, хотя и не часто [77, 79, 80, 196]. Выявлены штаммы, устойчивые к метронидазолу, клиндамицину. Хотя число устойчивых штаммов не велико, отмечают определенную тенденцию к увеличению их количества.

Клостридии — очень распространенные и очень разнообразные микроорганизмы, включающие около 100 видов. Большая их часть не патогенна. Зато те из них, которые относятся к болезнетворным, вызывают очень тяжелые инфекции: газовая гангрена (мионекроз), сепсис, ботулизм, столбняк, псевдомембранозный колит, некротический энтероколит и ряд других заболеваний разной степени тяжести, в этиологии которых основную роль играют клостридии. Разнообразие патоморфологических и клинических проявлений каждого из заболеваний во многом или исключительно зависит от свойств возбудителя. Каждый из них вызывает «свою» патологию. Трудно представить себе что-либо общего между газовой гангреной и ботулизмом; но и то, и другое заболевание вызывается клостридиями, в первом случае это *C. perfringens* и несколько других видов, которые часто обозначают как «патогенные клостридии», во втором — *C. botulinum*; то же можно заметить и о псевдомембранозном колите (*C. difficile*) и столбняке (*C. tetanus*). Очень разные патологии, и очень разные лечебные пособия, которые при этом необходимы. В определенной степени своеобразие прослеживается и при антибиотикотерапии клостридиозов, хотя есть достаточно много общего. Прежде всего, можно отметить, что используют несколько препаратов, которые за некоторым исключением являются своего рода универсальными для лечения инфекций, вызванных клостридиями — это метронидазол, бензилпенициллин и близкие ему по активности пенициллины, клиндамицин, цефокситин, карбапенемы. Однако, еще раз подчеркнем, есть и исключения. Удельная активность каждого из них в лечебном процессе неодинакова, в том числе и из-за возможной вторичной (индуцированной) устойчивости возбудителя к антимикробным препаратам [77, 78, 163]. И это очень и очень важно с точки зрения обсуждаемой проблемы — определения

чувствительности клостридий к антибиотикам. Поэтому кратко остановимся на отдельных нозологических формах и на каждом из названных возбудителей (или их группе), имея в виду — чем лечат патологию и какова вероятность устойчивости возбудителя к антибиотикам.

Газовая гангрена (некротический миозит, мионекроз) — тяжелейшее осложнение различного рода травм чаще всего с открытым повреждением тканей. В свое время газовая гангрена была бичом всех войн. Но и в мирное время газовая гангрена была тяжелейшим осложнением при повреждении тканей, в том числе в акушерской практике. Перелом наступил с внедрением двух профилактических мероприятий: быстрая эвакуация больного с своевременной хирургической обработкой раны и введение раненому больших доз бензилпенициллина. Такая схема была апробована в 50-е годы прошлого века, в том числе в т. н. «горячих точках», и оказалась успешной. Сегодня газовая гангрена из частого и очень опасного осложнения травмы перешла в категорию редкого заболевания, и, хотя более легким оно не стало, смертность снизилась радикально. Это во многом важнейший результат своевременной точной по выбору препарата антибиотикотерапии. Основным антибиотиком для профилактики и лечения газовой гангрены был и остается бензилпенициллин. Однако, он не единственный антимикробный препарат, эффективный при данной патологии. В свое время автор, изучая проблему антибиотикотерапии газовой гангрены, на основании исследований *in vitro* и в экспериментах на животных имел возможность отметить значительный лечебный потенциал клиндамицина, рифампицина, некоторых тетрациклинов и хлорамфеникола. Особенно примечателен был рифампицин, который в витральных исследованиях оказался активен в сотых и тысячных долях мкг, а при экспериментальном клостридиозе предупреждал развитие инфекции в малых дозах. И тем не менее, предпочтение может быть отдано бензилпенициллину по нескольким причинам: безусловная высокая активность по действию на клостридии, в первую очередь *C. perfringens*, низкая токсичность, возможность введения антибиотика в больших дозах, что для профилактики и лечения газовой гангрены имеет особое значение (ни один другой антибиотик не может сравниться с ним по этой характеристике), доступность и экономичность. Наконец, что главное в плане обсуждаемой в данном издании проблемы, вероятность обнаружения вторичной

(индуцированной) устойчивости к бензилпенициллину у штаммов *C. perfringens* исключительно мала. О такой возможности упоминают в некоторых публикациях. Известны иные виды клостридий, у которых вторичная устойчивость к пенициллину оказалась возможна. Однако, убедительной информации о развитии резистентности к бензилпенициллину у штаммов *C. perfringens* нет. Это важно для ответа на вопрос, надо ли определять чувствительность патогенных клостридий к антибиотикам.

Прежде всего, целесообразно разделить возбудителей газовой гангрены на две группы. В первую могут быть отнесены *C. perfringens* и *C. septicum*, для которых существующие методы определения МПК приемлемы (и в плотной, и в жидкой питательных средах). Во вторую следует включить *C. novyi*, *C. histolyticum*, *C. bifermentans*: для этих видов методики определения чувствительности к антибиотикам не отработаны. Особые трудности возникают при тестировании *C. novyi* (в прошлом *C. oedematiens*). Оценивая реально существующую ситуацию можно утверждать, что только применительно к *C. perfringens* методология определения чувствительности выглядит хотя бы условно приемлемой, дающей воспроизводимые результаты (о некоторых деталях — далее).

К каким антибиотикам следует определять чувствительность возбудителей газовой гангрены, главным образом, *C. perfringens*? По мнению большинства исследователей в этом пока нет необходимости применительно к бензилпенициллину (а вместе с ним и чувствительности к ампициллину). Но пенициллины не всегда можно применять. Сенсбилизация к ним суровая реальность, а она является абсолютным противопоказанием к применению пенициллинов. Заменой пенициллинов являются клиндамицин, метронидазол, карбапенемы (имипенем, меропенем и др.). Наиболее часто упоминают клиндамицин. Более того, есть рекомендация (не вполне убедительная) применять его вместе с бензилпенициллином в лечебных целях при клостридиальном мионекрозе. К клиндамицину клостридии могут быть устойчивы или малочувствительны (с МПК 8 мкг/мл и более). Устойчивые или малочувствительные к метронидазолу штаммы также обнаружены среда *C. perfringens*, хотя их число, видимо, очень не велико.

Отмечена возможность устойчивости клостридий к тетрациклинам, хлорамфениколу. Упоминается редкая возможность резистентности к карбапенемам, однако, речь идет об единичных штаммах, и этот факт еще требует подтверждения. Однако, применение

карбапенемов при сенсбилизации больного к пенициллинам требует очень большой осторожности (все они бета-лактамы). Итак, в определении чувствительности *C. perfringens* к некоторым антибиотикам может возникнуть необходимость; в основном речь идет о метронидазоле и клиндамицине. А раз так, то должны быть критерии чувствительности — break points, МПК, являющиеся показателем чувствительности или устойчивости клостридий. Ориентируясь на Европейские рекомендации (EUCAST), которые предложены в 2011 г., чувствительными к клиндамицину могут быть признаны культуры при МПК $\leq 4,0$ мкг/мл, резистентными — > 4 мкг/мл, а чувствительными к метронидазолу также при МПК ≤ 4 мкг/мл и устойчивыми — > 4 мкг/мл. Европейские требования по чувствительным к бензилпенициллину также велики — $\leq 0,25$ мкг/мл; при МПК 0,5 мкг/мл микроб устойчив.

Отдельного обсуждения заслуживает *C. difficile*. Хотя этот микроб принадлежит к тому же роду, что и возбудители газовой гангрены, по чувствительности к антибиотикам и, соответственно, по терапии вызванных им инфекций, эти клостридии существенно отличаются от прочих. Без большого преувеличения можно сказать, что многие из тех антимикробных препаратов, что используют для лечения клостридиозов, являются индукторами тяжелых инфекций кишечника, вызванных *C. difficile*. К таковым «индукторам», в частности, принадлежат клиндамицин и ампициллин, особенно первый. Называют и другие препараты, некоторые фторхинолоны, цефалоспорины, тетрациклины, макролиды. *C. difficile* является минорным представителем резидентной микрофлоры кишечника. Ее обнаруживают в кишечном содержимом человека (причем не у всех людей) в количестве не более, чем 10^3 КОЕ/г. Никакой опасности этот микроб не представляет до того момента, пока в силу каких-либо причин, в первую очередь и главным образом при антибиотикотерапии, не происходит подавления доминирующей микрофлоры кишечника, особенно анаэробной (она и есть доминирующая). В условиях изменения микробного баланса *C. difficile* получает благоприятные условия для размножения. Когда биомасса *C. difficile* достигает критической величины вступает в силу еще один фактор, — продуцируемый микробом энтеротоксин. Развивается колит или, что наиболее опасно для человека, т. н. псевдомембранозный колит, тяжелейшее смертельно опасное заболевание. Это осложнение антибиотикотерапии описано достаточно подробно [12]. Для об-

суждаемой проблемы важно то обстоятельство, что патология лечится главным образом антимикробными препаратами и их число ограничено. Реально их всего лишь два: метронидазол и ванкомицин. Одни авторы располагают их по значимости в таком порядке, другие считают ванкомицин основным антибиотиком, а метронидазол резервным. Естественно встает главный вопрос, а могут ли эти клостридии быть резистентными к тому и другому препарату. Есть мнение, что это маловероятно, но его опровергают другие исследователи, которые показали, что *C. difficile* может быть устойчива к метронидазолу и малочувствительна к ванкомицину [91, 146]. И хотя число устойчивых штаммов невелико (4–6%), с самим фактом считаются стандартизаторы, которые предлагают использовать для тестирования метод серийных разведений в плотной питательной среде и критерии чувствительности (устойчивости) микроба к обоим препаратам.

Особенность терапии осложнений, вызываемых *C. difficile*, заключается в том, что наиболее приемлемым признается оральный путь введения и ванкомицина, и метронидазола. Ванкомицин не всасывается из кишечника в кровь, что обеспечивает сравнительно высокие его концентрации в кишечном содержимом. Это позволяет считать, что к резистентным могут быть причислены *C. difficile*, для которых МПК более 16 мкг/мл. Метронидазол, наоборот, активно проникает из тонкого кишечника в кровь. Его биодоступность составляет не менее 80% от введенной дозы. С калом выводится от 6 до 16% метронидазола (включая неактивные метаболиты). Поэтому к чувствительным могут быть отнесены культуры, для которых МПК не превышают 8–16 мкг/мл. Эти критерии носят рекомендательный характер. Они выше, чем контрольные МПК для других анаэробов, вошедших в Европейский стандарт.

Приведенный краткий обзор показывает, что проблема резистентности облигатно анаэробных бактерий к антимикробным препаратам реальна. Речь идет, в частности, об устойчивости распространенных микроорганизмов, способных вызвать тяжелые и, даже, смертельно опасные инфекции. Антибиотики играют важную, а порой, и решающую роль в профилактике и терапии подобных заболеваний. Все это свидетельствует о необходимости проведения тестирования чувствительности анаэробных бактерий к противомикробным препаратам, по меньшей мере, в тех клинических ситуациях, когда речь идет о жизни больного и (или) при недостаточной эффективности проводимого лечения. А раз так,

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-

воряют ее в 1 N растворе щелочи (NaOH) из расчета 1 г гемина в 20 мл растворителя (5 % раствор). После того, как гемин полностью растворится, добавляют 80 мл дистиллированной воды (получают 1 % раствор гемина); теперь раствор гемина пригоден к использованию в основной питательной среде. Раствор витамина K_1 готовят в этаноле (предпочтителен абсолютный спирт). Для 1 г витамина K_1 необходимо 100 мл спирта (для 0,1 г — 10 мл). Как правило, растворы гемина и витамина K_1 , приготовленные с соблюдением правил асептики, не влияют на стерильность основной питательной среды или, во всяком случае, на информативность самого исследования чувствительности микроба к антибиотикам. В противном случае оба раствора следует стерилизовать. Оптимальный вариант — стерилизация фильтрацией. Раствор гемина можно также стерилизовать в автоклаве 15 мин при 121 °С. Раствор витамина K_1 автоклавированию не подлежит. Оба раствора, гемина и витамина K_1 , могут храниться в холодильнике во флаконах из темного стекла, хорошо закупоренных, при температуре 2–8 °С; раствор гемина не более месяца, раствор витамина K_1 — до года. При признаках микробного загрязнения растворов они не используются.

Для получения т. н. лаковой (лизированной) крови используют баранью кровь, которую замораживают при температуре от –20 °С или ниже. Размораживают кровь или в водяной бане при +35–37 °С (быстрое размораживание) или постепенно в холодильнике при +2–8 °С. Лаковая кровь может храниться при температуре +2–6 °С не более 10 суток, при –20 °С — до полугода.

Помимо названной плотной питательной среды, агара для выделения бруцелл с добавками, неоднократно делались попытки использовать иные агаризованные питательные среды для анаэробов, в т. ч. агар Шедлера, среду Вилкинса-Шеллгрена, сердечно-мозговой агар, Колумбийский агар с добавками и др. По мнению некоторых авторов, они могут быть достаточно надежными при тестировании чувствительности анаэробных бактерий к антибиотикам. Вместе с тем, стандартизаторы США убеждены, что из всех существующих питательных сред наиболее воспроизводимые результаты обеспечивает именно Бруцелл-агар. В этом утверждении, которое, безусловно, следует учитывать, есть и определенное не вполне убедительное допущение. Сравнение состава питательных сред для анаэробных бактерий показывает, что они имеют очень много общих компонентов, способствующих росту анаэробных бактерий, и в них нет таких соединений, которые

могли бы инактивировать антибиотики. Опыт производства и испытания питательных сред убеждает, что решающими элементами являются стандартность и качество составных компонентов питательных сред, стабильность буферных свойств (в т. ч. рН среды), и их способность обеспечивать надлежащий редокс-потенциал. Если эти требования соблюдаются, если контроль качества питательной среды с использованием референс-штаммов проводится регулярно, если соблюдаются иные требования к проведению аналитического исследования, то основные «анаэробные» питательные среды вполне адекватны поставленной задаче, — оценке чувствительности анаэробных бактерий к антибактериальным препаратам. Сказанное ни в коей мере не претендует на умаление роли агара для бруцелл, но при одном условии, если качество среды является высоким. При работе с анаэробами это требование особо актуально.

Инокулюм. Приготовление инокулюма для определения чувствительности анаэробных бактерий к антибиотикам реализуется по знакомой для любого микробиолога методике: либо готовится взвесь микроба, давшего рост на плотной питательной среде, либо используют культуру, давшую рост в жидкой питательной среде. В некоторых публикациях их называют соответственно «суспензионный» и «ростовой» методы приготовления инокулюма. И тот и другой варианты применительно к работе с анаэробными бактериями имеют свои особенности, отличающие их от методологии приготовления взвеси факультативно анаэробных и аэробных бактерий.

Для приготовления суспензии необходимо получить рост изолированных колоний на среде для бруцелл, состав которой приведен выше, или на иной среде для облигатно анаэробных бактерий, обеспечивающей рост этих микроорганизмов в минимально возможный срок, — оптимально в течение 1–2 суток. Однако, продолжительность инкубации зависит не только от качества среды, но и от характера роста микроба: рост типичных колоний *C. perfringens* можно отметить уже через 16–18 ч инкубации, а рост некоторых штаммов *B. fragilis* и через 72 ч. Естественно, что инкубация должна проводиться в строго анаэробных условиях. Если рост на плотной среде типичных колоний получен и чистота культуры не вызывает сомнений, снимают петлей несколько колоний и готовят взвесь культуры в жидкой питательной среде для анаэробов. Это может быть жидкий вариант среды для бруцелл или иная жидкая питательная среда, пригодная для сохра-

нения жизнеспособности клеток облигатно анаэробных бактерий и позволяющая по своей прозрачности и интенсивности окраски контролировать качество и плотность взвеси микроба. Поскольку инокулюм должен быть использован в течение 10–15 мин после приготовления, главное заключается не в ростовых свойствах питательной среды, а в ее рН и редокс-потенциале, т. е. в том, что может реально повлиять на выживаемость требовательных анаэробных бактерий, особенно бактероидов. Хранению взвесь не подлежит. Плотность взвеси устанавливается по стандарту мутности 0,5 McFarland.

Другой («ростовой») метод имеет то преимущество, что он позволяет использовать при определении чувствительности микроба физиологически активные клетки, что для облигатно анаэробных бактерий имеет большое значение. Изначально, как и в первом варианте метода, получают рост изолированных колоний изучаемого микроба на плотной питательной среде. Но далее делают посев на жидкую питательную среду для анаэробов. Это может быть жидкий вариант обогащенной среды для бруцелл (бруцелла-бульон) или также обогащенный вариант тиогликолевой среды. В данном случае питательная среда должна не только сохранить жизнеспособность клеток, но и способствовать их росту. Поэтому в ту и другую среду должны быть добавлены витамин К₁ и гемин.

Тиогликолевая среда, рекомендуемая для всего спектра облигатно анаэробных бактерий, достаточно богата и несколько отличается от привычной для отечественной микробиологии т. н. среды для посева крови или среды для определения стерильности. Есть несколько прописей тиогликолевой среды. Приведем одну из них (обогащенная тиогликолевая среда, ТНЮ, в г/л):

Панкреатический перевар казеина	17,0
Глюкоза	6,0
Папаиновый перевар соевой муки	3,0
Натрия хлорид	2,5
Агар	0,7
Натрия тиогликолят	0,5
L-цистин	0,25
Натрия бисульфит	0,1
Витамин К ₁	100 мг
Гемин	500 мг
рН 7,0 ± 0,2	

Витамин K_1 добавляют в питательную среду в виде спиртового раствора из расчета 1 г в 100 мл, а гемин — предварительно растворенным из расчета 1 г на 100 мл в 20 мл 1 N NaOH и затем в воде до 100 мл. Т. о. витамин K_1 вносят в количестве 0,1 мл, а гемин — 0,5 мл.

Подчеркнем еще раз, может быть использована иная жидкая питательная среда, качественная, проверенная на ростовые свойства, такой прозрачности и цветности, которые позволяют оценивать плотность биомассы в среде. В частности, при исследовании клостридий, может быть использована среда Китт-Тароцци, обеспечивающая в течение 4 ч достаточную для постановки анализа биомассу *C. perfringens*.

Итак, посев произведен. Далее инкубация. Столбик восстановленной питательной среды, особенно тиогликолевой, не требует анаэробных условий. Длительность инкубации определяется необходимостью получения биомассы такой плотности, которая бы соответствовала стандарту 0,5 MvFarland, т. е. $(1-2) \cdot 10^8$ КОЕ/мл. Это небольшая плотность, которая достижима для большинства анаэробных бактерий в течение 6–12 ч, реже суток. Многое зависит от качества питательной среды. Но если в течение суток необходимый рост не получен, используют первый вариант приготовления инокулюма («суспензионный» метод).

Полученная тем или другим способом микробная взвесь, содержащая около $(1-2) \cdot 10^8$ КОЕ/мл исследуемого микроба, используется для посева на предварительно приготовленные чашки с плотной питательной средой, содержащей антибиотик в двукратно меняющейся концентрации.

Приготовление серийных разведений антими­кробных препаратов в питательной среде. Напомним (см. выше), что питательная среда уже готова; она разлита в пробирки в объеме, достаточном для заполнения чашки Петри. Но для дальнейшей работы в нее должны быть добавлены растворы антими­кробного вещества и лаковой крови. Последняя уже приготовлена. Необходимы разведения антибиотика: от наименьшей до наибольшей. Ориентиром для их выбора являются т. н. контрольные концентрации (break-points), т. е. МПК, которые определяют — чувствителен ли микроб, устойчив или, что устанавливается не всегда, промежуточен по чувствительности. А это в свою очередь означает, что должны быть разведения, позволяющие получить в агаре три соответствующих концентрации, или две, если критерия промежуточной чувствительности нет. Однако, этого мало, необходимо, чтобы были, по меньшей мере, два разведе-

дения, менее концентрации, соответствующей критерию чувствительности, и два — выше критерия устойчивости. Это необходимо, поскольку результат в рамках 2–3 разведений (концентраций) может быть нечетким, его не всегда легко учитывать. Поэтому в некоторых зарубежных стандартах предлагается использовать не два, а три разведения выше критерия устойчивости. Итого, без контроля, необходимо, по меньшей мере, 7–8 разведений антибиотика. Рассмотрим произвольно взятый частный случай. Например, МПК для чувствительных к меропенему штаммов (по стандарту EUCAST 2011-01-05) грамотрицательных анаэробных бактерий 2 мкг/мл или менее, для промежуточных по чувствительности 4 мкг/мл, для устойчивых 8 мкг/мл и более. Соответственно, необходимые для определения чувствительности микроба концентрации будут в пределах (минимально) от 0,5 мкг/мл до 64 мкг/мл. Некоторые рекомендации еще более расширяют диапазон серийных разведений антибиотика — от 0,125 до 256 мкг/мл с оговоркой (безусловно, справедливой), что все определяется break-points для данного антибиотика и данного микроорганизма. За редким исключением исследователю это известно.

Следующий важный шаг, приготовление серии разведений антибиотика — двукратно убывающих (возрастающих) концентраций. Есть несколько важных нюансов, которые необходимо в этом случае учитывать. Первый уже упомянут выше, необходимо, прежде всего, определиться с тем, какие концентрации необходимы, адекватны поставленной задаче. Ряд должен быть намечен заранее, от максимальной концентрации до минимальной. Далее важно помнить, в какой объем питательной среды антибиотик будет вноситься, поскольку концентрация его в конечном итоге должна измеряться в мкг (или ЕД) на мл питательной среды. Еще один важный элемент, — в каком виде имеется антибиотик, из которого будут приготавливать необходимые растворы: он может быть в виде субстанции или в виде лекарственной формы. Оптимальный и логичный вариант, это использование субстанции (это предусмотрено всеми регламентирующими документами в мире, в т.ч. отечественными МУК по определению чувствительности). Ориентир, безусловно, должен быть на химически «чистое» вещество, без добавок, которые часто входят в состав лекарственной формы. Однако, многие субстанции антибиотиков труднодоступны. Большинство субстанций производится за рубежом и не является объектом поставок. Как выход — использование лекарственных форм антибиотиков для парентерального введения.

Субстанция противомикробного препарата имеет важную характеристику — т.н. «миллиграммовую активность», т.е. количество активного начала (в мкг или ЕД) в 1 мг вещества. Эта величина указывается в паспорте на препарат. Иногда ее дают в виде %, например, активность 90 %. Это означает, что в 1 мг антибиотика содержится 900 мкг активного начала. Но чаще в паспорте указывают именно количество мкг или ЕД, например, 900 мкг/мг. Напомним, что антибиотиков, чья активность указывается «по старинке» в ЕД, сейчас мало: бензилпенициллин, полимиксины, рокситромицин, нистатин. Обычно, это мкг, причем 1000 мкг в 1 мг — вещество 100% чистоты (чего не бывает). Как правило, активность современных антибиотиков лежит в пределах 90–95 %, иногда ниже. Учитывать «миллиграммовую активность» при получении раствора антибиотика нужной концентрации не сложно. Для этого почти 40 лет назад была предложена формула (она в несколько ином виде есть и в отечественных МУК), по которой сделанную навеску весом в мг надо растворить в таком объеме растворителя (в мл), которой вытекает из формулы:

$$\text{Объем (мл)} = \frac{\text{вес навески (мг)} \times \text{активность (мкг / мг)}}{\text{нужное разведение (мкг / мл)}}$$

Например, нужно растворить навеску 100 мг антибиотика с активностью 900 мкг/мг таким образом, чтобы концентрация его была 1280 мкг/мл. В этом случае объем растворителя (V) будет:

$$V = \frac{100(\text{мг}) \cdot 900(\text{мкг} / \text{мг})}{1280(\text{мкг} / \text{мл})} = 70,3 \text{ мл}$$

Увеличивая или уменьшая в 2 раза знаменатель, можем получить большую или меньшую концентрацию антибиотика в растворе при одной и той же навеске. Это легко проверяемо хотя бы на приведенном примере.

Далее готовят ряд разведений в питательном бульоне: 1280 мкг/мл, 640 мкг/мл, 320 мкг/мл и т.д. Заметим, что речь идет о десятикратно большей концентрации, чем это необходимо для постановки исследования.

Теперь дошла очередь до заготовок питательной среды, Бруцелл-агара с витамином К₁ и гемином (но без крови и антибиотика). Расплавляют среду на водяной бане, охлаждают до 50 °С и вводят в первую заготовку 1 мл лаковой крови и 2 мл первой концентрации антибактериального препарата. Тщательно пе-

ремешивают. Если в пробе 17 мл питательной среде, 1 мл крови и 2 мл раствора антибиотика, то, следовательно, объем в целом в образуемой расплавленной среде 20 мл; в этих 20 мл содержится 2 мл раствора антибиотика, т. е. в 1 мл — 0,1 мл раствора антибиотика. Очевидно, что если в 1 мл 1024 мкг, то в 0,1 мл — 128 мкг, т. е. получена максимальная необходимая для определения чувствительности микроба концентрация антибиотика. Выливают образец расплавленной питательной среды в чашку Петри. Теперь переходят к следующему образцу питательной среды, в который вводят 1 мл лаковой крови и 2 мл второго разведения антибиотика. Получают 64 мкг/мл среды. Выливают в чашку Петри. Далее поступают так же с последующими разведениями препарата. Готовится ряд чашек, содержащих среду с необходимыми двукратно убывающими концентрациями антибиотика. Дают среде застынуть. Следует помнить про чашку Петри с контролем питательной среды (без антибиотика), чашку со средой (без антибиотика), на которую будет сделан посев культуры (контроль культуры). Очень важно, чтобы питательная среда была равномерно распределена в чашке Петри, поэтому следует все манипуляции выполнять на горизонтально выверенной поверхности. В среде не должно быть пузырьков воздуха. Если они имеются, то их удаляют ротацией чашки. При большом количестве пузырьков их можно удалить, осторожно нагревая чашку со средой над газовой горелкой, слегка покачивая чашку. Далее дают агаризованной среде застыть; чашки подсушивают таким образом, чтобы поверхность не была мокрой, с каплями влаги. Можно подсушить чашки в термостате или ламинаре, но отслеживая степень высыхания. Поверхность агара должна быть влажной, но не мокрой.

Готовые чашки лучше использовать сразу, но допустимо их хранение в холодильнике при 2–6 °С не более недели. Чашки с богатой питательной средой необходимо оберегать от микробного загрязнения: хранить в перевернутом виде в чистых емкостях (паллах, пакетах и т. п.).

Теперь настала очередь инокуляции. Напомним, что инокулом не подлежит хранению, поэтому к моменту его приготовления все должно быть готово для посева. Метод серийных разведений в плотной питательной среде может быть использован при любом количестве штаммов, тестируемых на чувствительность к антибиотикам, но, естественно, он более целесообразен и экономически, и по трудозатратам, когда исследуемых культур много.

На питательной среде в обычной круглой чашке Петри диаметром 10 см может быть сделано до 32 точечных посевов в виде 6 рядов: первый 4 посева («точки»), 2–4 ряды по 6 посевов и последний ряд — 4 посева. Естественно, что если культура не единична, на дне чашки должны быть метки, обозначающие тот или иной посев. На крышке чашки обозначают название и концентрацию антимикробного вещества, а также дату начала исследования.

Посев может производиться калиброванной петлей, микропипеткой или репликатором. Последний необходим при исследовании от 10 штаммов и более, но может использоваться по усмотрению микробиолога при любом количестве тестируемых микроорганизмов, если их несколько. Объем инокулюма должен быть в пределах от 0,1 до 0,5 микролитров (т. е. от 10^5 КОЕ/мл до $5 \cdot 10^5$ КОЕ/мл). Инокулюм наносят на поверхность агара в виде пятна, осторожно, следя за тем, чтобы оно не растекалось: между пятнами должно быть не менее 1–2 мм, если посев делают репликатором. При использовании петли или микропипетки — 2 мм и более.

Инкубацию осуществляют в соответствии со всеми требованиями, которые обязательны для роста облигатно анаэробных микроорганизмов.

Результат исследования учитывают через двое суток (42–48 ч). При необходимости инкубацию можно продлить еще на сутки.

Заключительный этап исследования — оценка полученных данных и составление заключения для лечащего врача. Казалось бы, несложная процедура часто оказывается не такой уж простой. Естественно, что начинать надо с контрольных чашек. Среда должна быть стерильной, а рост каждой из культур на чашке без антибиотика должен быть хорошо выражен в виде плотного пятна, причем, как в проходящем, так и отраженном свете. Если этого нет, приходится опыт повторять. Теперь очередь за чашками с питательной средой, в которые введены различные концентрации антибиотика. Задача очевидна — найти ту минимальную концентрацию, которая подавляет рост культуры. Просматривают чашки в отраженном свете на фоне темной, не глянцевой поверхности. Все очевидно, когда на чашке с меньшей концентрацией препарата пятно есть, а на чашке с последующей концентрацией антибиотика роста (пятна) нет. МПК может считаться установленной. Допустим на чашке со средой, содержащей 1 мкг/мл препарата, микроб дал отчетливый рост в виде пятна, а на следующей чашке с питательной средой, в которой содержится 2 мкг/мл, этого

пятна нет, то МПК, естественно, 2 мкг/мл. Но все так очевидно бывает не всегда. Иногда вместо пятна может быть одна колония или несколько колоний, причем разной величины, иногда это чуть заметный рост сливающихся колоний в виде вуали. Как принято говорить, возможны варианты. Как быть в этом случае? Стандарт CLSI, в котором рассматривается такая ситуация, в основном декларирует возможность игнорирования такого роста. Единичные и, даже, множественные мелкие колонии, вуалевидный рост с образованием чуть заметного пятна во внимание не принимаются. Поскольку отечественного стандарта по определению чувствительности к антибиотикам облигатно анаэробных бактерий пока нет, отечественный микробиолог может учитывать эти рекомендации. Авторская позиция в этом вопросе несколько отличается. Во главу угла ставится не столько наличие того или иного типа роста микроба, а соотношение этого роста с контрольными концентрациями (break-points). Если рост исследуемого микроорганизма присутствует на чашках со средой, концентрации антибиотика в которых лежат в пределах, характеризующих микроб только как чувствительный, или только как устойчивый, какая из концентраций будет принята за МПК, значения не имеет. И в том, и в другом случае микроб или чувствителен, или устойчив. Иное дело, когда сомнение вызывает рост при концентрации, являющейся пограничной. Например, если контрольная концентрация, свидетельствующая о чувствительности микроба, 4 мкг/мл, и на чашке со средой, содержащей именно 4 мкг/мл антибиотика, есть рост, вызывающий сомнение (вуалеобразный, разрозненные немногочисленные колонии), учитывая интересы больного и тот факт, что МПК, это предельная концентрация (причем достаточно условная), целесообразно считать микроб резистентным к данному препарату. Определенную информацию может дать просмотр чашек не только в отраженном свете, но и в проходящем. В последнем случае сомнительный рост, который можно не принимать во внимание, не виден. В то же время, если в проходящем свете рост заметен, это подтверждает его наличие и с этим надо считаться при выборе ответа на радикальный вопрос: микроб чувствителен или устойчив. И всегда с учетом интересов больного, его безопасности. Такова должна быть, как представляется, позиция микробиолога. Естественно, что такой подход предполагает тесный рабочий контакт микробиологической службы с лечащими врачами (что должно быть в принципе).

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-

которые исследователи предпочитают вносить питательную среду с одним из разведений антибиотика и инокулом в лунки в равных объемах — по 0,1 мл. Естественно, что при любом варианте следует готовить адекватные разведения антибиотика, и соответствующую по плотности взвесь изучаемого микроба, чтобы в конечном объеме, помещенном в лунки, была нужная концентрация препарата и необходимое число микробных тел анаэроба — около 10^6 КОЕ/мл. Считается, что при методе серийных разведений в варианте микроразведений инокулом облигатно анаэробных микроорганизмов 10^6 КОЕ/мл адекватен инокулюму $5 \cdot 10^5$ КОЕ/мл факультативно анаэробных и аэробных бактерий.

Наиболее часто используют такой вариант объема рабочей смеси антибиотика и культуры, при котором используют 0,1–0,2 мл питательной среды с антибиотиком и 0,01–0,02 мл инокулюма. Как готовят инокулом приведено выше, когда обсуждался метод серийных разведений в плотной питательной среде. Есть два варианта, но в обоих случаях исходят из того, что базовая взвесь должна соответствовать стандарту мутности 0,5 McFarland, т.е. содержать $(1-2) \cdot 10^8$ КОЕ/мл. При использовании метода микроразведений в лунке, как уже говорилось, должно быть 10^6 КОЕ/мл клеток. Заметим — на мл; но в лунке 0,1 или 0,2 мл питательной среды с антибиотиком, т.е. фактически должно быть внесено в 10 раз меньше клеток, 10^5 КОЕ. Если базовая взвесь $(1-2) \cdot 10^8$ КОЕ/мл, т.е. в среднем около $1,5 \cdot 10^8$ КОЕ/мл, то при разведении в 15 раз (1 мл взвеси + 14 мл питательной среды) инокулом составит $1 \cdot 10^7$ КОЕ/мл. В 0,01 мл этой взвеси и будет искомая величина 10^5 КОЕ, которую следует внести в лунку с 0,1 мл среды с антибиотиком. Если в лунке 0,2 мл среды, то инокулом вносят в объеме 0,02 мл.

Приготовление растворов антибиотиков (серийных двукратных разведений) производят по той же схеме, что и при определении чувствительности к антибиотикам методом серийных разведений. В лунку вносят питательную среду в любом взятом объеме (от 0,1 до 0,3 мл) с содержанием концентрации антимикробного препарата, рассчитанным на мл среды, а не на вносимый объем.

Помимо лунок с антибиотиком, должен быть контроль питательной среды (без антибиотика и без культуры), контроль роста культуры (без антибиотика, но с посевом адекватного объема инокулюма исследуемого штамма). Кроме того, в некоторых методических документах присутствует рекомендация проверки чистоты культуры. Для этого предложено делать посев на плотную пита-

тельную среду в двух вариантах. Первый — посев на мясо-пептонный агар с 5% бараньей крови, призванный подтвердить отсутствие контаминации инокулюма факультативно анаэробными и аэробными микроорганизмами. Для этого посева предусмотрена инкубация в термостате при 35–37°C (без анаэробных условий). Второй контрольный посев — на чашку с обогащенной питательной средой для анаэробных бактерий с 5–10% бараньей крови. Этот посев предполагает оценку роста тестируемой культуры (он должен быть типичным для данного микроорганизма) и подтверждает отсутствие анаэробной контаминирующей микрофлоры. Естественно, что чашка с этим посевом должна инкубироваться в анаэробных условиях. Таким же образом осуществляется инкубация планшетов с серийными микротитрованиями.

При контрольных посевах на плотную питательную среду для анаэробов важно учесть плотность биомассы в инокулюме. Напомним, что изолированные колонии на поверхности агара различимы, если число колоний не превышает 150–300. Если в инокулюме содержится 10^6 КОЕ/мл, то для этого нужно посеять взвесь в соответствующих разведениях, или использовать пипетки, способные дозировать подобный объем жидкости от 0,001 до 0,0001 мл.

Инкубация в анаэробных условиях малых объемов питательной среды в лунках, может привести к «подсыханию», — уменьшению столбика жидкости, что способно привести к ухудшению условий тестирования чувствительности микроба, негативно повлиять на его результат. Для предупреждения подобной ситуации рекомендуется соблюдать три условия: не использовать при культивировании вакуум, а заполнять объем анаэростата бескислородной смесью газов; помещать на дно анаэростата увлажненный материал (влажный, но не мокрый), например, слегка смоченный пласт стерильной ваты, или увлажненную бумажную салфетку, или такую же марлю и т. п.; не герметизировать планшеты.

Через 48 ч инкубации считывают результат. Традиционно МПК определяют по той емкости, в данном случае лунке с наименьшей концентрацией антибиотика в питательной среде, в которой отсутствует рост микроба.

Это очевидное утверждение при использовании метода микро-разведений на самом деле не так очевидно, как это хотелось бы. Не всегда «прочтение» результата просто, об этом уже упоминалось. В свое время (1981–1982 гг.) данной проблеме были посвящены специальные исследования (А. Варту и др.). Авторы нашли,

что если МПК оценивают разные исследователи, то результаты могут не совпадать, причем в зависимости от тестируемого микроба и антибиотика — в широком диапазоне концентраций, т. е. и на одно, и на несколько разведений (ячеек). Т. о. МПК могут меняться и в два, и в более раз. Отсюда требования к стандартности самой оценки МПК. Микробиолог должен не только внимательно относиться к технике исследования, но и учитывать особенности роста микроба, учитывать, как выглядит этот рост в конце выбранного срока инкубации: осадок, выраженное помутнение среды, легкое помутнение среды, легкое помутнение с осадком или без него.

Исследование должно проводиться на темном и матовом фоне, например, на черной не блестящей бумаге в отраженном свете. Передвигая планшет по отношению к источнику света или, наоборот, источник света по отношению к планшету легче уловить наличие роста микроба, обязательно сравнивая контрольную ячейку с незасеянной средой, контрольную ячейку с засеянной средой, но без антибиотика, и «рабочие» образцы. За МПК принимается концентрация в первой ячейке, в которой, безусловно, отсутствует рост, или в ячейке при наличии сомнительного роста, которым допустимо пренебречь. Последнее предложение спорное, но некоторые зарубежные стандарты допускают такую возможность: чуть заметный рост или незначительный осадок на дне ячейки в расчет не принимаются. Автор лишь еще раз может подтвердить очевидную позицию — сомнение во всех случаях лучше трактовать в пользу устойчивости микроба, т. к. чаще всего это на пользу больному. Впрочем, за микробиологом остается право принимать свое решение.

Еще одна рекомендация, вытекающая из длительного опыта работы с клостридиями; в основном она касается *C. perfringens*, как быстрорастущего микроба. При определении чувствительности *C. perfringens* к антибиотикам воспроизводимые надежные результаты дает метод серийных разведений в жидкой питательной среде в варианте макроразведений. Для этой цели может быть использован жидкий фрагмент восстановленной среды Китт-Тароцци в объеме 2 мл на пробирку. Инокулюм целесообразно получать на цельной среде Китт-Тароцци, подрачивая культуру до плотности по стандарту 0,5 McFarland. Для этого достаточно, обычно, не более 4 ч от момента посева. Культуру разводят в 10 раз и вводят по 0,1 мл на 2 мл питательной среды. С учетом размеров клетки клостридий величина инокулюма в этом случае не превышает $5 \cdot 10^5$ КОЕ/мл. Если соблюдать требование о необ-

ходимости использовать при титровании восстановленную питательную среду, то результат можно получить в течение одного рабочего дня (8–10 ч). Анаэробные условия для роста *C. perfringens* в жидкой части среды Китт-Тароцци, разлитой по 2 мл, легко достигаются в анаэроостате под вакуумом (без смеси газов). При таком объеме среды и короткой инкубации высыхания не наступает. Аналогичные, достаточно точные, воспроизводимые результаты определения чувствительности *C. perfringens* к антибиотикам можно получить в восстановленной среде Китт-Тароцци (жидкой части, без плотного включения), используя столбик питательной среды в 4 мл под жидким вазелином. И в этом случае задача определения чувствительности культуры решается в течение короткого промежутка времени, до 10 ч.



ГЛАВА 6.

**ОПРЕДЕЛЕНИЕ
АНТИМИКРОБНЫХ ПРЕПАРАТОВ
В БИОСУБСТРАТАХ**

В данной главе речь пойдет о методах, часто используемых в научных исследованиях и, особенно, при изучении новых антибиотиков. К сожалению, очень редко к ним прибегают в обычной клинико-лабораторной практике лечебных учреждений. На самом деле, определение содержания антимикробных соединений в крови больного, их проникновения в ткани и выведения из организма человека может принести очень существенную пользу в организации лечебного процесса, в правильном выборе дозы и пути введения препарата, в предупреждении осложнений фармакотерапии [8, 12, 20, 118, 203]. В свое время автор позволил себе следующим образом сформулировать показания к проведению подобных аналитических исследований, имея в виду практику клинико-диагностических лабораторий [10]. Приведем их с некоторыми уточнениями, адекватными задачам сегодняшнего дня.

1. Применение антибиотических препаратов, имеющих «узкий» терапевтический коридор (ограниченный диапазон между терапевтической и повреждающей концентрациями). Это актуально в первую очередь при применении антибиотиков аминогликозидной группы. Возрождающийся интерес к лечебному потенциалу полимиксинов (а их повреждающее действие при парентеральном введении достаточно известно) делает актуальным отслеживание фармакокинетики этой группы препаратов при лечении больных. То же можно сказать о ряде новых антибактериальных и противогрибных препаратов, у которых соотношение между лечебной и повреждающей концентрациями далеко не установлены.
2. Патология экскреторных органов, прежде всего, почек, которая ведет к ограниченной элиминации препаратов и, как следствие, к увеличению их концентрации в крови и тканях; такая ситуация чревата проявлением повреждающего

действия антибиотиков, в том числе и при применении как обычных, так и лимитированных доз. Только определение концентраций антибиотиков в крови может дать реальное представление об адекватности выбранной дозы степени недостаточности выведения экскреторными органами антимикробных препаратов.

3. Использование лечебных пособий или манипуляций, способствующих существенному изменению фармакокинетики антибиотиков (гемодиализ, перитонеальный диализ, трансплантация органов).
4. Интерференция лекарственных средств, применение лекарств, влияющих на функцию экскреторных органов и, следовательно, на фармакокинетику препаратов.
5. Иная клиническая ситуация, способная существенно повлиять на всасывание, распределение и выведение лекарственных средств. К ним можно отнести возрастные особенности фармакокинетики, применение антибиотиков в предельно допустимых дозах, их назначение при особо тяжелой травме и др.

В этих, сформулированных полтора десятка лет тому назад положениях, отсутствует, хотя и подразумевается, еще одна рекомендация. Она основана на том обстоятельстве, что существующие критерии чувствительности микроорганизмов к антибиотикам, те «табличные данные», в которые заглядывает микробиолог после того, как замеряет диаметр зоны подавления роста микроба или определяет МПК, основаны (в частности) на неких усредненных показателях фармакокинетики конкретного антибиотика у некоего «усредненного» больного. Содержание антибиотика в крови такого виртуального больного при введении ему относительно безопасной дозы — это один из трех «слонов», на которых держатся критерии чувствительности. Но концентрации антибиотика в крови у одного человека (например, молодого, крепкого, не страдающего патологией экскреторных органов), и у другого (пожилого, тучного, с полиорганный патологией) это весьма разные величины. Отсюда условность существующих показателей чувствительности (устойчивости) возбудителя. Клинически это несовершенство уловить при ныне существующей практике лечения антимикробными соединениями невозможно, и она автоматически реализуется без осмысления ее возможных пос-

ледствий. Куда надежнее было бы сопоставление МПК с реально существующими хотя бы в крови больного количествами антибиотика. При всей условности и такого подхода, у врача были бы конкретные в цифрах показатели того, сколько нужно и сколько есть антибиотика. В этом случае выбор дозы препарата, пути и режима его введения больному приобрели бы обоснованную конкретность, сделали бы лечение антибиотиками таким, какое оно должно быть — индивидуальным (а не «усредненным»). Впрочем, до такой практики пока, видимо, далеко.

Каковы бы ни были показания, каким бы ни было отношение лечащего врача к фармакокинетическим данным, реализация исследования возможна только при участии лабораторной службы. Перечень методик, которые в этом случае могут быть использованы, достаточно велик [118]. Он включает иммуноферментный анализ, спектрофотометрические и радиоиммунные исследования, радиоизотопный и др. методы. Однако наиболее широко и не только в научных, но и в практических целях применяют два метода — микробиологический и высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ). Каждый из этих методов имеет свои преимущества и свои недостатки. Главное, что определяет ценность ВЭЖХ, — это возможность получить заключение уже через час после забора образца. И, хотя метод не прямой, он дает достаточно объективную информацию, что подтверждено многочисленными, в т. ч. сравнительными исследованиями. Однако, ВЭЖХ требует специального, достаточно дорогого оборудования. Не всегда доступны и не дешевы расходные материалы. Для обслуживания прибора и проведения анализов необходимы подготовленные специалисты. Основной недостаток микробиологического метода — это время. Ответ может быть получен не раньше, чем сформируется зона подавления роста тест-микроба, а это чаще всего 18–20 ч, но не менее 12–16 ч. К достоинствам метода, несомненно, можно отнести его простоту. Овладеть им может любой микробиолог. Метод не требует специального оборудования. Расходные материалы стандартны, доступны, не дороги. При определенном навыке у исследователя метод не требует больших трудозатрат (порой их существенно меньше, чем в случае обычного микробиологического диагностического анализа). Наконец, это прямой метод. Он информативен тогда, когда в биосубстрате действительно есть цельные молекулы антибиотика, а не фрагменты этого препарата или его комплекс с белком, меняющим,

порой, активность антибиотика до нулевой. Непрямые методы в этом отношении значительно менее надежны. Все сказанное делает микробиологический метод определения концентрации антибиотиков в биологических жидкостях и тканях наиболее реальным, доступным для значительной части микробиологических лабораторий клинических учреждений.

Принцип метода достаточно прост, он имеет много общего с «методом дисков», с которым микробиологи сталкиваются ежедневно. Но есть и важные отличия. Метод основан на том, что параллельно идет процесс диффузии антибиотика с известной концентрацией из резервуара в засеянный питательный агар (контроль) и диффузия антибиотика в ту же среду из аналогичного резервуара, но в концентрации, которую следует установить (опыт). В результате образуются зоны подавления роста, которые сравнивают (контроль — опыт) и в итоге устанавливают, сколько антибиотика имеется в опытном образце [8, 10, 118]. Таким исследуемым образцом могут быть самые разные объекты. В частности, этот метод используют для контроля противомикробных лекарств: устанавливают содержание антибиотиков в полупродуктах и в конечном продукте (лекарственной форме), что является важнейшим показателем качества лекарственного средства. Метод диффузии антибиотиков в гель является наиболее надежным при выявлении их в продуктах питания (мясе, молоке и т. д.). С этой же целью его используют в сельском хозяйстве, экологических исследованиях и др. В медицине он позволяет решать многие задачи. Это и уже упомянутые выше исследования качества лекарств. На основе изучения фармакокинетики новых препаратов у добровольцев и больных решается вопрос о способах их введения в организм человека. Такие исследования очень важны для решения вопроса о дозировании новых лекарственных средств. Они необходимы и для выяснения природы повреждающего действия лекарственных соединений. Этот перечень мог бы быть продлен.

Прежде чем перейти к деталям исследования следует подчеркнуть, что микробиологический метод определения содержания антимикробных препаратов требует несколько стандартных качественных компонентов, без которых реализация метода невозможна. Это:

- 1) питательная среда;
- 2) тест-микроб;
- 3) стандарт исследуемого антибиотика [1, 2, 10].

Качество исследования, воспроизводимость его результатов в значительной степени зависят от питательной среды. Она должна обеспечить стандартность, синхронность двух процессов — диффузии в гель антимиicrobialного соединения и роста культуры с образованием microbialного газона и, в результате, зоны подавления роста microbialа.

Напомним известную формулу, предложенную еще в 50-х годах группой ученых в США (ее часто называют формулой Купера) (К. Cooper):

$$x^2 = 4D(2,3 \log \frac{m_0}{m_1}) \cdot (L + 3,32g \log \frac{N_1}{N_0})$$

которая описывает эти два процесса, протекающие в геле, где: x — протяженность диффузии антибиотика от резервуара, в который вносят антибиотик, до края зоны; D — коэффициент диффузии; m_0 — концентрация антибиотика в исследуемом растворе; m_1 — «критическая концентрация», т. е. та концентрация антибиотика, которая создается у края зоны подавления роста;

L — продолжительность лаг-фазы роста тест-культуры при данных условиях проведения анализа;

g — время генерации тест-культуры в этих же условиях;

N_0 — величина посевного материала (инокулюма), выраженная в количестве microbialных тел на мл питательной среды;

N_1 — «критическая популяция», т. е. количество microbialных тел в среде вне зоны подавления роста к моменту образования зоны.

Из формулы следует, что на величину (радиус, диаметр) зоны отсутствия роста тест-microbialа (добавим, что и на четкость края зоны, и на разницу между величинами зон при диффузии в гель растворов антибиотиков, отличающихся по концентрации в 2 раза, а эти критерии также важны, что будет показано далее) существенно влияют диффузионные свойства антибиотика, величина инокулюма, концентрация препарата, культуральные особенности тест-microbialа.

Работами отечественных специалистов было показано [5, 6], что концентрация антибиотика в геле величина, перманентно меняющаяся, и это связано не только с диффузионным процессом, но и инактивацией ряда антимиicrobialных препаратов в геле. Это явление может иметь, по меньшей мере, двойное происхождение. С одной стороны на активность препарата может влиять microbial,

продукты его метаболизма, изменение рН питательной среды в результате жизнедеятельности микроорганизма. Создаются условия для «активной инактивации» молекулы противомикробного вещества. Но инактивация может быть и «пассивной», поскольку молекулы некоторых антибиотиков, особенно полиеновой структуры, не стабильны в водной фазе. Это позволило уточнить формулу К. Соорег, сделав ее более многокомпонентной. Но, что бы ни происходило, все зависит от качества питательной среды, ее адекватности диффузионным свойствам антибиотика и ростовым потребностям тест-микроба. В этом существенное различие между питательными средами для диск-диффузионного метода определения чувствительности микробов к антибиотикам и диффузионного метода определения содержания антибиотиков в биосубстратах. В первом случае стандартизация метода предполагает использование узкого круга питательных сред с учетом только потребностей микроба (но не свойств антибиотиков), да и то в очень ограниченной степени. Во-втором, наоборот, для стандартности требуется питательная среда, адекватная свойствам только одного антибиотика (или группы сходных по структуре препаратов), и при этом отвечающая ростовым потребностям тоже индивидуальной для данного антимикробного соединения тест-культуры. Т.о. для изучения содержания каждого из антибиотиков в биосубстратах используют специальную питательную среду (прописи будут представлены далее). Однако, важно сделать одну существенную для микробиологов, реализующих такое исследование, оговорку. В отличие от диск-диффузионного метода определения чувствительности к антибиотикам, рассматриваемая методика не является жестко регламентированной (фармакопейные анализы лекарств в данном случае не рассматриваются). Исследователь вправе выбрать свою пропись питательной среды или уточнить рекомендуемую среду по отдельным показателям (например, рН, содержанию солей и т.п.). С учетом ограниченной стандартности компонентов питательных сред в этом нередко бывает необходимость. Лучшим показателем надежности питательной среды является возможность построения т.н. «стандартной кривой», отражающей адекватность процессов роста культуры и диффузии антибиотиков в гель в данной питательной среде. О ней разговор пойдет далее.

Второй важный компонент анализа — тест-культура. Это индикатор наличия антибиотика в биосубстрате и от свойств этого «индикатора» зависит, насколько информативна окажется зона по-

давления роста тест-микроба. Тест-микроб должен, по меньшей мере, отвечать следующим требованиям:

- высокой чувствительностью к антибиотику, содержание которого изучают в биологических жидкостях и тканях;
- гомогенностью клеток по чувствительности к данному антибиотику;
- однородностью по ростовым свойствам (скорости размножения);
- гомогенностью по ростовым потребностям;
- морфологическим однообразием колоний.

Если культура гетерогенна по каждому из перечисленных признаков, то это исключает возможность получения гомогенного микробного газона, четких краев зоны подавления роста, что весьма затрудняет или исключает точный замер ее диаметра. Поэтому работа с тест-культурой, постоянный контроль за ее однородностью по метаболическим, морфологическим признакам и чувствительностью к антибиотику является важной задачей микробиологической службы, если фармакокинетические исследования входят в круг ее интересов. Существует несколько штаммов микроорганизмов, нашедших признание и в нашей стране, и в мире, которые используют при анализе антимикробных лекарств, и которые могут с успехом быть использованы для определения содержания антибиотиков в биосубстратах. Они приведены в таблице 6.1. Следует обратить внимание на спорообразующие бактерии. Использование в качестве посевного материала спор этих микроорганизмов обеспечивает ровный микробный газон и упрощает исследование, поскольку однократно заготовленные споры могут длительно храниться без потери способности давать гомогенный рост.

В таблице 6.1 приведены тест-культуры, наиболее используемые в отечественной практике. Их существенное преимущество заключается в том, что на питательных средах, изготовленных в лабораторных условиях, они позволяют получить не только качественные для прочтения зоны подавления роста микроба, но и построить стандартную кривую в достаточном диапазоне концентраций, что особенно важно при работе с биологическими образцами. Разброс количественного содержания в них антибиотика может быть велик. Этот момент очень важно подчеркнуть, поскольку для этой цели достаточно часто (в том числе и за рубежом) используют

тест-микробы, более привычные для клинических лабораторий. В частности, *Staphylococcus aureus* ATCC 25823 и *Escherichia coli* ATCC 25922. Но построение с ними стандартной кривой нередко оказывается затруднительным. Кроме того, их «разрешающая способность» (возможность улавливать низкие концентрации антибиотиков) не велика. Среди популярных за рубежом тест-культур — *Sarcina lutea* ATCC 9341, которую используют при определении концентрации в биосубстратах пенициллинов, линкозаминов, макролидов, хлорамфеникола.

Таблица 6.1.

Тест-культуры, которые могут использоваться при определении антибиотиков в биосубстратах

Тест-микроб	Что используется	Антимикробные препараты, которые определяются с тест-микробом
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	споры	Цефалоспорины
<i>B. subtilis</i> L ₂	споры	Тетрациклины
<i>B. cereus</i> var. <i>mycoides</i> НВ	споры	Эритромицин и др. антибиотики макролиды, фузидиевая к-та. Ванкомицин.
<i>B. cereus</i> var. <i>mycoides</i> 537	споры	Стрептомицин
<i>B. pumilus</i> NCTC 8242	споры	Гентамицин, канамицин, др. аминогликозиды
<i>Staphylococcus aureus</i> 209P*	вегетативные клетки	Пенициллины
<i>Bordetella bronchiseptica</i> ATCC 4617	вегетативные клетки	Полимиксины
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> NCTC 2134	вегетативные клетки	Карбенициллин
<i>Candida utilis</i> ЛИА-01	вегетативные клетки	Амфотерицин, нистатин
<i>C. scottii</i> ТУЛ-1	вегетативные клетки	Амфотерицин
* <i>S. aureus</i> ATCC 6538P		

Большинство перечисленных выше тест-культур доступны; они имеются в музеях специализированных учреждений. Тем не

менее, в случае их отсутствия проблема постановки исследования решаема. Выше уже подчеркнуто, что роль тест-микроба — это быть индикатором (и только). Их роль могут выполнить многие другие микроорганизмы, если только они отвечают приведенным выше требованиям (чувствительность, гомогенность и др.). Естественно, что при отборе нужного штамма необходима предварительная работа, подтверждающая его пригодность. Для этого готовятся и используются в эксперименте разведения антибиотика, адекватные его содержанию в биологических субстратах человека. Затем культуры в стандартных условиях проверяются на способность образовывать зону.

Еще раз подчеркнем преимущество спорообразующих микроорганизмов, споры которых могут храниться и использоваться не менее года, в то время как вегетативные клетки применяются только после суточной инкубации и при условии обязательного посева и контроля культуры, если ее трижды последовательно пересеивали на плотной питательной среде.

Третий важнейший компонент исследования, — это стандартный образец того антимикробного препарата, который определяют в биосубстрате. Как подчеркивалось, методология определения построена на сравнении зон подавления роста тест-микроба опытного образца (биосубстрата, содержащего препарат) и контрольного образца, т.е. стандарта антибиотика или, как его еще можно назвать, препарата сравнения. Очевидно, что чем качественнее контрольный образец антибиотика, тем достовернее получаемый результат. Идеальный вариант — это те стандартные образцы антимикробных препаратов, которые поставляют специализированные учреждения (они есть и в медицине, и в ветеринарии). Стандарты антибиотиков представляют собой хорошо очищенную и всесторонне проанализированную субстанцию. В частности, в стандарте с высокой точностью устанавливается содержание активного начала, т.е. сколько «идеального», антибиотика содержится в образце. Обычно это выражается в микрограммах активного начала на миллиграмм антибиотика (в мкг/мг). Для некоторых «старых» антибиотиков (бензилпенициллин, рокситромицин, нистатин) — в ЕД/мг. Иногда указывают % активного начала в мг препарата. Например, 95%-ая чистота означает наличие 950 мкг активного антибиотика в мг препарата. Этот фактор целесообразно учитывать при приготовлении контрольных образцов, если «чистота» стандарта не превышает 90% (или 900 мкг/мг). В этом случае необходимо делать адекватную поправку — исполь-

зовать или большую навеску или меньше растворителя. В приведенном частном примере — на 10% больше антибиотика или на 10% меньше растворителя. Проблема, к сожалению, состоит в том, что стандартные образцы не всегда доступны. Для некоторых новых антибиотиков их просто нет (как правило, это зарубежные препараты). Можно ли найти выход из положения в этом случае? Как исключение, в такой ситуации допустимо использовать лекарственную форму антибиотика для парентерального введения в виде порошка. Наличие дополнительных компонентов легко установить по разнице между указанным на этикетке количественным содержанием активного препарата (например, 250 мг или 500 мг и т. д.) и фактическим весом порошка, содержащегося во флаконе. Он, как правило, больше. При приготовлении навески антибиотика необходимо делать поправку, адекватную содержанию добавочных продуктов. Если в качестве «навески» используется вся лекарственная форма антибиотика, то растворитель добавляют в количестве, соответствующем весу, указанному на этикетке (т. е. по активному началу). Рекомендация использовать, как стандартный образец, лекарственную форму антибиотика, конечно, является вынужденной. К этому надо прибегать в исключительных случаях. Но, тем не менее, опыт показывает, что, как правило, к сколь-нибудь заметным ошибкам такая практика не приводит.

Еще одно обстоятельство, на которое необходимо обратить внимание, это использование в качестве стандарта близкого по структуре, но иного антибиотика. Автор имел возможность наблюдать, как при изучении фармакокинетики морфоциклина использовали в качестве стандарта тетрациклин, а при работе с кларитромицином — эритромицин. И тот, и другой исследуемые антибиотики являются производными препаратов, взятых в качестве стандартов, но, тем не менее, диффузионная способность у них разная и, следовательно, размер зон подавления роста тест-микроба мог оказаться не совпадающим. Подобная практика не может быть рекомендована, она приводит к ошибке.

Такова общая характеристика трех важнейших компонентов анализа. Естественно, что ими все не ограничивается; остальные будут рассмотрены при изложении техники исследования. Но следует подчеркнуть еще одно важное обстоятельство: микробиолог, занимающийся вопросами фармакокинетики антибиотиков в организме больного, обязан стремиться к максимально возможному методическому единообразию. Условия проведения

анализа должны быть стандартны, воспроизводимы от исследования к исследованию. Такие «мелочи», как обработка используемой посуды, размеры и форма чашек Петри, частота пересева тест-культуры и условия ее хранения, качество «лункоделателя» и многое другое могут отразиться на результатах анализа, на их сравнимости. А это важно.

Оснащение, необходимое для изучения содержания антибиотиков в биологических жидкостях и тканях

Чашки Петри.

Очень важно для названных исследований отобрать определенное количество чашек Петри и не использовать их для других целей. Все чашки должны быть сходны по следующим характеристикам:

- диаметр около 10 см; высота около 2 см;
- дно горизонтальное, ровное;
- прямой угол между дном и стенкой (форма цилиндра);
- чашки должны быть тщательно отмыты от моющих средств.

Вполне пригодны чашки Петри одноразового применения, если их форма и размер отвечают перечисленным требованиям. Использование чашек большего диаметра возможно, однако это увеличивает расход питательной среды.

Мерная и другая посуда.

Градуированные пипетки (стеклянные или автоматические) емкостью 1 мл, 2 мл, 5 мл, 10 мл. Пробирки биологические высотой 150 мм, диаметром 16 мм. Колбы плоскодонные вместимостью от 100 до 500 мл. Цилиндры измерительные на 50—1000 мл. Бюксы (стаканы для взвешивания). Фарфоровые ступки (диаметром от 86 до 110 мм).

Горизонтальный столик для разлива среды. Наиболее удобен горизонтальный столик из зеркального стекла на винтах, позволяющих строго выверить уровень с помощью ватерпаса. На этот момент необходимо обратить особое внимание, поскольку питательная среда, разлитая в чашки Петри, должна иметь одинаковую толщину по всей чашке. Если толщина геля в чашке Петри различна, то среда не пригодна, поскольку зоны, образующиеся при

диффузии в среду раствора антибиотика в одной и той же концентрации, будут различны.

Лункоделатель (устройство для вырезания лунок в толще агарового слоя). С этой целью может быть использован любой стальной цилиндр с внешним диаметром около 6 мм (допустимы колебания ± 1 мм). Важное условие заключается в том, что в одной серии анализов необходимо использовать лунки сходного диаметра, то есть сделанные одним устройством. Рабочий конец лункоделателя должен быть заточен под углом около 60° . Агаровый столбик, образующийся в результате введения такого лункоделателя в слой геля, удаляют лопаткой или скальпелем. При систематическом проведении соответствующих исследований, особенно в больших объемах, целесообразно пользоваться лункоделателем, который сам извлекает столбик агара. Для этого предложено несколько моделей. Одна из них представляет собой стальной цилиндр, имеющий две части: рабочую и рукоятку. Поскольку рабочая часть является фактически двумя полуцилиндрами, укрепленными на рукоятке и отстоящими друг от друга на 1 мм, это позволяет после введения прибора в гель сжимать их. В результате столбик геля остается в рабочей части лункоделателя и по мере повторного использования поступает в полую часть рукоятки, которая служит приемником для среды. Без опорожнения прибора можно сделать до 18–24 лунок. Вместо лунок могут быть использованы металлические цилиндры высотой 10 мм с внутренним диаметром 5 мм. Нижний конец цилиндра скошен (заострен). Цилиндры ставятся на поверхность питательной среды. Они, как и лунки — резервуар для внесения растворов с антибиотиками.

Капельницы. Растворы антибиотика (стандарта, биосубстрата) вводят в лунки или цилиндры капельницей. Для этой цели можно использовать пастеровские пипетки, которые готовят из легкоплавких стеклянных трубочек диаметром 0,5 см и длиной 20–25 см с концом в виде капилляра. Более точное введение в резервуар одинакового объема растворов антибиотиков обеспечивают автоматические пипетки.

Графарет для размещения лунок или цилиндров на агаровой пластинке. Лунки (цилиндры) следует размещать таким образом, чтобы они отстояли на одинаковом расстоянии от края чашки Пет-

ри и друг от друга. С этой целью можно использовать трафарет, сделанный из картона или плотной бумаги, на котором по окружности диаметром 6 см и с интервалом в 60° сделаны отметки. Для удобства диаметр самого трафарета должен соответствовать диаметру дна чашки Петри.

Аналитические весы. Важнейший элемент анализа. Весы, прежде всего, необходимы для взвешивания стандарта антибиотика, навеска которого должна быть сделана на весах достаточной точности. Весы целесообразно использовать также и для взвешивания биообразцов (например, тканей), однако это можно делать и на технических весах. Аналитические весы должны систематически подвергаться контрольной проверке.

Термостат. Необходим для выращивания тест-культуры, а также для ее роста в процессе анализа на опытной среде. Для биоаналитических целей, как правило, необходима температура около 37°.

Приспособление для замера диаметра зон задержки роста тест-культуры. Для этой цели пригодны линейка с миллиметровыми делениями, имеющая скос на одной из рабочих поверхностей (то есть деления линейки при работе должны непосредственно примыкать ко дну чашки Петри). Удобно с этой же целью использовать увеличители, позволяющие делать более точные замеры. Для этого могут быть использованы (после небольших конструктивных изменений) фотоувеличители, проекторы и т. п. Существуют автоматические измерители диаметра зон подавления роста.

Стандарт мутности. Он необходим для приготовления взвеси тест-микроба, которую в дальнейшем используют для заражения питательной среды. Можно использовать как готовый образец, так и приготовленный в лаборатории в соответствии с описанием, данным в отдельной главе.

Основные этапы проведения анализа биосубстратов на содержание противомикробных препаратов

1. Забор биосубстрата: кровь, моча, мокрота, гной, биоптаты тканей. Поскольку антибиотик при длительном хранении

теряет биологическую активность производство анализа должно происходить в день взятия опытного образца. Если исследование не может быть произведено в ближайшие часы после взятия биосубстрата, то его следует хранить в холодильнике при температуре не выше 4°. Срок хранения образца не должен превышать 24 ч. Необходимый объем биологической жидкости, для исследования от 0,5 до 1 мл; таков же в граммах вес ткани, взятой для анализа. Кровь, моча, не густые мокрота и гной не требуют дополнительной обработки. Вязкий экссудат или ткань тщательно перемешивают в адекватном объеме буферного раствора и обрабатывают в гомогенизаторе или растирают в фарфоровой ступке. Образовавшейся взвеси дают отстояться или фильтруют ее через бумажный фильтр и используют для исследования жидкую фазу. Опытные образцы готовят в двух или большем числе смежных разведений (не разведенный и 1 : 2; 1 : 2 и 1 : 4; 1 : 4 и 1 : 8 и т. д.). Разведения делают с помощью буферных растворов.

2. Приготовление раствора стандартного образца. Делают навеску стандарта на аналитических весах в стерильной пробирке или в бюксе (10–15 мг). Готовят основной раствор стандарта из расчета мг/мл (растворитель указан далее). Основной раствор может храниться в холодильнике при 4°. Из него готовят рабочий раствор стандарта до контрольной концентрации.

Контрольная концентрация индивидуальна для каждого антибиотика. Конечные разведения хранить более суток не рекомендуется.

3. Приготовление чашек с питательной средой. Питательную среду разогревают в водяной бане при 100° до ее полного растворения; охлаждают до 70° и вносят в нее споры тест-культуры. Если в качестве тест-культуры используют вегетативные формы бактерий или грибов, то среду охлаждают до 50 °С, после чего вносят взвесь тест-микроба. Замер температуры производят обязательно, поскольку внесение микроорганизмов в среду при избыточной температуре приводит к скудному росту или его полному отсутствию. Чрезмерно охлажденный агар быстро застывает, что препятствует его разливу в чашки Петри или он застывает в них неравномерным слоем (это недопустимо).

После внесения тест-культуры в гель его тщательно перемешивают и разливают в чашки Петри, установленные на горизонтальном столе. Разлив производят мерно пипеткой (10 мл). После того, как агар застынет и станет достаточно прочным чашку помещают на трафарет и делают с помощью лункоделателя лунки или устанавливают цилиндры (по 6 на чашку того или другого).

4. Внесение растворов стандарта и испытуемого образца. Набирают пипеткой раствор стандарта и вносят его в 3 лунки. Объем вносимых растворов определяется особенностями капельницы и резервуара. Следует стремиться к тому, чтобы лунка или цилиндр были заполнены более, чем на 80%. Однако, раствор не должен переливаться за край лунки. Кроме того, абсолютно необходимо, чтобы во все лунки или цилиндры вносили одинаковое количество стандартного и испытуемого растворов. На один опытный образец целесообразно использовать не менее двух чашек со средой. В лунки (цилиндры) вносят одно из двух разведений опытного образца. Стандартный раствор в обоих случаях используют один и тот же.

Чашки помещают в термостат на 18 ч, после чего учитывают результат, делают замеры диаметров зон подавления роста (контроль — опыт).

При проведении анализа следует учитывать два явления, которые принято именовать прединкубацией и преддиффузией. Прединкубация означает, что рост тест-культуры начался раньше, чем диффузия антибиотика в гель. Так бывает, например, тогда, когда чашки с засеянным агаром до внесения в них образцов с антибиотиком длительно находятся в комнате с температурой воздуха 20° и более. В этих условиях начинается рост многих из используемых в аналитических целях тест-культур. Прединкубация ведет к значительному уменьшению размера зон, что может исключить возможность учета результата исследования. Поэтому чашки с засеянной средой, если они не могут быть использованы сразу после приготовления, следует держать в холодильнике. Преддиффузия представляет собой противоположное явление, когда проникновение антибиотика в гель начинается раньше, чем рост тест-культуры. К этому приему иногда прибегают умышленно при работе с антибиотиками, обладающими плохой диффузионной способностью (например, амфоте-

рицином Б); это обеспечивает достаточный размер зон подавления роста. В других случаях эффект проявляется, если полностью обработанные чашки остаются в помещении при температуре, исключая рост тест-культуры. Это приводит к образованию больших зон подавления роста с нечетким краем, непригодным для замера.

Расчет содержания антибиотиков в биосубстратах. Полученные данные о диаметрах зон подавления роста используют для определения содержания антибиотика в субстрате (концентрации в ЕД или мкг на мл или грамм образца). С этой целью используют стандартные кривые или таблицы для расчета биологической активности антибиотика.

Стандартную кривую строят следующим образом. Из основного раствора стандарта готовят 5 вариантов рабочих растворов с определенными концентрациями антибиотика. Одна, средняя по величине, концентрация соответствует так называемой контрольной концентрации. Остальные 4 должны отличаться от нее не более, чем на -40% и $+50\%$. Например, при контрольной концентрации $0,5$ мкг/мл, остальные будут $0,3$; $0,4$; $0,6$; $0,75$ мкг/мл. Для каждой концентрации кроме контрольной используют по 3 чашки (то есть всего необходимо 12 чашек).

Раствором, содержащим контрольную концентрацию антибиотика, заполняют по 3 лунки или цилиндра каждой чашки, через одну (один); остальные три лунки заполняют одним из рабочих разведений антибиотика. Чашки инкубируют 18 ч в термостате, после чего учитывают результат. В распоряжении исследователя оказываются величины 36 зон, полученных в результате диффузии в гель контрольной концентрации антибиотика, и по 9 диаметров зон для каждого другого разведения. Далее важно рационально использовать полученные данные, обработать их так, чтобы сделать конечный результат достоверным. Предложен следующий способ.

Усредняют:

1. Величины диаметров всех зон, которые образовались вокруг лунок с контрольной концентрацией антибиотика. Обозначим среднюю величину как S_1 .
2. Величины диаметров зон вокруг лунок с контрольной концентрацией на тех трех чашках, на которых происходила диффузия в гель другой определенной рабочей концентрации (меньшей или большей, чем контрольная). Обозначим полученную величину S_2 .

3. Величины диаметров зон определенной рабочей концентрации, не контрольной (это будет S_3).

Определяют разность между средними величинами контрольных концентраций ($S_1 - S_2$). Эта величина является поправкой к среднему диаметру зон рабочих концентраций (S_3). Если разность ($S_1 - S_2$), величина положительная, то ее прибавляют к величине S_3 ; если отрицательная, то отнимают. Таким образом, имеются следующие величины: S_1 ; $S_3 \pm (S_1 - S_2)$; последняя для каждой рабочей концентрации.

Допустим, что величина всех зон подавление роста тест-культуры антибиотиков в контрольной концентрации (0,5 мкг/мл) — 20 мм. На трех чашках, где кроме контрольной использована концентрация 0,3 мкг/мл, величина диаметра зоны подавления роста при диффузии в гель контрольной концентрации оказалась 19,5 мм. Сама концентрация 0,3 мкг/мл дала зону диаметром 18,5 мм.

Таким образом, S_1 — 20 мм; S_2 — 19,5 мм; S_3 — 18,5 мм. $S_1 - S_2 = 20 - 19,5 = 0,5$ мм (величина положительная). Истинный размер $S_3 = 18,5 + 0,5 = 19$ мм. Таким же образом обсчитывают размер диаметра зон при диффузии в гель антибиотика, взятых в концентрации 0,4 мкг/мл; 0,6 мкг/мл; 0,75 мкг/мл. Все пять уточненных величин наносят на полулогарифмическую сетку, на которой по оси ординат отложены значения концентраций в ЕД/мл или мкг/мл, а по оси абсцисс — величины диаметров зон задержки роста тест-культуры в мм. Соединением точек получают стандартную кривую. Тщательно выполненное исследование позволяет получить прямую линию, на которой расположены четыре и, даже пять точек. Но, если выпрямленная часть кривой проходит менее, чем через три точки, она не пригодна.

При анализе содержания антибиотика в биосубстрате исследователь имеет две группы величин: диаметры зон подавления роста тест-культуры, образующиеся при диффузии в агар раствора стандарта антибиотика, и диаметры зон подавления роста тест-культуры, образующиеся в результате диффузии антибиотика, находящегося в биосубстрате. Определяют средние величины соответственно S_4 (стандарт) и S_5 (опыт). Сравнивают величину S_4 с той, что находят на стандартной кривой (то есть сравнивают диаметры зон, полученных в результате диффузии в гель контрольной концентрации стандарта антибиотика при получении стандартной кривой и при изучении содержания антибиотика в биосубстрате). Если

эти величины отличаются, то из S_1 вычитают S_4 . Разница может быть положительной и отрицательной величиной. Положительную прибавляют к величине S_5 , отрицательную вычитают. Полученное значение $S_5 + (S_1 - S_4)$ или $S_5 - (S_1 - S_4)$ является уточненной величиной размера зоны подавления роста тест-культуры при диффузии в гель опытного образца. По стандартной кривой находят, какая концентрация антибиотика соответствует данному размеру диаметра зоны. Для этого проводят прямую от оси абсцисс до стандартной кривой, а затем из этой точки опускают перпендикуляр на ось ординат. Если биосубстрат при производстве анализа взят в разведении, то результат в соответствующее количество раз увеличивают.

Допустим, что величина S_5 после внесения поправки соответствует 20 мм. Находим по стандартной кривой, что такой диаметр подавления роста тест-культуры образуется при диффузии в гель раствора, содержащего 0,5 мкг/мл антибиотика. Если образец (например, сыворотка крови) был до внесения его в лунку разведен в 4 раза, то $0,5 \times 4 = 2,0$ мкг/мл; то есть в 1 мл в крови содержится 2 мкг/мл антибиотика.

Определение содержания антибиотика в биосубстратах по таблицам В. С. Дмитриевой. Таблицы удобны в работе; они исключают необходимость в построении стандартной кривой. Поскольку таблицы основаны на систематически прослеженных результатах определения диффузии в гель различных концентраций ряда антибиотиков и общих закономерностях процесса зонообразования, то они имеют универсальный характер и могут быть использованы при изучении фармакокинетики практически всех антибиотиков, которые обладают способностью диффундировать в гель. Таблицы основаны на допуске, что антибиотик в концентрации 1 мкг/мл при его диффузии в гель дает зону подавления роста тест-микроба 17 мм. Техника исследования в целом описана выше. Обязательно берут два двукратных разведения биосубстрата (например, 1 : 2 и 1 : 4 или 1 : 4 и 1 : 8 и т. п.). Разведение стандарта берется одно, соответствующее контрольной концентрации. Для использования одного образца биосубстрата рекомендуется брать 4 чашки с питательной средой. По 3 лунки каждой чашки заполняют раствором стандарта (всего 12 лунок); по 3 лунки каждой из двух чашек заполняют первым разведением опытного образца (6 лунок) и по 3 лунки каждой из двух оставшихся чашек заполняют вторым разведением опытного образца (6 лунок). Если для исследования биосубстрат взят в небольшом объеме (так бывает при заборе крови из

пальца, при биопсии слизистых и в некоторых других ситуациях), то используют только по одной чашке на разведение. Это нежелательно, но допустимо.

Делают замер диаметров зон задержки роста микроба антибиотиком в контрольной концентрации (пометим, как S_1) и опытным образцом (S_2 и S_3); каждую группу величин усредняют. Напомним, что необходимо сделать поправку на условную величину диаметра зоны «теоретического» контроля (17 мм). Для этого из S_1 вычитают 17. Если величина положительная, то из S_2 вычитают разницу [$S_2 - (S_1 - 17)$] и таким образом находят первый диаметр зоны, пригодный для использования по таблицам. То же производят с результатами измерения зон, образующихся при диффузии в гель второй концентрации (S_3). Поправка делается таким же образом на основании измерения зон задержки роста контрольной концентрацией антибиотика на этих же чашках [$S_3 - (S_1 - 17)$]. Это вторая искомая величина. Находим разницу между S_2 и S_3 . По этой разнице находим в таблице соответствующий раздел и в нем по величине диаметра зон находят табличную величину, которую умножают на разведение. Результат и будет отражать содержание препарата в биосубстрате. Обратим внимание на то, что если S_1 меньше 17, то величину ($S_1 - 17$) надо прибавлять. Однако, если величина S_1 меньше 17 мм, то предпочтительнее увеличить контрольную концентрацию, чтобы диаметр зоны был 17 мм, не менее.

Допустим, что изучается содержание антибиотика в сыворотке крови. Делают ее разведение 1:2 и 1:4 буферным раствором. Вводят в лунки двух чашек раствор стандарта (1 ЕД/мл) и первое разведение (1:2) сыворотки крови; в лунки двух других чашек вводят тот же раствор стандарта и второе разведение сыворотки крови (1:4). Определяют через сутки диаметры зон подавления роста тест-культур, — усредняют полученные величины:

Опыт (разв. 1:2)	контроль	опыт (разв. 1:4)	контроль
18,5 мм	20,0 мм	17,5 мм	20,0 мм
19,5 мм	20,0 мм	17,5 мм	20,0 мм
19,0 мм	19,5 мм	18,5 мм	19,0 мм
19,5 мм	20,0 мм	17,5 мм	19,5 мм
20,5 мм	20,0 мм	17,5 мм	19,5 мм
<u>20,0 мм</u>	<u>20,5 мм</u>	<u>17,0 мм</u>	<u>20,0 мм</u>
$S_2 = 19,5$	$S_1 = 20,0$	$S_3 = 17$	$S_1 = 19,7$

Производим обсчет, как указано выше.

$$\begin{array}{r} 20 - 17 = 3,0 \text{ мм} \\ 19,5 - 3,0 = 16,5 \text{ мм} \\ \quad 16,5 - 14,3 = 2,2 \text{ мм} \end{array} \qquad \begin{array}{r} 19,7 - 17 = 2,7 \text{ мм} \\ 17 - 2,7 = 14,3 \text{ мм} \end{array}$$

Находим в таблице раздел разности диаметров зон, равный 2,2 мм. В нем находим величину диаметра зон 16,5 мм и показатель концентрации 0,86 мкг/мл; однако, образец был разведен в 2 раза, поэтому $0,86 \times 2 = 1,72$ мкг/мл. Таким же образом обсчитываем концентрацию по показателям второго образца: диаметр зоны 14,3 мм, он соответствует по таблице 0,443 мкг/мл; умножаем на разведение $0,443 \times 4 = 1,772$ мкг/мл. Таким образом, антибиотик обнаружен в сыворотке крови в количестве 1,72–1,78 мкг/мл.

Приведенный обсчет величин концентрации сделан с учетом того, что величина контрольной концентрации равна 1 мкг(ЕД)/мл. На практике она может быть как меньшей, так и большей. Поэтому должна быть сделана соответствующая поправка. Для этого полученную величину концентрации антибиотика при разведении стандарта до 1 ЕД/мл (мкг/мл) умножают на величину истинной контрольной концентрации. Например, если бы в приведенном выше расчете содержания антибиотика в сыворотке крови контрольная концентрация была бы не 1 мкг/мл, а 2 мкг/мл, то полученное значение 1,7 мкг/мл следовало увеличить в 2 раза (3,4 мкг/мл); если бы контрольная концентрация была 0,5 мкг/мл, то искомая величина была бы $1,7 \times 0,5 = 0,85$ мкг/мл и т. д.

Работа с тест-культурами

Как уже подчеркивалось, тест-микроорганизмы относятся к важнейшим компонентам исследования. Применение их в виде вегетативных клеток обычная для микробиолога процедура. Существенные особенности имеют получение и применение спор. На этом следует остановиться особо.

1. *Bacillus subtilis* Л₂. Для получения спор этой культуры производят ее посев на скошенный в пробирке мясо-пептонный агар (приведена далее как среда № 1). Инкубация 18–24 ч

при 37°C. Затем производят смыв культуры с поверхности питательной среды 5–10 мл изотонического раствора хлорида натрия. Взвесь равномерно (покачиванием) распределяют по поверхности скошенной среды № 3. Для этого необходимо около 300 мл агаризованной среды в большой емкости (колбы или матрацы). Засеянную среду выдерживают в течение 5–7 суток при 37°C. Начиная с 5 суток проводят контроль спорообразования. Если в поле зрения находят 80–90% спор, то делают смыв культуры дистиллированной водой. Взвесь спор прогревают при 65–70°C в течение 30 мин. Затем ее трижды промывают дистиллированной водой (объем воды должен приблизительно соответствовать объему взвеси; споры осаждают на центрифуге до полного просветления надосадочной жидкости). Взвесь спор повторно прогревают при 65–70°C, делают контрольный высев на среду № 1, разливают по ампулам и запаивают. Ампулы со спорами хранят при 2–10°C. Срок хранения не менее года, но он практически не ограничен; взвесь можно использовать до тех пор, пока она обеспечивает достаточной плотности микробный газон при росте на среде, используемой для анализа. По мере необходимости из взвеси спор, хранимой в ампулах, готовят в дистиллированной воде рабочую взвесь, используемую для засева питательной среды.

Необходимо подчеркнуть значимость строгого соблюдения стерильности при работе с культурой. Особенно большие сложности возникают при загрязнении ее сходными по морфологическим и культуральным характеристикам микроорганизмами.

2. *B. subtilis* ATCC 6633. Работа с тест-культурой проводится так же, как и *Bac. subtilis* Л₂. Различие заключается в том, что в матрацах используют среду № 4 (см. далее).
3. *B. cereus* вариант *mycoides* штамм 537 (шероховатая форма). Тест-культуру выращивают на скошенной в пробирке среде № 2. Через 18–24 ч культуру смывают с поверхности среды 5–10 мл изотонического раствора хлорида натрия и засевают на скошенную в матрацах среду № 3. Дальнейшая работа с культурой ведется так же, как с *B. subtilis* Л₂.
4. *B. cereus* вариант *mycoides* НВ (гладкая форма). Первичный посев производят на среду № 1, скошенную в пробирке. В матрацах используют среду № 4. В остальном культи-

вирование, приготовление спор и хранение то же, что для *B. subtilis* Л₂.

5. *B. pumilus* NCTC 8241. Последовательность работы с данной тест-культурой полностью представлена в описании работы с *B. subtilis* Л₂. (Использовано название микроорганизма, данное в отечественных распорядительных документах. Другое написание — *B. pumilis*).

Выше даны характеристики тест-культур, которые используют в виде спор. Вегетативные клетки других бактерий обычно применяют через сутки после пересева. Для этого делают посев на скошенный в пробирке мясо-пептонный агар (среда № 1) и инкубируют при 37 °С. Взвесь (1 млрд. микробных клеток) готовят в изотоническом растворе хлорида натрия.

Бактериологу, проводящему изучение содержания антибиотика в биосубстратах, приходится учитывать заметные колебания в росте тест-культур, которые зависят от ее возраста, условий хранения особенностей питательной среды (определенные компоненты питательных сред, например, агар-агар, дрожжевой экстракт, пептон, перевар Хоттингера и нек. др. недостаточно стандартны). Поэтому в каждом конкретном случае, например, при смене питательной среды, необходимо уточнять величину посевного материала. Приходится ставить контрольные опыты с определением характера газона, величины и четкости зон подавления роста в результате диффузии в гель антибиотика в контрольной концентрации, уточняя величину биомассы тест-культуры, вносимой в среду. Отбирают оптимальный вариант.

Питательные среды, которые могут быть использованы при определении содержания антибиотиков в биосубстратах

Ниже приведен состав ряда питательных сред, используемых для культивирования тест-культур и в процессе определения содержания антибиотиков в биологических жидкостях, тканях и лекарствах. Изменение состава питательных сред является нежелательным. Однако, поскольку отдельные компоненты не являются достаточно стандартными, в ряде случаев приходится вносить определенные уточнения. Обычно они касаются процентного содер-

жания того или иного вещества, а не композиции в целом. Очень важен контроль за рН среды после стерилизации. Изменение этого параметра может значительно повлиять на диффузию антибиотика в гель (обычно в сторону ухудшения). Нумерация сред, приведенная в тексте, является произвольной и дана для лучшей компоновки материала. Часть их взята из Государственной фармакопеи, являющейся регламентирующим документом при установленном содержании антибиотиков в лекарственных препаратах.

Среда № 1

*общего назначения для культивирования тест-культур**

Мясо-пептонный бульон 1 : 2 1000 мл

Агар-агар 20 г

рН после стерилизации 7,0–7,2

Среда № 2

*для культивирования тест-культур**

То же, что № 1

рН после стерилизации 7,8–8,0

Среда № 3

для грибов рода Candida, используемых как тест-культуры

Бульон Хоттингера

с содержанием 30–35 мг %

аминного азота

1000 мл

Агар-агар

25 г

рН после стерилизации 6,0–6,2

Среда № 4

для получения спор B. cereus и Bac. subtilis

То же, что № 3

рН после стерилизации 7,8–8,0

Среда № 5

для определения тетрациклинов

Бульон Хоттингера

с содержанием 130–140 мг %

аминного азота

1000 мл

Глюкоза

10 г

Агар-агар

10–15 г

рН после стерилизации 6,8–7,0

* Тест-культуры поименованы выше.

Среда №6

для определения пенициллинов и цефалоспоринов

Бульон Хоттингера

с содержанием 130–140 мг %

аминного азота

1000 мл

Глюкоза

1 г

Натрия фосфат двузамещенный

3 г

Агар-агар

10–12 г

рН после стерилизации 6,8–7,0

Среда №7

для определения линкозамидов

То же, что № 6, но без глюкозы

рН после стерилизации 7,8–8,0

Среда №8

для определения аминогликозидов

Бульон Хоттингера

с содержанием 30–35 мг %

аминного азота

1000 мл

Натрия фосфат двузамещенный

3 г

Агар-агар

15 г

рН после стерилизации 7,8–8,0

Среда №9

для определения рифампицина

Бульон Хоттингера

с содержанием 130–140 мг %

аминного азота

1000 мл

Калия фосфат однозамещенный

25 г

Агар-агар

10–15 г

рН после стерилизации 6,0–6,2

Среда №10

для определения макролидов

Бульон Хоттингера

с содержанием 30–35 мг %

аминного азота

1000 мл

Натрия фосфат двузамещенный

3 г

Агар-агар

15–20 г

рН после стерилизации 6,8–7,0

В питательные среды №№ 5, 8, 9, 10 при недостаточном росте культуры может быть добавлена глюкоза в количестве 0,2–0,5%.

Приведенный выше состав питательных сред обеспечивает рост тест-культур бактериальной природы, т. е. предназначенных для определения в биосубстратах противобактериальных антибиотиков. Большинство из них (с не принципиальными отличиями) вошли в отечественную государственную фармакопею (ГФК). На самом деле, это лишь небольшая часть питательных сред, используемых для данной цели. Их много больше [14]. Подобная «пестрота» связана с тем, что т. н. малостандартизуемые компоненты питательных сред из животного и растительного сырья способны существенно влиять на зонообразование, меняя и размер, и четкость края зон подавления роста тест-микроба. Например, качество мяса, используемого для приготовления бульона Хоттингера, или пептона, который предусмотрен в нескольких прописях питательных сред, может исключить возможность надлежащего исследования активности антибиотика в любом образце — и биосубстрате, и в лекарственном средстве. Коллектив микробиологов Санкт-Петербургского (Ленинградского) института антибиотиков и ферментов (НИТИАФ) в свое время попытался решить эту проблему, создав рецептуру питательных сред, в которых были бы только синтетические (т. е. стандартизуемые) компоненты. Исключение пришлось сделать только для агар-агара, поскольку другие желирующие агенты оказались или малопригодны, или слишком дороги. Эти исследования оказались результативны. Был предложен ряд прописей, одна из которых вошла в ГФК. Это среда для определения противогрибных (полиеновых) антибиотиков: нистатин, амфотерицин В. Ее рецептура:

Аммония цитрат двузамещенный	5 г
Натрия хлорид	20 г
Калия хлорид	20 г
Натрия фосфат двузамещенный	5 г
Агар-агар	18 г
Вода дистиллированная	1000 мл
рН 5,8–6,0	

Особенность этой питательной среды заключается в том, что источником азота для тест-культуры (*C. utilis*) является аммонийная соль. Биологических компонентов в ней нет.

Этот же прием использован для создания унифицированной питательной среды, позволяющей определять активность антибиотиков аминогликозидной группы:

Аммония ацетат	5 г
Натрия фосфат двузамещенный	3 г
Агар-агар	18 г
Вода дистиллированная	1000 мл
рН 7,8–8,0	

Среда используется с тест-культурой *B. subtilis* ATCC 6633 (споры). Вместе с тест-микробом в питательную среду вносят 1 % глюкозы.

Еще одна «синтетическая» питательная среда, успешно апробированная при определении активности тетрациклина и эритромицина с тест-культурой *B. subtilis* ATCC 6633 (споры) имеет следующий состав:

Аммония хлорид	3 г
Натрия цитрат трехзамещенный	5 г
Натрия фосфат двузамещенный	15 г
Агар-агар	18 г
Вода дистиллированная	1000 мл
рН 7,3 ± 0,2	

Питательные среды, в которых источником азота являются соли аммония, оказались надежными при определении содержания антибиотиков в моче, мокроте, экссудатах, в биоптатах тканей. Однако, при изучении содержания противобактериальных антибиотиков в сыворотке крови может проявиться антимикробная активность самой крови. Она выражается в образовании нечеткой (размытой) небольшой зоне подавления роста тест-микроба, что может препятствовать точному определению малых количеств антибактериальных препаратов в этом биосубстрате.

Растворители, буферные растворы

Для приготовления основных растворов стандартов антибиотиков используют органические растворители (этанол, диметилсульфоксид, диметилформамид) и кислоты (соляная кислота), или

буферные рстворы. Первые используют при работе с водонерастворимыми антибиотиками, вторые в тех случаях, когда антибиотики быстро и полностью растворяются в воде. Рабочие растворы всех компонентов анализа также делают с помощью буферных растворов.

Выбор растворителя чрезвычайно важен. Он обеспечивает не только образование раствора антибиотика, но и его стабильность в растворах. В значительной степени растворитель влияет и на диффузионную способность антибиотика, особенно в тех случаях, когда препарат образует не истинный раствор в водной фазе, а мелкодисперсную взвесь (например, полиеновые антибиотики). Изменение свойств растворителя может привести к агрегации частиц, что резко влияет на диффузию антибиотиков. Ионы входящих в буфер солей, диффундируя в гель быстрее антибиотика, предотвращают возникновение градиента электрического потенциала при диффузии антибиотика в питательной среде. В то же время некоторые элементы могут уменьшать активность антибиотиков. Все это определяет необходимость строгого подхода к выбору буферного раствора. Далее приведен состав основных буферных растворов (нумерация произвольная).

Буфер № 1

(фосфатный 1/15 мол)

Калия фосфат однозамещенный	3,63 г
Натрия фосфат двузамещенный	7,13 г
Вода дистиллированная	до 1000 мл
рН 6,8–7,0	

Буфер № 2

(цитратно-солянокислый)

Натрия цитрат трехзамещенный	20,6 г
Соляная кислота концентрированная	1,81 мл
Вода дистиллированная	до 1000 мл
рН 5,8–6,0	

Буфер № 3

(фосфатный 1/15 мол)

Калия фосфат однозамещенный	7,72 г
Натрия фосфат двузамещенный	1,78 г
Вода дистиллированная	до 1000 мл
рН 6,0–6,2	

Буфер № 4

(фосфатный 1/15 мол)

Калия фосфат однозамещенный	0,68 г
Натрия фосфат двузамещенный	10,99 г
Вода дистиллированная	до 1000 мл
рН 7,8–8,0	

Буфер № 5

(1% фосфатный)

Калия фосфат двузамещенный	2 г
Калия фосфат однозамещенный	8 г
Вода дистиллированная	до 1000 мл
рН 5,95–6,0	

Приведем несколько примеров того, как используют компоненты аналитического исследования для определения концентрации в субстратах часто применяемых антибиотиков.

Бензилпенициллин. Стандартный образец — бензилпенициллина натриевая соль. Растворитель для стандарта и испытуемого субстрата — буфер № 1. Срок хранения основного раствора стандарта при 4 °С 3 суток. Концентрации для построения стандартной кривой в пределах 0,12–1,5 ЕД/мл, контрольная концентрация 0,5–1,0 ЕД/мл. Питательная среда № 6. Тест культура *Staphylococcus aureus* 209Р — (10–40) • 10⁶ КОЕ/мл.

Оксациллин. Стандартный образец — оксациллина натриевая соль. Растворитель — буфер № 1. Концентрации для построения стандартной кривой в пределах 0,5–6,0 мкг/мл. Контрольная концентрация 2–4 мкг/мл. Среда и тест-культура — см. бензилпенициллин.

Ампициллин. Стандартный образец — ампициллина тригидрат. Для разведений используют буфер № 1 (основной раствор) и буфер № 2 (для приготовления рабочих растворов стандарта и разведений биосубстрата). Срок хранения основного раствора стандарта 3 суток. Концентрация для построения стандартной кривой в пределах 0,1–0,5 мкг/мл, контрольная концентрация 0,25–0,4 мкг/мл. Среда № 6. Тест-культура *S. aureus* 209Р, (10–20) • 10⁶ КОЕ/мл, или *Sarcina luteia* (10–20) • 10⁶ КОЕ/мл, или *B. cereus var. mycoides* НВ споры, (5–10) • 10⁶ спор/мл.

Карбенициллин и пиперациллин. Стандартные образцы — карбенициллина динатриевая соль, пиперациллина натриевая соль. При отсутствии стандартного образца пиперациллина можно использовать лекарственную форму натриевой соли пиперациллина для парентерального введения Основной растворитель буфер № 1, далее — буфер № 2. Растворы контрольных образцов в буфере № 2 хранятся не более суток. Тест-культура: *Pseudomonas aeruginosa* NCTC 2134 (10–50)•10⁶ КОЕ/мл. Контрольная концентрация 10–20 мкг/мл, концентрации для построения стандартной кривой в пределах 5–40 мкг/мл. В мировой практике в качестве тест-культуры широко используют штамм *P. aeruginosa* ATCC 27853. Контрольная концентрация в этом случае 50–100 мкг/мл; концентрации для построения стандартной кривой в пределах 16–200 мкг/мл.

Цефалотин и цефалексин. Стандартные образцы — цефалотина натриевая соль, цефалексин моногидрат или цефалексин гидрохлорид. Растворы готовят в буфере № 1. Тест-культура для обоих антибиотиков *B. subtilis* ATCC 6633, споры, (20–80)•10⁶ спор на мл среды. Контрольная концентрация цефалотина 0,5–1 мкг/мл, концентрации для построения стандартной кривой в пределах 0,2–2,0 мкг/мл. Контрольная концентрация цефалексина — 5–7 мкг/мл; концентрации для построения стандартной кривой 2–10 мкг/мл.

Стрептомицин. Стандартный образец — стрептомицина сульфат. Основное разведение делают в буфере № 3, остальные — в буфере № 4. Срок хранения основного раствора при 4 °С до 4-х недель. Концентрации для построения стандартной кривой от 1 до 4 мкг/мл; контрольная концентрация 2,0 мкг/мл. Тест-культура споры *B. cereus* вариант *mycoides* штамм 537, около 20 млн. спор на 1 мл среды.

Неомицин. Стандартный образец — неомицина сульфат. Растворитель для стандарта основного разведения — буфер № 4, рабочие разведения — также буфером № 4. Срок хранения основного раствора месяц при 4 °С. Для построения стандартной кривой используют концентрации от 2 до 6 мкг/мл; контрольная концентрация — 4 мкг/мл. Тест-микроб *B. cereus* вариант *mycoides* штамм 537, споры, около 20 млн. спор на мл среды.

Канамицин. Стандартный образец — канамицина моносульфат. Для приготовления основного раствора стандарта используют

дистиллированную воду. Остальные разведения делают буфером №4. Концентрации для построения стандартной кривой от 0,6 до 1,5 мкг/мл, контрольная концентрация 1,0 мкг/мл. Тест-микроб *B. subtilis* ATCC 6633, споры, 10–20 млн. спор на мл среды.

Гентамицин. Стандартный образец — гентамицина сульфат. Основной и рабочие растворы стандарта, разведения испытуемых образцов делают буфером №4. Срок хранения основного раствора стандарта 2 недели при 4 °С. Для построения стандартной кривой используют концентрации от 1 до 6 мкг/мл, контрольная концентрация — 1,0–2,0 мкг/мл. Тест-микроб *B. pumilus* NCTC 8241, споры, 20–50 млн. спор на мл среды.

Тобрамицин. Стандартный образец — тобрамицина сульфат. Метод определения — см. гентамицин. Ряд авторов изучали содержание тобрамицина в биосубстратах с использованием среды Мюллера-Хинтон и тест-культуры *Staphylococcus epidermidis* ATCC 27626, отмечая приемлемость таких условий проведения анализа.

Полимиксин В. Стандартный образец — полимиксин В сульфат. Разведение основного образца делают в буфере №3, рабочие растворы приготавливают в буфере №5. Раствор стандарта хранению не подлежит. Тест-культура *Bordetella bronchiseptica* ATCC 4617, (40–60) • 10⁶ КОЕ/мл Контрольная концентрация — 100 ЕД/мл. Для построения стандартной кривой используют разведения в пределах от 40 до 200 ЕД/мл. При приготовлении навески антибиотика следует обращать внимание на соответствие мкг и ЕД; последние могут колебаться в пределах от 5 до 10 ЕД/мкг.

Полимиксин Е (колистин) — см. полимиксин В. Близок по структуре к полимиксину В, но не тождественен. Отличается по растворимости и диффузии в питательную среду. Стандартным образцом может быть только полимиксин Е (колистин сульфат, акт. 30000 ЕД/мг).

Тетрациклин. Стандартный образец — тетрациклина гидрхлорид. Основной раствор стандарта готовят в 0,01 N соляной кислоте. Другие разведения делают буфером № 2. Срок хранения основного раствора 7 дней при 4 °С. Концентрации для постро-

ения стандартной кривой от 0,5 до 2,0 мкг/мл; контрольная концентрация 1,0 мкг/мл. Тест-культура *B. subtilis* вариант Л₂, споры, 10–30 млн. спор на мл среды.

Доксициклин. Стандартный образец — доксициклина гидрхлорид. Основной раствор стандарта готовят в 0,01 N растворе соляной кислоты. Остальные разведения — в буфере №2. Тест-микроб — споры *B. subtilis* вар. Л₂, 10–30 млн. спор на мл среды. Контрольная концентрация 0,3–0,5 мкг/мл, разведения для стандартной кривой от 0,1 до 0,8 мкг/мл.

Хлорамфеникол (левомицетин). В качестве стандарта используют основание антибиотика. (Не использовать водорастворимый хлорамфеникол!) Навеску стандарта растворяют в этиловом спирте из расчета 10 мг/мл, далее буфером №3 до 1 мг/мл (основной раствор). Срок хранения основного раствора месяц. Остальные разведения делают буфером №3. Концентрации для построения стандартной кривой от 4,0 до 60 мкг/мл, контрольная концентрация 16–32 мкг/мл. Тест-культура *Sarcina lutea* АТСС 9341.

Эритромицин. Стандартный образец — эритромицина основание. Навеску стандарта растворяют в этиловом спирте (10 мг/мл) и далее буфером №4 до концентрации мг/мл (основной раствор). Прочие разведения делают буфером №4. Срок хранения основного раствора 7 дней при 4 °С. Концентрации для построения стандартной кривой от 1,0 до 8,0 мкг/мл, контрольная концентрация 2,0–3,0 мкг/мл. Тест-микроб *B. cereus* вариант *mycoides* НВ, споры, около 10–20 млн. спор на мл среды. В качестве альтернативной тест-культуры может быть использована *S. lutea* АТСС 9341.

Олеандомицин. Стандартный образец — олеандомицина фосфат. Основной раствор стандарта приготавливают в буфере №3, остальные разведения делают буфером №4. Срок хранения основного раствора 3 дня при 4 °С. Концентрации для построения стандартной кривой от 2,0 до 6,0 мкг/мл, контрольная концентрация — 3,0–4,0 мкг/мл. Тест-микроб *B. cereus*. вариант *mycoides* НВ, споры, около 20 млн. спор на мл среды.

Линкомицин. Стандарт линкомицина растворяют в дистиллированной воде (мг/мл); дальнейшие разведения стандарта и раз-

ведения биосубстратов делают в буфере №4. Срок хранения основного раствора 7 дней при 4°С. Концентрации, для построения стандартной кривой от 0,6 до 1,5 мкг/мл, контрольная концентрация — 1,0 мкг/мл. Тест-микроб *B. subtilis* ATCC 6633 споры, 50–100 млн. спор на мл среды.

Клиндамицин. Стандарт антибиотика растворяют в воде. (Не использовать клиндамицин фосфат!) Далее — см. линкомицин. Тест-культура *S. lutea* ATCC 9341 (10–20) • 10⁶ КОЕ/мл или *B. subtilis* ATCC 6633, споры 30–50 млн. спор на мл питательной среды.

Нистатин. Стандарт нистатина растворяют в диметилформамиде до концентрации мг/мл (основной раствор). Срок хранения основного раствора 5 дней при 4°С. Остальные разведения делают в буфере №3. Для построения стандартной кривой используют концентрации от 30 до 75 ЕД/мл; контрольная концентрация — 40–50 мкг/мл. Тест-микроб *Candida utilis* ЛИА-01 (10–30) • 10⁶ КОЕ/мл.

Амфотерицин В. Основное разведение стандарта делают в диметилсульфоксиде (мг/мл), остальные в буфере №1, в том числе разведение биосубстрата. Основной раствор хранят не более суток при 4°С. Для построения стандартной кривой используют концентрации от 0,2 до 1,0 мкг/мл; контрольная концентрация 0,5 мкг/мл. Тест-микроб *C. utilis* ЛИА-01 (10–20) • 10⁶ КОЕ/мл.

В заключение необходимо остановиться на некоторых показателях качества исследования. Как уже говорилось, оно во многом зависит от питательной среды, гомогенности (по всем критериям) тест-культуры, тщательности, скрупулезности в выполнении всех этапов исследования. Последнее, это во многом «дело рук» исследователя. Насколько все компоненты анализа отвечают требованиям, чаще всего свидетельствует стандартная кривая. Есть несколько ее характеристик, которые весьма демонстративны.

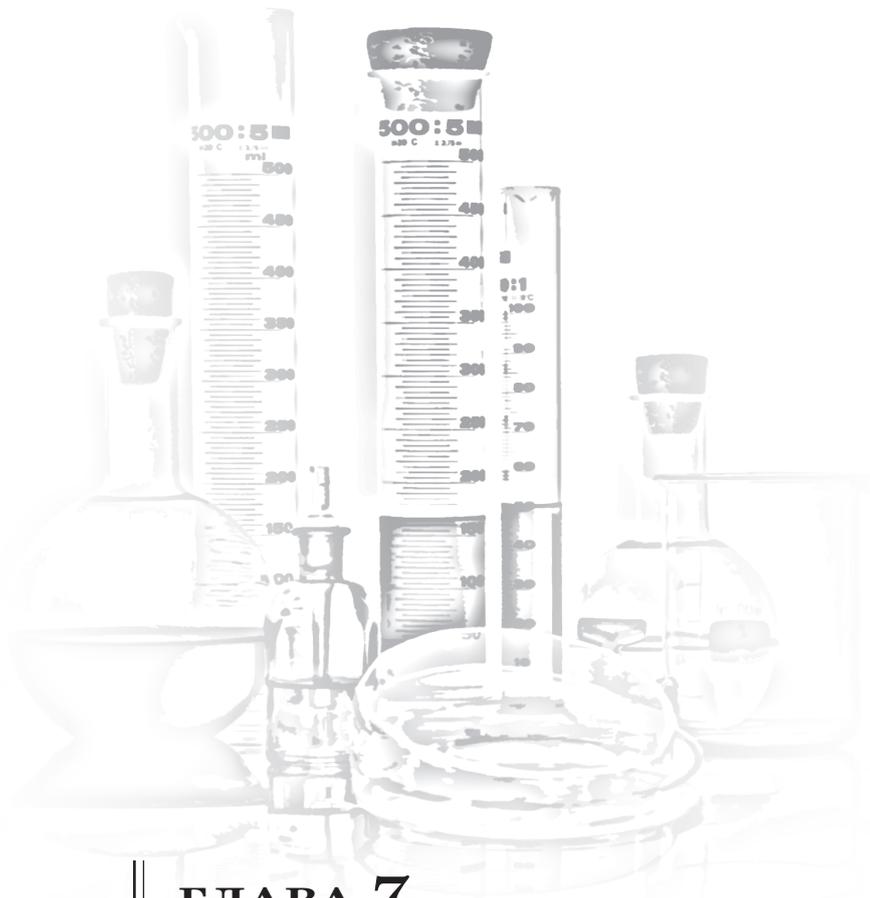
1. Стандартная кривая не должна быть «кривой». Определенный ее участок должен быть (на полулогарифмической сетке) выпрямлен и именно на этом участке следует сравнивать размеры диаметров зон, образуемых вокруг опытных образцов. Если такой выпрямленный фрагмент кривой получить не удается, значит, концентрации стандарта анти-

микробного средства подобраны неверно. В этой связи автор считает своим долгом обратить внимание исследователей на существующие в некоторых работах рекомендации строить стандартную кривую по 3 концентрациям стандарта (3 точкам) двукратными разведениями антибиотика. Вероятность получения в этом случае кривой, не обеспечивающей точность анализа, очень велика. Такой прием можно использовать только на стадии выбора нужного диапазона концентраций антибиотика, которые действительно помогут построить кривую с выпрямленным участком. Поэтому разведений должно быть не менее 4–5 и с шагом в пределах 1,25–1,5 (а не двукратным).

2. При построении стандартной кривой зоны подавления роста не должны быть ни слишком малы, ни слишком велики. Диаметр зоны подавления роста вокруг лунки (цилиндра) с контрольной концентрацией в оптимальном варианте должен быть 16–20 мм. У остальных разведений — от 12 до 23 мм (напомним, что речь идет о стандартной кривой). Если иметь в виду зоны подавления роста вокруг резервуара с опытным образцом, то она не должна быть менее 10 мм. Если зона меньше, то все, что можно при этом утверждать, это то, что антибиотик в образце есть, но менее такого-то количества (по зоне в 10 мм). Если зона подавления роста вокруг лунки с опытным образцом более 25 мм, то необходимо повторить исследование с большим разведением исследуемого материала.
3. Стандартная кривая не должна быть ни чрезмерно наклонной (т.е. с малым углом наклона по отношению к оси, на которой отложены диаметры зон подавления роста), ни приближающейся к вертикали (т.е. к параллели с осью, на которой обозначены концентрации антибиотика), т.о., в оптимальном варианте она должна равновелико отстоять и от оси абсцисс, и от оси ординат. Это легко проверяемо по разнице диаметров зон подавления роста тест-микроба, образуемых двукратно отличающимися концентрациями антибиотика: она в наилучшем варианте должна быть 2–3 мм. Допустимым считается разница от 1 до 5 мм, однако крайние значения нежелательны. Например, если диаметр зоны подавления роста вокруг лунки, содержащий раствор с 1 мкг/мл антибиотика, 17 мм, то вок-

руг лунки с 2 мкг/мл он должен быть 19–20 мм, а вокруг лунки с 0,5 мкг/мл — 14–15 мм.

4. Очень важный показатель качества исследования — однотипность диффузионных процессов в контроле и в опыте. Напомним, что опытный образец обычно используют в двух разведениях (1:2 и 1:4, 1:4 и 1:8 и т. д.). Если эти две точки обозначить на той же полулогарифмической сетке, что и стандартная кривая, то можно сравнить наклон выпрямленного участка последней и линии, соединяющей диаметры зон подавления роста двух разведений опытного образца. Параллельность двух линий — убедительное свидетельство достаточного качества исследования в части сравнимости зон. И наоборот, если эти две линии образуют угол, т. е. пересекаются в какой-либо точке выпрямленного участка стандартной кривой, это свидетельство различного протекания диффузионного процесса в контроле и опыте. А это означает, что сравнение зон не корректно.



ГЛАВА 7.

**ДИСК-ДИФFUЗИОННЫЙ 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 антибиотикам 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.

Базовая пропись среды Мюллера-Хинтон следующая (на литр):

Инфуз (вытяжка из мяса говяжьего)	300 г (мл)
Гидролизат казеина кислотный	17,5 г
Крахмал	1,5 г
Агар-агар	17,0 г
pH 7,4 ± 0,2	

Слова «базовая пропись» употреблены не случайно. Есть ряд прописей среды для самых разных целей, в том числе для выделения отдельных групп бактерий (легионелл, коринебактерий, хромобактерий). Их состав отличен от «базового». Об этом надо помнить при закупке питательной среды, она должна быть именно для определения чувствительности. Кроме того, разные производители часто используют свои источники белкового питания и, даже, свои прописи среды, не меняя ее названия (в принципе, это недопустимо). Поэтому следует у продавца не только требовать паспорт на данную среду, но и, что важно, осуществлять внутрилабораторный контроль качества каждой новой серии питательной среды [7]. Микробиологи привыкли в большинстве случаев доверять производителю, был бы паспорт. Есть не много питательных сред, внутрилабораторный контроль которых является обязательным. Питательные среды для определения чувствительности микробов к антибиотикам из их числа, в т. ч. среда Мюллера-Хинтон.

С учетом того, что среда Мюллера-Хинтон не самая богатая (для многих т. н. требовательных бактерий она недостаточна) существует несколько ее вариантов, в том числе являющихся признанными, вошедшими в стандарты определения чувствительности. Основной вариант, пропись которого представлена выше, предназначен для определения чувствительности бактерий семейства *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter* spp., *Burkholderia cepacia*, *Enterococcus* spp. и нек. др. Этот же вариант среды часто используют при тестировании чувствительности *Staphylococcus* spp. В то же время получила узаконенное признание среда Мюллера-Хинтон с добавлением 2% хлорида натрия, которая позволяет выявить устойчивость микроба к пенициллиназоустойчивым пенициллинам (оксациллину, клоксациллинам, нафциллину). Стафилококк, как известно, дает хороший рост («газон») на средах с добавлением сравнительно больших кон-

центраций NaCl (напомним, что в среде Чистовича содержится до 10% соли). Поэтому по оправданному мнению некоторых авторов для выявления т. н. «метициллинрезистентности» лучше добавлять в среду Мюллера-Хинтон не 2%, а 5–6% хлорида натрия.

Третий вариант этой питательной среды предназначен для определения чувствительности стрептококков (включая пневмококки) и менингококков. В этом случае рекомендовано использовать агар Мюллера-Хинтон с добавлением 5% бараньей крови. Фактически четвертым вариантом среды является т. н. НТМ-агар, предназначенный для тестирования чувствительности методом дисков *Haemophilus influenzae*. Ее пропись повторяет компоненты среды Мюллера-Хинтон, но включает НТМ-добавку. В состав последней входят никотинамид аденин динуклеотид (НАД) и гематин по 0,03 г каждого. Их растворяют в 10 мл дистиллированной воды и вносят в расплавленную и охлажденную до 45–50 °С основную среду. Компоненты добавки не стабильны при нагревании, поэтому в формализованном варианте считается правильным стерилизовать добавку фильтрацией. В первую очередь это касается НАД. Гематин более стабилен и его можно обесплодить также пастеризацией без потери его свойств.

Еще один вопрос, который возникает в связи с обогащением среды Мюллера-Хинтон, — чью кровь лучше использовать при тестировании чувствительности стрептококков и менингококков. В ряде работ упоминают лошадиную, кроличью и, даже, человеческую кровь. Более того, некоторые стандарты Европейских стран отдают предпочтение лошадиной крови. С учетом того, что критерии чувствительности бактерий в отечественных методических указаниях близки к стандартам, содержащим рекомендацию использовать баранью кровь, видимо, целесообразно соблюдать именно такое предложение.

Как уже подчеркивалось выше, среда Мюллера-Хинтона хотя и используется наиболее часто в мировой практике, тем не менее, является одной из нескольких, особенно в Европе. Некоторые питательные среды существенно отличаются по составу от среды Мюллера-Хинтон. Это, прежде всего, касается питательной среды, предложенной Британским обществом антимикробной терапии. От разработчика, английской фирмы Оксайд, она получила название Изосенситест агар (Iso-Sensitest agar Oxoid). Среда достаточно богата; она содержит гидролизат казеина, пептоны, глюкозу, водорастворимый крахмал, аминокислоты, витамины,

соли, в том числе те, которые стабилизируют рН среды. При всем при том, состав среды не исключает необходимости добавок при работе с цепочковыми кокками, нейссериями, гемофильными бактериями, «малыми» колониями стафилококков и в некоторых других случаях. Как добавку обычно используют дефибрированную кровь. Обратим внимание на то, что рекомендуют использовать дефибрированную лошадиную (а не баранью) кровь. Изосенситест агар пользуется признанием в нескольких странах. Он рекомендован в Швеции и Дании, причем в последней наряду с агаром Мюллера-Хинтон.

Есть рекомендации использовать, как базовые, питательные среды с иной прописью, но они широкого распространения не нашли и имеют распространение только в отдельных странах (и то наряду с более известными).

Следует заметить, что с появлением Европейского комитета по определению чувствительности микробов к антимикробным препаратам (EUCAST), который интенсивно внедряет собственные стандарты, все больше исследователей прибегают к общей методологии определения чувствительности, в том числе предпочитая плотную среду Мюллера-Хинтон, которая по Европейскому стандарту является основной.

Многообразны подходы к выбору питательной среды для определения чувствительности к антибиотикам гонококков. В стандарте CLSI рекомендуют использовать традиционную гонококковую среду с той ростовой добавкой, которую, как правило, вносят в среду для стимуляции роста микроба. До января 2012 г. EUCAST не определился с выбором среды для тестирования гонококков. В практике французских микробиологов принято определять чувствительность *N. gonorrhoeae* на шоколадном агаре также с внесением в среду стимулятора роста. Изосенситест агар признан достаточно богатой средой, пригодной для определения чувствительности гонококков, но при условии внесения в среду 5% лошадиной крови. Такова рекомендация в Британском стандарте (BSAC). Аналогичен подход к выбору питательной среды в Швеции; тот же Изосенситест агар с 5% лошадиной крови, но еще и с добавлением 20 мкг/мл NAD. В остальных стандартах, существующих в разных странах мира, чаще рекомендуют уже упомянутую выше гонококковую среду со специальной добавкой или Изосенситест агар с добавлением дефибрированной крови лошади. Основная цель — добиться равномерного диффузного

роста микроба на поверхности питательной среды, позволяющего определить край зоны подавления роста вокруг диска. Это не всегда доступно при тестировании гонококка, почему к качеству сред для тестирования гонококка предъявляются повышенные требования.

В этом издании не раз упоминается о приготовлении чашек с питательной средой для определения чувствительности микроорганизмов к антибиотикам. Некоторые положения целесообразно подчеркнуть. Слишком важна роль питательной среды в таком исследовании, велика цена и ее достоинств, и недостатков, ее качественных показателей. Суммируя, можно привести следующие требования [7, 14, 49]:

1. Любая новая партия среды, откуда бы она не поступала (от производителя, от поставщика, из собственной средоварни микробиологической лаборатории), всегда должна пройти входной (внутрилабораторный) контроль. Следует использовать тест-культуры разной родовой (видовой) принадлежности и не менее 8–10 вариантов дисков с антибиотиками различной структуры (пенициллины, цефалоспорины, макролиды, аминогликозиды и т. д.). Контролю подлежат рН среды, плотность геля, стерильность среды, рост референс-культур, образование газона, диаметр зон подавления роста.
2. Каждая серия питательной среды, поступающая в лабораторию, должна иметь паспорт с указанием НТД (нормативно-технического документа), по которому она сделана (ФС, ФСП, ТУ), и номера этого документа, даты изготовления и всех показателей качества. Особое внимание следует обратить на результаты тестирования зонообразования, сравнивая их с результатами внутрилабораторного контроля. Они должны быть близкими (в пределах различий, предусмотренных стандартом).
3. Приготовление питательной среды перед разливом в чашки Петри должно быть щадящим. Готовую питательную среду не следует «кипятить», — только расплавить в водяной бане. Охлаждение питательной среды после стерилизации в автоклаве следует проводить постепенно в водяной бане при температуре 45–50 °С. Необходимо учитывать, что всякая повторная тепловая обработка геля

ведет к изменению структуры полимеров. В результате, диффузия в него химических соединений, в данном случае антибиотиков, меняется.

4. На процесс зонообразования серьезное влияние оказывают характеристики столбика геля в чашке Петри. Поэтому чашки, в которые разливают питательную среду, должны иметь ровное плоское дно, прямой угол между дном и стенкой, а поверхность агара должна быть горизонтальной (соответственно, разливать чашки следует на выверенной по горизонтали плоскости). Столбик питательной среды должен быть около 4 мм, но не менее 3,5 мм и не более 5 мм.
5. В оптимальном варианте питательная среда, разлитая в чашки Петри, используется в день приготовления. Допустимо хранение питательной среды в чашках не более 7 суток при температуре 2–8 °С.
6. Нельзя использовать питательную среду с избыточной влажностью на поверхности; на ней не должно быть слоя жидкости или капель влаги. Поверхность среды должна быть увлажненной (не сухой), но не «мокрой».
7. Не следует использовать питательную среду в колбах, если она высохла при хранении. Среда в чашках Петри также не должна быть сухой. При признаках высыхания среды она подлежит выбраковке.
8. При входном контроле качества новой серии питательной среды целесообразно параллельно использовать референтную питательную среду. Под последней подразумевается специально отобранная, всесторонне проверенная партия питательной среды аналогичного состава (среды Мюллера-Хинтон или иной, если таковая используется). Сравнению подлежат:
 - 8.1. Рост тест-культур, образование газона, который на обоих вариантах среды должен быть сходным.
 - 8.2. Диаметры зон подавления роста тест-культур. Их величина должна быть близкой.
 - 8.3. Сходными должны быть характеристики зон подавления роста микроба вокруг дисков: отчетливость края зоны, наличие (или отсутствие) роста у края зоны или внутри ее, присутствие вуалеобразного роста и т. д.

Различия могут определяться обедненностью питательной

среды, наличием избыточного содержания солей, в т. ч. Mg, Ca, Fe и др., или, наоборот, недостаточностью микроэлементов, избыточной или недостаточной плотностью питательной среды (т. е. качеством и (или) количеством агар-агара) и рядом других факторов.

Поскольку от качества питательной среды во многом зависит информативность, точность тестирования чувствительности микроба к антибиотикам, сравнительное исследование с использованием референс-среды позволяет с высокой степенью надежности сделать выбор в пользу корректного исследования.

Диски для определения чувствительности микроорганизмов к антибиотикам

Вторым очевидным и важнейшим компонентом определения чувствительности микроба к антимикробным препаратам являются диски (или, как их иногда называют — индикаторные диски; в недавнем прошлом это было распространенным названием).

Диски, как известно, это носитель, пропитанный раствором противомикробного лекарственного средства. В каждом диске содержится строго определенное количество этого лекарства. Колебания возможны, но только в регламентированных пределах. Любое существенное отклонение от этой величины делает диски не пригодными; если диски содержат большее или меньшее, чем допустимо, количество антибиотика, все привычные для микробиолога табличные критерии чувствительности (устойчивости) микроба оказываются не информативными. Об этом следует помнить, поскольку и за рубежом, и на отечественном «рынке» предлагаются диски с различным содержанием антимикробного вещества. Их немного, но они есть. Поэтому, необходимо использовать только те из них, которые упомянуты в МУК. В иных случаях должны быть детальныe разъяснения.

Отечественные микробиологи, как правило, имеют дело с картонными дисками. На самом деле носитель может быть разным: и не обязательно картонным, и не обязательно округлым (полоски). Наибольшее распространение получили именно картонные диски диаметром 6 мм. Но и эта величина (диаметр) может быть иной. Автору довелось работать с дисками диаметром 3 мм. В мировой практике есть диски большого диаметра.

Об этом стоит упомянуть только с одной целью. Главное не то, каков носитель, и не то, какой он формы: главное заключено в том, с помощью каких носителей (дисков) и для каких носителей (дисков) определены критерии чувствительности. А исходя из этого очевидным является и то, что привычные, широко используемые картонные диски диаметром 6 мм должны быть стандартными, обеспечивающими сходные процессы зонообразования на выбранной питательной среде — в нашем случае плотной питательной среде Мюллера-Хинтон, рекомендованной отечественными МУК.

Нет надобности останавливаться на технологии изготовления дисков, это задача не клинических микробиологов, а тех, кто занят их производством. Упомянем только те моменты, которые имеют прямое отношение к зонообразованию. Понятно, что носитель (картон) должен быть способен сорбировать из раствора антибиотика только необходимое его количество. Но не менее важно, чтобы при нанесении диска на засеянный питательный агар он «отдавал» антибиотик, чтобы в короткий промежуток времени (для каждого препарата он индивидуален) антибиотик переходил из носителя в питательную среду, причем практически полностью. Без этого зона образоваться не может. Следующая характеристика диска, тоже очень важная для практики — способность сохранять активность антибиотика сравнительно длительный промежуток времени. Диски с коротким сроком хранения допустимы в исключительных случаях. Вместе с тем, есть антибиотики, легко теряющие свои противомикробные свойства. Отсюда проистекают требования к хранению дисков. Диски в герметично закупоренных флаконах лучше сохраняют свои свойства при минусовой температуре. Срок их хранения устанавливает производитель, но он не может быть менее года. Флаконы с дисками помещают в коробки или контейнеры. Иное дело, если речь идет о дисках, используемых для постановки исследований (т. е. в разгерметизированной упаковке). Их необходимо хранить таким образом, чтобы избавить от многих «напастей»: прямых солнечных лучей, влаги, микробного загрязнения, теплового воздействия. При этом диски должны быть пригодны для нанесения на поверхность засеянной питательной среды — обеспечить надлежащий процесс перехода антибиотика из диска в гель. Поэтому целесообразно придерживаться следующих правил:

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 обеспопленным 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 непереносимое 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 ингибции 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.

Если газон признан удовлетворяющим требованиям, переходят непосредственно к оценке зон подавления роста тестируемого микроба, образовавшихся вокруг дисков с антибиотиками. В этом случае рекомендуется придерживаться ряда требований, которые помогают качественной процедуре измерения диаметров зон подавления роста. В руках исследователя могут быть чашки с питательной средой двух типов: первый, самый частый вариант — с агаром Мюллера-Хинтон (или иной питательной средой) без добавок, и, второй вариант, среда с добавлением крови или гемина. В первом случае зона подавления роста микроба хорошо видна не только при прямом визуальном осмотре чашки со снятой крышкой, но и со дна перевернутой чашки, без снятия крышки чашки. Замер зоны может осуществляться со дна. Иное дело питательная среда с добавлением крови или шоколадный агар. Такие среды практически не дают возможность четко различить край зоны подавления роста в перевернутой вверх дном чашке (или среда вообще не прозрачна). В этом случае зона отчетливо просматривается только при снятой крышке чашки и прямом осмотре поверхности питательной среды. Но в любом случае чашки должны быть хорошо освещены. Источник света может располагаться под чашкой, или, что лучше, на уровне или даже чуть сзади головы исследователя. В таком варианте поверхность питательной среды или дно перевернутой чашки осматривается в отраженном свете. Это наиболее частый вариант. Важная рекомендация — свет не должен быть слишком ярким, он не должен слепить. Исследователю следует самому подобрать комфортный для него и достаточный источник освещения поверхности среды.

Второй, редкий вариант, используемый в особых случаях, когда источник света располагают позади чашки со средой. Зоны просматривают в проходящем свете. Цель — увидеть колонии внутри зоны подавления роста. Не следует помещать источник света на одной прямой — источник, зона, глаз. Он должен быть чуть выше или чуть ниже чашки со средой. Так лучше и для глаза исследователя, и для выявления роста внутри зоны. Этот способ освещения, рассмотрение зоны в проходящем свете, рекомендован при определении «метициллинрезистентности» стафилококков, используя диск с оксациллином и цефокситином. Такой же прием используют при определении чувствительности стафилококков к линезалиду и энтерококков к ванкомицину. Проходящий свет рекомендован для определения края зоны подавления

роста стафилококков вокруг диска с бензилпенициллином. Перечисленные показания вошли в некоторые зарубежные стандарты [67]. Однако, следует добавить, что рассмотрение зоны подавления роста в проходящем свете под разным углом наклона чашки может быть полезным при рассмотрении и ее края, и роста внутри зоны в случае работы с другими дисками, особенно с бета-лактамами антибиотиками, включая цефалоспорины и карбапенемы.

Еще одна рекомендация, которая дана в документе EUCAST, — рассматривать чашки на расстоянии около 30 см от глаз. Действительно, у человека с нормальным зрением это оптимальное расположение. Но всегда надо иметь в виду, что зрение может быть разным и право исследователя при изучении зоны самому подбирать себе расстояние от глаз до чашки со средой.

При рассмотрении и замере зон в отраженном свете очень желательно, чтобы фон был темным, даже черным, но при одном непременном условии, — этот темный фон не должен быть глянцевым, не должен рассеивать свет, «блестеть», а матовым, спокойным для глаз, без бликов.

Теперь вернемся к рассмотрению зоны, к таким ситуациям, когда зона не представляет собой четкое образование (размер которого определить нетрудно простым измерительным устройством), а содержит какие-либо дефекты, затрудняющие возможность оценки ее диаметра. Остановимся, прежде всего, на тех из них, которые нашли отражение в ряде документов (в основном зарубежных, в частности, Европы — EUCAST и США — CLSI). Самое частое, с чем микробиологу приходится сталкиваться, это рост колоний внутри зоны. Если колонии разбросаны по всей площади зоны, то возможны два варианта событий. Первый — культура контаминирована посторонней микрофлорой. Это легко проверить микроскопией мазка. Но если она не дает ответа, то необходимо или подтвердить, или исключить загрязнение иным микробом. Для этого требуется полноценная микробиологическая диагностика, позволяющая убедительно сказать — культура не чистая, контаминирована. Если контаминация подтверждается, исследование необходимо повторить с чистой культурой тестируемого микроорганизма. Это очевидно. Но если подтверждается идентичность микроорганизма, выделенного из зоны с исследуемым микробом, он признается устойчивым к данному антибиотику. Однако, последнее бывает в том случае, если изолированные колонии разбро-

саны по всей поверхности зоны. Но достаточно часто они расположены только у края зоны. Их может быть много или мало, но вокруг диска остается пространство, где колоний нет. Считается, что его можно принять за полноценную зону и измерить расстояние между крайними по отношению к диску колониями, сделав несколько замеров и усреднив результат. EUCAST предлагает поступать еще более жестко: измерять расстояние от колонии, расположенной наиболее близко к диску, до середины диска и умножить его на два. Т. е. диаметр зоны равен расстоянию между колонией, расположенной наиболее близко к центру, и такой же точкой с другой стороны от диска (хотя там роста нет). Единственное исключение, которое допускается в некоторых документах [49], это рост мелких колоний у края зоны подавления роста, причем, только таких, которые невозможно уловить невооруженным глазом, но их можно увидеть через увеличительное стекло. Спорное утверждение. Многое зависит от того, кто смотрит. Одни глаза могут уловить рост, другие нет. При тестировании чувствительности стафилококков к бензилпенициллину и ампициллину, действительно, у края зоны может быть рост очень мелких колоний, образованных нежизнеспособными клетками. Как правило, субкультуру при их пересеве получить не удастся. Однако, этот рост виден не только при использовании увеличительного устройства, но и может быть различим невооруженным глазом. Более того, это могут быть не изолированные мелкие колонии, а рост сливающихся колоний с образованием двойной зоны. Однако, повторимся, это кольцо состоит из погибших клеток. Рост, действительно, в данном частном случае может не приниматься во внимание.

В продолжение этой темы следует заметить, что двойной край зоны подавления роста, «террасовидная зона», «двойная зона» — не редкая ситуация, способная озадачить исследователя. В некоторых случаях наружное кольцо — это более плотный рост, валик из обильных крупных колоний тестируемого микроба. С ним, естественно, можно не считаться, его игнорируют при замере. Это рост, а не зона. Иное дело, когда равномерный, приемлемый по плотности газон переходит в слабый, но очевидный рост культуры, образующий наружное кольцо. А затем идет зона полного подавления роста. Все существующие методические документы, в которых упомянут подобный вариант зоны (точнее, двух зон подавления роста — частичного и полного), сходятся в том, что учитывать следует только диаметр внутренней зоны,

там, где роста нет. Это убедительная рекомендация, поскольку, когда речь идет о чувствительности микроба к антибиотикам макролидной группы, тетрациклинам и некоторым другим т.н. «бактериостатическим» антибиотикам двойная зона может являться отражением неоднородности популяции по устойчивости к данному антимикробному препарату. Это не единственная, но хорошо доказанная причина подобного явления.

Рост внутри зоны подавления роста, причем не только у ее края, но и внутри зоны, вплоть до диска, может не учитываться в двух ситуациях. Во-первых, когда тестируются на чувствительность к антибиотикам представители рода *Proteus*. Они, как известно, дают т.н. «ползучий» рост; есть край зоны, образуемой подавлением роста вокруг диска в полноценном газоне, и есть вуалеобразный рост внутри зоны, характер которого хорошо знаком любому клиническому микробиологу. Он может быть по всей зоне, может быть частичным и, даже, отсутствовать вокруг диска с образованием второй зоны меньшего диаметра (но, как правило, с «рваным», неправильной конфигурации краем). Вот этот рост не учитывают. Зоны замеряют от ее края до края в обычном газоне, образуемым протеем. Второй случай, когда рост внутри зоны может не учитываться, более сложный для прочтения, возникает при определении чувствительности микроба к триметоприму и его сочетанию с сульфаметоксазолом (ко-тримоксазолу). В питательных средах, содержащих белковый компонент (понятно, что среда Мюллера-Хинтон относится к их числу) присутствует ингибитор как триметоприма, так и сульфаниламида. Его количество не стандартизуемо. Подавить действие ингибитора можно нагреванием в определенном режиме, достаточно жестком. Когда-то, при определении чувствительности бактерий к сульфаниламидам, так и поступали. Сегодня практика иная. Допускается рост внутри зоны и в виде мелких, плохо различимых колоний, и в виде второго кольца у края зоны. Его не учитывают. Однако провести грань между газоном и «неучитываемым» ростом не всегда просто. Определение диаметра зоны подавления роста при установлении чувствительности эшерихий, стафилококков, гемофильных и нек. др. бактерий к триметоприму и его сочетанию с сульфаметаксазолом зачастую представляет собой трудную задачу и требует повторения исследования.

Роль качества питательной среды не только в этом случае, но и в ряде других ситуаций велика, о чем уже упоминалось. В регла-

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 (-ях). 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.

Итак, исследователями установлено, сколько нужно антибиотика для подавления размножения микробов определенного рода и (или) вида, убедились в том, что такие концентрации достижимы в организме человека, причем, что очень важно, при введении антибиотика в безопасной для человека дозе. Но теперь надо проверить, так ли надежны полученные данные. Ведь чувствительность, подавляющие концентрации, установлены только *in vitro*. Следовательно, надо убедиться в том, что МПК, определенные в пробирке, сопоставимы с концентрациями препарата в организме человека, и это действительно означает, что и *in vivo* они будут достаточны. Надо убедиться, что в организме антибиотик будет подавлять микроб, т. е. микроб будет *in vivo* действительно к нему чувствителен. Дальше начинаются последующие этапы установления *break-point*: проверка достоверности намеченных контрольных величин в опытах на животных и при терапии патологий человека. Надежность витрально установленной достаточной концентрации для суждения о чувствительности микроба определенного вида или рода к антибиотику проверяют в эксперименте на животном (*in vivo*), зараженном этим микроорганизмом, заведомо чувствительным по отобранной величине МПК (т. е. *in vitro*). Антибиотик должен лечить экспериментальную инфекцию. Но (ставят и такой эксперимент) если микроб устойчив к МПК, взятой как предполагаемый *break-point*, то антибиотик не должен лечить инфекцию или эффективность его должна быть существенно лимитированной. Убеждаются, что это так. А потом начинается трудный и, зачастую, длительный период сбора клинических данных. Накапливают шаг за шагом результаты изучения эффективности антибиотика при лечении больных, у которых был выделен (если удалось) микроб-возбудитель определенного вида или рода, и который был (или не был) чувствителен к использованному препарату. При этом чувствительность (устойчивость) определяют стандартным методом (обычно, серийных разведений с ориентиром на предлагаемую контрольную величину (*break-point*) в ЕД или мкг/мл. Если все перечисленное сходится, то эта величина признается приемлемой и вносится в таблицы, в последующем ежедневно используемые клиническими микробиологами. А вот если результат оказывается не адекватным, контрольные цифры признаются непригодными. Более того, может возникнуть убеждение (а оно не так уж редко), что витральные исследования дают ложноположительный результат и опреде-

лять чувствительность некоего микроба к данному антибиотику нецелесообразно (или, что представляется более убедительным — ошибочно). Вспомним, например, чувствительность *in vitro* сальмонелл к аминогликозидам (гентамицину и др.) или «метициллинрезистентных» стафилококков к цефалоспоринам. *In vitro* микроб чувствителен, *in vivo* это не так.

Таким образом, определяются контрольные цифры, *break-point* (или во мн. числе — *break-points*), которые в обыденной жизни называют «табличные данные». Пометим, речь идет об МПК, т. е. о тех показателях, которые определяют методом серийных разведений. О дисках, о предлагаемых результатах исследований чувствительности с их использованием, разговор особый.

Внешне установленные показатели чувствительности с использованием МПК выглядят достаточно убедительно, логично. В какой-то степени это действительно так, и автор настоятельно советует при наличии показаний использовать метод серийных разведений, т. е. оценивать чувствительность возбудителей по подавляющим концентрациям. Однако, не все так гладко, как хотелось бы. Дотошный читатель, знакомый с проблемой несколько более детально, наверно обратил внимание на тот факт, что контрольные показатели, фактически обязательные для микробиолога, во времени могут измениться, причем не раз и достаточно заметно. Раньше цифра была одна, теперь другая. В документах разных стран, в которых приведены «табличные данные», показатели чувствительности — устойчивости могут быть разными, порой значительно. Цифры, предлагаемые CLSI (Институт по клиническим лабораторным стандартам, США), не всегда совпадают с критериями, приведенными в Европейском стандарте. Свои «табличные данные» представлены Британским обществом противомикробной химиотерапии, в них есть существенные особенности. Более того, разночтения есть даже между *break-points* CLSI (которыми, в основном, пользуются российские микробиологи) и FDA (Агентство по контролю за лекарствами и продуктами питания), т. е. принятыми в одной и той же стране, США. Это происходит по ряду причин. Меняются методики исследования, накапливаются экспериментальные и клинические материалы. Не всегда видовой состав тестируемых микроорганизмов совпадает и это может внести свои коррективы. Меняется дозировка антимикробных препаратов, обычно в сторону повышения, что позволяет увеличить порог чувствительности и т. д. Методика

установления break-point в разных странах не совпадает и это способно самым радикальным образом повлиять на декларируемую контрольную концентрацию в отдельной стране. Например, в большинстве государств для определения чувствительности (в т. ч. МПК) используют плотную или жидкую среду Мюллера-Хинтон, достаточную для роста многих бактерий, но не очень богатую (если, конечно, не используют добавки). По методике, предложенной в Британии, при установлении чувствительности используют заметно более богатые среды (т. н. Изосенситест агар и Изосенситест бульон). Естественно, что чем богаче среда, тем быстрее, интенсивнее идет рост популяции, а это самым непосредственным образом влияет на критерии чувствительности: увеличится МПК, уменьшится размер зоны подавления роста. Следовательно и показатели чувствительности (устойчивости) окажутся иными. В мире специалистов понимают, что эта разногласица, в принципе, не приемлема, она ограничивает возможность решать проблему антибиотикорезистентности в планетарном масштабе, но пока реальность именно такова.

Впрочем, не это основная беда, не главный дефект такого критерия, как break-point. Самое слабое место этого показателя, его узость, относительность, а, следовательно, во многих ситуациях, не информативность. Во многих работах читатель найдет неудовлетворенность существующей ситуацией с определением чувствительности бактерий к антибиотикам [11, 12, 119, 122, 127, 161]. Почему это так? Выше уже говорилось о значимости фармакокинетических данных для установления break-point. Именно с ними, с показателями количественного содержания антибиотика в биосубстратах сравнивают МПК, именно соотношение тех и других величин является базисом для понятий — чувствителен микроб или не чувствителен. Но говоря о концентрации в биосубстратах автор, мягко говоря, преувеличивает. Речь, фактически, идет лишь об одном субстрате, о крови, о содержании антибиотика в крови, о динамике концентраций в крови, которую (динамику) характеризуют чаще всего общим критерием — площадью под фармакокинетической кривой на графике, отражающем, как меняется концентрация во времени, от инъекции до инъекции, от введения до введения. Для этого есть специальная система обсчета. Но, что главное, речь идет о концентрации в крови человека, более того, речь идет о концентрации в крови некоего «усредненного» человека, призванной впитать в себя, обобщить все возможные варианты

концентраций антибиотика в крови. А они более, чем многовариантны. Многие и многие причины могут влиять на количественную характеристику содержания препарата в крови, причем оно может быть разным в очень широком диапазоне. Но это только в крови. Уместно вспомнить, что концентрации в крови и концентрации в тканях — далеко не одно и то же. Более того, речь идет не просто о проникновении антибиотика в ткани, но в пораженные ткани. Патологические изменения тоже могут быть различны и самым радикальным образом влиять на проникновение антибиотиков в эти измененные патологией ткани. Естественно, что все это при установлении break-point учесть невозможно. По сути, надо было бы иметь контрольные концентрации на все случаи жизни, но при нынешнем методическом подходе к определению чувствительности это не реально. Сложившуюся ситуацию исследователи хорошо понимают. Поэтому и возникли рекомендации, ограничивающие перечень тех антимикробных препаратов, к которым следует определять чувствительность возбудителя того или иного заболевания. Действительно, какой смысл, например, при менингите, определять чувствительность менингококка к тем антибиотикам, которые не проникают через гематоэнцефалический барьер, а ведь менингококк на самом деле *in vitro* чувствителен к более широкому кругу препаратов, чем те, что обладают лечебным потенциалом при воспалении мозговых оболочек. Однако, могут быть ситуации прямо противоположные, когда концентрация в тканях больше, чем в крови. Правда, таких субстратов мало. Речь идет только о почках (прежде всего) и печени, являющихся основными органами, выводящими антибиотики из организма человека. Концентрация препаратов в них значительно больше, чем в крови, причем это могут быть даже те антибиотики, к которым микроб считается устойчивым. Выходит, что опять нужны специальные контрольные концентрации многих антибиотиков, отдельно для почек, отдельно для печени.

Обсуждая влияние фармакокинетики на break-point не сложно перебросить мостик на зависимость этого критерия от дозы вводимого препарата. Чем больше доза, тем выше концентрация антибиотика в крови и тканях. Хотя между этими величинами (доза — концентрация) нет строгой прямой зависимости, нет строгой пропорциональности, тем не менее, она существует и, поэтому, не может не влиять на контрольные показатели чувствительности. Верно, это касается далеко не всех антибиотиков. Есть противо-

микробные препараты строгого дозирования. Всякое увеличение их дозы выше установленных пределов чревато проявлением прямого токсического (органотропного) действия, а оно дозозависимо. Особенно опасны в этом отношении аминогликозиды, полимиксины, амфотерицин В. К числу препаратов строгого дозирования принадлежат тетрациклины, рифамицины, хлорамфеникол, некоторые другие антибиотики, хотя ограниченная возможность варьировать их дозу остается. Для этих препаратов влияние дозирования на величину break-point вряд ли имеет существенное значение. Другое дело, когда речь идет об антибиотиках т. н. ограниченного дозирования (цефалоспорины, карбапенемы, фосфомицин) и, особенно о пенициллинах. Многих из этой группы антибиотиков можно вводить больному в широком диапазоне доз, меняя их в зависимости от клинической ситуации. И концентрация антибиотика, соответственно, в крови и тканях больного будет заметно меняться. Вспомним, хотя бы, тот же бензилпенициллин: его можно ввести больному в дозе 2 млн. ЕД в сутки (т. е. 30 000 ЕД/кг) и 20 млн. ЕД (т. е. 300 000 ЕД/кг), а если необходимо, то и в большей дозе. Концентрация антибиотика в крови при этом тоже вырастет и хотя не в 10 раз, а только в 4–6, тем не менее, возрастет существенно и в первые часы, и к моменту следующего введения. Получается, что break-point тоже изменится и чем больше доза, тем больше та МПК, которая должна характеризовать микроб как чувствительный. Такие попытки уже делаются. Предлагают ввести break-point для характеристики чувствительности возбудителя в зависимости от локализации инфекционного процесса и с учетом дозы препарата. Но этот процесс еще только-только начался, и как будет обстоять дело дальше, можно только гадать. Главное, что разные аспекты проблемы обсуждаются, предлагаются решения или, хотя бы, направления исследований [56, 107, 184]. Практикующему врачу предлагается считаться с тем, что эффективность лечебного процесса лишь частично определяется чувствительностью микроба к антибиотику. Есть и другие факторы, о которых следует знать и считаться с ними [184].

Автор был бы совершенно неправильно понят, если бы читатель воспринял эти критические замечания в адрес break-point пенициллинов (или, что более правильно в данном случае — всех break-point) как сомнение в необходимости их использовать сегодня, тех из них, которые рекомендованы, которые узаконены на данном этапе развития антибиотической науки. Тестирование чувствительности возбудителя к антибиотикам во всех до-

ступных и показанных случаях, это жизненная необходимость. На карту поставлена человеческая жизнь и для ее спасения надо пользоваться тем, что сегодня реально есть. Только использовать умело, сознавая относительность получаемых данных, оценивая их критически, или, лучше сказать, грамотно, понимая, насколько и взятая методика, и полученный результат информативны. В сложных клинических ситуациях тесный альянс клинического микробиолога и лечащего врача переоценить невозможно. Другой разговор, что нужны новые подходы к определению чувствительности возбудителя к антимикробным препаратам. Один из таких новых подходов предложен автором [12]. Главное в «принципе достаточности» — уход от усредненных данных, от средней чувствительности, среднестатистического больного. Это попытка вернуться к принципу «лечить не болезнь, а больного». Но это в будущем. А сегодня надо умело использовать то, что есть, в том числе break-point.



ГЛАВА 8.

**СТАНДАРТ СРАВНЕНИЯ (МУТНОСТИ).
ПРИГОТОВЛЕНИЕ
В ЛАБОРАТОРНЫХ УСЛОВИЯХ**

Вопрос о стандарте сравнения, который используют при приготовлении микробной взвеси (его обычно называют стандартом мутности), логично рассматривать в рамках раздела об инокулюме. Однако, отечественная практика заставляет обратить на него особое внимание. Для определения чувствительности микроба к антибиотикам величина т. н. посевного материала, который используют для нанесения на поверхность агара или вносят в жидкую питательную среду, имеет первостепенное значение. Без строгой стандартизации инокулюма невозможна стандартизация всего аналитического исследования в целом. Вместе с тем, некоторые микробиологические лаборатории целиком ориентируются на готовые стандарты мутности, которые используют многие и многие годы без контроля их качества. Последнее недопустимо. Сам по себе стандарт мутности, поставляемый учреждением, имеющим и формальное право это делать, и обеспечивающее надлежащее качество продукта, не может вызвать возражений. Но бесконтрольное использование стандарта, тем более длительный промежуток времени, чревато ошибками при приготовлении микробной взвеси, а следовательно и ошибками при тестировании чувствительности. В ряде стран мира предпочитают использовать свежеприготовленную стандартную взвесь хлорида бария или коммерческую взвесь, плотность которой обязательно проверяют с использованием нефелометрии. По имени автора эта контрольная взвесь с использованием BaCl_2 получила название стандарта McFarland. В зависимости от разведения, плотность взвеси хлорида бария близка к плотности микробной взвеси с определенным содержанием клеток микроорганизма. Примечательно, что J. McFarland разработал и внедрил свои стандарты еще в 1907 г. и с тех пор их используют в микробиологической практике. Для определения чувствительности обычно приемлем стандарт McFarland 0,5. Фактически их 11 (с отличающейся плотностью, от наименьшей до наибольшей), хотя на практике, как правило, используют только первые 4–5 стандартов мутности. Заметим также,

что в последние годы делаются попытки, причем небезуспешные, заменить хлорид бария на иные вещества, образующие взвесь. В частности, используют латекс. Уже есть коммерческие варианты стандарта мутности с латексом (латекс — природные или синтетические полимеры разной молекулярной массы, образующие в зависимости от количества частиц взвесь различной оптической плотности). Тем не менее, классический вариант стандартов McFarlanda с хлоридом бария пока остается доминирующим.

Приготовление стандартов McFarland нельзя назвать сложной процедурой. Оно вполне доступно микробиологической службе клинических учреждений. Остановимся на том его варианте, который используют для приготовления инокулюма при определении чувствительности микроорганизмов к антибиотикам, т. е. стандарта 0,5, адекватного микробной взвеси, содержащей 150 000 000 КОЕ/мл ($1,5 \times 10^8$ КОЕ/мл). Порядок действий можно представить себе следующим образом.

1. Приготовление 1%-ного раствора серной кислоты. В цилиндр или мерный флакон на 100 мл жидкости вливают 90 мл деионизированной воды. Мерной пипеткой вносят туда же 1 мл концентрированной серной кислоты. Доливают деионизированную воду до 100 мл и раствор готов. Внимание: следует помнить, что концентрированная серная кислота — агрессивная жидкость, следует соблюдать все необходимые меры предосторожности.
2. Приготовление 1,175% раствора BaCl_2 . Делают навеску хлорида бария ($\text{BaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) — 1,175 г. Можно взять большую или меньшую навеску, но тогда следует пересчитать объем воды, в котором вещество будет растворено. Навеску целесообразно делать в калиброванном флаконе объемом на 100 мл жидкости. Во флакон с BaCl_2 добавляют 50 мл деионизированной воды и, перемешивая, доводят соль до полного растворения; доливают объем воды до 100 мл. Раствор хлорида бария готов.

Оба раствора, серной кислоты и BaCl_2 , это два базовых компонента для приготовления стандарта мутности (причем любой плотности, не только стандарта 0,5); они предназначены для повторного использования в течение года при условии, если растворы будут храниться при комнатной температуре (около 25°C), в стеклянной, хорошо укупоренной посуде с притертой пробкой,

а еще лучше, если на пробку будет нанесена парафиновая пленка. Избегать нагревания, прямых солнечных лучей. Как правило, оба раствора при длительном хранении остаются стерильными. Однако, помутнение любого происхождения делает их непригодными. Раствор хлорида бария лучше хранить в темном месте (хотя это требование выдвигается не всеми).

Теперь, когда базовые растворы готовы, можно перейти непосредственно к изготовлению стандарта мутности. Первое, на что необходимо обратить внимание — это на подбор одинаковых пробирок. Пробирки, в которых будет готовиться взвесь микроба, и пробирка для стандарта мутности должны быть одинаковы — и по толщине стекла (или пластика), и по диаметру, и по качеству стекла (пластика). Они должны быть прозрачны, не иметь дефектов (царапин, потертостей, участков с измененной прозрачностью и т. д.). Это очень важные «мелочи». В таблице 8.1 приведены те разведения, те соотношения растворов хлорида бария и серной кислоты, которые необходимы для получения взвеси (мутности) требуемой плотности. По мере увеличения концентрации соли бария интенсивность помутнения возрастает. Соответственно увеличивается и микробный эквивалент взвеси. Если на 99,5 мл 1 % раствора серной кислоты берут 0,5 мл 1,175 % раствора хлорида бария, то образующая взвесь адекватна взвеси, содержащей 150 млн. клеток. А если вместо 0,5 мл берут 2,0 мл на 98 мл раствора серной кислоты, то образующееся помутнение соответствует микробной взвеси, содержащей 600 млн. клеток. Напомним, правда, одно существенное уточнение: корреляция степени мутности в микробиологических стандартах с BaCl_2 дается по числу клеток одного микроба — *Escherichia coli*. Этот фактор не имеет большого значения, когда речь идет о многих бактериях, возбудителях заболеваний человека, даже тех, которые имеют несколько иную морфологию (бактерии семейства *Enterobacteriaceae*, стафилококки, т. н. неферментирующие бактерии). Но ситуация резко меняется, если тестируют микроорганизмы заметно иной морфологии или иного размера, например, грибы, в последнем случае несоответствие очень значительное (где-то в 40–50 раз). Число клеток гриба уже не 150 млн., а 3–4 млн., если взвесь готовят по стандарту мутности McFarland 0,5. Остановимся на том, каков порядок приготовления стандарта, необходимого при тестировании чувствительности бактерий к антибиотикам, т. е. стандарта 0,5. Цепочка действий следующая (для удобства прочтения будем использовать объем в 100 мл).

**Приготовление стандартов мутности с хлоридом бария
McFarland и их соответствие количеству КОЕ
в микробной взвеси
(по Hendrickson a. Krenz, 1991 г.)**

Номер стандарта McFarland	Объем 1,175 % раствора BaCl ₂ (мл)	Объем 1 % раствора H ₂ SO ₄ (мл)	Количество микробных клеток во взвеси соответствующей плотности (КОЕ/мл × 10 ⁸)
0,5	0,5	99,5	1,5
1	1,0	99,0	3
2	2,0	98,0	6
3	3,0	97,0	9
4	4,0	96,0	12
5	5,0	95,0	15
6	6,0	94,0	18
7	7,0	93,0	21
8	8,0	92,0	24
9	9,0	91,0	27
10	10,0	90,0	30

1. В стерильный мерный флакон на 100 мл наливают 1 % раствор серной кислоты в количестве 85 мл.
2. Туда же медленно, каплями градуированной пипеткой вносят 0,5 мл 1,175% раствора хлорида бария, равномерно распределяя его по всему объему круговыми движениями флакона. Образуется взвесь.
3. Доводят объем до 100 мл, добавляя 1 % раствор серной кислоты.
4. Продолжают смешивание двух растворов ручным способом или на качалке в течение 3–4 мин. Может быть использована также магнитная мешалка. Задача заключается в том, чтобы образовавшаяся взвесь была гомогенной, без включений.
5. Проводят оценку качества образовавшейся взвеси (см. ниже).
6. Разливают полученную взвесь по пробиркам, которые будут представлять собой стандарт мутности. Плотно укупоривают пробирки пробкой из нейтрального пластического

- материала или качественного латекса. Заливают пробку сургучом или парафином.
7. Полученный стандартный образец может храниться до 12 месяцев, периодически, не реже 1 раза в три месяца проходя контроль качества. (Отечественные МУ требуют ежемесячного контроля качества стандарта). Хранить стандарт можно при комнатной температуре в затемненном месте.
 8. Контроль качества полученной смеси растворов в процессе приготовления стандарта мутности.
 - 8.1. Визуальный осмотр позволяет оценить гомогенность взвеси, отсутствие включений. Далее следует убедиться в том, что степень мутности адекватна ожидаемой мутности взвеси микробных клеток $1,5 \times 10^8$ КОЕ/мл. Простой и привычный для микробиолога способ контроля, это приготовить, ориентируясь на предполагаемый стандарт, взвесь *E. coli* аналогичной плотности и сделать высев на плотную питательную среду с учетом через 16–18 ч инкубации числа колоний. Метод информативен, но требует определенных трудозатрат и много времени в ожидании результата — почти сутки. Если стандарт качественный, то при определенном разведении может быть получен рост изолированных колоний в том или ином количестве (таблица 8.2). Важно соблюдать несколько очевидных для микробиолога правил.
 - 1) Среда, предназначенная для посева, должна обеспечить полноценный рост микроба. Можно использовать, в частности, мясо-пептонный агар с добавлением 5% бараньей или лошадиной крови.
 - 2) Для приготовления микробной взвеси целесообразно использовать культуру (референс-штамм) с хорошо известными свойствами. В частности, это может быть *E. coli* ATCC 25922, но не исключается и другая кишечная палочка, рост которой хорошо знаком исследователю.
 - 3) Посев, — 0,1 мл взвеси, приготовленный с использованием нового стандарта, тщательно шпателем распределить по поверхности агара.
 - 4) Посевы следует делать в 2–3 повторях (параллельных).
 - 5) При учете результата считать, что наличие более 300 колоний на поверхности среды в чашке Петри диаметром 90–100 мм исключает точность исследования (не дает истинной величины).

**Микробиологический контроль инокулюма,
приготовленного по стандарту McFarland 0,5
(около $1,5 \times 10^8$ КОЕ/мл)**

Разведение	Объем взвеси для посева (мл)	Количество колоний на поверхности среды (КОЕ)	Примечание
1: 19 (10^{-1})	0,1	> 1000	Посев не обязателен
1: 100 (10^{-2})	0,1	> 1000	Посев не обязателен
1: 1000 (10^{-3})	0,1	> 1000	Посев не обязателен
1: 10000 (10^{-4})	0,1	> 1000	Посев не обязателен
1: 100000 (10^{-5})	0,1	> 1000	Посев
1: 1000000 (10^{-6})	0,1	около 150	Посев
1: 10000000 (10^{-7})	0,1	около 15	Посев

Существуют определенные разночтения в том, какое количество колоний является приближенным к искомой величине, позволяющей судить о качестве стандарта. Есть достаточно высокие требования, предполагающие, что допустимы колебания в пределах 10% от искомого числа колоний. Однако, и контрольные эксперименты, и реальная практика позволяют считать, что при разведении 10^{-6} рост от 100 до 200 колоний делает возможным использовать стандарт с достаточной степенью надежности. Впрочем, повторные исследования, обычно, дают возможность при усреднении существенно сократить разброс полученных данных по отношению к искомой величине.

Микробиологический контроль стандарта мутности, при всей его несомненной ценности, в силу хорошо знакомой микробиологам специфики микробного роста всегда чреват вероятностью существенного разброса числа колоний при посеве казалось бы одинакового объема микробной взвеси. Поэтому рекомендуют использовать не только этот метод контроля (а по мнению некоторых его просто не целесообразно использовать), а нефелометрически устанавливать плотность биомассы в стандартном образце, измерять светопропускание взвеси хлорида бария с применением соответствующих устройств. Для этих целей существует ряд моделей приборов с самыми разными возможностями и спектром исследований: нефелометры, нефелометры-колориметры, спектрофото-

метры. В разных изданиях (в том числе методических пособиях) их называют по-разному, хотя, фактически, что бы не могли анализировать эти приборы, микробиолога интересует только одна их функция: способность измерять интенсивность светопропускания (строго говоря — светорассеяния) при прохождении света через тонкую взвесь (в нашем случае — взвесь частиц хлорида бария). Т.е. речь идет именно о нефелометрических исследованиях (иногда их называют денситометрическими — это не совсем верно). Действительно, такую процедуру можно проводить и на очень простых устройствах и на сложных многофункциональных приборах. В микробиологической лаборатории для контроля стандарта мутности и бактериальной взвеси удобны самые простые из них, позволяющие не прибегать к кюветам, а выполнять нужные исследования с пробирками. Это, однако, ни в коей степени не исключает возможность и целесообразность постановки их на более сложных и точных приборах. Тут выбор целиком за аналитиком (и тем, чем он реально располагает). Техника исследования в основном определяется тем прибором, на котором оно реализуется. Если речь идет об устройстве, которое предполагает использование кювет, то рекомендуют длину волны 625 нм и кювету с 1 см в поперечнике. При этом оптическая плотность колеблется в пределах 0,08–0,1 при условии, что стандарт McFarland действительно адекватен взвеси *E. coli*, содержащей $1,5 \cdot 10^8$ КОЕ/мл. Если показатель больше этой величины, взвесь надо развести, если меньше — следовательно, концентрация BaCl_2 должна быть увеличена. Приведенные условия определения оптической плотности вошли в стандарт США (CLSI) и в отечественные методические указания. Однако, эти показатели не являются единственно возможными. Как упоминалось, существуют удобные нефелометры, не требующие применения кювет, — плотность взвеси определяют непосредственно в пробирках с учетом размерности стандартов McFarland. В этом случае контрольные величины (в том числе для стандарта 0,5) оговорены в инструкции. Анализ ряда источников, в которых авторы приводят результаты своих исследований, показывают, что оптическая плотность стандарта McFarland 0,5 не превышает 0,13, в то время как для следующего стандарта 1,0 эта величина достигает 0,2 или даже превышает ее (в зависимости от условий исследования). При наличии соответствующего оборудования нефелометрический контроль стандарта McFarland 0,5 не представляет сколь-нибудь существенных сложностей для микробиолога. Технически он прост.

Текущая (повторная) оценка качества стандарта McFarland состоит из уже упомянутых мероприятий: визуальный осмотр, нефелометрический контроль, если необходимо — микробиологическое исследование со взвесью микроба, протестированной по проверяемому стандарту (высев, с учетом числа колоний). Однако, обычно достаточно нефелометрической оценки.

Следует упомянуть несколько известных правил, позволяющих использовать стандарт мутности при приготовлении инокулюма.

1. Микробная взвесь должна быть сделана в стерильной, прозрачной, бесцветной жидкости; изотонический раствор хлорида натрия (физиологический раствор) для этой цели пригоден (хотя стандарт представляет собой взвесь BaCl_2 в деионизированной воде).
2. Микробная взвесь должна быть помещена в пробирки, идентичные тем, в которые разлит стандарт мутности. Недопустимо сравнивать стандарт и тестируемую взвесь в разных по диаметру и другим характеристикам емкостях.
3. Перед использованием содержимое пробирок со взвесью микроба и стандарта тщательно перемешивают.
4. Наиболее простой способ сравнения светопропускания стандарта и испытуемой взвеси осуществляется с помощью карты (рисунка) Викаermana (L. Wickerman). Классическая карта содержит ряд линий разной величины (ширины), черных, на белом фоне. Имеется несколько разновидностей рисунка, что не меняет сути использования устройства.
5. При хорошем освещении стандарт McFarland и пробирку с опытной взвесью помещают перед картой Викаermana и визуально сравнивают — как просматриваются линии на карте через стандартную и опытную взвеси. При совпадении результатов, взвесь микроба признается годной к использованию. Если плотность взвеси микроба больше, чем в стандарте, необходимо дальнейшее разведение с последующим новым контролем. Если плотность биомассы в пробирке с оцениваемой взвесью недостаточна, добавляют культуру до достижения искомой плотности.

Автор позволил себе напомнить эти хорошо известные микробиологам действия, чтобы подчеркнуть необходимость тщательной стандартизации инокулюма. Слишком ненадежны по точности микробиологические манипуляции, чтобы пренебрегать хотя бы

одной стадией, одним шагом при оценке чувствительности микроба к антибиотикам, столь важной для терапии инфекций, порой жизненно опасных для человека.

Особый вопрос — токсичность хлорида бария, его опасность для человека в процессе использования, в обсуждаемом варианте — при лабораторном изготовлении стандарта. Вещество не взрывоопасно, не пожароопасно, но оно признано токсичным. При длительном контакте с хлоридом бария, систематическом вдыхании его пыли, при заглатывании может развиваться патология желудочно-кишечного тракта (тошнота, рвота, коликообразные боли), дыхательных путей и легких (бронхит, трахеит, пневмония), глаз (расстройства зрения) и нек. др. На самом деле микробиолог имеет дело с очень небольшими количествами этого соединения. Одного грамма хлорида бария достаточно для приготовления, по меньшей мере, 50–80 образцов стандарта McFarland. А этого количества хватит более, чем на год даже для крупной микробиологической структуры (фактически, на больший срок). Тем не менее, при приготовлении стандарта в лаборатории нужно соблюдать все требования техники безопасности: надеть респиратор или плотную маску, работать в перчатках, не набирать в пипетку раствор ртом. При попадании раствора на открытую кожу смыть большим количеством воды, при попадании на слизистую глаза — промыть раствором сульфацила натрия. Укупоренный стандарт опасности не представляет.

ЛИТЕРАТУРА

1. Берштейн Е. М., Голубкова Л. С. Некоторые пути стандартизации и унификации биологических методов определения активности антибиотиков. Антибиотики и медицинская биотехнология, 1986, 7, 533–537.
2. Васильева Н. Г., Берштейн Е. М., Фрадкова Т. А. и др. Рост тест-микроорганизмов, используемых при определении активности антибиотиков, на синтетических питательных средах. Антибиотики, 1984, 6, 403–440.
3. Зуева Л. П., Поляк М. С., Колосовская Е. Н. и др. Микробиологический мониторинг и эпидемиологический анализ антибиотикорезистентности микроорганизмов с использованием компьютерной программы WHONET. С.-Пб., 2005, — 72 с.
4. Козлов Р. С., Сивая О. В., Кречикова О. И. и др. Динамика резистентности *Streptococcus pneumoniae* к антибиотикам в России за период 1999–2009 гг. Клини. Микробиол. Антимикроб. Химиотер., 2010, 4, 329–341.
5. Митницкий А. Б., Фрадкова Т. А., Поляк М. С. Математическая модель зонообразования при диффузии полиеновых антибиотиков в зараженный гель. Антибиотики, 1980, 6, 449–453.
6. Митницкий А. Б., Фрадкова Т. А., Поляк М. С. Размер зоны подавления роста тест-культуры при диффузии полиеновых антибиотиков в зараженный гель как функция времени. Антибиотики, 1982, 6, 22–24.
7. Михайлова В. С., Поляк М. С., Суханова С. М. О роли внутрилабораторного контроля качества в стандартизации питательных сред для микробиологических исследований в клинико-диагностических лабораториях. Проблемы стандартизации в здравоохранении, 2009, 5–6, 8–15.
8. Навашин С. М., Фомина И. П. Рациональная антибиотикотерапия. М. Медицина, 1982, — 495 с.
9. Определение чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препаратам. (Методические указания МУК 4.2.1890-04).
10. Поляк М. С. Клиническая значимость и методология определения антибиотиков в биосубстратах. Лекции по фармакотерапии, № 7, 1998, — 22 с.
11. Поляк М. С. Теория и практика определения чувствительности микроорганизмов к противомикробным препаратам диск-диффузионным методом. Клиническая лабораторная диагностика, 2003, 1, 25–32.
12. Поляк М. С. Антибиотикотерапия. Теория и практика. С.-Пб. ИнформМед, 2010, — 424 с.
13. Поляк М. С., Азанчевская С. В., Цветкова И. А. Стандартизация контрольных исследований при определении чувствительности микроорганизмов к антимикробным препаратам диск-диффузионным методом с использованием отечественных питательных сред. Проблемы стандартизации в здравоохранении, 2004, 4, 25–30.
14. Поляк М. С., Сухаревич В. И., Сухаревич М. Э. Питательные среды для медицинской и санитарной микробиологии. С.-Пб., Элби, 2008, — 351 с.

15. Поляк М. С., Цветкова И. А. Некоторые факторы, влияющие на результативность диск-диффузионного метода определения чувствительности микроорганизмов к антибиотикам. Клиническая лабораторная диагностика, 2007, 5, 36–39.
16. Практическое руководство по антиинфекционной химиотерапии. Ред. Л. С. Страчунский, Ю. Б. Белоусов, С. Н. Козлов. М. МАКМАХ, 2002, — 379 с.
17. Рациональная антимикробная фармакотерапия. Ред. В. П. Яковлев, С. В. Яковлев. М. Литтерра, 2003, — 1001 с.
18. Романов А. В., Дехнич А. В. Типирование MRSA: какие методы являются оптимальными для решения различных задач? Клини. Микробиол. Антимикроб. Химиотер., 2011, 2, 168–176.
19. Сидоренко С. В. Методы детекции антибиотикорезистентности и критерии ее оценки. В кн. Клиническая лабораторная диагностика. Ред. В. В. Меньшиков. М. «Агат-Мед», 2003, 138–205.
20. Холодов Л. Е., Яковлев В. П. Клиническая фармакокинетика. М. Медицина, 1985, — 463 с.
21. Яковлев С. В. Линезолид — первый препарат нового класса антимикробных средств оксазолидинонов: перспективы лечения грамположительных инфекций. Инфекции и антимикробная терапия, 2001, 3, 6, 169–174.
22. Яковлев С. В., Яковлев В. П. Цефалоспориновые антибиотики 4 поколения. Цефепим. М. АКХМ, 2005, — 211 с.
23. Ackermann G., Rodloff A. Drugs of the 21st century: telitromycin (HMR 3647) — the first ketolide. J. Antimicrob. Chemother., 2003, 51, 2, 497–511.
24. Alauzet C., Mory F., Teyssier C. et al. Metronidazole Resistance in *Prevotella* spp. and Description of a New nim Gene in *Prevotella baroniae*. Antimicrob. Agents Chemother., 2010, 54, 1, 60–64.
25. Aldridge K., Achcraft D., O'Brien M., Sanders C. Bacteremia Due to *Bacteroides fragilis* Group: Distribution of Species, beta-lactamase Production, and Antimicrobial Susceptibility Patterns. Antimicrob. Agents Chemother., 2003, 47, 1, 148–153.
26. Al Naiemi N., Murk J., Savelkoul P. et al. Extended-spectrum beta-lactamases screening agar with AmpC inhibition. Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. 2009, 28, 989–990.
27. Aloush V., Navon-Venezia S., Seigman-Igra Y. et al. Multidrug-Resistant *Pseudomonas aeruginosa*: Risk Factors and Clinical Impact. Antimicrob. Agents Chemother., 2006, 50, 1, 43–48.
28. Ambler R., Coulson A., Frere J. et al. A standart numbering scheme for the Class A beta-Lactamases. Biochem. J. 1991, 276, 1, 269–272.
29. Andrade S., Picao R., Campana E. et al. Influence of Disk Preparation on Detection of Metallo-beta-Lactamase — Producing Isolates by the Combined Disk Assay. J. Clin. Microbiol., 2007, 45, 6, 2058–2060.
30. Appelbaum P. Resistance among *Streptococcus pneumoniae*. Implications for Drug Selection. Clin. Infect. Dis., 2002, 34, 6, 1613–1620.
31. Arakawa Y., Shibata N., Shibayama K. et al. Convenient Test for Screening Metallo-beta-Lactamase — Producing Gram-Negative Bacteria by Using Thiol Compounds. J. Clin. Microbiol., 2000, 38, 1, 40–43.
32. Askoy D., Unal S. New antimicrobial agents for treatment of Gram-positive bacterial infections. Clin. Microbiol. Infect., 2008, 14, 5, 411–420.

33. *Attal R., Basak S., Mallick S., Bose S.* Metallobetalactamase Producing *Pseudomonas aeruginosa*: An Emerging Threat To Clinicians. *J. Clin. Diagn. Res.*, 2010, 4, 2691–2696.
34. *Baquero F., Coque T., Cruz F.* Ecology and Evolution as Targets: the Need for Novel Eco-Evo Drugs and Strategies To Fight Antibiotics Resistance. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2011, 55, 8, 3649–3660.
35. *Besier S., Smaczny C., Mallinckrodt C. et al.* Prevalence and Clinical Significance of *Staphylococcus aureus*, Small-Colony Variants in Cystic Fibrosis Lung Disease. *J. Clin. Microbiol.*, 2007, 45, 1, 168–172.
36. *Betriu C., Rodriguez-Avial I., Sanchez B. et al.* In Vitro Activities of Tigecycline (GAR-936) against Recently Isolates Clinical Bacteria in Spain. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2002, 46, 3, 892–895.
37. *Black J., Moland E., Thomson K.* AmpC Disk Test for Detection of Plasmid-Mediated AmpC beta-Lactamases in Enterobacteriaceae Lacking Chromosomal AmpC beta-Lactamases. *J. Clin. Microb.*, 2005, 43, 7, 3110–3113.
38. *Bolon M., Wright S., Gold H., Carmeli Y.* The Magnitude of the Association between Fluoroquinolone Use and Quinolone — Resistant *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* May Be Lower than Previously Reported. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2004, 48, 6, 1934–1940.
39. *Bonnet R.* Growing Group of Extended-Spectrum beta-Lactamases: the CTX-M Enzymes. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2004, 48, 1, 1–14.
40. *Boucher H., Corey G.* Epidemiology of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. *Clin. Infect. Dis.* 2008. 46. S.5, 344–349.
41. *Boucher H., Talbot G., Bradley J. et al.* Bad Bugs, No Drugs: No ESKA-PE! An Update from the Infections Diseases Society of America. *Clin. Infect. Dis.* 2009, 48, 1, 1–12.
42. *Bush K., Jacoby G.* Updated Functional Classification of beta-Lactamases. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2010, 54, 3, 969–976.
43. *Cappelletty D., Rybak M.* Comparison of Methodologies for Sinergism Testing of Drug Combination against Resistant Strains of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 1996, 40, 3, 677–683.
44. *Cetinkaya Y., Falk P., Mayhall C.* Vancomycin-Resistant Enterococci. *Clin. Microbiol. Rev.*, 2000, 13, 6, 686–707.
45. *Chamot E., Amari E., Rohner P., Delden C.* Effectiveness of Combination Antimicrobial Therapy for *Pseudomonas aeruginosa* Bacteremia. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2003, 47, 9, 2756–2764.
46. *Chaturvedi V., Ramani R., Andes D. et al.* Multilaboratory Testing of Two-Drug Combinations of Antifungals against *Candida albicans*, *Candida glabrata*, and *Candida parapsilosis*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2011, 55, 4, 1543–1548.
47. *Chiou C.* Does Penicillin Remain the Drug of Choice for Pneumococcal Pneumonia in View of Emerging In Vitro Resistance? *Clin. Infect. Dis.* 2006, 42, 2, 234–237.
48. *Chiou C., Yu V.* Severe pneumococcal pneumonia: new strategies for management. *Cur. Opin. Crit. Care*, 2006, 12, 5, 470–476.
49. CLSI. Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Test. MO2–A10, 2009.
50. CLSI. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. M100–S20, 2010.

51. CLSI. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. M100–S20 U, 2010.
52. Cottagnoud P, Cottagnoud M, Tauber M. Vancomycin Acts Synergistically with Gentamicin against Penicillin-Resistant Pneumococci by Increasing the Intracellular Penetration of Gentamycin. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2003, 47, 1, 144–147.
53. Cunha B. Meticillin-Resistant *Staphylococcus aureus*: clinical Manifestations and Antimicrobial therapy. *Clin. Microbiol. Infect.*, 2005, 11, Suppl. 4, 33–42.
54. Cunha B. Antimicrobial Therapy of Multidrug–Resistant *Streptococcus pneumoniae*, Vancomycin–Resistant Enterococci, and Methicillin–Resistant *Staphylococcus aureus*. *Med. Clin. N. Am.*, 2006, 90, 6, 1165–1182.
55. Dannaoui E., Lortholary O., Dromer F. In Vitro Evaluation of Double and Triple Combinations of Antifungal Drugs against *Aspergillus fumigatus* and *Aspergillus terreus*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2004, 48, 3, 970–978.
56. Deresinski S. Principles of Antibiotic Therapy in Severe Infections: Optimizing the Therapeutic Approach by Use of Laboratory and Clinical Data. *Clin. Infect. Dis.*, 2007, 45, S3, 177–183.
57. Dios P, Carmona I, Posse J. et al. Comparative Efficacies of Amoxicillin, Clindamycin, and Moxifloxacin in Prevention of Bacteremia following Dental Extractions. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2006, 50, 9, 2996–3002.
58. Doi Y, Paterson D. Detection of plasmid-mediated class C beta-lactamases. *Inter. J. Infect. Dis.*, 2007, 11, 3, 191–197.
59. Donlan R. Biofilm Formation: A Clinically Relevant Microbiological Process. *Clin. Microbiol. Rev.*, 2001, 33, 8, 1387–1392.
60. Drawz S., Bonomo R. Three Decades of beta-Lactamase Inhibitors. *Clin. Microbiol. Rev.*, 2010, 23, 1, 160–201.
61. Dreetz M., Hamacher J., Eller J. et al. Serum Bactericidal Activities and Comparative Pharmacokinetics of Meropenem and Imipenem — Cilastatin. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 1996, 40, 1, 105–109.
62. Drieux L., Brossier F, Sougakoff W., Jarlier V. Phenotype detection of extended-spectrum beta-lactamase production in Enterobacteriaceae: review and bench guide. *Clin. Microbiol. Infect.*, 2008, 14, Suppl. 1, 90–103.
63. Drlica K., Malik M., Kerns J., Zhao X. Quinolone–Mediated Bacterial Death. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2008, 52, 2, 385–392.
64. Dvorchik B., Brazier D., De Bruin M., Arbeit R. Daptomycin Pharmacokinetics and Safety following Administration of Escalating Doses Once Daily to Healthy Subjects. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2003, 47, 4, 1318–1323.
65. ECDC/EMA Joint Technical Report. The bacterial challenge: time to react., 2009, — 42 p.
66. Eiff C., Heilman C., Proctor R. et al. A site-directed *Staphylococcus aureus* hem B mutant is a small-colony variant which persists intracellularly. *J. Bacteriol.*, 1997, 179, 15, 4706–4712.
67. EUCAST. Antimicrobial susceptibility testing. EUCAST disk diffusion method. Version 2.0.2012.
68. Falagas M., Bliziotis A. Pandrug-resistant Gram-negative bacteria: the dawn of the post-antibiotic era? *Intern. J. Antimicrob. Agents.* 2007, 29, 7, 630–636.
69. Falagas M., Koletsi P., Kopterides P., Michalopoulos A. Risk Factors for Isolation of Strains Susceptible Only to Polymyxin among Patients with *Pseudomonas aeruginosa* Bacteremia. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2006, 50, 7, 2541–2543.

70. Falcone M., Mezzatesta M., Perilli M. et al. Infections with VIM-1 Metallo-beta-Lactamase-Producing *Enterobacter cloacae* and Their Correlation with Clinical Outcome. *J. Clin. Microbiol.*, 2009, 47, 11, 3514–3519.
71. Flamm R., Weaver M., Thornsberry C. et al. Factors Associated with Relative Rates of Antibiotic Resistance in *Pseudomonas aeruginosa* Isolates Tested in Clinical Laboratories in the United States from 1999 to 2002. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2004, 48, 7, 2431–2436.
72. Flannery E., Wang L., Zollner S. et al. Wounds, Functional Disability, and Indwelling Devices Are Associated With Cocolonization by Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* and Vancomycin-Resistant Enterococci in Southeast Michigan. *Clin. Infect. Dis.*, 2011, 53, 12, 1215–1222.
73. Gabriel P., Zhou J., Tabibi S. et al. Antimicrobial Susceptibility and Synergy Studies of *Stenotrophomonas maltophilia* Isolates from Patients with Cystic Fibrosis. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2004, 48, 1, 168–171.
74. Garou G., Di Guilmi A., Hall B. Structure-Based Phylogeny of the Metallo-beta-Lactamases. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2005, 49, 7, 2778–2784.
75. Giske C., Monnet D., Cars O. et al. Clinical and Economic Impact of Common Multidrug-Resistant Gram-Negative Bacilli. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2008, 52, 3, 813–821.
76. Gold H. Vancomycin-Resistant Enterococci: Mechanisms and Clinical Observations. *Clin. Infect. Dis.*, 2001, 33, 2, 210–219.
77. Goldstein E., Citron D. Resistance Trends in Antimicrobial Susceptibility of Anaerobic Bacteria, Part I. *Clin. Microbiol. Newslet.*, 2011, 33, 1, 1–8.
78. Goldstein E., Citron D. Resistance Trends in Antimicrobial Susceptibility of Anaerobic Bacteria, Part II. *Clin. Microbiol. Newslet.*, 2011, 33, 2, 9–15.
79. Goldstein E., Citron D., Merriam C. et al. Comparative In Vitro Activities of Ertapenem (MK-0826) against 1001 Anaerobes Isolates from Human Intra-Abdominal Infections. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2000, 44, 9, 2389–2394.
80. Goldstein E., Citron D., Merriam C. et al. In Vitro Activities of the New Semi-synthetic Glicopeptide Telavancin (TD-6424), Vancomycin, Daptomycin, Linezolid, and Four Comparator Agents against Anaerobic Gram-Positive Species and *Corynebacterium* spp. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2004, 48, 6, 2149–2152.
81. Goldstein E., Citron D., Merriam C. et al. Comparative In Vitro Susceptibilities of 396 Unusual Anaerobic Strains to Tigecycline and Eight Other Antimicrobial Agents. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2006, 50, 10, 3507–3513.
82. Gould I. Clinical activity of anti-Gram-positive agents against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J. Antimicrob. Chemother.*, 2011, 66, Suppl. 4, 17–21.
83. Guillemot D., Courvalin P. Better Control of Antibiotic Resistance. *Clin. Infect. Dis.*, 2001, 33, Suppl. 4, 542–547.
84. Gulmez Y., Woodford N., Palepou M. et al. Carbapenem-resistant *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumonia* isolates from Turkey with OXA-48-like carbapenemases and outer membrane protein loss. *Inter. J. Antimicrob. Agents.*, 2008, 31, 6, 523–526.
85. Gunderson B., Ibrachim K., Hovde L. et al. Synergistic Activity of Colistin and Ceftazidime against Multiantibiotic-Resistant *Pseudomonas aeruginosa* in an In Vitro Pharmacodynamic Model. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2003, 47, 3, 905–909.

86. Hacek D., Dressel D., Peterson L. Highly Reproducible Bactericidal Activity Test Results by Using a Modified National Committee for Clinical Laboratory Standards Broth Macrodilution Technique. *J. Clin. Microbiol.*, 1999, 37, 6, 1881–1884.
87. Harbarth S., Cosgrove S., Carmeli Y. Effects of Antibiotics on Nosocomial Epidemiology of Vancomycin-Resistant Enterococci. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2002, 46, 6, 1619–1628.
88. Hawser S., Hackel M., Hoban D. Antibiotic susceptibility profiles of European *Bacteroides fragilis* with reduced carbapenem susceptibility. *J. Antimicrob. Chemother.*, 2010, 65, 4, 803–804.
89. Hecht D. Prevalence of Antibiotic Resistance in Anaerobic Bacteria: Worrisome Development. *Clin. Infect. Dis.*, 2004, 39, 1, 92–97.
90. Hecht D. Antimicrobial Susceptibility Testing of Anaerobic Bacteria. In V.Lorian (Ed.) *Antibiotics in Laboratory Medicine*, 2005, Lippincott, P. 144–154.
91. Hecht D., Galang M., Sambol S. et al. In Vitro Activities of 15 Antimicrobial Agents against 110 Toxigenic *Clostridium difficile* Clinical Isolates Collected from 1983 to 2004. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2007, 51, 8, 2716–2719.
92. Hoellman D., Kelly L., Credito K. et al. In Vitro Antianaerobic Activity of Ertapenem (MK-0826) Compared to Seven Other Compounds. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2002, 46, 1, 220–224.
93. Hoiby N. *P. aeruginosa* in Cystic Fibrosis Patients Resist Host Defenses, Antibiotics. *Microbe*, 2006, 1, 12, 571–577.
94. Holmes R., Jorgensen J. Inhibitory Activities of 11 Antimicrobial Agents and Bactericidal Activities of Vancomycin and Daptomycin against Invasive Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Isolates Obtained from 1999 through 2006. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2008, 52, 2, 757–760.
95. Hsueh P., Teng L., Chen W. et al. Increasing Prevalence of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Causing Nosocomial Infections at a University Hospital in Taiwan from 1986 to 2001. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2004, 48, 4, 1361–1364.
96. Huang V., Rybak M. Pharmacodynamics of Cefepime Alone and in Combination with Various Antimicrobial against Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* in an In Vitro Pharmacodynamic Infection Model. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2005, 49, 1, 302–308.
97. Hunter P., Dawson S., French G. et al. Antimicrobial-resistant pathogens in animals and man: prescribing, practices and policies. *J. Antimicrob. Chemother.*, 2010, 65, Suppl. 1, 3–17.
98. Jacobus N., McDermott L., Ruthazer R., Snyderman D. In Vitro Activities of Tigecycline against *Bacteroides fragilis* Group. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2004, 48, 3, 1034–1036.
99. Jacoby G. AmpC beta-Lactamases. *Clin. Microbiol. Rev.*, 2009, 22, 1, 161–182.
100. Jacqueline C., Navas D., Batard E. et al. In Vitro and In Vivo Synergistic Activities of Linezolid Combined with Subinhibitory Concentrations of Imipenem against Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2005, 49, 1, 45–51.
101. Jenkins S., Brown S., Farrell D. Trends in antibacterial resistance among *Streptococcus pneumoniae* isolated in the USA: update from PROTEKT US Years 1–4. *Ann. Clin. Microbiol. Antimicrob.*. 2008, 7, 1, 1–11.

102. Jeong S., Song W., Kim H. et al. Broth Microdilution Method To Detect Extended-Spectrum beta-Lactamases and AmpC beta-Lactamases in Enterobacteriaceae Isolates by Use of Clavulanic Acid and Boronic Acid as Inhibitors. *J. Clin. Microb.*, 2009, 47, 11, 3409–3412.
103. Johnson A., Livermore D., Tillotson G. Antimicrobial susceptibility of Gram-positive bacteria: what's current, what's anticipated? *J. Hosp. Infect.*, 2001, 49, SA, 3–11.
104. Johnson M., MacDougall C., Ostrosky-Zeichner L. Combination Antifungal Therapy. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2004, 48, 3, 693–715.
105. Jones M., Karlowsky J., Blosser-Middleton R. et al. Longitudinal Assessment of Antipneumococcal Susceptibility in the United States. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2002, 46, 8, 2651–2655.
106. Jones R., Sader H., Beach M. Contemporary in vitro spectrum of activity summary for antimicrobial agents tested against 18 569 strains non-fermentative Gram-negative bacilli isolated in the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (1997–2001). *Intern. J. Antimicrob. Agents*, 2003, 22, S1, 551–556.
107. Jorgensen J., Hindler J. New Consensus Guidelines from the Clinical and Laboratory Standards Institute for Antimicrobial Susceptibility Testing of Infrequently Isolated or Fastidious Bacteria. *Clin. Infect. Dis.*, 2007, 44, 2, 280–286.
108. Jousimies-Somer H., Summanen P. Recent Taxonomic Changes and Terminology Update of Clinically Significant Anaerobic Gram-Negative Bacteria (Excluding Spirochetes). *Clin. Infect. Dis.*, 2002, 35, Suppl. 1, 17–21.
109. Kang C., Kim S., Park W. et al. Bloodstream Infections Due to Extended-Spectrum beta-Lactamase-Producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*: Risk Factors for Mortality and Treatment Outcome, with Special Emphasis on Antimicrobial Therapy. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2004, 48, 12, 4574–4581.
110. Kang C., Kim S., Park W. et al. Bloodstream Infections Caused by Antibiotic-Resistant Gram-Negative Bacilli: Risk Factor for Mortality and Impact of Inappropriate Initial Antimicrobial Therapy on Outcome. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2005, 49, 2, 760–766.
111. Karchmer A. Increased Antibiotic Resistance in Respiratory Tract Pathogens: PROTEKT US — An Update. *Clin. Infect. Dis.*, 2004, 39, Suppl. 3, 142–150.
112. Karlowsky G., Walkty A., Adam H. et al. Prevalence of Antimicrobial Resistance among Clinical Isolates of *Bacteroides fragilis* Group in Canada in 2010–2011: CANWARD Surveillance Study. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2012, 56, 3, 1274–1252.
113. Keren I., Shan D., Spoering A. et al. Specialized Persister Cells and the Mechanism of Multidrug Tolerance in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.*, 2004, 186, 24, 8172–8180.
114. Khardori N. Antibiotics — Past, Present, and Future. *Med. Clin. N. Am.*, 2006, 90, 6, 1049–1076.
115. Kim S.-Y., Hong S., Moland E., Thomson K. Convenient Test Using a Combination of Chelating Agents for Detection of Metallo-beta-Lactamases in the Clinical Laboratory. *J. Clin. Microbiol.*, 2007, 45, 9, 2798–2801.
116. King A., Phillips I., Kaniga K. Comparative in vitro activity of telavancin (TD-6424), a rapidly bactericidal, concentration-dependent anti-infective with multiple mechanisms of against Gram-positive bacteria. *J. Antimicrob. Chemother.*, 2004, 53, 5, 797–803.

117. Kipp F, Becker K, Peters G. *et al.* Evaluation of Different Methods to Detect Methicillin-Resistance in Small-Colony Variant of *Staphylococcus aureus*. *J. Clin. Microbiol.* 2004, 42, 3, 1277–1279.
118. Klein R., Edberg S. Applications, Significance of, and Methods for the Measurement of Antimicrobial Concentrations in Human Body Fluids. in V. Lorian (Ed). *Antibiotics in Laboratory Medicine*, 2005, Lippencott, p. 290–364.
119. Kuti J., Nightingale C., Nucolau D. Optimizing Pharmacodynamic Target Attainment Using the MYSTIC Antibiogram: Data Collected in North America in 2002. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2004, 48, 7, 2464–2470.
120. LaPlante K., Rybak M. Impact of High-Inoculum *Staphylococcus aureus* on the Activities of Nafcillin, Vancomycin, Linezolid, and Daptomycin, Alone and in Combination with Gentamicin, in an In Vitro Pharmacodynamic Model. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2004, 48, 12, 4665–4672.
121. Lebreton F., Depardieu F., Bourdon N. *et al.* D-Ala-D-Ser VanN-Type Transferable Vancomycin Resistance in *Enterococcus faecium*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2011, 55, 10, 4606–4612.
122. Lee S., Fung C., Guang J. *et al.* Clinical Correlates of Antifungal Macrodilution Susceptibility Test Results for Non-AIDS Patients with Severe Candida Infections Treated with Fluconazole. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2000, 44, 10, 2715–2718.
123. Lee K., Lim Y., Yong D. *et al.* Evaluation of the Hodge Test and Imipenem-EDTA Double-Disk Synergy Test for Differentiating Metallo-beta-Lactamase-Producing Isolates of *Pseudomonas* spp. and *Acinetobacter* spp. *J. Clin. Microbiol.*, 2003, 41, 10, 4623–4629.
124. Leibovici L., Paul M., Poznanski O. *et al.* Monotherapy versus beta-Lactam-Aminoglycoside Combination Treatment for Gram-Negative Bacteremia: a Prospective, Observational Study. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 1997, 41, 5, 1127–1133.
125. Lewis K. Riddle of Biofilm Resistance. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2001, 45, 4, 999–1007.
126. Lin E., Stanek R., Mufson M. Lack Synergy of Erythromycin Combined with Penicillin or Cefotaxime against *Streptococcus pneumoniae* In Vitro. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2003, 47, 3, 1151–1153.
127. Liu C., Chambers H. *Staphylococcus aureus* with Heterogeneous Resistance to Vancomycin: Epidemiology, Clinical Significance, and Critical Assessment of Diagnostic Methods. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2003, 47, 10, 3040–3045.
128. Livermore D. Fourteen years in resistance. *J. Antimicrob. Agents*, 2012, 30, 4, 283–294.
129. Livermore D., Canton R., Gniadkowski M. *et al.* CTX-M: changing the face of ESBLs in Europe. *J. Antimicrob. Chemother.*, 2007, 59, 2, 165–174.
130. Lodise T., Miller C., Graves J. *et al.* Clinical Prediction Tool to Identify Patients with *Pseudomonas aeruginosa* Respiratory Tract Infections at Greatest Risk for Multidrug Resistance. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2007, 51, 2, 417–422.
131. Löfmark S., Fang H., Hedberg M., Edlund C. Inducible Metronidazole Resistance and *him* Genes in Clinical *Bacteroides fragilis* Group Isolates. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2005, 49, 3, 1253–1256.
132. Mendes R., Woosley L., Farrell D. *et al.* Oritavancin Activity against Vancomycin-Susceptible and Vancomycin-Resistant Enterococci with Molecularly Characterized Glycopeptide Resistance Genes Recovered from Bacteremic Patients, 2009–2010. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2012, 56, 3, 1639–1642.

133. Meyer L., Brink D., Weldhagen G. Antibiotic susceptibility patterns of anaerobic bacteria isolated in Pretoria, South Africa, during 2003–2004. *South. Afr. J. Epidemiol. Infect.*, 2006, 39, 4, 161–163.
134. Micek S. Alternatives to Vancomycin for the Treatment of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Infections. *Clin. Infect. Dis*, 2007, 45, S.3, 184–190.
135. Miller L., Perdreau-Remington F., Bayer A. et al. Clinical and Epidemiologic Characteristic Cannot Distinguish Community-Associated Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Infection from Methicillin-Susceptible *S.aureus* Infection: A Prospective Investigation. *Clin. Infect. Dis*, 2007, 44, 4, 471–482.
136. Moise P., Sakoulas G., Forrest A., Schentag J. Vancomycin In Vitro Bactericidal Activity and Its Relationship to Efficacy in Clearance of Meticillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Bacteremia. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2007, 51, 7, 2582–2586.
137. Moody J. Sinergism Testing: Broth Microdilution Checkerboard and Broth Macrodilution Methods. In H. Isenberg (Ed). *Clinical Microbiology Procedures Handbook*, v.2, 2004, 5.12.1–5.12.21.
138. Mueller M., Pena A., Derendorf H. Issues in Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Anti-Infective Agents: Kill Curves versus MIC. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2004, 48, 2, 369–377.
139. Obritsch M., Fish D., Maclaren R., Jung R. National Surveillance of Antimicrobial Resistance in *Pseudomonas aeruginosa* Isolates Obtained from Intensive Care Unit Patients from 1993 to 2002. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2004, 48, 12, 4606–4610.
140. Osih R., McGregor J., Rich S. et al. Impact of Empiric Antibiotic Therapy on Outcomes in Patients with *Pseudomonas aeruginosa* Bacteremia. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2007, 51, 3, 839–844.
141. Owens R., Banevicius M., Nicolau D. et al. In Vitro Synergistic Activities of Tobramycin and Selected beta-Lactams against 65 Gram-Negative Clinical Isolates. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 1997, 41, 11, 2586–2588.
142. Pai H., Kang C., Byeon J. et al. Epidemiology and Clinical Features of Blood-stream Infection Caused by AmpC-Type-beta-Lactamas-Producing *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2004, 48, 10, 3720–3728.
143. Pasteran F., Mendez T., Guerriero L. et al. Sensitive Screening Tests for Suspected Class A Carbapenemase Production in Species Enterobacteriaceae. *J. Clin. Microb.*, 2009, 47, 6, 1631–1639.
144. Patel S., Saravolatz L. Monotherapy Versus Combination Therapy. *Med. Clin. N. Am.*, 2006, 90, 6, 1183–1195.
145. Pearson R., Steigbigel R., Davis H., Chapman S. Method for Reliable Determination of Minimal Lethal Antibiotic Concentration. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 1980, 18, 5, 699–708.
146. Pelaez T., Alcalá L., Alonso R. et al. Reassessment of *Clostridium difficile* Susceptibility to Metronidazole and Vancomycin. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2002, 46, 6, 1647–1650.
147. Peleg A., Hooper D. Hospital-Acquired Infections Due to Gram-Negative Bacteria. *N. Engl. J. Med.*, 2010, 362, 5, 1804–1813.
148. Pena C., Suarez C., Gozalo M. et al. Prospective Multicenter Study of the Impact of Carbapenem Resistance on Mortality in *Pseudomonas aeruginosa* Blood-stream Infections. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2012, 56, 3, 1265–1272.

149. *Perez F., Hujer A., Hujer K. et al.* Global Challenge of Multidrug-Resistant *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2007, 51, 10, 3471–3484.
150. *Perez-Trallero E., Fuent C., Garcia-Rey C. et al.* Geographical and Ecological Analysis of Resistance, Coresistance, and Coupled Resistance to Antimicrobials in Respiratory Pathogenic Bacteria in Spain. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2005, 49, 5, 1965–1972.
151. *Peric M., Jacobs M., Applbaum P.* Antianaerobic Activity of a Novel Fluoroquinolone, WCK 771, Compared to Those Nine Other Agents. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2004, 48, 8, 3188–3192.
152. *Petersen P., Bradford P., Weiss W. et al.* In Vitro and In Vivo Activities of Tigecycline (GAR-936), Daptomycin, and Comparative Antimicrobial Agents against Glycopeptide-Intermediate *Staphylococcus aureus* and Other Resistant Gram-Positive Pathogens. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2002, 46, 8, 2595–2601.
153. *Peterson L., Shanholtzer C.* Tests for Bactericidal Effects of Antimicrobial Agents: Technical Performance and Clinical Relevance. *Clin. Microbiol. Rev.*, 1992, 5, 4, 420–432.
154. *Philippon A., Arlet G., Jacoby G.* Plasmid-Determined AmpC-Type beta-Lactamases. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2002, 46, 1, 1–11.
155. *Picao R., Andrade S., Nicoletti A. et al.* Metallo-beta-Lactamase Detection: Comparative Evaluation of Double-Disk Synergy versus Combined Disk Test for IMP-, GIM-, SIM-, SPM-, or VIM-Producing Isolates. *J. Clin. Microbiol.*, 2008, 46, 6, 2028–2037.
156. *Pournaras S., Poulou A., Tsakris A.* Inhibitor-based methods for the detection of KPC carbapenemase-producing Enterobacteriaceae in clinical practice by using boronic acid compounds. *J. Antimicrob. Chemother.*, 2010, 65, 7, 1319–1321.
157. *Pumbwe L., Glass D., Wexler H.* Efflux Pump Overexpression in Multi-Antibiotic-Resistant Mutant of *Bacteroides fragilis*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2006, 50, 9, 3150–3153.
158. *Queenan A., Foleno B., Gownley C. et al.* Effect of Inoculum and beta-Lactamase Activity in AmpC- and Extended-Spectrum beta-Lactamase (ESBL)-Producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* Clinical Isolates Tested by Using NCCLS ESBL Methodology. *J. Clin. Microb.*, 2004, 42, 1, 269–275.
159. *Rahal J.* Novel Antibiotic Combinations against Infections with Almost Completely Resistant *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter* Species. *Clin. Infect. Dis.*, 2006, 43, S1, 95–99.
160. *Rahal J.* Antimicrobial Resistance among and Therapeutic Options against Gram Negative Pathogens. *Clin. Infect. Dis.*, 2009, 49, Suppl.1, 4–10.
161. *Richardson D., Bast D., McGeer A., Low D.* Evaluation of Susceptibility Testing To Detect Fluoroquinolone Resistance Mechanisms in *Streptococcus pneumoniae*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2006, 45, 6, 1911–1914.
162. *Richter S., Heilmann K., Dohrn C. et al.* Activity of Ceftaroline and Epidemiologic Trends in *Staphylococcus aureus* Isolates Collected from 43 Medical Centres in the United States on 2009. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2011, 55, 9, 4154–4160.
163. *Roberts S., Shore K., Paviour S. et al.* Antimicrobial susceptibility of anaerobic bacteria in New Zealand: 1999–2003. *J. Antimicrob. Chemother.*, 2006, 57, 5, 992–998.
164. *Roe-Carpenter D.* Agar Dilution MIC Test for Anaerobic Bacteria. In H. Isenberg (Ed.). *Clinical Microbiology Procedures Handbook*. ASM Press, 2004, 2, 5.9.1–12.

165. Rossolini G., Luzzaro F., Migliavacca R. et al. First Countrywide Survey of Acquired Metallo-beta-Lactamases in Gram-Negative Pathogens in Italy. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2008, 52, 11, 4023–4029.
166. Ruhe J., Smith N., Bradsher R., Menon A. Community-Onset Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Skin and Soft-Tissue Infections: Impact of Antimicrobial Therapy on Outcome. *Clin. Infect. Dis.*, 2007, 44, 6, 777–784.
167. Ruppe E., Bidet P., Verdet C. et al. First Detection of the Ambler Class C1 AmpC beta-Lactamases in *Citrobacter freundii* by a New Simple Double-Disk Synergy Test. *J. Clin. Microb.*, 2006, 44, 11, 4204–4207.
168. Rybac M., Hershberger E., Moldovan T., Grucz R. In Vitro Activities of Daptomycin, Vancomycin, Linezolid, and Quinupristin-Dalfopristin against Staphylococci and Enterococci, Including Vancomycin-Intermediate and — Resistant Strains. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2000, 44, 4, 1062–1066.
169. Saginur R., Denis M., Ferris W. et al. Multiple Combination Bactericidal Testing of *Staphylococcus* Biofilms from Implant-Associated Infections. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2006, 50, 1, 55–61.
170. Scheetz M., Qi C., Warren J. et al. In Vitro Activities of Various Antimicrobial Alone and a Combination with Tigecycline against Carbapenem-Intermediate or-Resistant *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2007, 51, 5, 1621–1626.
171. Schlossberg D. Clinical Approach to Antibiotic Failure. *Med. Clin. N. Am.*, 1996, 90, 6, 1265–1277.
172. Schwaber M., Novon-Venezia S., Schwartz D., Carmeli Y. High Levels of Antimicrobial Coresistance among Extended-Spectrum-beta-Lactamase Producing Enterobacteriaceae. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2005, 49, 5, 2137–2139.
173. Shanholtzer C., Peterson L., Mohn M. et al. MBCs for *Staphylococcus aureus* as Determined by Macrodilution and Microdilution Techniques. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 1984, 26, 2, 214–219.
174. Sivapalasingam S., Nelson J., Joyce K. et al. High Prevalence of Antimicrobial Resistance among *Shigella* Isolates in the United States Tested by the National Antimicrobial Resistance Monitoring System from 1999 to 2002. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2006, 50, 1, 49–54.
175. Slevert D., Rudrik J., Patel J. et al. Vancomycin-Resistant *Staphylococcus aureus* in the United States. *Clin. Infect. Dis.*, 2008, 46, 5, 668–674.
176. Smith P., Romesberg F. Combating bacteria and drug resistance by inhibiting mechanisms of persistence and adaptation. *Nature Chem. Biol.*, 2007, 3, 9, 549–556.
177. Snyderman D., Jacobus N., McDermott L. et al. In Vitro Activities of Newer Quinolones against Bacteroides Group Organisms. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2002, 46, 10, 3276–3279.
178. Snyderman D., Jacobus N., McDermott L. et al. National Survey on the Susceptibility of *Bacteroides fragilis* Group: Report and Analysis of Trends in the United States from 1997 to 2004. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2007, 51, 5, 1649–1655.
179. Song J., Hiramatsu K., Suh J. et al. Emergence in Asian Countries of *Staphylococcus aureus* with Reduced Susceptibility to Vancomycin. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2004, 48, 12, 4926–4928.
180. Soriano A., Marco F., Martinez J. et al. Influence of Vancomycin Minimum Inhibitory Concentration on the Treatment Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Bacteremia. *Clin. Infect. Dis.*, 2008, 46, 2, 193–200.

181. Spellberg B., Guidos R., Gilbert D. et al. The Epidemic of Antibiotic-Resistant Infections: A Call to Action for the Medical Community from the Infections Diseases Society of America. *Clin. Infect. Dis.*, 2008, 46, 2, 155–164.
182. Srinivasan A., Dick J., Perl T. Vancomycin Resistance in Staphylococci. *Clin. Microbiol. Rev.*, 2002, 15, 3, 430–438.
183. Steed M., Vidaillac C., Rose W. et al. Characterizing Vancomycin-Resistant *Enterococcus* Strains with Various Mechanisms of Daptomycin Resistance Developed in a In Vitro Pharmacokinetic / Pharmacodynamic Model. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2011, 55, 10, 4748–4754.
184. Stratton C. In Vitro Susceptibility Testing Versus In Vivo Effectiveness. *Med. Clin. N. Am.*, 2006, 90, 6, 1077–1088.
185. Stryjewski M., Chu V., O’Riordan W. et al. Telavancin versus Standard Therapy for Treatment of Complicated Skin and Skin Structure Infection Caused by Gram-Positive Bacteria: FAST 2 Study. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2006, 50, 3, 862–867.
186. Szumowski J., Cohen D., Kanaya F., Mayer K. Treatment and Outcomes of Infections by Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* at an Ambulatory Clinic. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2007, 51, 2, 423–428.
187. Talbot G. The Antibiotic Development Pipeline for Multidrug-Resistant Gram-Negative Bacilli: Current and Future Landscapes. *Infect. Contr. Hosp. Epidemiol.*, 2010, 31, Suppl. 1, 55–58.
188. Tam V., Schilling A., Lewis R. et al. Novel Approach to Characterization of Combined Pharmacodynamic Effect of Antimicrobial Agents. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2004, 48, 11, 4315–4321.
189. Tan J., Pituot J., Gutman D. New and Sensitive Assay for Determining *Pseudomonas aeruginosa* Metallo-beta-Lactamase Resistance to Imipenem. *J. Clin. Microbiol.*, 2008, 46, 5, 1870–1872.
190. Taylor P., Schoenkecht F., Sherris J., Linner E. Determination of Minimum Bactericidal Concentrations of Oxacillin for *Staphylococcus aureus*: Influence and Significance of Technical Factors. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 1983, 23, 1, 142–150.
191. Te Dorsthorst D., Verweij P., Meis J. et al. In Vitro Interactions between Amphotericin B, Itraconazole, and Flucytosine against 21 Clinical *Aspergillus* Isolates Determined by Two Drug Interaction Model. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2004, 48, 6, 2007–2013.
192. Thomson K. Extended-Spectrum-beta-Lactamase, AmpC, and Carbapenemase Issue. *J. Clin. Microb.*, 2010, 48, 4, 1019–1025.
193. Thomson K., Sanders C. Detection of Extended-Spectrum beta-Lactamases in Members of the Family Enterobacteriaceae: Comparison of the Double-Disk and Three-Dimensional Tests. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 1992, 36, 9, 1877–1882.
194. Tsakris A., Kristo I., Poulou A. et al. Evaluation of Boronic Acid Disk Test for Differentiating KPC-Possessing *Klebsiella pneumoniae* Isolates in Clinical Laboratory. *J. Clin. Microb.*, 2009, 47, 2, 362–367.
195. Tsuji B., Eiff C., Kelchlin P. et al. Attenuated Vancomycin Bactericidal Activity against *Staphylococcus aureus* hem B Mutant Expressing the Small-Colony-Variant Phenotype. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2008, 52, 4, 1533–1537.
196. Veloo A., Welling G., Degener J. Antimicrobial Susceptibility of Clinically Relevant Gram-Positive Anaerobic Cocci Collected over a Three-Year Period in the Netherlands. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2011, 55, 3, 1199–1203.

197. *Waites K., Duffy L., Dowzicky M.* Antimicrobial Susceptibility among Pathogens Collected from Hospitalized Patients in the United States and In Vitro Activity of Tigecycline, a New Glycylcycline Antimicrobial. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2006, 50, 10, 3479–3484.
198. *Walsh T., Toleman M., Poirel L., Nordmann P.* Metallo-beta-Lactamases: the Quiet before the Storm? *Clin. Microbiol. Rev.*, 2005, 18, 2, 306–325.
199. *Weldhagen G., Poirel L., Nordmann P.* Ambler Class A Extended-Spectrum beta-Lactamases in *Pseudomonas aeruginosa*: Novel Developments and Clinical Impact. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2003, 47, 8, 2385–2392.
200. *Wexler B.* Susceptibility Testing of Anaerobic Bacteria: Myth, Magic, or Method. *Clin. Microbiol. Rev.*, 1991, 4, 4, 470–484.
201. *Wexler H., Engel A., Glass D., Li C.* In Vitro Activities of Doripenem and Comparator Agents against 364 anaerobic Clinical Isolates. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2005, 49, 10, 4413–4417.
202. *Wiuiff C., Andersson D.* Antibiotic treatment in vitro of phenotypically tolerant bacterial populations. *J. Antimicrob. Chemother.*, 2007, 59, 2, 254–263.
203. *Zelenitsky S., Ariano R., Harding G., Silverman R.* Antibiotic Pharmacodynamics in Surgical Prophylaxis: an Association between Intraoperative Antibiotic Concentrations and Efficacy. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2002, 46, 9, 3026–3030.
204. *Zhou J., Chen Y., Tabibi S. et al.* Antimicrobial Susceptibility and Synergy Studies of *Burkholderia cepacia* Complex Isolates from Patients with Cystic Fibrosis. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2007, 51, 3, 1085–1088.

ОГЛАВЛЕНИЕ

ПРЕДИСЛОВИЕ	3
ГЛАВА 1.	
Проблемы антибиотикотерапии: почему роль микробиологической службы должна расти (вместо введения)	7
ГЛАВА 2.	
Клиническая значимость и определение минимальной бактерицидной концентрации (летального действия) антибиотиков	23
ГЛАВА 3.	
Бета-лактамазы: их определение как фактор повышения эффективности антибиотикотерапии	51
ГЛАВА 4.	
Тестирование чувствительности микроорганизмов к сочетанному действию антибиотиков и его значение для клиники	105
ГЛАВА 5.	
Определение чувствительности к антибиотикам облигатно анаэробных бактерий	135
ГЛАВА 6.	
Определение антимикробных препаратов в биосубстратах	167
ГЛАВА 7.	
Диск-диффузионный метод изучения чувствительности бактерий к антибиотикам: комментарии и дополнения	203
ГЛАВА 8.	
Стандарт сравнения (мутности). Приготовление в лабораторных условиях	233
ЛИТЕРАТУРА	242

Марк Соломонович Поляк
ЛАБОРАТОРНОЕ ОБЕСПЕЧЕНИЕ
АНТИБИОТИКОТЕРАПИИ

Научный редактор: Сухаревич В. И.

Верстка: Быкова Катерина

Подписано в печать 05.10.2012.
Гарнитура Таймс. Печать офсетная.
Формат 60×90¹/₁₆. Объем 16 печ. л.
Тираж 1000 экз. Заказ № 90.

ISBN 978-5-7452-0047-2



Издательство «Анатолия».
199178, г. Санкт-Петербург, В. О. 14-я линия, д. 39.
Тел./факс: +7 (812) 328-47-43.
www.anatolya.ru

Напечатано в типографии ООО «Анатолия».