

Методы изучения антимикробной активности антибиотиков и антисептиков *in vitro*

Адамович Т. Г., Гаврилова И. А., Кирильчик Е. Ю.

Введение

В настоящее время в клинической практике существуют два подхода к назначению антибиотиков – эмпирический и рациональный. Несомненным преимуществом эмпирического назначения химиопрепаратов является возможность раннего старта антибиотикотерапии без выделения возбудителя инфекционного заболевания, что значительно сокращает временные и экономические затраты.

Однако при неэффективности антибактериальной терапии необходима микробиологическая верификация клинического диагноза с последующим рациональным выбором этиотропного лечения. Рациональное назначение антибиотиков предполагает не только выделение возбудителя инфекции из клинического материала, но и определение его чувствительности к антибиотикам. Получение корректных данных возможно только при грамотном выполнении всех звеньев бактериологического исследования: от взятия клинического материала, транспортировки его в бактериологическую лабораторию, идентификации возбудителя до определения его чувствительности к антибиотикам и интерпретации полученных результатов. Вторая причина, обуславливающая необходимость определения чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препаратам - это получение эпидемиологических данных о структуре резистентности возбудителей внебольничных и нозокомиальных инфекций.

Классификация методов определения чувствительности к антибиотикам

1. диффузионные методы

- дискдиффузионный метод
- метод E-тестов (градиентный метод)
- Другие диффузионные методы
- ✓Метод диффузии из лунок в агаре
- ✓Метод диффузии из агаровых блоков
- ✓Метод перпендикулярных штрихов

2. методы разведений

- метод разведения в жидкой питательной среде (бульоне)
- метод разведения в агаре
- микрометод разведения в жидкой питательной среде

3. Тонкослойная хроматография (ТСХ)-биоавтография

- Диффузия в агар
- Прямая биоавтография

4. Кривая зависимости «время — летальное действие» (time-kill assay).

5. Анализ биолюминесценции АТФ

6. Метод проточной цитофлуориметрии

Основные этапы проведения тестирования

Оценка антибиотикочувствительности, независимо от конкретного метода, предполагает последовательное выполнение нескольких этапов:

- приготовление питательных сред;
- приготовление суспензии исследуемых микроорганизмов (инокулюма);
- инокуляция;
- инкубация;
- учет и интерпретация результатов, формулировка рекомендаций по лечению.

Диффузионные методы включают также этап наложения дисков или полосок E-теста на плотную питательную среду.

Диффузионные методы

При определении чувствительности **диско-диффузионным методом** на поверхность агара в чашке Петри наносят бактериальную суспензию определенной плотности (обычно эквивалентную стандарту мутности 0,5 по McFarland) и затем помещают диски, импрегнированные антибиотиком в стандартной концентрации. Диффузия антибиотика в агар приводит к формированию зоны подавления роста микроорганизмов вокруг дисков. После инкубации чашек (18-20 час, t 35°-37°С) учитывают результат путем измерения диаметра зоны вокруг диска в миллиметрах.



Определение чувствительности микроорганизма с помощью **E-теста** проводится аналогично тестированию диско-диффузионным методом. Отличие состоит в том, что вместо диска с антибиотиком используют полоску E-теста, содержащую градиент концентраций антибиотика от максимальной к минимальной. В месте пересечения эллипсовидной зоны подавления роста с полоской E-теста получают значение минимальной подавляющей концентрации (МПК).

Несомненным достоинством диффузионных методов является простота тестирования и доступность выполнения в любой бактериологической лаборатории. Однако с учетом высокой стоимости E-тестов для рутинной работы обычно используют диско-диффузионный метод.

Другие методы диффузии

Другие методы диффузии используются для оценки противомикробной активности различных веществ или для исследования антагонизма между микроорганизмами.

Метод диффузии из лунок агара широко используется для оценки антимикробной активности растительных компонентов или экстрактов. Различие с диско-диффузионным методом состоит в том, что в питательной среде после инокуляции микробной взвеси в асептических условиях делают отверстия диаметром от 6 до 8 мм с помощью стерильного сверла или наконечника. Затем в лунки вносят по 20–100 мкл исследуемого противомикробного вещества и контроля. Противомикробный агент диффундирует в питательную среду и подавляет рост микробного штамма.

Метод диффузии из агаровых блоков часто используется для определения антагонизма между микроорганизмами, и процедура аналогична тому, что используется в диско-диффузионном методе.

Данный метод удобен тем, что выращивание штаммов-антагонистов и тест-культур производится на разных питательных средах. Исследуемый на антагонистическую активность микроорганизм засевают на поверхность агаризованной среды в чашке Петри таким образом, чтобы в процессе его роста сформировался «сплошной газон». После того, как клетки микроорганизма хорошо вырастут, стерильным сверлом вырезают агаровые блоки, которые переносят на предварительно засеянную тест-культурой поверхность среды в другой чашке Петри. Тест-культура засеивается шпательем, а агаровые блоки накладывают ростом вверх на равном расстоянии один от другого и от краев чашки, плотно прижимая к агаровой пластинке. Чашки инкубируют в термостате при температуре, оптимальной для роста тест-культуры. В случае чувствительности последних к антибактериальному веществу продуцента вокруг агаровых блоков образуются зоны отсутствия роста. Чем больше выделяется антибактериального вещества, чем оно активнее и лучше диффундирует в среде, тем больше диаметр зоны задержки роста тест-культуры. Нечувствительные к антибиотическому веществу данного продуцента клетки растут на всей поверхности среды.

Метод перпендикулярных штрихов используется для быстрого скрининга на микробный антагонизм.

При использовании метода перпендикулярных штрихов на поверхность агаризованной среды в чашке Петри засеивают штрихом исследуемый микроб-антагонист, продуцирующий антибактериальное вещество. Посев делают по диаметру чашки, которую затем помещают в термостат при температуре, оптимальной для роста. Продолжительность культивирования определяется скоростью роста антагониста. После завершения роста и диффузии продуцируемого вещества в агаризованную среду, перпендикулярно к выросшему штриху, подсеивают штрихами тест-культуры, начиная от краев чашки. Чашки помещают в термостат на 48 часов. Если изучаемый микроорганизм-антагонист образует вещество, оказывающее антимикробное действие в отношении тест-культур, то рост последних будет начинаться на некотором расстоянии от роста самого антагониста. Чем больше это расстояние, тем более чувствительна тест-культура к продуцируемому антибиотическому веществу. Нечувствительные микроорганизмы будут развиваться в непосредственной близости от штриха.



Методы разведения

Методы разведения основаны на использовании двойных последовательных разведений концентраций антибиотика от максимальной к минимальной (например от 128 мкг/мл, 64 мкг/мл, и т.д. до 0,5 мкг/мл, 0,25 мкг/мл и 0,125 мкг/мл). При этом антибиотик в различных концентрациях вносят в жидкую питательную среду (бульон) или в агар. Затем бактериальную суспензию определенной плотности, соответствующую стандарту мутности 0,5 по McFarland, помещают в бульон с антибиотиком или на поверхность агара в чашке. После инкубации в течение ночи при температуре 35°-37°С проводят учет полученных результатов. Наличие роста микроорганизма в бульоне (помутнение бульона) или на поверхности агара свидетельствует о том, что данная концентрация антибиотика недостаточна, чтобы подавить его жизнеспособность. По мере увеличения концентрации антибиотика рост микроорганизма ухудшается. Первую наименьшую концентрацию антибиотика (из серии последовательных разведений), где визуально не определяется бактериальный рост принято считать минимальной подавляющей концентрацией (МПК). Измеряется МПК в мг/л или мкг/мл.

Микрометод

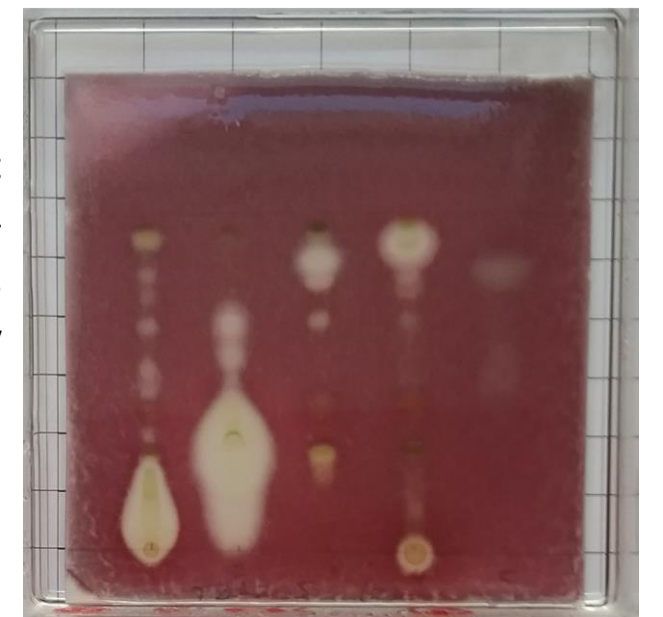
Преимуществами микрометода является высокая производительность и возможность длительного хранения заранее приготовленных планшет. Тестирование проводят при величине конечного объема 0,2 мл и меньше, что позволяет значительно сократить количество расходных материалов. Методика не имеет отличий от макрометода, за исключением используемых объемов питательного бульона с разведениями антибиотиков и инокулюма, но требует дополнительного оснащения лаборатории.

В качестве индикатора роста бактерий чаще всего используют соли тетразолия или аламаровый синий (ресазурин). Они являются индикаторами окислительно-восстановительного потенциала, который используется для оценки метаболической функции клеток. Учет изменения цвета проводят на спектрофотометре.



Тонкослойная хроматография (ТСХ) - биоавтография.

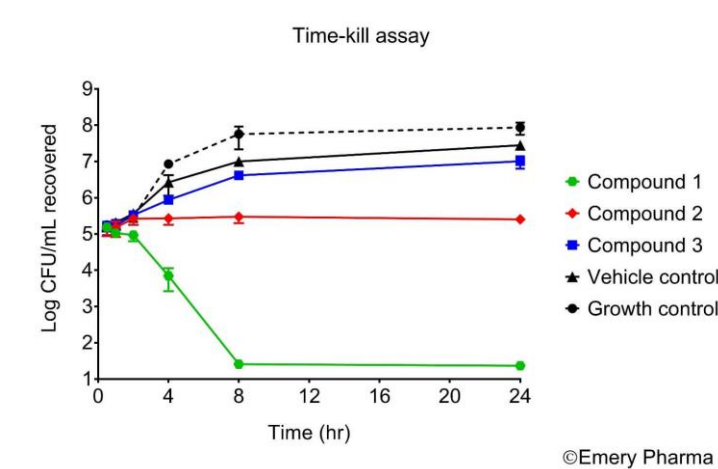
Наиболее часто данный метод применяется для изучения антимикробной активности растительных экстрактов. Во время исследования исследуемое вещество разделяется по пластине с помощью ТСХ. Затем смесь расплавленного агара и тест-микроорганизма выливают на поверхность пластинки и инкубируют в подходящих для микроорганизма условиях. Для учета пластинку обрабатывают раствором йоднитротетразолия хлорида, который окрашивает в розовый цвет зоны с ростом бактерий и становится бесцветным в зоне ингибирования роста бактерий.



Time-kill assay

Кривая зависимости «время — летальное действие» (time-kill assay) проводится для оценки сокращения *in vitro* микробной популяции тестируемых организмов после воздействия исследуемого противомикробного агента.

Испытуемый образец или его разведение приводят в контакт с известной популяцией микроорганизмов в течение определенного периода времени при определенной температуре. Затем испытуемый образец нейтрализуется в заданное время отбора проб и подсчитывают выжившие организмы. Рассчитывают процент и / или log10 снижения либо от исходной микробной популяции, либо от отрицательного контроля.



Закключение

Изучение принципов оценки чувствительности микроорганизмов к антимикробным препаратам является необходимым знанием для врачей лабораторной диагностики, клинических микробиологов, эпидемиологов, фармацевтов и других специалистов. Унификация и стандартизация подходов к изучению позволит повысить воспроизводимость методов.

Представления о современных методах изучения антимикробной активности антибиотиков и антисептиков *in vitro* позволит повысить компетентность специалистов.