

Занятие семинарского типа № 4

ТЕМА ЗАНЯТИЯ: Антибиотикорезистентность

УЧЕБНЫЙ МАТЕРИАЛ

1. Понятие об антибиотикорезистентности

Антибиотикорезистентность – феномен устойчивости штамма возбудителей инфекции к воздействию одного или нескольких антибактериальных препаратов, снижение чувствительности (устойчивость, невосприимчивость) культуры микроорганизмов к действию антибактериального вещества.

Устойчивость (или резистентность) к антибиотикам может развиваться в результате естественного отбора посредством случайных мутаций и/или благодаря воздействию антибиотика.

Микроорганизмы способны переносить генетическую информацию устойчивости к антибиотикам путем горизонтального переноса генов. Кроме того, антибиотикорезистентность микроорганизмов может быть получена искусственно с использованием метода генетической трансформации, например, путем внесения искусственных генов в геном микроорганизма.

Развитие и распространение устойчивости к ванкомицину форм золотистого стафилококка и опасность, которую она представляет для пациентов лечебных учреждений («госпитальные штаммы») является прямым результатом эволюции за счет естественного отбора. Еще одним примером служат развитие штаммов шигеллы, устойчивых к антибиотикам из группы сульфаниламидных препаратов.

Механизмы формирования антибиотикорезистентности:

Госпитальный штамм – это культура патогенных микроорганизмов, получившая в результате мутаций или переноса генов (плазмид) несвойственные «дикому» штамму характерные черты, позволяющие выживать в условиях стационара.

К основным характеристикам приспособления относятся:

- ✓ устойчивость к одному или нескольким антибиотикам широкого спектра действия;
- ✓ устойчивость к условиям внешней среды;
- ✓ снижение чувствительности к антисептикам.

Госпитальные штаммы очень разнообразны – в каждой больнице или отделении возможно появление своего характерного штамма со свойственным только ему набором биологических свойств.

Механизмы резистентности:

- ✓ у микроорганизма может отсутствовать структура, на которую воздействует антибиотик (например, бактерии рода микоплазма (*Mycoplasma*) нечувствительны к пенициллину, т.к. у них отсутствуют клеточные стенки);
- ✓ микроорганизм непроницаем для антибиотика (большинство грамотрицательных бактерий невосприимчивы к пенициллину G, поскольку клеточная стенка защищена дополнительной мембраной);
- ✓ микроорганизм в состоянии переводить антибиотик в неактивную форму (многие стафилококки (*Staphylococcus*) содержат фермент β-лактамазу, который разрушает β-лактамовое кольцо большинства пенициллинов).

В результате генных мутаций, обмен веществ микроорганизма может быть изменен так, что блокируемые антибиотиком биохимические реакции больше не являются критичными для его жизнедеятельности.

1.1. Виды антибиотикорезистентности

Известно, что устойчивость к антибиотикам существовала всегда. До сих пор не был получен антибиотик, эффективный в отношении всех патогенных бактерий.

Резистентность микроорганизмов к антибиотикам может быть истинной и приобретенной.

Истинная (природная) устойчивость характеризуется отсутствием у микроорганизмов мишени действия антибиотика или недоступностью мишени вследствие первично низкой проницаемости или ферментативной инактивации. При наличии у бактерий природной устойчивости антибиотики являются клинически неэффективными.

Под приобретенной устойчивостью понимают свойство отдельных штаммов бактерий сохранять жизнеспособность при тех концентрациях антибиотиков, которые подавляют основную часть микробной популяции. Появление у бактерий приобретенной резистентности не обязательно сопровождается снижением клинической эффективности антибиотика.

Формирование резистентности во всех случаях обусловлено генетически — приобретением новой генетической информации или изменением уровня экспрессии собственных генов.

Известны следующие биохимические механизмы устойчивости бактерий к антибиотикам:

- ✓ модификация мишени действия;
- ✓ инактивация антибиотика, активное выведение антибиотика из микробной клетки (эффлюкс);
- ✓ нарушение проницаемости внешних структур микробной клетки;
- ✓ формирование метаболического шунта.

1.2. Причины развития устойчивости микроорганизмов к антибиотикам

Причины развития устойчивости микроорганизмов к антибиотикам многообразны, среди них существенное место занимают нерациональность, а порой и ошибочность применения лекарственных препаратов.

1. Необоснованное назначение антибактериальных средств. Показанием для назначения антибактериального препарата является документированная или предполагаемая бактериальная инфекция. Наиболее распространенная ошибка в амбулаторной практике, наблюдаемая в 30–70% случаев, – назначение антибактериальных препаратов при вирусных инфекциях.

2. Ошибки в выборе антибактериального препарата. Антибиотик должен выбираться с учетом следующих основных критериев:

- спектр антимикробной активности лекарственного препарата *in vitro*;
- региональный уровень резистентности возбудителей к антибиотику;
- доказанная эффективность в контролируемых клинических исследованиях.

3. Ошибки в выборе режима дозирования антибактериального препарата. Ошибки в выборе оптимальной дозы антибактериального средства могут заключаться как в недостаточной, так и в избыточной дозе назначенного лекарственного препарата, а также в неправильном выборе интервалов между введениями. В случае, если доза антибиотика недостаточна и не создает в крови и тканях дыхательных путей концентрации, превышающие минимально подавляющие концентрации основных возбудителей инфекции, что является условием эрадикации (уничтожения) соответствующего возбудителя, то это становится не только одной из причин неэффективности терапии, но и создает реальные предпосылки для формирования резистентности микроорганизмов.

Неправильный выбор интервалов между введениями антибактериальных препаратов обычно обусловлен не столько сложностями парентерального введения лекарственных препаратов в амбулаторных условиях или негативным настроением больных, сколько неосведомленностью практических врачей о некоторых фармакодинамических и фармакокинетических особенностях лекарственных препаратов антибиотиков, которые должны определять режим их дозирования.

4. Ошибки комбинированного назначения антибиотиков. Одной из ошибок антибактериальной терапии внебольничных респираторных инфекций является необоснованное назначение комбинации антибиотиков. В современных условиях при наличии широкого арсенала высокоэффективных антибактериальных препаратов широкого спектра действия показания к комбинированной антибактериальной терапии значительно сужены и приоритет в лечении многих инфекций остается за монотерапией.

5. Ошибки, связанные с длительностью антибактериальной терапии. В настоящее время в некоторых случаях проводится необоснованно длительная антибактериальная терапия у детей. Такая ошибочная тактика лечения, прежде всего, обусловлена недостаточным пониманием цели проводимой антибактериальной терапии, которая, в первую очередь, сводится к эрадикации возбудителя или подавлению его дальнейшего роста, т.е. направлена на подавление микробной агрессии.

Кроме перечисленных ошибок назначения антибактериальных препаратов, развитию антибиотикорезистентности способствует социальная проблема неадекватного доступа к лекарственным препаратам, что обуславливает появление на рынке некачественных, но экономически доступных лекарственных препаратов антибиотиков, быстрое развитие к ним резистентности и, как следствие, пролонгирование времени заболевания.

В целом развитие антибиотикорезистентности микроорганизмов связано с выработанными в ходе эволюции биохимическими механизмами. Различают следующие пути реализации антибиотикорезистентности у бактерий:

- ✓ модификация мишени действия антибиотика;
- ✓ инактивация самого антибиотика;
- ✓ уменьшение проницаемости внешних структур бактериальных клеток;
- ✓ формирование новых метаболических путей и активное выведение антибиотика из бактериальной клетки.

Различным бактериям свойственны свои механизмы развития резистентности.

Устойчивость бактерий к β -лактамным антибиотикам развивается при:

- ✓ изменении нормальных пенициллинсвязывающих белков (ПСБ);
- ✓ обретении способности вырабатывать дополнительные ПСБ с низким сродством к β -лактамным антибиотикам;
- ✓ чрезмерной выработке нормальных ПСБ (ПСБ-4 и ПСБ-5) с более низким сродством к β -лактамным антибиотикам, чем у ПСБ-1, ПСБ-2, ПСБ-3.

У грамположительных микроорганизмов цитоплазматическая мембрана относительно порозна и непосредственно прилежит к пептидогликанному матриксу, в связи с этим цефалоспорины достаточно легко достигают ПСБ. В противоположность этому наружная мембрана грамотрицательных микроорганизмов имеет более сложную конструкцию: состоит из липидов, полисахаридов и белков, что является препятствием для проникновения цефалоспоринов в периплазматическое пространство микробной клетки.

Снижение сродства ПСБ к β -лактамным антибиотикам рассматривают как ведущий механизм формирования резистентности *Neisseria gonorrhoea* и *Streptococcus pneumoniae* к пенициллину. Метициллинрезистентные штаммы *Staphylococcus aureus* (MRSA) продуцируют ПСБ-2 (ПСБ-2a), которые характеризуются значительным снижением аффинности к пенициллиназорези-

стентным пенициллинам и цефалоспорином. Способность этих «новых» ПСБ-2а к замещению эссенциальных ПСБ (с более высоким сродством к β -лактамным антибиотикам) в конечном итоге приводит к формированию устойчивости MRSA ко всем цефалоспорином.

Безусловно, объективно наиболее клинически значимым механизмом развития устойчивости грамотрицательных бактерий к цефалоспорином является продукция β -лактамаз.

β -Лактамазы широко распространены среди грамотрицательных микроорганизмов, а также продуцируются рядом грамположительных бактерий (стафилококки). В настоящее время известно более 200 видов данных ферментов. В последнее время до 90% резистентных штаммов бактерий, выделенных в клинике, способны к выработке β -лактамаз, что и определяет их резистентность.

Сравнительно недавно были открыты и β -лактамазы расширенного спектра действия, кодируемые плазмидами (extended-spectrum β -lactamases – ESBL). ESBL происходят из TEM-1, TEM-2 или SHV-1 вследствие точечной мутации в активном центре ферментов и продуцируются преимущественно *Klebsiella pneumoniae*. Продукция ESBL ассоциируется с высоким уровнем резистентности к азтреонаму и цефалоспорином III поколения – цефтазидиму и др.

Продукция β -лактамаз находится под контролем хромосомных или плазмидных генов, и их выработка может быть индуцирована антибиотиками или опосредована конституциональными факторами в росте и распределении бактериальной резистентности, с которыми плазмиды переносят генетический материал. Гены, кодирующие резистентность к антибиотикам, возникают в результате мутаций или попадают извне внутрь микробных клеток. Так, при конъюгации устойчивой и чувствительной бактерий гены резистентности могут передаваться с помощью плазмид. Плазмиды представляют собой небольшие генетические элементы в виде заключенных в кольцо нитей ДНК, способные переносить от одного до нескольких генов резистентности не только среди бактерий одного вида, но и среди микроорганизмов разных видов.

Помимо плазмид, гены резистентности могут попадать внутрь бактерий с помощью бактериофагов или захватываться микроорганизмами из окружающей среды. В последнем случае носителями генов резистентности являются свободные ДНК погибших бактерий. Впрочем, перенос генов резистентности с помощью бактериофагов или захват свободной ДНК, содержащей такие гены, еще не означает, что их новый хозяин стал устойчивым к антибиотикам. Для приобретения резистентности необходимо, чтобы кодирующие ее гены были инкорпорированы в плазмиды или в хромосомы бактерий.

Инактивация β -лактамных антибиотиков с помощью β -лактамазы на молекулярном уровне можно представить следующим образом: в β -лактамазах находятся устойчивые сочетания аминокислот. Эти группы аминокислот образуют полость, в которую β -лактам входит так, что серин в центре перерезает β -лактамную связь. В результате реакции свободной гидроксильной груп-

пы аминокислоты серина, входящей в активный центр фермента, с β -лактамным кольцом образуется нестабильный ацилэфирный комплекс, быстро подвергающийся гидролизу. В результате гидролиза высвобождается активная молекула фермента и разрушенная молекула антибиотика.

С практической точки зрения при характеристике β -лактамаз необходимо учитывать несколько параметров:

- ✓ субстратную специфичность (способность гидролизовать отдельные β -лактамные антибиотики);
- ✓ чувствительность к действию ингибиторов;
- ✓ локализацию гена.

Общепринятая классификация Richmond и Sykes выделяет 5 классов β -лактамаз в зависимости от воздействия на антибиотики (по данным Ю.Б. Белоусова, выделяется 6 типов). К I классу относят ферменты, расщепляющие цефалоспорины, ко II – пенициллины, к III и IV – различные антибиотики широкого спектра действия, к V классу – ферменты, которые расщепляют изоксазолилпенициллины. β -Лактамазы, ассоциированные с хромосомами (I, II, V), расщепляют пенициллины, цефалоспорины, а плазмидассоциированные (III и IV) – пенициллины широкого спектра.

Отдельные представители семейства *Enterobacteriaceae* (*Enterobacter spp.*, *Citrobacter freundii*, *Morganella morganii*, *Serratia marcescens*, *Providencia spp.*), а также *Pseudomonas aeruginosa* демонстрируют способность к продукции индуцибельных хромосомных цефалоспориноз, характеризующихся высоким сродством к цефамицинам и цефалоспорином III поколения. Индукция или стабильное «дерепрессирование» этих хромосомных β -лактамаз в период «давления» (применения) цефамицинов или цефалоспоринов III поколения в конечном итоге приведет к формированию резистентности ко всем доступным цефалоспорином. Распространение данной формы резистентности увеличивается в случаях лечения инфекций, прежде всего, вызываемых *Enterobacter cloacae* и *Pseudomonas aeruginosa*, цефалоспорином широкого спектра действия.

Хромосомные β -лактамазы, продуцирующиеся грамотрицательными бактериями, классифицируют на 4 группы. К первой группе относят хромосомные цефалоспориноз (I класс ферментов по Richmond – Sykes), вторая группа ферментов расщепляет цефалоспорины, в частности цефуроксим (цефуроксимазы), к третьей относят β -лактамазы широкого спектра действия, к четвертой группе – ферменты, вырабатываемые анаэробами.

Хромосомные цефалоспориноз классифицируют на два подтипа. К первому относят β -лактамазы, продуцируемые *E. coli*, *Shigella*, *P. mirabilis*. В присутствии β -лактамных антибиотиков они не увеличивают выработку β -лактамаз. В то же время, *P. aeruginosae*, *P. rettgeri*, *Morganella morganii*, *E. cloacae*, *E. aerogenes*, *Citrobacter*, *Serratia spp.* могут продуцировать большое количество ферментов в присутствии β -лактамных антибиотиков (второй подтип).

Для инфекции, вызванной *P. aeruginosae*, выработка β -лактамаз не является основным механизмом резистентности, т.е. только 4–5% устойчивых форм обусловлены продукцией плазмид- и хромосомноассоциированных β -лактамаз. В основном резистентность связана с нарушением проницаемости бактериальной стенки и аномальной структурой ПСБ.

Хромосомные цефуроксимазы представляют собой низкомолекулярные соединения, активны *in vitro* против цефуроксима и частично инактивируются клавулановой кислотой. Цефуроксимазы вырабатываются *P. vulgaris*, *P. cepali*, *P. pseudomallei*. Лабильные цефалоспорины первого поколения стимулируют продукцию данного вида β -лактамаз. Возможна индукция цефуроксимаз и стабильными цефалоспоринами. Клебсиеллы синтезируют хромосомнодетерминированные β -лактамазы IV класса, которые разрушают пенициллин, ампициллин, цефалоспорины первого поколения (β -лактамазы широкого спектра), а также другие цефалоспорины.

Хромосомные β -лактамазы грамотрицательных бактерий (*Morganella*, *Enterobacter*, *Pseudomonas*) более интенсивно вырабатываются в присутствии ампициллина и цефокситина. Однако, их выработка и активность подавляются клавулановой кислотой и особенно сульбактамом.

Плазмидассоциированные β -лактамазы, вырабатываемые грамотрицательными бактериями, в первую очередь, кишечной палочкой и *P. aeruginosae*, определяют подавляющее число внутригоспитальных штаммов, резистентных к современным антибиотикам. Многочисленные ферменты β -лактамаз инактивируют не только пенициллины, но и пероральные цефалоспорины, лекарственные препараты первого поколения, а также цефомандол, цефазолин и цефоперазон. Такие ферменты, как PSE-2, OXA-3, гидролизуют и определяют низкую активность цефтриаксона и цефтазидима. Описана стабильность цефокситина, цефотетана и лактамоцефа к ферментам типа SHV-2 и CTX-1.

Поскольку β -лактамазы играют важную роль в экологии ряда микроорганизмов, они широко распространены в природе. Так, в хромосомах многих видов грамотрицательных микроорганизмов гены β -лактамаз обнаруживаются в естественных условиях. Очевидно, что внедрение в медицинскую практику антибиотиков значительным образом изменило биологию микроорганизмов. Однако, детали данного процесса неизвестны, можно предположить, что некоторые из хромосомных β -лактамаз оказались мобилизованными в состав подвижных генетических элементов (плазмид и транспозонов). Селективные преимущества, которые обеспечивали микроорганизмам обладание этими ферментами, привели к быстрому распространению последних среди клинически значимых патогенов.

К наиболее распространенным ферментам с хромосомной локализацией генов относятся β -лактамазы класса C. Гены этих ферментов обнаруживаются в хромосомах практически всех грамотрицательных бактерий. Для β -лактамаз класса C с хромосомной локализацией генов характерны определенные особенности экспрессии. У некоторых микроорганизмов (например,

E. coli) хромосомные β -лактамазы экспрессируются постоянно, но на очень низком уровне, недостаточном даже для гидролиза ампициллина.

Для микроорганизмов группы *Enterobacter*, *Serratia*, *Morganella* и др. характерен индуцибельный тип экспрессии. При отсутствии в среде антибиотиков фермент практически не вырабатывается, но после контакта с некоторыми β -лактамными антибиотиками скорость синтеза резко возрастает. При нарушении регуляторных механизмов возможна постоянная гиперпродукция фермента.

Несмотря на то, что в настоящее время уже описано более 20 β -лактамаз класса С, локализованных на плазидах, данные ферменты еще не получили широкого распространения, однако уже в ближайшем будущем они могут составить реальную клиническую проблему.

Хромосомные β -лактамазы *K. pneumoniae*, *K. oxytoca*, *C. diversus* и *P. vulgaris* относятся к классу А. Для них характерны различия в экспрессии. Однако, даже в случае гиперпродукции этих ферментов микроорганизмы сохраняют чувствительность к некоторым цефалоспорином III поколения. Хромосомные β -лактамазы клебсиелл относят к группе 2be (по Bush), а β -лактамазы *C. diversus* и *P. vulgaris* – к группе 2e.

По не совсем понятным причинам мобилизация β -лактамаз класса А на подвижные генетические элементы происходит эффективнее, чем ферментов класса С. Так, есть все основания предполагать, что широко распространенные среди грамотрицательных микроорганизмов плазмидные β -лактамазы SHV-1 и их производные произошли от хромосомных β -лактамаз *K. pneumoniae*.

Исторически первыми β -лактамазами, вызвавшими серьезные клинические проблемы, были стафилококковые β -лактамазы. Эти ферменты эффективно гидролизуют природные и полусинтетические пенициллины, возможен также частичный гидролиз цефалоспоринов I поколения, они проявляют чувствительность к действию ингибиторов (клавуланату, сульбактаму и тазобактаму).

Гены ферментов локалируются на плазидах, что обеспечивает их быстрое внутри- и межвидовое распространение среди грамположительных микроорганизмов. Уже к середине 50-х гг. XX в. в ряде регионов более 50% штаммов стафилококков продуцировали β -лактамазы, что привело к резкому снижению эффективности пенициллина. К концу 90-х гг. XX в. частота продукции β -лактамаз среди стафилококков практически повсеместно превосходит 70–80%.

У грамотрицательных бактерий первая плазмидная β -лактамаза класса А (TEM-1) была описана в начале 60-х гг. XX в., после внедрения в медицинскую практику аминопенициллинов. Благодаря плазмидной локализации генов TEM-1 и две другие β -лактамазы класса А (TEM-2, SHV-1) в течение короткого времени распространились среди представителей семейства *Enterobacteriaceae* и других грамотрицательных микроорганизмов практически повсеместно.

Перечисленные ферменты получили название β -лактамаз широкого спектра. По классификации Bush β -лактамазы широкого спектра относятся к группе 2b. К практически важными свойствами β -лактамаз широкого спектра являются следующие:

- ✓ цефалоспорины III–IV поколения и карбапенемы устойчивы к ним;
- ✓ способность гидролизовать природные и полусинтетические пенициллины, цефалоспорины I поколения, частично цефоперазон и цефамандол;
- ✓ чувствительность к действию ингибиторов;
- ✓ плазмидная локализация генов.

Период с конца 60-х и до середины 80-х гг. XX в. отмечен интенсивным развитием β -лактамных антибиотиков, в клиническую практику были внедрены карбокси- и уреидопенициллины, а также цефалоспорины трех поколений. По уровню и спектру противомикробной активности, а также по фармакокинетическим характеристикам данные лекарственные препараты существенно превосходили аминопенициллины. Большинство цефалоспоринов II и III поколения, кроме того, оказались устойчивыми к β -лактамазам широкого спектра.

В течение некоторого времени после внедрения в клиническую практику цефалоспоринов II–III поколений приобретенной устойчивости к ним среди энтеробактерий практически не отмечено. Однако, уже в начале 80-х гг. XX в. появились первые сообщения о штаммах с плазмидной локализацией детерминант устойчивости к данным антибиотикам. Достаточно быстро было установлено, что данная устойчивость связана с продукцией микроорганизмами ферментов, генетически связанных с β -лактамазами широкого спектра (TEM-1 и SHV-1), новые ферменты получили название β -лактамаз расширенного спектра (БЛРС).

Первым идентифицированным ферментом расширенного спектра была β -лактамаза TEM-3. К настоящему времени известно около 100 производных фермента TEM-1. Чаще всего β -лактамазы TEM-типа встречаются среди *E. coli* и *K. pneumoniae*. Однако, их обнаружение возможно практически среди всех представителей Enterobacteriaceae и ряда других грамотрицательных микроорганизмов.

По классификации Bush β -лактамазы TEM- и SHV-типа относятся к группе 2be. Практически важными свойствами БЛРС являются следующие:

- ✓ способность гидролизовать цефалоспорины I–III и в меньшей степени IV поколения;
- ✓ карбапенемы устойчивы к гидролизу;
- ✓ цефамицины (цефокситин, цефотетан и цефметазол) устойчивы к гидролизу;
- ✓ чувствительность к действию ингибиторов;
- ✓ плазмидная локализация генов.

Среди β -лактамаз TEM- и SHV-типа описаны ферменты со своеобразным фенотипом. Они не чувствительны к воздействию ингибиторов (кла-

вуланата и сульбактама, но не тазобактама). Однако, их гидролитическая активность в отношении большинства β -лактамных антибиотиков ниже, чем у ферментов-предшественников. Ферменты, получившие название «ингибиторустойчивые TEM» (inhibitor-resistant TEM – IRT), включены в группу 2br по классификации Bush. На практике микроорганизмы, обладающие этими ферментами, проявляют высокую устойчивость к защищенным β -лактамным антибиотикам, но лишь умеренно устойчивы к цефалоспорином I–II поколения и чувствительны к цефалоспорином III–IV поколения. Следует отметить, что у отдельных β -лактамаз сочетаются устойчивость к ингибиторам и расширенный спектр гидролитической активности.

К ферментам, количество которых в последние годы быстро увеличивается, относятся β -лактамазы CTX-типа (цефотаксимазы), представляющие собой группу, отличающуюся от других ферментов класса A. Предпочтительным субстратом данных ферментов, в отличие от TEM- и SHV-производных, является не цефтазидим или цефподоксим, а цефотаксим. Цефотаксимазы обнаруживают у разных представителей *Enterobacteriaceae* (преимущественно у *E. coli* и *Salmonella enterica*) в географически отдаленных регионах земного шара. В то же время в Восточной Европе описано распространение клонально-родственных штаммов *Salmonella typhimurium*, продуцирующих фермент CTX-M4. По классификации Bush β -лактамазы CTX-типа относятся к группе 2be. Происхождение ферментов CTX-типа неясно. Значительная степень гомологии обнаруживается с хромосомными β -лактамазами *K. oxytoca*, *C. diversus*, *P. vulgaris*, *S. fonticola*. Сравнительно недавно была установлена высокая степень гомологии с хромосомной β -лактамазой *Kluyvera ascorbata*.

Кроме того, известен ряд редко встречающихся ферментов, относящихся к классу A и обладающих фенотипом, характерным для БЛРС (способностью гидролизовать цефалоспорины III поколения и чувствительностью к ингибиторам). Эти ферменты (BES-1, FEC-1, GES-1, CME-1, PER-1, PER-2, SFO-1, TLA-1 и VEB-1) выделяли у ограниченного количества штаммов разных видов микроорганизмов в различных регионах мира от Южной Америки до Японии. Данные ферменты отличаются по предпочтительным субстратам (отдельные представители цефалоспоринов III поколения).

К БЛРС относят и ферменты класса D. Их предшественники, β -лактамазы широкого спектра, гидролизующие преимущественно пенициллин и оксациллин, слабо чувствительны к ингибиторам, в основном распространены в Турции и Франции среди *P. aeruginosa*. Гены этих ферментов, как правило, локализованы на плазмидах. Большинство ферментов, демонстрирующих фенотип расширенного спектра (преимущественный гидролиз цефотаксима и цефтриаксона – OXA-11, -13, -14, -15, -16, -17, -8, -19, -28), происходят от β -лактамазы OXA-10. По классификации Bush β -лактамазы OXA-типа относятся к группе 2d.

Bush выделяет еще несколько групп ферментов, существенно различающихся по свойствам, в том числе и по спектру действия, но обычно не рассматриваемых как β -лактамазы расширенного спектра. Для ферментов из

группы 2с преимущественными субстратами являются пенициллины и карбенициллин, они встречаются среди *P. aeruginosa*, *Aeromonas hydrophilia*, *Vibrio cholerae*, *Acinetobacter calcoaceticus* и некоторых других грамотрицательных и грамположительных микроорганизмов, гены чаще локализованы на хромосомах.

Для ферментов группы 2е преимущественным субстратом являются цефалоспорины, в качестве типичного примера рассматривают хромосомные индуцибельные цефалоспориназы *P. vulgaris*. β -Лактамазы данной группы описывают также у *Bacteroides fragilis*, реже, у других микроорганизмов.

В группу 2f входят редкие ферменты класса А, способные гидролизовать большинство β -лактамов, включая карбапенемы. Livermore относит эти ферменты к β -лактамазам расширенного спектра, другие исследователи – нет.

Кроме перечисленных β -лактамаз следует упомянуть о двух последних группах ферментов, включенных в классификацию Bush. К ферментам группы 3 относятся редкие, но потенциально очень важные металло- β -лактамазы класса В, обнаруживаемые среди *Stenotrophomonas maltophilia* и редко встречающиеся у других микроорганизмов (*B. fragilis*, *A. hydrophila*, *P. aeruginosa* и др.). Отличительной особенностью данных ферментов является способность гидролизовать карбапенемы. В группу 4 включены плохо изученные пенициллиназы *P. aeruginosa*, подавляемые клавулановой кислотой.

Частота распространения БЛРС существенно варьирует в отдельных географических регионах. Так, по данным многоцентрового исследования MYSTIC, в Европе наибольшую частоту распространения БЛРС стабильно отмечают в России и Польше (более 30% среди всех изученных штаммов энтеробактерий). В отдельных лечебных учреждениях РФ частота продукции БЛРС среди *Klebsiella spp.* превышает 90%. В зависимости от специфики лечебного учреждения наиболее распространенными в нем могут быть разные механизмы устойчивости (метициллинрезистентность, устойчивость к фторхинолонам, гиперпродукция хромосомных β -лактамаз и др.).

БЛРС обладают широким спектром активности, в той или иной степени они гидролизуют практически все β -лактамные антибиотики, за исключением цефамицинов и карбапенемов.

Однако, наличие у микроорганизма детерминанты устойчивости к определенному антибиотику далеко не всегда означает клиническую неудачу при терапии данным лекарственным препаратом. Так, получены сообщения о высокой эффективности цефалоспоринов III поколения при лечении инфекций, вызванных штаммами, продуцирующими БЛРС.

2. Направления и пути преодоления антибиотикорезистентности

Во всем мире с целью повышения эффективности и безопасности антибактериальных и противовирусных средств и предотвращения развития антибиотикорезистентности создаются общества и ассоциации, принимаются декларации, разрабатываются образовательные программы по рациональной антибиотикотерапии. К важнейшим из них относятся:

✓ «Копенгагенские рекомендации», принятые странами Европейского Союза, 1998 г.;

✓ «План деятельности общественного здравоохранения по борьбе с антибиотикорезистентностью», предложенный Американским обществом микробиологов и рядом ведомств США, 2000 г.;

✓ «Глобальная стратегия ВОЗ по сдерживанию антибиотикорезистентности», 2001 г.

Кроме того, в Канаде (2002) была принята Всемирная декларация по борьбе с антимикробной резистентностью, в которой указывается, что резистентность к антибиотикам коррелирует с их клинической неэффективностью, она создается человеком, и только человек может решить эту проблему, а необоснованное применение антибиотиков населением, неправильные представления и недооценка проблемы резистентности врачами и фармацевтами, назначающими антибиотики, может привести к распространению резистентности.

Основными задачами при изучении антибиотикочувствительности и антибиотикорезистентности являются:

✓ разработка локальных и региональных стандартов профилактики и терапии госпитальных и внебольничных инфекций;

✓ обоснование мероприятий по ограничению распространения антибиотикорезистентности в госпитальных условиях;

✓ выявление начальных признаков формирования новых механизмов устойчивости;

✓ выявление закономерностей глобального распространения отдельных детерминант резистентности и разработка мероприятий по его ограничению.

✓ осуществление долговременного прогноза распространения отдельных механизмов устойчивости и обоснование направлений разработки новых антибактериальных препаратов.

Антибиотикорезистентность и антибиотикочувствительность исследуют как «точечными» методами (в пределах одного учреждения, района, государства), так и посредством динамических наблюдений за распространением резистентности.

Достаточно сложно сравнивать данные, полученные с использованием коммерческих систем оценки антибиотикочувствительности разных производителей. Еще большей степени осложняет ситуацию наличие различных национальных критериев чувствительности. Так, только среди стран Европы национальные критерии чувствительности существуют во Франции, Великобритании, Германии и в ряде других стран. В отдельных учреждениях и лабораториях методики забора материала и оценки клинической значимости изолятов часто существенно различаются.

Однако, следует отметить, что использование антибиотика не всегда приводит к антибиотикорезистентности (свидетельством этому является чув-

ствительность *Enterococcus faecalis* к ампициллину, не изменяющаяся на протяжении десятилетий) и, тем более, не зависит от длительности применения (резистентность может развиваться в течение первых двух лет его применения или даже на стадии клинических испытаний).

Различают несколько путей преодоления резистентности бактерий к антибиотикам. Один из них – это защита известных антибиотиков от разрушения ферментами бактерий или от удаления из клетки посредством мембранных насосов. Так, появились «защищенные» пенициллины – комбинации полусинтетических пенициллинов с ингибиторами бактериальных β -лактамаз. Имеется целый ряд соединений, которые подавляют продукцию β -лактамаз, часть из них нашли свое применение в клинической практике:

- ✓ клавулановая кислота;
- ✓ пенициллановые кислоты;
- ✓ сульбактам (сульфон пенициллановой кислоты);
- ✓ 6-хлорпенициллановая кислота;
- ✓ 6-йодпенициллановая кислота;
- ✓ 6-бромпенициллановая кислота;
- ✓ 6-ацетилпенициллановая кислота.

Различают два типа ингибиторов β -лактамаз. К первой группе относят антибиотики, устойчивые к действию ферментов. Такие антибиотики, помимо антибактериальной активности, обладают ингибиторными свойствами в отношении β -лактамаз, которые проявляются при высокой концентрации антибиотиков. К ним относят: метициллин и изоксазолилпенициллины, моноциклические β -лактамы типа карбапенема (тиенамицин).

Вторую группу составляют ингибиторы β -лактамаз, проявляющие в низких концентрациях ингибиторную активность, а в высоких – обладающие антибактериальными свойствами. Примером может служить клавулановая кислота, галогенизированные пенициллановые кислоты, сульфон пенициллановой кислоты (сульбактам). Клавулановая кислота и сульбактам блокируют гидролиз пенициллина стафилококками.

Наиболее широко используют в качестве ингибиторов β -лактамаз клавулановую кислоту и сульбактам, обладающие гидролитической активностью. Сульбактам блокирует β -лактамазы II, III, IV и V классов, а также хромосомно-опосредованный I класс цефалоспоринов. Аналогичными свойствами обладает клавулановая кислота. Различие между данными препаратами состоит в том, что в гораздо меньших концентрациях сульбактам блокирует образование хромосомно-опосредованных β -лактамаз, а клавулановая кислота – плазмидассоциированных ферментов. Причем на ряд лактамаз сульбактам оказывает необратимое ингибиторное воздействие. Включение в среду ингибитора β -лактамаз клавулановой кислоты повышает чувствительность пенициллинрезистентных стафилококков с 4 до 0,12 мкг/мл.

Перспективными подходами к преодолению резистентности бактерий к антибиотикам представляются:

- применение комбинаций антибиотиков;

- проведение целевой и узконаправленной антибактериальной терапии;
- синтез новых соединений, относящихся к известным классам антибиотиков;
- поиск принципиально новых классов антибактериальных препаратов.

В целях профилактики развития устойчивости микроорганизмов к лекарственным средствам необходимо руководствоваться следующими принципами:

1. Проводить терапию с применением антибактериальных препаратов в максимальных дозах до полного преодоления болезни (особенно в тяжелых случаях); предпочтительный способ введения лекарственных препаратов – парентеральный (с учетом локализации процесса).

2. Периодически заменять широко применяемые лекарственные препараты недавно созданными или редко назначаемыми (резервными) лекарственными средствами.

3. Теоретически оправданно комбинированное использование ряда лекарственных препаратов.

4. Лекарственные препараты, к которым у микроорганизмов развивается устойчивость стрептомицинового типа, не следует назначать в виде монотерапии.

5. Не заменять один антибактериальный препарат на другой, к которому существует перекрестная устойчивость.

6. К антибактериальным препаратам, назначаемым профилактически или наружно (особенно в аэрозольной форме), быстрее вырабатывается устойчивость, чем при их парентеральном введении или приеме внутрь. Местное применение антибактериальных препаратов должно быть сведено к минимуму. При этом используются, как правило, агенты, не применяемые для системного лечения и с низким риском быстрого развития устойчивости к ним.

7. Проводить оценку вида антибактериального препарата (примерно один раз в год), который чаще всего применялся для лечебных целей, и анализ результатов лечения. Следует различать антибактериальные препараты, применяемые наиболее часто и в тяжелых случаях, резервные и глубокого резерва.

8. Систематизировать заболевания в зависимости от локализации очага воспаления и тяжести состояния больного; выделить антибактериальные препараты для применения в соответствующей области (органе или ткани) и для использования в исключительно тяжелых случаях, причем на их применение обязательно разрешение компетентных лиц, специально занимающихся антибактериальной терапией.

9. Оценивать периодически вид возбудителя и устойчивость штаммов микроорганизмов, циркулирующих в больничной среде, намечать меры борьбы для предупреждения внутрибольничной инфекции.

10. При бесконтрольном применении антибактериальных средств усиливается вирулентность возбудителей инфекции и возникают формы, устойчивые к лекарственным средствам.

11. Ограничить применение в пищевой промышленности и ветеринарии тех лекарственных препаратов антибиотиков, которые используются для лечения людей.

12. В качестве способа снижения резистентности микроорганизмов рекомендуется применение лекарственных препаратов антибиотиков с узким спектром действия.

2.1. Глобальная стратегия ВОЗ по сдерживанию резистентности к антимикробным препаратам

11 сентября 2001 г. ВОЗ опубликовала Глобальную стратегию по сдерживанию резистентности к противомикробным препаратам. Эта программа направлена на обеспечение гарантий эффективности таких жизненно важных лекарственных препаратов, как антибиотики, не только для нынешнего поколения людей, но и в будущем. Без согласованных действий всех стран многие великие открытия, сделанные учеными-медиками за последние 50 лет, могут утратить свое значение из-за распространения антибиотикорезистентности.

Антибиотики являются одним из наиболее значительных открытий XX в. Благодаря открытию антибиотиков, стало возможно лечить и вылечивать те заболевания, которые ранее были смертельными (туберкулез, менингит, скарлатина, пневмония и др.). В случае, если человечество не сможет защитить это величайшее достижение медицинской науки, оно вступит в постантибиотическую эру.

За последние 5 лет более, чем 17 млн. долларов было потрачено фармацевтической промышленностью на исследования и разработку лекарственных средств, применяющихся для лечения инфекционных заболеваний. В случае, если резистентность микроорганизмов к лекарственным средствам будет развиваться быстро, большинство этих инвестиций могут быть потеряны.

Стратегия ВОЗ по сдерживанию резистентности к противомикробным препаратам касается всех, кто в той или иной мере имеет отношение к применению или назначению антибиотиков, – от пациентов до врачей, от административных работников больниц до министров здравоохранения. Эта стратегия – результат 3-летней работы экспертов ВОЗ и сотрудничающих организаций. Она направлена на содействие разумному применению антибиотиков с целью минимизировать резистентность и дать возможность следующим поколениям применять эффективные противомикробные препараты.

Информированные пациенты смогут не оказывать давления на врачей, чтобы последние назначали им антибиотики. Образованные врачи будут назначать только те лекарственные средства, которые действительно необходимы для терапии пациента. Административные работники больниц смогут проводить на местах детальное мониторинговое исследование эффективности лекарственных средств. Министры здравоохранения смогут сделать так, чтобы

большинство действительно необходимых лекарственных препаратов антибиотиков было доступно для использования, в то время, как неэффективные лекарственные препараты не применялись.

Использование антибиотиков в пищевой промышленности также способствует росту антибиотикорезистентности. В настоящее время 50% всех производимых антибиотиков применяется в сельском хозяйстве не только для лечения больных животных, но и в качестве стимуляторов роста крупного рогатого скота и птиц. Устойчивые микроорганизмы могут передаваться от животных к человеку. Для предотвращения этого обстоятельства ВОЗ рекомендует последовательность действий, включая обязательное выписывание рецепта на все антибиотики, применяемые для лечения животных, и снятие с производства антибиотиков, используемых в качестве стимуляторов роста.

Антибиотикорезистентность представляет собой естественный биологический процесс. В настоящее время мы живем в мире, в котором антибиотикорезистентность быстро распространяется и растет число жизненно необходимых лекарственных препаратов, которые становятся неэффективными. В настоящее время резистентность микроорганизмов зарегистрирована к антибиотикам, применяемым для лечения менингита, заболеваний, передающихся половым путем, госпитальных инфекций и даже к новому классу антиретровирусных препаратов, применяемых для лечения ВИЧ-инфекции. Во многих странах микобактерии туберкулеза резистентны как минимум к двум среди наиболее эффективных лекарственных препаратов, применяемых для лечения туберкулеза.

Данная проблема в одинаковой степени касается как высокоразвитых и индустриальных, так и развивающихся стран. Избыточное применение антибиотиков во многих развитых странах, недостаточная продолжительность курса лечения у бедных – в конечном счете создается одинаковая угроза для человечества в целом.

Таким образом, антибиотикорезистентность представляет собой глобальную проблему. Нет страны, которая могла бы позволить себе игнорировать ее, и нет страны, которая могла бы не отвечать на нее. Только одновременно проводимые действия по сдерживанию роста антибиотикорезистентности в каждой отдельной стране смогут дать положительные результаты во всем мире.

3. Методы определения чувствительности микроорганизмов к антибиотикам

Высокая частота устойчивости возбудителей гнойно-септических заболеваний к антибиотикам и изменение спектра и уровня устойчивости микробных популяций в течение болезни обуславливают необходимость определения их чувствительности перед назначением лекарственного препарата и в процессе лечения. При использовании классических методов определения чувствительности микроорганизмов к антибиотикам – метода серийных раз-

ведений в жидкой или плотной питательной среде, а также метода бумажных дисков – результат может быть получен не ранее, чем через 18 ч от начала исследования (с учетом времени, необходимого для выделения чистых культур – через 48–72 ч.).

Методы определения чувствительности микроорганизмов к антибиотикам делятся на 2 группы: диффузионные методы (с использованием дисков с антибиотиками и с помощью Е-тестов) и методы разведения в жидкой или плотной средах.

При определении чувствительности микроорганизмов к антибиотикам с помощью диско-диффузионного метода на поверхность агар в чашке Петри наносят бактериальную суспензию определенной плотности (обычно эквивалентную стандарту мутности 0,5 по McFarland) и затем помещают диски, содержащие определенное количество антибиотика. Диффузия антибиотика в агар приводит к формированию зоны подавления роста микроорганизмов вокруг дисков. После инкубации чашек в термостате при температуре 35–37 °С в течение ночи учитывают результат путем измерения диаметра зоны вокруг диска в миллиметрах (рис. 1).

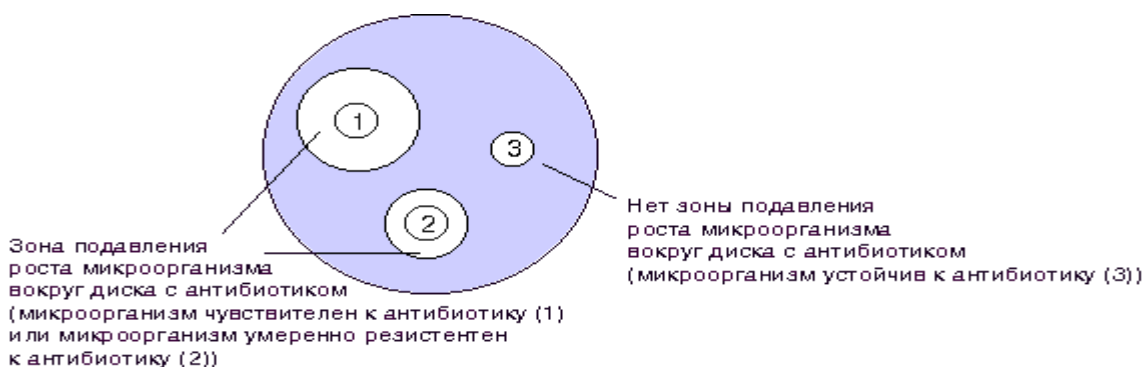


Рис. 1. Определение чувствительности микроорганизмов диско-диффузионным методом

Определение чувствительности микроорганизма с помощью Е-теста проводится аналогично тестированию с помощью диско-диффузионного метода. В данном случае отличие состоит в том, что вместо диска с антибиотиком используют полоску Е-теста, содержащую градиент концентраций антибиотика от максимальной к минимальной (рис. 2). В месте пересечения эллипсовидной зоны подавления роста с полоской Е-теста получают значение минимальной подавляющей концентрации (МПК).

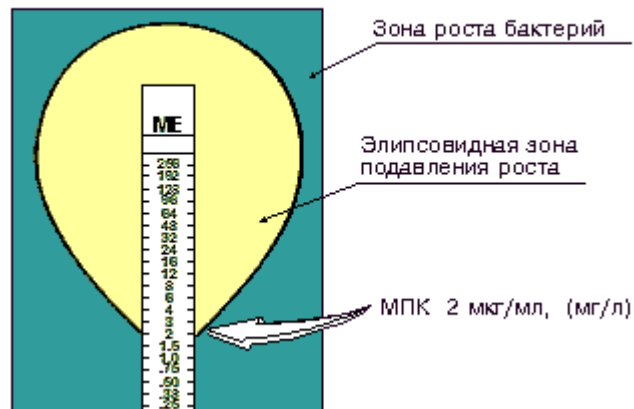


Рис. 2. Определение чувствительности микроорганизмов с помощью Е-тестов.

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

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 разных 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 Петри. После инкубации в течение 12 ч 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 МПК (наименьшая концентрация антибиотика, которая *in vitro* полностью подавляет видимый рост микроорганизмов). Единицы измерения МПК – мг/л или мкг/мл (рис. 3).



Рис. 3. Определение значения МПК методом разведения в жидкой питательной среде

На основании получаемых количественных данных (диаметра зоны подавления роста антибиотика или значения МПК) микроорганизмы подразделяют на чувствительные, умеренно резистентные и резистентные (рис. 4). Для разграничения этих трех категорий чувствительности (или резистентности) между собой используют пограничные концентрации (breakpoint) антибиотика (или пограничные значения диаметра зоны подавления роста микроорганизма).

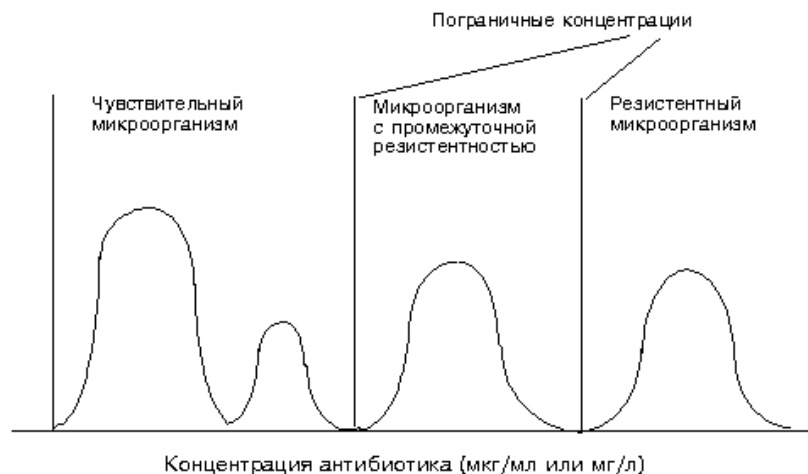


Рис. 4. Интерпретация результатов определения чувствительности бактерий в соответствии со значениями МПК

Пограничные концентрации не являются неизменными величинами. Они могут пересматриваться в зависимости от изменения чувствительности популяции микроорганизмов. Разработкой и пересмотром критериев интерпретации занимаются ведущие специалисты (химиотерапевты и микробиологи), входящие в специальные комитеты. Одним из них является Национальный комитет по клиническим лабораторным стандартам США (National Committee for Clinical Laboratory Standards – NCCLS). В настоящее время стандарты NCCLS признаны во всем мире и используются в качестве международных стандартов для оценки результатов определения чувствительности

бактерий при многоцентровых микробиологических и клинических исследованиях.

Существуют два подхода к интерпретации результатов определения чувствительности: микробиологический и клинический.

Микробиологическая интерпретация основана на анализе распределения значений концентраций антибиотика, подавляющих жизнеспособность бактерий.

Клиническая интерпретация основана на оценке эффективности антибактериальной терапии.

Эффективность химиотерапии повышается при раннем назначении этиотропного лечения, которое можно обеспечить использованием методов и средств быстрого определения чувствительности к антибиотикам возбудителей заболеваний. Проведен ряд исследований, подтверждающих преимущества ускоренных методов.

Так, в исследованиях Varenfanger и Doern с соавт. показано, что сокращение среднего времени исследования от 44,4 до 39,2 ч. сопровождалось сокращением продолжительности пребывания в стационаре с 12,6 до 10,7 суток, снижением средней стоимости терапии пациента с 6677 до 4927 долларов США и летальности – от 9,6 до 7,9%.

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

Ускоренные методы определения чувствительности микроорганизмов к химиопрепаратам позволяют получить ответ спустя 2–6 ч от начала исследования чистых культур.

По принципу и механизму реакций, возникающих в результате действия антибиотиков, можно выделить 5 групп ускоренных методов, основанных на:

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

Сущность методов первой группы заключается в следующем: в мясо-пептонный бульон с глюкозой добавляют антибиотик в необходимой концентрации, а затем засевают испытуемый штамм микроорганизма. Устойчивые к данному антибиотику микроорганизмы усваивают глюкозу, что проявляется изменением кислотно-щелочного потенциала (рН) среды. Для опреде-

ления изменений значения рН среды предложено использовать индикаторы, изменяющие свой цвет при снижении значения рН – феноловый красный, индикатор Андреде и бромтимоловый синий.

Методы второй группы, получившие наибольшее распространение, основаны на выявлении изменений окислительно-восстановительного потенциала среды (rH_2) развивающимися микроорганизмами в присутствии антибиотиков с помощью биологических или химических редокс-индикаторов. После 3–4 ч роста большинство бактерий создают в среде приблизительно одинаковый rH_2 -потенциал, варьирующийся от 25 до 23. В связи с этим, для определения чувствительности бактерий разных видов возможно использование одних и тех же индикаторов.

Микроорганизмы, устойчивые к антибиотику, растут и размножаются в среде и снижают rH_2 – потенциал, в результате индикатор, добавленный к питательной среде, изменяет свой цвет. Чувствительные микроорганизмы в зоне диффузии антибиотиков не размножаются и не изменяют rH_2 , вследствие этого цвет среды вокруг дисков не изменяется.

В качестве таких индикаторов нашли применение резузарин, суспензии человеческих, кроличьих или бараньих эритроцитов, 2,6-дихлорфенолиндофенол, 2,3,5-трифенилтетразолий хлорид, водные растворы красной кровяной соли и железоаммиачных квасцов, метиленовый синий, водный голубой с розоловой кислотой, молибденовоокислый аммоний, соли азотной кислоты.

Цитоморфологические ускоренные методы основаны на том принципе, что микроорганизмы, чувствительные к антибиотикам при 3–4-часовом росте на средах с химиопрепаратами, не увеличивают размеров микробной клетки или не образуют микроколоний на специальных препаратах с питательными средами. Необходимость применения при реализации методов данной группы специальных препаратов для установления изменений величины клеток или микрокамер, целлофановых пластинок или мембранных фильтров с последующим микроскопическим изучением формирования на них микроколоний в световом, фазово-контрастном или люминесцентном микроскопах обуславливает трудоемкость этих методов и их потребность в специальном техническом оснащении.

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

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

Для лечебной и эпидемиологической практики большой интерес представляют экспресс-методы определения чувствительности микроорганизмов к антибиотикам, позволяющие устанавливать антибиотикограмму возбудителя непосредственно в нативном материале или в первичном посеве, что сокращает время анализа до нескольких часов. Разработано несколько модификаций экспресс-метода, в основном для определения чувствительности к антибиотикам возбудителей опасных инфекционных заболеваний (ОИЗ) в первичном посеве исследуемого материала с помощью иммунологических реакций – метода флюоресцирующих антител, реакции непрямой гемагглютинации (РНГА), иммуноферментного метода.

Основу модификаций эспресс-анализа антибиотикочувствительности составляет регистрация с помощью специфических антител действия лекарственных препаратов на рост и размножение популяции возбудителя в смешанной культуре, т.е. в ассоциации с сопутствующей микрофлорой.

Различными исследователями показано, что использование иммунофлюоресцентной методики для экспресс-определения антибиотикочувствительности позволяет устанавливать при первичном посеве материала антибиотикограмму возбудителей холеры, чумы, сибирской язвы через 8–12 ч, туляремии и бруцеллеза – через 18–24 ч. Необходимыми условиями анализа являлись: содержание в 1 мл материала не менее 5×10^5 – 10^7 микробных клеток и до 4×10^4 – сопутствующей микрофлоры, использование специальных питательных сред, соблюдение температурных режимов инкубации посевов.

Результаты анализа оценивают с помощью иммунофлюоресцентной микроскопии по шкале, разработанной на основе зависимости функции от процента ингибиции микробного роста.

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

М.И. Леви с соавт. предложили экспресс-метод определения чувствительности к антибиотикам возбудителей гнойно-септических инфекций. Для экспресс-анализа использован метод серийных разведений антибиотиков в цветной питательной среде, содержащей 0,002% индикатора бромкрезолпурпурного и 0,5% глюкозы. При росте устойчивых к антибиотикам микроорганизмов снижается значение рН питательной среды и индикатор изменяет свой цвет, чувствительные к антибиотикам микроорганизмы цвет среды не изменяют. Исследования проводили в пластмассовых планшетах, в лунках которых приготовили разведения антибиотиков на цветной питательной сре-

де. В контрольные лунки вносили только цветную питательную среду. Гнойное отделяемое из ран больных забирали ватным тампоном, смоченным цветной питательной средой, готовили разведения материала и по 0,05 мл добавляли в луночки планшетов с разными разведениями антибиотиков. Планшеты помещали в термостат до изменения исходного цвета питательной среды в контрольных лунках (без антибиотиков) в желтый (3–6 часов). Затем учитывали результаты анализа. Сохранение исходного цвета питательной среды в опытной лунке свидетельствовало о чувствительности микрофлоры к данной концентрации антибиотика, появление желтого цвета – об устойчивости микрофлоры к такой концентрации лекарственного препарата.

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

Чувствительность реакции ДНК-ДНК гибридизации может быть значительно увеличена в результате предварительного использования полимеразной цепной реакции, в которой за 30–40 циклов в течение 1 ч из одного ДНК-фрагмента можно получить до 10⁸ ампликонов. После накопления ДНК и ее рестрикции эндонуклеазами генетический анализ фрагментов проводят в реакции ДНК-ДНК гибридизации.

✓ Благодаря высокой специфичности и чувствительности совместного применения полимеразной цепной реакции и метода молекулярной гибридизации обеспечивается возможность получения результатов в течение 6–8 часов от начала исследования нативного материала. Однако, необходимость наличия сложного и дорогостоящего оборудования и реактивов ограничивает использование методов молекулярной диагностики в практике.