

Определение чувствительности к антибиотикам методом микроразведений в бульоне: модификация, доступная для всех

Тапальский Д.В., Бильский И.А.

УО «Гомельский государственный медицинский университет», Гомель, Беларусь

Контактный адрес:
Дмитрий Викторович Тапальский
Эл. почта: tapalskiy@gsmu.by

Ключевые слова: минимальная подавляющая концентрация, диски с антибиотиками, антибиотикорезистентность.

Цель. Оценить возможность использования стандартных дисков в качестве источника антибиотиков для определения минимальных подавляющих концентраций (МПК) методом последовательных микроразведений.

Материалы и методы. Предложен простой метод приготовления рабочих растворов с использованием в качестве источника антибиотиков стандартных бумажных дисков, имеющихся в большинстве микробиологических лабораторий. Проведено многократное определение МПК антибиотиков для штаммов *E. coli* ATCC 25922 и *P. aeruginosa* ATCC 27853.

Результаты. Из 576 значений МПК, определенных с помощью модифицированного метода, референтным значениям контрольных штаммов соответствовали 78,5% полученных результатов, ещё 20,8% результатов относились к категории допустимых значений.

Выводы. Использование стандартных дисков в качестве источника антибиотиков для приготовления рабочих растворов значительно упрощает процедуру тестирования методом последовательных микроразведений и делает её доступной для большинства микробиологических лабораторий.

Antimicrobial susceptibility testing by broth microdilution method: widely available modification

Tapalskiy D.V., Bilskiy I.A.

Gomel State Medical University, Gomel, Belarus

Contacts:
Dmitry V. Tapalskiy
E-mail: tapalskiy@gsmu.by

Key words: minimal inhibitory concentration, disks with antibiotics, antimicrobial resistance.

Objective. To assess the possibility of standard disk application as an antibiotic source for determination of the minimal inhibitory concentrations (MICs) by serial microdilution method.

Materials and methods. A simple method of working solutions preparation using standard paper discs as an antibiotics source available in most microbiological laboratories is proposed. A multiple determination of antibiotic MICs for *E. coli* ATCC 25922 and *P. aeruginosa* ATCC 27853 strains was conducted.

Results. Of the 576 MIC values determined by the modified method, 78.5% of the results corresponded to the control strains reference values, and 20.8% of the results were categorized as acceptable values.

Conclusions. Use of standard disks as an antibiotics source for the working solutions preparation greatly simplifies a testing by serial microdilution method and makes it available to most microbiological laboratories.

Определение минимальных подавляющих концентраций (МПК) антибактериальных препаратов (АБП) может выполняться различными методами, включающими методы последовательных разведений в бульоне и агаре, микроразведений, градиентной диффузии (Е-тест), использование автоматических микробиологических систем. Метод последовательных микроразведений в бульоне является референтным фенотипическим методом определения чувствительности микроорганизмов к антибиотикам. Процедура тестирования регламентируется стандартом ISO 20776-1:2006 [1], в Российской Федерации введен в действие стандарт ГОСТ Р ИСО 20776-1-2010, идентичный международному стандарту [2]. Существует целый ряд объективных причин, сдерживающих широкое применение метода последовательных микроразведений в повседневной практике микробиологических лабораторий:

- необходимость использования дорогостоящих чистых субстанций АБП, полученных непосредствен-

но от изготовителя или из надежных коммерческих источников, невозможность использования фармацевтических препаратов;

- необходимость приготовления точных навесок АБП с использованием калиброванных аналитических весов;
- необходимость использования различных растворителей и разбавителей для некоторых АБП (фосфатный буфер, растворы бикарбоната натрия различной концентрации, диметилсульфоксид, метанол, этанол, ледяная уксусная кислота и др.);
- необходимость использования низкотемпературных морозильников для хранения основных растворов АБП и планшетов с приготовленными последовательными микроразведениями, ограниченные сроки их хранения (не более 3-6 мес.).

Учитывая это, метод последовательных микроразведений для определения МПК крайне редко при-

меняется в повседневной практике отечественных и зарубежных лабораторий. Так, среди 974 микробиологических лабораторий из 30 стран, участвовавших в 2015 г. в программе внешней оценки качества Европейской сети по мониторингу антибиотикорезистентности (EARS-Net), определение чувствительности к АБП было выполнено автоматизированными методами в 51,9% лабораторий, диско-диффузионным методом – в 39,2% лабораторий, а методом разведений – только в 7,9% лабораторий [3]. Среди 129 лабораторий из 15 стран, участвовавших в программе внешней оценки качества Сети по надзору за резистентностью к антимикробным препаратам в Центральной Азии и Восточной Европе (CAESAR) в 2015 г., только 3 лаборатории (2,3%) определяли МПК методом разведений, 2 лаборатории (1,6%) определяли МПК градиентным методом, остальные лаборатории использовали диско-диффузионный метод (50%) или автоматизированные методы (47%) [4].

Таким образом, большинство микробиологических лабораторий не проводят определение истинных значений МПК, ограничиваясь диско-диффузионным методом или автоматизированным тестированием чувствительности к пограничным и близким к ним концентрациям АБП, и интерпретируют результаты определения чувствительности в категориях «R-I-S» (резистентный – умеренно резистентный – чувствительный). Дополнительным ограничением является отсутствие у большинства врачей-клиницистов опыта интерпретации значений МПК АБП для назначения и оптимизации антибиотикотерапии.

В условиях глобального распространения грамотрицательных бактерий с множественной (MDR, multiple drug resistance), экстремальной (XDR, extensively drug resistance) и полной (PDR, pandrug resistance) антибиотикорезистентностью знание истинных значений МПК АБП может стать крайне важным для проведения адекватной этиотропной терапии. Так, широко распространенные в больничной среде карбапенеморезистентные энтеробактерии и грамотрицательные неферментирующие бактерии (*Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*), обладают ассоциированной устойчивостью к большинству не бета-лактамов антибиотиков. Сцепление генов карбапенемаз с другими детерминантами резистентности во многих случаях сопровождается развитием экстремальной антибиотикорезистентности [3]. До настоящего времени только полимиксины (колистин, полимиксин В) сохраняют приемлемую микробиологическую активность в отношении многих карбапенеморезистентных госпитальных изолятов грамотрицательных бактерий, для обозначения профиля резистентности которых введена аббревиатура «POS» (polymyxin-only-susceptible, чувствительные только к полимиксинам) [6]. Очевидно, что точный количественный результат определения чувствительности к колистину является критически важным при тестировании антибиотикорезистентности XDR изолятов.

Вместе с тем, определение чувствительности к колистину сопряжено с рядом трудностей, связанных с большой молекулярной массой, наличием катионных свойств и плохой диффузией в агаре. В предупреждении Европейского комитета по определению чувствительности к

антимикробным препаратам (EUCAST) указано, что при определении чувствительности к колистину только метод микроразведений в бульоне дает корректные значения, как для чувствительных, так и для резистентных изолятов грамотрицательных бактерий [7]. Диско-диффузионный метод неприменим вследствие плохой диффузии колистина. Метод градиентной диффузии дает несогласованные результаты даже в случае получения адекватных значений МПК для контрольных штаммов, и не должен использоваться в практике. Определение чувствительности к колистину автоматизированными системами также не позволяет получить надежные результаты [8, 9].

В интерпретационных таблицах EUCAST отсутствуют пограничные значения диаметров зон подавления роста (из-за неприменимости диско-диффузионного метода) для колистина в отношении энтеробактерий, *P. aeruginosa*, *Acinetobacter* spp., для ванкомицина и тейкопланина – в отношении *Staphylococcus aureus* [10]. Таким образом, в большинстве лабораторий клинической микробиологии требуется внедрение методов последовательных разведений, по крайней мере, для этих АБП.

В современной клинической практике определение МПК также может быть важным для выбора режима дозирования АБП в терапии инфекций, вызванных XDR и PDR микроорганизмами [11]. Например, увеличение разовой дозы карбапенемов и их введение в виде 3-часовой продленной инфузии позволяет добиться клинической эффективности для лечения инфекций, вызванных карбапенеморезистентными *Klebsiella pneumoniae* с МПК карбапенемов 8 и даже 16 мкг/мл. Однако при значениях МПК карбапенемов 32 мкг/мл и более целевой параметр клинической эффективности 50%T>МПК (концентрация АБП выше МПК на протяжении более половины 24-часового интервала дозирования) практически не достигается [12, 13]. В логистической регрессионной модели показано, что при значениях МПК аминогликозидов 0,25 и 0,5 мкг/мл вероятность достижения клинического эффекта при введении стандартной дозы 5 мг/кг превышает 90%, при МПК 1,0 мкг/мл она снижается до менее 80%, при МПК 2,0-4,0 мкг/мл – до 50-60%, даже если эти значения попадают в категорию «чувствительность» [14]. В этой связи интерпретация результатов определения чувствительности в категориях «R-I-S» всё чаще не устраивает врачей-клиницистов, вынужденных назначать антибактериальную терапию для лечения инфекций, вызванных XDR микроорганизмами, пациентам в критических состояниях.

В опубликованной в 1978 г. работе Flowers D. описан принцип использования стандартных бумажных дисков с пенициллином и гентамицином в качестве источника стандартных количеств АБП для приготовления последовательных разведений и определения МПК [15]. Показано, что полное вымывание АБП из диска в бульонную среду происходило в течение менее 1 минуты, а вся процедура приготовления линейки последовательных разведений АБП и инокуляции лунок тестируемым микроорганизмом занимала около 5 минут. При этом согласованность с результатами, полученными стандартным методом, в котором для приготовления последователь-

ных разведений использовались фармацевтические субстанции пенициллина и гентамицина, составляла от 77 до 89%. В современных условиях использование бумажных дисков в качестве источника антибиотиков могло бы значительно упростить процесс определения МПК и сделать его доступным для большинства микробиологических лабораторий.

Целью нашего исследования была оценка возможности использования стандартных дисков в качестве источника антибиотиков для определения МПК методом последовательных микроразведений.

Материалы и методы

Определение МПК для 9 АБП (азтреонам, амикацин, имипенем, колистин, меропенем, тобрамицин, цефепим, цефтазидим, ципрофлоксацин) выполняли методом последовательных разведений в бульоне Мюллера-Хинтона (BD, США) в стерильных 96-луночных полистироловых планшетах (SARSTEDT, Германия). Тестирование проводили в отношении штаммов микроорганизмов из Американской коллекции типовых культур *Escherichia coli* ATCC 25922 и *P. aeruginosa* ATCC 27853 с известными референтными значениями МПК АБП. Исследование выполняли в соответствии со стандартом ГОСТ Р ИСО 20776-1-2010 [2], за исключением этапа приготовления рабочих растворов АБП.

Рабочие растворы АБП готовили в бульоне Мюллера-Хинтона (МХБ) в стерильных пробирках эппендорф, помещая в бульонную среду необходимое для получения заданной концентрации количество стандартных бумажных дисков (BD Sensi-Disc, США). Общая схема приготовления рабочих растворов представлена на Рисунке 1.

Концентрацию рабочего раствора рассчитывали исходя из необходимой максимальной концентрации в ряду последовательных разведений, учитывая фактор разбавления при последующей инокуляции. Расчет объ-

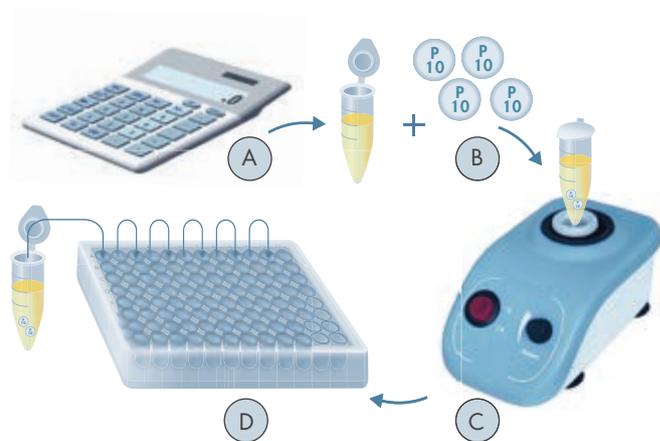


Рисунок 1. Схема приготовления рабочего раствора и последовательных разведений АБП с использованием стандартных дисков

А – расчет необходимого объема питательной среды и количества дисков, В – внесение МХБ и необходимого количества дисков с АБП в пробирку, С – 30-секундное вортиксирование, D – внесение 50 мкл полученного рабочего раствора в лунку ряда 1 полистиролового планшета и приготовление двукратных последовательных разведений

ема МХБ, необходимого для получения рабочей концентрации АБП, рассчитывали по формуле:

$$V = \frac{nM}{C},$$

где V – необходимый объем питательной среды, n – количество дисков с АБП, M – содержание АБП в одном диске, C – требуемая концентрация АБП в рабочем растворе.

В Таблице 1 приведены сведения об используемых дисках с АБП, референтных значениях МПК контрольных культур микроорганизмов и диапазонах тестируе-

Таблица 1. Диски с АБП, диапазон тестируемых концентраций и референтные значения МПК контрольных штаммов

Антибиотик	Содержание в диске, мкг	Диапазон тестируемых концентраций, мкг/мл	МПК контрольных штаммов, мкг/мл			
			<i>E. coli</i> ATCC 25922		<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	
			Целевые значения	Допустимые значения	Целевые значения	Допустимые значения
Азтреонам	30	0,03-32	0,125	0,06-0,25	4	2-8
Амикацин	30	0,03-32	0,125	0,5-4	2	1-4
Имипенем	10	0,008-8	0,125	0,06-0,25	2	1-4
Колистин	10	0,008-8	0,5-1	0,25-2	1-2	0,5-4
Меропенем	10	0,004-4	0,016-0,03	0,008-0,06	0,5	0,25-1
Тобрамицин	10	0,016-16	0,5	0,25-1	0,5	0,25-1
Цефепим	30	0,008-8	0,03-0,06	0,016-0,125	1-2	0,5-4
Цефтазидим	10	0,016-16	0,125-0,25	0,06-0,5	2	1-4
Ципрофлоксацин	5	0,002-2	0,008	0,004-0,016	0,5	0,25-1

мых концентраций. Диапазон тестируемых концентраций подбирался таким образом, чтобы целевые значения МПК контрольных штаммов находились в центральной части ряда последовательных разведений.

После погружения дисков в пробирку с питательной средой выполняли 30-секундное вортексирование для быстрой элюции АБП в раствор (в предварительной серии экспериментов было показано, что увеличение времени элюции АБП до 20-30 минут не сказывается на результатах определения МПК). Во все лунки 96-луночного планшета вносили по 50 мкл МХБ. В лунки ряда 1 вносили 50 мкл рабочего раствора АБП. С использованием 8-канального дозатора путем последовательного смешивания и переноса 50 мкл жидкости из лунок ряда 1 к лункам ряда 11 готовили двукратные последовательно убывающие разведения АБП. Удаляли 50 мкл жидкости из лунок ряда 11. Лунки ряда 12 использовались в качестве контроля роста культуры. Вносили в лунки 1-12 по 50 мкл МХБ, предварительно инокулированного суспензией 0,5 МакФарланд исследуемого штамма (100 мкл суспензии 0,5 МакФарланд на 9,9 мл МХБ, концентрация микробных клеток 10^6 КОЕ/мл). Финальный объем в каждой из лунок составлял 100 мкл, концентрация микробных клеток 5×10^5 КОЕ/мл. Планшеты закрывали крышками, помещали в герметичные полиэтиленовые пакеты и инкубировали в течение 18 ± 2 ч при 35°C . Учет результатов проводили визуально, сравнивая рост микроорганизма в присутствии АБП с ростом культуры в ячейках ряда 12, не содержащих АБП.

Исследования выполнялись в 6 независимых повторях, в каждом из которых определение МПК для каждого из АБП проводилось четырехкратно. Таким образом, проведено по 24 определения МПК для каждого из АБП в отношении каждого из контрольных штаммов. Исследование выполнялось квалифицированным персоналом лаборатории, имеющим значительный опыт определения чувствительности к АБП методами разведений.

Для оценки возможности внедрения предложенного метода в лабораториях клинической микробиологии параллельно было выполнено определение МПК группой исследователей, не имеющих предыдущего опыта использования метода последовательных разведений (студенты 3 курса медицинского университета). Предварительная подготовка заключалась в однодневном обучении навыкам пипетирования и приготовления последовательных разведений, а также в ознакомлении с протоколом эксперимента на рабочем месте. После обучения студентами самостоятельно было выполнено по 8 определений МПК 9 АБП для двух контрольных штаммов.

Результаты и обсуждение

Результаты определения МПК представлены на Рисунках 2, 3 и в Таблице 2. Раздельно проанализированы результаты, полученные группами исследователей, обозначенными как «Микробиологи» и «Студенты».

Всего получено 576 индивидуальных значений МПК, из них 78,5% относились к категории целевых значений, 20,8% – к категории допустимых значений, 0,7% – к категории недопустимых значений. Точность полученных результатов предсказуемо различалась в сравниваемых группах исследователей (83,3% значений МПК, соответствующих целевым значениям, в группе «Микробиологи» и 63,9% – в группе «Студенты»), вместе с тем, в группе «Студенты» полученные значения МПК выходили за пределы допустимого диапазона только в 5,6% определений.

На основании проведенных исследований разработан лабораторный протокол для определения МПК АБП для энтеробактерий, *A. baumannii* и *P. aeruginosa* методом последовательных разведений с использованием стандартных дисков в качестве источника АБП. В Таблице 3 приведены сведения о диапазоне тестируемых концентраций, а также количестве питательной среды и дисков с АБП, необходимых для приготовления рабочих растворов. Приведенные расчеты ориентированы на получение не менее 400 мкл рабочего раствора АБП, достаточного для выполнения 8 определений МПК.

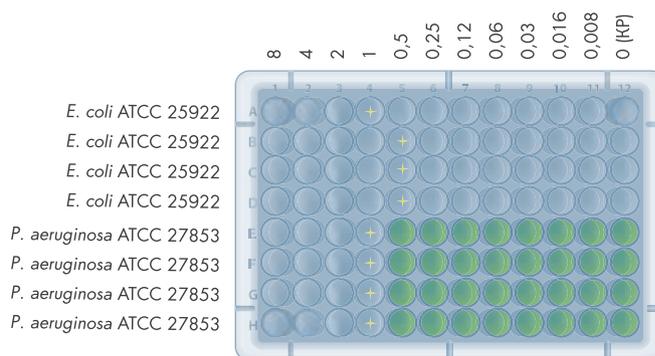


Рисунок 2. Результаты определения МПК колистина для *E. coli* ATCC 25922 и *P. aeruginosa* ATCC 27853, группа «Студенты» (значения МПК соответствуют целевым во всех повторях)

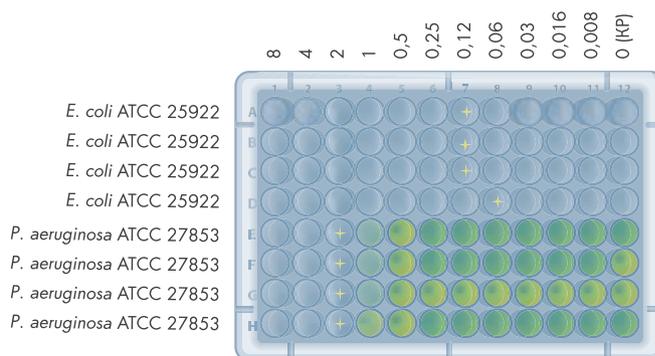


Рисунок 3. Результаты определения МПК имипенема для *E. coli* ATCC 25922 и *P. aeruginosa* ATCC 27853, группа «Студенты» (значения МПК соответствуют целевым в 7 из 8 повторов)

Таблица 2. Согласованность значений МПК, полученных модифицированным методом последовательных микроразведений, с референтными значениями МПК контрольных штаммов

Антибиотик	Группа «Микробиологи»						Группа «Студенты»					
	<i>E. coli</i> ATCC 25922			<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853			<i>E. coli</i> ATCC 25922			<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853		
	Ц	Д	Н	Ц	Д	Н	Ц	Д	Н	Ц	Д	Н
Азтреонам	8	16		24			4	4		8		
Амикацин	24			18	6		8			8		
Имипенем	20	4		24			4	4		8		
Колистин	24			24			8			8		
Меропенем	20	4		16	8			8			4	4
Тобрамицин	24			22	2		8				8	
Цефепим	24			24			6	2			8	
Цефтазидим	24			20	4		8			8		
Ципрофлоксацин	6	18		14	10			8		6	2	
Всего	n	174	42	186	30		46	26		46	22	4
	%	80,6	19,4	86,1	13,9		63,9	36,1		63,9	30,6	5,6

Ц – целевое значение МПК; Д – допустимое значение МПК; Н – недопустимое значение МПК.

Таблица 3. Рекомендации по определению МПК грамотрицательных бактерий и приготовлению рабочих растворов АБП из стандартных дисков

Антибиотик	Содержание в диске, мкг	Диапазон тестируемых концентраций, мкг/мл	Исходная концентрация в МХБ (4х), мкг/мл	Приготовление МХБ с исходной концентрацией	
				Объем МХБ, мкл	Количество дисков, шт.
Азтреонам	30	0,06-64	256	700	6
Амикацин	30	0,06-64	256	700	6
Имипенем	10	0,016-16	64	625	4
Колистин	10	0,016-16	64	625	4
Меропенем	10	0,016-16	64	625	4
Тобрамицин	10	0,016-16	64	625	4
Цефепим	30	0,03-32	128	700	3
Цефтазидим	10	0,016-16	64	625	4
Ципрофлоксацин	5	0,004-4	16	625	2

Заключение

Определение МПК АБП методом разведений в ряде случаев является единственным способом получения микробиологической информации, необходимой для назначения этиотропной терапии заболеваний, вызванных антибиотикорезистентными возбудителями. Предложенный принцип использования стандартных дисков в качестве источника АБП для приготовления рабочих растворов значительно упрощает процедуру тестирования методом последовательных микроразведений и делает её доступной для большинства микробиологических лабораторий. Для выполнения исследований по предложенной схеме не требуется лабораторное оборудование, используемое в классическом методе определения МПК (аналитические весы, низкотемпературные морозильники). В качестве

расходных материалов применяются стандартные диски с АБП, рутинно используемые большинством клинических микробиологических лабораторий.

Показана высокая согласованность результатов определения МПК с референтными значениями МПК АБП для контрольных штаммов, даже в случае выполнения исследований персоналом, не имеющим достаточного опыта работы в микробиологической лаборатории.

Благодарность

Авторы выражают благодарность Эйдельштейну Михаилу Владимировичу, заведующему лабораторией антибиотикорезистентности НИИ антимикробной химиотерапии ФГБОУ ВО «Смоленский государственный медицинский университет» Минздрава России, за помощь в разработке дизайна исследования.

Литература

1. ISO 20776-1:2006 «Clinical laboratory testing and in vitro diagnostic test systems – Susceptibility testing of infectious agents and evaluation of performance of antimicrobial susceptibility test devices». Part 1: Reference method for testing the in vitro activity of antimicrobial agents against rapidly growing aerobic bacteria involved in infectious diseases.
2. National Standard GOST R ISO 20776-1-2010 Clinical laboratory testing and in vitro diagnostic test systems – Susceptibility testing of infectious agents and evaluation of performance of antimicrobial susceptibility test devices. Part 1. Reference method for testing the in vitro activity of antimicrobial agents against rapidly growing aerobic bacteria involved in infectious diseases. Russian. (Национальный Стандарт ГОСТ Р ИСО 20776-1-2010 Клинические лабораторные исследования и диагностические тест-системы in vitro. Исследование чувствительности инфекционных агентов и оценка функциональных характеристик изделий для исследования чувствительности к антимикробным средствам. Часть 1. Референтный метод лабораторного исследования активности антимикробных агентов против быстрорастущих аэробных бактерий, вызывающих инфекционные болезни.).
3. European Centre for Disease Prevention and Control. Antimicrobial resistance surveillance in Europe 2015. Annual Report of the European Antimicrobial Resistance Surveillance Network (EARS-Net). Stockholm: ECDC; 2017. Available at: ecdc.europa.eu/sites/portal/files/media/en/publications/Publications/antimicrobial-resistance-europe-2015.pdf.
4. Central Asian and Eastern European surveillance of antimicrobial resistance. Annual report 2016. Available at: www.euro.who.int/___data/assets/pdf_file/0009/323568/CAESAR-Annual-report-2016.pdf?ua=1.
5. Diene S.M., Rolain J.M. Carbapenemase genes and genetic platforms in Gram-negative bacilli: *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas* and *Acinetobacter* species. *Clin Microbiol Infect.* 2014;20(9):831-838.
6. Falagas M.E., Kasiakou S.K., Kofteridis D.P., Roditakis G., Samonis G. Effectiveness and nephrotoxicity of intravenous colistin for treatment of patients with infections due to polymyxin-only-susceptible (POS) gram-negative bacteria. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2006;25(9):596-599.
7. EUCAST warnings concerning antimicrobial susceptibility testing products or procedures. Available at: http://www.eucast.org/ast_of_bacteria/warnings/.
8. Vasoo S. Susceptibility testing for the polymyxins: two steps back, three steps forward? *J Clin Microbiol.* 2017;55(9):2573-2582.
9. Chew K.L., La M.V., Lin R.T.P., Teo J.W.P. Colistin and polymyxin B susceptibility testing for carbapenem-resistant and mcr-positive *Enterobacteriaceae*: comparison of Sensititre, MicroScan, Vitek 2, and Etest with broth microdilution. *J Clin Microbiol.* 2017;55(9):2609-2616.
10. European Committee on Antimicrobial Susceptibility testing (EUCAST). Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Ver. 8.0 2018. Available at: www.eucast.org/clinical_breakpoints/.
11. Kuti J.L. Optimizing antimicrobial pharmacodynamics: a guide for your stewardship program. *Revista Médica Clínica Las Condes.* 2016;27(5):615-624.
12. Daikos G.L., Markogiannakis A. Carbapenemase-producing *K. pneumoniae*: (when) might we still consider treating with carbapenems? *Clin Microbiol Infect.* 2011;17:1135-1141.
13. Grupper M., Kuti J.L., Nicolau D.P. Continuous and prolonged intravenous β -lactam dosing: implications for the clinical laboratory. *Clin Microbiol Rev.* 2016;29(4):759-772.
14. Drusano G.L., Louie A. Optimization of aminoglycoside therapy. *Antimicrob Agents Chemother.* 2011;55(6):2528-2531.
15. Flowers D.J. Use of sensitivity discs as primary antibiotic standards in MIC determination. *J Clin Pathol.* 1978;31(9):855-858.