

На правах рукописи

СТЕЦЮК Ольга Ульяновна

**ЗАВИСИМОСТЬ ФАРМАКОДИНАМИЧЕСКИХ ПАРАМЕТРОВ
АНТИБИОТИКОВ ОТ УСЛОВИЙ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ
БАКТЕРИАЛЬНЫХ ВОЗБУДИТЕЛЕЙ ВНЕБОЛЬНИЧНЫХ И
ГОСПИТАЛЬНЫХ ИНФЕКЦИЙ**

14.00.42 - клиническая фармакология

03.00.07 - микробиология

А в т о р е ф е р а т
диссертации на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Смоленск – 2000

Работа выполнена в Смоленской государственной медицинской академии.

НАУЧНЫЙ РУКОВОДИТЕЛЬ:

доктор медицинских наук, профессор **Л. С. Страчунский.**

НАУЧНЫЙ КОНСУЛЬТАНТ:

доктор медицинских наук, профессор **С. В. Сидоренко.**

ОФИЦИАЛЬНЫЕ ОППОНЕНТЫ:

доктор медицинских наук, профессор **А. Н. Цой;**

доктор биологических наук, профессор **Л. К. Катосова.**

Ведущая организация: Волгоградская государственная медицинская академия.

Защита диссертации состоится “ _____ ” _____ 2000 г.
в _____ часов на заседании диссертационного совета К084.34.02 Смоленской государственной медицинской академии (214019, г. Смоленск, ул. Крупской, д. 28).

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Смоленской государственной медицинской академии.

Автореферат разослан “ _____ ” _____ 2000 г.

**Ученый секретарь диссертационного совета,
кандидат медицинских наук, доцент**

Т. Г. СТЕПИНА

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы. Эффективное использование антибиотиков невозможно без учета их фармакодинамических характеристик, позволяющих прогнозировать клиническую эффективность терапии и разрабатывать новые более эффективные препараты. С точки зрения фармакодинамики антибиотики представляют собой уникальную группу лекарственных средств, так как действуют в системе, состоящей из трех взаимодействующих между собой компонентов “организм человека - микроорганизм - лекарственный препарат” (O. Cars, 1996). Поэтому фармакодинамика антибиотиков прежде всего подразумевает их действие на микроорганизмы, а также изменение их активности в зависимости от механизмов резистентности (Г.К. Решедько, 1997) и уже во вторую очередь - их непосредственные и опосредованные эффекты на клетки и физиологические функции организма человека.

Фармакодинамика антибактериальных препаратов реализуется на двух уровнях. Первый - это взаимодействие антибиотика с микроорганизмом *in vitro*, а второй - *in vivo*, что оценивается по результатам экспериментов на животных и в клинике. Клиническая эффективность антибиотиков не является прямым отражением их активности *in vitro*, однако, исследования I уровня (*in vitro*) служат основой для прогнозирования клинического эффекта, а чувствительность микроорганизма к антибиотику является одним из наиболее важных с практической точки зрения фармакодинамических параметров, определяющих его антимикробную активность (W. Craig, 1998, J.J. Schentag et al., 1985, J.J. Schentag, 1999).

Диско-диффузионный метод является наиболее простым и широко используемым способом определения чувствительности микроорганизмов к антибиотикам. Однако на результаты определения чувствительности влияют многие факторы, такие как состав, pH (R.E. Bryant et al., 1992, E.T. Houang, 1983, C. Konig et al., 1993), толщина слоя (A.W. Bauer et al., 1966, C.L. Dunsmoor et al., 1971) и влажность (L.D. Bourgeois et al., 1965) питательной среды, содержание в ней двухвалентных катионов Ca^{2+} , Mg^{2+} , Zn^{2+} (особенно при тестировании *Pseudomonas aeruginosa*) (С.М. Чайковская, 1981, R.F. D'Amato et al., 1975, L.P. Garrod et al., 1969), тимина и тимидина (S.R.M. Bushby, 1973, A.E. Koch, J.J. Burchall, 1971), условия культивирования (температура, атмосфера) (A.L. Barry et al., 1984, K.E. Cooper, 1964), скорость диффузии антибиотика в агар и т.д. Поэтому исследование чувствительности микроорганизмов к антибиотикам требует использования определенной питательной среды, строгого соблюдения условий тестирования,

правильного и регулярного проведения процедур по контролю качества (J. Vandepitte et al., 1991).

В России основной питательной средой для определения чувствительности служит среда АГВ, а нормативным документом, определяющим процедуру тестирования, “Методические указания по определению чувствительности микроорганизмов к антибиотикам методом диффузии в агар с использованием дисков” Минздрава СССР 1983 г. Однако этот документ не охватывает определения чувствительности к современным антибактериальным препаратам, методики тестирования микроорганизмов со сложными питательными потребностями (стрептококки, пневмококки, гемофильная палочка) и выявления клинически значимых механизмов резистентности (метициллинрезистентности у стафилококков, пенициллинрезистентности у пневмококков и др.)

В международной практике для определения чувствительности используется агар Мюллера-Хинтон (МХА), для которого подробно разработаны методики тестирования различных возбудителей и критерии интерпретации результатов для большого набора современных антибиотиков (J.H. Mueller, J. Hinton, 1941, National Committee for Clinical Laboratory Standards, 1998, J. Vandepitte et al., 1991, World Health Organization, 1997).

В настоящее время приобретение импортного агара Мюллера-Хинтон для большинства российских лабораторий малореально. В то же время не изучено влияние среды АГВ на фармакодинамические параметры антибиотиков и, в связи с этим, не показана возможность ее использования вместо МХА для определения чувствительности ко многим современным антибактериальным препаратам (ингибитор-защищенным пенициллинам, цефалоспорином, карбапенемам, фторхинолонам, современным аминогликозидам и макролидам и т.д.) и не разработаны критерии интерпретации получаемых результатов. Таким образом, результаты определения чувствительности, получаемые в настоящее время на среде АГВ, во многих случаях не являются стандартизированными, а следовательно, воспроизводимыми и сравнимыми. Это зачастую вызывает сомнения в их достоверности и делает невозможной их правильную клиническую интерпретацию, что в конечном итоге может неблагоприятно влиять на качество лечения пациентов.

Цель исследования. Изучить зависимость фармакодинамических параметров современных антибиотиков от вида питательной среды, используемой при тестировании микроорганизмов диско-диффузионным методом, оценить качество определения чувствительности в бактериологических лабораториях России и, ис-

ходя из этого, установить возможность использования отечественной среды АГВ вместо агара Мюллера-Хинтон с применением международных критериев интерпретации результатов.

Задачи исследования.

1. В сравнительном аспекте определить зависимость фармакодинамических параметров исследуемых антибиотиков от вида питательной среды (АГВ или МХА), используемой для определения чувствительности клинических штаммов микроорганизмов диско-диффузионным методом.
2. Установить возможности и ограничения использования среды АГВ вместо МХА для оценки антимикробной активности антибиотиков *in vitro* в отношении различных групп микроорганизмов с использованием международных критериев интерпретации результатов, разработанных для МХА.
3. Оценить качество определения чувствительности микроорганизмов к антибиотикам в бактериологических лабораториях Российской Федерации.
4. Обосновать пути улучшения качества определения чувствительности бактериальных возбудителей внебольничных и госпитальных инфекций к различным антибиотикам диско-диффузионным методом с целью повышения клинической эффективности антибактериальной химиотерапии.

Научная новизна исследования.

Впервые:

- в сравнительном аспекте *in vitro* изучена зависимость фармакодинамических параметров современных антибиотиков от вида питательной среды (АГВ или МХА), используемой для определения чувствительности бактериальных возбудителей внебольничных и госпитальных инфекций диско-диффузионным методом, и установлено, что среда АГВ в сравнении с МХА не влияет на фармакодинамические параметры всех исследованных антибиотиков (кроме триметоприма/сульфаметоксазола) в отношении микроорганизмов семейства *Enterobacteriaceae* и *Acinetobacter* spp.; тикарциллина/клавуланата и цефалоспоринов (цефоперазон, цефодизим, цефпиром) против *P.aeruginosa*; макролидов и офлоксацина при тестировании *S.pneumoniae*, оксациллина при скрининге пенициллинорезистентности у пневмококков;
- показано, что при определении чувствительности диско-диффузионным методом среда АГВ в сравнении с МХА существенно изменяет активность имипенема, аминогликозидов (нетилмицин, амикацин) и фторхинолонов в отношении

P.aeruginosa; имипенема и современных макролидов в отношении *Staphylococcus* spp.; макролидов в отношении *S.pyogenes*;

- доказано, что варианты питательных сред на основе АГВ при тестировании *H.influenzae* существенно изменяют фармакодинамические параметры всех antimicrobных препаратов в сравнении с референтной средой НТМ.

Практическая ценность работы.

- Подтверждено, что отечественная среда АГВ может быть использована вместо импортного МХА для определения чувствительности микроорганизмов семейства *Enterobacteriaceae* и *Acinetobacter* spp. к антибиотикам различных классов (за исключением триметоприма/сульфаметоксазола) диско-диффузионным методом с использованием международных критериев интерпретации результатов.
- Доказано, что среда АГВ, обогащенная 5% дефибринированной человеческой крови (ДЧК), эквивалентна МХА с 5% дефибринированной бараньей крови (ДБК) при скрининге пенициллинорезистентности у *S.pneumoniae* с 1 мкг оксациллина, а также пригодна для определения чувствительности пневмококков к макролидам и офлоксацину.
- Результаты проведенного исследования позволяют исключить варианты тестирования диско-диффузионным методом на среде АГВ, приводящие к получению недостоверных результатов: исследование активности триметоприма/сульфаметоксазола в отношении всех видов микроорганизмов; определение чувствительности *H.influenzae*; оценку фармакодинамических параметров имипенема, аминогликозидов и фторхинолонов в отношении *P.aeruginosa*; макролидов в отношении *S.pyogenes*; имипенема и современных макролидов в отношении *Staphylococcus* spp., а также выявление метициллинорезистентности у стафилококков.

Основные положения, выносимые на защиту.

1. Фармакодинамические параметры антибиотиков, определяемые *in vitro*, зависят от вида используемой питательной среды и условий проведения тестирования.
2. Знание зависимости фармакодинамических параметров антибиотиков от вида питательной среды и условий тестирования позволяет повысить качество определения чувствительности микроорганизмов.

Внедрение результатов работы в практику. Практические рекомендации, разработанные в диссертации, используются в работе бактериологической лабо-

ратории Смоленской областной клинической больницы и микробиологической лаборатории Смоленского областного центра госсанэпиднадзора. Основные положения работы излагаются при проведении занятий со студентами на кафедрах клинической фармакологии и антимикробной химиотерапии, микробиологии Смоленской государственной медицинской академии, курсах специализации и повышения квалификации врачей-бактериологов при Смоленском областном Центре госсанэпиднадзора, на семинарах Межрегиональной ассоциации по клинической микробиологии и антимикробной химиотерапии (МАКМАХ).

Апробация работы. Результаты исследования доложены на 8 Международном конгрессе по инфекционным болезням (Бостон, 1998 г.), на Краснодарском краевом научно-практическом семинаре “Принципы рациональной антимикробной терапии” (Краснодар, 1998 г.), Европейском конгрессе по клинической микробиологии и инфекционным болезням (Берлин, 1999 г.), конференции молодых ученых Смоленской государственной медицинской академии (1999 г.), а также межкафедральном заседании СГМА (2000 г.).

По материалам диссертации опубликовано 7 научных работ, из них 2 - в зарубежной печати.

Структура и объём работы. Диссертация изложена на 152 страницах машинописи и состоит из введения, обзора литературы, собственных исследований, результатов и обсуждения полученных данных, заключения, выводов и научно-практических рекомендаций. Работа иллюстрирована 38 таблицами и 4 рисунками. Список литературы состоит из 187 источников, из них 40 отечественных и 147 иностранных.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материалы и методы исследования. Изучение зависимости фармакодинамических параметров от вида питательной среды при определении чувствительности микроорганизмов диско-диффузионным методом было проведено для 19 антибактериальных препаратов 9 классов, включающих: пенициллины (оксациллин), ингибитор-защищенные пенициллины (ампициллин/сульбактам, амоксициллин/клавуланат, тикарциллин/клавуланат), цефалоспорины (цефоперазон, цефодизим, цефпиром), карбапенемы (имипенем), аминогликозиды (нетилмицин, амикацин), макролиды (klarитромицин, рокситромицин, азитромицин), линкосамиды

(клиндамицин), фторхинолоны (ципрофлоксацин, норфлоксацин, офлоксацин, пефлоксацин), антифолаты (триметоприм/сульфаметоксазол).

В работе были использованы клинические штаммы микроорганизмов, выделенные в 1995-98 гг. в бактериологических лабораториях Смоленского областного Центра госсанэпиднадзора, Смоленской областной клинической больницы и лечебных учреждениях других городов Российской Федерации. Выбор видов микроорганизмов, включенных в исследование, определялся спектром активности исследуемых антибиотиков.

Для исследования зависимости фармакодинамических параметров антибиотиков от используемой питательной среды в одинаковых условиях параллельно проводили тестирование на АГВ (НПО "Питательные среды", Махачкала, Россия) и МХА (BBL, США) диско-диффузионным методом в соответствии с рекомендациями Национального комитета по клиническим лабораторным стандартам (NCCLS), США, 1998 г. Определение чувствительности проводили дважды для оценки воспроизводимости результатов во времени и использовали две серии АГВ для оценки воспроизводимости результатов на разных партиях этого агара (рис. 1).

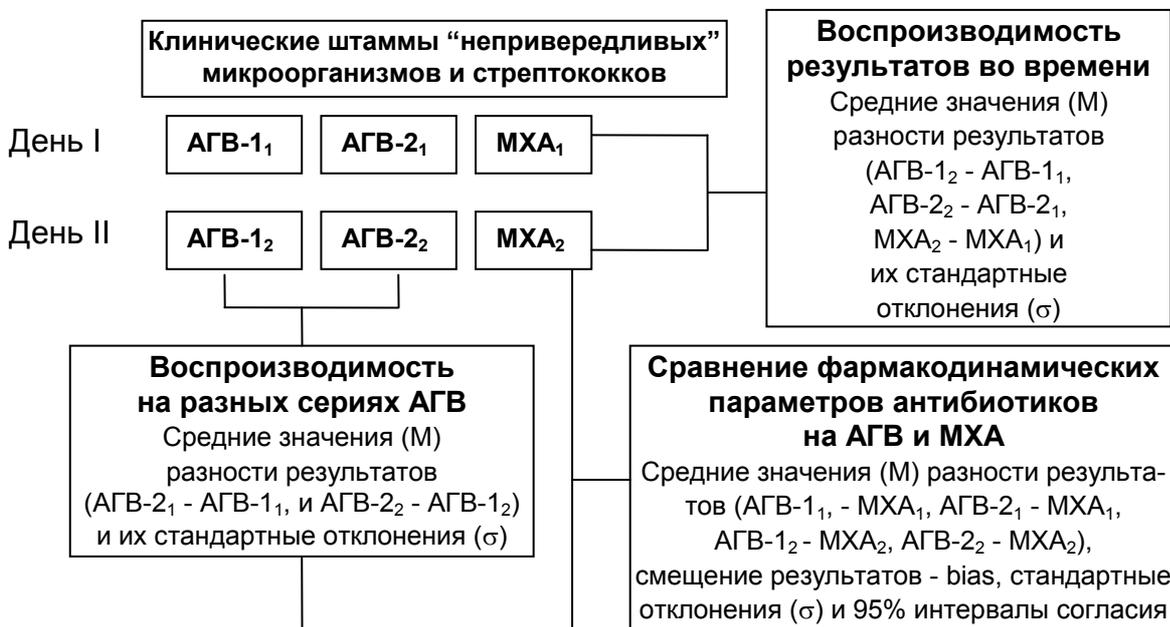


Рис. 1. Схема проведения исследования

При тестировании *S.pneumoniae* и *S.pyogenes* МХА обогащали 5% ДБК, а АГВ - 5% ДЧК. При тестировании *H.influenzae* референтной средой служил агар Наemophilus Test Medium (НТМ), а исследуемыми средами были: шоколадный

агар на основе АГВ и 5% ДЧК (АГВш) и среда АГВ со специальными добавками (дрожжевой экстракт 5 мг/мл, гематин 15 мкг/мл и НАД 15 мкг/мл) (АГВд).

Статистический анализ результатов проводили по методу Альтмана (D.G. Altman, 1991). Пригодность среды АГВ для тестирования определяли по среднему значению (M) разности результатов, полученных на АГВ и МХА, стандартному отклонению (σ), и 95% интервалу согласия ($M \pm 2\sigma$) (рис. 1). Допустимыми считали значение $\sigma \leq 1,5$ мм и границы 95% интервала согласия в пределах ± 3 мм. Кроме того рассчитывали количество и степень ошибок в интерпретации результатов на АГВ в сравнении с МХА. Допустимым считалось получение не более 5% малых, 3% больших (ложная резистентность) и 1,5% очень больших (ложная чувствительность) ошибок.

Для оценки качества определения чувствительности микроорганизмов к антибиотикам в бактериологических лабораториях России под эгидой МАКМАХ была проведена программа внешнего контроля качества (ВКК). Программа ВКК включала тестирование двух контрольных штаммов с известными фенотипами чувствительности (*E.coli* ATCC 25922 и *S.aureus* ATCC 25923) в течение 10 последовательных дней и однократное определение чувствительности 4 штаммов с неизвестными фенотипами резистентности, предоставленных Всемирной организацией здравоохранения (ВОЗ) (*K.pneumoniae* WHO-1, *S.aureus* WHO-2, *E.faecium* WHO-3 и *E.cloacae* WHO-5) для оценки точности результатов.

При статистическом анализе определяли частоту и степень отклонения результатов тестирования *E.coli* ATCC 25922 и *S.aureus* ATCC 25923 от допустимых диапазонов значений, а также достоверность различий результатов, полученных на АГВ и МХА, с помощью парного критерия Стьюдента. Для оценки точности однократного тестирования *K.pneumoniae* WHO-1, *S.aureus* WHO-2, *E.faecium* WHO-3 и *E.cloacae* WHO-5 рассчитывали частоту ошибок в интерпретации результатов определения чувствительности (L. Martinez-Martinez et al., 1995, D.J. Biedenbach et al., 1997), используя в качестве референтных результаты тестирования Центров по контролю за заболеваниями (CDC), США.

Результаты исследования и их обсуждение

Количество штаммов микроорганизмов, использованных для изучения зависимости фармакодинамических параметров антибиотиков от вида питательной среды, составило от 93 до 311 в зависимости от спектра активности исследуемого

антимикробного препарата. Всего была протестирована 3701 комбинация “антибиотик - микроорганизм”.

Поскольку методика определения чувствительности к антибиотикам была различной для “непривередливых” и “привередливых” микроорганизмов, и были выявлены явные отличия в результатах исследования для разных видов бактерий, отдельно был проведен анализ для шести групп: 1) *Enterobacteriaceae* и *Acinetobacter* spp., 2) *P.aeruginosa*, 3) *Staphylococcus* spp., 4) *S.pneumoniae*, 5) *S.pyogenes*, 6) *H.influenzae*.

Воспроизводимость результатов тестирования во времени. Для исследованных групп микроорганизмов диаметры зон подавления роста, полученные при первом и втором тестировании со всеми антибактериальными препаратами, за исключением триметоприма/сульфаметоксазола, на МХА и каждой серии АГВ, были близки - значения σ в большинстве случаев $\leq 1,5$ мм (табл. 1).

Таблица 1. Воспроизводимость во времени результатов тестирования *Enterobacteriaceae* и *Acinetobacter* spp., *P.aeruginosa*, *Staphylococcus* spp., *S.pneumoniae*, *S.pyogenes*

Антибиотики	Стандартное отклонение σ , мм	
	МХА*	АГВ*
Все, кроме триметоприма/сульфаметоксазола	0,23 – 1,26	0,36 – 1,45
Триметоприм/сульфаметоксазол	0,45 – 0,81	1,92 – 2,88

* - При тестировании *S.pneumoniae* и *S.pyogenes* МХА обогащали 5% ДБК, а АГВ – 5% ДЧК.

Таким образом, полученные значения стандартного отклонения подтверждают хорошую воспроизводимость результатов тестирования во времени и удовлетворительное качество определения чувствительности.

При определении чувствительности *H.influenzae* на различных вариантах среды АГВ были получены более значительные различия в диаметрах зон подавления роста, определенных в разные дни (табл. 2), что, прежде всего, объясняется природными особенностями этого “привередливого” микроорганизма, рост которого на питательных средах в значительной степени варьирует при минимальных изменениях условий тестирования (F. Crocaert et al., 1995).

Более значительные различия в диаметрах зон подавления роста при определении чувствительности всех видов микроорганизмов к триметоприму/

сульфаметоксазолу на АГВ, вероятно, связаны с недопустимо высоким содержанием в ней тимина и тимидина, что привело к получению переменных результатов тестирования в разные дни, и подтверждается результатами сравнения фармакодинамических параметров этого антимикробного препарата на АГВ и МХА.

Таблица 2. Воспроизводимость во времени результатов тестирования *H.influenzae*

Антибиотики	Стандартное отклонение σ , мм		
	НТМ	АГВш	АГВд
Все, кроме триметоприма/сульфаметоксазола	0,98 – 1,47	1,36 – 1,71	1,25 – 1,83
Триметоприм/сульфаметоксазол	0,91	3,42 – 3,78	3,94 – 4,03

Воспроизводимость результатов на разных сериях АГВ. Фармакодинамические параметры всех исследованных антибактериальных препаратов, за исключением триметоприма/сульфаметоксазола, определенные на различных сериях АГВ, не имели существенных различий (табл. 3 и 4).

Таблица 3. Воспроизводимость результатов тестирования *Enterobacteriaceae* и *Acinetobacter* spp., *P.aeruginosa*, *Staphylococcus* spp., *S.pneumoniae*, *S.pyogenes* на разных сериях АГВ

Антибиотики	Стандартное отклонение σ , мм
Все, кроме триметоприма/сульфаметоксазола	0,35 – 1,00
Триметоприм/сульфаметоксазол	1,94 – 2,32

При определении чувствительности к триметоприму/сульфаметоксазолу энтеробактерий, стафилококков, пневмококков и гемофильной палочки были получены более значительные различия в диаметрах зон подавления роста на разных сериях АГВ, что свидетельствует о недостаточной стандартизации ее состава по содержанию тимина и тимидина.

Однако хорошая воспроизводимость результатов тестирования к остальным исследованным антибактериальным препаратам позволяет сделать заключение о высокой стабильности состава различных партий АГВ производства НПО “Питательные среды” (Махачкала, Россия) по другим параметрам (рН, содержание катионов и т.п.) и удовлетворительной стандартизации процесса ее производ-

ленного изготовления. Таким образом, вариабельность состава АГВ не оказывает существенного влияния на качество определения чувствительности в бактериологических лабораториях России.

Таблица 4. Воспроизводимость результатов тестирования *H.influenzae* на разных сериях АГВ

Антибиотики	Стандартное отклонение σ , мм	
	АГВш	АГВд
Все, кроме триметоприма/сульфаметоксазола	0,81 – 1,49	0,86 – 1,52
Триметоприм/сульфаметоксазол	3,04	3,73

Сравнение фармакодинамических параметров антибиотиков, определенных на АГВ и МХА. Результаты сравнения фармакодинамических параметров антибиотиков в отношении различных микроорганизмов на АГВ и МХА существенно зависели от вида тестируемого микроорганизма и особенностей антимикробного препарата.

При тестировании на АГВ микроорганизмов семейства *Enterobacteriaceae* и рода *Acinetobacter* фармакодинамические параметры всех антибиотиков, кроме триметоприма/сульфаметоксазола, существенно не отличались от полученных на МХА (табл. 5).

Таблица 5. Сравнение фармакодинамических параметров антибиотиков в отношении *Enterobacteriaceae* и *Acinetobacter* spp. на АГВ и МХА

Антибиотики	M, мм	σ , мм	95% интервал согласия
Все, кроме триметоприма/сульфаметоксазола	-0,36 – +0,36	0,82 – 1,53	-2,78 – 3,36
Триметоприм/сульфаметоксазол	-18,01	13,26	-44,54 – 8,5

При тестировании триметоприма/сульфаметоксазола на АГВ диаметры зон подавления роста микроорганизмов были значительно меньше, чем на референтном МХА, что обусловило недопустимо высокую частоту получения ложно резистентных результатов (больших ошибок в интерпретации результатов) при определении чувствительности к этому антимикробному препарату на АГВ (табл. 6).

Это явление может быть объяснено высоким содержанием тимина и тимидина в питательной среде, являющихся антагонистами действия антифолатов

(сульфаниламидов и триметоприма) (R. Ferone et al., 1975, A.E. Koch, J.J. Burchall, 1971, A. Stokes, R.W. Lacey, 1978).

Таблица 6. Интерпретация результатов определения чувствительности *Enterobacteriaceae* и *Acinetobacter* spp. к антибиотикам на АГВ и МХА

Антибиотики	Согласие, %	Ошибки, %		
		Малые	Большие	Очень большие
Все, кроме триметоприма/сульфаметоксазола	88,1 – 100	0 – 11,9	0 – 0,7	0
Триметоприм/сульфаметоксазол	33	4,3	62,7	0

Для подтверждения этого на АГВ был протестирован контрольный штамм *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, который служит маркером содержания тимина и тимидина в питательных средах для определения чувствительности. При определении чувствительности *E.faecalis* ATCC 29212 на МХА были получены зоны подавления роста более 21 мм вокруг диска с триметопримом/сульфаметоксазолом, а на АГВ различных серий зоны ингибиции не образовывались. Необходимо отметить, что добавление в АГВ 5% лизированной лошадиной крови, содержащей фермент тимидин-фосфорилазу, не приводило к восстановлению образования зон подавления роста. Это свидетельствует о наличии высоких (>25 мг/л) концентраций тимидина в питательной среде (S.R.M. Bushby, 1973, R. Ferone et al., 1975, C. Jones, 1987).

При определении фармакодинамических параметров антибактериальных препаратов в отношении синегнойной палочки на АГВ результаты существенно не отличались от полученных на МХА для тикарциллина/клавуланата и исследованных цефалоспоринов – цефоперазона, цефодизима и цефпирома (табл. 7).

Таблица 7. Сравнение фармакодинамических параметров антибиотиков в отношении *P.aeruginosa* на АГВ и МХА

Антибиотики	М, мм	σ , мм	95% интервал согласия
Тикарциллин/клавуланат, Цефалоспорины	0,19 – 0,49	0,52 – 1,34	-2,56 – 3,17
Имипенем	-1,92	1,69	-5,30 – 1,46
Аминогликозиды	1,74 – 3,26	1,79 – 3,18	-3,10 – 9,62
Фторхинолоны	1,11 – 1,21	1,67 – 1,89	-2,62 – 4,94

При тестировании аминогликозидов (нетилмицина и амикацина) и фторхинолонов (ципрофлоксацина, норфлоксацина, офлоксацина и пефлоксацина) на АГВ было обнаружено положительное смещение результатов относительно референтного МХА (табл. 7).

Таким образом, при определении чувствительности *P.aeruginosa* к указанным антибиотикам на АГВ формируются зоны подавления роста большего диаметра, чем на МХА, что может приводить к получению ложно чувствительных результатов (очень больших ошибок), недооценке истинной частоты резистентности к аминогликозидам и фторхинолонам и назначению неэффективных антибиотиков для терапии синегнойной инфекции, что крайне неблагоприятно с клинической точки зрения (табл. 8).

При определении чувствительности штаммов синегнойной палочки к имипенему на АГВ были получены меньшие зоны подавления роста, чем на МХА. Отрицательное смещение результатов на АГВ в сравнении с МХА указывает на возможность получения ложной резистентности *P.aeruginosa* к имипенему при тестировании на АГВ (табл. 7 и 8).

Таблица 8. Интерпретация результатов определения чувствительности *P.aeruginosa* к антибиотикам на АГВ и МХА

Антибиотики	Согласие, %	Ошибки, %		
		Малые	Большие	Очень большие
Тикарциллин/клавуланат	91	9	0	0
Цефоперазон	97,5	2,5	0,5	0
Имипенем	90,5	8	1,5	0
Аминогликозиды	66 – 88,5	8 – 17	0	3,5 – 17
Фторхинолоны	88,5 – 90	9,5 – 10	0	0,5 – 1,5

Основными факторами, способными повлиять на результаты определения чувствительности синегнойной палочки к аминогликозидам, фторхинолонам и имипенему, могут быть pH (J. Blaser et al., 1986, J. Blaser, R. Luthy, 1988, L.D. Sabath, 1982, J.T. Smith, N.T. Ratcliffe, 1985) и содержание двухвалентных катионов Ca^{2+} , Mg^{2+} и Zn^{2+} (С.М. Чайковская и др., 1981, R.F. D'Amato et al., 1975, L.P. Garrod, P.M. Waterworth, 1969, D. Birkenhead et al., 1995) в питательной среде для определения чувствительности.

При проведении химического анализа (рН и определение катионов Ca^{2+} , Mg^{2+} и Zn^{2+} методом атомной абсорбционной спектрофотометрии) двух партий АГВ и МХА было обнаружено, что рН агаров соответствовали рекомендациям производителей и составляли 7,6, 7,6 и 7,2, соответственно. В АГВ двух партий содержание различных катионов в два и более раза превышало аналогичные показатели МХА и составило: Ca^{2+} - 100,2, 100,2 и 56,1 мг/л, Mg^{2+} - 40,13, 42,84 и 11,34 мг/л и Zn^{2+} - 155, 155 и 56,1 мг/л, соответственно.

Полученные данные свидетельствуют о невозможности использования международных критериев интерпретации результатов, разработанных для МХА, при тестировании штаммов *P.aeruginosa* к имипенему, аминогликозидам и фторхинолонам на АГВ. Однако высокая стабильность физико-химических показателей и хорошая воспроизводимость результатов на разных партиях АГВ позволяют предположить возможность разработки отечественных критериев интерпретации результатов определения чувствительности синегнойной палочки к указанным антибиотикам.

Результаты тестирования стафилококков с ампициллином/сульбактамом, амоксициллином/клавуланатом, клиндамицином и фторхинолонами на АГВ и МХА были близки. Однако, фармакодинамические параметры имипенема, макролидов (klarитромицин, рокситромицин, азитромицин) и триметоприма/сульфаметоксазола, определенные на АГВ, значительно отличались от полученных на МХА (табл. 9).

Таблица 9. Сравнение фармакодинамических параметров антибиотиков в отношении *Staphylococcus* spp. на АГВ и МХА

Антибиотики	M, мм	σ , мм	95% интервал согласия
Ампициллин/сульбактам Амоксициллин/клавуланат	-0,07 – 0,05	0,50 – 0,75	-1,45 – 1,55
Имипенем	-1,07	1,90	-4,87 – 2,73
Клиндамицин	0,04	0,63	-1,22 – 1,30
Макролиды	1,86 – 2,38	2,92 – 3,20	-4,04 – 8,76
Фторхинолоны	0,04 – 0,81	0,75 – 1,22	-1,93 – 3,25
Триметоприм/ сульфаметоксазол	-1,72	11,63	-30,46 – 16,04

При тестировании макролидов следует учитывать, что у стафилококков имеет место перекрестная резистентность ко всем 14- и 15-членным представи-

телям этого класса антибиотиков. Поэтому для рутинной лабораторной практики достаточно проводить определение чувствительности только к эритромицину, являющемуся «класс-диск» для этой группы антибиотиков, и для которого разработаны отечественные критерии интерпретации результатов тестирования на АГВ (Методические указания Минздрава СССР, 1983 г.). По результатам определения чувствительности к эритромицину можно оценить антибактериальную активность новых 14-членных макролидов и азитромицина в отношении *Staphylococcus* spp.

При тестировании стафилококков принципиально важно определить, является штамм метициллиночувствительным или метициллинорезистентным, что позволяет оценить активность всех β -лактамов и ряда других препаратов против этого возбудителя. Поэтому наиболее важными следует считать данные о непригодности АГВ для достоверного выявления этого механизма резистентности стафилококков методом скрининга (А. Dekhnitch, et. al., 1999). Так при проведении скрининга на АГВ с 6 мг/л оксациллина невозможно выявить до 25% метициллинорезистентных стафилококков после 24 ч и более 15% - после 48 ч инкубации.

Таким образом, существует настоятельная потребность в разработке отечественных рекомендаций по выявлению метициллинорезистентности у *Staphylococcus* spp., что позволит правильно оценивать чувствительность стафилококков ко всем β -лактамным антибиотикам, в том числе имипенему.

При определении чувствительности пневмококков на АГВ + 5% ДЧК и МХА + 5% ДБК фармакодинамические параметры антибиотиков, за исключением триметоприма/сульфаметоксазола, были сходны (табл. 10).

Таблица 10. Сравнение фармакодинамических параметров антибиотиков в отношении *S.pneumoniae* на АГВ + 5% ДЧК и МХА + 5% ДБК

Антибиотики	M, мм	σ , мм	95% интервал согласия
Оксациллин	0,57	1,10	-1,63 – 2,77
Клиндамицин	0,37	1,20	-2,03 – 2,77
Макролиды	0,04 – 0,40	0,50 – 0,74	-0,96 – 1,14
Офлоксацин	0,29	0,63	-0,97 – 1,55
Триметоприм/ сульфаметоксазол	-15,13	12,32	-39,77 – 9,51

Особенно важным следует считать получение аналогичных результатов при скрининге пенициллинорезистентности у пневмококков с 1 мкг оксациллина на АГВ с 5% ДЧК и МХА с 5% ДБК. Всего было протестировано 93 штамма

S.pneumoniae, из которых 27 (29%) обладали промежуточным уровнем резистентности к пенициллину. При этом только в двух случаях из 186 определений (1,1%) на АГВ не была выявлена пенициллинорезистентность в сравнении с МХА.

Однако, тот же вариант питательной среды - АГВ + 5% ДЧК значительно влияет на определяемые *in vitro* фармакодинамические параметры макролидов при тестировании *S.pyogenes* в сравнении с МХА + 5% ДБК ($M = 0,83 - 3,49$ мм; $\sigma = 1,17 - 2,19$ мм; 95% интервал согласия от $-3,05$ до $7,86$ мм). Поэтому необходим поиск питательной среды, обеспечивающей хороший рост пиогенных стрептококков, для правильной оценки фармакодинамических параметров антибиотиков в отношении этого «привередливого» микроорганизма.

Исследованные варианты питательных сред для тестирования *H.influenzae* на основе АГВ (АГВш и АГВд) значительно изменяли фармакодинамические параметры всех исследованных антибиотиков по сравнению с референтной средой НТМ (табл. 11). Следовательно, при использовании международных критериев интерпретации результатов определения чувствительности гемофильной палочки, полученных на шоколадном АГВ или АГВ с добавками, допускается большое количество ошибок в оценке антимикробной активности препаратов.

Таблица 11. Сравнение фармакодинамических параметров антибиотиков в отношении *H.influenzae* на АГВш, АГВд и НТМ

Среда	Антибиотики	M, мм	σ , мм	95% интервал согласия
АГВш vs НТМ	Все, кроме триметоприма/сульфаметоксазола	-2,29 – -0,53	1,72 – 2,86	-7,17 – 4,56
	Триметоприм/сульфаметоксазол	-14,82	13,24	-41,30 – 11,66
АГВд vs НТМ	Все, кроме триметоприма/сульфаметоксазола	0,09 – 2,29	1,74 – 4,09	-7,55 – 8,81
	Триметоприм/сульфаметоксазол	-12,93	10,29	-33,51 – 7,65

Возможным решением проблемы может быть более широкое использование интерпретационного учета результатов определения чувствительности *H.influenzae* (P. Courvalin, 1996) и эпидемиологических данных по ее антибиотикорезистентности в определенном регионе. На сегодняшний день все штаммы *H.influenzae* чувствительны к цефалоспорином III поколения, фторхинолонам и азитромицину (D. Felmingham, R.N. Gruneberg, 1999, O.I. Kretchikova, 1999).

С клинической точки зрения наиболее важно выявлять ампициллинорезистентные *H.influenzae* и определять, продуцирует ли штамм β-лактамазы или является β-лактамазонегативным ампициллинорезистентным (БЛНАР). Поэтому для рутинной работы российских бактериологических лабораторий достаточно внедрить в практику использование теста с нитроцефином для выявления β-лактамаз (выполняется на обычном шоколадном агаре) и разработать отечественную методику и критерии интерпретации определения чувствительности *H.influenzae* к ампициллину диско-диффузионным методом.

Результаты программы ВКК выявили неудовлетворительное качество определения чувствительности “непривередливых” микроорганизмов (*E.coli* ATCC 25922 и *S.aureus* ATCC 25923, *K.pneumoniae* WHO-1, *S.aureus* WHO-2, *E.faecium* WHO-3 и *E.cloacae* WHO-5) как на АГВ, так и на МХА к различным антимикробным препаратам во многих бактериологических лабораториях России (табл. 12, 13).

Таблица 12. Результаты 10-кратного тестирования контрольных штаммов

Контрольный штамм	Значения диаметров зон, %			Отклонения результатов от диапазона допустимых значений, мм
	Меньшие, чем допустимо	Допустимый диапазон	Большие, чем допустимо	
<i>E.coli</i> ATCC 25922	6 – 64	30 – 94	0 – 7	От –18 до +11
<i>S.aureus</i> ATCC 25923	4 – 53	41 – 91	1 – 44	От –20 до +10

При отдельном анализе результатов тестирования контрольных штаммов на АГВ и МХА достоверные различия фармакодинамических параметров были выявлены для триметоприма/сульфаметоксазола и гентамицина в отношении *E.coli* ATCC 25922 и гентамицина в отношении *S.aureus* ATCC 25923 ($p < 0,05$).

Таблица 13. Результаты тестирования контрольных штаммов ВОЗ

Контрольный штамм	Согласие, %	Ошибки, %		
		Малые	Большие	Очень большие
<i>K.pneumoniae</i> WHO-1	33 – 100	0 – 67	0 – 38	0 – 50
<i>S.aureus</i> WHO-2	67 – 100	0 – 24	0 – 22	0 – 14
<i>E.faecium</i> WHO-3	20 – 92	0 – 54	0 – 60	0 – 25
<i>E.cloacae</i> WHO-5	0 – 100	0 – 58	0 – 70	0 – 17

При тестировании контрольных штаммов ВОЗ с неизвестными фенотипами резистентности также было получено недопустимо большое количество ошибок

(табл. 13). Наиболее серьезными следует считать неспособность лабораторий выявить клинически важные механизмы резистентности - продукцию β -лактамаз расширенного спектра действия у *K.pneumoniae* (примерно в 1/3 лабораторий) и метициллинорезистентность у *S.aureus* (в 14% случаев). Следует отметить, что все ошибки в определении чувствительности *S.aureus* WHO-2 к оксациллину были допущены на среде АГВ.

Несомненно, что при определении чувствительности клинических штаммов, выделенных от пациентов с инфекциями, также допускается большое количество ошибок, что зачастую ведет к назначению неадекватной терапии.

Однако результаты ВКК свидетельствуют о том, что многие ошибки, допущенные при определении фармакодинамических параметров различных антимикробных препаратов диско-диффузионным методом, связаны не с влиянием среды АГВ, а обусловлены другими причинами. В частности тем, что большинство российских бактериологических лабораторий не проводят внутреннего контроля качества определения чувствительности на должном методическом уровне.

Следовательно, можно предположить, что информационно-методическая поддержка, обучение врачей-бактериологов и лаборантов теоретическим и практическим основам определения чувствительности и проведения внутреннего контроля качества позволят существенно уменьшить количество ошибок в оценке фармакодинамических параметров антибиотиков.

Учитывая сложившуюся в бактериологических лабораториях России ситуацию, необходимо объединить усилия государственных и общественных организаций по созданию единых национальных стандартов определения чувствительности микроорганизмов к антибиотикам.

Выводы

1. Фармакодинамические параметры антибиотиков, полученные *in vitro* при определении чувствительности диско-диффузионным методом, существенно зависят от используемой питательной среды (АГВ или МХА).
2. Отечественная питательная среда АГВ в сравнении с МХА не изменяет фармакодинамические параметры и пригодна для тестирования ингибитор-защищенных пенициллинов, цефалоспоринов, имипенема, аминогликозидов (нетилмицина и амикацина) и фторхинолонов в отношении *Enterobacteriaceae* и *Acinetobacter* spp.; тикарциллина/клавуланата и цефалоспоринов (цефоперазон, цефодизим, цефпиром) против *P.aeruginosa*; макролидов и офлоксацина

при тестировании *S.pneumoniae*, выявления пенициллинорезистентности у пневмококков методом скрининга с оксациллином.

3. Среда АГВ в сравнении с МХА *in vitro* существенно занижает антимикробную активность имипенема, но завышает активность аминогликозидов (нетилмицин, амикацин) и фторхинолонов в отношении *P.aeruginosa*, имипенема и современных макролидов в отношении *Staphylococcus* spp., макролидов в отношении *S.pyogenes* и, следовательно, непригодна для их тестирования.
4. Фармакодинамические параметры ингибитор-защищенных пенициллинов, цефалоспоринов, имипенема, макролидов и фторхинолонов при тестировании *H.influenzae* на шоколадном агаре АГВ и среде АГВ со специальными добавками существенно отличаются от определяемых на референтной среде НТМ.
5. Питательные среды на основе АГВ (шоколадный агар АГВ и среда АГВ со специальными добавками) непригодны для определения чувствительности *H.influenzae*.
6. Среда АГВ, вследствие недопустимо высокого содержания тимина, не позволяет правильно оценивать активность триметоприма/сульфаметоксазола и не может быть использована для определения чувствительности к нему любых микроорганизмов.
7. Значительная частота ошибок при тестировании контрольных штаммов свидетельствует о неудовлетворительном качестве определения чувствительности во многих бактериологических лабораториях России.
8. Для повышения качества определения чувствительности и улучшения клинической эффективности антибиотикотерапии необходимо учитывать зависимость фармакодинамических параметров препаратов от вида питательной среды, а также возможности и ограничения использования среды АГВ для тестирования.

Практические рекомендации

Для врачей-бактериологов.

1. Для определения чувствительности диско-диффузионным методом микроорганизмов семейства *Enterobacteriaceae* и *Acinetobacter* spp. ко всем антимикробным препаратам (кроме триметоприма/сульфаметоксазола); *P.aeruginosa* к тикарциллину/клавуланату, цефоперазону и цефпирому может быть использо-

вана отечественная питательная среда АГВ и международные критерии интерпретации результатов.

2. Среда АГВ, обогащенная 5% ДЧК, может служить альтернативой МХА с 5% ДБК для выявления пенициллинорезистентности у пневмококков, а также изучения фармакодинамических параметров макролидов и офлоксацина у *S.pneumoniae*.
3. Для определения чувствительности *P.aeruginosa* к имипенему, аминогликозидам и фторхинолонам следует использовать только МХА.
4. Для оценки чувствительности стафилококков к β -лактамам необходимо выявлять метициллинорезистентные штаммы путем тестирования на МХА, для определения чувствительности к 14-членным макролидам и азитромицину достаточно выполнить тестирование с эритромицином на среде АГВ.
5. Для корректной оценки антимикробной активности *in vitro* триметоприма/сульфаметоксазола в отношении всех видов бактериальных возбудителей пригоден только МХА, но не среда АГВ.
6. Чувствительность к антимикробным препаратам *H.influenzae* необходимо определять на среде НТМ, при ее отсутствии использовать тест с нитроцефином для выявления продукции β -лактамаз.
7. Для повышения качества определения чувствительности микроорганизмов к антибиотикам в бактериологических лабораториях Российской Федерации следует ввести в практику обязательное регулярное (ежедневное, еженедельное) проведение внутреннего контроля качества этого исследования.
8. Необходима разработка и внедрение современных отечественных стандартов определения чувствительности к антибиотикам и критериев интерпретации результатов, а также обучение врачей-бактериологов современным приемам определения чувствительности и проведения внутреннего контроля качества.

Для клинических фармакологов и клиницистов других специальностей.

1. При оценке антибиотикограммы и выборе антибиотиков для этиотропной терапии необходимо учитывать вид питательной среды, на которой проводилось определение чувствительности возбудителя.
2. Клиницисты должны быть информированы о результатах внутреннего контроля качества в бактериологической лаборатории лечебного учреждения.
3. При использовании результатов эпидемиологических исследований антибиотикорезистентности для проведения эмпирической антибактериальной тера-

пии необходимо принимать во внимание ошибки, связанные с использованием питательной среды для тестирования.

Список научных работ, опубликованных по теме диссертации

1. Сравнение результатов определения чувствительности к антибиотикам на среде АГВ и агарах Мюллера-Хинтона и Изосенситест // Антибиотики и химиотерапия. - 1996. - № 10. - С. 22-27. (В соавт. с Козловым Р.С., Страчунским Л.С., Ливермором Д.М., Шавриковой Е.П.)
2. Исследование чувствительности к имипенему грамотрицательных микроорганизмов с использованием агара АГВ // III Российский национальный конгресс "Человек и Лекарство". - Москва, 1996. - С. 213. (В соавт. с Решедько Г.К., Страчунским Л.С.)
3. Оценка возможности использования агара АГВ при исследовании чувствительности грамотрицательных бактерий к норфлоксацину и цiproфлоксацину // Материалы VII съезда Всероссийского общества эпидемиологов, микробиологов и паразитологов. - Москва, 1997. - С. 367-368. (В соавт. с Решедько Г.К., Страчунским Л.С.)
4. Specific problems in antimicrobial susceptibility testing (AST) in Russia // 8th International Congress for Infectious Diseases. Boston (USA). - 1998. - P. 189. (В соавт. с Stratchounski L.S., Kozlov R.S., Reshedko G.K.)
5. Особенности фармакодинамики антибактериальных препаратов // V Международная конференция "Актуальные вопросы клинической фармакологии". - Москва, 1998. - С. 92. (В соавт. с Страчунским Л.С., Решедько Г.К.)
6. Quality assessment (QA) of antimicrobial susceptibility testing in Russia // Clin. Microbiol. Infect. – 1999. – V. 5. – P. 407 (В соавт. с Reshedko G.K., Krechikova O.I., Rjabkova E.L.).
7. Определение чувствительности к цiproфлоксацину и норфлоксацину // Клин. микробиол. антимикроб. химиотер. - 1999. - № 1. - С. 92-100. (В соавт с Г.К. Решедько, Е.Л. Рябковой).