

УДК: 579.842.1/.2.044:615.28
DOI: 10.52419/issn2072-2419.2022.3.22

МИНИМАЛЬНЫЕ ПОДАВЛЯЮЩИЕ КОНЦЕНТРАЦИИ ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ УСТОЙЧИВОСТИ ЭНТЕРОБАКТЕРИЙ К АНТИМИКРОБНЫМ ПРЕПАРАТАМ

Макавичик С.А. 1-к.в.н., доцент orcid.org 0000-0001-5435-8321,
Воробьева Е.Д. 1- студ., Кротова А.Л. 2- ветеринарный врач

1. ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный университет ветеринарной медицины», 2- ФГБУ «Ленинградская межобластная ветеринарная лаборатория»

Ключевые слова: *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, механизмы резистентности, антибиотикорезистентность, микробиологические методы.

Keywords: *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, resistance mechanisms, antibiotic resistance, poultry, cattle, microbiological methods.



РЕФЕРАТ

ESBL (β -лактамазы расширенного спектра) – ферменты, способные расщеплять пенициллины, цефалоспорины и монобактамы и не гидролизующие цефамицины и карбапенемы. Наиболее частыми продуцентами ESBL являются *Escherichia coli* и *Klebsiella pneumoniae*.

Тестирование чувствительности к антибиотикам методом серийных разведений определяет эффективную дозировку антибиотиков.

Цель работы - изучить минимальную подавляющую концентрацию различных антибиотиков и определить продукцию β -лактамаз для бактерий *Klebsiella pneumoniae* и *Escherichia coli* с помощью планшета Sensititre ESB1F.

В ходе работы использовали два планшета Sensititre ESB1F, в лунках которых содержатся сухие антимикробные препараты в определенных концентрациях, физиологический раствор, бульон Мюллер-Хинтон, автоматическая пипетка на 10 и 50 μ л с одноразовыми наконечниками, стандарт Мак-Фарланда 0.5 единиц, чашки с кровяным агаром для контроля чистоты культур.

Учет результатов проводили визуально, регистрируя рост по помутнению среды, формированию пленки или осадка на дне планшета в сравнении с контрольными лунками.

Для учета результатов теста, подтверждающего наличие ESBL, сравнили МПК, полученную для цефтазидима, цефотаксима и МПК, полученную для комбинации этих антибиотиков с клавулановой кислотой (цефтазидим/клавулановая кислота и цефотаксим/клавулановая кислота). Результат теста считали положительным, если разница в МПК превышает два разведения.

Для *E. coli* МПК цефтазидима и цефтазидима/клавулановой кислоты составили 8 и 0,25/4 соответственно, то есть разница в разведениях – 7; для цефотаксима МПК соответствует 1 мг/л, по отношению к цефотаксиму/клавулановой кислоте исследуемая *E. coli* оказалась чувствительной при всех исследуемых концентрациях. Для *Kl. pneumoniae* МПК цефтазидима составила 16, цефтазидима/клавулановой кислоты – 0,5 (разница в 6 разведений); цефотаксима – 2 и цефотаксима/клавулановой кислоты – 0,25 (разница в 3 разведения). Из этого следует, что оба исследуемых микроорганизма продуциру-

ют β -лактамазы расширенного спектра. Сделано заключение о целесообразном применении планшетов Sensititre ESB1F, которые позволяют определить и подтвердить наличие ферментов ESBL у представителей семейства *Enterobacteriaceae*.

Результаты оценки уровня бета-лактамазной активности позволят сократить необоснованное использование антибактериальных препаратов из группы бета-лактамов.

ВВЕДЕНИЕ

Появление толерантности к различным антибиотикам является эволюцией бактерий под действием факторов окружающей среды, спонтанные мутации, вертикальный и горизонтальный пути передачи генов от других микроорганизмов в результате генетических рекомбинаций. Также, приобретение антибиоткорезистентности различных микроорганизмов связано с нерациональным использованием антимикробных препаратов в животноводстве и птицеводстве: отсутствие ротационных схем применения препаратов; лекарственного мониторинга за клинической эффективностью антибиотиков и др. [1,2, 4].

Тестирование чувствительности к антибиотикам методом серийных разведений определяет эффективную дозировку антибиотиков.

Минимальная ингибирующая концентрация – минимальная концентрация, полностью подавляющая рост исследуемой культуры микроорганизма, то есть первая лунка в ряду с антимикробным препаратом, в которой не наблюдается роста.

Минимальные ингибирующие концентрации (МИК) различных тестов на чувствительность к противомикробным препаратам классифицируются различными международными агентствами. Эти руководящие принципы МИК определяют чувствительность и резистентность бактерий к антибиотикам. В большинстве европейских стран соблюдаются пороговые значения МИК, основанные на свойствах фармакокинетики-фармакодинамики (ФК-ФД), и эпидемиологические пороговые значения МИК (ECOFFS), установленные Европейским международным комитетом по определению чувствительности к антимикробным препаратам EUCAST (The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing), или Американским

институтом клинических и лабораторных стандартов (CLSI).

Институтом клинических и лабораторных стандартов (CLSI) разработаны рекомендации VET01S для тестирования чувствительности микроорганизмов к антибиотикам, выделенных от животных, основанные на фармакокинетических - фармакодинамических свойствах и механизмах резистентности.

По результатам исследований необходимо проводить выбор рекомендации для интерпретации результатов в зависимости от цели проведения этих исследований [3].

Предельные значения МИК, рекомендуемые EUCAST обычно выше, чем CLSI, например, более высокая устойчивость к цефтазидиму у *Klebsiella pneumoniae* и ESBL – продуцирующей *Escherichia coli*. Кроме того, руководства CLSI доступны в виде пакета из трех документов за 500 долларов США в год, в то время как руководства EUCAST находятся в свободном доступе на веб-сайте EUCAST»[5,6,7].

Одним из методов определения минимальной ингибирующей концентрации является метод микроразведений в бульоне, который лежит в основе системы Sensititre для идентификации и определения чувствительности микроорганизмов к антимикробным препаратам в лабораторных условиях. Ее разновидность ESB1F позволяет определить и подтвердить наличие ферментов ESBL у представителей семейства *Enterobacteriaceae*.

ESBL (β -лактамазы расширенного спектра) – ферменты, способные расщеплять пенициллины, цефалоспорины и монобактамы и не гидролизующие цефамидины и карбапенемы. Большинство β -лактамаз – производные плазмидно кодируемых пенициллиназ TEM-1, TEM-2, SHV-1, от которых они отличаются единичными аминокислотными заменами, за счет

чего расширяется спектр ферментативной активности. Различия в уровнях устойчивости продуцентов ESBL обусловлены вариациями в уровне экспрессии и свойствах различных ESBL, наличием дополнительных механизмов резистентности. Наиболее частыми продуцентами ESBL являются *Escherichia coli* и *Klebsiella pneumoniae*. Большинство ESBL подавляются «классическими ингибиторами»: клавулановой кислотой, сульбактамом, тазобактамом, а также авибактамом [1].

Цель. Изучить минимальную подавляющую концентрацию различных антибиотиков и определить продукцию β -лактамаз для бактерий *Klebsiella pneumoniae* и *Escherichia coli* с помощью планшета Sensititre ESB1F.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В ходе работы использовали два планшета Sensititre ESB1F, в лунках которых содержатся сухие антимикробные препараты в определенных концентрациях, физиологический раствор, бульон Мюллера-Хинтона, автоматическая пипетка на 10 и 50 μ л с одноразовыми наконечниками, стандарт Мак-Фарланда 0.5 единиц, чашки с кровяным агаром для контроля чистоты культур.

С суточных агаровых культур *Kl. pneumoniae* и *E. coli* взяли по 5 изолированных колоний и приготовили инокуляты плотностью 0.5 единиц Мак-Фарланда в пробирках со стерильным физиологическим раствором. Из суспензий перенесли по 10 μ л в пробирки с 11 мл бульона Мюллер-Хинтон, после чего гомогенизировали суспензии.

В лунки планшетов Sensititre ESB1F внесли по 50 μ л приготовленных суспензий с помощью автоматической пипетки в течение 30 минут после приготовления. Из лунок положительного контроля сделали высев на кровяной агар для проверки чистоты и плотности конечных суспензий. Планшеты полностью закрыли адгезивной пленкой так, что она не образовала складок для избежание полного или частичного пересыхания лунок и получение некорректных результатов, после чего инкубировали в течение 18 часов

при 34-36 °C в аэробной атмосфере.

В работе использовали «Экспертные правила определения к антибиотикам EUCAST»[6,7].

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Перед учетом результатов проверили чашки, на которые делали высев из лунок положительного контроля, и убедились в чистоте и плотности конечных суспензий.

Учет результатов проводили визуально, регистрируя рост по помутнению среды, формированию пленки или осадка на дне планшета в сравнении с контрольными лунками. Сначала проверили рост во всех лунках положительного контроля и отсутствие роста в лунках отрицательного контроля для подтверждения действительности результатов, после чего по первой лунке, в которой отсутствует рост микроорганизмов, определили минимальную подавляющую концентрацию антибиотиков.

В наших исследованиях МПК не указывали для тех случаев, когда рост бактерий во всех исследуемых разведениях присутствовал (R) или отсутствовал (S).

Для учета результатов теста, подтверждающего наличие ESBL, сравнили МПК, полученную для цефтазидима, цефотаксима и МПК, полученную для комбинации этих антибиотиков с клавулановой кислотой (цефтазидим/клавулановая кислота и цефотаксим/клавулановая кислота). Результат теста считали положительным, если разница в МПК превышает два разведения.

Для *E. coli* МПК цефтазидима и цефтазидима/клавулановой кислоты составили 8 и 0,25/4 соответственно, то есть разница в разведениях – 7; для цефотаксима МПК соответствует 1 мг/л, по отношению к цефотаксиму/клавулановой кислоте исследуемая *E. coli* оказалась чувствительной при всех исследуемых концентрациях (табл.1).

Для *Kl. pneumoniae* МПК цефтазидима составила 16, цефтазидима/клавулановой кислоты – 0,5 (разница в 6 разведений); цефотаксима – 2 и цефотаксима/клавулановой кислоты – 0,25 (разница в 3 разведения). Из этого следует, что оба

Таблица 1

Минимальные подавляющие концентрации антимикробных препаратов для *E. coli* и *Kl. pneumoniae* с продукцией бета-лактамаз

Наименования антимикробных препаратов	<i>Escherichia coli</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Пограничные значения МПК (мг/л) EUCAST	
			S ≤	R >
Цефемы				
Цефтазидим	R (8)	R (16)	1	4
Цефазолин	R	R	0,001	4
Цефепим	S (1)	S (1)	1	4
Цефподоксим	R (4)	R (8)	1	1
Цефатаксим	S (1)	I (2)	1	2
Цефтриаксон	I (2)	R (4)	1	2
Карбапенемы				
Имипенем	S	S	2	4
Меропенем	S	S	2	8
Аминогликозиды				
Гентамицин	S	R (8)	2	2
Пенициллины				
Ампициллин	R	R	8	8
Фторхинолоны				
Ципрофлоксацин	R	S	0,25	0,5
Ингибиторы β-лактамаз				
Пиперациллин/тазобактам	S	S (8/4)	8	8
Цефтазидим/клавулановая кислота	0,25	0,5	-	-
Цефотаксим/клавулановая кислота	S	0.25	-	-

Примечание: R – резистентный; S – чувствительный.

исследуемых микроорганизма продуцируют β-лактамазы расширенного спектра (табл.1).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В случае высокого значения МПК (превышающего диапазон чувствительности) может потребоваться модификация дозирования антибиотика или переход на другой с более низким МПК, ниже пограничной чувствительности.

На основании значения МИК дозирование можно корректировать:

- обычная доза, если МИК соответствует профилю чувствительности бактерий дикого типа;
- более высокая доза, если МИК попадает в

диапазон бактерий недикого типа, но все еще находится в диапазоне чувствительности;

максимальная доза, если МИК находится на умеренно – резистентном уровне.

Сделано заключение о целесообразном применении планшетов Sensititre ESB1F, которые позволяют определить и подтвердить наличие ферментов ESBL у представителей семейства *Enterobacteriaceae*.

Результаты оценки уровня бета-лактамазной активности позволят сократить необоснованное использование антибактериальных препаратов из группы бета-лактамов.

MINIMUM INHIBITORY CONCENTRATION FOR DETERMINING ANTIMICROBIAL RESISTANCE IN ENTEROBACTE-

RIA

Makavchik S.A.1. – Dr. of vet. Sciences, docent; Vorobyeva E.D.1. – student; Krotova A.L.2 – veterinarian. 1. St. Petersburg state academy of veterinary medicine, 2- Leningrad interregional veterinary laboratory.

ABSTRACT

ESBL (extended spectrum β -lactamases) are enzymes capable for splitting penicillins, cephalosporins and monobactams and not hydrolyzing cephamycins and carbapenems. The most common ESBL producers are *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*.

Antibiotic susceptibility testing by serial dilution determines the effective dosage of antibiotics.

The aim of the work is to study the minimum inhibitory concentration of various antibiotics and determine the production of β -lactamase for the bacteria *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* using the Sensititre ESBIF tablet.

In the course of the work, two Sensititre ESBIF plates were used, the wells of which contained dry antimicrobials at certain concentrations, saline, Mueller-Hinton broth, an automatic pipette for 10 and 50 μ l with disposable tips, McFarland standard 0.5 units, blood agar plates to control the purity of cultures.

The results were recorded visually, registering growth by cloudiness of the medium, formation of a film or sediment at the bottom of the plate in comparison with the control wells.

To account for the results of the test confirming the presence of ESBL, the MIC obtained for ceftazidime, cefotaxime and the MIC obtained for the combination of these antibiotics with clavulanic acid (ceftazidime/clavulanic acid and cefotaxime/clavulanic acid) were compared. The test result was considered positive if the difference in MIC was more than two dilutions.

For *E. coli*, the MICs of ceftazidime and ceftazidime/clavulanic acid were 8 and 0.25/4, respectively, i.e. the difference in dilutions was 7; for cefotaxime, the MIC corresponds to 1 mg/l, with respect to cefotaxime/clavulanic acid, the studied *E. coli* turned out to be sensitive at all concentrations studied. For *Kl. pneumoniae* MIC of ceftazidime was 16, ceftazidime/clavulanic acid was 0.5 (difference of 6 dilutions); cefotaxime - 2 and cefotaxime / clavulanic acid - 0.25 (3 dilution difference). It follows from this that both studied microorganisms produce extended spectrum β -

lactamases.

A conclusion was made about the expedient use of Sensititre ESBIF tablets, which make it possible to determine and confirm the presence of ESBL enzymes in representatives of the Enterobacteriaceae family.

The results of assessing the level of beta-lactamase activity will reduce the unreasonable use of antibacterial drugs from the group of beta-lactams.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

1. Макавчик С.А. Гипермукоидные фенотипы *Klebsiella pneumoniae* и проблемы антибиотикотерапии сельскохозяйственных животных/ Макавчик, С.А.// Вопросы нормативно-правового регулирования в ветеринарии. - 2019. - № 4. - С. 48-51.
2. Макавчик С.А., Сухинин А.А., Енгалев С.В., Кротова А.Л. Лабораторные методы контроля полирезистентных возбудителей бактериальных болезней животных и рациональное применение антимикробных препаратов: монография. – Санкт-Петербург: изд-во ВВМ, 2021. – 152 с.: ил.
3. Макавчик С.А. Рациональная фармакотерапия животных с основами ранжирования антимикробных препаратов в ветеринарных лабораториях /Макавчик, С.А.// Ветеринария. - 2022. - № 2. - С. 9-12.
4. Смирнова Л.И. Атипичные биологические свойства и чувствительность к антимикробным препаратам микроорганизмов - возбудителей мастита/ Смирнова, Л.И., Макавчик, С.А., Сухинин, А.А., Кузьмин, В.А., Фогель, Л.С.// Вопросы нормативно-правового регулирования в ветеринарии. -2020.- № 4.- С. 62-66.
5. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Tests for Bacteria Isolated from Animals; Approved Standard – Fourth Edition. CLSI document VET01-A4. Available at: www.clsi.org.
6. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST). MIC distributions and ECOFFs <https://mic.eucast.org/search/>.
7. EUCAST. Экспертные правила определения чувствительности к антибиотикам EUCAST. Доступно по адресу: https://www.eucast.org/expert_rules_and_intrinsic_resistance/