

ЛЕКЦИЯ 11

ОЦЕНКА АНТИМИКРОБНОЙ АКТИВНОСТИ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ АНТИБАКТЕРИАЛЬНОЙ ТЕРАПИИ

Лекция 11. Оценка антимикробной активности лекарственных средств антибактериальной терапии



Все антимикробные (противомикробные) лекарственные средства можно разделить на 2 основные группы:

- *Химиопрепараты;*
- *Биологические препараты*

I. Химиопрепараты:

- **антибиотики** - группа природных или полусинтетических органических веществ, подавляющих рост и размножение микроорганизмов или вызывающих их гибель;
- **синтетические антибактериальные средства** (производные хинолона, имидазола, оксазолидинона и др.) - полностью синтетические препараты, не имеющие природных аналогов и оказывающие сходное с антибиотиками подавляющее влияние на рост бактерий;
- **антисептики** – синтетические противомикробные средства, предназначенные для подавления жизнедеятельности микроорганизмов в основном при местном применении (поверхность ран, слизистых оболочек);
- **противогрибковые препараты (антимикотики)** — вещества природного или синтетического происхождения, обладающие фунгицидным или фунгистатическим действием и применяемые для профилактики и лечения микозов;
- **противовирусные препараты** – средства, вызывающие гибель вирусов или угнетающие их размножение.

Лекция 11. Оценка антимикробной активности лекарственных средств антибактериальной терапии

II. Иммунобиологические препараты:

- **бактериальные препараты (пробиотики)** – живые культуры микроорганизмов, как правило – представители нормальной микрофлоры человека, способные выделять вещества с антимикробной активностью;
- **бактериофаги** – вирусы бактерий, которые используются с лечебной или профилактической целью;
- **антитела** против микроорганизмов и их токсинов (препараты сывороток и иммуноглобулинов);
- **препараты цитокинов** - интерфероны, интерлейкины и др.

Химиотерапия противомикробными средствами – лечение бактериальных, вирусных и паразитарных заболеваний с помощью химиотерапевтических препаратов, которые избирательно подавляют развитие и размножение соответствующих инфекционных агентов в организме человека.

В клинической практике чаще используется термин *антибиотикотерапия*

Действие средств антимикробной терапии:

- **бактериостатическое действие** – прекращение роста и размножения бактерий за счет нарушения биохимических процессов в клетке (тетрациклин, левомицетин, макролиды);
- **бактерицидное действие** – гибель клетки (пенициллин, стрептомицин, цефалоспорины, аминогликозиды).

В клинической практике существуют два принципа назначения антибактериальных препаратов:

- эмпирическое
- этиотропное.

Лекция 11. Оценка антимикробной активности лекарственных средств антибактериальной терапии

Эмпирическое назначение антибиотиков основано на знаниях о чувствительности бактерий – причины того или иного заболевания, эпидемиологических данных о резистентности микроорганизмов в регионе или стационаре, а также на симптоматике заболевания.

Преимущество эмпирического назначения химиопрепаратов является возможность быстрого начала терапии. Кроме того, при таком подходе исключаются затраты на проведение дополнительных исследований.

Этиотропное назначение антибиотиков основано на выделении возбудителя инфекции из очага инфекции и определении его чувствительности к антибиотикам.

Требования, предъявляемые к средствам антимикробной терапии:

- широкий спектр действия и способность оказывать антимикробный эффект в дозах, нетоксичных для макроорганизма,

- сохранение антимикробного эффекта в жидкостях и тканях организма, низкий уровень инактивации белками сыворотки крови и тканевыми ферментами;
- хорошее всасывание, распределение и выведение, обеспечивающие высокие терапевтические концентрации в макроорганизме в течение достаточно длительного времени;
- отсутствие или медленное развитие резистентности при их применении;
- отсутствие или небольшой процент побочных эффектов;
- достаточно длительный период полураспада (прием 1-2 раза в сутки);
- низкая стоимость на курс терапии и высокая эффективность;
- лекарственная форма должна быть удобной для практического использования в разных возрастных группах, при различной локализации процесса и стабильной при хранении.

На практике ни один из препаратов не отвечает всем требованиям.

Лекция 11. Оценка антимикробной активности лекарственных средств антибактериальной терапии

При фармацевтической разработке генерических противомикробных средств необходимо провести оценку их антимикробной активности в сравнении с оригинальным препаратом в экспериментах *in vitro* с целью подтверждения соответствия воспроизводимого препарата референсному **по спектру и степени антибактериальной активности.**

- Оценка антимикробной активности базируется на определении чувствительности микроорганизмов к исследуемым лекарственным средствам.
- Мерой чувствительности микробов является *минимальная концентрация препарата* (мкг или ед/мл), которая подавляет рост микробов на питательных средах в стандартных условиях постановки опыта.

Количественные показатели, характеризующие микробиологическую активность антибактериальных препаратов:

- МПК (минимальная подавляющая концентрация) или МИК (минимальная ингибирующая концентрация) – минимальная концентрация, подавляющая *in vitro* видимый рост исследуемого микроорганизма в жидкой или плотной среде. Соответствует наибольшему разведению (наименьшей концентрации) препарата, тормозящему рост исследуемой культуры в стандартных условиях опыта. Устанавливают посевом испытуемой культуры на плотные или жидкие среды, содержащие различные концентрации антимикробного препарата.

- МПК50 (МИК50) – к данной концентрации антибактериального средства чувствительно 50% исследуемых штаммов;

- МПК90 (МИК90) – к данной концентрации антибиотика чувствительно 90% исследуемых штаммов;

- МБК (минимальная бактерицидная концентрация) - минимальная концентрация антимикробного препарата, вызывающая при исследовании *in vitro* полную гибель бактерий в стандартных условиях опыта.

Лекция 11. Оценка антимикробной активности лекарственных средств антибактериальной терапии

Как и МПК, МБК устанавливают посевом испытуемой культуры на плотные или жидкие среды, содержащие различные концентрации антимикробного препарата.

В дальнейшем из стерильных зон или прозрачных пробирок делают высев на среды без препарата. Появление роста указывает на статическое действие препарата в данной концентрации, отсутствие – на бактерицидное. Обычно МБК соответствует либо превышает величину МПК.

Концентрация антибиотиков в месте локализации инфекции должна равняться или превышать МПК для данного возбудителя.

По степени чувствительности к антибактериальным препаратам бактерии разделяются на *чувствительные*, *умеренно чувствительные* (промежуточные) и *устойчивые (резистентные)*.

Чувствительные - культуры, рост которых подавляется концентрациями препарата, создаваемыми в сыворотке крови больного в процессе назначения среднетерапевтических доз АБП (рекомендуемый режим дозирования).

Умеренно чувствительные (умеренно-устойчивыми) считаются культуры, подавляемые концентрациями, которые могут быть достигнуты при введении максимальных, но находящихся в пределах рекомендуемых доз препарата.

Устойчивые (резистентные) – микроорганизмы, рост которых не подавляется при введении даже максимально допустимых доз препарата. Такие микроорганизмы имеют механизмы резистентности. Бактериостатический эффект может быть достигнут только *in vitro* при высоких концентрациях лекарственного препарата, являющихся токсичными для человека.

Лекция 11. Оценка антимикробной активности лекарственных средств антибактериальной терапии

Антимикробная активность одного и того же антибиотика не всегда совпадает при исследовании его в экспериментах *in vitro* и при лечении больного.

Причины:

- активация или инактивация его в результате метаболических реакций макроорганизма,
- неадекватность условий, в которых проявляется действие антибиотика,
- гетерогенность микробных популяций по признаку устойчивости к антибиотикам.

Методы определения чувствительности бактерий к антибиотикам делятся на 2 группы:

1. Диффузионные методы:

- с использованием дисков с антибиотиками
- с помощью E-тестов

2. Методы серийных разведений:

- разведение в жидкой питательной среде (бульоне)
- разведение в агаризованной среде

Методы определения чувствительности были разработаны во второй половине 60-х – начале 70-х годов XX века и с тех пор с методической точки зрения не претерпели принципиальных изменений.

Для всех методов общими являются следующие этапы:

- приготовление и проверка качества питательных сред
- приготовление суспензии исследуемых микроорганизмов (инокулюма)
- инокуляция
- для диффузионных методов – этап наложения дисков или полосок E-теста на плотную питательную среду.
- инкубирование
- учет и интерпретация результатов
- формулировка рекомендаций по лечению

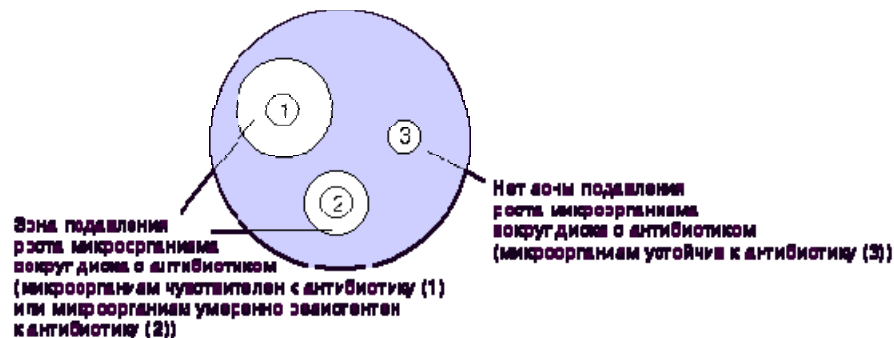
Лекция 11. Оценка антимикробной активности лекарственных средств антибактериальной терапии

Диффузионные методы основаны на диффузии антибактериального препарата (АБП) из носителя в плотную питательную среду, инокулированную микроорганизмом, и регистрации диаметра зоны ингибирования (задержки) роста исследуемого микроорганизма.

- Метод менее чувствителен и менее точен, чем метод серийных разведений, но на практике применяется чаще из-за своей простоты.
- Скорость диффузии в агар любого препарата зависит от его структуры, молекулярной массы, наличия примесей, состава и pH среды.

Метод бумажных дисков с антибиотиком (дискодиффузионный метод).

Для проведения этого метода используют стандартные диски, содержащие определенное количество антибиотиков, и стандартную питательную среду, необходимую для роста данного вида микроорганизма. В определенных пределах величина диаметра зоны подавления роста обратно пропорциональна МПК.

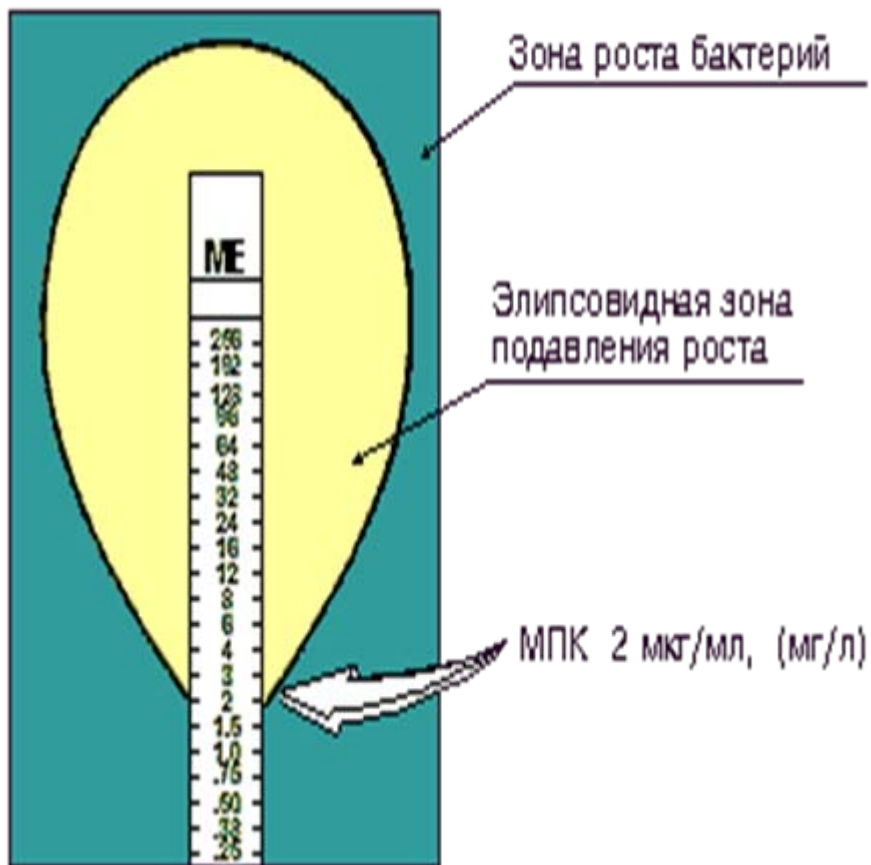


- На поверхность агара в чашке Петри наносят бактериальную суспензию определенной плотности.
- Помещают диски, содержащие определенное количество антибиотика.
- Инкубируют при условиях, благоприятных для каждого конкретного микроорганизма.
- Измеряют диаметры зон задержки роста вокруг диска в миллиметрах (с учетом диаметра диска).
- Оценивают результат по специальной таблице путем сопоставления диаметра зон задержки роста испытанной культуры с пограничными значениями диаметра зоны в таблице.
- Исследуемую культуру относят к одной из трех категорий: чувствительная, умеренно-чувствительная и устойчивая.

Лекция 11. Оценка антимикробной активности лекарственных средств антибактериальной терапии

Е-тест (E-test или эпсилометрический метод)

Метод близок по технологии постановки к методу бумажных дисков.



- В качестве носителя используется узкая полоска полимера (0.5x6.0 см), на которую нанесен градиент концентраций АБП (от минимальных до максимальных). Значения концентрации АБП в каждом участке полоски нанесены на наружной (обращенной к исследователю) поверхности.
- Ингибирование роста микроорганизма вокруг полоски носителя происходит в зоне, где концентрация антибиотика, диффундирующего из носителя, выше МПК.
- В месте пересечения эллипсоидной зоны подавления роста с полоской Е-теста получают значение МПК.

Е-тест сочетает простоту постановки метода бумажных дисков и точность метода серийных разведений

Лекция 11. Оценка антимикробной активности лекарственных средств антибактериальной терапии

Методы серийных разведений:

- Позволяют количественно оценить чувствительность выделенного микроорганизма к антибактериальным средствам и определить МПК препарата.
- Используют для сравнительной оценки антимикробной активности *in vitro* разрабатываемого препарата-генерика и оригинального средства.
- Для определения величины МПК заданные концентрации антибиотиков вносят в питательную среду, которую затем засевают культурой исследуемого микроорганизма. После инкубации оценивают наличие или отсутствие видимого роста.
- Основаны на использовании двукратных последовательных разведений концентраций АБП 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).
- Проводятся в жидкой и агаризованной питательных средах.

Лекция 11. Оценка антимикробной активности лекарственных средств антибактериальной терапии

Метод серийных разведений в жидкой питательной среде (бульоне)

Существует 2 варианта данного метода: макрометод (пробирочный) и микрометод (планшетный).

Макрометод .

- Тестирование проводят в пробирках в конечном объеме 1 мл для каждого разведения.
- Питательный бульон разливают по 0,5 мл в каждую пробирку. Количество пробирок определяют необходимым диапазоном разведений АБП.
- Приготовление суспензии исследуемых микроорганизмов:
 - Из стандартной суспензии каждого исследуемого микроорганизма ($\sim 10^8$ КОЕ/мл) готовят рабочую суспензию ($\sim 10^6$ КОЕ/мл)
- Приготовление двукратных серийных разведений АБП:
 - готовят основной раствор АБП исследуемого препарата-генерика и препарата сравнения (оригинального) в концентрации 1000 мкг/мл и выше (с учетом содержания активного вещества).

-из основных растворов АБП исследуемого препарата-генерика и препарата сравнения (оригинального) готовят рабочие растворы АБП с использованием жидкой питательной среды. (Концентрация рабочих растворов рассчитывается исходя из необходимой максимальной концентрации в ряду серийных разведений с учетом фактора разбавления при последующей инокуляции суспензией микроорганизма)

- готовят серийные разведения: 0,5 мл рабочего раствора АБП вносят в первую пробирку, содержащую 0,5 мл бульона. Перемешивают. Новой пипеткой (наконечником) переносят 0,5 мл раствора АБП в бульоне во вторую пробирку, содержащую 0,5 мл бульона и т.д., пока не будет приготовлен весь необходимый ряд разведений. Из последней пробирки 0,5 мл удаляют. Т.о., получают ряд пробирок с растворами АБП, концентрации в которых отличаются в соседних пробирках в 2 раза

Лекция 11. Оценка антимикробной активности лекарственных средств антибактериальной терапии

- Инокуляция: по 0,5 мл микробной суспензии с концентрацией микроорганизма $\sim 10^6$ вносят в каждую пробирку с 0,5 мл соответствующего разведения АБП. Конечная концентрация микроорганизма в каждой пробирке $\sim 5 \times 10^5$ КОЕ/мл.

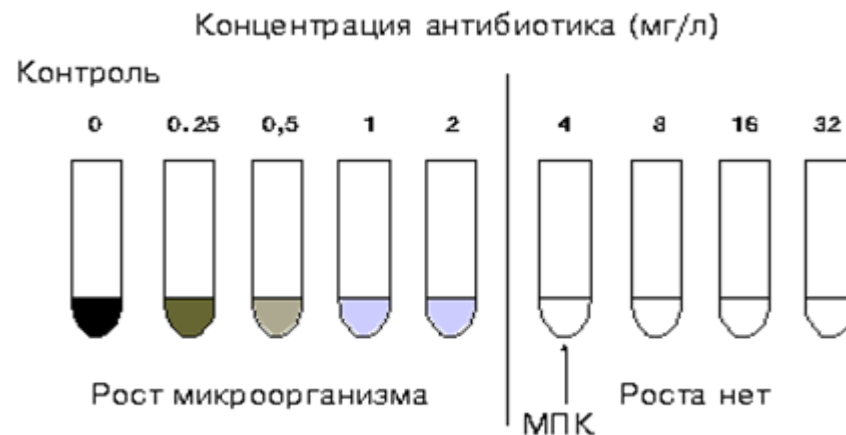
- Контроль – пробирка с бульоном и культурой микроорганизма (контроль роста). Отрицательный контроль – пробирка с бульоном (контроль стерильности).

- Инкубирование: все пробирки, закрытые пробками, или колпачками, инкубируют при условиях, обеспечивающих рост испытуемых микроорганизмов.

- Учет и интерпретация результатов: пробирки с посевами просматривают в проходящем свете. Рост культуры в пробирке с АБП сравнивают с контрольной пробиркой.

- наличие роста микроорганизма в бульоне (помутнение бульона) свидетельствует о том, что данная концентрация антибиотика недостаточна, чтобы подавить его жизнеспособность.

- по мере увеличения концентрации антибиотика рост микроорганизма ухудшается. Первую наименьшую концентрацию антибиотика (из серии последовательных разведений), где визуально не определяется бактериальный рост принято считать **минимальной подавляющей концентрацией (МПК)**.



- сравнивают результаты, полученные для оригинального ЛС и исследуемого генерического ЛС. Делают вывод об их эквивалентности в отношении спектра (перечень используемых микроорганизмов) и степени антимикробной активности (значения МПК).

Лекция 11. Оценка антимикробной активности лекарственных средств антибактериальной терапии

• Определение МБК: из нескольких последних пробирок с задержкой роста делают посев петлей на сектора чашки Петри. За МБК, которая, как правило, на несколько разведений меньше МПК, принимают концентрацию препарата в последней пробирке, посев из которой не дал роста.

• Недостаток метода: низкая производительность – применение ограничивается исследованиями небольшого числа микроорганизмов.

Микрометод

• Процедура проведения испытания аналогична таковой при использовании макрометода

• Величина конечного объема – до 0,2 мл

• Наличие соответствующего оснащения лаборатории: планшет на 96 лунок со стерильными крышками, многоканальных пипеток

• Рабочие растворы АБП можно вносить в лунки планшет заранее, после чего хранить запаянными в полиэтилене при температуре ниже 60°C до момента использования.

• Преимущества метода:

- высокая производительность
- возможность длительного хранения заранее приготовленных планшет
- экономия расходных материалов.

Метод серийных разведений в агаризованной среде

• Принцип проведения испытания аналогичен методу разведений в бульоне

• Приготовление суспензии исследуемых микроорганизмов:

- стандартная суспензия каждого исследуемого микроорганизма должна содержать $\sim 10^8$ КОЕ/мл.

- стандартную микробную суспензию для проведения эксперимента разводят \sim в 10 раз до получения концентрации микроорганизма $\sim 10^7$ КОЕ/мл

• Приготовление двукратных серийных разведений АБП для оригинального препарата и исследуемого препарата-генерика проводят аналогично методу разведений в бульоне

Лекция 11. Оценка антимикробной активности лекарственных средств антибактериальной терапии

- Агаризованную среду расплавляют и охлаждают до температуры 45-50°C.
 - Приготовление чашек с агаризованной средой и разведениями АБП: смешивают агаризованную среду и растворы АБП непосредственно в чашке Петри (для пластиковых чашек диаметром 90 мм к 2 мл раствора АБП добавляют 18 мл расплавленного и охлажденного агара).
 - Инокуляция и инкубирование: бактериологической петлей переносят 1-2 мкл суспензии исследуемых микроорганизмов на поверхность агаризованной среды. Таким образом, конечная посевная доза составляет $\sim 10^4$ КОЕ (стандартная бактериологическая петля диаметром 3 мм переносит 1-2 мкл жидкости).
 - На поверхности агара образуется пятно диаметром 5-8 мм. После подсыхания чашки переворачивают и инкубируют при условиях, благоприятных для роста исследуемых микроорганизмов.
 - Учет и интерпретация результатов: аналогично методу разведения в бульоне. Чашки Петри помещают на темную, не отражающую свет поверхность. За МПК принимают концентрацию АБП, вызвавшую полное ингибирование видимого роста.
 - Контроль: инокулированные суспензией культур микроорганизмов чашки с агаром без АБП (контроль роста). Отрицательный контроль: чашки с агаром (контроль стерильности).
- Преимущества метода: на одной чашке можно определять чувствительность нескольких микроорганизмов.

Лекция 11. Оценка антимикробной активности лекарственных средств антибактериальной терапии

Объем исследований по сравнительной оценке in vitro антимикробной активности генерических противомикробных лекарственных средств:

- Задача исследования: подтверждение соответствия генерического препарата референсному (оригинальному) по спектру (микроорганизмы) и степени (значение МПК, МБК) антимикробной активности.
- Набор тестируемых микроорганизмов: по 1-2 штамма каждого из входящих в спектр действия микроорганизмов
 - эталонные коллекционные штаммы
 - выделенные в стационарах клинические штаммы
- Определяются значения МПК и МБК
- Контроль: препарат сравнения – оригинальный препарат
- Ожидаемый результат: МПК и МБК разрабатываемых генерических противомикробных ЛС входят в допустимые диапазоны значений и полностью совпадают с МПК и МБК препаратов сравнения (оригинальных ЛС) в отношении коллекционных и клинических штаммов.

Лекция 11. Оценка антимикробной активности лекарственных средств антибактериальной терапии

Порядок исследований по определению *in vitro* антимикробной активности новых противомикробных соединений:

- Первичная оценка чувствительности к новым соединениям эталонных штаммов различных видов грамотрицательных и грамположительных микроорганизмов (4-5 штаммов для каждого вида);

- Детальное изучение степени антибактериальной активности соединений в отношении штаммов грамотрицательных и грамположительных микроорганизмов из международных коллекций с известными механизмами резистентности (метод серийных разведений);

- Исследование активности в отношении клинических штаммов условно патогенных и патогенных микроорганизмов в сравнении с известными препаратами близкой химической группы или аналогичными по антимикробному эффекту:

- в случае преимущественной активности в отношении грамположительных микроорганизмов контроль – природные пенициллины, цефалоспорины I – II поколений, макролиды, линкозамиды;

- при активности в отношении грамотрицательных микроорганизмов контроль – полимиксин В, азтреонам;

- для препаратов широкого спектра действия контроль – полусинтетические пенициллины, аминогликозиды, тетрациклины, цефалоспорины III – IV поколений

- Оценка антимикробной активности в отношении проблемных возбудителей:

- метициллинорезистентные стафилококки, устойчивые к бензилпенициллину *Streptococcus pneumoniae*, множественноустойчивые энтеробактерии, устойчивые к аминогликозидам бактерии рода *Pseudomonas* и др.

- Первоначальные терапевтические концентрации новых препаратов устанавливаются с учетом токсичности, определенной в опытах по изучению острой токсичности;

Лекция 11. Оценка антимикробной активности лекарственных средств антибактериальной терапии



- Сравнительную степень антимикробной активности препаратов оценивают величиной МПК или МБК, определяемых не менее, чем при 2-х значениях посевной дозы: минимальной – 10^4 – 10^5 КОЕ/мл и максимальной – 10^6 – 10^9 КОЕ/мл в зависимости от вида возбудителя;

На сегодняшний день не существует методов, которые позволили бы с абсолютной достоверностью прогнозировать клинический эффект антибиотиков при лечении инфекционных болезней. Однако, данные результатов определения чувствительности могут служить хорошим ориентиром клиницистам для выбора и коррекции антимикробной терапии.

