

## **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

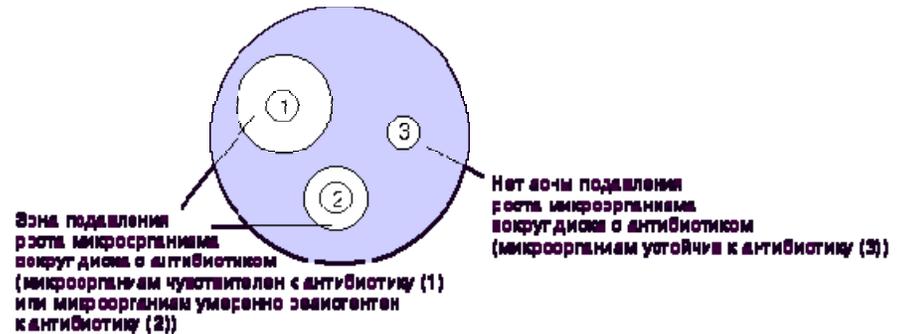
# Лекция 11. Оценка антимикробной активности лекарственных средств антибактериальной терапии

**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.

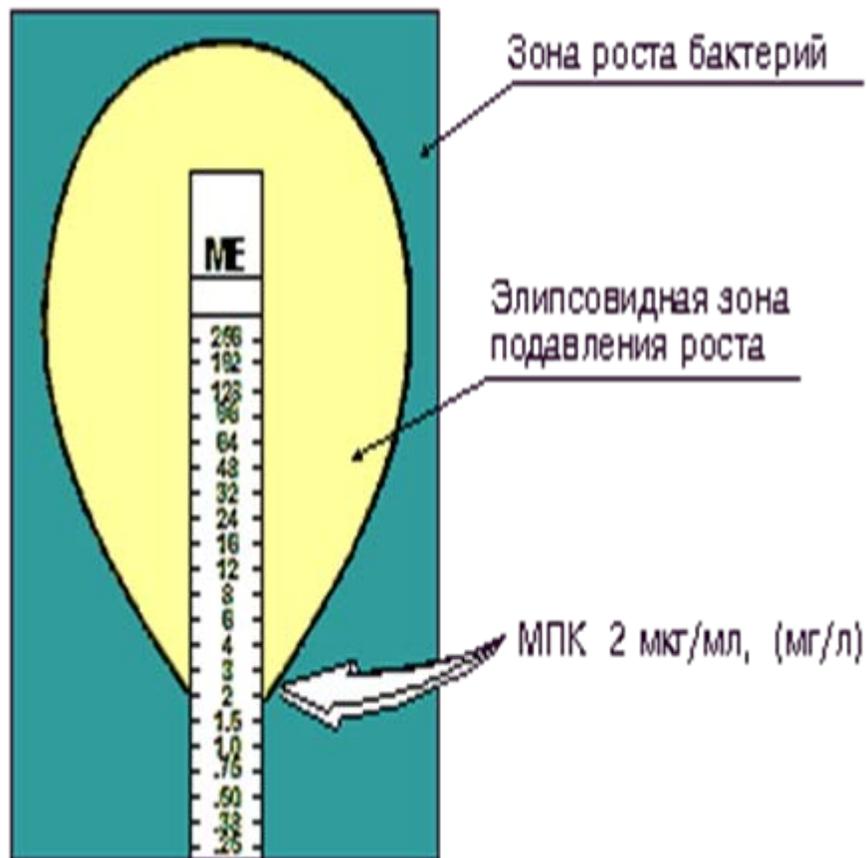


- На поверхность агара в чашке Петри наносят бактериальную суспензию определенной плотности.
- Помещают диски, содержащие определенное количество антибиотика.
- Инкубируют при условиях, благоприятных для каждого конкретного микроорганизма.
- Измеряют диаметры зон задержки роста вокруг диска в миллиметрах (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.

