

Применение экспресс-метода лазерной флуоресцентной спектроскопии для определения чувствительности возбудителей к антибактериальным препаратам

Е.В.Ипполитов, Д.В.Давыдов, В.В.Царёва, А.А.Лабазанов, М.С.Подпорин

ФГБОУ ВО «Московский государственный медико-стоматологический университет им. А.И.Евдокимова»
Минздрава России, Москва, Российская Федерация

Цель. Сравнительный анализ эффективности экспресс-метода лазерно-флуоресцентной спектроскопии (ЛФС) для определения чувствительности бактерий к антибиотикам.

Материалы и методы. Проводили исследование чувствительности микрофлоры гнойного отделяемого, полученного при заболеваниях слезных путей (дакриоцистит, конъюнктивит), – 16 образцов, из пазух носа (верхнечелюстной синусит) – 18 образцов, с помощью метода ЛФС, а также традиционного бактериологического исследования с использованием техники анаэробного культивирования для сравнения.

Результаты и выводы. Установлены существенные различия мощности флуоресценции в зависимости от чувствительности/резистентности штаммов к антибиотикам. Полученные результаты позволяют рекомендовать врачам-офтальмологам, стоматологам, оториноларингологам назначение препарата, в пробе с которым наблюдается максимальное снижение флуоресценции по сравнению с контролем. Предложенный экспресс-тест позволяет практикующему врачу избежать эмпирического выбора средств медикаментозной поддержки.

Ключевые слова: чувствительность/резистентность к антибиотикам, штаммы, лазерно-флуоресцентная спектроскопия

Для цитирования: Ипполитов Е.В., Давыдов Д.В., Царёва В.В., Лабазанов А.А., Подпорин М.С. Применение экспресс-метода лазерной флуоресцентной спектроскопии для определения чувствительности возбудителей к антибактериальным препаратам. Бактериология. 2018; 3(2): 20–23. DOI: 10.20953/2500-1027-2018-2-20-23

Application of the rapid method of laser fluorescence spectroscopy to determine the sensitivity of pathogens to antibacterial drugs

E.V.Ippolitov, D.V.Davidov, V.V.Tsareva, A.A.Labazanov, M.S.Podporin

A.I.Yevdokimov Moscow State University of Medicine and Dentistry of the Ministry of Healthcare of the Russian Federation, Moscow, Russian Federation

The aim of the work is a comparative analysis of the effectiveness of the express method of laser-fluorescence spectroscopy to determine the sensitivity of bacteria to antibiotics.

Materials and methods. The sensitivity of the purulent discharge microflora, obtained in diseases of the lacrimal tract (dacryocystitis, conjunctivitis) – 16 samples, from the sinuses (maxillary sinusitis) – 18 samples, using the method of laser-fluorescence spectroscopy, as well as traditional bacteriological study using anaerobic cultivation techniques for comparison, was studied.

Results and conclusions. Significant differences in fluorescence power were found depending on the sensitivity/resistance of strains to antibiotics. The results obtained allow to recommend to ophthalmologists, dentists, otorhinolaryngologists the appointment of the drug, in the sample with which there is a maximum decrease in fluorescence, compared with the control. The proposed rapid test allows the practitioner to avoid the empirical choice of medical support,

Keywords: antibiotic sensitivity/resistance, strains, laser-fluorescence spectroscopy

For citation: Ippolitov E.V., Davidov D.V., Tsareva V.V., Labazanov A.A., Podporin M.S. Application of the rapid method of laser fluorescence spectroscopy to determine the sensitivity of pathogens to antibacterial drugs. Bacteriology. 2018; 3(2): 20–23. (In Russian). DOI: 10.20953/2500-1027-2018-2-20-23

Для корреспонденции:

Ипполитов Евгений Валерьевич, доктор медицинских наук, профессор кафедры микробиологии, вирусологии, иммунологии ФГБОУ ВО «Московский государственный медико-стоматологический университет им. А.И.Евдокимова» Минздрава России

Адрес: 123425, Москва, ул. Делегатская, 20/1

Телефон: (495) 609-6700

E-mail: ippo@bk.ru

Статья поступила 15.04.2018 г., принята к печати 27.06.2018 г.

For correspondence:

Yevgeniy V. Ippolitov, MD, PhD, DSc, professor, head of department of microbiology, virology, immunology of A.I.Yevdokimov Moscow State University of Medicine and Dentistry of the Ministry of Healthcare of the Russian Federation

Address: 20/1 Delegatskaya str., Moscow, 123425, Russian Federation

Phone: (495) 609-6700

E-mail: ippo@bk.ru

The article was received 15.04.2018, accepted for publication 27.06.2018

В меморандуме «Глобальная стратегия по сдерживанию антимикробной резистентности», принятом Всемирной организацией здравоохранения в 2001 г., прогрессирующее развитие устойчивости возбудителей оппортунистических и особенно ятрогенных инфекций к антибиотикам на всех континентах рассматривается как угроза национальной безопасности государств [1, 2].

Российская Федерация участвовала в формировании нового Глобального плана преодоления антимикробной резистентности. Обсуждение этого документа во Всемирной организации здравоохранения состоялось в 2015 г., и уже в сентябре 2016 г. ВОЗ на 71-й сессии Генеральной ассамблеи ООН призвала правительства всех стран мира разработать план борьбы с распространением устойчивости микроорганизмов к антибиотикам [3].

В октябре 2017 г. Председатель Правительства Российской Федерации Д.А.Медведев подписал распоряжение об утверждении «Стратегии предупреждения распространения антимикробной резистентности в РФ на период до 2030 года», представленной Минздравом РФ. Российская национальная стратегия включила в себя все основные положения Глобального плана преодоления антимикробной резистентности. Отечественная стратегия межведомственная – в ее разработке, помимо Минздрава, участвовали Роспотребнадзор, Минфин, Минпромторг, Минсельхоз, Россельхознадзор, МЭР, ФАНО и РАН.

Стратегию планируется реализовать в два этапа. Первый (до 2020 года) предусматривает повышение осведомленности населения о рациональном применении противомикробных препаратов, недопустимости самолечения, а также увеличение охвата пропагандой иммунопрофилактики и здорового образа жизни. На этом этапе также планируется повысить выявляемость резистентности к противомикробным препаратам, а также установить базовые показатели, характеризующие распространенность антимикробной резистентности. На втором этапе (до 2030 г.) планируется сократить количество случаев оказания медицинской помощи при инфекционных заболеваниях, вызванных микроорганизмами со множественной лекарственной устойчивостью.

Однако известно, что существующие методы определения чувствительности/резистентности к антибактериальным препаратам имеют ряд недостатков, среди которых следует отметить, прежде всего, отсутствие надежного экспресс-метода и частый процент несовпадения результатов определения чувствительности/эффективности препарата в клинической практике, что в настоящее время связывают с формированием микробных биопленок в воспалительном очаге и покоящихся форм бактерий-персистеров, находящихся в состоянии анабиоза или минимизированного метаболизма [1, 3, 4].

Цель исследования: повышение эффективности диагностики оппортунистической инфекции в клиническом материале от пациентов стоматологического и офтальмологического профиля путем апробации экспресс-методики выявления и оценки чувствительности возбудителей к антибактериальным препаратам методом лазерной флуоресцентной спектроскопии (ЛФС).

Материалы и методы

Проводили исследование чувствительности микрофлоры гнойного отделяемого, полученного при заболеваниях слезных путей (дакриоцистит, конъюнктивит) – 16 образцов и пазух носа (верхнечелюстной синусит) – 18 образцов с помощью метода ЛФС [5], а также традиционного бактериологического исследования с использованием техники анаэробного культивирования для сравнения [6]. В качестве моделей для эксперимента использовали 4 препарата: ампициллина гидрохлорид, гентамицина сульфат, линкомицина гидрохлорид, ципрофлоксацин, метронидазол. Проведено 4 серии экспериментов в 5 повторностях.

Статистическую обработку данных проводили с использованием критериев Манна–Уитни и корреляции по Спирмену.

Результаты и обсуждение

Оценку результатов, полученных методом ЛФС, проводили исходя из положения, высказанного М.Т.Александровым и А.А.Воробьевым, что уменьшение мощности флуоресценции в динамике адекватно уменьшению концентрации микроорганизмов, а ее увеличение – наоборот (увеличению концентрации и метаболической активности микрофлоры) [5].

При оценке кривых роста микробных популяций в микст-культурах было установлено, что мощность флуоресценции гнойного отделяемого отражает густоту микробной взвеси в пробирках, а при добавлении к исследуемому материалу разных антибиотиков и кратковременном культивировании (в течение 12 ч) мощность флуоресценции существенно меняется в зависимости от чувствительности компонентов консорциума. Иными словами, она падает при чувствительности компонентов консорциума к тестируемому антибактериальному препарату и, напротив, возрастает при резистентности штаммов.

В первой серии экспериментов выявлены резкое снижение мутности бактериальной взвеси с ампициллином в концентрации 4 мкг/мл и 2 мкг/мл в первые 60 мин по сравнению с мутностью контроля культуры и отсутствие изменений мощности флуоресценции взвеси с ампициллином в концентрациях 1 мкг/мл, 0,5 мкг/мл, 0,25 мкг/мл. Примерно та же картина наблюдалась также и через 12 ч. Учет результатов бактериологического исследования (высев на 5% кровяной агар с геминим) через 24 ч показал отсутствие роста в пробирках с ампициллином в концентрациях 4 мкг/мл и 2 мкг/мл и рост культуры в пробирках с ампициллином в концентрациях 1 мкг/мл, 0,5 мкг/мл, 0,25 мкг/мл, что подтвердило результат, полученный методом ЛФС в первые 60 мин.

Во второй серии экспериментов при проведении клинико-лабораторного исследования гнойного экссудата выявлены резкое снижение мутности бактериальной взвеси с ципрофлоксацином в концентрации 4 мкг/мл, 2 мкг/мл и 1 мкг/мл (в первые 60 мин) по сравнению с мутностью контроля культуры и отсутствие изменений мощности флуоресценции взвеси с ципрофлоксацином в концентрациях 0,5 мкг/мл, 0,25 мкг/мл. Контрольный посев, сделанный из обработанной пробы в это время (через 60 минут),

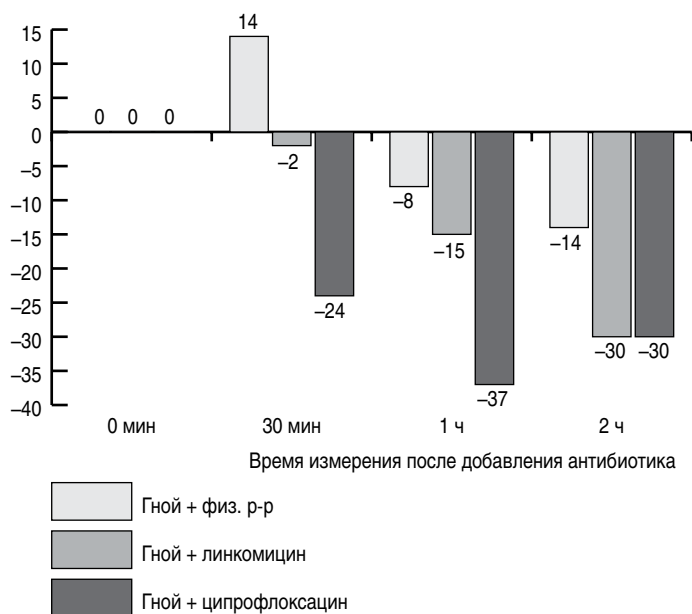


Рис. 1. Исследование действия линкомицина и ципрофлоксацина на микрофлору гнойного отделяемого раны больной В. в динамике эксперимента ЛФС.

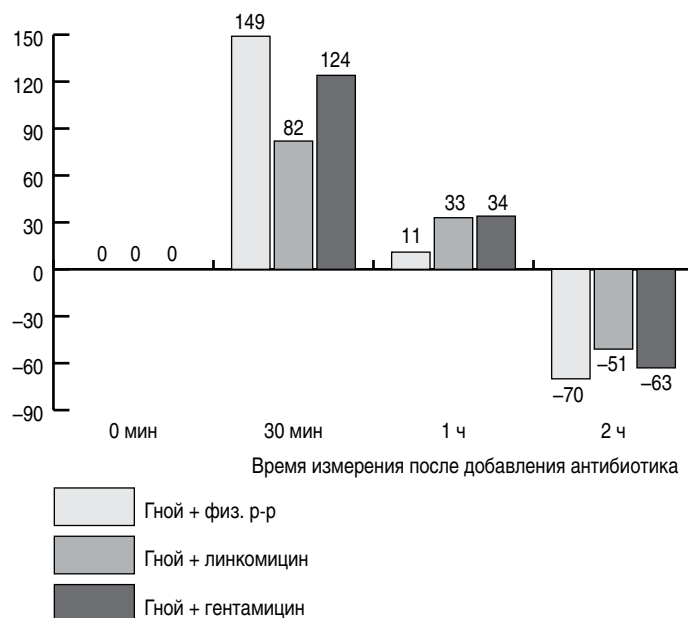


Рис. 2. Исследование действия гентамицина и линкомицина на микрофлору гнойного отделяемого раны больного Г. в динамике эксперимента ЛФС.

также показал отсутствие роста при культивировании через 24 ч в пробах с ципрофлоксацином в концентрациях 4 мкг/мл и 2 мкг/мл.

Таким образом, результаты культурального исследования подтвердили данные, полученные методом ЛФС.

Наибольшая чувствительность смешанной микрофлоры гнойного отделяемого определяется к ципрофлоксацину (больная В.) – это видно по выраженному снижению мощности флюоресценции через 30 мин и 1 ч после постановки пробы, в то время как линкомицина гидрохлорид оказывал эффект (причем менее выраженный) лишь через 2 ч (рис. 1).

В третьей серии экспериментов с использованием гентамицина сульфата и линкомицина гидрохлорида получен пример отсутствия чувствительности микрофлоры гнойного отделяемого к препаратам, так как в исследуемой пробе не происходило снижения флюоресценции, отличного от контроля. На рисунке 2 представлен пример отсутствия чувствительности микрофлоры гнойной раны больного (больной Г.) к используемым антибиотикам, так как в исследуемой пробе не происходило снижения флюоресценции гнойного отделяемого с антибиотиком, отличного от контроля.

При высеве через 24 ч выделена чистая культура *Enterococcus faecalis*, устойчивого к гентамицину, в ассоциации с анаэробным возбудителем из группы пигментообразующих бактероидов – *Prevotella melaninogenica*. Как известно, облигатно-анаэробные виды, как правило, обладают природной (естественной) устойчивостью к аминогликозидам, что необходимо учитывать при назначении антибактериальной терапии [1, 3, 6].

Для объективности полученных результатов в следующей серии экспериментов мы провели сравнительное изучение метода серийных двукратных разведений (бактериологический метод) и метода ЛФС для определения

чувствительности микробов к антимикробным препаратам с целью изучения зависимости бактериостатического или бактерицидного действия антибиотиков от концентрации бактерий.

С использованием референс-штамма *S. aureus* было установлено, что при концентрации микробной взвеси 10^6 КОЕ/мл антибиотик (например, ампициллина гидрохлорид) подавляет рост бактерий полностью (на 100%), а при концентрации 10^8 КОЕ/мл – только на 70%, при 10^{10} КОЕ/мл – на 30%. При использовании в эксперименте гентамицина сульфата и ципрофлоксацина получены сходные результаты (100% – 75% – 30% и 100% – 75% – 50% соответственно). Очевидно, что только 100% эффект подавления роста культуры может быть охарактеризован как бактерицидный.

Данные последних исследований свидетельствуют, что в исследуемой популяции количество как антибиотикочувствительных, так и антибиотикорезистентных штаммов микробов, выделяемых из гнойного экссудата у больных с гнойно-воспалительными заболеваниями челюстно-лицевой области, сбалансировано и практически одинаково. Но в то же время разные штаммы, выделенные у разных пациентов и относящиеся к одному и тому же виду микроорганизмов, могут быть как чувствительными, так и резистентными к антибактериальным препаратам [2, 7].

Выявленные нами различия в показателях мощности флюоресценции позволяют рекомендовать клиницистам врачам-офтальмологам, стоматологам, оториноларингологам назначение того препарата, в пробе с которым наблюдается максимальное снижение флюоресценции по сравнению с контролем. Предложенный экспресс-тест позволяет практикующему врачу избежать эмпирического выбора средств медикаментозной поддержки, особенно до получения результатов бактериологического исследования (длительность исследования с определением чувствительности к антимикробным препаратам – 5–7 дней).

Заключение

Полученные результаты свидетельствуют о необходимости коррекции медикаментозного воздействия на гнойную рану в зависимости от концентрации бактерий (что зачастую не учитывается практикующими врачами вследствие отсутствия клинических технологий экспресс-определения концентрации и чувствительности микробиоты гнойной раны непосредственно в месте лечения). Данный факт позволяет, на наш взгляд, объяснить низкую эффективность антибактериальной терапии гнойной инфекции при выявленной высокой чувствительности микрофлоры гнойной раны к антибиотику, а также отсутствие таковой в реальной клинической практике вследствие значительной – 10^8 КОЕ/мл и более концентрации микробов в гнойной ране. В этих случаях необходимость применения ЛФС в качестве экспресс-метода лабораторной диагностики становится еще более очевидной. Метод ЛФС на сегодняшний день можно охарактеризовать как клинкоориентированный микробиологический метод, предназначенный для экспресс-диагностики и определения чувствительности смешанной микробиоты гнойного очага к антибактериальным препаратам.

Литература

1. Ипполитов ЕВ. Мониторинг формирования микробной биопленки и оптимизация диагностики воспалительных заболеваний пародонта. Автореф. дисс. ... докт. мед. наук. М.: МГМСУ, 2016, 48 с.
2. Фурсова НК. Лекарственная устойчивость микроорганизмов. М.: Онто-Принт, 2012, 248 с.
3. Царёв ВН. Лабораторная диагностика анаэробной (неклостридиальной) инфекции. Руководство по медицинской микробиологии. Оппортунистические инфекции: возбудители и этиологическая характеристика. Под ред. А.С.Лабинской, Н.Н.Костюковой. Кн. III, Т. 1. М.: Бином, 2013, с. 439-454.
4. Брусина ЕБ. Эпидемиология внутрибольничных инфекций в офтальмологических отделениях. Руководство по медицинской микробиологии. Оппортунистические инфекции: клинко-эпидемиологические аспекты. Под ред. А.С.Лабинской, Е.Г.Волиной, Е.П.Ковалёвой. Кн. III, Т. 2. М.: Бином, 2014, с. 682-96.
5. Антибиотики и противоинфекционный иммунитет. Научно-практическое издание. Под ред. Н.Д.Ющука, И.П.Балмасовой, В.Н.Царёва. М.: Практическая медицина, 2012, 232 с.
6. Александров МТ. и др. Устройство для мультисубстратной флуоресцентной идентификации биологических микрообъектов и их биологических свойств. Патент №93990 РФ, 28.09.2009.
7. Ушаков РВ, Царёв ВН. Антимикробная терапия в стоматологии. Принципы и алгоритмы. М.: Практическая медицина, 2018, 240 с.

References

1. Ippolitov EV. Monitoring the formation of microbial biofilm and optimizing the diagnosis of inflammatory periodontal diseases. Diss. Moscow: MSMSU, 2016, 48 p. (In Russian).
2. Fursova NK. Drug Resistance of Microorganisms. Moscow: "Onto-Print" Publ., 2012, 248 p. (In Russian).

3. Tsarev VN. Laboratory diagnosis of anaerobic (non-clostridial) infection. In: Labinskaya AS, Kostyukova NA. Guide to Medical Microbiology. Moscow: "Binom" Publ., 2013, pp. 439-454. (In Russian).
4. Brusina EB. Opportunistic infections: clinical and epidemiological aspects. In: Labinskaya AS, Volina EG, Kovaleva EP. Guide to Medical Microbiology. Moscow: "Binom" Publ., 2014, pp. 682-96. (In Russian).
5. Antibiotics and anti-infectious immunity. Edited by Yushchuk ND, Balmasova IP, Tsarev VN. Moscow: "Prakticheskaya meditsina" Publ., 2012, 232 p. (In Russian).
6. Alexandrov MT, et al. Device for multisubstrate fluorescence identification of biological microobjects and their biological properties. Patent RF N 93990; 2009. (In Russian).
7. Ushakov RV, Tsarev VN. Antimicrobial therapy in dentistry. Principles and algorithms. Moscow: "Prakticheskaya meditsina" Publ., 2018, 240 p. (In Russian).

Информация о соавторах:

Давыдов Дмитрий Викторович, доктор медицинских наук, профессор кафедры глазных болезней ФГБОУ ВО «Московский государственный медико-стоматологический университет им. А.И.Евдокимова» Минздрава России
Адрес: 123425, Москва, ул. Делегатская, 20/1
Телефон: (495) 609-6700
E-mail: d-davydov3@yandex.ru

Царёва Валентина Викторовна, младший научный сотрудник лаборатории экспериментальной и клинической офтальмологии Научно-исследовательского медико-стоматологического института ФГБОУ ВО «Московский государственный медико-стоматологический университет им. А.И.Евдокимова» Минздрава России
Адрес: 123425, Москва, ул. Делегатская, 20/1
Телефон: (495) 609-6700
E-mail: fomicheva-e-m@yandex.ru

Лабазанов Асхаб Алиевич, научный сотрудник лаборатории молекулярно-биологических исследований Научно-исследовательского медико-стоматологического института ФГБОУ ВО «Московский государственный медико-стоматологический университет им. А.И.Евдокимова» Минздрава России
Адрес: 123425, Москва, ул. Делегатская, 20/1
Телефон: (495) 609-6700
E-mail: labazanov@yandex.ru

Подпорин Михаил Сергеевич, младший научный сотрудник лаборатории молекулярно-биологических исследований Научно-исследовательского медико-стоматологического института ФГБОУ ВО «Московский государственный медико-стоматологический университет им. А.И.Евдокимова» Минздрава России
Адрес: 123425, Москва, ул. Делегатская, 20/1
Телефон: (495) 609-6700
E-mail: podporin.mikhail@yandex.ru

Information about co-authors:

Dmitriy V. Davydov, MD, PhD, DSc, professor of department of eyes diseases of A.I.Yevdokimov Moscow State University of Medicine and Dentistry of the Ministry of Healthcare of the Russian Federation
Address: Delegatskaya Str. 20/1, Moscow, 123425, Russian Federation
Phone: (495) 609-6700
E-mail: d-davydov3@yandex.ru

Valentina V. Tsareva, junior research associate, laboratory of experimental and clinical ophthalmology, Research Institute of Medicine and Dentistry of A.I.Yevdokimov Moscow State University of Medicine and Dentistry of the Ministry of Healthcare of the Russian Federation
Address: Delegatskaya Str. 20/1, Moscow, 123425, Russian Federation
Phone: (495) 609-6700
E-mail: fomicheva-e-m@yandex.ru

Ashab A. Labazanov, research associate, laboratory of molecular biology investigation, Research Institute of Medicine and Dentistry of A.I.Yevdokimov Moscow State University of Medicine and Dentistry of the Ministry of Healthcare of the Russian Federation
Address: Delegatskaya Str. 20/1, Moscow, 123425, Russian Federation
Phone: (495) 609-6700
E-mail: labazanov@yandex.ru

Mikhail S. Podporin, junior research associate, laboratory of molecular biology investigation, Research Institute of Medicine and Dentistry of A.I.Yevdokimov Moscow State University of Medicine and Dentistry of the Ministry of Healthcare of the Russian Federation
Address: Delegatskaya Str. 20/1, Moscow, 123425, Russian Federation
Phone: (495) 609-6700
E-mail: podporin.mikhail@yandex.ru