

Методические подходы при определении чувствительности *Bacillus anthracis* к антибактериальным препаратам

Н. П. БУРАВЦЕВА, Л. Ю. АКСЕНОВА, А. Г. РЯЗАНОВА

Ставропольский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора

Methodic Approaches to Testing *Bacillus anthracis* Susceptibility to Antibacterials

N. P. BURAVTSEVA, L. YU. AKSENOVA, A. G. RYAZANOVA

Stavropol Research Antiplague Institute

Представлены материалы по определению чувствительности 50 штаммов *Bacillus anthracis* к 24 антибиотикам двумя методами: диско-диффузионным методом и методом серийных разведений антибиотиков в плотной питательной среде. Определены пограничные значения зон задержки роста микробов и значения минимальных подавляющих концентраций антибиотиков для чувствительных и устойчивых к антибиотикам штаммов сибиреязвенного микроба. Даны рекомендации по использованию питательных сред и контрольных штаммов для определения чувствительности возбудителя сибирской язвы к антибиотикам.

Ключевые слова: *Bacillus anthracis*, чувствительность к антибиотикам.

Susceptibility of 50 isolates of *Bacillus anthracis* to 24 antibiotics was tested by the disk-diffusion method and the method of serial dilutions in solid media. The tests allowed to determine the boundary values of the growth inhibition zones and the minimum inhibitory concentrations of the antibiotics for susceptible and resistant strains of *B.anthraxis*. Nutrient media and reference strains for testing antibiotic susceptibility of *B.anthraxis* are recommended.

Key words: *Bacillus anthracis*, antibiotic susceptibility.

Введение

Сибирская язва продолжает оставаться особо опасной социально значимой инфекцией. После актов биологического терроризма в 2001 г. в США с использованием спор *Bacillus anthracis* в качестве средства поражения проблема сибирской язвы приобрела новые аспекты [1].

Основными медикаментозными средствами, используемыми как для лечения сибирской язвы, так и в случае экстренной профилактики являются антибактериальные препараты.

Большинство природных изолятов *B.anthraxis* чувствительны ко многим антибиотикам, используемым в лечебной практике, однако в литературе описаны штаммы сибиреязвенного микроба, выделенные от больных и из других источников, устойчивые к пенициллину, амоксициллину, стрептомицину, тетрациклину, рифампицину [2—4]. Использование цефалоспоринов при лечении сибирской язвы может быть малоэффективным, так как к некоторым препаратам II и III поколения возбудитель сибирской язвы природноустойчив [5, 6]. Кроме того, по

данным отечественных авторов, получение антибиотикорезистентных штаммов *B.anthraxis* в эксперименте не составляет особых трудностей [7].

Отличительной особенностью сибирской язвы при ингаляционном пути заражения, который наиболее вероятен и опасен при биотеррористических атаках, является длительная задержка спор в легких. Возможность развития легочной формы заболевания в более поздние сроки (40 дней и более), как вследствие прорастания в легких так называемых «дремлющих» спор после раннего прекращения лечения или профилактики антибиотиками, вынудила в США в 2001 г. к проведению экстренной профилактики антибактериальными препаратами в течение 60—90 дней. Такое длительное назначение антибиотиков сопровождалось развитием частых осложнений, вплоть до 20% [8, 9].

Исходя из вышеизложенного, определение чувствительности *B.anthraxis* к антибактериальным препаратам перед назначением профилактики является необходимым этапом лабораторной диагностики.

Из всех методов определения чувствительности бактерий к антибиотикам диско-диффузионный метод (ДДМ) является наиболее распространен-

© Коллектив авторов, 2009

Адрес для корреспонденции: 355106 Ставрополь, ул. Советская, 13—15. Ставропольский научно-исследовательский противочумный институт

ным. На основании полученных значений диаметров зон подавления роста микробов вокруг дисков с антибиотиками исследуемые штаммы подразделяются на чувствительные, умеренно резистентные и резистентные. Для разграничения этих трёх категорий чувствительности используются так называемые пограничные значения диаметров зон подавления роста микробов, которые для каждого вида микроба и антибиотика различны [10]. Пограничные значения не являются неизменными величинами. Они могут пересматриваться в зависимости от изменения чувствительности к антибиотикам популяции микроорганизмов или с появлением новых антибиотиков [11].

Возбудитель сибирской язвы имеет ряд особенностей, с которыми сталкиваются лабораторные работники при определении чувствительности микроба к антибиотикам. Во-первых, сибиреязвенный микроб на питательной среде растёт в R-форме и взвесь при её приготовлении неомогенна. Во-вторых, выросшие колонии микроба имеют большие размеры (3–5 мм в диаметре), формируются в короткие сроки (15–18 ч), поэтому при определении ДДМ диаметры зон задержки роста могут быть заниженными.

Многолетний опыт работы с данным микробом позволяет нам дать рекомендации для определения чувствительности сибиреязвенного микроба к антибиотикам двумя методами — методом серийных разведений и ДДМ.

Материал и методы

При исследованиях придерживались инструкции [10] и методических рекомендаций [12].

Питательные среды. Для определения чувствительности *B.anthraxis* к антибактериальным препаратам методом серийных разведений и ДДМ использовали три среды: агар Мюллера-Хинтона (МХА) (рН 7,3±0,1), агар Хоттингера (АХ) (рН 7,2±0,2) и агар Гивенталья–Ведьминой (АГВ).

Контрольные штаммы. Для контроля точности и стандартности проведения исследований были использованы две тест-культуры с известной чувствительностью к антибиотикам. ВОЗ рекомендует для этой цели использовать *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. В ряде случаев критерии чувствительности для *S.aureus* ATCC 25923 не соответствуют критериям для *B.anthraxis*, поэтому в качестве контрольного использовали также вакцинный штамм *B.anthraxis* СТИ, применяемый для иммунизации людей, основные биологические свойства которого, в том числе и антибиотикочувствительность, изучены наиболее полно.

Антибактериальные препараты. Для определения чувствительности *B.anthraxis* использовали 24 коммерческих антибактериальных препарата. Среди них препараты первого ряда — бензилпенициллин, ампициллин, доксициклин, тетрациклин, цiproфлоксацин, офлоксацин, пефлоксацин, рифампицин, меропенем, имипенем, к препаратам второго ряда относят антибиотики группы аминогликозидов, цефалоспоринов, макролидов. Следует отметить, что сибиреязвенный микроб чувствителен только к цефалоспорином I поколения (цефазолин, цефалексин), тогда как к цефалоспорином II—III поколения (цефуоксим, цефтазидим, цефтриаксон, цефотаксим и др.) — устойчив.

Для метода серийных разведений в плотной питательной среде использовали соответствующие разведения антибиоти-

ков. Для препаратов первого ряда: ампициллин (или бензилпенициллин) — 0,002—0,004—0,008—0,015—0,03—0,06—0,125 мг/л; доксициклин (или тетрациклин) — 0,008—0,015—0,03—0,06—0,125 мг/л; цiproфлоксацин (или офлоксацин, пефлоксацин) — 0,004—0,008—0,015—0,03—0,06—0,125—0,25 мг/л; рифампицин — 0,008—0,015—0,03—0,06—0,125 мг/л; меропенем (или имипенем) — 0,008—0,015—0,03—0,06—0,125 мг/л; препаратов второго ряда: цефазолин (или цефалексин) — 0,125—0,25—0,5—1,0—2,5 мг/л; азитромицин — 0,125—0,25—0,5—1,0—2,5 мг/л; линкомицин — 0,5—1,0—2,5—5,0 мг/л; канамицин (или гентамицин, амикацин, стрептомицин) — 0,03—0,06—0,125—0,25 мг/л.

Для постановки ДДМ использовали коммерческие диски с определёнными концентрациями антибактериальных препаратов.

Посевная доза, инокуляция, инкубация. Для определения чувствительности к антибиотикам использовали 50 типичных вирулентных штаммов *B.anthraxis*. При определении ДДМ для посева отбирали типичные колонии 16–18-часовых агаровых культур, из которых готовили взвесь микробов в 0,9% растворе хлорида натрия, доводя плотность инокулюма в соответствии с отраслевым стандартом мутности ГИСК им. Л. А. Тарасевича (10 единиц), что соответствует $\sim 2 \cdot 10^7$ КОЕ/мл. Эту взвесь в объёме 0,3 мл наносили на поверхность питательной среды и равномерно распределяли шпателем. Чашки выдерживали 30 мин при комнатной температуре для впитывания суспензии. Затем накладывали диски стерильным пинцетом на поверхность засеянной питательной среды (не более 4 дисков на чашку), вновь выдерживали 30 мин при комнатной температуре, а затем, перевернув чашки с посевами, инкубировали при (36±1)°С в течение 18–20 ч (не более). Измеряли диаметр зон задержки роста вокруг дисков, включая диаметр самого диска, с точностью до 1 мм. Мелкие колонии в пределах зоны задержки роста не учитывали.

Для метода серийных разведений использовали суспензию той же концентрации микробных клеток, нанося небольшими каплями с помощью штампа-репликатора или пипеток с тонким концом на агаровые пластинки с разными концентрациями антибактериальных препаратов, начиная со среды с минимальным содержанием антибиотиков. Посевная доза составляла 10^4 – 10^5 КОЕ/мл. Посевы инкубировали 18–24 ч при (36±1)°С. Чувствительность/устойчивость культур устанавливали по минимальной концентрации препарата, подавляющей рост возбудителя (МПК, мг/л или мкг/мл) на среде культивирования.

Результаты и обсуждение

Результаты определения чувствительности 50 штаммов *B.anthraxis* двумя методами с использованием двух питательных сред (МХА и АХ) представлены в табл. 1. Исходя из того, что метод серийных разведений более точный, чем ДДМ, были сопоставлены значения МПК антибиотиков с пограничными значениями диаметров зон задержки роста микроба, установленных ДДМ (средние данные для 50 штаммов). Были обнаружены несоответствия при определении чувствительности двумя методами, особенно это касается тех препаратов, к которым возбудитель сибирской язвы устойчив (цефуоксим, цефтазидим, цефотаксим, цефтриаксон) или к тем препаратам, которые не нашли применения при лечении сибиреязвенной инфекции (эритромицин). Так, минимальные пограничные значения диаметра зон задержки роста сибиреязвенного микроба от 15 до 20 мм свидетельствуют о небольшой активности препа-

Таблица 1. Диапазон значений МПК антибактериальных препаратов и диаметров зон подавления роста для 50 штаммов *B.anthraxis*

Антибактериальные препараты	Содержание препарата в диске, мкг	Диаметры зон подавления роста, мм (средние данные)		Значение МПК, мг/л (средние данные)	
		МХА (рН 7,3±0,1)	АХ (рН 7,3±0,1)	МХА (рН 7,3±0,1)	АХ (рН 7,3±0,1)
Бензилпенициллин	10	26—30	34—46	0,002—0,06	0,002—0,06
Ампициллин	10	27—35	27—35	0,008—0,06	0,008—0,015
Цефазолин	30	29—35	29—35	0,125—0,25	0,06—0,125
Цефалексин	30	29—35	29—33	0,25—1,0	0,25—1,0
Цефуросим	30	17—23	17—23	10,0—25,0	10,0—25,0
Цефтазидим	30	15—20	15—20	50,0—100,0	50,0—100,0
Цефотаксим	30	20—28	20—28	10,0—25,0	10,0—25,0
Цефтриаксон	30	20—25	20—25	5,0—10,0	5,0—10,0
Эритромицин	15	18—24	18—24	0,25—1,0	0,5—1,0
Азитромицин	30	24—30	24—30	0,5—2,5	0,5—2,5
Линкомицин	15	22—30	22—30	1,0—5,0	1,0—2,5
Канамицин	10	22—30	22—30	0,06—0,5	0,06—0,25
Гентамицин	10	24—32	24—30	0,03—0,125	0,03—0,05
Стрептомицин	10	18—30	18—30	0,06—0,125	0,06—0,125
Амикацин	30	26—32	26—32	0,125—0,25	0,125—0,25
Тетрациклин	30	30—40	30—40	0,008—0,015	0,008—0,015
Доксициклин	10	30—40	30—40	0,008—0,015	0,008—0,015
Рифампицин	5	20—26	20—26	0,008—0,06	0,008—0,06
Ципрофлоксацин	5	27—35	27—35	0,004—0,015	0,004—0,015
Офлоксацин	5	27—35	27—35	0,05—0,125	0,05—0,125
Пефлоксацин	10	27—35	27—35	0,05—0,125	0,05—0,125
Ломефлоксацин	10	27—35	27—35	0,05—0,5	0,05—0,5
Меропенем	10	30—37	30—37	0,002—0,008	0,002—0,008
Имипенем		—	—	0,002—0,008	0,002—0,008

Таблица 2. Диапазон значений диаметров зон подавления роста контрольных штаммов *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) и *Bacillus anthracis* СТИ

Антибактериальные препараты	Содержание препарата в диске, мкг	Диаметр зон подавления роста, мм					
		МХА (рН 7,3±0,1)		АХ (рН 7,3±0,1)		АГВ (рН 7,3±0,1)	
		<i>S.aureus</i> ATCC 25923	<i>B.anthraxis</i> СТИ	<i>S.aureus</i> ATCC 25923	<i>B.anthraxis</i> СТИ	<i>S.aureus</i> ATCC 25923	<i>B.anthraxis</i> СТИ
Бензилпенициллин	10	26—37	32—39	26—37	34—40	26—30	32—39
Ампициллин	10	27—35	27—35	27—35	27—35	27—35	27—32
Цефазолин	30	29—35	29—35	29—35	29—35	29—35	29—35
Цефалексин	30	29—37	29—35	29—37	29—33	29—35	29—35
Цефуросим	30	27—35	17—23	27—35	17—23	27—35	16—23
Цефтазидим	30	16—20	15—20	16—20	15—20	16—20	15—22
Цефотаксим	30	25—31	20—28	25—31	20—28	25—31	19—26
Цефтриаксон	30	29—35	20—25	29—35	20—25	25—30	20—25
Эритромицин	15	22—30	18—24	22—30	18—24	22—30	18—24
Азитромицин	30	24—30	24—30	24—30	24—30	21—26	21—26
Линкомицин	15	22—32	22—30	22—32	22—30	22—32	22—30
Канамицин	30	19—26	22—30	19—26	22—30	19—26	19—26
Гентамицин	10	19—27	24—32	19—27	24—30	19—27	24—30
Стрептомицин	10	18—22	18—30	18—22	18—30	18—22	19—29
Амикацин	30	20—26	26—32	20—26	26—32	20—26	20—26
Тетрациклин	30	24—30	30—40	24—30	30—40	24—30	30—35
Доксициклин	10	23—29	30—40	23—29	30—40	23—29	27—32
Рифампицин	5	26—34	20—26	26—34	20—26	26—34	19—22
Ципрофлоксацин	5	22—30	27—35	22—30	27—35	22—30	25—30
Офлоксацин	5	24—28	27—35	24—28	27—35	24—28	23—30
Пефлоксацин	10	17—28	27—35	17—28	27—35	17—28	22—30
Ломефлоксацин	10	23—29	27—35	23—29	27—35	23—29	22—30
Меропенем	10	29—37	30—37	29—37	30—37	27—35	27—30

рата, однако диаметры зон задержки роста микроба этими же препаратами могут быть и максимальными — от 20 до 28, что может свидетельствовать об их чувствительности. Поэтому для определения чувствительности к этим препаратам мы рекомендуем использовать только метод серийных разведений.

Что же касается питательных сред, то данные табл. 1 свидетельствуют о возможности использования агар Хоттингера, если в лаборатории отсутствует среда Мюллера-Хинтона.

Среда АГВ, широко используемая в лабораторной практике, имеет ряд недостатков, и по-

Таблица 3. Пограничные значения диаметров зон подавления роста и величин МПК антибактериальных препаратов для *B.anthraxis*

Антибактериальные препараты	Содержание препарата в диске, мкг	Диаметры зон подавления роста, мм		Значение МПК, мг/л	
		S*	R*	S	R
Бензилпенициллин	10	≥26	≤16	≤0,1	≥1,0
Ампициллин	10	≥27	≤16	≤0,1	≥1,0
Цефазолин	30	≥29	≤16	≤0,2	≥1,0
Цефалексин	30	≥29	≤16	≤1,0	≥4,0
Эритромицин	15	≥24	≤16	≤1,0	≥4,0
Азитромицин	30	≥24	≤16	≤1,0	≥4,0
Линкомицин	15	≥23	≤16	≤1,0	≥4,0
Канамицин	10	≥23	≤16	≤1,0	≥4,0
Гентамицин	10	≥23	≤16	≤1,0	≥4,0
Стрептомицин	10	≥23	≤16	≤1,0	≥4,0
Амикацин	30	≥23	≤16	≤1,0	≥4,0
Тетрациклин	30	≥23	≤16	<0,1	≥1,0
Доксициклин	10	≥23	≤16	<0,1	≥1,0
Рифампицин	5	≥20	≤13	≤0,1	≥1,0
Ципрофлоксацин	5	≥19	≤15	<0,1	≥1,0
Офлоксацин	5	≥19	≤15	<0,1	≥1,0
Пефлоксацин	10	≥19	≤15	<0,1	≥1,0
Ломефлоксацин	10	≥20	≤15	<0,1	≥1,0
Меропенем	10	≥26	≤15	<0,1	≥1,0
Имипенем	—	—	—	<0,1	≥1,0

Примечание. S* — чувствителен; R* — устойчив.

этому некоторые исследователи не рекомендуют использовать её для определения чувствительности к антибиотикам [11]. Однако, как видно из табл. 2, значения зон задержек роста тест-культур — *S.aureus* (ATCC 25923) и *B.anthraxis* СТИ на трёх испытанных средах были практически аналогичными. Важными условиями для стандартизации проводимых определений являются толщина и равномерность слоя агара в чашках Петри, для чего в чашку диаметром 90 мм заливают 20 мл агара, а при диаметре 100 мм — 25 мл.

При выборе контрольного штамма, как видно из представленных в табл. 2, предпочтение можно отдать вакцинному штамму *B.anthraxis* СТИ. Значения диаметра зон задержки роста такими антибиотиками, как бензилпенициллин, цефуроксим, цефтриаксим, эритромицин, всеми аминогликозидами, тетрациклином и доксициклином, не совпадают у штамма *S.aureus* ATCC 25923 и штамма *B.anthraxis* СТИ, в то же время значения диаметра зон задержки роста штамма СТИ и вирулентных штаммов сибиреязвенного микроба оказались аналогичными (см. табл. 1 и 2).

Нами определены пограничные значения диаметра зон подавления роста (в мм) и величин

МПК (в мг/л) для антибактериальных препаратов, к которым возбудитель сибирской язвы чувствителен (табл. 3). На основании полученных значений диаметров зон подавления роста вокруг дисков с антибиотиками и МПК для штаммов сибиреязвенного микроба изученные штаммы были подразделены на чувствительные (S) и резистентные (R) (см. табл. 3).

Заключение

Таким образом, для разграничения двух категорий чувствительности (или резистентности) выделяемых штаммов *B.anthraxis* можно использовать так называемые пограничные значения диаметров зон подавления роста микроорганизмов или значения минимальной подавляющей концентрации антибиотиков в плотной питательной среде. Увеличение МПК или снижение зоны подавления роста для исследуемых штаммов по сравнению с контрольным штаммом *B.anthraxis* СТИ может свидетельствовать о тенденции повышения устойчивости культуры, что требует изменения схемы терапии данным антибиотиком или использования для лечения и профилактики другого, более эффективного антибактериального препарата.

ЛИТЕРАТУРА

1. Черкасский Б. Л. Эпидемиология и профилактика сибирской язвы. М.: 2002; 332—352.
2. Буравцева Н. П. Роль пеницилиназы в механизме устойчивости сибиреязвенного микроба к бензилпенициллину. Антибиотики 1971; 2: 168—173.
3. Cavallo J. D., Ramisse F., Girardet M. et al. Antibiotic susceptibilities of 96 *Bacillus anthracis* isolated in France between 1994 and 2000. Antimicrob Agents Chemother 2002; 2307—2309.
4. Chen Y., Tenover F. C., Kohler T. M. Beta-lactamase gene expression in a penicillin-resistant *B.anthraxis* strain. Ibid; 2004; 48: 12: 4873—4877.
5. Буравцева Н. П., Саркисова Н. В., Еременко Е. И., Цыганкова О. И. и др. Чувствительность сибиреязвенного микроба к антибиотикам, в том числе к цефалоспорином. Актуальные аспекты природноочаговых болезней: Мат. науч.-практ. конф., посвященной 80-летию Омского НИИПИ, 16—17 окт. 2001 г. Омск 2001; 208—209.
6. Coker P. R., Smith K. L., Hugh-Jones M. E. Antimicrobial susceptibilities of diverse *Bacillus anthracis* isolates. Antimicrob. Agents Chemother 2002; 46: 3843—3845.

7. *Буравцева Н. П.* Специфическая и экстренная профилактика сибирской язвы. Дис. ...д-ра мед. наук. Саратов 1991; 389.
8. *Perkins B.* Bioterrorism-related anthrax, USA 2001. 5th International Conference on Anthrax. Nice, France March 30 — April 3 2003; 38.
9. *Shepard C. W., Soriano-Gabarro M., Zell E. R.* Antimicrobial postexposure prophylaxis for anthrax: adverse events and adherence. *Emerging for Emerging Diseases* 2002.
10. Инструкция по определению чувствительности возбудителей опасных инфекционных заболеваний к антибиотикам и химиопрепаратам. М.: 1990; 36.
11. *Решедько Г. К., Стецюк О. У.* Особенности определения чувствительности микроорганизмов диско-диффузионным методом. *Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия* 2001; 3: 4: 348—354.
12. Методические указания «Определение чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препаратам» /МУК 4.2.1890-04/. *Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия* 2004; 6: 4: 306—359.