ISSN 2218-7332

Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова

Сеченовский вестник

№ 1(23)
2016

НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКИЙ РЕЦЕНЗИРУЕМЫЙ ЖУРНАЛ



- ДОСТИЖЕНИЯ ПРОФИЛАКТИЧЕСКОЙ МЕДИЦИНЫ
- ОБРАЗОВАТЕЛЬНЫЕ ИННОВАЦИИ
- НОВОСТИ МЕДИЦИНЫ И ФАРМАЦИИ

СЕЧЕНОВСКИЙ ВЕСТНИК

НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКИЙ РЕЦЕНЗИРУЕМЫЙ ЖУРНАЛ
ГБОУ ВПО ПЕРВЫЙ МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ имени И.М. СЕЧЕНОВА МИНЗДРАВА РОССИИ

SCIENTIFIC AND PRACTICAL REVIEWED JOURNAL
SEI HPT THE FIRST SECHENOV MOSCOW STATE MEDICAL UNIVERSITY OF THE MINISTRY OF HEALTH OF RUSSIA

№ 1(23) 2016 г.

«Сеченовский вестник»
НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКИЙ РЕЦЕНЗИРУЕМЫЙ ЖУРНАЛ

Выходит 4 раза в год

Журнал входит в перечень изданий, рекомендованных ВАК

Учредитель
Государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова Министерства здравоохранения Российской Федерации
The First Sechenov Moscow State Medical University of the Ministry of Health of Russian Federation
119991, г. Москва, ул. Трубецкая, д. 8, стр. 2

Почтовый адрес редакции
119991, г. Москва, ул. Трубецкая, д. 8, стр. 2

Телефон редакции
8 (499) 766-44-28
e-mail: vestnik@mma.ru

Заведующий редакцией: *Г.В. Кондрашов*
Верстка: *Е.В. Комарова*
Корректор: *В.В. Прокопенко*
Переводчик: *канд. полит. наук А.Е. Тарасов*

Издатель
Издательство Первого МГМУ имени И.М. Сеченова
119034, г. Москва, Зубовский бульвар, д. 37, стр. 2
Телефон: 8 (499) 766-44-28

Издается с 2010 г.

Журнал представлен в Федеральной электронной медицинской библиотеке http://www.femb.ru, входит в библиографическую базу данных РИНЦ

Подписной индекс в каталоге агентства «Пресса России» – 29124

Формат 60x90 1/8. Печ. л. 9.5
Печать цифровая. Тираж 500 экз.

Подготовлено к печати в Издательстве Первого МГМУ имени И.М. Сеченова: 119034, Москва, Зубовский бульвар, д. 37, стр. 2

Перепечатка и любое воспроизведение материалов и иллюстраций в электронном виде из журнала «Сеченовский вестник» допускается только с письменного разрешения учредителя и издателя

ISSN 2218-7332

Главный редактор
П.В. Глыбочко

Заместитель главного редактора
С.Б. Шевченко

Ответственный секретарь
Ю.В. Несвижский

Редакционная коллегия

Н.И. Брико
Н.А. Геппе
С.В. Грачев
В.Т. Ивашкин
А.И. Ищенко
В.Р. Кучма
П.Ф. Литвицкий
В.И. Подзолков
В.П. Сергиев
В.П. Фисенко
А.Ф. Черноусов
В.И. Чиссов

Редакционный совет

О.И. Адмакин
Е.И. Алексеева
Е.И. Аляев
Е.И. Баранов
Г. Барбали
Ю.Н. Беленков
Л.А. Бокерия
А.И. Вялков
Э.И. Гальперин
С.В. Готье
И.И. Дедов
А.А. Замятнин
М.А. Кинкулькина
И.И. Краснюк
Т.М. Литвинова
Е.Н. Морозов
Н.А. Мухин
Д.А. Напалков
Г.Г. Онищенко
В.И. Покровский
А.В. Решетников
В.А. Решетников
Р. Риенмюллер
Х.Э. Санер
А.А. Свистунов
С.В. Смердин
А.И. Стрижаков
Г.Т. Сухих
А.Л. Сыркин
Й.-М. Танген
С.К. Терновой
В.В. Фомин
И.М. Чиж
Е.В. Ших
Б. Эдвин
Б. Ян
Н.Н. Яхно

Editor-in-Chief
P.V. Glybochko

Deputy Editor-in-Chief
S.B. Shevchenko

Executive Secretary
Yu.V. Nesvizhsky

Editorial Collegium

N.I. Briko (Россия)
N.A. Geppe (Россия)
S.V. Grachev (Россия)
V.T. Ivashkin (Россия)
A.I. Ishenko (Россия)
V.R. Kuchma (Россия)
P.F. Litvitskiy (Россия)
V.I. Podzolkov (Россия)
V.P. Sergiev (Россия)
V.P. Fisenko (Россия)
A.F. Chernousov (Россия)
V.I. Chissov (Россия)

Editorial Board

O.I. Admakin (Россия)
E.I. Alekseeva (Россия)
Yu.G. Alyaev (Россия)
A.A. Baranov (Россия)
G. Barbagli (Италия)
Yu.N. Belenkov (Россия)
L.A. Bokeriya (Россия)
A.I. Vyalkov (Россия)
E.I. Galperin (Россия)
S.V. Gotje (Россия)
I.I. Dedov (Россия)
A.A. Zamyatnin (Россия)
M.A. Kinkulkina (Россия)
I.I. Krasnyuk (Россия)
T.M. Litvinova (Россия)
E.N. Morozov (Россия)
N.A. Mukhin (Россия)
D.A. Napalkov (Россия)
G.G. Onishchenko (Россия)
V.I. Pokrovsky (Россия)
A.V. Reshetnikov (Россия)
V.A. Reshetnikov (Россия)
R. Rienmuller (Австрия)
H.E. Saner (Швейцария)
A.A. Svistunov (Россия)
S.V. Smerdin (Россия)
A.I. Strizhakov (Россия)
G.T. Sukhikh (Россия)
A.L. Syrkin (Россия)
J.-M. Tangen (Норвегия)
S.K. Ternovoi (Россия)
V.V. Fomin (Россия)
I.M. Chihz (Россия)
E.V. Shih (Россия)
B. Edwin (Норвегия)
B. Yan (Китай)
N.N. Yakhno (Россия)

СОДЕРЖАНИЕ

№ 1(23) 2016 г.

ДОСТИЖЕНИЯ ПРОФИЛАКТИЧЕСКОЙ МЕДИЦИНЫ
THE ACHIEVEMENTS OF PREVENTIVE MEDICINE

Брико Н.И., Миндлина А.Я., Полибин Р.В., Соколова Т.В., Цапкова Н.Н.

НА ПЕРЕДОВЫХ РУБЕЖАХ ЭПИДЕМИОЛОГИИ (К 85-ЛЕТНЕМУ ЮБИЛЕЮ КАФЕДРЫ ЭПИДЕМИОЛОГИИ И ДОКАЗАТЕЛЬНОЙ МЕДИЦИНЫ ПЕРВОГО МГМУ ИМЕНИ И.М. СЕЧЕНОВА)

4

Briko N.I., Mindlina A.J., Polibin R.V., Sokolova T.V., Tsapkova N.N.

AT THE FOREFRONT OF EPIDEMIOLOGY (THE 85TH ANNIVERSARY OF THE DEPARTMENT OF EPIDEMIOLOGY AND EVIDENCE-BASED MEDICINE SECHENOV FIRST MOSCOW STATE MEDICAL UNIVERSITY)

Зверев В.В., Несвижский Ю.В., Миндлин С.Н., Тарасова Н.Ю.

ИСТОРИКО-ТЕХНОЛОГИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ МИКРОБОВ К АНТИБИОТИКАМ

12

Zverev V.V., Nesvizhskiy Yu.V., Mindlin S.N., Tarasova N.Yu.

HISTORY AND TECHNOLOGICAL ASPECTS OF ANTIBIOTIC SENSITIVITY TESTING

Герасимов А.Н., Сердюкова М.Ю.

ПРОВЕРКА ПРИМЕНИМОСТИ МЕТОДОВ ПАРАМЕТРИЧЕСКОЙ СТАТИСТИКИ ДЛЯ АНАЛИЗА МЕДИКО-БИОЛОГИЧЕСКИХ ДАННЫХ

19

Gerasimov A.N., Serdyukova M.Yu.

PARAMETRIC STATISTICS APLICABILITY TO BIO-MEDICAL DATA ANALYSIS

Орлова О.А., Акимкин В.Г.

ПРОФИЛАКТИКА ВНУТРИБОЛЬНИЧНЫХ ПНЕВМОНИЙ В ОТДЕЛЕНИИ ХИРУРГИЧЕСКОЙ РЕАНИМАЦИИ

24

Orlova O.A., Akimkin V.G.

PREVENTION OF NOSOCOMIAL PNEUMONIAS IN A SURGICAL INTENSIVE CARE UNIT

Коршунов В.А., Миндлина А.Я., Вязовиченко Ю.Е.

АНАЛИЗ СИСТЕМЫ ПЕРВИЧНОЙ ПРОФИЛАКТИКИ НАРКОМАНИИ В РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ И ПРЕДЛОЖЕНИЯ ПО ЕЕ ОПТИМИЗАЦИИ

31

Korshunov V.A., Mindlina A.Ya., Vjazovichenko Yu.E.

ANALYSIS OF THE RUSSIAN PRIMARY DRUG ABUSE PREVENTION SYSTEM AND PROPOSALS FOR ITS OPTIMIZATION

ОБРАЗОВАТЕЛЬНЫЕ ИННОВАЦИИ
EDUCATIONAL INNOVATIONS

Решетников А.В., Трегубов В.Н., Шамшурина Н.Г., Марочкина Е.Б., Жилина Т.Н.

ПЕРСПЕКТИВЫ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ МАССОВЫХ ОТКРЫТЫХ ОНЛАЙН КУРСОВ В СИСТЕМЕ НЕПРЕРЫВНОГО МЕДИЦИНСКОГО ОБРАЗОВАНИЯ ОРГАНИЗАТОРОВ ЗДРАВООХРАНЕНИЯ

39

Reshetnikov A.V., Tregubov V.N., Shamshurina N.G., Marochkina E.B., Zilina T.N.

MASSIVE OPEN ONLINE COURSES IN THE CONTINUOUS TRAINING OF HEALTH POLICY MAKERS

УДК 616-093

В.В. Зверев,
д-р биол. наук, проф., акад. РАН, зав. кафедрой микробиологии, вирусологии и иммунологии Первого МГМУ имени И.М. Сеченова Минздрава России, директор НИИ вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова РАН

Ю.В. Несвижский,
д-р мед. наук, проф., декан медико-профилактического факультета Первого МГМУ имени И.М. Сеченова Минздрава России

С.Н. Миндлин,
студент центра инновационных образовательных программ «Медицина Будущего» Первого МГМУ имени И.М. Сеченова Минздрава России

Н.Ю. Тарасова,
студентка центра инновационных образовательных программ «Медицина Будущего» Первого МГМУ имени И.М. Сеченова Минздрава России

V.V. Zverev,
Dr. Biol. Sciences, Prof., Acad. RAS, head. Department of Microbiology, Virology and Immunology of the First Sechenov Moscow State Medical University, Director of Federal State Budgetary Scientific Institution I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera

Yu.V. Nesvizhskiy,
Dr. med. Sciences, Professor, Dean, faculty of preventive medicine of the First Sechenov Moscow State Medical University

S.N. Mindlin,
a student of the center for innovative educational programs Medicine of tthe First Sechenov Moscow State Medical University

N.Yu. Tarasova,
student at center for innovative educational programs Medicine of the Futurethe First Sechenov Moscow State Medical University

ИСТОРИКО-ТЕХНОЛОГИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ МИКРОБОВ К АНТИБИОТИКАМ

HISTORY AND TECHNOLOGICAL ASPECTS OF ANTIBIOTIC SENSITIVITY TESTING

КОНТАКТНАЯ ИНФОРМАЦИЯ:
Несвижский Юрий Владимирович, д-р мед. наук, проф., декан медико-профилактического факультета Первого МГМУ имени И.М. Сеченова Минздрава России
Адрес: 125009, г. Москва, ул. Моховая, д. 11, стр. 10
Телефон: + 7 903 557-50-51
e-mail: nesviz@mail.ru
Статья поступила в редакцию: 29.02.2016 г.
Статья принята к печати: 25.04.2016 г.

CONTACT INFORMATION:
Yuri Nesvizhskiy, Dr. med. Sciences, Professor, Dean, faculty of preventive medicine of the First Sechenov Moscow State Medical University
Address: 11, p. 10, Mokhovaya str., Moscow, Russia, 125009
Tel.: + 7 903 557-50-51
e-mail: nesviz@mail.ru
The article received: February 29, 2016.
The article approved for publication: April 25, 2016.

Аннотация. В представленной статье дается историко-технологическая оценка развития методов определения чувствительности микробов к антибиотикам и показано наличие отдельных периодов, ассоциирующихся с внедрением определенных технологий. Показано, что внедрение того или иного диагностического подхода связано с его технологической проработанностью, стандартизованностью, наличием соответствующего оснащения, квалифицированных кадров, организационной структуры и международного признания, а также медицинской и экономической эффективности.
Представляется перспективным внедрение в практику «некультуральных» автоматизированных технологий. Между тем, развитие этого направления диагностики требует серьезной проработки ряда технологических и организационных вопросов, одним из которых является стандартизация, а также доказательство специфичности.

Abstract. The present article discusses a history and technological aspects of antibiotic susceptibility testing methods and indentifies individual periods associated with the introduction of new technologies. The article demonstrates that the introduction of a diagnostic approach is associated with technological elaboration, standardization, the availability of appropriate equipment, qualified personnel, organizational structure and the international recognition, as well as medical and economic efficiency.

"Noncultural" automated technologies seem to be promising for practical implementation. Meanwhile, the progressin this field requires serious consideration of a number of technological and organizational issues, e.g. standardization and the proof of specificity.

Ключевые слова. Антибиотик, определение чувствительности микроба к антибиотику.

Keywords. Antibiotic, antibiotic susceptibility testing, antibiotic resistance.

XIX в. знаменовался бурным развитием многих наук и в том числе микробиологии. Одним из ее достижений явилось открытие такого явления, как антибиоз или микробный антагонизм. Проявляется оно тем, что выделяемые одной популяцией микроорганизмов вещества подавляют рост другой. Враждебное отношение между микроорганизмами интенсивно изучалось такими всемирно известными учеными, как Л. Пастер, Р. Кох и П. Эрлих [1]. Были даже специально предложены лабораторные методы обнаружения эффекта, например, по потере подвижности микроба в бульонной культуре.

Вместе с тем отдельный интерес в научно-историческом плане представляют исследования взаимодействия бактерий и грибов. Так, Уильям Робертс в своей работе в 1874 г. обнаружил, что пробирки с Penicillium glaucum не подвергаются бактериальному загрязнению [2]. Джон Тиндаль в 1876 г. сделал сходное заключение: в одном бульоне может расти либо плесень, либо бактерии, но никак не совместно [1]. Однако именно Александр Флеминг в 1929 г., наблюдая за характером роста колоний стафилококка в чашках, контаминированных пенициллом, «переоткрыл» с новых позиций явление антибиоза [3, 4]. Он сделал вывод о том, что есть некое вещество, препятствующее размножению бактерий. Это вещество он назвал «Пенициллин». Описанный феномен и выполненный впоследствии А. Флемингом целый ряд работ ознаменовал новую эру в развитии медицины – эру антибиотиков.

Открытие эффекта пенициллина дало старт широкомасштабным поискам препаратов, обладающих антимикробным действием, который продолжается и поныне. Наряду с блестящими достижениями антибиотикотерапии медицина столкнулась с ее неожиданной проблемой, приобретшей сегодня особую медико-социальную значимость: бактерии могут формировать резистентность к антибиотикам. Помимо этого современная микробиология нередко использует чувствительность к антибиотическим препаратам как маркер штаммовой принадлежности бактерий. Именно проблема чувствительности, а в некоторых случаях устойчивости бактерий к антибиотикам определила необходимость целенаправленной разработки методик для ее исследования.

Одной из первых публикаций в России (СССР), в которой была обозначена проблема антибиотикорезистентности и приведены методические подходы для ее изучения, была монография выдающегося отечественного микробиолога, академика АМН СССР, профессора З.В. Ермольевой «Пенициллин» (1946) [5]. С тех пор возможности микробиологии значительно расширились в техническом и методическом плане, несравненно шире стали наши познания в этой области. Однако проблема антибиотикорезистентности за последнее время стала еще острее, что определило актуальность настоящего обзора, в котором с историко-технологических позиций будет дан анализ развития данного направления микробиологической диагностики.

Первенство как в историческом плане, так и по непосредственной близости к «золотому стандарту» микробиологической диагностики принадлежит классическим методам, основанным на культивировании «микроба-мишени» в присутствии антибиотического препарата. При этом оценка результатов испытания проводится по непосредственному биологическому эффекту: гибели или торможению развития живой тест-культуры.

Первым методическим подходом в решении вопроса об испытании действия различных веществ на культуру микроба следует считать работу М.В. Бейеринка, голландского микробиолога и ботаника, иностранного почетного члена АН СССР. В 1889 г. при исследовании влияния ауксинов на рост бактерий он использовал метод, основанный на диффузии вещества в агаровый слой [2]. Применив данный подход для определения активности антибиотиков, Флеминг в 20-е гг. XX в. разработал ряд методов, получивших обобщенное название диффузионных. Их технологическую основу составляет культивирование бактерий на плотной питательной среде, в которую диффундирует антибиотик.

Первым для определения бактериостатической активности пенициллина стал разработанный Флемингом в 1924 г. «метод бороздки» [3]. Его же он использовал при изучении лизоцима. Суть метода заключалась в том, что в плотной питательной среде, залитой в чашку Петри, вырезали борозду, и под прямым углом к ней высевали микробную культуру. Затем бороздку заполняли расплавленным агаром с растворенным в нем пенициллином. Активное вещество диффундировало в питательную среду и тормозило рост микробной культуры. Эффективность подавления роста зависела от чувствительности штамма к пенициллину. О концентрации пенициллина судили по величине зоны подавления роста по сторонам от борозды. Reddish усовершенствовал эту технику, предложив вырезать в питательной среде небольшие лунки [6], в дальнейшем такая техника получила название «Оксфордский чашечный метод» или «чашечный метод Heatley» [7], эффект определяли по отсутствию роста вокруг лунки. «Метод бороздки» и «чашечный метод» являлись только первыми ориентировочными качественными пробами: первый для испытания большого количества бактериальных видов на одной чашке, а второй – для тестирования нескольких образцов пенициллина на одном чувствительном виде микробов.

В дальнейшем Heatley и Flory создали методику, получившую название «кольцевой метод» [5]. В этом методе на поверхность питательной среды, засеянной суточной культурой стафилококка, уста-

навливали нагретые стеклянные или фарфоровые цилиндры, в которые заливали различные разведения пенициллина, а затем замеряли зоны подавления роста, образовавшиеся вокруг них.

В 40-х гг. диффузионные методы получили дальнейшее развитие, связанное с модификацией способа нанесения антибиотика. Heatley в 1940 г. усовершенствовал оксфордский метод, предложив использовать для нанесения на культуру микробов испытуемого вещества бумажные фильтры, пропитанные тем или иным антибиотиком вместо цилиндров с агаром. [8] В 1943 г. насыщенные пенициллином бумажные диски с успехом применили Foster и Woodroof [73]. А в 1944 г. Vincent и Vincent [9] установили, что при использовании дисков зоны подавления роста больше и их размер чувствителен к колебаниям содержания пенициллина. Использование дисков позволило сократить время исследования и облегчить подсчет результатов. Этот подход составил основу широко распространенного дискодиффузионного метода, ставшего «золотым стандартом» тестирования антибиотикочувствительности. В настоящее время для диагностики широко используются, в том числе и в России, стандартизованные 6-миллиметровые бумажные диски с антибиотиками, предложенные Бонди и его коллегами в 1947 г. [10].

Следует также отметить работу Hoyt и Levine, которые описали технику использования таблеток, содержащих пенициллин вместо пропитанной бумаги [11]. Однако она не получила широкого распространения в практической работе.

Результаты первых диффузионных тестов учитывались достаточно условно: отсутствие зоны подавления роста свидетельствовало о резистентности, а ее наличие – о чувствительности. Для уточнения полученных результатов было предложено использовать два диска с крайними значениями концентрации: высоким и низким. Таким образом, появление зоны подавления роста вокруг обоих дисков свидетельствовало о высокой чувствительности микроорганизма, появление зоны вокруг диска с максимальной концентрацией – о средней степени чувствительности, а полное отсутствие – о резистентности.

В 1945 г. Моос описал метод с использованием дисков [12], который стал предшественником метода Стокс, до недавнего времени широко применявшегося во многих лабораториях Великобритании. В этом методе высев возбудителей производили вокруг диска с антибиотиком в виде радиальных штрихов.

В этом методе, разработанном Stokes и Waterworth [13], предложили разделить чашку Петри горизонтальными линиями на три части. Верхнюю и нижнюю треть засевают контрольным штаммом, а центральную часть – исследуемым (в модифицированном методе Стокс, наоборот, контроль в центре, а сверху и снизу – исследуемые штаммы). На линии, разделяющие зоны, помещают диски с антибиотиками. Таким образом, на одной чашке Петри удавалось получить сравнительные результаты.

Другая технология, предложенная А. Флемингом [4], основывалась на культивировании бактерий в жидкой питательной среде в присутствии различных концентраций антибиотика. При этом производилось серийное разведение антибиотика в бульоне, а результат оценивался по степени мутности. Позже ученый усовершенствовал этот метод, используя для регистрации эффекта pH-индикатор вместо мутности [14]. Именно с помощью метода серийных разведений стало возможно определять минимальную ингибирующую концентрацию (МИК). Г.Ф. Гаузе, автор отечественного антибиотика грамицидина С, также описывал способы проверки выпускаемых промышленностью серий этого антибиотика при помощи метода серийных разведений [15].

В тот же период времени появились методы, основанные на приготовлении серийных разведений антимикробных агентов в расплавленном агаре, получившие впоследствии название «методы разведения в агаре». Такой подход впервые применили Schmith и Reymann для определения МИК сульфапиридина для гонококков [16]. Позднее Frisk применил данную технологию для тестирования чувствительности Streptococcus pneumonia к пенициллину [17]. Стало понятно, что при правильном выполнении диско-диффузионных методов и методов разведения в агаре получались схожие результаты [18]. Однако вскоре признали, что для определения МИК для чистых культур в условиях обычных лабораторий этот метод не подходит – он слишком трудоемкий и кропотливый. Поэтому этот метод упростили путем введения специализированных приспособлений [19, 20] и замены ряда концентраций в методе серийных разведений на одно или несколько крайних значений [21, 22].

Комбинация диффузионного метода и метода серийных разведений была разработана в Швеции и представлена научному сообществу на заседании Межнаучной Конференции по Антимикробным Препаратам и Химиотерапии (ICAAC) в 1988 г. Этот метод получил название Е-тест. На пластиковую полоску помещался градиент концентрации препарата, который стабильно сохраняется в течение 18–20 часов. Последнее позволяет тестировать широкий диапазон микробов от быстрорастущих аэробов до медленнорастущих анаэробов и грибов. В США метод был одобрен FDA в 1991 г. и он также получил одобрение Минздрава и упомянут в МУК 4.12.1890-04.

Существенным недостатком всех классических методов определения чувствительности микроба к антибиотикам является длительное время получе-

ния результата, что обусловлено продолжительной культивацией бактериальной культуры. Решение было найдено в создании автоматизированных методов тестирования антибиотикочувствительности [23], чему способствовало бурное развитие информационных технологий и широкое внедрение ЭВМ.

Одной из первых автоматических систем была Autobac disc elution, выпущенная Pfizer Diagnostics в 1974 г. [24]. Она позволяла получить результаты уже через 4–6 ч после инокуляции исследуемого материала. Следующей был выпущенный в 1977 г. фирмой Abbott комплекс MS-2 System [25], который для идентификации микроорганизма и составления антибиотикограммы с определением минимальной ингибирующей концентрации антибиотика затрачивал 4 часа. В том же году McDonnel Douglas Corporation предложила на рынок диагностическую систему AMS, которая является предшественником сегодняшнего бактериологического анализатора Vitek [26]. Эта система использовала дегидратированные реагенты в запаянных пластиковых картах отдельно для идентификации микроорганизма и определения его антибиотикочувствительности. Также в 1977 г. были выпущенные стандартизированные планшеты для микротитрования, содержащие антимикробные препараты. Эта инновация в итоге привела к разработке таких автоматизированных комплексов, как Micro-Media Systems, Sensititre, BBL Sceptor, и целой линейки продуктов от Microscan. В итоге система для микротитрования превратилась в конструктивно сложные анализаторы, такие как TouchScan, AutoScan и MicroScan Walkaway System [26].

Параллельно с классическими методами развивались и альтернативные методики тестирования антибиотикочувствительности. Так, например, сотрудник лаборатории, руководимой З.В. Ермольевой, В.А. Дорфман предложил метод быстрого определения активности пенициллина, основанный на его способности вызывать моментальные изменения свойств поверхности бактериальных клеток путем регистрации их электрического заряда. Изменение поверхностного потенциала бактерий оказалось специфичным для видов бактерий, чувствительных к пенициллину. Этот метод не требует культивирования, однако его недостатком является сложность установки для микрокатафореза, которой определяется измерение электрического разряда [5].

Флуоресцентная спектроскопия является одним из самых высокочувствительных методов, позволяющих выявлять очень низкие концентрации веществ, вплоть до пикомолярных, и отличать одно вещество от другого [27]. При взаимодействии излучения с живыми организмами наблюдаются такие эффекты, как отражение, рассеяние, поглощение, генерация акустического поля, нелинейные эффекты, флуоресценция и т. д. Знания о собственной флюоресценции органических соединений, встречающихся в живой клетке любого организма, послужили основой для разработки новой медицинской технологии, которая позволяет оценить адекватность выбранной антибиотикотерапии в течение 2–4 часов.

Перспективной считается матричная лазерная десорбционная времяпролетная масс-спектрометрия (MALDI-TOF), которая успешно используется для микробиологической диагностики. В настоящее время определение чувствительности к антибиотикам напрямую с помощью этого метода невозможно, так как требует дополнительного оборудования. Однако данное направление активно исследуется [28]. Прорабатываются следующие направления: определение изменчивости активности ферментов под влиянием препаратов, детекция детерминант резистентности посредством исследования протеомики мультирезистентных штаммов, анализ модификаций точек приложения действия антибиотика, таких как рибосомальное метилирование и пр. Новые методы, такие как PEX/MALDI-TOF MS, позволяют обнаружить гены резистентности гораздо раньше ПЦР или секвенирования по Сэнгеру.

В 2005 г. Gfeller, Nugaeva и Hegner опубликовали статью, в которой описали разработанный ими детектор роста бактерий, основанным элементом которого является наномеханический осциллятор, покрытый слоем питательной среды. Увеличение массы клеток приводит к изменению частоты колебаний осциллятора, что позволяет зарегистрировать рост клеток. При этом минимальное регистрируемое изменение массы примерно эквивалентно 100 клеткам E. coli, а ответ возможно получить в течение 2 ч [29].

Как вариант детекции было предложено использовать проточную цитофлоуметрию.

После инкубации с антибактериальным препаратом исследуемый штамм микроба обрабатывают флуоресцентным красителем, связывающимся с нуклеиновыми кислотами погибших клеток. При этом жизнеспособные клетки остаются интактными. Под воздействием лазерного излучения погибшие клетки излучают спектр флуоресценции, который регистрируется в проточном цитофлуориметре. Общая продолжительность диагностики варьирует от 1–2 до 24 ч.

Применение изотермальной микрокалориметрии позволяет тестировать антибиотикочувствительность по выделению тепла активно растущей культурой клеток. Исследование проводится в герметично закрытых ампулах. Это, например, облегчает работу с высококонтагиозными возбудителями, такими как M. tuberculosis. Метод дает информацию о максимальной скорости роста микроорганизма, бактерицидной активности антибиотика, задержки Log-фазы и позволяет определить МИК. При этом

возможна оценка эффективности комбинации антибиотиков и их различных дозировок.

Определить антибактериальное действие препарата можно по изменению вязкости бактериальной суспензии. Эффект можно уловить, например, при помощи теста на асинхронное вращение метки в магнитном поле (AMBR): обнаружить рост культуры E. coli в концентрации 50 клеток на каплю возможно в течение 20 мин, а определить МИК – в течение 100 мин. Другими методами измерения вязкости для исследования антибиотикочувствительности являются использование чувствительных к вязкости красителей, микроакустических сенсоров, кантилеверов и т. д. [28].

Для увеличения скорости и надежности определения антибиотикочувствительности в последнее время все чаще используют генотические методы, позволяющие определить специфические гены бактерий, отвечающие за невосприимчивость к антибиотикам [30–33]. Для этого возможно использование ставших традиционными – метод гибридизации ДНК, полимеразная цепная реакция (ПЦР) и др. [34]. Предложенная Кэри Мюллисом в 1983 г. ПЦР позволяет оперативно решать поставленную задачу. Например, выделение, идентификация и определение лекарственной устойчивости у штаммов метициллинорезистентного золотистого стафилококка (MRSA) с помощью традиционных микробиологических методов требуют не менее 3–5 дней, в то время как ПЦР позволяет выявить этот микроб менее чем за сутки.

Между тем, несмотря на все достоинства, использование ПЦР для определения чувствительности микроорганизмов является целесообразным лишь в тех случаях, когда традиционные фенотипические методы неприменимы или недостаточно эффективны. Применение метода может быть оправдано в отношении микроорганизмов, чрезвычайно чувствительных к условиям забора клинического материала, транспортировки и культивирования (пневмококки, гемофильные палочки, нейссерии, микоплазмы, облигатные анаэробы и др.), медленно растущих (возбудители туберкулеза, грибы), строгих внутриклеточных паразитов (хламидии, риккетсии) [34].

Существуют определенные ограничения для использования генетических методов оценки лекарственной устойчивости микроорганизмов. Например, могут отсутствовать данные о конкретных генетических механизмах резистентности того или иного возбудителя. Нельзя также исключить, что резистентность к определенным препаратам часто бывает связана с различными механизмами и мутациями в различных генах, которые независимо влияют на фенотип. Так, резистентность грамотрицательных бактерий к аминогликозидным антибиотикам может быть вызвана продукцией различных типов модифицирующих ферментов или изменением проницаемости клеточной стенки. В этом случае результаты ПЦР, которые всегда характеризует строго определенный специфический участок ДНК, не могут служить основанием для оценки чувствительности микроорганизма в целом [34]. В плане трактовки результатов ПЦР Bergeron и Ouellette также отметили, что наличие резистентного гена не всегда может означать резистентность бактерии и, наоборот, отсутствие гена резистентности не всегда свидетельствует о чувствительности бактерии [30].

Еще на ранних этапах развития методов исследования антибиотикочувствительности, исследователям стало очевидно, что получаемые данные отличаются высоким разбросом ввиду множества трудно учитываемых факторов, влияющих на получаемые результаты [35–39]. К концу 1950-х гг. стало очевидно, что единственным способом получения сопоставимых результатов является стандартизация. В 1954 г. Ericsson [40] опубликовал статью, в которой он описал первую стандартизированную технику, названную им методом бумажных дисков. Промышленное производство компонентов, необходимых для этого метода, наладила компания AB BIODISK, расположенная в городе Сольна в Швеции. Тщательный контроль всех партий реагентов для этого метода и применение выверенной до деталей процедуры тестирования открыли возможность для стандартизации. В 1961 г. Ericsson и Sherris в сотрудничестве с ВОЗ предприняли попытку стандартизировать методы тестирования антибиотикочувствительности на глобальном уровне. Было организовано международное исследование (International Collaborative Study), в котором принимали участие ученые из 16 стран от США до Японии. Его результаты были опубликованы в Acta Pathologica Scandinavica. Этот обширное руководство получило более 5 000 цитирований в рецензируемой литературе и заложило основы для последующего создания стандартов [41]. В 1966 г. был достигнут значительный прогресс в этом направлении: Bauer и Kirby с сотрудниками опубликовали статью, в которой предприняли попытку преобразовать диско-диффузионную технику в метод, пригодный для практического использования в клинических лабораториях [42]. В 1975 г. этот метод стал основой для разработанных National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS) стандартов диско-диффузионного метода [43]. В 2005 г. NCCLS был переименован в Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). В настоящее время стандарты CLSI используются в большинстве стран мира. В странах Европейского Союза для стандартизации методов тестирования антибиотикочувствительности в 1997 г. был сформирован Европейский комитет по определению чувствительности к антибиотикам (EUCAST).

В нашей стране также были разработаны нормативные документы, регламентирующие процедуру определения чувствительности микроорганизмов к

антибиотикам: приказ № 250 Министерства здравоохранения СССР от 13 марта 1975 г. «Об унификации методов определения чувствительности микроорганизмов к химиотерапевтическим препаратам» и «Методические указания по определению чувствительности микроорганизмов к антибиотикам методом диффузии в агар с использованием дисков» от 10 марта 1983 г. № 2675-83. В 2004 г. Главным государственным санитарным врачом Российской Федерации утверждены и введены в действие «Методические указания по определению чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препаратам» (МУК 4.12.1890-04), в основе которых лежат стандарты CLSI [44].

Отсутствие в настоящий момент международных стандартов и рекомендаций по использованию ПЦР для определения чувствительности к антимикробным препаратам является существенным фактором, ограничивающим возможность широкого применения этого подхода в практической работе.

Таким образом, клиническая медицина сегодня обеспечена широким набором подходов к определению чувствительности микробов к антибиотикам. Историко-технологическая оценка развития этого направления микробиологической диагностики высветила ряд периодов, четко ассоциирующихся с внедрением определенных технологий. В итоге, всю совокупность разработанных методов можно подразделить, с одной стороны, на ручные и автоматизированные, а с другой – на «классические», основанные на культивировании микроба, и, соответственно, не требующие данной процедуры.

Так сложилось, что в настоящее время культуральные методы уверенно занимают передовые позиции в микробиологической диагностике, вообще, и подборе адекватной антибиотикотерапии, в частности. Сказывается богатый практический и теоретический опыт микробиологов, детальная технологическая проработанность микробиологической диагностики и устоявшаяся организационная структура. Немаловажное значение также имеет стандартизация и международное признание диско-диффузионного метода.

Между тем, несмотря на техническую простоту и доступность, определение антибиотикочувствительности культуральным методом требует для получения результата минимум двое суток при неукоснительном соблюдении технологии. Нельзя также сбрасывать со счетов экономическую сторону вопроса: потребность в специализированном оснащении и расходных материалах, наличие высококвалифицированных кадров. Отдельную проблему представляет соблюдение мер биологической безопасности при размещении лаборатории микробиологической диагностики в «нережимной» медицинской организации.

Отчасти обозначенные проблемы решаются внедрением автоматизированных технологий. Однако в этом случае возникает вопрос о рентабельности использования автоматизированных анализаторов.

Учитывая сказанное, широкомасштабное внедрение в практику «некультуральных» технологий представляется перспективным. Между тем, развитие этого направления диагностики требует серьезной проработки ряда технологических и организационных вопросов, одним из которых является стандартизация, а также доказательство специфичности.

Список литературы

1. Philip F. Wheat. History and development of antimicrobial susceptibility testing methodology // J. Antimicrob. Chemother. 2001; 48 (suppl 1): 1-4.
2. Roberts W. Studies on biogenesis // Philosophical Transactions of the Royal Society of London. 1874; 164: 466.
3. Fleming A. A comparison of the activities of antiseptics on bacteria and on leucocytes // Proceedings of the Royal Society of London. 1924; Series B 96: 171-180.
4. Fleming A. On the antibacterial action of cultures of a penicillium, with special reference to their use in the isolation of B. influenza // British Journal of Experimental Pathology. 1929; 10: 226-236.
5. Ермольева З.В. Пенициллин. М. Медгиз. 1946. 158 с. [Ermoleva Z.V. Penicillin. M. Medgiz. 1946. 158 p.]
6. Reddish G.F. Methods of testing antiseptics // Journal of Laboratory and Clinical Medicine. 1929; 14: 649-658.
7. Abraham E.P., Chain E., Fletcher C.M. et al. Further observations on penicillin // Lancet ii. 1941; 177-188.
8. Heatley N.G. Method for the assay of penicillin // Biochemical Journal. 1944; 38: 61-65.
9. Vincent J.G., Vincent H.W. Filter paper disc modification of the Oxford cup penicillin determination // Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine. 1944; 55: 162-164.
10. Bondi A., Spaulding E.H., Smith D.E., Dietz C.C. Routine method for rapid July 2001 4 determination of susceptibility to penicillin and other antibiotics // American Journal of the Medical Sciences. 1947; 213: 221-225.
11. Hoyt R.E., Levine M.G. Method for determining sensitivity to penicillin and streptomycin // Science. 1947; 106: 171.
12. Mohs F.E. A simple quantitative test for the penicillin sensitivity of bacteria: the «radial streak» method // Journal of Laboratory and Clinical Medicine. 1945; 30: 800-802.
13. Working Party of the British Society for Antimicrobial Chemotherapy. A guide to sensitivity testing // Journal of Antimicrobial Chemotherapy. 1991; 27 Suppl. D: 1-50.
14. Fleming A. In-vitro tests of penicillin potency // Lancet i. 1942; 732-733.
15. Гаузе Г.Ф. Грамицидин С и его применение. М. Медгиз. 1952. 153 с.
    [Gause, F. G. Gramicidin s and its use. M. Medgiz. 1952. 153 c.]
16. Schmith K., Reymann F.E. Expeimentelle og kliniske undersogelser over gonococcers folsomhed overfor sulfapyridin // Nordisk Medicin. 1940; 8: 2493-2499.

17. Frisk A.R. Bestamning av penicillin koncentration och penicillinkaslighet // Nordisk Medicin. 1945; 28: 2249-2252.
18. Jackson G.G., Finland M. Comparison of methods for determining sensitivity of bacteria to antibiotics in vitro // Archives of Internal Medicine. 1951; 88: 446-460.
19. Garrett S.D. A multiple – point inoculating needle for agar plates // Transactions of the British Mycological Society. 1946; 29: 171-172.
20. Steers E., Foltz E.L., Graves B.S. An inocula replicating apparatus for routine testing of bacterial susceptibility to antibiotics // Antibiotics and Chemotherapy. 1959; 9: 307-311.
21. Hutchison J.G.P. Antibiotic sensitivity tests: a rapid method suitable for multiple cultures // Journal of Clinical Pathology. 1954; 7: 350-351.
22. Tolhurst J.C., Buckle G., Williams S.W. Agar dilution tests. In Chemotherapy with Antibiotics and Allied Drugs. National Health and Medical Research Council of Australia, Canberra. 1963; 2nd edn.: pp. 153-154.
23. Spencer R.C., Wheat P.F. Novel mechanisms for determining antibiotic susceptibilities // Journal of Antimicrobial Chemotherapy. 1986; 17: 404-407.
24. Mckie J., Borovoy R., Dooley J., Enavega G. et al. Autobac I – A three hour automated antimicrobial susceptibility system. In Automation in Microbiology and Immunology, (Heden C., Illeni T., Eds). NY. John Wiley. 1974. 187-189.
25. Spencer H.J., Stockert J., Welaj P. et al. Automated antimicrobial susceptibility testing with the MS-2 system. In Rapid Methods and Automation in Microbiology. (Johnston, H.H., Newsom S.W.B.). NY. John Wiley. 1977. 262-263.
26. Aldridge C., Jones P.W., Gibbson S. et al. Automated microbiological detection/identification system // Journal of Clinical Microbiology. 1977; 6: 406-413.
27. Медицинская технология «Применение экспресс-метода лазерной флуоресценции для определения чувствительности микроорганизмов к антимикробным препаратам» от 07.08.2007 г. (№ ФС-2007/158).
[Medical technology "The Use of the rapid method of laser fluorescence to determine the sensitivity of microorganisms to antimicrobial agents" dated 07.08.2007 (№ FS-2007/158)]
28. A. van Belkum, W.M. Dunne Jr. Next-Generation Antimicrobial Susceptibility Testing. // J. Clin. Microbiol. 2013; 51(7): 2018.
29. Gfeller K.Y., Nugaeva N., Hegner M. Rapid biosensor for detection of antibiotic-selective growth of Escherichia coli. // Appl. Environ. Microbiol. 2005; 71: 2626-2631.
30. Bergeron M.G., Ouellette M. Preventing antibiotic resistance through rapid genotypic identification of bacteria and of their antibiotic resistance genes in the clinical microbiology laboratory. // Journal of Clinical Microbiology. 1998; 36: 2169-2172.
31. Courvalin P. Genotypic approach to the study of bacterial resistance to antibiotics. // Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 1991; 35: 1019-1023.
32. Tenover F.C. Bauer and Kirby meet Watson and Crick: antimicrobial susceptibility testing in the molecular era. // ASM News. 1992; 58: 669-672.
33. Arlet G., Philippon A. PCR-based approaches for the detection of bacterial resistance. In PCR-based Diagnostics in Infectious Diseases, (Ehrlich G.D., Greenberg S. J. Eds), Oxford. Blackwell Scientific Publications. 1994. 665-687.
34. Семенихина А.В., Рахманова Т.И., Нехаева Г.И., Попова Т.Н. Учебно-методическое пособие для вузов. Воронеж. Издательско-полиграфический центр Воронежского государственного университета. 2007. 69 с.
[Semenikhina A.V., Rakhmanova T.I., Nekhaeva I.G., Popova T.N. Textbook for high schools. Voronezh. Publishing-polygraphic centre of Voronezh state University. 2007. 69 p.]
35. Snell J.J.S., Danvers M.V.S., Gardner P.S. Comparison of antibiotic susceptibility results obtained with Adatab and disc methods. // Journal of Clinical Pathology. 1984; 37: 1059-1065.
36. Heatley N.G. Methods for measuring the sensitivity of micro-organisms to antibiotics. In Antibiotics, Volume 1. (Florey H.W., Chain E., Heatley N.G. et al., Eds). London. Oxford University Press. 1949. pp. 200-214.
37. Erlanson P. Determination of the sensitivity in vitro of bacteria to chemotherapeutic agents with special reference to routine tests. // Acta Pathologica et Microbiologica Scandinavica Suppl. 1951; 85: 1-162.
38. Waterworth P.M. A comparative study of methods of testing sensitivity to antibiotics and of the factors influencing the results. // Journal of Medical Laboratory Technology. 1951; 9: 65-85.
39. Gould J.C., Bowie J.H. The determination of bacterial sensitivity to antibiotics. // Edinburgh Medical Journal. 1952; 59: 178-199.
40. Ericsson H., Sherris J.C. Antibiotic sensitivity testing. Report of an international collaborative study. // Acta Pathologica et Microbiologica Scandinavica. Section B, Suppl. 1971; 217: 1-90.
41. World Health Organisation. Standardization of Methods for Conducting Microbic Sensitivity Tests. Second report of the Expert Committee on Antibiotics. WHO Technical Report Series. Geneva. WHO. 1961. № 210.
42. Bauer A.W., Kirby W.M.M., Sherris J.C., Turck M. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. // American Journal of Clinical Pathology. 1966. 45: 493-496.
43. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests; Approved Standard M2-A7 ASM-2. Villanova. PA. NCCLS. 1975.
44. Алексеев В.В. и др. Медицинские лабораторные технологии. Руководство по клинической лабораторной диагностике. В 2 томах. Том 1 / под ред. А.И. Карпищенко. 3-е изд., перераб. и доп. Москва. ГЭОТАР-Медиа. 2012. 472 с.
[Medical laboratory technology. Guide to clinical laboratory diagnosis. In 2 volumes. Volume 1. Alexeev V.V., etc. / Under the editorship of A.I. Karpishchenko. 3-e Izd., Rev. and supplementary. Moscow. GEOTAR-Media. 2012. 472 p.]