

ГЛАВА 2 | **КЛИНИЧЕСКАЯ ЗНАЧИМОСТЬ И ОПРЕДЕЛЕНИЕ МИНИМАЛЬНОЙ БАКТЕРИЦИДНОЙ КОНЦЕНТРАЦИИ (ЛЕТАЛЬНОГО ДЕЙСТВИЯ) АНТИБИОТИКОВ**

Минимальной бактерицидной концентрацией (МБК) или минимальной летальной концентрацией (как принято за рубежом) называют то наименьшее количество антибиотика, которое подавляет жизнеспособность 99,9% клеток инокулюма в витральных исследованиях. Обратим внимание на несколько принципиальных моментов. Во-первых, как очевидно, речь идет о способности антимикробного вещества убивать микроб. Не подавлять его репродукцию, а именно лишать микроб возможности пережить антибиотическую атаку с последующим восстановлением его физиологической активности, в частности, патогенности. Почему это важно, чуть ниже. Во-вторых, что имеет большое значение для понимания сути методики, речь идет о бактерицидном действии на инокулюм. Это существенная оговорка, коль скоро она определяет детали тестирования, несколько осложняющие процедуру определения МБК (о чем тоже далее). Наконец, обсуждается именно лабораторное «пробирочное», исследование, т.е. такой анализ, который может и должен осуществляться в любой микробиологической лаборатории клинического учреждения, если только последнее (клиника) оказывает помощь тяжелым больным с инфекционной патологией.

Определение бактерицидного действия антибиотиков (и их сочетаний) в обыденной жизни микробиологических лабораторий не является частым исследованием (если говорить о мировой практике в целом). Но, тем не менее, при наличии показаний оно осуществляется. Без особого преувеличения можно сказать, что отечественная микробиологическая служба это исследование, как правило, игнорирует. А вот с этим согласиться трудно, потому что есть такие клинические ситуации, такие патологические состояния, когда лечить больного с учетом бактерицидного потенциала антимикробного препарата является полезным (по меньшей мере).

И лечащие врачи, и клинические микробиологи не так редко, как хотелось бы, сталкиваются с тем, что антибиотик, выбранный для терапии с учетом чувствительности к нему микроба-возбуди-

теля, тем не менее оказывается недостаточно эффективным или полностью неэффективным с вытекающими отсюда драматическими последствиями для больного. Среди ряда причин (а их, к сожалению, достаточно) [12, 171, 184] важное место занимает отсутствие бактерицидного действия. Оно традиционным определением чувствительности микроба к антибиотикам не улавливается. В то же время при ряде заболеваний бактерицидное действие является очень и очень нужным, а может быть даже решающим фактором для достижения лечебного эффекта.

Современная антибиотикотерапия в большинстве случаев осуществляется таким образом, что ее действие реализуется преимущественно за счет бактериостатического эффекта. Антимикробный препарат подавляет рост микробной популяции, не дает ей увеличиваться. Значительная часть клеток возбудителя при этом гибнет, а остальных «добивают» собственные факторы защиты больного, то, что принято называть факторами иммунитета. В значительной части случаев этого вполне достаточно и больной благополучно преодолевает болезнь. Но это, как известно, бывает не всегда. По сути, синергидное действие антимикробного соединения и защитных сил макроорганизма достижимо только тогда, когда оба механизма полноценны. Выверенное дозирование, грамотный учет чувствительности возбудителя к назначаемому препарату позволяют обеспечить эффективность первой половины тандема. У врача есть объективная возможность быть в той или иной степени точным. А вот как быть с факторами иммунитета? Как, каким образом грамотно оценить их потенциал? Вот тут вопросов больше, чем ответов. Особенно, когда речь идет о рядовом лечебном учреждении. Справедливо обращают внимание на нейтропению — этот показатель, безусловно, дает основание говорить о неблагоприятии с иммунными механизмами защиты больного. А вот иных, доступных, методически простых в получении критериев, таких, которые можно использовать в любой больнице и обеспечивать при этом надежную информацию, фактически нет. Могут (и вполне справедливо) указать на роль анамнестических данных. Больные, которые ранее получали цитотоксичные препараты, подвергались по любой причине лучевой терапии или оказались в зоне повышенной радиации, перенесли тяжелое длительно текущее заболевание, длительно находились в тяжелых условиях существования и т. д. всегда или почти всегда в той или иной мере имеют функционально неполноценный иммунитет. Но достаточ-

но часто любой врач сталкивается с таким течением заболевания, с такой патологией, когда есть все основания полагать сниженную сопротивляемость макроорганизма, но, какова ее степень, какова причина, как этот фактор влияет на прогноз течения инфекционной патологии, остается судить только очень и очень приблизительно. Что греха таить. Сплошь и рядом врач об этом не думает или, лучше сказать, лишен возможности думать, потому что объективных данных о состоянии иммунитета у него нет, а получить их или невозможно, или для этого требуется слишком много времени. А если, даже, и получит, то, как ими распорядиться, что использовать для коррекции иммунитета? И вот в этой ситуации, и быстрее, и надежнее использовать не просто терапевтический потенциал антибиотиков, а возможность достижения с помощью противомикробных препаратов гибели патогена, т. е. бактерицидного действия. Это далеко не простая задача, но ее решение реально, в том числе с помощью лабораторной службы.

Так как же можно обеспечить бактерицидное действие антибиотиков (или их сочетаний)? Есть две возможности, традиционные для противомикробной терапии: эмпирическая терапия с применением т. н. бактерицидных антибиотиков и лабораторно обоснованное лечение препаратом (препаратами), к бактерицидному действию которого (которых) возбудитель чувствителен.

Разделение антибиотиков на бактерицидные и бактериостатические получило широкое распространение. К первым относят пенициллины, цефалоспорины, карбапенемы (т. е. все бета-лактамы), аминогликозиды, фторхинолоны, гликопептиды. Ко вторым — макролиды, тетрациклины, фосфомицин и нек. др. [16, 17, 22, 63]. Полагают, что к бактерицидным препаратам относятся те, у которых различие между минимальной подавляющей концентрацией (МПК) и минимальной бактерицидной (летальной) концентрацией (МБК) не более 2–4-х кратное. Зачастую существующими методами их определения различия просто не улавливаются, МПК и МБК совпадают. Иное дело бактериостатические антибиотики; при соответствующем тестировании различие между МПК и МБК может быть и 8-и кратным, и 16ти кратным, и, даже большим. Считают, что если возбудитель чувствителен к бактерицидному антибиотику, то в организме человека достигнуть летальной концентрации проще — ведь разница между МПК и МБК не велика. Микроб, в частности, потому и называют чувствительным, что фармакокинетика антибиотика обеспечивает концентрации в крови больного

близкие к МПК или превышающие МПК. Иное дело, когда речь идет о бактериостатическом препарате: различие между МПК и МКБ может быть столь велико, что достичь в организме человека летальных концентраций окажется невозможным. В такой градации, безусловно, есть своя логика. Да и жизнь это подтверждает. Предпочтительный лечебный потенциал пенициллинов у больных с тяжелой инфекцией (при условии, что возбудитель к ним чувствителен), в частности, при сепсисе или эндокардите, сомнений не вызывает. Это тем более так, если учесть возможность широкого дозирования этих антибиотиков в силу их относительно низкого прямого токсического действия, т.е. увеличением дозы создание больших (читай, бактерицидных) концентраций в организме больного реально. Тем не менее, в разделении антибиотиков на бактериостатические и бактерицидные есть немало условного. И тот, и другой эффект (подавляющий и летальный) это функция концентрации действующего начала и экспозиции, а это такие характеристики, которые в организме человека динамичны, переменны. И т.н. бактерицидные антибиотики могут действовать бактериостатически, и т.н. бактериостатические препараты способны подавлять жизнеспособность микробной популяции. Предсказать все это в каждом частном случае трудно, порой невозможно. Поэтому необходимо иметь какую-то объективную информацию. Это и результаты исследования фармакокинетики используемого антибиотика у данного конкретного больного, это и оценка чувствительности возбудителя заболевания к бактерицидному действию применяемого препарата. О последнем и идет речь в данном разделе.

Прежде всего, необходимо сразу же подчеркнуть одно важное обстоятельство, на которое часто в негативном плане ссылаются некоторые микробиологи. Речь идет о, якобы, чрезмерной трудоемкости, сложности исследования. Это не так. Методически определение бактерицидного действия антибиотика на микроб несложно и доступно любой микробиологической лаборатории. Оно не требует ни специального оборудования, ни особых питательных сред или реактивов. Определение чувствительности микроба к бактерицидному действию антибиотика, выполненное в разных лабораториях и с разной целью, показало — это доступное микробиологическое исследование, для которого требуются традиционные навыки и обычные материалы, принятые в повседневной микробиологической практике [61, 136, 169, 190]. Что верно, — оно на один шаг более трудоемко, чем определение чувствитель-

ности «методом дисков». Но и определять этот показатель следует только тогда, когда речь идет о терапии тяжелого инфекционного процесса, причем не просто тяжелого, но и с плохой динамикой. Информация о бактерицидном потенциале антибиотика, кроме того, важна при лечении больных с выраженным подавлением белой крови или иными очевидными и существенными признаками иммунной недостаточности. Это узкий круг больных, для которых выверенная антибиотикотерапия может оказаться единственным шансом на спасение. Имеет ли право микробиолог отказывать в этом шансе больному? Вопрос скорее риторический. Но ведь на практике это так и есть. Подчеркнем еще раз. Определение чувствительности микроба-возбудителя к бактерицидному действию антибиотика — это не рядовой анализ, а элемент тех мероприятий, которые необходимы для лечения больных с тяжелой инфекцией при ее неблагоприятном течении. Вопрос о необходимости такого анализа решают совместно лечащий врач и микробиолог.

Можно выделить два основных метода определения бактерицидной активности: это метод серийных разведений с последующим высевом (метод определения МБК) и определение динамики гибели микроба в среде с антибиотиком (определение кривой гибели микроба) [86, 138, 153, 173]. Есть несколько вариантов этих методологий, которые целесообразно рассмотреть в рамках основного метода. Поскольку речь идет о практическом аспекте проблемы выявления бактерицидности, далее акцент будет сделан на определении МБК, как наиболее доступном для любой микробиологической лаборатории методе.

Поскольку в отечественных методических указаниях по определению чувствительности микроорганизмов к антибиотикам о бактерицидной активности не упоминается, остановимся на методической стороне вопроса подробно, базируясь на международном опыте и практике исследовательской микробиологической службы Санкт-Петербургского (Ленинградского) института антибиотиков.

Определение МБК можно условно разделить на два этапа. Первый — определение МПК в классическом варианте, но с некоторыми отличиями от существующих МУК. Второй этап — использование результатов первого этапа исследования для постановки теста на выявление уже самого МБК (см. схему 2.1). Можно сказать иначе: первый этап, это применение метода серийных разведений в жидкой питательной среде, позволяющий определить МПК, а второй этап — это мерный высеv из пробирок, в которых рост отсутст-

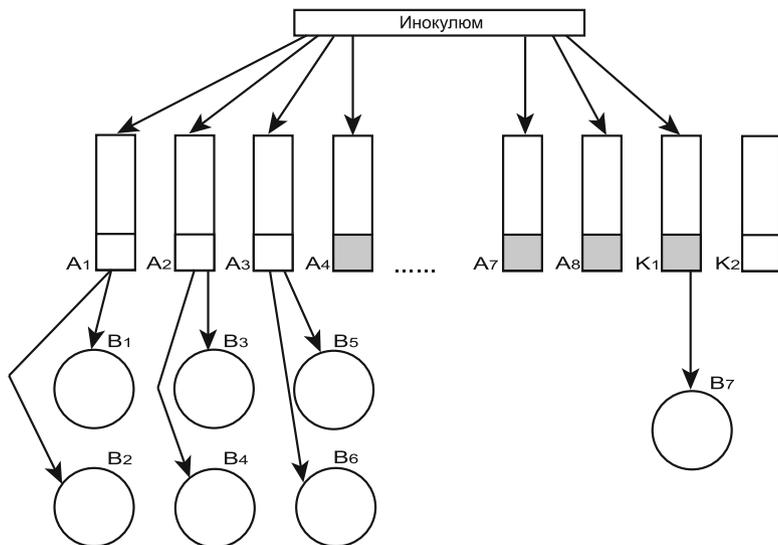


Рис. 2.1. Схема определения минимальной бактерицидной концентрации

Комментарии к рисунку:

A₁; A₂; A₃; A₄;... A₇; A₈ — Пробирки с двукратно убывающими концентрациями антибиотиков.

K₁ — Контроль роста культуры.

K₂ — Контроль стерильности питательной среды.

B₁; B₂; B₃; B₄; B₅; B₆ — Чашки Петри с плотной питательной средой, на которые делают высев из пробирок без видимого роста культуры (A₁; A₂; A₃).

B₇ — Чашка Петри с плотной питательной средой, на которую делают высев из пробирки K₁ для проверки чистоты культуры.

среда Мюллера-Хинтон, остановимся на ней, тем более, что собственных критериев чувствительности (МПК) у нас просто нет, они взяты из зарубежных стандартов, полученных в исследованиях с использованием этой среды.

Теперь к вопросу о том, сколько питательной среды внести в каждую пробирку. Напомним, что для определения МПК (не МБК) отечественные методические указания предлагают следующую схему: в каждой пробирке 0,5 мл бульона, содержащего определенную концентрацию антибиотика, и 0,5 мл взвеси микроба в той же питательной среде. Итого — 1 мл среды на пробирку. Не будем повторять те манипуляции, которые даны в МУК. Остановимся в деталях на рекомендациях, которые предложены в ряде других ме-

тодических документах и которые, по опыту и убеждению автора, приемлемы и удобны в работе (при определении МБК). Итак, в штативе 14 пробирок. Стерильной пипеткой вносим в первую пробирку 1,8 мл жидкой среды Мюллера-Хинтон, а в остальные пробирки со 2-й по 14-ю — по 1 мл среды. В первую пробирку стерильной пипеткой добавляем 0,2 мл раствора антибиотика, содержащего 1280 мкг/мл. Нетрудно обчислить ту концентрацию, которая при этом будет в первой пробирке. Если в 1 мл 1280 мкг антимикробного препарата, то в 0,1 мл будет в десять раз меньше — 128 мкг, а в 0,2 мл — 256 мкг. Но это количество антибиотика добавлено в 1,8 мл среды в первой пробирке. $1,8 + 0,2$ мл — 2 мл. На 2 мл внесено 256 мкг, значит, в 1 мл — 128 мкг. То, что необходимо для первой пробирки — 128 мкг/мл. Перемешали — покрутили пробирку в ладонях. Это же можно сделать пипеткой, набирая и выливая жидкую среду (всего 3–4 раза). Однако, одно условие — без пузырей, не забирать весь объем, только аккуратное перемешивание. Берем новую стерильную пипетку. Переносим 1 мл среды из первой во вторую пробирку. Перемешиваем. Во второй пробирке уже есть один мл среды. Теперь там 2 мл питательной среды, но из первой пробирки перенесено 128 мкг. Получается на 2 мл 128 мкг, т. е. 64 мкг/мл. Меняем пипетку и переносим из второй пробирки в третью 1 мл среды. Теперь уже в третьей пробирке на 2 мл будет 64 мкг, т. е. 32 мкг/мл. И так до 12-й пробирки включительно: меняем пипетку, переносим 1 мл, аккуратно встряхиваем (перемешиваем). Нетрудно подсчитать, что в 12-й пробирке будет 0,06 мкг/мл антибиотика. Из 12-й пробирки забираем 1 мл среды и выливаем ее — не переносим в следующую, а именно выливаем. В 12-й пробирке, как и во всех предыдущих должен быть 1 мл питательной среды с антибиотиком. Выполнен первый этап — приготовлен ряд серийных разведений антибиотика. Пришел черед инокуляции. Надо приготовить взвесь микробных клеток необходимой плотности. Для этого есть несколько приемов. Самый распространенный вариант тот, который, в частности, предусмотрен отечественными МУК при определении МПК. Берется суточная культура микроорганизма на скошенном агаре или на поверхности агара в чашке (в том числе в виде изолированных колоний) и приготавливается взвесь в изотоническом растворе хлорида натрия по стандарту мутности 0,5 McFarland. Одно маленькое, но важное замечание — не следует использовать культуры, давшие рост на селективной или дифференциально-диагностической средах. Это должен быть обычный питательный агар, который в обы-