

ГЛАВА 6 | **ОПРЕДЕЛЕНИЕ АНТИМИКРОБНЫХ ПРЕПАРАТОВ В БИОСУБСТРАТАХ**

В данной главе речь пойдет о методах, часто используемых в научных исследованиях и, особенно, при изучении новых антибиотиков. К сожалению, очень редко к ним прибегают в обычной клинико-лабораторной практике лечебных учреждений. На самом деле, определение содержания антимикробных соединений в крови больного, их проникновения в ткани и выведения из организма человека может принести очень существенную пользу в организации лечебного процесса, в правильном выборе дозы и пути введения препарата, в предупреждении осложнений фармакотерапии [8, 12, 20, 118, 203]. В свое время автор позволил себе следующим образом сформулировать показания к проведению подобных аналитических исследований, имея в виду практику клинико-диагностических лабораторий [10]. Приведем их с некоторыми уточнениями, адекватными задачам сегодняшнего дня.

1. Применение антибиотических препаратов, имеющих «узкий» терапевтический коридор (ограниченный диапазон между терапевтической и повреждающей концентрациями). Это актуально в первую очередь при применении антибиотиков аминогликозидной группы. Возрождающийся интерес к лечебному потенциалу полимиксинов (а их повреждающее действие при парентеральном введении достаточно известно) делает актуальным отслеживание фармакокинетики этой группы препаратов при лечении больных. То же можно сказать о ряде новых антибактериальных и противогрибных препаратов, у которых соотношение между лечебной и повреждающей концентрациями далеко не установлены.
2. Патология экскреторных органов, прежде всего, почек, которая ведет к ограниченной элиминации препаратов и, как следствие, к увеличению их концентрации в крови и тканях; такая ситуация чревата проявлением повреждающего

действия антибиотиков, в том числе и при применении как обычных, так и лимитированных доз. Только определение концентраций антибиотиков в крови может дать реальное представление об адекватности выбранной дозы степени недостаточности выведения экскреторными органами антимикробных препаратов.

3. Использование лечебных пособий или манипуляций, способствующих существенному изменению фармакокинетики антибиотиков (гемодиализ, перитонеальный диализ, трансплантация органов).
4. Интерференция лекарственных средств, применение лекарств, влияющих на функцию экскреторных органов и, следовательно, на фармакокинетику препаратов.
5. Иная клиническая ситуация, способная существенно повлиять на всасывание, распределение и выведение лекарственных средств. К ним можно отнести возрастные особенности фармакокинетики, применение антибиотиков в предельно допустимых дозах, их назначение при особо тяжелой травме и др.

В этих, сформулированных полтора десятка лет тому назад положениях, отсутствует, хотя и подразумевается, еще одна рекомендация. Она основана на том обстоятельстве, что существующие критерии чувствительности микроорганизмов к антибиотикам, те «табличные данные», в которые заглядывает микробиолог после того, как замеряет диаметр зоны подавления роста микроба или определяет МПК, основаны (в частности) на неких усредненных показателях фармакокинетики конкретного антибиотика у некоего «усредненного» больного. Содержание антибиотика в крови такого виртуального больного при введении ему относительно безопасной дозы — это один из трех «слонов», на которых держатся критерии чувствительности. Но концентрации антибиотика в крови у одного человека (например, молодого, крепкого, не страдающего патологией экскреторных органов), и у другого (пожилого, тучного, с полиорганный патологией) это весьма разные величины. Отсюда условность существующих показателей чувствительности (устойчивости) возбудителя. Клинически это несовершенство уловить при ныне существующей практике лечения антимикробными соединениями невозможно, и она автоматически реализуется без осмысления ее возможных пос-

ледствий. Куда надежнее было бы сопоставление МПК с реально существующими хотя бы в крови больного количествами антибиотика. При всей условности и такого подхода, у врача были бы конкретные в цифрах показатели того, сколько нужно и сколько есть антибиотика. В этом случае выбор дозы препарата, пути и режима его введения больному приобрели бы обоснованную конкретность, сделали бы лечение антибиотиками таким, какое оно должно быть — индивидуальным (а не «усредненным»). Впрочем, до такой практики пока, видимо, далеко.

Каковы бы ни были показания, каким бы ни было отношение лечащего врача к фармакокинетическим данным, реализация исследования возможна только при участии лабораторной службы. Перечень методик, которые в этом случае могут быть использованы, достаточно велик [118]. Он включает иммуноферментный анализ, спектрофотометрические и радиоиммунные исследования, радиоизотопный и др. методы. Однако наиболее широко и не только в научных, но и в практических целях применяют два метода — микробиологический и высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ). Каждый из этих методов имеет свои преимущества и свои недостатки. Главное, что определяет ценность ВЭЖХ, — это возможность получить заключение уже через час после забора образца. И, хотя метод не прямой, он дает достаточно объективную информацию, что подтверждено многочисленными, в т. ч. сравнительными исследованиями. Однако, ВЭЖХ требует специального, достаточно дорогого оборудования. Не всегда доступны и не дешевы расходные материалы. Для обслуживания прибора и проведения анализов необходимы подготовленные специалисты. Основной недостаток микробиологического метода — это время. Ответ может быть получен не раньше, чем сформируется зона подавления роста тест-микроба, а это чаще всего 18–20 ч, но не менее 12–16 ч. К достоинствам метода, несомненно, можно отнести его простоту. Овладеть им может любой микробиолог. Метод не требует специального оборудования. Расходные материалы стандартны, доступны, не дороги. При определенном навыке у исследователя метод не требует больших трудозатрат (порой их существенно меньше, чем в случае обычного микробиологического диагностического анализа). Наконец, это прямой метод. Он информативен тогда, когда в биосубстрате действительно есть цельные молекулы антибиотика, а не фрагменты этого препарата или его комплекс с белком, меняющим,

порой, активность антибиотика до нулевой. Непрямые методы в этом отношении значительно менее надежны. Все сказанное делает микробиологический метод определения концентрации антибиотиков в биологических жидкостях и тканях наиболее реальным, доступным для значительной части микробиологических лабораторий клинических учреждений.

Принцип метода достаточно прост, он имеет много общего с «методом дисков», с которым микробиологи сталкиваются ежедневно. Но есть и важные отличия. Метод основан на том, что параллельно идет процесс диффузии антибиотика с известной концентрацией из резервуара в засеянный питательный агар (контроль) и диффузия антибиотика в ту же среду из аналогичного резервуара, но в концентрации, которую следует установить (опыт). В результате образуются зоны подавления роста, которые сравнивают (контроль — опыт) и в итоге устанавливают, сколько антибиотика имеется в опытном образце [8, 10, 118]. Таким исследуемым образцом могут быть самые разные объекты. В частности, этот метод используют для контроля противомикробных лекарств: устанавливают содержание антибиотиков в полупродуктах и в конечном продукте (лекарственной форме), что является важнейшим показателем качества лекарственного средства. Метод диффузии антибиотиков в гель является наиболее надежным при выявлении их в продуктах питания (мясе, молоке и т.д.). С этой же целью его используют в сельском хозяйстве, экологических исследованиях и др. В медицине он позволяет решать многие задачи. Это и уже упомянутые выше исследования качества лекарств. На основе изучения фармакокинетики новых препаратов у добровольцев и больных решается вопрос о способах их введения в организм человека. Такие исследования очень важны для решения вопроса о дозировании новых лекарственных средств. Они необходимы и для выяснения природы повреждающего действия лекарственных соединений. Этот перечень мог бы быть продлен.

Прежде чем перейти к деталям исследования следует подчеркнуть, что микробиологический метод определения содержания антимикробных препаратов требует несколько стандартных качественных компонентов, без которых реализация метода невозможна. Это:

- 1) питательная среда;
- 2) тест-микроб;
- 3) стандарт исследуемого антибиотика [1, 2, 10].

Качество исследования, воспроизводимость его результатов в значительной степени зависят от питательной среды. Она должна обеспечить стандартность, синхронность двух процессов — диффузии в гель антимиicrobialного соединения и роста культуры с образованием microbialного газона и, в результате, зоны подавления роста микроба.

Напомним известную формулу, предложенную еще в 50-х годах группой ученых в США (ее часто называют формулой Купера) (К. Cooper):

$$x^2 = 4D(2,3 \log \frac{m_0}{m_1}) \cdot (L + 3,32g \log \frac{N_1}{N_0})$$

которая описывает эти два процесса, протекающие в геле, где: x — протяженность диффузии антибиотика от резервуара, в который вносят антибиотик, до края зоны; D — коэффициент диффузии; m_0 — концентрация антибиотика в исследуемом растворе; m_1 — «критическая концентрация», т. е. та концентрация антибиотика, которая создается у края зоны подавления роста;

L — продолжительность лаг-фазы роста тест-культуры при данных условиях проведения анализа;

g — время генерации тест-культуры в этих же условиях;

N_0 — величина посевного материала (инокулюма), выраженная в количестве microbialных тел на мл питательной среды;

N_1 — «критическая популяция», т. е. количество microbialных тел в среде вне зоны подавления роста к моменту образования зоны.

Из формулы следует, что на величину (радиус, диаметр) зоны отсутствия роста тест-микроба (добавим, что и на четкость края зоны, и на разницу между величинами зон при диффузии в гель растворов антибиотиков, отличающихся по концентрации в 2 раза, а эти критерии также важны, что будет показано далее) существенно влияют диффузионные свойства антибиотика, величина инокулюма, концентрация препарата, культуральные особенности тест-микроба.

Работами отечественных специалистов было показано [5, 6], что концентрация антибиотика в геле величина, перманентно меняющаяся, и это связано не только с диффузионным процессом, но и инактивацией ряда антимиicrobialных препаратов в геле. Это явление может иметь, по меньшей мере, двойное происхождение. С одной стороны на активность препарата может влиять микроб,

анализа должны быть стандартны, воспроизводимы от исследования к исследованию. Такие «мелочи», как обработка используемой посуды, размеры и форма чашек Петри, частота пересева тест-культуры и условия ее хранения, качество «лункоделателя» и многое другое могут отразиться на результатах анализа, на их сравнимости. А это важно.

Оснащение, необходимое для изучения содержания антибиотиков в биологических жидкостях и тканях

Чашки Петри.

Очень важно для названных исследований отобрать определенное количество чашек Петри и не использовать их для других целей. Все чашки должны быть сходны по следующим характеристикам:

- диаметр около 10 см; высота около 2 см;
- дно горизонтальное, ровное;
- прямой угол между дном и стенкой (форма цилиндра);
- чашки должны быть тщательно отмыты от моющих средств.

Вполне пригодны чашки Петри одноразового применения, если их форма и размер отвечают перечисленным требованиям. Использование чашек большего диаметра возможно, однако это увеличивает расход питательной среды.

Мерная и другая посуда.

Градуированные пипетки (стеклянные или автоматические) емкостью 1 мл, 2 мл, 5 мл, 10 мл. Пробирки биологические высотой 150 мм, диаметром 16 мм. Колбы плоскодонные вместимостью от 100 до 500 мл. Цилиндры измерительные на 50—1000 мл. Бюксы (стаканы для взвешивания). Фарфоровые ступки (диаметром от 86 до 110 мм).

Горизонтальный столик для разлива среды. Наиболее удобен горизонтальный столик из зеркального стекла на винтах, позволяющих строго выверить уровень с помощью ватерпаса. На этот момент необходимо обратить особое внимание, поскольку питательная среда, разлитая в чашки Петри, должна иметь одинаковую толщину по всей чашке. Если толщина геля в чашке Петри различна, то среда не пригодна, поскольку зоны, образующиеся при

диффузии в среду раствора антибиотика в одной и той же концентрации, будут различны.

Лункоделатель (устройство для вырезания лунок в толще агарового слоя). С этой целью может быть использован любой стальной цилиндр с внешним диаметром около 6 мм (допустимы колебания ± 1 мм). Важное условие заключается в том, что в одной серии анализов необходимо использовать лунки сходного диаметра, то есть сделанные одним устройством. Рабочий конец лункоделателя должен быть заточен под углом около 60° . Агаровый столбик, образующийся в результате введения такого лункоделателя в слой геля, удаляют лопаткой или скальпелем. При систематическом проведении соответствующих исследований, особенно в больших объемах, целесообразно пользоваться лункоделателем, который сам извлекает столбик агара. Для этого предложено несколько моделей. Одна из них представляет собой стальной цилиндр, имеющий две части: рабочую и рукоятку. Поскольку рабочая часть является фактически двумя полуцилиндрами, укрепленными на рукоятке и отстоящими друг от друга на 1 мм, это позволяет после введения прибора в гель сжимать их. В результате столбик геля остается в рабочей части лункоделателя и по мере повторного использования поступает в полую часть рукоятки, которая служит приемником для среды. Без опорожнения прибора можно сделать до 18–24 лунок. Вместо лунок могут быть использованы металлические цилиндры высотой 10 мм с внутренним диаметром 5 мм. Нижний конец цилиндра скошен (заострен). Цилиндры ставятся на поверхность питательной среды. Они, как и лунки — резервуар для внесения растворов с антибиотиками.

Капельницы. Растворы антибиотика (стандарта, биосубстрата) вводят в лунки или цилиндры капельницей. Для этой цели можно использовать пастеровские пипетки, которые готовят из легкоплавких стеклянных трубочек диаметром 0,5 см и длиной 20–25 см с концом в виде капилляра. Более точное введение в резервуар одинакового объема растворов антибиотиков обеспечивают автоматические пипетки.

Графарет для размещения лунок или цилиндров на агаровой пластинке. Лунки (цилиндры) следует размещать таким образом, чтобы они отстояли на одинаковом расстоянии от края чашки Пет-

ри и друг от друга. С этой целью можно использовать трафарет, сделанный из картона или плотной бумаги, на котором по окружности диаметром 6 см и с интервалом в 60° сделаны отметки. Для удобства диаметр самого трафарета должен соответствовать диаметру дна чашки Петри.

Аналитические весы. Важнейший элемент анализа. Весы, прежде всего, необходимы для взвешивания стандарта антибиотика, навеска которого должна быть сделана на весах достаточной точности. Весы целесообразно использовать также и для взвешивания биообразцов (например, тканей), однако это можно делать и на технических весах. Аналитические весы должны систематически подвергаться контрольной проверке.

Термостат. Необходим для выращивания тест-культуры, а также для ее роста в процессе анализа на опытной среде. Для биоаналитических целей, как правило, необходима температура около 37°.

Приспособление для замера диаметра зон задержки роста тест-культуры. Для этой цели пригодны линейка с миллиметровыми делениями, имеющая скос на одной из рабочих поверхностей (то есть деления линейки при работе должны непосредственно примыкать ко дну чашки Петри). Удобно с этой же целью использовать увеличители, позволяющие делать более точные замеры. Для этого могут быть использованы (после небольших конструктивных изменений) фотоувеличители, проекторы и т. п. Существуют автоматические измерители диаметра зон подавления роста.

Стандарт мутности. Он необходим для приготовления взвеси тест-микроба, которую в дальнейшем используют для заражения питательной среды. Можно использовать как готовый образец, так и приготовленный в лаборатории в соответствии с описанием, данным в отдельной главе.

Основные этапы проведения анализа биосубстратов на содержание противомикробных препаратов

1. Забор биосубстрата: кровь, моча, мокрота, гной, биоптаты тканей. Поскольку антибиотик при длительном хранении