

## ГЛАВА

### 4

## ТЕСТИРОВАНИЕ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ МИКРООРГАНИЗМОВ К СОЧЕТАННОМУ ДЕЙСТВИЮ АНТИБИОТИКОВ И ЕГО ЗНАЧЕНИЕ ДЛЯ КЛИНИКИ

В данной главе речь пойдет об одном из наиболее противоречивых явлений в медицинской практике. С одной стороны сочетанное применение антимикробных препаратов, особенно при лечении тяжелых больных, это обычное явление. С другой стороны, целесообразность таких назначений оспаривается и, более того, когда речь идет о фиксированных сочетаниях антимикробных лекарственных средств, категорически отвергается. Врачи старшего поколения хорошо помнят, какое распространение имели многие комбинированные препараты (ампиокс — ампициллин и оксациллин, олететрин, олеморфоциклин — олеандомицин и тетрациклин или морфоциклин и др.). Эти сочетанные лекарственные формы были решительно исключены из номенклатуры, хотя имели много сторонников. Правда, есть исключения, которые лишь подтверждают правило. Сохранили свое значение сочетания бета-лактамов с ингибиторами бета-лактамаз, один из компонентов которых по своему механизму действия не является, строго говоря, истинным антибиотиком (клавулановая кислота, сульбактам, тазобактам). Длительно сохраняет свои позиции только сочетанный препарат, включающий триметоприм и сульфаниламид (обычно, сульфаметоксазол), более известный под патентованным названием ко-тримоксазол.

Какой бы горячей не была дискуссия о том, нужно или не нужно применять сочетания антибиотиков [45, 104, 124, 144], практика остается неизменной, их используют. А раз так, то, естественно, возникают закономерные вопросы — какие реальные показания есть для такой фармакотерапии, и какова роль лабораторной службы в грамотном, обоснованном использовании сочетаний препаратов. Ответы на эти вопросы имеют тесную связь, о чем не всегда помнят.

Наиболее простое обоснование для сочетанной антибиотикотерапии, это, как раз, отсутствие микробиологических данных: возбудитель неизвестен, антибиотиков, обладающих универсальным действием, нет (чему можно только радоваться, поскольку о «нормальной» флоре человека тоже нельзя забывать), поэтому

есть очевидный соблазн использовать два (или три) антибиотика, чтобы спектр их противомикробного действия включал все вероятные микроорганизмы, способные вызвать данную патологию. В этом случае микробиолог может помочь в выборе оптимального сочетания только на основе эпидемиологического анализа данных о чувствительности микроорганизмов в конкретном стационаре (регионе) к антибиотикам. На этом базируется т. н. эмпирическая антибиотикотерапия.

Второе основание для назначения сочетания антибиотиков — смешанная микрофлора, необходимость подавления микроорганизмов разной таксономической принадлежности с различной чувствительностью к антимикробным препаратам. Это достаточно частый вариант в хирургической клинике (острые заболевания органов живота, раны, ожоги и др.). Терапевт нередко сталкивается с подобной ситуацией при патологии органов дыхания, особенно при хронических заболеваниях легких и дыхательных путей. О смешанной микрофлоре, как этиологическом факторе, приходится помнить гинекологам, отиатрам, офтальмологам, стоматологам. Роль микробиологической службы в этом случае очень велика. Из комплекса разных и по этиологической роли, и по патогенности, и по конститутивной чувствительности к противомикробным препаратам микроорганизмов следует выделить главные, определить их чувствительность к антибиотикам и, если в этом есть необходимость (о чем далее), оценить лабораторным путем целесообразность тех или иных сочетаний антибиотиков.

Еще одно показание к сочетанному применению антимикробных препаратов (третье по счету) — предупреждение развития вторичной устойчивости бактерий. Существует убеждение, подтвержденное экспериментально и, в меньшей степени, даже клинически, что если использовать два антибиотика с различным механизмом действия, то индуцированная резистентность микроба возникает реже или вообще не проявляется. Все это достаточно логично, закономерно. Хотя есть и прямо противоположное мнение (не очень подтвержденное ни экспериментально, ни клинически) — применение двух антибиотиков одновременно чревато устойчивостью уже не к одному, а к двум препаратам. В плане обсуждаемой проблемы, роли микробиологической службы в обосновании сочетанного применения антибиотиков, важно, однако, другое: отсутствие надежной, очевидной методики оценки предупреждающего действия двух препаратов на развитие устойчивости. Априорно такое действие

можно считать вполне допустимым, экспериментально его можно установить, но обосновать подобный феномен в лаборатории, дать какие-либо критерии целесообразности той или иной комбинации на основе лабораторного анализа невозможно. Во всяком случае, на данном отрезке времени. Микробиологическая служба обязана отслеживать развитие резистентности микроорганизмов у больного в процессе антибиотикотерапии, должна держать под контролем появление устойчивости микробов к антибиотикам в стационаре, и в этом их важная роль, в том числе для выбора сочетаний противомикробных соединений в терапевтических целях.

Упомянем четвертое показание для сочетанной антибиотикотерапии — самое неубедительное и не имеющее прямого отношения к микробиологическому обеспечению. Речь идет о предположении, что взяв для лечения больного два антибиотика в половинной (или просто в уменьшенной) дозе можно предупредить проявление их повреждающего действия на больного, сохранив при этом лечебный потенциал: действие на макроорганизм снижается, действие на микроорганизм сохраняется. Это мнение родилось еще в 50-е годы прошлого столетия и не нашло ни экспериментального, ни клинического подтверждения. Более того, создание в организме низких концентраций лечебного препарата чревато и снижением эффективности терапии, и развитием устойчивости возбудителя. А для компенсации этой потенциальной опасности с помощью уменьшенных концентраций другого антибиотика нет ни критериев, ни убедительных методик лабораторных исследований, подтверждающих такую возможность. Об этом показании к сочетанной антибиотикотерапии можно было бы не упоминать, если бы оно не перекочевало в некоторые публикации уже нашего времени.

Наконец, последняя (пятая) и, наверное, самая обсуждаемая причина, по которой принято назначать несколько антибиотиков, это попытка обеспечить их потенцированное действие на микроб — возбудитель заболевания. Далее проблема variability эффекта, получаемого при воздействии на микробную клетку двух (или более) препаратов, будет обсуждаться специально. По сути дела, все представленные ниже лабораторные методики определения чувствительности микроба к сочетанному действию антибиотиков сводятся к ответу на вопрос: будет ли это действие потенцированным (синергидным), т. е. полезным, перспективным для лечебного процесса, или, наоборот, конкурентным, антагонистическим, способным снизить лечебный потенциал антибиотиков,

взятых вместе. Прогнозирование подобного действия в каждом конкретном (частном случае) — это целиком и полностью задача микробиологической лаборатории. Синергизм явление достаточно не частое, он проявляется только при сочетании определенного круга антимикробных соединений [46, 52, 85, 141, 159, 204]. То же самое можно сказать и об антагонистическом действии антибиотиков на микроб [73, 96, 100, 170, 191]. Но цена и того, и другого для больного может быть велика. И хотя методики оценки чувствительности микроба к сочетанному действию антибиотиков далеки от совершенства, знать их, уметь использовать в практической деятельности лабораторной службы, задача, заслуживающая самого серьезного внимания микробиологов.

Изучение чувствительности микроорганизмов к сочетанному действию антибиотиков не относится к разряду рутинных частых исследований. Показания к нему должны быть обоснованными, причем целесообразность каждого анализа — это результат совместного мнения микробиолога и лечащего врача. Более того, микробиолог вправе поставить под сомнение необходимость такого исследования в нескольких очевидных ситуациях.

1. Большинство моноинфекционных процессов. Исключение могут составлять лишь очень тяжело протекающие инфекции, если возможность синергидного действия дает надежду на повышение эффективности проводимого лечения.
2. Заболевание вызвано ассоциацией микроорганизмов, чувствительных к одним и тем же антибиотикам. Исключения могут быть в такой ситуации, которая приведена в п. 1.
3. Исследование не должно проводиться, если ставится вопрос о сочетании антибиотиков, несовместимых по их сочетанному действию на больного (например, нефротоксичных или гепатотоксичных). В этом случае вопрос должен решаться совместно с клиническим фармакологом.
4. Несовместимость антибиотиков по их сочетанному действию на микроб (т. е. антибиотиков антагонистов). Исключением может быть лишь нестандартная клиническая ситуация, требующая особого обсуждения и обоснования.

Возвращаясь к показаниям для сочетанного применения антимикробных препаратов нетрудно заметить, что большинство из них предполагает потребность в традиционных микробио-

рос так, — что и как может дать микробиологическая лаборатория для рациональной сочетанной антибиотикотерапии? Ответ очевиден и, к сожалению, короток — она способна оценить чувствительность возбудителя к одновременному действию двух препаратов [43, 55, 137, 188].

Наиболее признанным, чаще применяемым способом определения чувствительности микроорганизмов к сочетанному действию антибиотиков является т. н. «метод шахматной доски», checkerboard array [137]. В русском переводе его чаще называют методом перекрестного титрования. Он был предложен еще в 60-е годы прошлого века в работах L. Garrod и D. Waterworth, L. Sabath и др. В основу был взят метод серийных разведений антибиотиков с определением МПК как каждого из препаратов, так и их сочетаний, взятых в разных концентрациях. Подчеркнем — именно в разных, что оказалось очень важно. К тому времени уже было известно (в т. ч. благодаря работам и отечественных специалистов), что синергизм или антагонизм могут проявляться при сочетании антибиотиков только в определенных концентрациях, иногда не многих, и не проявляться в других. При этом предсказать, какие из них меняют эффект, а какие нет, оказалось невозможно. Отсюда последовал вывод, определять активность сочетания антибиотиков следует при использовании разных концентраций и того, и другого препарата. Чтобы не пропустить эффект, препараты надо сочетать в самых различных вариантах концентраций. Нужна была система, и она была представлена в виде «шахматной доски». Представить себе принцип исследования несложно. Возьмем пробирки или лунки в планшетах в определенном количестве, например (только как пример) по 8 штук в 8 рядах: т. е. квадрат из 64 «шахматных» полей. На самом деле их может быть столько, сколько необходимо для корректного исследования, причем количество рядов по горизонтали может не совпадать с количеством рядов по вертикали. Определить это должен исследователь. Но, как пример, пусть будет  $8 \times 8$ , тем более, что именно такой набор емкостей (пробирок, лунок) вполне приемлем для исследований. Обозначим лунки (пробирки) по горизонтали буквами: от А до З (рис. 4.1), а по вертикали цифрами. Чтобы не повторяться далее будем использовать только термин «лунки», хотя это могут быть и пробирки (или любая другая емкость, пригодная для титрования). А теперь вспомним игру «морской бой» и будем обозначать лунки набором из буквы и цифры. Лунки А1 и З8 — они будут контрольными: А1 — контроль роста культуры,

		Антибиотик X							
		А	Б	В	Г	Д	Е	Ж	З
Антибиотик Y	1	$K_1$	x	2x	4x	8x	16x	32x	64x
	2	y	x+y	2x+y	4x+y	...	...	...	64x+y
	3	2y	x+2y	2x+2y	...	...	...	...	64x+2y
	4	4y	x+4y	...	...	...	...	...	64x+4y
	5	8y	...	...	...	8x+8y	...	...	...
	6	16y	...	...	...	...	...	...	...
	7	32y	x+32y	...	...	...	...	32x+32y	64x+32y
	8	64y	x+64y	2x+64y	...	...	...	32x+64y	$K_2$

Рис. 4.1. Схема «шахматной доски» для определения чувствительности микроба к сочетанному действию антибиотиков X и Y

Комментарии к рисунку:

$K_1$  — Контроль культуры.

$K_2$  — Контроль среды.

X — Антибиотик 1.

x — Концентрация антибиотика X, мкг/мл.

Y — Антибиотик 2.

y — Концентрация антибиотика Y, мкг/мл.

2x — Двойная концентрация.

4x — Учетверенная концентрация и т. д. (например, 1, 2, 4, ..., 64 мкг/мл).

2y — Двойная концентрация в мкг/мл и т. д.

Иллюстрация — см. следующий рисунок.

		Антибиотик X							
		А	Б	В	Г	Д	Е	Ж	З
Антибиотик Y	1	$K_1$	0,5	1,0	2,0	4,0	8,0	16,0	32,0
	2	1,0	0,5+1	1+1	2+1	4+1	8+1	16+1	32+1
	3	2,0	0,5+2	1+2	2+2	4+2	8+2	16+2	32+2
	4	4,0	0,5+4	1+4	2+4	4+4	8+4	16+4	32+4
	5	8,0	0,5+8	1+8	2+8	4+8	8+8	16+8	32+8
	6	16,0	0,5+16	1+16	2+16	4+16	8+16	16+16	32+16
	7	32,0	0,5+32	1+32	2+32	4+32	8+32	16+32	32+32
	8	64,0	0,5+64	1+64	2+64	4+64	8+64	16+64	$K_2$

Рис. 4.2. Частный пример титрования с использованием «шахматной доски» (см. рис. 4.1)

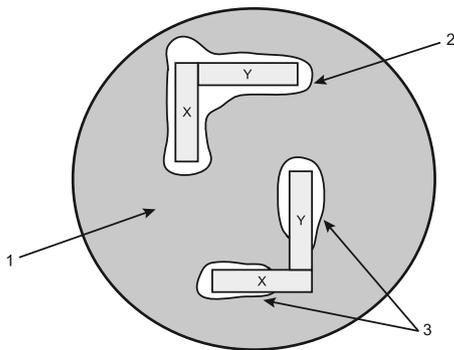


Рис 4.5. Схема синергидного и антагонистического действия антибиотиков X и Y при их диффузии из полосок в засеянный агар

Комментарии к рисунку:

X, Y — Полоски с антибиотиками X и Y.

1 — Микробный газон.

2 — Подавление роста микроба, синергидное действие.

3 — Подавление роста микроба, антагонистическое действие.

данных (понятно, что и они относительны). Ориентируясь на них, следует наложить диски. Можно использовать не одну, а 2–3 пары дисков, варьируя расстояние между ними. Это простой и, зачастую, эффективный прием.

Еще один вариант метода определения сочетанного действия основанный на диффузии антибиотиков в гель — использование полосок, пропитанных антибиотиками. Полоски накладывают под прямым углом на засеянный тестируемым микробом агар и через сутки оценивают результат. При индифферентном результате действия двух препаратов по периметру полосок образуется равномерная зона подавления роста микроба, в том числе и на стыке двух полосок. В случае антагонизма подавление роста вокруг угла, образуемого двумя полосками, не происходит или размер зоны уменьшается. При синергидном действии, наоборот, на стыке двух полосок зона подавления роста увеличивается (рис. 4.5).

При использовании диффузионного метода, как с дисками, так и полосками, эффект в некоторых случаях достаточно демонстративен и на этом основании вполне можно судить о целесообразности сочетания определенных антибиотиков или, наоборот, об их потенциальном конкурентном действии, что недопустимо. Однако возможности этого метода ограничены — антимикробные препа-

раты используют только в одной концентрации и это резко лимитирует возможность получения полноценной информации. Метод не стандартизован, критерии достоверности результата не разработаны. Будучи простым технически, диффузионный метод пригоден в скрининговых исследованиях, для получения предварительных результатов, но не более того.

Заметно большее признание получило определение зависимости между бактерицидным действием антибиотиков и временем экспозиции их воздействия на микроб (time-kill assay). Иногда такое исследование называют определением кривой зависимости «время — летальное действие» (time-kill curves, time-kill plots). Речь идет, по сути дела, об определении бактерицидного или фунгицидного действия антибиотиков и их сочетаний, но не в одной временной точке, обычно через сутки, как это представлено во многих методических публикациях (в т.ч. и в данном издании), а в динамике. Для применения такой методики есть ряд показаний, которые в настоящее время, в основном, касаются углубленных исследований новых антимикробных препаратов, а также тех проявлений резистентности бактерий, которые пока не вошли в число исследуемых в повседневной практике микробиологических лабораторий (т.н. «толерантность» микроорганизмов, «персистенция», «малые колонии» и т.п.). Единственная область, в которой определение кривой бактерицидного действия антибиотиков на микроб рассматривается как практически значимое, приближенное к повседневным интересам микробиологической службы, это, как раз, проблема сочетанного действия антимикробных препаратов на микроорганизм. Нельзя, однако, не признать, что этот метод остается вторичным, уступая в частоте использования «перекрестному титрованию», которое приведено выше.

В чем основное преимущество метода определения кривой зависимости «время — летальный эффект» очевидно. Определение чувствительности микроорганизмов к сочетанному действию антибиотиков показано тогда, когда речь идет о лечении тяжелых больных, когда, образно говоря, стоит проблема жизни и смерти человека. Но в такой ситуации важна не просто чувствительность микроба к используемому препарату, но и способность этого препарата убить микроб. Об этом достаточно подробно говорится в разделе, посвященном бактерицидному действию антибиотиков. Цепочка простая. У тяжелого больного иммунитет очень часто подавлен. Раз иммунитет неполноценен, то бактериостатическое