

Химиотерапия острых форм сапа в эксперименте

В. И. ИЛЮХИН, К. А. РОТОВ, Т. В. СЕНИНА, Е. А. ШАТЕНКОВ, С. Н. ТИХОНОВ, Н. Г. ПЛЕХАНОВА,
А. С. КУЛИКОВА, Е. В. ШУБНИКОВА, Е. В. КОРОЛЬ, М. О. НЕХЕЗИНА

ФКУЗ Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора, Волгоград

Experimental Study on Chemotherapy of Acute Glanders

V. I. ILYUKHIN, K. A. ROTOV, T. V. SENINA, E. A. SNATENKOV, S. N. TIKHONOV, N. G. PLEKHANOVA,
A. S. KULIKOVA, E. V. SHUBNIKOVA, E. V. KOROL, M. O. NEKHEZINA

Volgograd Plague Control Research Institute, Volgograd

Сап относится к зоонозным инфекциям, вызывающим у человека и животных формирование при определённых условиях острых форм заболевания (пневмония, сепсис), которые даже при лечении современными средствами химиотерапии имеют неблагоприятный прогноз. Недостаточная эффективность антибиотиков (имеющих *in vitro* низкие уровни МПК в отношении планктонной бактериальной взвеси *Burkholderia mallei*) при химиотерапии сапной инфекции объясняется способностью возбудителя к внутриклеточному существованию и формированию биоплёнок. В этих условиях чувствительность *B.mallei* к антибиотикам снижается на несколько порядков. Лечение химиопрепаратами острых форм у животных, как правило, приводит лишь к увеличению продолжительности жизни павших, а среди выживших после химиотерапии наблюдается существенный уровень рецидивов. Более благоприятный исход наблюдался при использовании эффективных *in vitro* антибиотиков в виде клатратных соединений и особенно в липосомальной форме. В опытах на золотистых хомячках выживаемость достигала 100% при заражении 1000 Длм даже при начале лечения липосомальной формой меропенема через 48 ч после инфицирования. Химиопрепараты в липосомальной форме преодолевали резистентность *B.mallei* как при постановке опытов с планктонной взвесью микроорганизмов, так и в случае с бактериями, интенированными в эукариотические клетки (*Tetrahymena pyriformis*).

Ключевые слова: сап, *B.mallei*, химиотерапия, липосомы

Glanders is a zoonotic infection inducing acute forms of the disease (pneumonia, sepsis) in humans and animals under certain conditions, which even with the use of modern chemotherapy have unfavourable prognosis. Insufficient of efficacy of antibiotics with *in vitro* low MIC for planktonic bacterial suspension of *Burkholderia mallei* in chemotherapy of acute forms of glanders was due to the capacity of the pathogen for intracellular survival and formation of biofilms. Under such conditions the susceptibility of *B.mallei* to antibiotics lowered by several orders of magnitude. Chemotherapy of the glanders acute forms in animals usually provided only an increase of the lifespan, while among the survivors there was recorded a high relapse rate. More favourable outcomes were observed with the use of *in vitro* effective antibiotics in the form of clathrate compounds or especially liposomal forms. In the experiments with golden hamsters the survival rate reached 100% in 1000 Dlm infection even with the treatment onset by meropenem liposomal form 48 hours after the infection. Chemotherapeutics in the liposomal form significantly lowered resistance of *B.mallei* in both the experiments with a suspension of planktonic organisms and the use of bacteria interned in eukaryotic cells (*Tetrahymena pyriformis*).

Key words: glanders, *B.mallei*, chemotherapy, liposomes.

Сап — типичное зоонозное инфекционное заболевание, единственным резервуаром которого в природе являются непарнокопытные (лошади, ослы, мулы). Однако заболевание сапом регистрируют и у многих видов млекопитающих (верблюды, козы, овцы) при естественном контакте с больными или при поедании трупов инфицированных лошадей (львы, тигры и другие хищные млекопитающие). Коровы, свиньи, крысы и птицы считаются невосприимчивыми к заражению сапом [1, 2]. Сап у людей относят к профессиональным заболеваниям, которым болеют, как

правило, конюхи, ветеринары, кавалеристы, работники ветеринарных и медицинских лабораторий [2—4].

В настоящее время эпизоотии и спорадические заболевания сапа встречаются в Монголии, Иране, Ираке, Турции, Бразилии, Бахрейне [1—3]. Среди людей описаны только случаи внутрилабораторных заражений [5].

Клиническая картина заболевания у людей и животных широко варьирует от латентной формы до острой в виде сепсиса и пневмонии. Острые формы заболевания при позднем начале лечения, тем более при отсутствии такового, заканчиваются летальным исходом в течение нескольких дней от начала заболевания.

© Коллектив авторов, 2012

Адрес для корреспонденции: 400131, г. Волгоград, Голубинская, 7. Волгоградский НИ противочумный институт

Проблемы лечения сапа определены не только природной устойчивостью возбудителя к антибактериальным средствам, но и особенностями патогенеза заболевания: внутриклеточной локализацией возбудителя *in vivo*, капсулообразованием, формированием биоплёнок. Все эти факторы резко снижают эффективность препаратов, которые в условиях *in vitro* имеют обнадеживающие показатели МПК в отношении планктонных форм *Burkholderia mallei* [1, 6–8].

Высокая патогенность возбудителя сапа для людей и животных, проблемы с диагностикой и лечением заболевания, отсутствие специфической вакцины являются основанием для включения *B.mallei* в число вероятных агентов биотерроризма, относящихся к категории В по классификации Американского Центра по контролю заболеваний (CDC, США). В Российской Федерации этот возбудитель относится к микроорганизмам 2-й группы патогенности, требующим соблюдения специального режима при работе с ним [1, 3, 9].

В качестве модели для проведения исследований по лечению сапа используют различные виды животных, среди них: лошади, обезьяны, морские свинки, кошки, линейные мыши [1, 2, 10], однако наиболее адекватной и удобной моделью для изучения острых форм сапа является золотистый хомячок (*Mesocricetus auratus*), у которого заболевание протекает по типу «всё или ничего». ЛД₅₀ всех известных природных штаммов *B.mallei* составляет < 10¹ микр. кл., при подкожном введении летальных доз клинические проявления наступают уже в первые сутки после инфицирования, а гибель животных происходит в течение 1-й недели после заражения [10–12]. При этом очевидно, что препараты и схемы лечения, разработанные для химиотерапии сапа у золотистых хомячков, еще более эффективны при лечении животных, более резистентных к сапу, к которым, по мнению ряда авторов, относится и человек [1, 2, 7].

Целью проведённых исследований являлся отбор химиопрепаратов, эффективных для подавления роста *B.mallei*, и разработка схем и способов введения этих средств для лечения острых форм сапа.

Материал и методы

Штамм. В опытах использовали вирулентный штамм *B.mallei* Ц 5, предварительно пассированный 10-кратно на золотистых хомячках. Выделенная от павших животных последнего пассажа культура была лиофилизирована и в ампулах хранилась при 4°C. Перед опытом ампулы вскрывали, делали высев на Nutrient agar (Difco, США). После второго пересева готовили бактериальную суспензию для постановки опытов. В предварительных опытах минимальная смертельная доза (D₅₀) этого штамма составляла ≤ 10¹ микр. клеток.

Экспериментальные животные. Опыты по лечению сапа проводили на золотистых хомячках обоего пола массой 90–110 г.

Заражение животных проводили подкожно в область правой паховой складки культурой *B.mallei* Ц 5 в дозе 10⁴ м. к., что составляло 10³ D₅₀.

Химиопрепараты: ко-тримоксазол (бисептол, Польфа), цефтазидим (фортум, Glaxowellcome), доксициклин (доксициклин, Польфа), меропенем (меропенем, АстраЗенека).

Антибактериальную активность определяли методом серийных разведений в бульоне Мюллера-Хинтона (Hi Media, India), с определением минимальной подавляющей концентрации (МПК) и минимальной бактерицидной концентрации (МБК).

Оценка резистентности *B.mallei* в интернированном в эукариотические клетки состоянии проведена на культуре *Tetrahymena pyriformis*, широко используемой в опытах по изучению фагоцитоза и патогенности бактерий [13, 14]. Культура *T.pyriformis* поддерживалась в бульоне с гидролизатом казеина при комнатной температуре [13], оценка эффективности антибиотиков проводилась в бульоне Мюллера-Хинтона в соотношении тетраимены/буркхольдерии 10²/10⁷ клеток/мл. МБК препаратов для микробных клеток, интернированных в простейшие, определяли по результатам роста *B.mallei* на Nutrient agar по данным высева на него осаждённых центрифугированием (2000 об/мин, 5 мин) тетраимен. При постановке опыта по оценке МБК разведения антибиотиков и экспозиция были стандартными, отличие состояло лишь в температуре, которая составляла 32°C. Ранее было показано, что антибиотикограмма *B.mallei* при таком уровне снижения температуры существенно не отличается от стандартной (37°C) [15].

Введение препаратов. Лечение начинали через 4 ч (экстренная профилактика) и через 24 и 48 ч после заражения. Химиопрепараты вводили *per os* в виде суспензии в подсолнечном масле и парентерально инъекциями в растворе 0,9% NaCl, или в виде клатратного соединения препаратов с 6% полиглюкином-декстраном с молекулярной массой 60000 (ОАО «Биохимик»). Кроме того, препараты вводили в составе липосом, которые готовили по методу Szoka [16, 17]. Липосомы имели размер 1,0–1,5 мкм и содержали в 1,0 мл 30 мг препарата.

Препараты вводили ежедневно, за исключением липосомальных форм, которые вводили внутрибрюшинно с 2-суточным интервалом, что определялось особенностью фармакокинетики липосомальных форм антибиотиков [17].

Длительность введения антибиотиков варьировала в зависимости от задач конкретного опыта. Доза вводимых препаратов определялась величиной максимально достигаемой концентрацией (МДК) в крови.

После завершения курса лечения животных наблюдали не менее 21 дня, затем забивали хлороформом и вскрывали с целью выявления хронических форм (производился высев отпечатками паренхиматозных органов и лимфоузлов на Nutrient agar).

Достоверность различия уровней выживаемости животных опытных и контрольных групп оценивалась по точному методу Фишера для групп наблюдений по качественным показателям [18].

Результаты и обсуждение

Отбор антибиотиков для лечения сапа прежде всего базировался на опубликованных результатах по определению чувствительности *B.mallei in vitro* к химиопрепаратам [3, 7, 19], а также в определённой мере на рекомендациях по лечению мелиоидоза — заболевания, вызываемого филогенетически и патогенетически близкой к *B.mallei* буркхольдерией — *B.pseudomallei* [7].

Наиболее эффективными препаратами для подавления роста *B.mallei* считаются цефтазидим, доксициклин, ко-тримоксазол и меропенем [2, 3, 7, 19]. Чувствительность бактериальной взвеси

Таблица 1. Показатели чувствительности *B.mallei* Ц 5 к химиопрепаратам (в мкг/мл)

Препарат	МПК	МБК	МБК/Т	МДК
Доксициклин	0,6	2,5	>100	4
Ко-тримоксазол	0,35	3,0	>100	80
Меропенем	0,6	0,6	25,0	100
Цефтазидим	5,0	5,0	>100	70

Примечание. МПК и МБК по отношению к планктонным взвесям клеток *B.mallei*; МБК/Т — минимальная бактерицидная концентрация препаратов для клеток *B.mallei*, интернированных в тетрахимены; МДК — максимальная достигаемая концентрация препаратов в плазме крови при введении их в терапевтических дозах.

Таблица 2. Эффективность лечения экспериментального сапа золотистых хомячков при подкожном заражении 10^3 Dlm культуры *B.mallei* Ц 5

Препарат	Суточная доза, мг	Лекарственная форма	Начало лечения, часы после заражения	Длительность введения, сутки	Уровень защиты, %	Срок жизни павших, сутки
Доксициклин	4	Эмульсия	4	15	50*	12
Цефтазидим	100	Эмульсия	4	10	20	8,5
Цефтазидим	100	Эмульсия	24	15	30	11,0
Ко-тримоксазол	120	Эмульсия	4	10	40	18,0
Ко-тримоксазол	120	Эмульсия	24	15	20	17,0
Контроль	—	—	—	—	0	5,0
Меропенем	5	0,9 % NaCl	4	10	0	7,0
Ко-тримоксазол	4	0,9 % NaCl	4	10	10	12,0
Доксициклин	120	0,9 % NaCl	4	10	10	11,5
Доксициклин	4	Клатрат	4	10	80*	21,0
Контроль	—	—	—	—	0	4,5
Меропенем	5	Липосомы	4	9	60*	17,5
Меропенем	5	Липосомы	4	15	100*	—
Меропенем	5	Липосомы	24	15	100*	—
Меропенем	5	Липосомы	48	15	100*	—
Контроль	—	—	—	—	0	4,5

Примечание. Эмульсия — препараты в подсолнечном масле вводили *per os*; 0,9% NaCl — «чистый» препарат вводили подкожно в виде раствора в 0,9% NaCl; клатрат — комплексное соединение антибиотика с полиглюкином, вводили подкожно; начало лечения начиналось через 4, 24 и 48 часов после заражения животных; * — достоверность уровня защиты по сравнению с контролем превышает 95%; материалы каждой строки таблицы получены для группы из 10 золотистых хомячков.

штамма *B.mallei* Ц 5 представлена в табл. 1. Очевидно, что в условиях *in vitro* планктонная взвесь микробов по показателям МПК и МБК по сравнению с известными данными о МДК антибиотиков в плазме крови предполагает их эффективность при лечении сапной инфекции.

Однако полученные нами данные по МБК этих же препаратов по отношению к клеткам буркхольдерий, интернированных в эукариотические клетки *T.pyriformis* (см. табл. 1), ставят под сомнение эффективность лечения острых форм сапа для всех препаратов, кроме меропенема, у которого МБК для внутриклеточных бактерий *B.mallei* оказывается ниже МДК. Эти различия между МПК клеток *B.mallei* в планктонном и интернированном состоянии и предполагают высокую вероятность рецидивов заболевания после прекращения химиотерапии, так как в этот период, несмотря на отсутствие жизнеспособных микробов в плазме крови, появляется высокая вероятность выхода возбудителя сапа из эукариотических клеток и появление симптомов реинфекции.

В наших опытах при концентрациях антибиотиков, в десятки раз превышающих исходную МДК для планктонной взвеси, бульон Мюллера-Хинтона остается прозрачным. При высеве через 24 ч осаждённых центрифугированием клеток *T.pyriformis* на агар Мюллера-Хинтона появляется рост колоний *B.mallei* Ц 5. Таким образом, сапные микробы сохранили свою жизнеспособность в интернированном состоянии в эукариотических клетках, находившихся в среде, содержащей антибиотики в бактерицидной концентрации для внеклеточных бактерий *B.mallei*.

В дальнейших опытах такой же характер взаимодействия *in vivo* антибактериальных средств и расположенных вне- и внутриклеточно бактерий подтвердился и результатами лечения сапной инфекции у экспериментальных животных (табл. 2).

Острая форма сапа у золотистых хомячков, заражённых 10^3 Dlm, характеризовалась следующими признаками. Через 4 ч после инфицирования у хомячков температура тела была в пределах физиологической нормы: 37,6—38,2°C (Ме 37,8°C), поведение, аппетит и состояние внешних покровов

не отличались от контроля. У забитых хлороформом животных в эти сроки культура *B.mallei* выделялась только из места её введения и из регионарного лимфоузла; высевы из крови, лёгких и паренхиматозных органов были отрицательными.

Через 24 ч у заражённых животных ректальная температура повышалась до 38,8–40,2°C (Ме 39,4°C) и сохранялась на этом уровне до терминального состояния (за 15–20 ч до гибели), когда она снижалась ниже нормы, достигая в агональном состоянии 35,0°C. Животные становились апатичными, шерсть взъерошена, глаза слипались от обильной слизи. Гибель в контрольной группе наступала в среднем через 4,5 дня (из 30 животных контроля одно погибло через 48 ч и два на 6-й день после заражения).

На вскрытии у павших хомячков обнаружены многочисленные абсцессы в селезёнке, печени и лёгких, из крови и мочи выделялась культура *B.mallei*.

Лечение животных эмульсией в подсолнечном масле *per os* и инъекционными препаратами, эффективными по данным МПК *in vitro*, приводило в большинстве своём лишь к удлинению продолжительности жизни павших животных (см. табл. 2). При этом отмечается 2 пика падежа золотистых хомячков: 1-й в ходе лечения, на 5–6 сутки, и второй — через 6–7 дней после прекращения лечения. Второй пик объясняется реинфекцией, наступающей вследствие выхода из внутриклеточного состояния бактерий *B.mallei*.

Очевидное усиление эффективности антибиотиков происходило при введении их в клатратной форме (комплексное соединение с высокомолекулярным декстраном) и особенно в липосомальной форме.

Клатраты обеспечивают не только длительное поддержание высокой концентрации антибиотика в плазме крови, но и проникновение препаратов в лимфатическую систему (как известно в патогенезе сапа лимфангоиты и лимфадениты играют едва ли не ведущую роль [1–3]).

Липосомальные формы меропенема оказались наиболее эффективным средством экстренной профилактики и лечения острых форм сапа у золотистых хомячков. Длительность введения препарата должна обеспечивать минимум 15-суточную циркуляцию антибиотика в крови, в то время как при 9-суточном воздействии даже при введении липосом в режиме экстренной профилактики не обеспечивается 100% защита. К моменту окончания лечения все 10 хомячков были

живы, однако через 6–11 дней последующего наблюдения 4 (40 %) погибли со специфическими морфологическими проявлениями типичного сапа и выделением культуры из крови, лёгких и абсцессов печени и селезёнки.

Увеличение сроков введения липосомального меропенема до 15 сут обеспечило 100% выживаемость и санацию организма от сапного микроба даже при начале лечения через 48 ч после инфицирования. У вскрытых через 22 сут выживших животных культура *B.mallei* не выделялась ни из крови, ни из внутренних органов. Таким образом, липосомальная форма меропенема является весьма эффективным средством лечения, обеспечивающим не только выживание животных при острой форме сапа, но и санацию организма от интернированных в эукариотические клетки микробов *B.mallei*, устраняя возможность формирования рецидивов сапной инфекции.

При световой микроскопии ($\times 900$) уже через 2–3 ч экспозиции планктонной взвеси микробов и липосом в бульоне с тетрациклинами, в последних наблюдается скопление липосом и микробов в вакуолях, что обеспечивает длительное воздействие на микробы антибиотиков, выделяющихся из липосом [17]. Это также подтверждается и результатами ряда авторов на других видах инфекций [16, 20].

Выводы

1. Парентеральное введение золотистым хомячкам взвеси культуры *B.mallei* Ц 5 в дозе 10^3 Dlm формирует острую форму сапа, характеризующуюся бактериемией, пневмонией и многочисленными абсцессами во внутренних органах. Гибель животных происходит в течение 3–5 сут после инфицирования.

2. Пероральное и инъекционное введение высокоактивных *in vitro* препаратов не гарантирует достаточно эффективную защиту от сапной инфекции, при этом хотя и удлиняет жизнь павших животных, но не обеспечивает выживших от рецидивов заболевания.

3. Клатраты и в особенности липосомальные формы химиопрепаратов наиболее эффективны для лечения острых форм сапа. При этом использование липосом обеспечивает санацию животных и от интернированных в эукариотические клетки макроорганизма бактерий возбудителя сапа, тем самым предупреждая возможность формирования рецидивов заболевания.

ЛИТЕРАТУРА

1. Dvorak G. D., Spickler A. R. Glanders. JAMA. 2008; 233: 4: 570–577.
2. Waag D. M., Deshazer D. Glanders. New insights into an old disease. In: Infectious Disease: Biological Weapons Defense / Ed. by L. E. Lindler, F. J. Lebeda, G. W. Korch, NJ. 2004; 209–237.
3. Илюхин В. И., Алексеев В. В., Королев Ю. С. Буркгольдерии — возбудители сапа и мелиоидоза. В кн.: Руководство по медицинской микробиологии / Под ред. А. С. Лабинской. М.: 2010; 2: 755–787.
4. Howe C., Miller W. R. Human glanders: report of six cases. Ann Intern Med 1947; 26: 93–115.
5. Srinivasan A., Kraus C. N., Deshazer D. Glanders in a military research microbiology. N Engl J Med 2001; 345: 256–258.
6. Ebert L. Quorum sensing in the genus *Burkholderia*. Int J Med Microbiol 2006; 296: 103–110.

7. Estes D. M., Dow S. W., Schweizer H. P., Torres A. G. Present and future therapeutic strategies for melioidosis and glanders. *Expert Rev Anti Infect Ther* 2010; 8: 3: 325–338.
8. Tunpiboonsak S., Monkolrob R., Kitudomsab K. et al. Role of a *Burkholderia pseudomallei* polyphosphate kinase in an oxidative stress response, motilities and biofilm formation. *J Microbiol* 2010; 48: 63-70.
9. Lehavi O., Aizenstein O., Katz L. H., Hourvitz A. Glanders — a potential disease for biological warfare in humans and animals. *Harefuah* 2002; 88–91: 119.
10. Miller W. R., Pannell L., Gravitz L. et al. Studies on certain biological characteristics of *Malleomyces mallei* and *Malleomyces pseudomallei* II. Virulence and infectivity for animals. *J Bact* 1948; 55: 1: 127–135.
11. Fritz D. L., Vogel P., Brown D. R., Waag D. M. The hamster model of intraperitoneal *Burkholderia mallei* (Glanders). *Vet Pathol* 1999; 36: 276–291.
12. Russell P., Eley S. M., Ellis J. et al. Comparison of efficacy of ciprofloxacin and doxycycline against experimental melioidosis and glanders. *J Antimicrob Chemother* 2000; 45: 813–818.
13. Bozzone D. An investigative approach to the study of phagocytosis in *Tetrahymena*. In: *Tested Studies for Laboratory Teaching* / ed. S. Karcher. 1998; 19: 347–350.
14. Panq M-D., Lin X-Q., Hu M. et al. *Tetrahymena*: an alternative model host for evaluating virulence of *Aeromonas* strains. *PLoS* 2012, ONE 7: 11: e 48922.
15. Илюхин В. И., Батманов В. П. Влияние температуры и pH среды на чувствительность патогенных псевдомонад к химиопрепаратам. *Антибиотики и химиотер* 1997; 4: 21–23.
16. Halwani M., Mugabe C., Azghani A. O. et al. Bactericidal efficacy of liposomal aminoglycosides against *Burkholderia cenocepacia*. *J Antimicrob Chemother* 2007; 60: 760–769.
17. Rotov K. A., Tikhonov S. N., Alekseev V. V., Snatnikov E. A. Pharmacokinetics of liposomal gentamicin. *Bull Exper Biol Med* 2012; 4: 464–466.
18. Генес В. С. Таблицы достоверных различий между группами наблюдений по качественным показателям. М.: 1964; 71.
19. Thibault F. M., Hernandez E., Vidal D. R. et al. Antibiotic susceptibility of 65 isolates of *Burkholderia pseudomallei* and *Burkholderia mallei* to 35 antimicrobial agents. *J Antimicrob Chemother* 2004; 54: 1134–1138.
20. Drulis-Kawa Z., Gubernator J., Doratkiewicz-Jach A. et al. *In vitro* antimicrobial activity of liposomal meropenem against *Pseudomonas aeruginosa* strains. *Intern J Pharm* 2006; 315: 1–2: 59–66.