

ISSN 0235-2990

АНТИБИОТИКИ И ХИМИОТЕРАПИЯ

Том 58



3-4'2013

Научно-практический журнал

Создан для монотерапии полимикробных и резистентных инфекций

Грамположительные
Грамотрицательные
Атипичные
Анаэробы
Резистентные грамположительные
Резистентные грамотрицательные

Спектр активности Тигацила:¹⁻³

- БЛРС-продуценты*
- MRSA**
- VRE***
- *Acinetobacter baumannii*
- *Stenotrophomonas maltophilia*

Краткая информация по применению препарата ТИГАЦИЛ

МНН: тигециклин

ЛЕКАРСТВЕННАЯ ФОРМА: лиофилизат для приготовления раствора для инфузий

ФАРМАКОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА

Фармакодинамика

Антибиотик тигециклин принадлежит к классу глицициклинов, структурно сходному с тетрациклинами. Ингибирует трансляцию белка у бактерий за счёт связывания с 30S-субъединицей рибосомы и блокирования проникновения молекул аминоацил-тРНК на А-сайт рибосомы, что препятствует включению аминокислотных остатков в растущие пептидные цепи. Считается, что тигециклин обладает бактериостатическими свойствами.

Бактерицидное действие тигециклина отмечено в отношении *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae* и *Legionella pneumophila*.

Тигециклин может преодолевать два основных механизма резистентности микроорганизмов, наблюдаемых в отношении тетрациклинов: рибосомальную защиту и активное выведение. Кроме того, активность тигециклина не подавляется ни действием бета-лактамаз (включая бета-лактамазы расширенного спектра), ни модификацией чувствительных к антибиотку участков бактериальной оболочки, ни путём активного выведения антибиотика из бактериальной клетки или модификацией мишеней воздействия (например, гиразы/топоизомеразы). Таким образом, тигециклин обладает широким спектром антибактериальной активности. Однако у тигециклина отсутствует защита против механизма резистентности микроорганизмов в виде активного выведения из клетки, кодируемого хромосомами *Protease* и *Pseudomonas aeruginosa* (система оттока MexXY-OprM). Между тигециклином и большинством классов антибиотиков не существует перекрёстной устойчивости.

Фармакокинетика

Менее 20% тигециклина подвергается метаболизму. Он не является ни конкурентным ингибитором, ни необратимым ингибитором цитохрома P450. Отмечено, что 59% назначенной дозы выводится через кишечник (при этом большая часть неизменённого тигециклина поступает в жёлчь), а 33% выводится почками.

ПОКАЗАНИЯ К ПРИМЕНЕНИЮ

- Осложнённые инфекции кожи и мягких тканей, за исключением инфекций при синдроме диабетической стопы.
- Осложнённые интраабдоминальные инфекции.
- Внебольничная пневмония.

*БЛРС – бета-лактамазы расширенного спектра, **MRSA – метициллин-резистентный золотистый стафилококк, ***VRE – ванкомицин-резистентный энтерококк

Ссылки

1. Инструкция по медицинскому применению препарата Тигацил, одобренная Росздравнадзором 13.10.2009 г. 2. И.В.Андреева и другие. Тигециклин: перспективы применения в клинической практике. Клиническая микробиология и антимикробная терапия 2010 том 12, №2. 3. G.L. French A Review of Tigecycline. Journal of Chemotherapy. Vol. 20 - Suppl. n 1 (3-11) - 2008.



Представительство Корпорации «Пфайзер Эйч. Си. Пи. Корпорейшн» (США)
Россия, 123317 Москва, Пресненская наб., д.10, БЦ «Башня на Набережной» (Блок С)
Тел.: +7 (495) 287 50 00. Факс: +7 (495) 287 53 00.

Министерство здравоохранения
Российской Федерации

Государственный научный
центр по антибиотикам

«Антибиотики и химиотерапия» —
ежемесячный научно-практический
журнал
Основан в 1956 году

«Antibiotics and Chemotherapy»
Published 12 times a year
Founded in 1956

АДРЕС РЕДАКЦИИ:

117105 Москва, Нагатинская ул., д. 3а.
ГНЦА
Тел.: 8-499-611-20-77
Факс: 8-499-611-42-38
E-mail: journalgnca@yandex.ru
Зав. редакцией Л. Б. Смирнова
Корректор: А. Н. Лобусева

ОТДЕЛ РЕКЛАМЫ:

Тел.: 8-499-611-20-77
Факс: 8-499-611-42-38
E-mail: gncajournal@yandex.ru
Л. И. Гусак

Подписка по каталогу Роспечать:

- индекс **71404** — для индивидуальных подписчиков
- индекс **71405** — для предприятий и организаций

*Подписка через объединённый каталог
«Пресса России»:*

- индекс **10659** — для индивидуальных подписчиков
- индекс **10660** — для предприятий и организаций

Журнал зарегистрирован
в Комитете РФ по печати
Рег. свид. № 0110694 от 25 мая 1993 г.

Установочный тираж 5000 экз.

© ГНЦА 2013

ISSN 0235-2990

АНТИБИОТИКИ И ХИМИОТЕРАПИЯ

ANTIBIOTICS AND CHEMOTHERAPY

Том 58

3—4'2013

ЕЖЕМЕСЯЧНЫЙ НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКИЙ ЖУРНАЛ
MONTHLY JOURNAL

Главный редактор
профессор, д. м. н. Сидоренко С. В.

Зам. главного редактора — к. м. н. Буданов С. В.
Отв. секретарь — к. м. н. Гучев И. А.

РЕДАКЦИОННАЯ КОЛЛЕГИЯ

Член-корр РАМН, проф., д. м. н. Белоусов Ю. Б.
Проф., д. м. н. Белобородов В. А.
Проф. Говорун В. М.
Проф. Гомберг М. А.
Д. б. н. Даниленко В. Н.
Проф. Климко Н. Н.
Акад. РАМН, проф., д. м. н. Лобзин Ю. В.
Проф., д. м. н. Никитин А. В.
Проф., д. х. н. Преображенская М. Н.
Проф. Руднов В. А.
Проф. Тишков В. Н.
Проф., д. б. н. Фирсов А. А.
Проф., д. м. н. Яковлев С. В.
Проф. Яроцкий С. В.

Научные редакторы

к.м.н. Кузнецова С. М.
к.б.н. Белявская И. В.

РЕДАКЦИОННЫЙ СОВЕТ

Беседнова Н. Н.	Клясова Г. А.
Бибикова М. В.	Ленёва И. А.
Васильев А. Н.	Митрохин С. Д.
Волжанин В. М.	Романцов М. Г.
Дмитриева Н. В.	Сычев Д. А.
Долгова Г. В.	Тец В. В.
Захарова Ю. А.	Цыбанев А. А.
Зуева Л. П.	Ших Е. В.
Ильина Е. Н.	

Журнал* цитируется в: *Medline; Ind Chem; Index Medicus; Ind Sci Rev; Curr Biothech Abstr; Current Contents (Life Sciences)*

Cited in: *Medline; Ind Chem; Index Medicus; Ind Sci Rev; Curr Biothech Abstr; Current Contents (Life Sciences)*

Оригинальные статьи

Тренин А. С.
Микробная тест-система для поиска ингибиторов биосинтеза стеролов.
Агеевец В. А., Партина И. В., Лисицына Е. С., Батыршин И. М., Попенко Л. Н., Шляпников С. А., Ильина Е. Н., Сидоренко С. В.
Чувствительность грамотрицательных бактерий, продуцентов карбапенемаз, к антибиотикам различных групп
Палий Г. К., Назарчук А. А., Палий Д. В., Назарчук Г. Г., Гончар О. О., Сухляк В. В., Трофименко Ю. Ю., Задерей Н. В., Стукан О. К.
Антимикробные свойства антисептической композиции пролонгированного действия
Писарев В. В.
Сравнение антибактериальной активности ингаляционных форм препаратов тобрамицина
Подборонов В. М., Шелканов М. Ю., Смирнова И. П., Буренкова Л. А., Новикова В. П., Аристова В. А., Новикова Е. Л., Москвитина Г. Г., Иоффе А. М.
Бактерицидное действие лизоцима

В помощь практикующему врачу

Лубасовская Л. А., Корниенко М. А., Припутневич Т. В., Ильина Е. Н., Шеголев А. И.
Микробиологическая и молекулярно-генетическая характеристика коагулазонегативных стафилококков, выделенных у новорождённых отделения реанимации и интенсивной терапии.
Гельберг И. С., Вольф С. Б., Суханов Д. С., Авласенко В. С., Шейфер Ю. А.
Применение реамберина при химиотерапии туберкулёза и его влияние на показатели функции печени
Попов Д. А., Анучина Н. М., Терентьев А. А., Костюк Г. В., Блатун Л. А., Русанова Е. В., Александрова И. А., Пхакадзе Т. Я., Богомолова Н. С., Терехова Л. П.
Диоксидин: антимикробная активность и перспективы клинического применения на современном этапе
Кимирилова О. Г., Романцов М. Г., Харченко Г. А.
Иммунотропная терапия арбовирусных инфекций у детей

Original Papers

3 Trenin A. S.
Microbial Test-System for Screening of Inhibitors of Sterol Biosynthesis
10 Ageevets V. A., Partina I. V., Lisitsina E. S., Batyrshin I. M., Popenko L. N., Shlyapnikov S. A., Ilyina E. N., Sidorenko S. V.
Susceptibility of Gramnegative Carbapenemase-Producing Bacteria to Various Group Antibiotics
14 Paly G. K., Nazarchuk A. A., Paly D. V., Nazarchuk G. G., Gonchar O. O., Sukhlyak V. V., Trofimenko Yu. Yu., Zaderei N. V., Strukan O. K.
Antimicrobial Properties of Antiseptic Composite with Prolonged Action
19 Pisarev V. V.
Comparison of Antibacterial Activities of Tobramycin Inhalation Solutions
22 Podboronov V. M., Shchelkanov M. Yu., Smirnova I. P., Burenkova L. A., Novikova V. P., Aristova V. A., Novikova E. L., Moskvitina G. G., Ioffe A. M.
Bactericidal Effect of Lysozyme

Guidelines for Practitioners

25 Lubasovskaya L. A., Kornienko M. A., Priputnevich T. V., Ilyina E. N., Shchegolev A. I.
Microbiological and Molecular Genetic Characteristics of Coagulase-Negative Staphylococcal Isolates from Neonates in Intensive Care Unit
33 Gelberg I. S., Volf S. B., Sukhanov D. S., Avlasenko V. S., Sheifer Yu. A.
Reamberin in Tuberculosis Chemotherapy and Its Effect on Liver Function
37 Popov D. A., Anuchina N. M., Terentyev A. A., Kostyuk G. V., Blatun L. A., Rusanova E. V., Aleksandrova I. A., Pkhakadze T. Ya., Bogomolova N. S., Terekhova L. P.
Dioxidin: Antimicrobial Activity and Prospects of Its Clinical Use at Present
43 Kimirilova O. G., Romantsov M. G., Kharchenko G. A.
Immunotropic Therapy of Arbovirus Infections in Children

По страницам журналов 49 Abstracts

* Журнал входит в перечень ведущих научных журналов и изданий, выпускаемых в Российской Федерации, в которых должны быть опубликованы основные научные результаты диссертаций на соискание ученой степени доктора наук.

Микробная тест-система для поиска ингибиторов биосинтеза стеролов

А. С. ТРЕНИН

ФГБУ «НИИ по изысканию новых антибиотиков им. Г. Ф. Гаузе» РАМН, Москва

Microbial Test-System for Screening of Inhibitors of Sterol Biosynthesis

A. S. TRENIN

G. F. Gause Institute of New Antibiotics, Russian Academy of Medical Sciences, Moscow, Russia

Предлагается новая экономичная высокоэффективная микробная тест-система, позволяющая осуществлять поиск ингибиторов биосинтеза стеролов. Система основана на культивировании гриба *Acremonium fusidioides* (по прежней классификации *Fusidium coccineum*), образующего фузидиевую кислоту (фузидин) — антибиотик стероидной структуры. Значительное сходство в биосинтезе фузидиевой кислоты в организме гриба-продуцента и холестерина в организме человека, совпадение их начальных этапов вплоть до стадии формирования сквалена позволяет с успехом применять *A.fusidioides* для оценки микробных вторичных метаболитов — потенциальных ингибиторов биосинтеза холестерина. Ингибиторы биосинтеза стеролов в тесте с культурой *A.fusidioides* выявляются как соединения, резко снижающие продукцию фузидина при отсутствии заметного влияния на рост продуцента. Мевалоновая кислота — один из ключевых интермедиатов биосинтеза стеролов — может с успехом применяться для снятия ингибирующего действия ряда микробных метаболитов. Тест с *A.fusidioides* легко поддается механизации благодаря миниатюризации микробиологических процессов, выращиванию культуры в стерильных 6-, 24- и 96-луночных планшетах и использованию автоматических микропипеток, его результаты хорошо согласуются с оценкой ингибирующего действия метаболитов в тестах с клетками человека (культура клеток гепатобластомы G2). Указанная тест-система пригодна для работы с грубо очищенными экстрактами культуральной жидкости микроорганизмов-продуцентов и может быть применена на начальных этапах поиска.

Ключевые слова: ингибиторы биосинтеза стеролов, вторичный микробный метаболизм, микробные модели поиска, холестерин, мевалоновая кислота, фузидиевая кислота, ГМГ-КоА редуктаза, миниатюризация, механизация микробиологических процессов.

New effective economic microbial test-system for screening of microbial metabolites, that are inhibitors of sterol biosynthesis, is proposed. It is based on cultivation of fungal strain *Acremonium fusidioides* (former *Fusidium coccineum*), that produces fusidic acid (fusidin) that is antibiotic of steroid structure. Great similarity of fusidic acid biosynthesis in fungous strain and cholesterol biosynthesis in human organism, coincidence of their initial steps till squalene formation, allows use *A. fusidioides* as a model for estimation of microbial secondary metabolites that are potential inhibitors of sterol biosynthesis. Such inhibitors in *A.fusidioides* model are revealed as compounds that strongly reduce fusidin production without any visible influence on fungus growth. Mevalonate that is one of the crucial intermediates of sterol biosynthesis could be successfully applied for removal of inhibition induced by some microbial metabolites. *A.fusidioides* test-system can be easily mechanized because of miniaturization of microbiological procedures, cultivation in 6-, 24-, or 96-well plates and usage of automatic micropipettes and dispensers. The results of this model are well correlated with the ones obtained with human cells (Hep G2 test-system, offered earlier). *A.fusidioides* test-system can be applied at rather early stages of screening procedures and is quite effective for testing of crude extracts of producers' culture liquid.

Key words: inhibitors of sterol biosynthesis, microbial secondary metabolites, microbial models for screening of new antibiotics, cholesterol, mevalonate, fusidin, HMG-CoA reductase, crude extracts of culture liquid, miniaturization, mechanization of microbial processes.

Введение

Микробные вторичные метаболиты — ингибиторы биосинтеза стеролов (ИБС), в первую очередь статины — ингибиторы 3-гидрокси-3-метилглутарил-КоА редуктазы (ГМГ-КоА редуктазы) и созданные на их осно-

ве химические аналоги, хорошо зарекомендовали себя в качестве действенных средств лечения и профилактики атеросклероза, показали высокую эффективность в лечении ряда онкологических заболеваний [1–5]. Серьезные перспективы в разработке эффективных средств лечения сердечнососудистых заболеваний связаны также с созданием препаратов на базе ингибиторов более поздних этапов биосинтеза стеролов, в частности, ингибиторов сквален

© А. С. Тренин, 2013

Адрес для корреспонденции: 119021 г. Москва, Большая Пироговская, 11. ФГБУ НИИНА

синтазы, сквален эпоксидазы и сквален монооксигеназы [6–9]. Ингибиторы Р-450 зависимой деметилазы ланостерола являются, по-видимому, действенным средством лечения грибковых инфекций [10–12]. В настоящее время развернут широкий поиск ИБС среди продуктов жизнедеятельности различных микроорганизмов как грибов, так и актиномицетов [13–16]. Успех поисковых работ во многом зависит от эффективности применяемых тест-систем, в особенности на начальном этапе отбора.

Возможность применения ферментных систем, требующих тщательной химической очистки тестируемых препаратов, на начальных этапах скрининговых исследований весьма затруднительна. Значительно более уместным здесь оказывается использование клеточных культур. Предложенный нами ранее метод отбора ИБС с помощью культуры клеток гепатобластомы G2 (Нер G2), в основу которого положена количественная оценка включения радиоизотопных предшественников в холестерин и отдельные фракции липидов, позволяет не только выявить микробные метаболиты — ИБС, но и обнаружить (при использовании очищенных препаратов) особенности их механизма действия [17]. К сожалению, для указанного метода характерна весьма высокая трудоемкость.

В настоящей работе предлагается значительно менее трудоемкий подход, основанный на использовании не клеток человека, а микробных культур. В основу предлагаемой тест-системы положено культивирование несовершенного гриба *Acremonium fusidioides* — продуцента фузидиевой кислоты (фузидина) — антибиотика стероидной структуры [18]. Ингибиторы биосинтеза стеролов в тесте с культурой *A.fusidioides* выявляются как соединения, резко снижающие продукцию фузидина при отсутствии заметного влияния на рост продуцента. Мевалоновая кислота — один из ключевых интермедиатов биосинтеза стеролов — может с успехом применяться для снятия ингибирующего действия микробных метаболитов, действующих на ранних этапах биосинтеза стеролов и, таким образом, способствовать их раннему выявлению.

По сравнению с культурой Нер G2 описываемый тест обладает значительно более высокой пропускной способностью, мало чувствителен к микробному заражению, с успехом поддается механизации благодаря выращиванию микробной тест-культуры в жидкой питательной среде в стерильных 6-, 24- и 96-луночных планшетах. Указанная тест-система пригодна для работы с грубо очищенными экстрактами культуральной жидкости микроорганизмов-продуцентов и может быть применена на начальных этапах поиска.

Материал и методы

Условия культивирования, среды, определение биологической активности. Культуры актиномицетов и грибов выделяли из образцов почвы и выращивали при температуре 28°C на агаризованных средах: актиномицеты — на среде Гаузе 1 и Гаузе 2 [19], грибы — на сусло-агаре и кислом агаре Чапека [20].

Для изучения антибиотической активности культур в жидкой питательной среде их выращивали в колбах Эрленмейера емкостью 750 мл, содержащих 50–150 мл питательной среды, на качалках при 28°C в течение 5–11 суток в различных питательных средах (состав указан в процентах): Гаузе 2 (глюкоза — 10,0, пептон — 5,0, триптон — 5,0, NaCl — 5,0, CaCO₃ — 2,5), соево-глицериновой (соевая мука — 1,5, глицерин — 3,0, NaCl — 0,3, CaCO₃ — 0,3), соево-глюкозной (соевая мука — 1,0, глюкоза — 1,0, NaCl — 0,5, CaCO₃ — 0,25), соево-сахарозной (соевая мука — 1,0, сахароза — 2,0, CaCO₃ — 0,3, NaCl — 0,3, KNO₃ — 0,2), кукурузно-крахмальной (кукурузный экстракт — 0,3, крахмал — 2,0, CaCO₃ — 0,5, NaCl — 0,5, KNO₃ — 0,4). В качестве инокулята использовали выращенную на агаризованных средах 7–10-суточную культуру. Рост культур в жидкой среде контролировали спектрофотометрически по уровню поглощения при 560 нм.

Антибиотическую активность определяли методом штриха на агаровой среде при выращивании продуцентов на плотных питательных средах и методом диффузии в агаре при выращивании в жидких средах — в отношении различных бактериальных тест-микроорганизмов и грибов: *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Micrococcus luteus* ATCC 9341, *Staphylococcus aureus* ATCC 21027, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Candida albicans* ATCC 14053, *Candida tropicalis* ATCC 750, *Cryptococcus humicola* ATCC 9949, *Aspergillus niger* ATCC 16404 и *Fusarium oxysporum* VKM F-140 (= CMI, IMI 90473).

Реактивы и материалы. В работе использовали препараты антибиотиков зарубежных и отечественных компаний, а также антибиотики, полученные в НИИНА им. Г.Ф. Гаузе, РАМН. Используемый в тест-системе препарат лактона D,L-мевалоновой кислоты («Sigma», США) подвергали сапонификации — выдерживали в слабо щелочной среде для получения кислотной формы: 1 М раствор лактона в 0,1 н NaOH инкубировали при 50°C в течение 2 часов, либо при 37°C в течение 4 ч.

Контрольным препаратом при выявлении ИБС служил ловастатин («MSD», США).

Для стерилизации проб культуральной жидкости применяли одноразовые стерильные фильтры Sterivex (диаметр пор 0,22 мкм) фирмы «Millipore», США. В целях концентрирования препаратов культуральной жидкости проводили их лиофилизацию на лиофилизационной установке SUE 300 Q («Heto», Швеция).

Выделение и очистка антибиотиков. Культуральную жидкость и мицелий продуцентов разделяли фильтрацией или центрифугированием. Для выделения антибиотиков из фильтрата культуральной жидкости применяли сорбцию на смоле Амберлит XAD-2, позволяющую выделять биологически активные вещества разной степени гидрофильности, а также экстракцию этилацетатом для выделения метаболитов, обладающих липофильными свойствами. Обработку мицелия проводили экстракцией этиловым спиртом (EtOH) при нейтральном и кислом (4,0) значениях pH.

При выделении методом сорбции на смоле Амберлит XAD-2 антибиотики из культуральной жидкости (250 мл), сорбированные на смоле, элюировали смесью ацетон — бутанол — вода (1:1:1) при нейтральном и кислом (4,5) значениях pH. Концентрирование получаемых таким образом растворов осуществляли упариванием в вакууме до маслянистого остатка с последующим растворением в небольшом объеме (3 мл) 60% EtOH (концентраты 1 и 2).

При экстракции антибиотиков этилацетатом при кислом (4,0) и нейтральном значениях pH соотношение экстрагента и культуральной жидкости составляло 1:10 — 1:5. Концентриро-

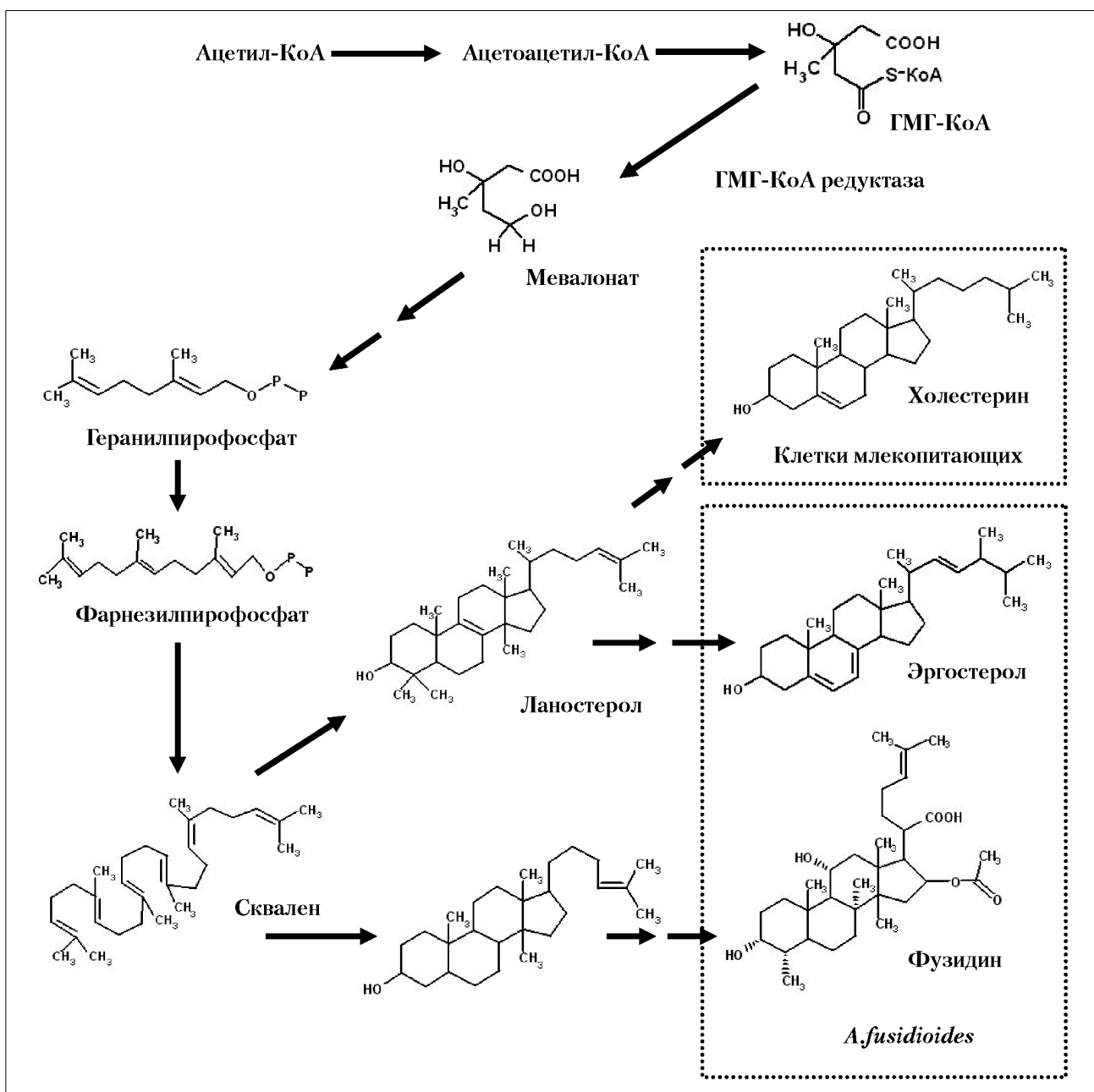


Рис. 1. Биосинтез холестерина, эргостерола и антибиотика фузидина (схема разработана на основе источников [21–24]).

вание получаемых экстрактов (концентраты 3 и 4) также проводили упариванием в вакууме.

В случае обработки мицелия его отделяли от культуральной жидкости фильтрованием и разделяли на две части. Антибиотики экстрагировали 80% EtOH из расчета 3 мл растворителя на 1 г мицелия при кислом (4,0) и нейтральном значениях pH. После экстракции надосадочную жидкость упаривали до получения маслянистого остатка и разводили в небольшом объеме EtOH (концентраты 5 и 6).

Применение указанных способов выделения позволяло провести концентрирование биологически активных соединений, содержащихся в культуральной жидкости и мицелии продуцентов, в 50–100 раз.

Обладавшие антимикробной активностью концентраты исследовали путем хроматографирования в тонком слое на пластинках с Кизильгелем 60 (Merck) в системе гексан — ацетон (1:1) или хлороформ — метанол (9:1) с последующим химичес-

ким (опрыскивание 2% водным раствором KMnO_4) и биологическим (тест-организмы *B. subtilis* и *A. niger*) проявлением.

Хроматографическую очистку и разделение компонентов перспективных препаратов проводили методом колоночной хроматографии. Определяли физико-химические характеристики полученных соединений. Для идентификации выделенных антибиотических веществ использовали компьютерную базу данных природных биологически активных веществ (BNPD), разработанную Я. Берди (Венгрия).

Микробная тест-система для выявления ИБС. Культуру *Acremonium fusidoides* (по прежней классификации *Fusidium coccineum* Fuckel ATCC 14700), выращивали при 28°C в питательной среде Гаузе 2 (в г/л: глюкоза — 10, пептон — 5,0, триптон — 5,0, NaCl — 5,0, CaCO_3 — 2,5, pH 7,0–7,2) в атмосфере повышенной влажности в 6-, 24- и 96-луночных стерильных полистироловых планшетах, («Flow», Великобритания, «Costar», Франция, «Медполимер», С-Пб.). Объем проб со-

ставил соответственно 1 мл, 0,5 мл и 200 мкл. Продолжительность выращивания — 3–6 сут.

Исследуемые препараты, полученные из культуральной жидкости и мицелия продуцентов, вносили в среду культивирования *A.fusidioides* в виде спиртовых или спирто-водных растворов серий последовательных трехкратных разведений. Препарат в каждой концентрации вносили в 3–6 повторах. Конечное содержание этанола в эксперименте не превышало 1%. При анализе непосредственно культуральной жидкости продуцентов ее подвергали стерилизационной обработке микрофильтрацией (фильтры Sterivex, «Millipore», США с диаметром пор 0,22 мкм), а серию последовательных разведений проводили в стерильной дистиллированной воде.

Препарат мевалоновой кислоты вносили в конечной концентрации 1–10 мМ непосредственно в питательную среду в начале культивирования.

Концентрацию тестируемых препаратов в экспериментах с *A.fusidioides* рассчитывали в мкг/мл (для очищенных препаратов) и в единицах культуральной жидкости (ед. к.ж.) (для первичных экстрактов антибиотиков).

Рост тест-культуры в планшетах оценивали визуально, а также по сухой массе мицелия. Продукцию фузидина выявляли методом диффузии в агаре с помощью культуры *B.subtilis* ATCC 6633, для чего культуральную жидкость *A.fusidioides* отбирали из ячеек полистиролового планшета и переносили в лунки (диаметр 8 мм), приготовленные в агаризованной (2%) среде Гаузе 2, содержащей суспензию клеток *B.subtilis*. Инкубацию осуществляли при 37°C 16 часов до полного вырастания тест-культуры и появления отчетливых зон подавления роста вокруг лунок. Количественное определение фузидина проводили путем измерения диаметра зон.

О наличии у испытуемых препаратов способности к ингибированию биосинтеза стеролов судили по подавлению продукции фузидина при отсутствии заметного влияния на рост культуры.

Статистическую обработку результатов исследований проводили с использованием компьютерных программ Statgraf и Microsoft Excel, рассчитывая средние арифметические значения, доверительные интервалы и стандартное отклонение. Достоверность различий между средними величинами оценивали с использованием *t*-критерия Стьюдента ($p < 0,05$).

Результаты и обсуждение

Микробная модель поиска ИБС основана на способности гриба *A.fusidioides* продуцировать фузидиевую кислоту (антибиотик стероидной структуры фузидин), легко выявляемую благодаря наличию антибиотической активности в отношении грамположительных микроорганизмов. Биосинтез фузидиевой кислоты в организме гриба-продуцента и синтез холестерина в организме человека протекают по мевалонатному пути, при этом этапы биосинтеза, вплоть до стадии формирования сквалена, у них совпадают (рис. 1).

Для уточнения механизма действия изучаемых ингибиторов использовали мевалоновую кислоту, препаратом сравнения служил известный ингибитор биосинтеза стеролов ловастатин.

Активный рост тест-культуры *A.fusidioides* начинался на 2-е сутки и заканчивался примерно к 4–5-м суткам эксперимента. Одновременно с началом роста отмечено образование культурой фузидина. Наиболее ощутимо фузидин накапливался к 4–6 суткам эксперимента (рис. 2, кривая *a*).

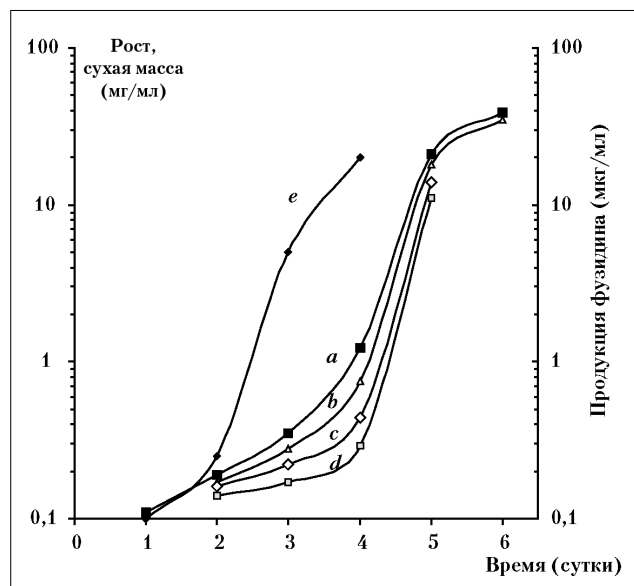


Рис. 2. Влияние ловастатина на образование культурой *A.fusidioides* антибиотика фузидина.

Кривые *a*, *b*, *c* и *d* — продукция фузидина (в мкг/мл) при содержании в среде ловастатина: 0 (*a*), 2,5 (*b*), 5 (*c*) и 10 мкг/мл (*d*); рост культуры, сухая масса мицелия (в мг/мл) — кривая *e*. Ось абсцисс — время (сутки); ось ординат левая — рост, сухая масса (мг/мл); ось ординат правая — продукция фузидина (мкг/мл).

Внесение ловастатина (2,5–10 мкг/мл) приводило к подавлению продукции фузидиевой кислоты, наиболее заметному в течение первых 4 суток культивирования, происходившему при отсутствии подавления роста тест-культуры (рис. 2, кривые *b*, *c*, *d*).

Аналогичный эффект — подавление образования фузидина у *A.fusidioides* — наблюдался при добавлении экстрактов различных микробных штаммов — предполагаемых продуцентов ИБС (рис. 3).

Внесение в тест-систему препарата экзогенной мевалоновой кислоты — одного из основных интермедиатов биосинтеза стеролов в количестве 2–10 мМ приводило к возобновлению культурой *A.fusidioides* синтеза фузидина, несмотря на присутствие ловастатина (5, 10 мкг/мл) (рис. 4).

Аналогичный эффект мевалоновой кислоты наблюдался при испытании ряда микробных метаболитов (рис. 5, 6 *a*, *b*) и свидетельствовал о подавлении ими начальных (т. е. до образования мевалоната) этапов биосинтеза стеролов. Ингибирующее действие других метаболитов, напротив, в присутствии мевалоновой кислоты не снималось (рис. 6, *в*).

Предложенная тест-система была применена для исследования 1130 штаммов актиномицетов и плесневых грибов, проявивших на предварительных этапах исследования противогрибковую активность (рис. 7). У 610 штаммов (54%) выявлено

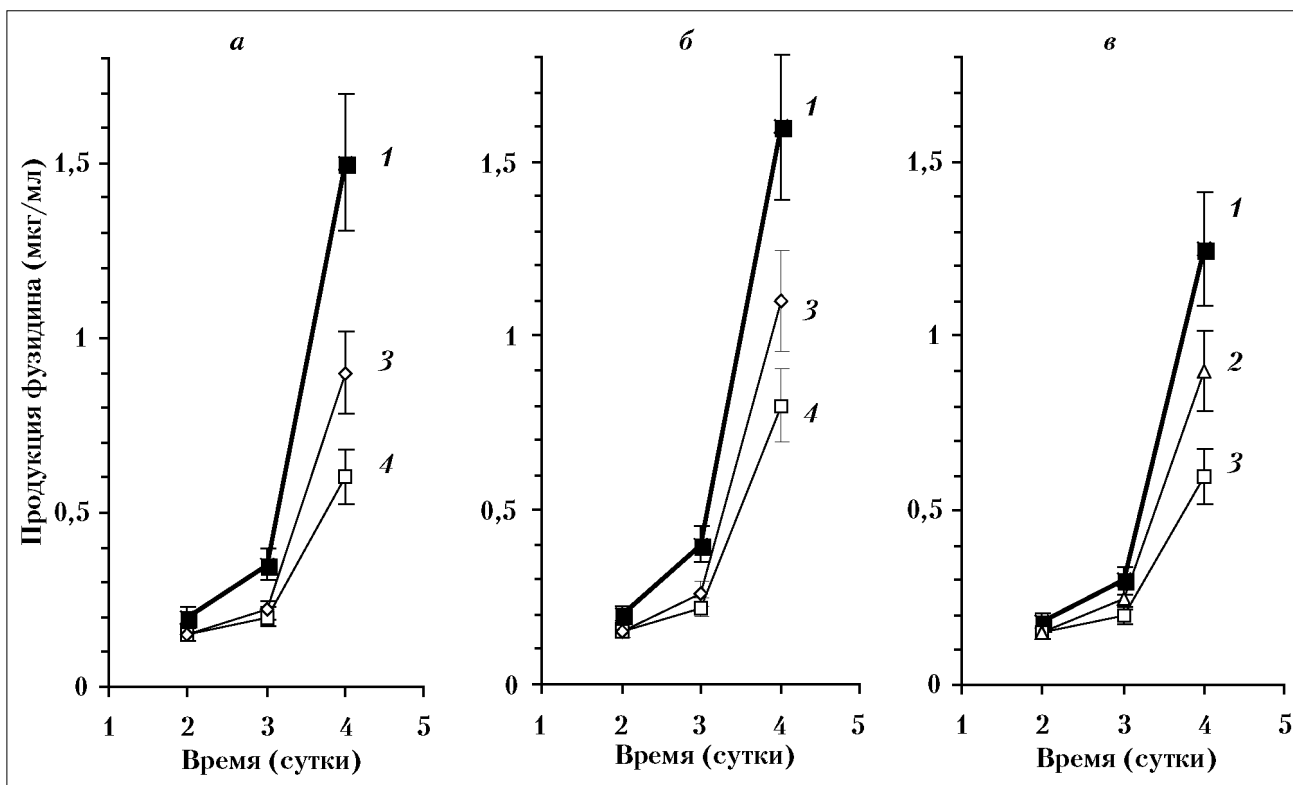


Рис. 3. Образование фузидина культурой *A.fusidioides* в присутствии экстрактов, полученных из культуральной жидкости штаммов 199/89 (а), 86/89 (б) и 55/90 (в).

Содержание тестируемых веществ (в ед. кж/мл): 0 (кривая 1), 3×10^{-3} (кривая 2), 10^{-2} (кривая 3), 3×10^{-2} (кривая 4). Ось абсцисс — время (сутки); ось ординат — продукция фузидина (мкг/мл).

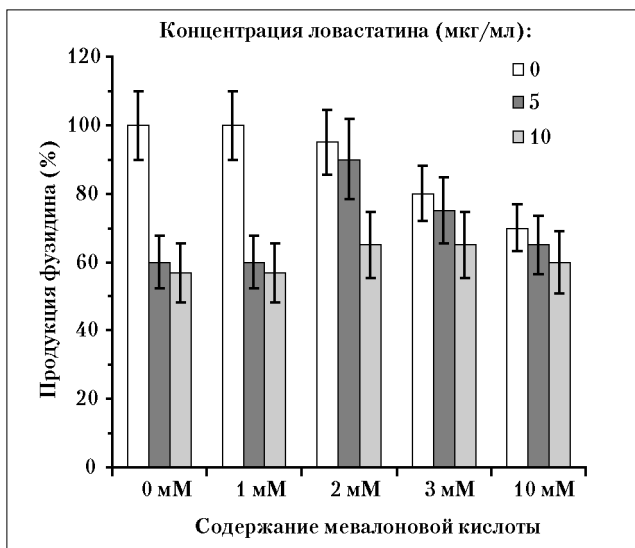


Рис. 4. Влияние мевалоновой кислоты на продукцию культурой *A.fusidioides* антибиотика фузидина (время инкубации 4 суток).

Ось абсцисс — содержание мевалоновой кислоты; ось ординат — продукция фузидина (%).

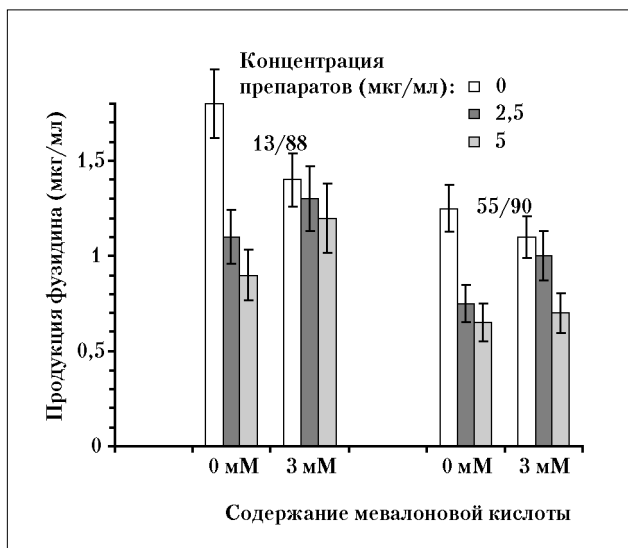


Рис. 5. Влияние мевалоновой кислоты на продукцию культурой *A.fusidioides* фузидина в присутствии антибиотиков 13/88, 55/90 (время инкубации 4 суток)

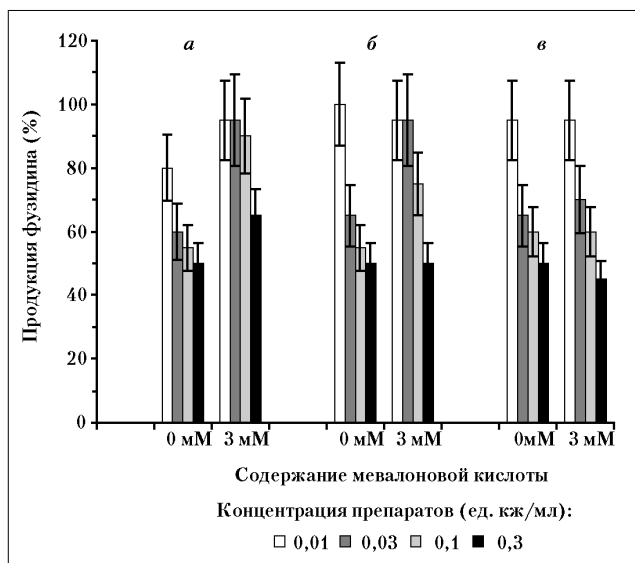


Рис. 6. Влияние мевалоновой кислоты на продукцию культурой *A. fusidioides* фузидина в присутствии экстрактов, полученных из культуральной жидкости штаммов 8 (а), 1248/00 (б) и 5422 (в). Ось абсцисс — содержание мевалоновой кислоты; ось ординат — продукция фузидина (%).

подавление биосинтеза фузидина, причем у большинства из них двукратное подавление продукции фузидина наблюдалось при испытании сильно разведенных (в 30—100 раз) препаратов культуральной жидкости и мицелия продуцентов. 415 штаммов такой способностью не обладали.

У 105 (9%) штаммов снижение продукции фузидина сопровождалось подавлением роста

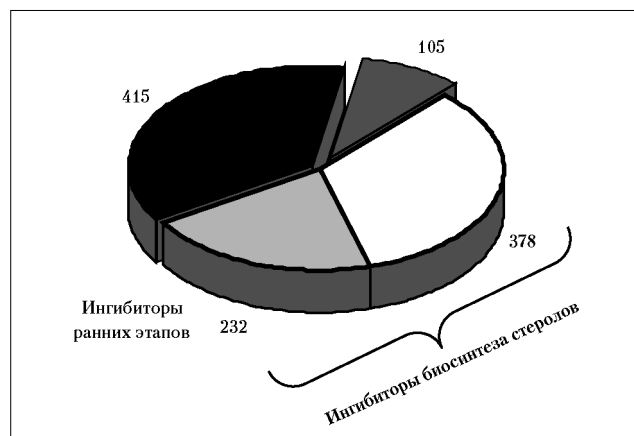


Рис. 7. Способность микробных штаммов-продуцентов к подавлению биосинтеза стеролов в модели *A. fusidioides*.

тест-культуры, что препятствовало их корректному тестированию в модели *A. fusidioides* (рис. 7). Для остальных 1025 (91%) штаммов предложенное тестирование в описываемой модели было возможным.

Подавление биосинтеза фузидина снималось в присутствии экзогенной мевалоновой кислоты у 232 штаммов (38% всех активных штаммов), что явилось доказательством воздействия образуемых ими метаболитов на ранние этапы биосинтеза стеролов (включая этап ГМГ-КоА редуктазы). Другие 378 культур, по-видимому, являются продуцентами метаболитов, воздействующих на поздние этапы биосинтеза стеролов (рис. 7).

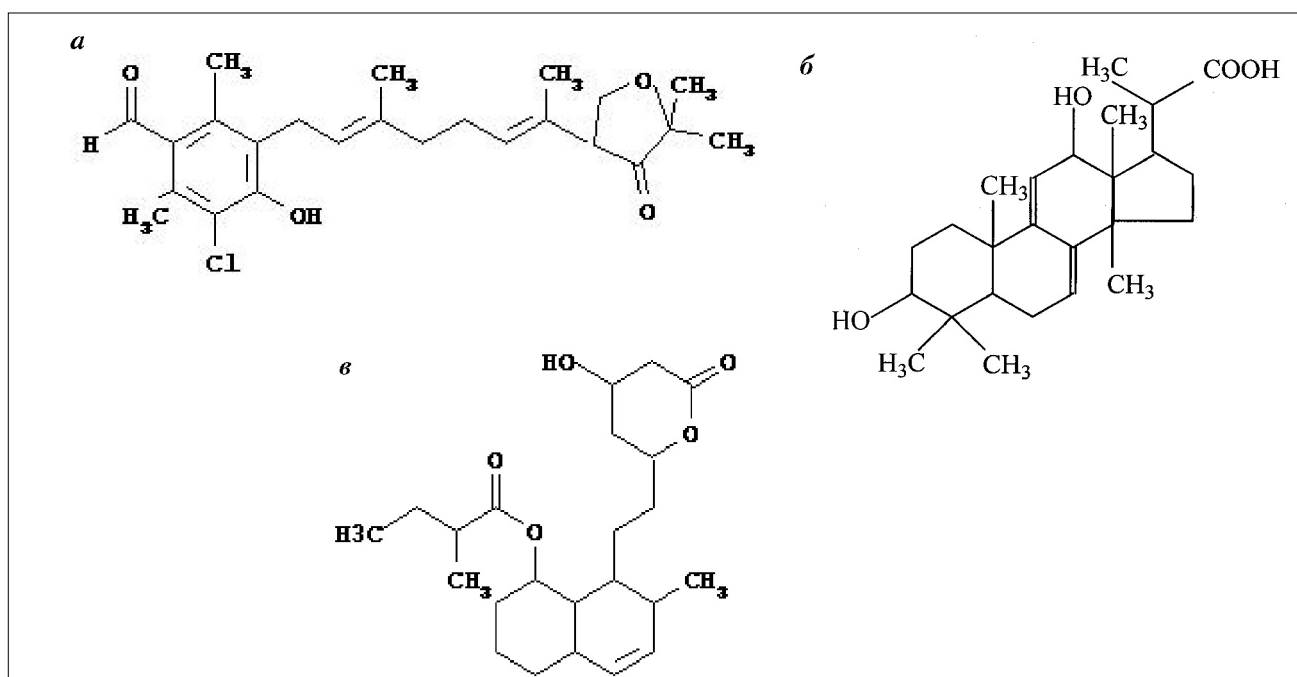


Рис. 8. Химическая структура антибиотика 199/88 (аскофуранон) (а), а также предполагаемая структура антибиотиков 55/90 (б) и 13/88-2 (в).

Применение описываемой микробной модели в скрининге новых антибиотиков в НИИНА им. Г. Ф. Гаузе РАМН позволило выделить продуценты таких ИБС, как аскофуранон (199/89) [25], антибиотиков стероидной (55/90) и монаколиновой структуры (13/88-2) [18, 26], а также ряда других соединений, находящихся в настоящее время в стадии углубленного изучения (рис. 8).

В сравнении с ранее предложенной моделью поиска ИБС с использованием клеток Нер G2 новая микробная модель *A.fusidioides* обладает значительно более высокой пропускной способностью, менее чувствительна к микробному заражению, поддается механизации благодаря выращиванию культуры в стерильных 6-, 24- и 96-луночных планшетах и использованию автоматических микропипеток. Результаты микробного теста хорошо сочетаются с оценкой ингибирующего действия метаболитов в тестах с клетками человека: все метаболиты, активные в тесте Нер G2, оказались активными в микробной модели, а среди метаболитов, неактивных в мик-

робной модели, не было ни одного, который бы проявил свою активность в тесте Нер G2. Следовательно, микробная модель *A.fusidioides* не дает ложно-отрицательных результатов, и ее применение практически не вызывает неправомерного отсева потенциально перспективных культур.

Заключение

Таким образом, ИБС при использовании модели *A.fusidioides* выявляются как соединения, снижающие продукцию фузицина при отсутствии заметного влияния на рост продуцента. Рассматриваемая модель пригодна для работы с грубо очищенными экстрактами, полученными из культуральной жидкости и мицелия микроорганизмов-продуцентов, и может быть с успехом использована на начальных этапах поиска. Возможность применения в микробной модели *A.fusidioides* мевалоновой кислоты позволяет уже на начальных этапах поиска успешно выявлять метаболиты, способные к подавлению ранних этапов биосинтеза стеролов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Тренин А. С., Кампуха Г. С. Антибиотики — ингибиторы биосинтеза холестерина. Хим фарм журн 1997; 31: 9: 5—16.
2. Тренин А. С. Вторичные метаболиты грибов — ингибиторы биосинтеза стеролов. Прикл биохим микробиол 1998; 34: 2: 131—138.
3. Trapani L., Segatto M., Pallottini V. Regulation and deregulation of cholesterol homeostasis: The liver as a metabolic «power station». World J Hepatol 2012; 4: 6: 184—190.
4. Hindler K., Cleeland C. S., Rivera E., Collard C. D. The role of statins in cancer therapy. Oncologist 2006; 11: 3: 306—315.
5. Garcia-Ruiz C., Morales A., Fernandez-Checa J. C. Statins and protein prenylation in cancer cell biology and therapy. Anticancer Agents Med Chem 2012; 12: 4: 303—315.
6. Charlton-Menys V., Durrington P. N. Squalene synthase inhibitors: clinical pharmacology and cholesterol-lowering potential. Drugs 2007; 67: 1: 11—16.
7. Seiki S., Frishman W. H. Pharmacologic inhibition of squalene synthase and other downstream enzymes of the cholesterol synthesis pathway: a new therapeutic approach to treatment of hypercholesterolemia. Cardiol Rev 2009; 17: 2: 70—76.
8. Chugh A., Ray A., Gupta J. B. Squalene epoxidase as hypocholesterolemic drug target revisited. Prog Lipid Res 2003; 42: 1: 37—50.
9. Belter A., Skupinska M., Giel-Pietraszek M. et al. Squalene monooxygenase — a target for hypercholesterolemic therapy. Biol Chem 2011; 392: 12: 1053—1075.
10. Vicente M. F., Basilio A., Cabello A., Peláez F. Microbial natural products as a source of antifungals. Clin Microbiol Infect 2003; 9: 1: 15—32.
11. Espinel-Ingroff A. Novel antifungal agents, targets or therapeutic strategies for the treatment of invasive fungal diseases: a review of the literature (2005—2009). Rev Iberoam Micol 2009; 26: 1: 15—22.
12. Kathiravan M. K., Salake A. B., Chothe A. S. et al. The biology and chemistry of antifungal agents: a review. Bioorg Med Chem 2012; 20: 19: 5678—5698.
13. Hatori H., Sato B., Sato I. et al. FR901512, a novel HMG-CoA reductase inhibitor produced by an agonomycetous fungus No. 14919. II. Taxonomy of the producing organism, fermentation, isolation and physico-chemical properties. J Antibiot (Tokyo) 2004; 57: 4: 264—270.
14. Hatori H., Shibata T., Tsurumi Y. et al. FR171456, a novel cholesterol synthesis inhibitor produced by *Sporormiella minima* No. 15604. I. Taxonomy, fermentation, isolation, physico-chemical properties. J Antibiot (Tokyo) 2004; 57: 4: 253—259.
15. Donadio S., Maffioli S., Monciardini P. et al. Antibiotic discovery in the twenty-first century: current trends and future perspectives. J Antibiot (Tokyo) 2010; 63: 8: 423—430.
16. Donadio S., Maffioli S., Monciardini P. et al. Sources of novel antibiotics — aside the common roads. Appl Microbiol Biotechnol 2010; 88: 6: 1261—1267.
17. Тренин А. С., Терехова Л. П., Толстых И. В. и др. Отбор микробных вторичных метаболитов — ингибиторов биосинтеза холестерина с помощью культуры клеток гепатобластомы G2. Антибиотики и химиотер 2003; 48: 1: 3—8.
18. Trenin A. S. Microbial test system for screening of secondary metabolites inhibiting cholesterol biosynthesis. International Conference on Microbial Secondary Metabolism, 5—8 Oct. 1994. Interlaken, 1994; Abstr. P.4.
19. Гаузе Г. Ф., Преображенская Т. П., Свешикова М. А. и др. Определение актиномицетов. М.: 1983; 245.
20. Waksman S. A. The actinomycetes. Classification, identification and descriptions of genera and species. Vol. 2. Baltimore, The Williams and Wilkins Co. 1961. — 363 p.
21. Ланчини Д., Паренти Ф. Антибиотики. М.: 1985; 272.
22. Berg J. M., Tymoczko J. L., Stryer L. Biochemistry, 5th edition: International Version. — New York: W.H. Freeman and Company, 2002; 1100.
23. Bellamine A., Mangla A. T., Dennis A. L. et al. Structural requirements for substrate recognition of *Mycobacterium tuberculosis* 14 α -demethylase: implications for sterol biosynthesis. J of Lipid Research. 2001; 42: 128—136.
24. Mitsuguchi H., Seshime Y., Fujii I. et al. Biosynthesis of Steroidal Antibiotic Fusidanes: Functional Analysis of Oxidosqualene Cyclase and Subsequent Tailoring Enzymes from *Aspergillus fumigatus*. J Am Chem Soc 2009; 131: 18: 6402—6411.
25. Терехова Л. П., Тренин А. С., Озерская С. М. и др. Образование аскофуранона культурой гриба *Raecilomyces variotii* Bainier 199. Микробиология 1997; 66: 5: 611—615.
26. Кампуха Г. С., Толстых И. В., Жухлистова Н. Е. и др. Потенциальные средства лечения и профилактики атеросклероза на основе вторичных микробных метаболитов. Тез. докл. I Всеросс. конференции по проблемам атеросклероза, 8-9 июня 1999 г., М.: М., 1999; 151—152.

Чувствительность грамотрицательных бактерий, продуцентов карбапенемаз, к антибиотикам различных групп

В.А. АГЕЕВЕЦ¹, И. В. ПАРТИНА¹, Е. С. ЛИСИЦЫНА², И. М. БАТЫРШИН⁴,
Л. Н. ПОПЕНКО⁴, С. А. ШЛЯПНИКОВ⁴, Е. Н. ИЛЬИНА³, С. В. СИДОРЕНКО¹

¹ НИИ детских инфекций ФМБА России, Санкт-Петербург

² ООО НПФ Литех, Москва

³ НИИ физико-химической медицины ФМБА России, Москва

⁴ НИИ скорой помощи им. Джанелидзе, Санкт-Петербург

Susceptibility of Gramnegative Carbapenemase-Producing Bacteria to Various Group Antibiotics

V. A. AGEEVETS, I. V. PARTINA, E. S. LISITSINA, I. M. BATYRSHIN, L. N. POPENKO, S. A. SHLYAPNIKOV, E. N. ILYINA, S. V. SIDORENKO

Research Institute of Children's Infections, St. Petersburg

Litekh, Moscow

Research Institute of Physico-Chemical Medicine, Moscow

Dzhanelidze Research Institute of Emergent Medical Service, St. Petersburg

В исследование включено 25 изолятов грамотрицательных бактерий, продуцирующих карбапенемазы. 17 изолятов *Klebsiella pneumoniae* продуцировали карбапенемазу NDM-1 и проявляли высокий уровень устойчивости к цефалоспорином (МПК>128 мкг/мл), карбапенемам (МПК>16 мкг/мл), аминогликозидам и фторхинолонам, однако среди этих изолятов 4 сохраняли чувствительность к азтреонаму, и все они были чувствительны к тигециклину и полимиксину. Два изолята *Acinetobacter genomospecies* 13 продуцировали NDM-1, они были устойчивы ко всем беталактам и амикацину, но сохраняли чувствительность к гентамицину, ко-тримоксазолу, тигециклину и полимиксину, чувствительность к ципрофлоксацину была снижена. Карбапенемазу VIM-4 продуцировали два изолята *Enterobacter cloacae*, они демонстрировали высокий уровень устойчивости к цефалоспорином и азтреонаму, но при этом между цефепимом и клавуланатом проявлялся выраженный синергизм. Уровень устойчивости к карбапенемам у этих изолятов был невысоким (МПК 0,5—4,0 мкг/мл), они были также устойчивы к аминогликозидам и ципрофлоксацину, но чувствительны к тигециклину и полимиксину. Карбапенемазы KPC-2 были выявлены у двух изолятов *K.pneumoniae* и у одного изолята *E.cloacae*. Перечисленные изоляты были устойчивы ко всем беталактам, ципрофлоксацину, аминогликозидам и ко-тримоксазолу. Один изолят *E.cloacae* проявлял устойчивость к тигециклину, и один изолят *K.pneumoniae* — к полимиксину. У одного изолята *K.pneumoniae* была обнаружена карбапенемаза OXA-48, он был устойчив ко всем беталактам, ципрофлоксацину, ко-тримоксазолу, но чувствителен к аминогликозидам, тигециклину и полимиксину.

Ключевые слова: карбапенемазы, продуценты, грамотрицательные бактерии, антибиотикограммы.

The study involved 25 isolates of gramnegative carbapenemase-producing bacteria. 17 isolates of *Klebsiella pneumonia* produced carbapenemase NDM-1 and were highly resistant to cephalosporins (MIC>128 mcg/ml), carbapenems (MIC>16 mcg/ml), aminoglycosides and fluoroquinolones, while among them 4 isolates preserved susceptibility to aztreonam and all of them were susceptible to tigecycline and polymyxin. 2 isolates of *Acinetobacter genomospecies* 13 produced NDM-1 and were resistant to all the beta-lactams and amikacin, while preserved susceptibility to gentamicin, co-trimoxazole, tigecycline and polymyxin, the susceptibility to ciprofloxacin being lowered. Carbapenemase VIM-4 was produced by 2 isolates of *Enterobacter cloacae*, which were highly resistant to cephalosporins and aztreonam, significant synergism being observed between cefepim and clavulanate. The resistance of the isolates to carbapenems was low (MIC 0.5—4.0 mcg/ml), they also being resistant to aminoglycosides and ciprofloxacin and susceptible to tigecycline and polymyxin. Carbapenemases KPC-2 were detected in 2 isolates of *K.pneumoniae* and in 1 isolate of *E.cloacae*. The above isolates were resistant to all the beta-lactams, ciprofloxacin, aminoglycosides and co-trimoxazole. 1 isolate of *E.cloacae* showed resistance to tigecycline and 1 isolate of *K.pneumoniae* was resistant to polymyxin. Carbapenemase OXA-48 was detected in 1 isolate of *K.pneumoniae*. It was resistant to all the beta-lactams, ciprofloxacin and co-trimoxazole and susceptible to aminoglycosides, tigecycline and polymyxin.

Key words: carbapenemases, producers, gramnegative bacteria, antibioticograms.

В течение более 30 лет карбапенемы составляли основу этиотропной терапии тяжёлых инфек-

ций, вызванных грамотрицательными бактериями, устойчивыми к антибиотикам других групп. Однако в последние годы наблюдается быстрое распространение резистентности и к этим антибиотикам. Резистентность к карбапенемам может быть обусловлена несколькими механизмами, но

© Коллектив авторов, 2013

Адрес для корреспонденции: 197022, Санкт-Петербург, ул. Профессора Попова, д.9. НИИ детских инфекций

основную угрозу представляют ферменты карбапенемазы [1], гены которых локализованы на различных подвижных генетических элементах, что определяет их способность к быстрому внутри- и межвидовому распространению.

Первоначально карбапенемазы выявляли преимущественно среди штаммов *Pseudomonas aeruginosa*, но в настоящее время они быстро распространяются среди других грамотрицательных бактерий, прежде всего среди представителей семейства Enterobacteriaceae.

Между географическими регионами наблюдаются различия в распространении отдельных карбапенемаз, но в целом наибольшее значение имеют следующие: КРС-тип (молекулярный класс А), группа ферментов ОХА-типа (молекулярный класс D) и обширная группа ферментов молекулярного класса В (IMP-тип, VIM-тип, SPM-тип и GIM-тип, SIM-тип, AIM-тип). К классу В также относится необычайно быстро распространяющаяся и эволюционирующая группа ферментов NDM-типа [2].

Целью работы явилось определение чувствительности грамотрицательных бактерий, продуцирующих карбапенемазы, к антибиотикам различных групп.

Материал и методы

В исследование были включены грамотрицательные бактерии, продуцирующие карбапенемазы различных групп, выделенные в стационарах Санкт-Петербурга в 2011—2013 гг. Определение чувствительности к антимикробным препаратам проводили методом серийных микроразведений в бульоне Мюллера-Хинтона (BD, США) согласно рекомендациям CLSI [3] в 96-луночных планшетах для иммунологических исследований. МПК определяли для следующих антибиотиков: цефотаксим (CTX), цефепим (FEP), цефтазидим (CAZ), гентамицин (GEN), амикацин (AN), имипенем (IMP), дорипенем (DOR), меропенем (MEM), ко-тримоксазол (SXT), тигециклин (TGC), полимиксин (PB), азтреонам (AZT), ципрофлоксацин (CIP), цефепим/клавуланат (FEP/CL), цефтазидим/клавуланат (CAZ/CL), цефоперазон/сульбактам (CFP/SU).

Для приготовления рабочих растворов антибиотиков использовали субстанции антибактериальных препаратов с известной активностью (Sigma Aldrich). Микропланшеты с внесённым туда бульоном Мюллера-Хинтона и 2-кратными разведениями антибиотиков сохранялись до использования при -80°C. Перед тестированием культур микропланшеты однократно размораживались.

Постановка МПК проводилась микрометодом при величине конечного объёма 0,2 мл. Постановка каждой новой серии планшетов сопровождалась тремя контролями: контроль пригодности используемых антибактериальных препаратов со штаммом *E.coli* ATCC 25922, контроль роста тестируемых штаммов и контроль стерильности используемого субстрата (бульона Мюллера-Хинтона). Для интерпретации результатов оценки чувствительности использовали критерии CLSI [3] и EUCAST [4].

Результаты исследований

Результаты оценки антибиотикочувствительности продуцентов карбапенемаз представлены в таблице. Изоляты *K.pneumoniae*, продуцирующие

NDM-1 проявляли высокий уровень устойчивости к подавляющему большинству бета-лактамов антибиотиков. МПК цефотаксима, цефепима, комбинаций этих антибиотиков с клавулановой кислотой, а также цефоперазона/сульбактама были равны или превышали 128 мкг/мл, МПК карбапенемов были равны или превышали 16,0 мкг/мл. Определённые различия были выявлены лишь по уровню чувствительности к азтреонаму. Четыре изолята проявляли чувствительность, а 13 — устойчивость. Известно, что азтреонам устойчив к гидролизу многими карбапенемазами, в том числе и NDM-1. Появление у части изолятов устойчивости к этому антибиотику, вероятно, связано с приобретением ими генов бета-лактамаз расширенного спектра. Все *K.pneumoniae*, продуцирующие NDM-1, были также высокоустойчивы к ципрофлоксацину, аминогликозидам и ко-тримоксазолу, но сохраняли чувствительность к тигециклину и полимиксину.

Продукция карбапенемаз NDM-1 была также выявлена у двух изолятов *Acinetobacter genomospecies* 13. Эти изоляты были высокоустойчивы к цефалоспорином (МПК > 64,0 мкг/мл) и карбапенемам (МПК > 16,0 мкг/мл), демонстрировали умеренное снижение чувствительности к ципрофлоксацину, в то же время они сохраняли чувствительность к аминогликозидам, ко-тримоксазолу, полимиксину и тигециклину.

Два изолята *Enterobacter cloacae*, продуцирующие карбапенемазы VIM-4, демонстрировали высокий уровень устойчивости к цефалоспорином и азтреонаму (МПК > 64,0 мкг/мл) и невысокий уровень устойчивости к карбапенемам (МПК 0,5—4,0 мкг/мл). Оба изолята демонстрировали синергизм цефепима и клавулановой кислоты (снижение МПК более чем в 4 раза), при отсутствии синергизма цефтазидима с клавулановой кислотой. Наиболее вероятным объяснением такого фенотипа может быть наличие у изолята бета-лактамаз расширенного спектра класса А, а также бета-лактамаз класса С (плазмидных либо хромосомных гиперпродуцентов). Оба изолята были также высокоустойчивы к ципрофлоксацину и аминогликозидам, демонстрировали незначительное снижение чувствительности к ко-тримоксазолу, но сохраняли чувствительность к полимиксину и тигециклину.

Карбапенемазы КРС-2 продуцировали два изолята *K.pneumoniae* и один — *E.cloacae*. Изоляты *K.pneumoniae*, продуцирующие КРС-2, были высокоустойчивы ко всем бета-лактамам, ципрофлоксацину и ко-тримоксазолу, но несколько различались по другим признакам. Одни изолят был устойчив к полимиксину и гентамицину, а другой сохранял чувствительность к этим антибиотикам. Оба изолята были чувствительны к тигециклину и амикацину. Изолят *E.cloacae* прояв-

лял устойчивость к цефалоспорином и карбапенемам, ципрофлоксацину, ко-тримоксазолу и гентамицину, а также к тигециклину, но сохранял чувствительность к полимиксину и амикацину.

Изолят *K.pneumoniae*, продуцирующий карбапенемазу ОХА-48, был высокоустойчив ко всем беталактам, ципрофлоксацину и ко-тримоксазолу, но сохранял чувствительность к аминогликозидам, тигециклину и полимиксину.

Обсуждение результатов

Лечение инфекций, вызванных грамотрицательными бактериями, продуцирующими карбапенемазы, относится к наиболее сложным проблемам антибактериальной химиотерапии, прежде всего, из-за недостатка данных и, как следствие, отсутствия общепринятых рекомендаций. В недавнем обзоре, посвящённом *K.pneumoniae*, продуцирующим карбапенемазы, авторам удалось собрать данные лишь о 301 случае лечения соответствующих инфекций, причём более половины случаев приходилось на продуценты КРС [5]. Применявшиеся режимы были крайне разнообразны, в виде монотерапии и в виде различных комбинаций использовали карбапенемы, колистин, тигециклин и аминогликозиды. Именно к перечисленным препаратам продуценты карбапенемаз могут сохранять чувствительность либо демонстрировать невысокий уровень устойчивости. В приведённом выше обзоре было показано, что карбапенемы сохраняют клиническую эффективность при МПК, равной 8,0 мкг/мл и ниже. Это значение совпадает с критериями EUCAST (ус-

МПК антибиотиков основных групп в отношении грамотрицательных бактерий, продуцирующих различные карбапенемазы

№ штамма	Фермент	Вид микроорганизма	МПК антибиотиков (в мкг/мл) и критерии чувствительности (S≤/R≥)													
			CTX	FER	FER/CL	CAZ	CAZ/CL	AZT	CIP/SU	IMP	MEM	DOR	CIP	GEN	AN	SXT
55	NDM-1	Kpn	>256	128	>128	>128	>128	0,12	>128	32	>16	>16	>256	>128	>256	>32
57	NDM-1	Kpn	>256	>128	>128	>128	>128	0,25	>128	>64	>16	>16	>256	>128	>256	>32
59	NDM-1	Kpn	>256	128	>128	>128	>128	0,12	>128	64	>16	>16	>256	>128	>256	>32
83	NDM-1	Kpn	>256	128	>128	>128	>128	0,25	>128	>64	>16	>16	>256	>128	>256	>32
28	NDM-1	Kpn	>256	128	>128	>128	>128	>64	>128	32	16	>16	>256	>128	>256	>32
49	NDM-1	Kpn	>256	128	>128	>128	>128	>64	>128	32	>16	>16	>256	>128	>256	>32
54	NDM-1	Kpn	>256	>128	>128	>128	>128	>64	>128	32	>16	>16	>256	>128	>256	>32
82	NDM-1	Kpn	>256	128	>128	>128	>128	>64	>128	32	>16	>16	>256	>128	>256	>32
107	NDM-1	Kpn	>256	128	>128	>128	>128	>64	>128	32	>16	>16	>256	>128	>256	>32
112	NDM-1	Kpn	>256	>128	>128	>128	>128	>64	>128	>64	>16	>16	>256	>128	>256	>32
409	NDM-1	Kpn	>256	128	>128	>128	>128	>64	>128	32	>16	>16	>256	>128	>256	>32
410	NDM-1	Kpn	>256	128	>128	>128	>128	>64	>128	32	16	>16	>256	>128	>256	>32
416	NDM-1	Kpn	>256	128	>128	>128	>128	>64	>128	32	>16	>16	>256	>128	>256	>32
456	NDM-1	Kpn	>256	128	>128	>128	>128	>64	>128	32	>16	>16	>256	>128	>256	>32
458	NDM-1	Kpn	>256	128	>128	>128	>128	>64	>128	32	>16	>16	>256	>128	>256	>32
524	NDM-1	Kpn	>256	>128	>128	>128	>128	>64	>128	>64	>16	>16	>256	>128	>256	>32
552	NDM-1	Kpn	>256	>128	>128	>128	>128	>64	>128	32	>16	>16	>256	>128	>256	>32
N152	NDM-1	Ac.gsl3	>256	>128	>128	>128	>128	>64	>128	>64	>16	>16	2	0,5	16	0,5
N199	NDM-1	Ac.gsl3	>128	>128	64	>128	64	>64	>128	>16	>16	>16	0,5	1,0	16	1
31	VIM-4	Ecl	>256	>128	8	>128	>128	>64	>128	4	1	4	>256	>128	>256	8
34	VIM-4	Ecl	>256	128	8	>128	>128	>64	>128	2	0,5	2	>256	>128	>256	2
565	KPC-2	Kpn	>256	>128	>128	>128	>128	>64	>128	>64	>16	>16	>256	128	1	>32
570	KPC-2	Kpn	>256	>128	>128	>128	>128	>64	>128	>64	>16	>16	>256	0,5	16	32
566	KPC-2	Ecl	>256	>128	>128	128	128	>64	>128	16	8	>16	>256	64	1	>32
485	OXA-48	Kpn	>256	>128	>128	>128	128	>64	128	8	>16	>16	>256	0,12	2	>32

Примечание. ¹ — критерии CLSI отсутствуют, использованы критерии EUCAST; ² — критерии CLSI отсутствуют, использованы критерии EUCAST для колистин; Kpn — *K.pneumoniae*; Ac. gsl3 — *Acinetobacter genotomoreses* 13; Ecl — *E.coliaceae*.

стойчивыми к имипенему и меропенему считаются изоляты при МПК > 8 мкг/мл), но выше критерия CLSI (устойчивыми к имипенему, меропенему и дорипенему считаются изоляты при МПК > 4,0 мкг/мл).

Известно, что уровень и спектр ассоциированной резистентности у продуцентов различных карбапенемаз может существенно различаться. Среди бактерий-продуцентов, выделенных в Санкт-Петербурге, наибольшей устойчивостью характеризовались *K. pneumoniae*, продуцирующие металло-бета-лактамазы NDM-1. Они проявляли высокий уровень устойчивости ко всем антибиотикам, кроме полимиксина и тигециклина. Важно отметить высокий уровень устойчивости к карбапенемам (МПК > 16,0 мкг/мл), что не позволяет рассчитывать на эффективность этих антибиотиков даже при применении в максимальных дозах. Определённый интерес представляет то, что некоторая часть изолятов сохраняла чувствительность к азтреонаму. Этот антибиотик может быть использован для лечения в случае подтверждения чувствительности возбудителя, но не для эмпирической терапии.

Другие продуценты карбапенемаз демонстрировали несколько более широкий спектр чувствительности к антибиотикам. Так, *Acinetobacter genospecies* 13 в дополнение к полимиксину и тигециклину сохранял чувствительность к аминогликозидам и ко-тримоксазолу, а также демонстрировали невысокий уровень устойчивости к цiproфлоксацину. Продуценты металло-бета-лактамазы VIM-4 проявляли невысокий уровень устойчивости к карбапенемам (МПК > 8,0 мкг/мл), что позволяет рассчитывать на определённую эффективность этих антибиотиков. Продуценты KPC-2 и OXA-48 частично сохраняли чувствительность к аминогликозидам. В отношении одного изолята, продуцирующего KPC-2, умеренную активность сохранял меропенем.

ЛИТЕРАТУРА

1. Nordmann P., Naas T., Poirel L. Global spread of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. Emerg Infect Dis 2011; 17: 1791–1798.
2. Johnson A. P., Woodford N. Global spread of antibiotic resistance: the example of New Delhi metallo-beta-lactamase (NDM)-mediated carbapenem resistance. J Med Microbiol 2013; 62: 499–513.
3. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standard for antimicrobial susceptibility testing. Nineteenth Informational Supplement Document M100-S22. CLSI, Wayne, PA. 2012.
4. The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 3.0, 2013. <http://www.eucast.org>.
5. Tzouveleki L. S., Markogiannakis A., Psichogiou M., Tassios P. T., Daikos G. L. Carbapenemases in *Klebsiella pneumoniae* and other Enterobacteriaceae: an evolving crisis of global dimensions. Clin Microbiol Rev 2012; 25: 682–707.
6. Biswas S., Brunel J. M., Dubus J. C., Reynaud-Gaubert M., Rolain J. M. Colistin: an update on the antibiotic of the 21st century. Expert Rev Anti Infect Ther 2012; 10: 917–934.
7. Stein G. E., Babinchak T. Tigecycline: an update. Diagn Microbiol Infect Dis 2013; 75: 331–336.

В целом следует отметить, что наибольшую чувствительность продуценты карбапенемаз проявляли к полимиксину и тигециклину. Однако место этих антибиотиков в лечении тяжёлых инфекций, прежде всего вызванных продуцентами карбапенемаз, окончательно не определено. Так, к полимиксину проявляют природную устойчивость такие важные возбудители нозокомиальных инфекций, как *Proteus mirabilis*, *Serratia marcescens* и *Morganella morganii*. Серьёзной проблемой для этого антибиотика является нефротоксичность. Обсуждается вопрос о целесообразности применения полимиксина в комбинации с другими антибиотиками (карбапенемами, тетрациклинами и рифампином) [6].

Для тигециклина также характерны некоторые ограничения в спектре действия (природная устойчивость *Pseudomonas aeruginosa* и *Proteus*), однако профиль безопасности намного более благоприятный, чем у полимиксина. Официально применение тигециклина разрешено при инфекциях кожи и мягких тканей, интраабдоминальных инфекциях и внебольничной пневмонии. Однако в настоящее время проводятся многочисленные исследования по применению этого антибиотика при госпитальной пневмонии, в том числе и связанной с искусственной вентиляцией лёгких, инфекциях мочевыводящих путей, сепсисе, вызванном множественноустойчивыми бактериями [7].

В тех учреждениях, где карбапенемазы стали реальностью, целесообразно рассмотреть вопрос о включении тигециклина и, возможно, полимиксина в схемы эмпирической терапии тяжёлых инфекций у отдельных групп пациентов. Не исключено, что более широкое применение тигециклина несколько снизит селективный прессинг карбапенемов и приведёт к сдерживаю распространения карбапенемаз.

Антимикробные свойства антисептической композиции пролонгированного действия

Г. К. ПАЛИЙ, А. А. НАЗАРЧУК, Д. В. ПАЛИЙ, Г. Г. НАЗАРЧУК,
О. О. ГОНЧАР, В. В. СУХЛЯК, Ю. Ю. ТРОФИМЕНКО, Н. В. ЗАДЕРЕЙ, О. К. СТУКАН

Винницкий национальный медицинский университет им. Н. И. Пирогова, Винница, Украина

Antimicrobial Properties of Antiseptic Composite with Prolonged Action

G. K. PALY, A. A. NAZARCHUK, D. V. PALY, G. G. NAZARCHUK, O. O. GONCHAR,
V. V. SUKHYLYAK, YU. YU. TROFIMENKO, N. V. ZADEREI, O. K. STUKAN

N. I. Pirogov Vinnitsa National Medical University, Vinnitsa, Ukraine

Исследованы антимикробные свойства антисептической композиции на основе декаметоксина и модифицированных полисахаридов (карбоксиметилкрахмал, оксиэтилцеллюлоза). Показано, что антисептическая композиция обладает высокими противомикробными свойствами в отношении грамположительных и грамотрицательных бактерий в разных условиях опытов.

Ключевые слова: антисептики, декаметоксин, карбоксиметилкрахмал, оксиэтилцеллюлоза, антимикробные свойства.

Antimicrobial properties of a composite based on decamethoxine and modified polysaccharides (carboxymethylamyllum, oxyethylcellulose) were studied. The composite was shown to have high antimicrobial activity against grampositive and gramnegative bacteria under different conditions of the experiment.

Key words: antiseptics, decamethoxine, carboxymethylamyllum, oxyethylcellulose, antimicrobial properties.

Введение

Хирургическая инфекция кожи и мягких тканей занимает ведущие позиции в общей структуре хирургической заболеваемости во всём мире и достигает 70%. Ежегодно регистрируют около 5 млн больных гнойно-воспалительными заболеваниями. Данные отчётов национальной системы наблюдения за нозокомиальными инфекциями (CDC's National Nosocomial Infections Surveillance (NNIS), США) свидетельствуют о том, что инфекционные осложнения после хирургических вмешательств занимают третье место среди наиболее регистрируемых инфекций и составляют 14–16% всех нозокомиальных инфекций среди госпитализированных пациентов [1–4].

Благодаря современной антибактериальной терапии, внедрению эффективных методов хирургической обработки гнойного очага, удалось улучшить использование современных противомикробных материалов. В условиях высокого уровня антибиотикорезистентности клинических штаммов микроорганизмов лечение гнойно-воспалительных заболеваний кожи и мягких

тканей представляет собой сложный, длительный процесс [5].

На местном уровне чрезвычайно важная роль в профилактике инфекционных осложнений ран принадлежит эффективным, оказывающим пролонгированное действие антимикробным материалам. Среди множества разных методов профилактики и лечения раневой инфекции огромное внимание уделяют применению современных раневых покрытий на основе антисептиков [6].

В качестве носителей для антисептиков используют различные материалы (полиметилметакрилат, коллаген, гидроксиапатит, сульфат кальция, полиангидрид и т. д.). Технология разработки антимикробных материалов предусматривает использование антисептических препаратов; их композиций с биополимерами разной химической природы [8]. Преимущественно для этого используют альгинаты, поливиниловый спирт, различные полисахариды. Идеальной композиции, которая обеспечивала бы длительную дозированную десорбцию антисептика в очаг инфекционного воспаления, не существует. Поиск такой композиции возможен при использовании в модели «антисептик-закрепитель» веществ, неспособных во время физико-химического взаимодействия изме-

© Коллектив авторов, 2013

Адрес для корреспонденции: g_paliy@ukr.net

нять химическую структуру друг друга, быстро разрушаться в растворах в присутствии белков плазмы крови и при изменении pH среды [6–8]. Оригинальная антимикробная композиция с декаметоксином и биodeградируемыми модифицированными полисахаридами карбоксиметилкрахмалом, оксиэтилцеллюлозой (патент UA №74853 от 12.11.2012 года) восполняет этот пробел в определённой степени [9].

Цель исследования — определить противомикробные свойства антисептической композиции пролонгированного действия в различных условиях опытов.

Материал и методы

Декаметоксин (ДКМ) является оригинальным антисептическим лекарственным препаратом, получение, исследование которого проведено в СССР [10, 11]. Доказано, что ДКМ обладает антибактериальным, противовирусным, фунгицидным действием, повышает чувствительность резистентных вариантов бактерий к антибиотикам, что открывает хорошую перспективу для профилактики и лечения инфекционных заболеваний.

ДКМ прошел 13.04.2012 г. государственную регистрацию в Украине. Министерство здравоохранения (МЗ) Украины выдало регистрационное удостоверение на лекарственное средство Декаметоксин (субстанция), которое утверждено приказом МЗ Украины 13.04.2012 г., №264. Синтез субстанции декаметоксина осуществляет Общество с ограниченной ответственностью «Фармхим» (Украина).

Существенные результаты получены при исследовании закономерности и механизма формирования устойчивости к ДКМ у микроорганизмов. Отмечено, что ДКМ не оказывает отрицательного воздействия на иммунную систему макроорганизма, обладает десенсибилизирующим действием, замедляет развитие анафилактического шока. Установлено, что у ДКМ отсутствует мутагенное действие. ДКМ обладает выраженным профилактическим, лечебным действием в различных лекарственных формах (таблетки, глазные капли, мази, суппозитории, растворы).

Таблица 1. Характеристика антимикробной активности препаратов при различном значении pH питательной среды

Микроорганизмы	рН питательной среды					
	6,0	7,2*	8,0	6,0	7,2*	8,0
	декаметоксин (0,1%)			антисептическая композиция		
	МБсК**, мкг/мл (M±m)					
<i>S.aureus</i> (n=131)	0,54±0,36	0,74±0,50	1,55±0,93	0,44±0,39	0,56±0,44	0,95±0,56
<i>p</i>	<0,01	—	<0,01	<0,01	—	<0,01
<i>E.coli</i> (n=123)	1,83±1,23	2,70±1,74	4,72±2,51	1,38±0,79	2,32±1,47	4,06±2,45
<i>p</i>	<0,01	—	<0,01	<0,01	—	<0,01
<i>K.pneumoniae</i> (n=20)	5,95±3,07	7,02±2,71	12,09±3,98	4,00±1,48	6,34±2,09	8,97±3,60
<i>p</i>	<0,05	—	<0,05	<0,05	—	<0,05
<i>P.aeruginosa</i> (n=20)	32,0±17,18	40,63±14,69	84,38±30,59	19,51±6,95	21,08±7,66	32,03±11,87
<i>p</i>	<0,05	—	<0,05	<0,05	—	<0,05
	МБцК***, мкг/мл (M±m)					
<i>S.aureus</i> (n=131)	1,14±0,82	1,50±1,01	3,12±1,66	0,82±0,57	1,10±0,86	1,97±1,04
<i>p</i>	<0,01	—	<0,01	<0,01	—	<0,01
<i>E.coli</i> (n=123)	3,65±2,86	4,88±2,85	9,64±5,39	3,10±2,82	4,45±2,07	7,93±3,83
<i>p</i>	<0,01	—	<0,01	<0,01	—	<0,01
<i>K.pneumoniae</i> (n=20)	11,3±3,98	16,39±5,62	29,68±13,32	9,75±3,47	15,99±7,38	19,12±7,39
<i>p</i>	<0,05	—	<0,05	<0,05	—	<0,05
<i>P.aeruginosa</i> (n=20)	74,9±25,66	84,38±30,59	144,7±83,85	21,08±7,66	35,94±11,45	62,05±0
<i>p</i>	<0,05	—	<0,05	<0,05	—	<0,05

Примечание. * — контроль; **МБсК — минимальная бактериостатическая концентрация; ***МБцК — минимальная бактерицидная концентрация; p — в сравнении с контролем.

В исследовании использовали водный раствор декаметоксина (ДКМ) 0,1%, композицию (КП) на основе декаметоксина с карбоксиметилкрахмалом (КМК), оксиэтилцеллюлозой (ОЭЦ) и поливинилацетатной дисперсией, состав которой приводим ниже. Антисептическую композицию (КП) готовили следующим образом. В ёмкости с мешалкой при температуре 20–30°C смешивали последовательно полимерные компоненты (натриевая соль карбоксиметилкрахмала — 0,9 мас.%; водный раствор оксиэтилцеллюлозы — 0,4 мас.%; поливинилацетатная дисперсия 0,2 мас.%), декаметоксин 0,1 мас.% согласно рецептуре. Композиция представляет собой антисептический раствор, обладающий способностью к плёнокообразованию на поверхности текстильных материалов [9].

Изучение антимикробной активности разработанного состава полимерной композиции проводили по основным показателям, имеющим значение для придания материалам пролонгированного антимикробного действия. Нами проводилось сравнительное изучение бактериостатической и бактерицидной активности антисептической композиции. При этом определяли минимальную бактериостатическую (МБсК) и минимальную бактерицидную (МБцК) концентрации КП по общепринятой методике [3].

Антимикробное действие препаратов изучали на *Staphylococcus aureus* ATCC 25923; клинических штаммах *S.aureus* (n=130), *Echerichia coli* (n=123), *Pseudomonas aeruginosa* (n=20), *Klebsiella pneumoniae* (n=20), которые имели типичные тинкториальные, морфологические, культуральные, биохимические свойства. Противомикробную активность ДКМ, антисептической КП изучали по общепринятой методике в различных опытах (питательная среда с pH 6,0–8,0; питательные среды, содержащие 5%; 10% сыворотки крови; концентрации микробов: lg3 КОЕ/мл, lg6 КОЕ/мл, lg9 КОЕ/мл) [3]. Статистическую обработку полученных данных проводили с помощью программ Microsoft Excel 2007 и «Med Stat» [12].

Результаты и обсуждение

Проведённые исследования показали, что КП проявляла антимикробные свойства. Установлено низкие значения бактериостатических и бактерицидных концентраций исследуемой антисептической КП в отношении *S.aureus*, *E.coli*,

Таблица 2. Характеристика антимикробной активности препаратов при различных значениях количества белков плазмы крови в питательной среде

Микроорганизмы	% состав белка плазмы крови в питательной среде					
	0*	5	10	0*	5	10
	декаметоксин (0,1%)			антисептическая композиция		
МБсК, мкг/мл (<i>M</i> ± <i>m</i>)						
<i>S.aureus</i> (<i>n</i> =131)	0,74±0,50	0,46±0	2,77±1,89	0,56±0,44	1,01±0,70	2,08±1,43
<i>p</i>	—	<0,01	<0,01	—	<0,01	<0,01
<i>E.coli</i> (<i>n</i> =123)	2,70±1,74	5,22±2,93	9,29±4,25	2,32±1,47	4,41±2,57	7,74±3,16
<i>p</i>	—	<0,01	<0,01	—	<0,01	<0,01
<i>K.pneumoniae</i> (<i>n</i> =20)	7,02±2,71	15,61±8,79	28,51±16,68	6,34±2,09	12,68±6,06	21,47±9,45
<i>p</i>	—	<0,05	<0,05	—	<0,05	<0,05
<i>P.aeruginosa</i> (<i>n</i> =20)	40,63±14,69	65,62±22,42	118,25±19,24	21,08±7,66	34,38±9,62	62,50±0
<i>p</i>	—	<0,05	<0,05	—	<0,05	<0,05
МБцК, мкг/мл (<i>M</i> ± <i>m</i>)						
<i>S.aureus</i> (<i>n</i> =131)	1,50±1,01	2,83±1,95	4,86±3,02	1,10±0,86	2,02±1,12	3,85±1,97
<i>p</i>	—	<0,01	<0,01	—	<0,01	<0,01
<i>E.coli</i> (<i>n</i> =123)	4,88±2,85	9,89±5,69	18,56±13,05	4,45±2,07	9,23±5,10	15,89±7,67
<i>p</i>	—	<0,01	<0,01	—	<0,01	<0,01
<i>K.pneumoniae</i> (<i>n</i> =20)	16,39±5,62	32,03±14,77	49,22±17,02	15,99±7,38	28,90±5,73	48,44±18,21
<i>p</i>	—	<0,05	<0,05	—	<0,05	<0,05
<i>P.aeruginosa</i> (<i>n</i> =20)	84,38±30,59	150,0±62,75	212,50±58,77	35,94±11,45	71,88±22,90	112,50±25,65
<i>p</i>	—	<0,05	<0,05	—	<0,05	<0,05

Примечание. * — контроль (питательная среда без белков плазмы крови); p — по сравнению с контролем.

Таблица 3. Антимикробная активность антисептических препаратов в условиях изменения концентрации КОЕ

Микроорганизмы	Концентрация КОЕ в питательной среде, КОЕ/мл					
	10 ³	10 ^{6*}	10 ⁹	10 ³	10 ^{6*}	10 ⁹
	декаметоксин (0,1%)			антимикробная композиция		
МБсК, мкг/мл (<i>M±m</i>)						
<i>S.aureus</i> (n=131)	0,39±0,23	0,74±0,50	1,55±0,91	0,27±0,18	0,56±0,44	0,98±0,67
<i>p</i>	<0,01	—	<0,01	<0,01	—	<0,01
<i>E.coli</i> (n=123)	0,78±0,99	2,70±1,74	4,84±2,43	1,43±0,77	2,32±1,47	4,14±2,42
<i>p</i>	<0,01	—	<0,01	<0,01	—	<0,01
<i>K.pneumoniae</i> (n=20)	5,17±2,03	7,02±2,71	12,09±3,98	3,90±1,10	6,34±2,09	9,17±3,41
<i>p</i>	<0,05	—	<0,05	<0,05	—	<0,05
<i>P.aeruginosa</i> (n=20)	28,90±5,73	40,63±14,69	137,50±38,47	17,17±4,82	21,08±7,66	34,38± 9,62
<i>p</i>	<0,05	—	<0,05	<0,05	—	<0,05
МБцК, мкг/мл (<i>M±m</i>)						
<i>S.aureus</i> (n=131)	0,78±0,46	1,50±1,01	3,13±1,81	0,53±0,39	1,10±0,86	2,05±1,33
<i>p</i>	<0,01	—	<0,01	<0,01	—	<0,01
<i>E.coli</i> (n=123)	3,08±1,50	4,88±2,85	10,12±5,65	2,53±0,96	4,45±2,07	8,09±3,91
<i>p</i>	<0,01	—	<0,01	<0,01	—	<0,01
<i>K.pneumoniae</i> (n=20)	9,75±4,47	16,39±5,62	28,90±13,68	8,97±2,86	15,99±7,38	21,86±7,87
<i>p</i>	<0,05	—	<0,05	<0,05	—	<0,05
<i>P.aeruginosa</i> (n=20)	45,31±15,95	84,38±30,59	231,25±45,79	22,64±7,99	35,94±11,45	68,75±19,24
<i>p</i>	<0,05	—	<0,05	<0,05	—	<0,05

Примечание. * — контроль; p — по сравнению с контролем.

K.pneumoniae, *P.aeruginosa*. Полученные результаты иллюстрирует табл. 1—3.

В исследовании определили достаточно стойкую и маловариабельную антимикробную активность КП в питательной среде с разными значениями концентрации водородных ионов. Так, в диапазоне pH питательной среды от слабокислой до слабощелочной (6,0—8,0) установили высокое противомикробное действие исследуемой КП (МБсК 0,44±0,39 — 0,95±0,56 мкг/мл) на штаммы *S.aureus*. В щелочной среде (pH до 8,0) МБсК КП составляла 0,95±0,56 мкг/мл в отношении *S.aureus*, для сравнения отметим, что МБсК ДМК составил — 1,55±0,93 мкг/мл. Бактерицидная ак-

тивность КП (МБцК — 1,97±1,04 мкг/мл) в отношении резистентных штаммов *S.aureus* при pH питательной среды 8,0 не выходила за пределы терапевтического коридора ДКМ. В отношении грамотрицательных микроорганизмов антимикробное действие КП в щелочной среде также находилось на достаточно высоком уровне. В нейтральной (pH 7,2) и кислой среде (pH 6,0) мы отмечали потенцирование противомикробной активности КП в отношении штаммов *S.aureus* (МБцК — 1,10±0,86 мкг/мл; 0,82±0,57 мкг/мл). Высокое бактерицидное действие регистрировали в отношении штаммов *E.coli* (МБцК 3,10±2,82 мкг/мл). Выявлена чувствительность *K.pneumoni-*

ае к КП (МБцК $9,75 \pm 3,47$ мкг/мл). Сдвиг pH в кислую сторону улучшал также антисептическую активность КП по отношению к *P.aeruginosa* (МБцК $21,08 \pm 7,66$ мкг/мл). Отмечали потенцирование антипсевдомонадной активности КП в 2,3 раза по сравнению с ДКМ. Сохранение высокого противомикробного действия ДКМ в составе его КП в диапазоне pH 6,0—8,0 подтверждает химическую инертность антисептика и модифицированных полисахаридов (табл. 1).

Исследование противомикробной активности КП в условиях белковой защиты в питательной среде показало умеренное повышение минимальных бактериостатических, бактерицидных концентраций, которые не превышали терапевтического диапазона ДКМ (табл. 2).

Увеличение концентрации белков сыворотки крови в питательной среде от 5 до 10% вызывало несколько большее повышение МБсК ($0,46 \pm 0$ — $2,77 \pm 1,89$ мкг/мл) у ДКМ в отношении *S.aureus*, чем у КП (МБсК $1,01 \pm 0,70$ — $2,08 \pm 1,43$ мкг/мл;). Средние значения бактерицидных концентраций ДКМ (МБцК $2,83 \pm 1,95$ — $4,86 \pm 3,02$ мкг/мл) имели аналогичную тенденцию к некоторому повышению по сравнению с антисептической КП (МБцК $2,02 \pm 1,12$ — $3,85 \pm 1,97$) в отношении *S.aureus* не превышали $3,85 \pm 1,97$ мкг/мл. Присутствие КМК и ОЭЦ способствовало повышению противомикробной активности ДКМ в отношении штаммов *E.coli*, *K.pneumoniae*, *P.aeruginosa* в условиях белковой защиты 5—10%. Следует отметить достаточную чувствительность штаммов *E.coli*, *P.aeruginosa*, *K.pneumoniae* к КП и ДКМ, поскольку практически не изменялась их противомикробная активность при концентрации белков сыворотки крови в питательной среде до 5%. Тенденцию лишь к незначительному повышению наблюдали при увеличении концентрации белков до 10% в питательной среде. В присутствии КМК и ОЭЦ антимикробная активность ДКМ по отношению к грамотрицательным микроорганизмам изменялась незначительно при белковой защите в сравнении с 0,1% ДКМ и находились в пределах значений МБцК $15,89 \pm 7,67$ — $112,50 \pm 26,65$ мкг/мл (табл. 2).

Установлено, что КП проявляла высокие противомикробные свойствами в условиях изменений микробной нагрузки от $1 \cdot 10^3$ до $1 \cdot 10^9$ КОЕ/мл. По мере увеличения количества КОЕ в инокуляте уменьшалась чувствительность исследуемых штаммов микробов к ДКМ. Для КП доказана достаточно высокая антимикробная активность даже с увеличением $1 \cdot 10^9$ КОЕ/мл микроорганизмов в питательной среде. В исследовании при изменении концентрации КОЕ штаммов *S.aureus* (10^3 , 10^6 , 10^9 КОЕ/мл) определили выраженное постоянство бактериостатической (МБсК $0,27 \pm 0,18$ мкг/мл — $0,98 \pm 0,67$ мкг/мл) и

бактерицидной (МБцК $0,53 \pm 0,39$ мкг/мл — $2,05 \pm 1,33$ мкг/мл) активности КП. При этом для КП получили невысокие значения МБсК и МБцК в отношении устойчивых штаммов грамотрицательных микроорганизмов, за счёт потенцирования противомикробной активности ДКМ. Наблюдали существенное снижение бактерицидных (МБцК $4,45 \pm 2,07$ мкг/мл) концентраций ДКМ к штаммам эшерихий. В присутствии КП увеличение микробной нагрузки к 10^6 — 10^9 КОЕ/мл не вызывало снижения антимикробного действия в отношении клебсиелл (МБцК $21,86 \pm 7,85$ мкг/мл), практически не изменялась бактерицидная активность в экспериментах с *P.aeruginosa* (МБцК $22,64 \pm 7,99$ — $68,75 \pm 19,24$ мкг/мл) (табл. 3).

Важно отметить, что наличие в композиции таких компонентов КМК и ОЭЦ оказывало хороший эффект на противомикробную активность ДКМ, не уменьшая допустимых значений его бактерицидных концентраций в процессе увеличения микробной нагрузки в питательной среде, способствуя потенцированию его активности в 2—2,5 раза (см. табл. 3).

Выводы

1. Антисептический препарат декаметоксин в композиции с модифицированными полисахаридами карбоксиметилкрахмалом, оксиэтилцеллюлозой статистически достоверно обладает высокой противомикробной активностью по отношению к исследуемым штаммам микроорганизмов в различных условиях опытов.

2. Противомикробные свойства антисептической композиции в отношении клинических штаммов стафилококков, эшерихий, клебсиелл, псевдомонад не изменяются в щелочной среде (pH 8,0), повышаются в кислой среде (pH 6,0).

3. В составе антисептической композиции модифицированные полисахариды (КМК, ОЭЦ) потенцируют противомикробную активность декаметоксина в отношении *S.aureus*, *E.coli*, *K.pneumoniae*, *P.aeruginosa* в условиях содержания белков плазмы в питательной среде в концентрации 5 и 10%.

4. КП характеризуется высокими антимикробными свойствами в отношении штаммов грамположительных и грамотрицательных бактерий в условиях микробной нагрузки в питательной среде (10^3 КОЕ/мл, 10^6 КОЕ/мл, 10^9 КОЕ/мл).

5. Антисептическая композиция в условиях белковой защиты (5 или 10%), изменения pH и концентрации КОЕ/мл (10^3 — 10^9) обладает достаточной терапевтической эффективностью, необходимой для профилактики, лечения хирургической гнойной инфекции, вызванной штаммами патогенных и условно-патогенных микроорганизмов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Григорьев Е. Г., Коган А. С. Госпитальная инфекция в многопрофильной хирургической клинике. Новосибирск: Наука, 2003; 206.
2. Палий Г. К., Когет Т. О., Палий В. Г. и др. Антисептики в профилактике и лечении инфекций: монография. Киев: 1997; 201.
3. Медицинская микробиология, вирусология и иммунология: учебник для студ. высш. мед. уч. зав. / Под ред. В. П. Широбокова / Издание 2-е. Винница: Новая Книга, 2011; 952.
4. Волков А. О., Большакова Г. М. Микрофлора гнойных ран и современные подходы к использованию антисептиков в хирургической практике. *Annals of Mechnikov Institute* 2009; 2: 19—23 / URL. <http://www.imiamn.org/journal.htm>.
5. Афиногенов Г. Е., Тихилов Р. М., Афиногенова А. Г., Богданова Т. Я., Краснова М. В., Козлов И. В., Даровская Е. Н., Анисимова Л. О., Лебедева И. К., Петрова Т. М. Антимикробная биodeградируемая композиция на основе высокомолекулярного поливинилпирролидона для профилактики экспериментального остеомиелита. *Травматол ортопед России* 2010; 3: 57: 47—54.
6. Ефименко Н. А., Шин Ф. Е., Толстых М. П., Тепляшин А. С. Современные тенденции в создании биологически активных материалов для лечения гнойных ран. *Военно-мед журн* 2002; 1: 48—52.
7. Палий В. Г., Зарицкий А. М., Цвигун Б. Я. и др. Использование антимикробных композиций на основе декаметоксина для лечения заболеваний мочеполовой системы. *Biomed Bios Anthropol* 2005; 5: 107—111.
8. Олтаржевская Н. Д., Кричевский Г. Е. Лечебные текстильные материалы «Коллетекс» — эффективные многофункциональные депосистемы. *Химико-фарм журн* 2005; 39; 3: 42—50.
9. Назарчук А. А., Палий В. Г., Кулаков А. И. и др. Патент №74853. Украина. Композиция для придания медицинским текстильным материалам антимикробных свойств с пролонгированным действием. Заявлено 10.05.2012; опубликовано 12.11. 2012. *Бюл.* 2012; 21: 4.
10. Paliy G. K., Markovskij, Losinskij. Decamethoxin. *Handbuch der Antiseptik. Antiseptika*. Veb Verlag Vdk Gesundheit Berlin 1987; II: 3: 552—566.
11. Машковский М. Д. Лекарственные средства. 15-е изд. М.: 2007; 953.
12. Glanz S. *Medicobiologic statistics* М.: 1999; 459.

Сравнение антибактериальной активности ингаляционных форм препаратов тобрамицина

В. В. ПИСАРЕВ

Научно-производственный центр Пробиотек, Москва

Comparison of Antibacterial Activities of Tobramycin Inhalation Solutions

V. V. PISAREV

RPC Probiotech, Moscow

Проведена сравнительная оценка по спектру антибактериального действия лекарственных препаратов тобрамицина (растворы для ингаляций): Тобрамицин-Гобби производства «Гобби Новаг С.А.», Аргентина, Тоби — (раствор для ингаляций 60 мг/мл) производства «Кардинал Хелс Инк.», США. В работе были использованы 75 клинических изолятов микроорганизмов из коллекции Государственного научного центра по антибиотикам и эталонные штаммы *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853. Показано, что лекарственные формы тобрамицина, Тобрамицин-Гобби (раствор для ингаляций 60 мг/мл) производства «Гобби Новаг С.А.», Аргентина, и Тоби (раствор для ингаляций 60 мг/мл) производства «Кардинал Хелс Инк.», США, идентичны по спектру антибактериального действия.

Ключевые слова: лекарственные формы тобрамицина, антибактериальная активность

Antibacterial spectra of Tobramycin-Gobby (solution for inhalation 60 mg/ml, «GobbyNovag C.A.», Argentina) and Toby (solution for inhalation 60 mg/ml, «Cardinal Health Inc.», USA) were estimated comparatively. The estimation involved 75 clinical isolates of microorganisms from the Culture Collection of the National Research Centre of Antibiotics and standard strains of *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853. It was shown that Tobramycin-Gobby (solution for inhalation 60 mg/ml, «GobbyNovag C.A.», Argentina) and Toby (solution for inhalation 60 mg/ml, «Cardinal Health Inc.», USA) were identical by their antibacterial spectra.

Key words: tobramycin formulations, antibacterial activity.

Ингаляционные лекарственные формы антибиотиков незаменимы в лечении инфекций дыхательных путей, вызванных в первую очередь *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* [1].

При ингаляционном пути введения антибиотиков в высоких концентрациях доставляются непосредственно в участок поражения, что важно при лечении персистирующих инфекций. В то же время при применении ингаляционных форм снижается риск системной токсичности аминокликозидов. Среди таких антибиотиков наибольшее распространение получил ингаляционный тобрамицин для лечения инфекций дыхательных путей, вызванных *Pseudomonas aeruginosa* у больных муковисцидозом. Препарат блокирует 30S субъединицу рибосом и тормозит синтез белка (бактериостатическое действие). В более высоких концентрациях он нарушает функцию цитоплазматических мембран, вызывая гибель клетки. То-

брамицин высокоактивен в отношении грамотрицательных микроорганизмов: *Pseudomonas aeruginosa*, а также в отношении *Escherichia coli*, *Proteus* spp. (*Proteus mirabilis*, *Proteus vulgaris*, индолположительные и индолотрицательные штаммы), *Klebsiella* spp. (*Klebsiella pneumoniae*), *Serratia* spp., *Providencia* spp., *Enterobacter* spp. (*Enterobacter aerogenes*), *Shigella* spp., *Salmonella* spp., *Citrobacter* spp., *Haemophilus influenzae*, *Haemophilus aegyptius*, *Moraxella lacunata*, *Morganella morganii*, *Acinetobacter calcoaceticus* (*Herellea vaginacola*), некоторые виды *Neisseria* spp. (в том числе *Neisseria gonorrhoeae*).

Тобрамицин активен также в отношении грамположительных бактерий: *Staphylococcus* spp. (включая *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, в том числе штаммы, продуцирующие пенициллиназу, устойчивые к пенициллинам, цефалоспорином, коагулазоотрицательные и коагулазоположительные), *Streptococcus* spp. (в том числе бета-гемолитических штаммов из группы А, некоторых негемолитических штаммов, *Streptococcus pneumoniae*), *Enterococcus* spp.

© В. В. Писарев, 2013

Адрес для корреспонденции: 117105 Москва, ул. Нагатинская, д. За. Редакция журнала Антибиотики и химиотерапия

Безопасность и клиническая эффективность тобрамицина доказана в многочисленных мультицентровых исследованиях. Он достоверно снижает число обострений, улучшает респираторную функцию и уменьшает колонизацию *Pseudomonas aeruginosa* в группе больных, получавших препарат, по сравнению с контрольной группой [2]. Появление ингаляционных препаратов тобрамицина разных производителей требует сравнение их фармакологической активности. Поэтому целью данной работы явилась сравнительная оценка по спектру антибактериального действия лекарственных препаратов тобрамицина (растворы для ингаляций): Тобрамицин-Гобби производства «Гобби Новаг С.А.», Аргентина, и Тоби — (раствор для ингаляций 60 мг/мл) производства «Кардинал Хелс Инк», США.

Материал и методы

В работе были оценены показатели следующих образцов: испытуемого препарата — Тобрамицин-ГОББИ — раствор для ингаляций 60 мг/мл (300 мг/5 мл) производства «Гобби Новаг С.А.», Аргентина, серия № ТОВ003, годен до: 08.2011 и серия № ТОВ009, годен до: 11.2013, препарата сравнения — ТОБИ — раствор для ингаляций 60 мг/мл производства «Кардинал Хелс Инк.», США, серия № Х0023, годен до: 07.2011 и серия № Х0063D, годен до: 05.2014.

Для оценки спектра антибактериального действия препаратов определяли значения минимальной подавляющей рост микроорганизмов концентрации (МПК) микрометодом серийных двукратных разведений в бульоне Мюллера-Хинтон (BioMerieux S.A.). Исследования проводили в соответствии с рекомендациями [3].

В работе были использованы клинические штаммы микроорганизмов из коллекции Государственного научного центра по антибиотикам и эталонные штаммы *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853.

Эталонные штаммы использованы для определения контроля условий проводимого исследования. При исследовании чувствительности к антимикробным препаратам контрольных штаммов полученные значения МПК соответствовали стандартным значениям, что свидетельствовало о точности соблюдения условий постановки эксперимента. Результаты определения чувствительности клинических изолятов, полученные в этих условиях, были достоверными.

При соблюдении стандартных условий методики значения МПК эталонных штаммов не выходили за доверительные пределы, приведённые ниже:

- *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 (0,12—1,0) мкг/мл;
- *Escherichia coli* ATCC 25922 (0,25—1,0) мкг/мл;
- *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 (0,25—1,0) мкг/мл.

Для приготовления инокулята из изолированных колоний готовили суспензию по стандарту McFarland 0,5 в физиологическом растворе. Суспензию разводили в среде Mueller—Hinton Broth II до концентрации 10^5 КОЕ/мл. Приготовленную суспензию вносили по 50,0 мкл в лунки планшета (предварительно размороженные). Инокулированные планшеты инкубировали в течение 18 ч при 37°C. За МПК принимали наименьшую концентрацию антибиотика, при которой отсутствовал видимый рост микроорганизмов. В качестве контроля использовали референтные штаммы.

Результаты и обсуждение

Результаты сравнительной оценки антибактериальной активности испытуемых препаратов представлены в таблице.

Как видно из данных, приведённых в таблице, колебания в значениях МПК испытуемых препаратов в отношении эталонных штаммов не выходят за доверительные пределы.

Различия в значениях МПК сравниваемых препаратов не превышают 1—2 двукратных разведений, что соответствует ошибке опыта. Поэтому следует считать, что в отношении 75 клинических изолятов и 3 эталонных штаммов оба изучаемых препарата по спектру антибактериального действия и значениям МПК практически идентичны.

Согласно клиническим исследованиям, в мокроте при хроническом инфицировании дыхательных путей в большинстве случаев высевается *P.aeruginosa* [4]. В связи с этим в исследование было включено 15 штаммов *P.aeruginosa*, выделенных из клинического материала (трахеальный аспират, мокрота).

С учётом новых критериев (критерии MEN-SURA) [5] для определения чувствительности клинических изолятов к ингаляционному тобрамицину (в отношении *P.aeruginosa* считаются чувствительными, если МПК — 64 мкг/мл и устойчивыми, если МПК составляет более 128 мкг/мл) оба испытуемых препарата определены как эффективные в отношении 87% штаммов, использованных в исследовании. Следовательно, можно заключить, что лекарственные препараты тобрамицина: Тобрамицин-Гобби (раствор для ингаляций 60 мг/мл) производства «Гобби Новаг С.А.», Аргентина, и Тоби (раствор для ингаляций 60 мг/мл) производства «Кардинал Хелс Инк.», США, идентичны по спектру антибактериального действия.

Тобрамицин представляет собой катионную полярную молекулу, которая не сразу проходит через эпителиальные мембраны. Биологическая доступность тобрамицина может варьировать из-за индивидуальных различий в работе небулайзера и патологии дыхательных путей. Поэтому встречающиеся иногда в клинических условиях вариабельность в эффективности препаратов тобрамицина не следует относить к используемому лекарственному препарату, по крайней мере в отношении препаратов Тобрамицин-Гобби и Тоби. Причинами индивидуальной чувствительности пациентов к тому или иному препарату тобрамицина могут быть именно конструктивные особенности используемого небулайзера и доступности очага инфекции к антибактериальному веществу.

Спектр антибактериальной активности лекарственных форм тобрамицина — препаратов Тобрамицин Гобби и Тоби

Микроорганизмы	Минимальная подавляющая рост микроба концентрация (МПК), мкг/мл		Микроорганизмы	Минимальная подавляющая рост микроба концентрация (МПК), мкг/мл	
	Тобрами- цин- Гобби «Гобби Новаг С.А»	Тоби произво- дства «Карди- нал Хелс Инк»		Тобрами- цин- Гобби «Гобби Новаг С.А»	Тоби произво- дства «Карди- нал Хелс Инк»
Staphylococcus spp., чувствительные к метициллину			<i>Proteus vulgaris</i> 4	0,5	0,5
<i>S.aureus</i> ATCC 29213	0,5	1,0	<i>Proteus vulgaris</i> 73	0,25	0,25
<i>S.aureus</i> 0034	2,0	2,0	Enterobacter cloacae, Serratia marcescens, Citrobacter freundii		
<i>S.aureus</i> 00121	0,5	0,5	<i>Enterobacter cloacae</i> 1145	0,03	0,03
<i>S.aureus</i> 0022	0,004	0,004	<i>Enterobacter cloacae</i> 87	8,0	8,0
<i>S.aureus</i> 00123	0,25	0,25	<i>Enterobacter cloacae</i> 142	0,25	0,5
<i>S.aureus</i> 00141	0,25	0,12	<i>Enterobacter cloacae</i> 139	16,0	16,0
<i>S.aureus</i> 00132	0,008	0,008	<i>Enterobacter cloacae</i> 141	16,0	16,0
<i>S.epidermidis</i> 31-4	0,016	0,008	<i>Serratia marcescens</i> 121	4,0	4,0
<i>S.epidermidis</i> 32-20	0,03	0,03	<i>Serratia marcescens</i> 145	128,0	128,0
<i>S.epidermidis</i> 33-25	0,03	0,03	<i>Serratia marcescens</i> 1089	32,0	32,0
<i>S.epidermidis</i> 34-75	0,03	0,016	<i>Serratia marcescens</i> 1325	16,0	16,0
<i>S.epidermidis</i> 35-81	0,03	0,03	<i>Citrobacter freundii</i> 116	0,5	0,5
<i>S.epidermidis</i> 36-83	0,016	0,016	<i>Citrobacter freundii</i> 115	0,5	0,5
<i>S.epidermidis</i> 37-100	0,12	0,12	<i>Citrobacter freundii</i> 138	0,12	0,12
<i>S.epidermidis</i> 38-105	0,004	0,004	<i>Citrobacter freundii</i> 117	1,0	1,0
Escherichia coli			Acinetobacter baumannii		
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	1,0	0,5	<i>Acinetobacter baumannii</i> 000169	1,0	2,0
<i>Escherichia coli</i> L-102	4,0	4,0	<i>Acinetobacter baumannii</i> 000168	16,0	16,0
<i>Escherichia coli</i> L-80	0,5	0,5	<i>Acinetobacter baumannii</i> 000170	0,5	0,5
<i>Escherichia coli</i> L-6	16,0	16,0	<i>Acinetobacter baumannii</i> 000171	32,0	32,0
<i>Escherichia coli</i> 00024	0,25	0,25	<i>Acinetobacter baumannii</i> 000172	0,06	0,06
<i>Escherichia coli</i> 00050	0,5	0,5	<i>Acinetobacter baumannii</i> 000177	64,0	64,0
<i>Escherichia coli</i> 000110	2,0	2,0	<i>Acinetobacter baumannii</i> 000183	0,12	0,12
<i>Escherichia coli</i> 000123	64,0	128,0	<i>Acinetobacter baumannii</i> 000184	0,5	0,5
<i>Escherichia coli</i> 000125	>128,0	>128,0	Pseudomonas aeruginosa		
Klebsiella pneumoniae			<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	0,25	0,5
<i>Klebsiella pneumoniae</i> 911	0,12	0,06	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 00014	16,0	16,0
<i>Klebsiella pneumoniae</i> 1024	0,25	0,25	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 00013	4,0	2,0
<i>Klebsiella pneumoniae</i> 1951	8,0	8,0	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 00015	0,25	0,25
<i>Klebsiella pneumoniae</i> L-72	0,03	0,03	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 00016	0,25	0,25
<i>Klebsiella pneumoniae</i> L-86	128,0	128,0	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 00017	64,0	64,0
<i>Klebsiella pneumoniae</i> L-22	16,0	16,0	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 000102	128,00	128,0
<i>Klebsiella pneumoniae</i> 0068	0,25	0,25	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 862	0,5	0,5
<i>Klebsiella pneumoniae</i> 0037	16,0	8,0	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 885	2,0	2,0
Proteus spp.			<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 952	4,0	4,0
<i>Proteus mirabilis</i> L-34	0,06	0,06	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 1367	>128,0	>128,0
<i>Proteus mirabilis</i> L-41	1,0	1,0	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 2345	>128,0	>128,0
<i>Proteus mirabilis</i> 0083	0,06	0,06	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 2508	0,5	0,5
<i>Proteus mirabilis</i> 00108	8,0	8,0	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 1927	4,0	4,0
<i>Proteus mirabilis</i> 0017	16,0	8,0	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 2041	16,0	16,0
<i>Proteus vulgaris</i> 2	0,25	0,25	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 1997	16,0	16,0
<i>Proteus vulgaris</i> 3	0,25	0,25			

ЛИТЕРАТУРА

1. Dudley M. N., Loutit J., Griffith D. C. Aerosol antibiotics: considerations in pharmacological and clinical evaluation. Curr Opin Biotechnol 2008, 19: 637—643.
2. Ramsey B. W., Pepe M. S., Quan J. M. et al. Intermittent administration of inhaled tobramycin in patients with cystic fibrosis. Cystic Fibrosis Inhaled Tobramycin Study Group. New Engl J Med 1999; 340: 23—30.
3. Методические указания по определению чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препаратам. МУК 4.2.1890-04. М.: 2004.
4. Амелина Е. Л., Черняк А. В., Чучалин А. Г. Пульмонология. Приложение по муковисцидозу. 2006; 30—39.
5. Mesa Española de Normalización de la Sensibilidad y Resistencia a los Antimicrobianos. Recomendaciones del grupo MENSURA para la selección de antimicrobianos en el estudio de la sensibilidad y criterios para la interpretación del antibiograma. MENSURA, Madrid, Spain. 2005.

Бактерицидное действие лизоцима

В. М. ПОДБОРОНОВ¹, М. Ю. ЩЕЛКАНОВ⁵, И. П. СМЕРНОВА², Л. А. БУРЕНКОВА⁴,
В. П. НОВИКОВА³, В. А. АРИСТОВА⁵, Е. Л. НОВИКОВА³, Г. Г. МОСКВИТИНА¹, А. М. ИОФФЕ²

¹ ФГБУ «НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Н. Ф. Гамалеи» Минздрава России, Москва;

² Российский университет дружбы народов, Москва;

³ Карачаево-Черкесская государственная технологическая академия, Черкесск;

⁴ УРАМН «Институт полиомиелита и вирусных энцефалитов им. М. П. Чумакова» Российской академии медицинских наук, Московская обл.;

⁵ ФГБУ «Институт вирусологии им. Д. И. Ивановского» Минздрава России, Москва

Bactericidal Effect of Lysozyme

V. M. PODBORONOV, M. YU. SHCHELKANOV, I. P. SMIRNOVA, L. A. BURENKOVA,
V. P. NOVIKOVA, V. A. ARISTOVA, E. L. NOVIKOVA, G. G. MOSKVITINA, A. M. IOFFE

N. F. Gamaleya Research Institute of Epidemiology and Microbiology, Moscow

Russian Peoples' Friendship University, Moscow

Karachaevo-Cherkesk State Technological Academy, Cherkessk

M. P. Chumakov Institute of Poliomyelitis and Virus Encephalitis, Russian Academy of Medical Sciences, Moscow region

D. I. Ivanovskiy Institute of Virology, Moscow

Описано выделение лизоцима из гемолимфы иксодидных клещей *Alveonassus lahorensis* (Acari: Parasitiformes, Argasidae) и *Hyalomma marginatum* (Acari: Parasitiformes, Ixodidae) с помощью воздействия ультразвуком. Установлено, что бактерицидный эффект в отношении *Staphylococcus aureus* и *Micrococcus luteus* лизоцима, выделенного с помощью ультразвука, существенно превосходит таковой яичного лизоцима и лизоцима из гемолимфы клещей, полученного без воздействия ультразвуком. Разрушение клеток гемолимфы приводит к достоверному увеличению продукции лизоцима.

Ключевые слова: лизоцим, *Staphylococcus aureus*, *Micrococcus luteus*, *Hyalomma marginatum*, *Alveonassus lahorensis*, бактерицидный эффект, гемолимфа.

Isolation of lysozyme from hemolymph of *Alveonassus lahorensis* (Acari: Parasitiformes, Argasidae) and *Hyalomma marginatum* (Acari: Parasitiformes, Ixodidae) with using ultrasound is described. It was shown that the bactericidal effect of the ultrasound-extracted lysozyme against *Staphylococcus aureus* and *Micrococcus luteus* significantly exceeded that of the chicken egg lysozyme and lysozyme from ticks without ultrasound exposure. Disintegration of the hemolymph cells increased lysozyme production.

Key words: lysozyme, *Staphylococcus aureus*, *Micrococcus luteus*, *Hyalomma marginatum*, *Alveonassus lahorensis*, bactericidal effect, hemolymph.

Прошло уже более века с 1901 г., когда И. И. Мечников дал определение иммунитета как «общей системы явлений, благодаря которым организм может выдержать нападение болезнетворных микробов». За это время огромный прогресс достигнут в изучении механизмов иммунитета позвоночных животных. Однако лишь в последние 10—20 лет стали активно изучаться механизмы иммунитета членистоногих.

Одним из наиболее интересных объектов антимикробного иммунитета членистоногих является лизоцим, который встречается как у беспозвоночных, так и позвоночных [1—4].

У позвоночных животных лизоцим синтезируется, в основном, в клетках, способных к фаго-

цитозу, — гранулоцитах и макрофагах. В норме в перитонеальной жидкости присутствуют макрофаги, мезотелиальные клетки, небольшое количество лимфоцитов, эозинофилы, при воспалении — полиморфно-ядерные клетки. Что касается беспозвоночных, то было показано, что фагоцитарной активностью обладают ранние и зрелые плазматочиты. По морфологическим признакам макрофаги могут быть отнесены к гемато- или плазматочитам. При заражении клещей бактериями в гемолимфе увеличивается число макрофагов и обнаруживаются клетки с фагоцитированными бактериями [3]. Вместе с тем в литературе отсутствуют данные по продукции лизоцима форменными клетками гемолимфы у беспозвоночных животных.

Целью настоящей работы явилось изучение продукции лизоцима клетками гемолимфы иксодидных клещей и его бактерицидного действия.

© Коллектив авторов, 2013

Адрес для корреспонденции: 123098 Москва, ул. Гамалени, 18. НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Н. Ф. Гамалеи

Диаметр зоны подавления роста (в мм) микроорганизмов под действием лизоцима гемолимфы

Вариант опыта (n=10)	Микроорганизм	Обработка УЗ	Без обра- ботки УЗ	Яичный лизозим	Физиологичес- кий раствор
Гемолимфа клещей <i>Alveonassus lahorensis</i>	<i>Micrococcus luteus</i> ATSS-4698	29,0±1,5	21,4±1,7	20,5±1,2	—
Гемолимфа клещей <i>Alveonassus lahorensis</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	26,0±1,3	15,4±1,2	20,4±1,4	—
Гемолимфа клещей <i>Hyalomma marginatum</i>	<i>Micrococcus luteus</i> ATSS-4698	19,4±1,7	15,0±0,5	20,4±1,0	—
Гемолимфы клещей <i>Hyalomma marginatum</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	19,4±1,1	15,1±0,4	20,4±1,0	—

Примечание. Итоговые значения приводятся в форме: среднее значение среднее квадратическое отклонение; «—» — отсутствие подавления роста культуры микроорганизмов.

Материал и методы

Иксодонидные клещи — *Alveonassus lahorensis* Neumann, 1908 (*Acari: Parasitiformes, Argasidae*) и *Hyalomma marginatum* (*Acari: Parasitiformes, Ixodidae*) Koch, 1844 — использовались для получения гемолимфы, которую брали из лапки клеща.

Подготовка образцов. Гемолимфу иксодонидных клещей вносили в пробирку с 0,85% физиологическим раствором и подвергали воздействию ультразвуком на аппарате MSE (Англия) при максимальной мощности (10 с × 3 повтора) при 4°C, центрифугировали при 5000 об/мин в течение 5 мин для удаления нерастворимого материала в соответствии с ранее описанной методикой [5].

Изучение бактерицидного действия образцов. Диски толстой фильтровальной бумаги, смоченные исследуемым образцом, помещали на мясо-пептонные агаровые газоны *Staphylococcus aureus* или *Micrococcus luteus* ATSS-4698. В качестве контролей использовали яичный лизоцим в концентрации 0,15 мг/мл, а также гемолимфу клещей без воздействия ультразвуком и физиологический раствор. Учёты размеров зон подавления роста стафилококков и микрококков проводили через 1–2 сут с повторной проверкой через 3–5 сут. О результатах антибактериального действия судили по максимальному диаметру зоны подавления роста бактерий. Положительный результат регистрировали при образовании зоны подавления роста культуры диаметром от 15–25 мм и более.

Результаты и обсуждение

Во всех проведённых экспериментах лизоцим гемолимфы *A.lahorensis* обладал большей бактерицидной активностью после обработки ультразвуком (таблица). Для средних значений по отношению к *M.luteus* и *S.aureus* превышение достоверно с вероятностью альтернативной гипотезы (здесь и далее, использован критерий Стьюдента) $p < 0,00005$ (достоверным считается уровень $p < 0,05$). Обработанный ультразвуком лизоцим гемолимфы *A.lahorensis* со столь же надёжной достоверностью превышал бактерицидную активность и яичного альбумина в отношении обоих использованных микроорганизмов. При этом необработанный ультразвуком лизоцим гемолимфы *A.lahorensis* по сравнению с яичным альбумином был достоверно ($p < 0,00005$) менее активен в отношении *S.aureus* и недостоверно ($p < 0,3$) несколько более активен (в 1,04 раза) в отношении *M.luteus*.

Аналогичным образом, во всех проведённых экспериментах, обработка ультразвуком лизоцима гемолимфы *H.marginatum* достоверно ($p < 0,00005$) повышала его бактерицидную активность. При этом яичный лизоцим имел более высокую активность даже по сравнению с обрабо-

танным ультразвуком лизоцимом гемолимфы этого вида клещей как по отношению *M.luteus*, так и *S.aureus*, хотя и недостоверную ($p < 0,2$ и $p < 0,06$, соответственно). Вместе с тем разница в активности необработанного ультразвуком лизоцима гемолимфы и яичного альбумина была вполне достоверна (в обоих случаях, $p < 0,00005$).

Следует отметить широту активности клещевых лизоцимов — в отношении и микрококков, и стафилококков.

Использованные режимы ультразвуковой обработки приводили к разрушению клеток гемолимфы, что верифицировалось с помощью прямого микрокопирования. По-видимому, это и стало причиной достоверного увеличения выхода лизоцима. При этом выявленные различия в антибактериальном действии гемолимфы у использованных видов иксодонидных клещей объясняются различиями аминокислотного состава, как было выявлено нами ранее [6]. В наших предыдущих исследованиях был выделен лизоцим из различных видов клещей и изучены его физико-химические и антибактериальные свойства [3]. Сравнение аминокислотных составов клещевых и яичных лизоцимов указывает на их принадлежность к одной группе ферментов. Эти белки имеют одинаковый набор аминокислотных остатков, хотя по содержанию отдельных аминокислот несколько различаются [6]. Эти исследования значительно позже подтвердились зарубежными авторами [7], когда возник чисто прикладной интерес к переносчикам и непереносчикам боррелий — возбудителей болезни Лайма. Действительно, в кишечнике кровососов были обнаружены специфические белки — дефензины, у клещей их называли варизинами [8]. Их появление имеет место как у голодных клещей рода *Ornithodoros* [9], так и в особенности под влиянием бактериального раздражения, например *S.aureus*. По аминокислотному составу они весьма близки аналогичным белкам стрекоз и скорпионов, а гены, ответственные за их появление, имеются в клетках средней кишки, жировом теле и репродуктивных органах [9, 10]. Важно отметить, что именно благодаря дефензинам происходит лизис грамположительных боррелий *Borrelia burgdorferi* в гемолимфе клещей *Dermacentor variabilis*, в

кишечнике которых также находят боррелий [11–13]. Напротив, в гемолимфе специфического переносчика *Ixodes scapularis* этого не происходит [12].

ЛИТЕРАТУРА

1. Ермольева З. В. Лизоцим. Антибиотики, интерферон, бактериальные полисахариды. М.: 1968; 382.
2. Бухарин О. В., Васильев Н. В., Усвятцев Б. Я. Лизоцим микроорганизмов. Томск: 1985; 213.
3. Подборонов В. М., Подборонов А. М. Лизоцим и другие антибактериальные факторы паразитических членистоногих их действие на патогенные микроорганизмы. М.: Нефть и газ 1993; 291.
4. Подборонов В. М. Бактерии сальмонеллы и сальмонеллезы. Пенза: 2012; 118.
5. Подборонов В. М., Смирнова И. П., Подборонов А. М. Сравнительное изучение биохимических свойств кровососущих клещей различных семейств, родов и видов методом электрофореза. Сибирь-Восток 2006; 1: 28–31.
6. Подборонов В. М. Возбудители болезней человека, животных и клещи. М.: 2004; 224.
7. Kopacek P., Vogt L., Jindrak L., Safarik I. Purification and characterization of the lysozyme from the gut of the soft tick *Ornithodoros moubata*. Insect Biochem Mol Biol 1999; 29: 989–997.
8. Sonenshine D. E., Ceraul S. M., Hynes W. E. et al. Expression of defensin-like peptides in tick hemolymph and midgut in response to challenge with *Borrelia burgdorferi*, *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis*. Exp Appl Acarol 2002; 28: 1: 127–134.
9. Nakajima Y., Ogihara K., Taylor D., Yamakawa M. Antibacterial hemoglobin fragments from the midgut of the soft tick, *Ornithodoros moubata* (Acari: Argasidae). J Med Entomol 2003; 40: 1: 78–81.
10. Nakajima Y., vander Goes van Naters-Yasui A., Taylor D., Yamakawa M. Two isoforms of a member of the arthropod defensin family from the soft tick *Ornithodoros moubata* (Acari: Argasidae). Insect Biochem Mol Biol 2001; 31: 747–751.
11. Johns R., Sonenshine D. E., Hynes W. L. Response of the tick *Dermacentor variabilis* (Acari: Ixodidae) to honocoelic inoculation of *Borrelia burgdorferi* (Spirochetales). J Entomol 2000; 2: 265–270.
12. Johns R., Ohnishi J., Broadwater A. et al. Contrasts in tick innate immune responses to *Borrelia burgdorferi* challenge; immunotolerance in *Ixodes scapularis* versus immunocompetence in *Dermacentor variabilis* (Acari: Ixodidae). J Med Entomol 2001; 38: 1: 99–107.
13. Johns R., Sonenshine D. E., Hynes W. L. Identification of a defensin from the hemolymph of the American dog tick, *Dermacentor variabilis*. Insect Biochem Mol Biol 2001; 31: 657–665.

Описанные закономерности могут иметь определенное практическое значение в случае паразитического накопления лизоцима для медицинских или ветеринарных нужд.

Микробиологическая и молекулярно-генетическая характеристика коагулазонегативных стафилококков, выделенных у новорождённых отделения реанимации и интенсивной терапии

Л. А. ЛЮБАСОВСКАЯ¹, М. А. КОРНИЕНКО², Т. В. ПРИПУТНЕВИЧ¹, Е. Н. ИЛЫНА², А. И. ЩЕГОЛЕВ¹

¹ ФГБУ Научный центр акушерства, гинекологии и перинатологии им. В. И. Кулакова Минздрава РФ, Москва

² ФГБУНИИ физико-химической медицины ФМБА, Москва

Microbiological and Molecular Genetic Characteristics of Coagulase-Negative Staphylococcal Isolates from Neonates in Intensive Care Unit

L. A. LUBASOVSKAYA, M. A. KORNIENKO, T. V. PRIPUTNEVICH, E. N. ILYINA, A. I. SHCHEGOLEV

V. I. Kulakov Scientific Centre of Obstetrics, Gynecology and Perinatology, Moscow

Research Institute of Physico-Chemical Medicine, Moscow

В отделениях реанимации новорождённых всего мира проблема госпитальных инфекций, вызываемых коагулазонегативными стафилококками (CoNS), стоит на первом месте в течении последних 20 лет. Новорождённые с очень низкой и экстремально низкой массой тела при рождении являются особой группой риска по CoNS-инфекциям. Однако в России CoNS до сих пор часто воспринимают как контаминанты, а не как главные этиологические агенты пневмонии и сепсиса у глубоко недоношенных новорождённых. В данной работе показано, что в ОРИТ постоянно циркулируют госпитальные штаммы CoNS, способные вызывать фатальные инфекции у глубоко недоношенных новорождённых.

Ключевые слова: ОРИТ новорождённых, инфекции, коагулазонегативные стафилококки, факторы патогенности, клональность.

The problem of hospital-acquired infections due to coagulase-negative staphylococci (CoNS) in neonatal intensive care units is crucial over the last 20 years in the world. Neonates with very low or extremely low body weight belong to a special group of risks by the CoNS infection. However, in Russia CoNS up to now are frequently considered as contaminants and not as the main etiologic factors of pneumonia and sepsis in extremely premature infants. It was shown that hospital strains of CoNS causing fatal infections in extremely premature infants are always present in intensive care units.

Key words: neonatal intensive care units, infections, coagulase-negative staphylococci, pathogenicity factors, clonality.

С середины 80-х годов, коагулазонегативные стафилококки (*CoNS*) стали рассматриваться как группа этиологических агентов госпитальных инфекций в отделениях реанимации и интенсивной терапии (ОРИТ) новорождённых. Однако их видовой состав, антибиотикорезистентность, генетические и фенотипические характеристики до сих пор недостаточно изучены.

Поскольку глубоко недоношенные дети чаще подвергаются воздействию инвазивных процедур (интубация трахеи, катетеризация центральных вен, инфузия липидных растворов), вероятность заразиться внутрибольничной инфекцией у них

больше, чем у доношенных детей [1, 2]. Основными нозологическими формами *CoNS*-инфекций, как правило, являются пневмония и катетер-ассоциированный сепсис [1, 2], а по данным некоторых исследователей, менингит, причем иногда без клеточных или химических изменений в спинно-мозговой жидкости [3]. В единичных публикациях описаны случаи некротизирующего энтероколита [4], остеомиелита [29] и септического артрита, вызванного *CoNS* у новорождённых с очень низкой и экстремально низкой массой тела (ОНМТ и ЭНМТ) при отсутствии центрального венозного катетера (ЦВК) [5].

Абсолютное большинство госпитальных *CoNS* представлены метициллинорезистентными штаммами (*MRCoNS*), обладающими дополнительным пенициллинсвязывающим белком, ко-

© Коллектив авторов, 2013

Адрес для корреспонденции: 117513 Москва, ул. Академика Опарина, 4. МЦ АГ и П им. В. И. Кулакова

дируемым геном *tecA*, поэтому при лечении инфекций, вызванных *MRCoNS*, препаратом выбора чаще всего служит ванкомицин. Этот препарат являлся основным в терапии *CoNS*-инфекций в ОРИТ новорождённых, хотя в публикациях последних лет имеется много сообщений о том, что использование ванкомицина у пациентов с инфекциями, вызванными штаммами стафилококков с МПК между 1 и 2 мг/мл следует проводить с осторожностью, поскольку отсутствует его клиническая эффективность [6].

Патогенность как коагулазоположительных, так и коагулазоотрицательных стафилококков во многом обусловлена наличием широкого спектра различных факторов вирулентности, в том числе и продукция различных токсинов [7]. Основными токсинами стафилококков являются различные гемолизины, лейкоцидины, большой спектр энтеротоксинов, относящихся к нескольким серологическим типам А-Е, G, H, I, J, K-R, токсин синдрома токсического шока, эксфолиативные токсины А и В и др. [8]. *CoNS* по сравнению с *S.aureus* обладают значительно меньшим разнообразием токсинов [9] и из наиболее часто встречаемых у них являются некоторые энтеротоксины и токсин токсического шока [10, 11].

Способность к образованию биоплёнок является фактором, способствующим колонизации *CoNS* на поверхности синтетических имплантов — центральных венозных катетеров, интубационных трубок и т. д. Их формирование связано с поверхностными белками и межклеточными полисахаридными адгезинами (PIA). Помимо PIA, к факторам адгезии стафилококка относят клампинг фактор, кодируемый генами *clfA* и *clfB*, коллагенсвязывающий белок (ген *cna*), а также фибронектинсвязывающий белок (гены *fnbA*; *fnbB*) [12–16].

Синтез PIA регулируется *ica* опероном, в который входят следующие гены *icaA*, *icaB*, *icaC*, *icaD*. Функция белка, кодируемого геном *icaB*, заключается в деацетилировании поли-N-ацетилглюкозамина. Деацетилирование PIA требуется для его прикрепления к поверхности клетки и формирования биоплёнок [17]. Присутствие этих генов является прогностическим признаком образования биоплёнок у *CoNS*, что и может объяснить причину катетер-ассоциированных *CoNS*-сепсисов.

Способность к образованию биоплёнок и метициллинорезистентность, дают *CoNS* преимущество в борьбе за право населять особую экологическую нишу — госпитальную среду, вызывая инфекции у иммунокомпрометированного контингента больных, в частности у глубоко недоношенных новорождённых или новорождённых с тяжёлой неинфекционной патологией.

Таким образом, подробное изучение микробиологических и молекулярно-генетических

свойств коагулазонегативных стафилококков является важной и своевременной задачей. Определение частоты выделения отдельных видов *CoNS* у новорождённых, находящихся на выживании в ОРИТ, наличие или отсутствие у них основных факторов патогенности — маркёров антибиотикорезистентности (метициллинорезистентность и чувствительность к ванкомицину), а также выявление их принадлежности к определённым клональным группам явилось целью данного исследования.

Материал и методы

Бактериальные изоляты. При микробиологическом посеве клинического материала, полученного от новорождённых (кал, соскоб из зева, отделяемое трахеи, пупочной ранки, конъюнктивы, повреждения кожи, кровь, моча, ликвор, асцитическая и плевральная жидкость, аутопсийный материал) выделяли чистые культуры коагулазонегативных стафилококков, путём пересева их на питательную среду — 5% кровяной агар. Видовую идентификацию выделенных изолятов *CoNS* осуществляли через 24 часа по биохимическим свойствам с помощью автоматического бактериологического анализатора Vitek2Compact (BioMérieux, США) и методом масс-спектрометрического анализа с помощью масс-спектрометра AutoflexIII MALDI-TOF-MS (Bruker Daltonics, Германия) с программным обеспечением Biotyper (Bruker Daltonics, www.bdal.com).

Фенотипическая характеристика. Чувствительность к антибиотикам, (ампициллину, оксациллину, ванкомицину, линезолиду, гентамицину, линкомицину (клиндамицину), эритромицину, ципрофлоксацину, хлорамфениколу, тетрациклину) выделенных изолятов *CoNS*, определяли диско-диффузионным методом на агаре Мюллера-Хинтона (HiMedia) с использованием стандартизованных дисков (BioRad Inc.) или путём определения минимальной подавляющей концентрации (МПК) антибиотика на автоматическом анализаторе Vitek2Compact (BioMérieux, США). При интерпретации результатов тестирования руководствовались критериями CLSI [18].

Генетическая характеристика. Расширенная генетическая характеристика 70 клинических изолятов *CoNS*, выделенных от 28 новорождённых, включала:

- определение наличия гена *tecA* для подтверждения устойчивости к метициллину (оксациллину);
- тестирование геномной ДНК на наличие известных генов вирулентности и патогенности;
- типирование 41 штамма *S.haemolyticus* и 28 штаммов *S.epidermidis* на основании существующих схем мультилокусного секвенирования (MLST).

Выделение ДНК. Для выделения геномной ДНК стафилококков использовался набор «ДНК-экспресс» (ООО НПФ Литех, Россия) в соответствии с прилагаемыми инструкциями (ТУ-9398-450-17253567-03). Пробы ДНК хранились при температуре 20°C.

Проведение ПЦР. С помощью олигонуклеотидных праймеров, перечисленных в табл. 1, были амплифицированы фрагменты гена *tecA*, генов токсинов *hlgA*, *hlgA*, *hlgB*, *hlgC*, *sea*, *seb*, *sed*, *see*, *seg*, *seh*, *sei*, *sej*, *tsst*, факторов адгезии и колонизации *clfA*, *clfB*, *cna*, *fnbA*, *fnbB*, *icaA*, *icaB*, *icaC*, *icaD*. Реакция амплификации проводилась по стандартному протоколу: в 25 мкл реакционной смеси, содержащей 66 мМ Tris-HCl (pH 9,0), 16,6 мМ (NH₄)₂SO₄, 2,5 мМ MgCl₂, 250 мкМ каждого dNTP, 1 ед. *Taq* DNA полимеразы (ООО НПФ Литех, Россия) и по 10 пмоль праймеров для амплификации тестируемого гена. Реакцию ставили на TETRAD DNA ENGINE (MJ Research, Inc.) при температуре 94°C 2 минут, далее 35 циклов 94°C 30 секунд, ТПЦР 30 секунд и 72°C 30 секунд. Продукты

Таблица 1. ПЦР праймеры, используемые в данном исследовании для генетической характеристики *CoNS*

Ген	Название	5'-3' последовательность	Температура реакции, °C	Размер ампликона, бп
<i>mecA</i>	MecA-P4	tccagattacaacttcaccagg	56	160
	MecA-P7	ccacttcatacttctgtaacg		
<i>hla</i>	hla1	atagagatacttggaaaccg	58	294
	hla2	tactgaagaacgatctgtcc		
<i>sea</i>	SEA-1	ggttatcaatgtgcgggtgg	60	195
	SEA-2	aagatcctactcctgaacag		
<i>seb</i>	SEB-1	aaactgtatgtatgggtgg	58	178
	SEB-2	ttttcagcaaatagtacgag		
<i>sed</i>	SED-1	ggfgaaatagataggactgc	58	193
	SED-2	aaatagcgacttgctgtgc		
<i>see</i>	SEE-1	gaaatcaatgtgctggaggc	60	313
	SEE-2	tcataacttaccgtggacc		
<i>sej</i>	SEJ-1	tactgattttctccctgacg	60	397
	SEJ-2	tcattccagtgttactccacc		
<i>sei</i>	SEI-1	agattgaaaaggcgtcacag	62	513
	SEI-2	ctacaggcagtcctatctcc		
<i>seg</i>	SEG-1	atctttatgtctccacctg	58	411
	SEG-2	ttagtgagccagtgcttgc		
<i>seh</i>	SEH-1	gctaattgttggtagatgg	58	195
	SEH-2	cgaatgagtaactctaggag		
<i>tsst</i>	TSST-1	taagaccttgtgtgtgcg	62	247
	TSST-2	gggctataatcaggactcgg		
<i>hlgA</i>	hlgA1	tcaatcgagtcagtggtc	62	206
	hlgA2	tagtctcttgctgctggacc		
<i>hlgB</i>	hlgB1	gctatacatttggtgtgac	58	262
	hlgB2	tatacactgctttgtctgcc		
<i>hlgC</i>	hlgC1	cttacttgccctcttgc	60	437
	hlgC2	tgatccattaccaccgagtg		
<i>icaA</i>	icaA1	gaggtaagccaacgcactc	62	485
	icaA2	tcgtgtcccccttgagccc		
<i>icaB</i>	icab1	gataaactttgatgatagg	52	516
	icab2	ttttcatggaatccgtccc		
<i>icaC</i>	icac1	tattaggtcaatggatggc	60	246
	icac2	ctaagaagaataaaaaatccatcc		
<i>icaD</i>	icad1	cagaggcaatatccaacgg	56	217
	icad2	caaacaaactcatccatcc		
<i>clfA</i>	clfa1	aagtgtgcctagaatgagagc	60	995
	clfa2	cgataccgtcaccagaacc		
<i>clfB</i>	clfb1	accactacaacagagccagc	62	300
	clfb2	gtacctttagcatcagcagc		
<i>fnbA</i>	fnba1	atcggtgttgggatgggac	56	334
	fnba2	actgtctttgatctccgc		
<i>fnbB</i>	fnbb1	aagaagatacaaaaccagg	54	410
	fnbb2	taactacgatattgccacc		
<i>cna</i>	cna1	gaacaggtgggtcaagcag	58	245
	cna2	gtcgtatcttctggcagc		

амплификации анализировали в 2% агарозном геле с визуализацией бромистым этидием.

Мультилокусное типирование штаммов *S.haemolyticus* проводили в соответствии с методикой Ворониной О. Л. [19], мультилокусное типирование штаммов *S.epidermidis* проводили в соответствии со схемой, представленной на сайте <http://sepidermidis.mlst.net/>, используя рекомендованные праймеры и условия амплификации.

Секвенирование ДНК. Перед постановкой реакции секвенирования ампликоны, полученные в ходе стандартной ПЦР, обрабатывали щелочной фосфатазой арктических креветок и экзонуклеазой I *E.coli* (ExoI, производства Fermentas, Литва) для инактивации неизрасходованных нуклеотидов и деградации олигонуклеотидных праймеров. Для этого к полученным ампликонам добавляли по 5 мкл смеси, содержащей 66 мМ Tris-HCl pH 9,0; 16,6 мМ (NH₄)₂SO₄; 2,5 мМ MgCl₂; 5 ед. ExoI и 0,5 ед. щелочной фосфатазы арктических креветок. Инкубировали в течение 20 минут при температуре 37°C с последующей инак-

тивацией ферментов и прогреванием в течение 10 минут при 85°C.

Определение нуклеотидных последовательностей амплифицированных фрагментов ДНК проводили модифицированным методом Сенгера с использованием ABI Prism BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit и прибора ABI Prism 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, США) в соответствии с прилагаемыми инструкциями.

Анализ данных секвенирования. Анализ последовательностей и выравнивание выполняли с помощью программного обеспечения VECTOR NTI v. 9.0. Для филогенетического анализа использовали программу MEGA v. 4.0 (<http://www.mega-software.net>).

Результаты и обсуждение

В период с 2010 по 2012 годы из клинического материала от новорождённых детей, выделено

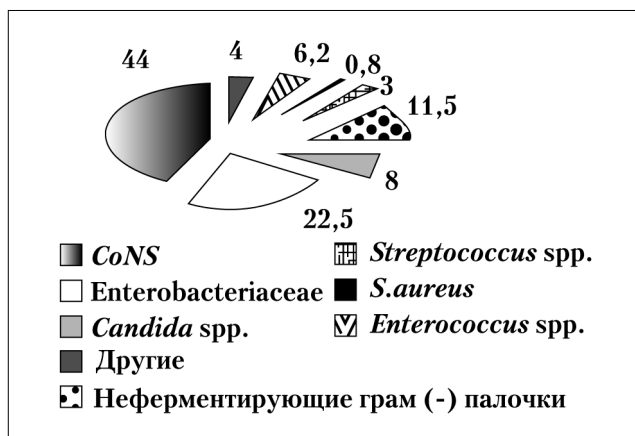


Рис. 1. Частота выделения различных групп микроорганизмов из клинического материала у новорождённых ОРИТ.

2867 изолятов микроорганизмов (рис. 1), из которых 1259 (43,9%) были отнесены к *CoNS*, и 672 из них идентифицированы до вида.

Видовой состав коагулазонегативных стафилококков был представлен в основном тремя видами: *S.epidermidis* (69,5%), *S.haemolyticus* (22%) и *S.hominis* (8%). Значительно реже, выделялись другие виды — *S.warneri*, *S.pasteuri*, *S.saprophyticus*, в общей сложности составившие 0,5% от всех идентифицированных *CoNS*. При сравнении видового состава изолятов *CoNS*, выделяемых при колонизации слизистых ЖКТ (кал и зев) и из очагов инфекций, было обнаружено, что в обоих случаях преобладает *S.epidermidis*, причём при инфекциях высеваемость *S.epidermidis* была выше (74%), чем при колонизации (65%). Вторым по частоте выделения был *S.haemolyticus* — 29% изолятов из кала и зева и 15% из очагов инфекций, *S.hominis* — 5,6 и 9,5 % соответственно (рис. 2).

Поскольку в ОРИТ новорождённых в качестве стартовой терапии чаще всего применяют комбинацию защищённого пенициллина (амоксциллина/клавуланата) с аминогликозидом (нетилицин), а для этиотропной терапии инфекций, вызванных метициллинорезистентными стафилококками используют ванкомицин или линезолид, все выделенные в данном исследовании изоляты *CoNS* ($n=1259$) были протестированы на чувствительность к оксациллину, пенициллину, гентамицину, ванкомицину и линезолиду. Для группы изолятов, отобранных для углубленного генетического типирования ($n=70$), были получены расширенные антибиотикограммы, включающие линкомицин (клиндамицин), эритромицин, фузидин, ципрофлоксацин, хлорамфеникол, тетрациклин.

Абсолютное большинство выделенных изолятов *CoNS* были устойчивыми к метициллину 93% (1171/1259), метициллинорезистентность которых подтвердилась наличием гена *mecA* у 96% генотипированных изолятов. Вырабатывали пеницилли-

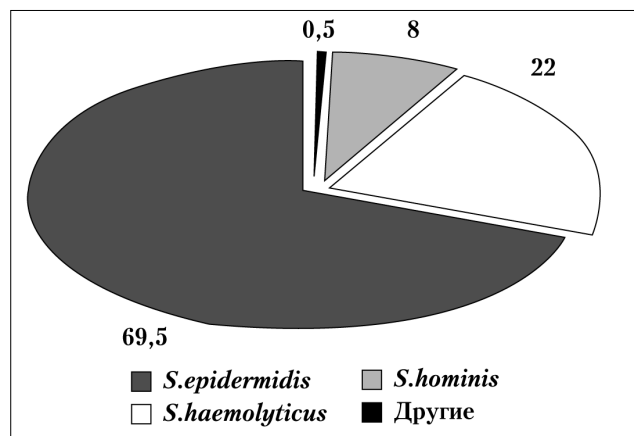


Рис. 2. Частота выделения различных видов *CoNS*.

назу 98% (1234/1259) и были устойчивы к гентамицину 91% (1145/1259) изолятов, а устойчивых к ванкомицину и линезолиду обнаружено не было.

Среди изолятов, для которых была сделана расширенная антибиотикограмма ($n=70$), устойчивы к тетрациклину были 18% (13/70), к хлорамфениколу — 41% (29/70), к линкомицину — 40% (28/70), к эритромицину — 77% (54/70), к фузидиевой кислоте — 34% (24/70), к ципрофлоксацину — 66% (46/70).

При анализе чувствительности 114 изолятов *MRCoNS* к ванкомицину с определением минимальной подавляющей концентрации у 6% МПК составила 0,5 мкг/мл; у 93% МПК 1—2 мкг/мл; МПК более 2 мкг/мл (4 мкг/мл) у 1% изолятов. Исходя из современных представлений о чувствительности стафилококков к ванкомицину, можно говорить лишь о 6% изолятов *CoNS*, в отношении которых этот антибактериальный препарат будет клинически эффективен.

Отдельно стоит сказать, что в ходе настоящего исследования проведён анализ клинического материала от 16 погибших глубоконедоношенных новорождённых, для которых был подтвержден инфекционный диагноз. В 9 из 16 случаев (56%) в аутопсийном материале были обнаружены госпитальные микроорганизмы: в 7 случаях *MRCoNS* (77%), в 1 случае полирезистентный штамм *Enterobacter cloacae*, в 1 случае — *Candida famata*. Сроки пребывания этих новорождённых в ОРИТ превышали 72 часа. Вызывает особый интерес, что из 7 новорождённых, в аутопсийном материале которых обнаружены *MRCoNS*, 3 ребенка получали ванкомицин, но элиминации возбудителя при этом не произошло.

В рамках генетической характеристики ограниченной группы клинических изолятов *CoNS* ($n=70$) было проверено наличие следующих токсинов: гемолизина α и γ , энтеротоксинов А, В, D, Е, G, Н, I, J и токсина токсического шока. Гены, ответственные за синтез токсинов, указаны

Таблица 2. Наличие генов токсинов у 70 клинических изолятов CoNS

Вид	Гемолизин α <i>hla</i>	Энтеротоксин A <i>sea</i>	Энтеротоксин B <i>seb</i>	Энтеротоксин D <i>sed</i>	Энтеротоксин E <i>see</i>	Энтеротоксин G <i>seg</i>	Энтеротоксин H <i>seh</i>	Энтеротоксин I <i>sei</i>	Энтеротоксин J <i>sej</i>	Токсического шока tst	Гемолизин α <i>hlgA, hlgB, hlgC</i>
<i>S.haemolyticus</i> (n=38)	3 (8%)	0	0	0	2 (5,3%)	0	0	0	0	2 (5,3%)	0
<i>S.epidermidis</i> (n=25)	16 (64%)	0	7 (28%)	10 (40%)	1 (4%)	0	4 (16%)	0	0	4 (16%)	0
<i>S.hominis</i> (n=4)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1 (25%)	0
<i>S.warneri</i> (n=3)	0	0	0	0	0	0	1 (33,3%)	0	0	0	0

Таблица 3. Наличие генов основных факторов адгезии и колонизации у 70 клинических изолятов CoNS

Вид	Межклеточный полисахаридный адгезин				Кламппинг фактор		Коллаген-связывающий белок	Фибронектин-связывающий белок	
	<i>icaA</i>	<i>icaB</i>	<i>icaC</i>	<i>icaD</i>	<i>clfA</i>	<i>clfB</i>	<i>cna</i>	<i>fmbA</i>	<i>fmbB</i>
<i>S.haemolyticus</i> (n=38)	0	8 (21%)	3 (8%)	4 (10,5%)	3 (8%)	0	0	2 (5,3%)	0
<i>S.epidermidis</i> (n=25)	7 (28%)	10 (40%)	6(24%)	16 (64%)	0	0	0	0	1 (4%)
<i>S.hominis</i> (n=4)	0	1 (25%)	1 (25%)	0	0	0	0	0	1 (25%)
<i>S.warneri</i> (n=3)	0	0	0	1 (33.3%)	0	0	0	0	0

Таблица 4. Сиквенс-типы *S.haemolyticus* и профиль антибиотикорезистентности

Сиквенс-тип	Аллельный профиль <i>mvaK-rphE-iphK-gtr-arcC-tpi-aroE</i>	Число штаммов	Резистентность к антибиотикам, %									
			OXA	GEN	TET	CL	LIN	ER	FA	CIP	LZ	VAN
1	1-1-2-1-1-1-1	1	100	100	0	100	100	100	0	100	0	0
5	3-1-1-1-1-3-1	20	100	100	5	5	95	100	5	100	0	0
7	3-2-2-1-2-2-1	1	100	100	0	0	100	100	0	0	0	0
19	3-1-1-1-1-1-1	18	100	100	39	17	17	100	0	100	0	0
20	3-1-1-3-1-1-1	1	100	100	0	0	0	100	0	0	0	0

в табл. 2. В табл. 3 представлены данные о наличии генов основных факторов адгезии и колонизации среди проанализированных 70 клинических изолятов. Всего гены гемолизина α были обнаружены у 19 изолятов CoNS (19/70; 27,1%), а ген токсического шока — у 7 изолятов (7/70; 10,0%). Наиболее часто из генов энтеротоксинов встречался ген энтеротоксина D (10/70; 14,3%), гены энтеротоксинов B, E и H найдены у 7 (7/70; 10,0%), 3 (3/70; 4,3%) и 5 (5/70; 7,1%) изолятов CoNS соответственно.

Наибольшее разнообразие генов токсинов было выявлено среди клинических изолятов *S.epidermidis* (n=25). Различные изоляты *S.epidermidis* имели гены гемолизина α (16/25; 64%), энтеротоксинов B (7/25; 28%), D (10/25; 40%), E (1/25; 4%), H (4/25; 16%), токсина токсического шока (4/25; 16%). У клинических изолятов *S.haemolyticus* (n=38) были обнаружены гены гемолизина α (3/38; 8%), энтеротоксина E (2/38; 5,3%), токсина токсического шока (2/38; 5,3%). Наличие генов токсинов у *S.hominis* и *S.warneri* было показано только для 2 клинических изолятов: клинический изолят *S.hominis* обладал токсинотоксическим шоком, а изолят *S.warneri* — энтеротоксином H.

Для определения способности к образованию биоплёнок были детектированы гены основных факторов адгезии и колонизации *clfA*, *clfB*, *cna*,

fmbA, *fmbB*, *icaA*, *icaB*, *icaC*, *icaD*. Генами *ica* оперона обладали *S.haemolyticus*, *S.epidermidis* и *S.hominis*. Ген *icaA* встречался у 7 (7/70; 10,0%) изолятов CoNS, *icaB* — у 19 (19/70; 27,1%) изолятов, *icaC* — у 10 (10/70; 14,3%) изолятов, *icaD* — у 21 (21/70; 30,0%) изолятов. Гены фибронектинсвязывающего белка *fmbA*, *fmbB* были найдены у клинических изолятов *S.haemolyticus* и *S.epidermidis* (*fmbA* — у 2 (2/70; 2,8%) и *fmbB* — у 2 (2/70; 2,8%) соответственно. Гена коллагенсвязывающего белка *cna* не было найдено ни у одного клинического изолята CoNS.

На основании результатов MLST типирования 41 изолят *S.haemolyticus*, выделенный от 26 новорождённых, был отнесён к 5 различным сиквенс-типам (табл. 4). Из 26 новорождённых, двое были доношенными, остальные — недоношенными (92%). Среди недоношенных очень низкую и экстремально низкую массу тела имели 16 (66%) новорождённых. Наиболее представлены сиквенс-типы 5 и 19, в состав которых входят соответственно 20 и 18 изолятов.

У доношенных новорождённых был обнаружен ST19, но клинические признаки госпитальной инфекции отсутствовали. В то же время три глубоко недоношенных ребенка имели клинические признаки инфекции, которая была ассоциирована с *S.haemolyticus* (CoNS-сепсис — 2 ребёнка и конъюнктивит — 1 ребёнок). При конъюнктивит

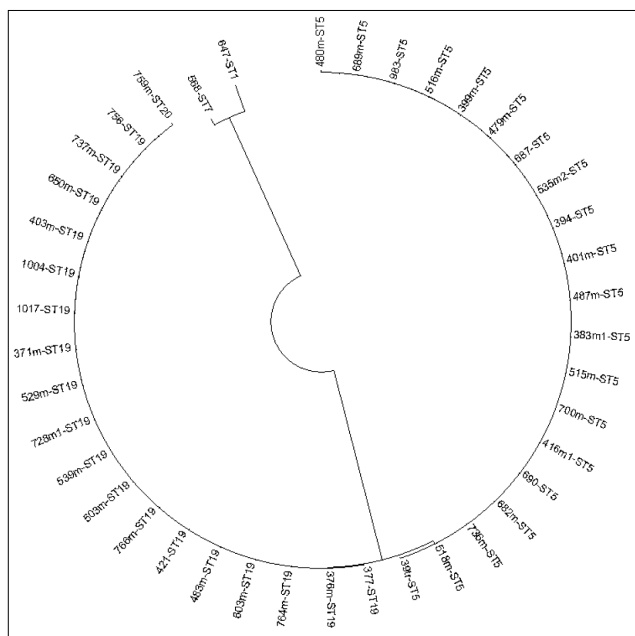


Рис. 3. Филогенетическое дерево штаммов *S. haemolyticus*, построенное на основании нуклеотидных последовательностей локусов *mvaK*, *rphE*, *tphK*, *gtr*, *arcC*, *tpi*, *aroE*, входящих в состав схемы MLST.

вите были обнаружены ST19, при *CoNS*-сепсисе — ST5.

Филогенетическое дерево штаммов *S. haemolyticus*, построенное на основании нуклеотидных последовательностей семи локусов, входящих в состав схемы MLST представлено на рис. 3, где видно, что наиболее представленный кластер (95%) образован близкородственными изолятами, входящими в сиквенс-типы 5, 19, 20.

Таким образом, все выделенные и проанализированные нами изоляты были близкородственными, что подтверждает их госпитальное происхождение. Несмотря на то, что одинаковые *CoNS* выделяли у всех новорождённых, проявления инфекций (пневмония и сепсис) отмечались только у глубоко недоношенных детей.

Помимо этого было проведено MLST типирование 28 изолятов *S. epidermidis*, выделенных от 19 новорождённых, из которых двое были доношенными, остальные — недоношенными (89,5%). Среди недоношенных очень низкую и экстремально низкую массу тела имели 11 (65%) новорождённых.

Изоляты на основании MLST схемы были отнесены к 7 различным сиквенс-типам (табл. 5). Наиболее представлены сиквенс-типы: ST2 (4 штамма), ST22 (12 штаммов), ST59 (6 штаммов).

От доношенных новорождённых был выделен ST22 без клинических признаков госпитальной инфекции. Клинические признаки инфекции, ассоциированной с *S. epidermidis*, имели три недоношенных ребёнка. Инфекции были представле-

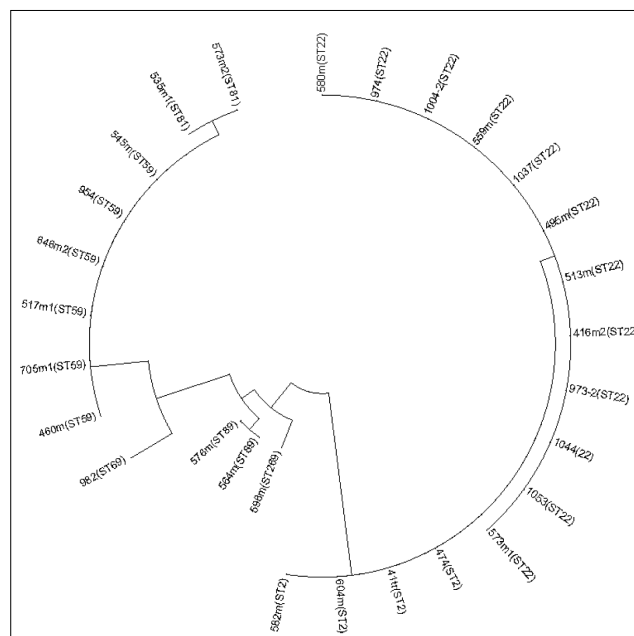


Рис. 4. Филогенетическое дерево штаммов *S. epidermidis*, построенное на основании нуклеотидных последовательностей локусов *arcC*, *aroE*, *gtr*, *mutS*, *pyr*, *tpi*, *yqiL*, входящих в состав схемы MLST (в скобках указан номер соответствующего сиквенс-типа).

ны следующими нозологическими формами: конъюнктивит, пневмония и сепсис. При конъюнктивите *S. epidermidis* был отнесен к ST59; из ткани лёгких при вскрытии выделен ST2; в третьем случае при вскрытии в крови из полости сердца обнаружен ST22.

Филогенетическое дерево штаммов *S. epidermidis*, построенное по данным MLST анализа, изображено на рис. 4. Наиболее представленный кластер, образован близкородственными штаммами, входящими в сиквенс-типы 2 и 22 (57%). Обращает на себя внимание, что конъюнктивит, вызванный *S. epidermidis*, был у ребёнка с массой тела более 2000 г, в то время как пневмония и сепсис были у глубоко недоношенных детей с массой тела при рождении менее 1500 г.

Изучая способность к длительной персистенции в условиях стационара, было отмечено, что изоляты с наиболее часто обнаруживаемыми сиквенс-типами встречались с постоянной частотой на протяжении 6 месяцев наблюдений.

Обсуждение

В этой работе было показано, что основную роль в патологии новорождённых, находящихся на выхаживании в ОРИТ, играют *MRCoNS*, что подтверждается данными зарубежных исследователей [1, 2, 19, 20, 29]. Поздний неонатальный сепсис (более 72 часов после рождения) с первичным очагом в лёгких или катетер-ассоциированный, встречается у 50% новорождённых с весом

Таблица 5. Сиквенс-типы *S.epidermidis* и профиль антибиотикорезистентности

Сиквенс-тип	Аллельный профиль <i>arcC-aroE-gtr-mutS- pyr-tpi-yqiL</i>	Число штаммов	Резистентность к антибиотикам, %									
			OXA	GEN	TET	C	LIN	ER	FA	CIP	LZ	VAN
2	7-1-2-2-4-1-1	4	100	100	0	25	0	100	100	100	0	0
22	7-1-2-2-4-7-1	12	100	100	25	100	0	17	75	17	0	0
59	2-1-1-1-2-1-1	6	100	100	0	67	17	83	67	17	0	0
69	1-18-6-2-2-1-1	1	100	100	100	100	100	100	0	100	0	0
81	2-17-1-1-2-1-1	2	100	100	100	50	0	100	50	0	0	0
89	1-1-2-1-2-1-1	2	100	100	0	50	50	0	50	0	0	0
269	1-1-2-2-28-16-1	1	100	100	0	0	0	0	0	0	0	0

при рождении менее 1500 г. [2]. Наиболее часто выделяемые из крови микроорганизмы — коагулазонегативные стафилококки (*CoNS*). Частота возникновения *CoNS*-сепсиса у новорождённых по различным данным от 30 до 40% [2].

В нашем исследовании было подтверждено, что у глубоко недоношенных новорождённых наиболее частыми нозологическими формами *CoNS*-инфекций являются сепсис и пневмония, реже встречаются локальные поражения (например, конъюнктивит).

Все изоляты, выделенные из очагов инфекций, были метициллинорезистентными и обладали множественной лекарственной устойчивостью. Во всех случаях препаратом выбора в терапии новорождённых служил ванкомицин, но не всегда происходила элиминация возбудителя при назначении терапевтических доз этого антибиотика, что возможно, связано с абсолютным преобладанием изолятов *CoNS* с МПК более 1 мкг/мл.

Количество видов *CoNS*, циркулирующих в ОРИТ ограничено: самым часто встречаемым является *S.epidermidis*, вторым по частоте выделения — *S.haemolyticus*, третьим — *S.hominis*. В связи с этим часто возникает проблема разделения контаминации от инфекции, ведь эти виды являются наиболее частыми комменсалами кожи и слизистых оболочек.

Патогенность стафилококков связана с большим количеством разнообразных факторов вирулентности и патогенности: образование биоплёнок, продукция токсинов, различных факторов, позволяющих избежать иммунного ответа, устойчивость к различным антибиотикам. Как известно, у *CoNS* значительно меньше факторов вирулентности, чем *S.aureus*. Однако среди клинических изолятов *CoNS* есть весьма патогенные изоляты, вызванные ими инфекции могут быть причиной смерти [21]. Патогенные штаммы *CoNS* могут содержать некоторые факторы вирулентности и патогенности *S.aureus*, так как многие из этих генов находятся в составе остовов патогенности и подвижных элементов [22]. В нашей работе были детектированы некоторые гены токсинов, основные факторы адгезии и колонизации у клинических изолятов *CoNS*. Представители *S.epidermidis* чаще

других видов несут гены энтеротоксинов, токсины токсического шока, плёнообразования, что, по-видимому, и определяет их ведущую роль в патологии новорождённых.

На основании полученных данных видно, что выделенные нами изоляты *CoNS* обладают значительно меньшим разнообразием токсинов, чем *S.aureus*, что подтверждается литературными данными [9]. При этом клинические изоляты *S.epidermidis* имеют наибольшее количество различных токсинов (гемолизин α , энтеротоксины В, D, Е, Н, токсин токсического шока).

Необходимо отметить, что наиболее часто в составе генома *CoNS* встречается ген гемолизина α . Для клинических изолятов *S.epidermidis* данный ген встречается у 64% изолятов, для изолятов *S.haemolyticus* — 8%. Возможно, это связано с тем, что гемолизин α обладает не только цитолитическими свойствами в отношении моноцитов, лимфоцитов, эритроцитов и тромбоцитов, но и необходим для образования биоплёнок и адгезии бактериальных клеток на поверхности клеток хозяина [7, 23]. В то время как образование биоплёнок является одним из основных факторов вирулентности и патогенности *CoNS*.

Одним из необходимых факторов для образования биоплёнок стафилококками является PIA. По полученным нами данным гены *ica* оперона присутствуют у многих клинических изолятов *CoNS*, но при этом гены *ica* оперона представлены не полностью. Возможно, нуклеотидные последовательности этих генов в *CoNS* сильно отличаются от аналогичных последовательностей *S.aureus*, что приводит к снижению эффективности используемых праймерных систем.

По данным MLST анализа, было установлено, что для ОРИТ нашего госпиталя характерны два основных сиквенс-типа *S.haemolyticus*: ST5 и ST19, выраженная клональность подтверждает их госпитальное происхождение. Основные сиквенс-типы являются генетически родственными, поскольку принадлежат к единому клональному комплексу. Ранее было показано, что генетическое родство штаммов *S.haemolyticus* характерно не только для штаммов одного стационара, но и для штаммов, выделенных в стационарах разных городов [24].

Кроме того, для ОРИТ нашего госпиталя наиболее характерны сиквенс-типы ST2, ST22, ST59 *S.epidermidis*. Несмотря на то, что сиквенс-типы ST2, ST22 и ST59, ST69, ST81 образуют два разных кластера на филогенетическом дереве, они принадлежат к одному клональному комплексу [25]. В данный комплекс входят госпитальные штаммы, выделенные в различных странах мира, а сиквенс-тип ST2 является комплексобразующим сиквенс-типом [25–27].

Таким образом, для каждого отделения и стационара эндемичными являются определённые родственные молекулярные типы *CoNS* [28]. В нашем исследовании не было выявлено определённой связи между принадлежностью к определённому сиквенс-типу и способностью вызывать инфекции у недоношенных новорождённых, этот вопрос требует проведения дальнейших клиничко-микробиологических исследований. Вероятнее всего первостепенную роль в развитии госпитальных *CoNS*-ассоциирован-

ных инфекций играют факторы риска, связанные с иммунодефицитным состоянием недоношенных новорождённых и инвазивностью методов лечения в ОРИТ. Повторное выделение основных сиквенс-типов *CoNS* на протяжении шести месяцев говорит о длительной персистенции определённых клонов в отделении, что также подтверждает их госпитальное происхождение [28].

Заключение

В заключении хотелось бы отметить, что незрелость органов и систем, следствием которой является иммунокомпрометированность глубоко недоношенных новорождённых и новорождённых с тяжёлой врождённой патологией позволяет микроорганизмам с низким патогенным потенциалом, в частности *CoNS*, преодолевать естественные барьеры и запускать патологические процессы, приводящие к полиорганной недостаточности.

ЛИТЕРАТУРА

1. Craft A., Finer N. Nosocomial coagulase negative staphylococcal (CoNS) catheter-related sepsis in preterm infants: definition, diagnosis, prophylaxis, and prevention. J Perinatol 2001; 26: 186–192.
2. Mohan P. V., Placencia F., Leonard E. W. Coagulase-negative staphylococcal infections in the neonate and child: an update. Semin Pediatr Infect Dis 2006; 17: 120–127.
3. Gruskay J., Harris M. C., Costarino A. T. et al. Neonatal *Staphylococcus epidermidis* meningitis with unremarkable CSF examination results. Am J Dis Child 1989; 143: 580–582.
4. Scheifele D. W., Gordean L. Bjornson Delta-like toxin produced by CoNS is associated with neonatal necrotizing enterocolitis. Infect Immun 1987; 2268–2273.
5. Eggink B. H., Rowen J. L. Primary osteomyelitis and suppurative arthritis caused by coagulase-negative staphylococci in a preterm neonate. Pediatr Infect Dis J 2003; 22: 572–573.
6. Haque N. Z., Zuniga L. C. et al. Relationship of vancomycin minimum inhibitory concentration to mortality in patients with methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* hospital-acquired, ventilator-associated, or health-care-associated pneumonia. Chest 2010; 138: 6: 1356–1362.
7. Plata K., Rosato A., Węgrzyn G. *Staphylococcus aureus* as an infectious agent: overview of biochemistry and molecular genetics of its pathogenicity. Acta Biochim Pol 2009; 56: 4: 594–612.
8. Dinges M., Orwin P. Schlievert exotoxins of *Staphylococcus aureus*. PClin Microbiol Rev 2000; 13: 1: 13–34.
9. Otto M. Molecular basis of *Staphylococcus epidermidis* infections. Semin Immunopathol 2012; 34: 2: 201–214.
10. Marin M., de la Rose M., Cornejo I. Enterotoxigenicity of *Staphylococcus* strains isolated from Spanish dry-cured hams. Appl Environ Microbiol 1992; 58: 3: 1067–1069.
11. Madhusoodanan J., Seo K., Remortel B., Park J., Hwang S., Fox L., Park Y., Deobald C. An Enterotoxin-bearing pathogenicity island in *Staphylococcus epidermidis*. J Bacteriol 2011; 193: 8: 1854–1862.
12. Biofilms, infection, and antimicrobial therapy / Ed by J. L. Pace, M. Rupp, and R. G. Finch. Published by CRC Press Taylor & Francis Group, USA, 2006.
13. Menzies B. E. The role of fibronectin binding proteins in the pathogenesis of *Staphylococcus aureus* infections. Curr Opin Infect Dis 2003; 16: 3: 225–229.
14. McDevitt D., Nanavaty T., House-Pompeo K., Bell E., Turner N., McIntire L., Foster T., Höök M. Characterization of the interaction between the *Staphylococcus aureus* clumping factor (ClfA) and fibrinogen. Eur J Biochem 1997; 247: 1: 416–424.
15. Ni Eidhin D., Perkins S., Francois P., Vaudaux P., Höök M., Foster T. J. Clumping factor B (ClfB), a new surface-located fibrinogen-binding adhesin of *Staphylococcus aureus*. Mol Microbiol 1998; 30: 2: 245–257.
16. Patti J. M., Jonsson H., Guss B., Switalski L. M., Wiberg K., Lindberg M., Höök M. Molecular characterization and expression of a gene encoding a *Staphylococcus aureus* collagen adhesin. J Biol Chem 1992; 267: 7: 4766–4772.
17. Vuong C., Kocianova S., Voyich J., Yao Y., Fischer E., DeLeo F., Otto M. A crucial role for exopolysaccharide modification in bacterial biofilm formation, immune evasion, and virulence. J Biol Chem 2004; 279: 52: 54881–54886.
18. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Eighteenth Informational Supplement. CLSI Document M100-S18. 2008.
19. Isaacs D. A ten-year multicentre study of coagulase negative staphylococcal infections in Australasian neonatal units. Arch Dis Child 2003; 88: F89–93.
20. Bansal S., Jain A., Agarwal J., Malik G. K. Significance of coagulase negative staphylococci in neonates with late onset septicemia. Indian J Pathol Microbiol 2004; 47: 586–588.
21. Piette A., Verschraegen G. Role of coagulase-negative staphylococci in human disease. Vet Microbiol 2009; 134: 45–54.
22. Malachowa N., DeLeo F. R. Mobile genetic elements of *Staphylococcus aureus*. Cell Mol Life Sci 2010; 67: 18: 3057–3071.
23. Caiazza N. C., O'Toole G. Alpha-toxin is required for biofilm formation by *Staphylococcus aureus*. J Bacteriol 2003; 185:10: 3214–3217.
24. Воронина О. Л., Кунда М. С., Дмитриенко О. А., Лушин В. Г., Гинцбург А. Л. Разработка схемы мультилокусного секвенирования *Staphylococcus haemolyticus* и ее применение для молекулярно-эпидемиологического анализа штаммов, выделенных в стационарах Российской Федерации в 2009–2010 гг. Журн микробиол 2011; 5: 62–67.
25. Miragaia M., Thomas J. C., Couto I., Enright M. C., de Lencastre H. Inferring a population structure for *Staphylococcus epidermidis* from multilocus sequence typing data. J Bacteriology 2007; 189: 6: 2540–2552.
26. Li M., Wang X., Gao Q., Lu Y. Molecular characterization of *Staphylococcus epidermidis* strains isolated from a teaching hospital in Shanghai, China. J Med Microbiol 2009; 58: 4: 456–461.
27. Mendes R. E., Deshpande L. M., Costello A. J., Farrell D. J. Molecular epidemiology of *Staphylococcus epidermidis* clinical isolates from U.S. hospitals. Antimicrob Agents Chemother 2012; 56: 9: 4656–4661.
28. Krediet T. G., Mascini E. M., van Rooij E., Vlooswijk J., Paauw A., Gerards L. J., Fleer A. Molecular epidemiology of coagulase-negative staphylococci causing sepsis in a neonatal intensive care unit over an 11-year period. J Clin Microbiol 2004; 42: 3: 992–995.
29. Guilbert J., Meau-Petit V., de Labriolle-Vaylet C., Vu-Thien H., Renolleau S. Coagulase-negative staphylococcal osteomyelitis in preterm infants: a proposal for a diagnostic procedure. Arch Pediatr 2010; 17: 10: 1473–1476.

Применение реамберина при химиотерапии туберкулёза и его влияние на показатели функции печени

И. С. ГЕЛЬБЕРГ¹, С. Б. ВОЛЬФ¹, Д. С. СУХАНОВ², В. С. АВЛАСЕНКО¹, Ю. А. ШЕЙФЕР¹

¹ УО «Гродненский государственный медицинский университет», Гродно, Республика Беларусь

² ГБОУ ВПО Северо-Западный государственный медицинский университет им. И. И. Мечникова, Санкт-Петербург

Reamberin in Tuberculosis Chemotherapy and Its Effect on Liver Function

I. S. GELBERG, S. B. VOLF, D. S. SUKHANOV, V. S. AVLASENKO, YU. A. SHEIFER

Grodno State Medical University, Belarus Republic, Grodno

I. I. Mechnikov North-Western State Medical University, St. Petersburg

Проведена оценка применения реамберина для профилактики побочных реакций у 257 больных туберкулёзом органов дыхания на фоне химиотерапии. В группу сравнения вошел 241 пациент, получавший только химиотерапию. Применение изучаемого препарата способствовало снижению в 2 раза частоты встречаемости интоксикационного синдрома в течение первого месяца лечения, в том числе у больных с наличием МЛУ МБТ. Неблагоприятные побочные эффекты (токсические, аллергические) противотуберкулёзной химиотерапии регистрировались в 2,4 раза реже в группе пациентов, получавших реамберин. Отмечено положительное влияние изучаемого препарата на активность АлАТ и АсАТ, более выраженное при сохраненной лекарственной чувствительности возбудителя.

Ключевые слова: туберкулёз, побочные реакции, химиотерапия, печень, реамберин.

The use of reamberin for prophylaxis of side effects was estimated in 257 patients with tuberculosis of the respiratory organs under the chemotherapy. The reference group involved 241 patients treated with the chemotherapeutics alone. Reamberin in the treatment of the patients, including subjects with multidrug resistant *Mycobacterium tuberculosis*, promoted a 2-fold decrease in the frequency of the intoxication syndrome during the first month of the treatment. Adverse reactions (toxic, allergic) to the antituberculosis chemotherapeutics were 2.4 times less frequent in the patients additionally treated with reamberin. Positive effect of reamberin on the activity of AlAT and AsAT was observed, the effect being higher, when the pathogen was susceptible to the drugs.

Key words: tuberculosis, side effects, chemotherapy, liver, reamberin.

В настоящее время в лечении больных туберкулёзом используется химиотерапия с одновременным применением не менее 4 противотуберкулёзных препаратов (ПТП), а при наличии множественной лекарственной устойчивости (МЛУ) микобактерий туберкулёза (МБТ) — 5 и более ПТП. При этом каждый из них является антиметаболитом, а для макроорганизма — ксенобиотиком. Главным органом метаболизма ПТП является печень. По литературным данным, у 6,6—47,2% пациентов возникают повреждения печени в процессе химиотерапии [1]. У пациентов с МЛУ МБТ приходится использовать препараты резерва, которые в целом менее активны и более токсичны, чем основные. Курс лечения длительный, только интенсивная фаза химиотерапии при

МЛУ-туберкулёзе продолжается 6—8 месяцев, а в целом — до 2 лет. Все это приводит к повышению частоты нежелательных побочных реакций (НПР) на ПТП [2—5]. Развитие НПР нередко приводит к временной отмене ПТП, изменению схемы химиотерапии, снижая тем самым эффективность лечения больных туберкулёзом [6].

Изложенное определяет высокую актуальность разработки и усовершенствования методов предупреждения и лечения НПР на ПТП.

Реамберин является комплексным препаратом, содержащим дезоксиглюцитол-п-метиламмония, натрия сукцинат, хлориды натрия, калия и магния. Он обладает антиоксидантным, антигипоксическим, антитоксическим эффектом, стимулирует окислительные процессы и с эффектом используется при ряде заболеваний [7—9].

Цель настоящей работы — оценка эффективности реамберина для предупреждения НПР на

© Коллектив авторов, 2013

Адрес для корреспонденции: 117105 Москва, Нагатинская ул., д. За.
Редакция журнала «Антибиотики и химиотерапия»

Таблица 1. Частота и сроки ликвидации проявлений интоксикационного синдрома у пациентов с наличием МЛУ МБТ при назначении реамберина на фоне химиотерапии туберкулёза и без него

Сроки ликвидации интоксикационного синдрома	Группы обследуемых				p
	основная группа (ОГ _а), n=110		группа сравнения (ГС _а), n=106		
	абс.	%	абс.	%	
До 1 месяца	54	49,1	27	25,5	<0,05
До 2 месяцев	50	45,4	62	58,5	>0,05
Более 2 месяцев	6	5,4	17	16,0	<0,05

Примечание. Здесь и табл. 2: p — достоверность различий между группами.

Таблица 2. Частота и сроки ликвидации проявлений интоксикационного синдрома у пациентов без наличия МЛУ МБТ при назначении реамберина на фоне химиотерапии туберкулёза и без него

Сроки ликвидации интоксикационного синдрома	Группы обследуемых				p
	основная группа (ОГ _б), n=43		группа сравнения (ГС _б), n=45		
	абс.	%	абс.	%	
До 1 месяца	26	60,4	13	28,9	<0,05
До 2 месяцев	15	34,9	27	60,0	<0,05
Более 2 месяцев	2	4,6	5	11,1	>0,05

ПТП и его влияния на показатели функции печени в условиях химиотерапии туберкулёза.

Материал и методы

Обследовано 498 больных туберкулёзом органов дыхания, находившихся в стационарах ГОКЦ «Фтизиатрия». Больные были рандомизированы в две группы: основную (ОГ) — 257 пациентов и группу сравнения (ГС) — 241 пациент. В основной группе мужчин было 205 (79,8%), женщин — 52 (20,2%), в группе сравнения — мужчин 194 (80,5%), женщин — 47 (19,5%). Средний возраст в группах составил: ОГ — 39,5±0,35 лет, ГС — 42,7±4,6 лет. В группах преобладали пациенты с распространённым туберкулёзным процессом — ОГ — 226 (88,9%) и ГС — 205 (85,1%). Отмечалась высокая частота бактериовыделения — у 227 (88,3%) пациентов ОГ и 207 (85,9%) в ГС, в том числе МЛУ МБТ — 173 (67,3%) больных ОГ и 146 (60,6%) в ГС. Наличие полости распада в лёгких выявлено у 176 (68,5%) обследуемых ОГ и 145 (60,2%) ГС. Наблюдалась высокая частота отягощающих факторов (злоупотребление алкоголем, пребывание в ИТУ, социальная дезадаптация, ВИЧ-инфекция, ХНЗОД, сахарный диабет и др.) — у 211 (82,1%) пациентов ОГ и 193 (80,1%) ГС.

Химиотерапия проводилась согласно существующих протоколов: 4 ПТП получало 67 пациентов (26,1%) ОГ и 71 (29,5%) ГС, 5 ПТП — 124 (48,2%) ОГ и 114 (47,3%) ГС, 6 ПТП — 57 (22,2%) ОГ и 55 (22,8%) ГС; более 6 ПТП — 9 (3,5%) ОГ и 1 (0,4%) ГС.

Для изучения влияния реамберина на НПР при химиотерапии туберкулёза пациенты каждой группы были разделены на 2 подгруппы: «а» — с наличием МЛУ МБТ и «б» — без наличия МЛУ. Необходимость такого разделения вызвана тем, что курс химиотерапии при МЛУ-туберкулёзе, как указывалось, длительнее, применяются не менее 5 ПТП одновременно, преимущественно препараты резерва. В результате рандомизации в ОГ вошли 173 пациента с МЛУ МБТ (ОГ_а) и 84 — без МЛУ МБТ (ОГ_б). Соответственно ГС составили 146 пациентов с МЛУ МБТ (ГС_а) и 95 — без МЛУ МБТ (ГС_б). Пациенты ОГ в дополнении к химиотерапии туберкулёза получали реамберин. Реамберин назначался по 400,0 1,5% раствора внутривенно, не более 90 капель в 1 минуту, 1 раз в сутки в течение 10 дней. Группы, которые сравнивались между собой, значимо не отличались по возрасту, полу, характеру туберкулёзного процесса, сопутствующей патологии и схемам химиотерапии.

Для проведения анализа использовались результаты клинических, лабораторных, биохимических исследований, проводимых в клинике ГОУЗ «Фтизиатрия».

Полученные в ходе исследования данные обрабатывались с использованием пакета обработки данных Statistica for Windows, версия 6.0 и офисного приложения Excel. Для показателей, характеризующих качественные признаки, указывались абсолютное число и относительная величина в процентах (%), количественные показатели записывались в виде $M \pm m$. Вследствие нормального распределения данных в исследуемых группах сравнение показателей осуществлялось с помощью *t*-критерия Стьюдента. Сравнение качественных признаков проводилось путём расчёта критерия χ^2 . Различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

Переносимость реамберина оценивалась у пациентов основной группы. Переносимость препарата была хорошей, без появления жалоб и объективных симптомов у 244 пациентов (94,94%). У 13 человек, т. е. в 5,06%, возникли НПР на реамберин. У 4 пациентов их можно отнести к аллергическим, 9 — к токсическим. Аллергические реакции проявлялись в виде отёка Квинке (1), зуда кожи (3), гиперемии и сыпи по типу крапивницы (2), бронхоспазма (1). В трёх случаях реамберин был отменен, в одном — лечение им продолжено. НПР токсического характера проявлялись в виде головных болей, головокружения (4), болей в нижних конечностях (1), поясничной области (зона почек), но без изменений в анализе мочи (2), со стороны ЖКТ (1).

Влияние реамберина на клинические проявления интоксикационного синдрома изучено у пациентов ОГ с наличием МЛУ МБТ и без МЛУ МБТ.

Применение реамберина на фоне химиотерапии туберкулёза у пациентов ОГ с наличием МЛУ МБТ позволило ликвидировать проявления интоксикационного синдрома у половины из них в

Таблица 3. Динамика показателей функции печени у пациентов с наличием МЛУ МБТ при химиотерапии туберкулеза с использованием реамберина и без него

Наименование показателя	Группы обследуемых		<i>p</i>
	основная группа (ОГ _а), <i>n</i> =25	группа сравнения (ГС _а), <i>n</i> =35	
Билирубин (общ), мкмоль/л			
исходное значение	10,7±1,4	13,8±2,2	>0,05
через 1 мес лечения	11,0±1,5	27,8±3,2	<0,05
<i>p</i> ₁	>0,05	<0,05	
АлАТ, ед.			
исходное значение	35,6±5,7	46,1±6,9	>0,05
через 1 мес лечения	22,1±2,6	126,1±12,2	<0,05
<i>p</i> ₁	<0,05	<0,05	
АсАТ, ед.			
исходное значение	43,8±6,3	40,1±6,7	>0,05
через 1 мес лечения	27,4±2,2	92,5±13,2	<0,05
<i>p</i> ₁	<0,05	<0,05	

Примечание. Здесь и табл. 4: *p* — сравнение различий между группами; *p*₁ — сравнение различий внутри группы до и через 1 месяц лечения.

Таблица 4. Динамика показателей функции печени у пациентов без наличия МЛУ МБТ при химиотерапии туберкулеза с использованием реамберина и без него

Наименование показателя	Группы обследуемых		<i>p</i>
	основная группа (ОГ _б), <i>n</i> =35	группа сравнения (ГС _б), <i>n</i> =44	
Билирубин (общ), мкмоль/л			
исходное значение	12,1±1,1	12,9±1,3	>0,05
через 1 мес лечения	11,6±0,14	20,7±2,8	>0,05
<i>p</i> ₁	>0,05	>0,05	
АлАТ, ед.			
исходное значение	27,4±2,8	34,8±4,1	>0,05
через 1 мес лечения	20,9±2,1	93,4±8,4	<0,05
<i>p</i> ₁	>0,05	<0,05	
АсАТ, ед.			
исходное значение	28,8±2,3	32,9±3,1	>0,05
через 1 мес лечения	24,6±1,4	71,5±7,7	<0,05
<i>p</i> ₁	>0,05	<0,05	

течение месяца, что оказалось значимо больше, чем в группе сравнения (табл. 1, 2).

В последующем различия нивелировались и через 2 месяца химиотерапии значимых различий между группами не установлено.

Схожие изменения отмечаются и при анализе сроков ликвидации проявлений интоксикации у больных туберкулёзом без наличия МЛУ МБТ. При этом статистически значимые различия между группами (ОГ и ГС) сохраняются не только через 1 месяц химиотерапии, но и более длительно.

Из представленных результатов видно благоприятное действие реамберина на сроки ликвидации интоксикационного синдрома, в большей степени в первый месяц химиотерапии.

Одним из проявлений НПР на ПТП является их негативное влияние на печень. Анализ динамики показателей функции печени у пациентов с наличием МЛУ МБТ ОГ и ГС показал, что при одинаковых их исходных значениях через 1 месяц химиотерапии в ОГ наблюдаются положительные тенденции в виде снижения активности АлАТ и АсАТ. В ГС напротив эти показатели имеют отрицательную направленность, и через 1 месяц хи-

миотерапии их значение значимо превышают свои исходные значения и таковые показатели у больных ОГ (табл. 3).

Наиболее выраженное влияние реамберина наблюдалось у пациентов с исходно высокими показателями функции печени. Через 1 месяц химиотерапии у этих больных (*n*=10) активность АлАТ снизилась с 69,9±9,5 ед. до 26,1±4,3 ед. (*p*<0,001) и АсАТ с 80,4±8,3 ед. до 33,4±4,2 ед. (*p*<0,001).

Несколько иная картина наблюдалась при анализе влияния реамберина на вышеуказанные показатели у пациентов без наличия МЛУ МБТ. В ОГ статистически значимых различий в исходных значениях показателей функции печени и результатах через 1 месяц не выявлено. В то же время в ГС наблюдаются статистически значимые различия в виде повышения активности АлАТ и АсАТ до лечения и через 1 месяц терапии. Через 1 месяц химиотерапии показатели активности АлАТ и АсАТ у пациентов ГС значимо превышают таковые в ОГ (табл. 4).

Таким образом, выявляется положительный эффект реамберина на функциональное состояние печени на фоне химиотерапии туберкулёза. Изло-

Таблица 5. Частота и характер НПР у больных туберкулёзом с наличием МЛУ МБТ в основной группе и группе сравнения

Сроки ликвидации интоксикационного синдрома	Группы обследуемых				<i>p</i>
	основная группа (ОГ _а), <i>n</i> =173		группа сравнения (ГС _а), <i>n</i> =146		
	абс.	%	абс.	%	
Аллергические НПР	12	6,9	22	15,1	<0,05
Токсические НПР	26	15,0	58	39,7	<0,05
Дисбактериоз	8	4,6	13	8,9	>0,05
Тяжелые ПР	8	4,6	15	10,3	=0,05
Неустрашимые ПР	14	8,1	27	18,5	<0,05
Всего пациентов с НПР	46	26,6	93	63,7	<0,05

Примечание. Здесь и табл. 6: *p* — достоверность различий между группами.

Таблица 6. Частота и характер НПР у больных туберкулёзом без наличия МЛУ МБТ в основной группе и группе сравнения

Сроки ликвидации интоксикационного синдрома	Группы обследуемых				p
	основная группа (ОГ _а), n=84		группа сравнения (ГС _а), n=95		
	абс.	%	абс.	%	
Аллергические НПР	7	8,3	10	10,5	>0,05
Токсические НПР	5	6,0	20	21,0	<0,05
Дисбактериоз	1	1,2	2	2,1	>0,05
Неустрашимые ПР	2	2,4	10	10,5	<0,05
Всего пациентов с НПР	13	15,5	32	33,6	<0,05

женное позволяет считать целесообразным применение реамберина как средства патогенетического воздействия при химиотерапии туберкулёза.

Изучено влияние применения реамберина на частоту и характер развития НПР у пациентов как при наличии МЛУ МБТ, так и без нее. Данные по основной группе и группе сравнения представлены в табл. 5 и 6.

Частота развития НПР в основной группе (где применялся реамберин на фоне химиотерапии) оказалась значимо ниже, чем в группе сравнения 26,6 и 63,7% ($p<0,05$) соответственно, прежде всего за счёт уменьшения токсических ПР (см. табл. 5, 6). При этом изменился и характер НПР в данной группе. Тяжёлые и неустрашимые ПР у больных этой группы наблюдались значимо реже, чем в группе сравнения.

Следует отметить, что схожие изменения отмечены и при анализе НПР у больных туберкулёзом без наличия МЛУ МБТ. В ГС частота НПР значимо превышает таковую в ОГ 33,6

и 15,5% ($p<0,05$) соответственно. При этом токсические ПР развиваются в этой группе в 3,5 раза чаще ($p<0,05$), а неустрашимые в 4,4 раза чаще ($p<0,05$), чем в ОГ.

Таким образом, реамберин оказал заметное профилактическое действие в отношении частоты возникновения НПР при химиотерапии больных туберкулёзом.

Выводы

1. Применение реамберина способствует сокращению сроков ликвидации проявлений туберкулёзной интоксикации.

2. Реамберин оказывает нормализующее действие на функцию печени при химиотерапии больных туберкулёзом.

3. Назначение реамберина позволяет значительно снизить частоту и тяжесть НПР при химиотерапии больных туберкулёзом, в первую очередь токсических, как при наличии МЛУ МБТ, так и без нее.

ЛИТЕРАТУРА

- Оковитый С. В. и др. Исследование гепатопротекторного эффекта белитила на модели олитального токсического поражения печени. Экспер клин фармакол 2006; 69: 2: 52—54.
- Баласанянц Г. С., Суханов Д. С., Айзиков Д. Л. Побочные действия противотуберкулёзных препаратов и методы их устранения: учеб. пособие. СПб.: 2011; 88.
- Моргунов С. С. Коррекция реамберинотканевой гипоксии у хирургических больных с гастродуоденальным кровотечением. Вест интенсив тер 2006; 2: 32—35.
- Реамберин в клинической практике / Под общей редакцией М. Г. Романцова и А. Л. Коваленко. Практ руководство для врачей ОРИТ. Раздел. Реамберин во фтизиатрии.
- Яковлев А. Ю. и др. Применение реамберина в интенсивной терапии перитонита, осложнённого полиорганной недостаточностью. Метод пос Н.Новгород, 2007.
- Чуканов В. И., Каминская Г. О., Ливчане Э. Частота и характер побочных реакций при лечении больных туберкулёзом препаратами резервного ряда. Проблем туб 2004; 10: 6—10.
- Косинец В. А., Смагина А. Н. Реамберин в лечении хирургических заболеваний. Хирург 2012; 7: 93—96.
- Фещенко Ю. И. и др. Оценка значимости побочных реакций противотуберкулёзных препаратов при лечении туберкулёза. Укр. Мед. Часопис 2008; 3.
- Панова Л. В., Овсянкина Е. С. Частота развития и виды побочных реакций на химиотерапию у подростков, больных туберкулёзом. Пробл туб бол лег 2003; 1: 28—30.

Диоксидин: антимикробная активность и перспективы клинического применения на современном этапе

Д. А. ПОПОВ, Н. М. АНУЧИНА, А. А. ТЕРЕНТЬЕВ, Г. В. КОСТЮК, Л. А. БЛАТУН, Е. В. РУСАНОВА,
И. А. АЛЕКСАНДРОВА, Т. Я. ПХАКАДЗЕ, Н. С. БОГОМОЛОВА, Л. П. ТЕРЕХОВА

Институт хирургии им. А. В. Вишневского, Москва

Dioxidin: Antimicrobial Activity and Prospects of Its Clinical Use at Present

D. A. POPOV, N. M. ANUCHINA, A. A. TERYTYEV, G. V. KOSTYUK, L. A. BLATUN, E. V. RUSANOVA,
I. A. ALEKSANDROVA, T. YA. PKHAKADZE, N. S. BOGOMOLOVA, L. P. TEREKHOVA

A. V. Vishnevsky Institute of Surgery, Moscow

Цель — определить *in vitro* активность диоксидина в отношении возбудителей нозокомиальных инфекций, а также его цитотоксичность. **Материал и методы.** Исследовано 300 штаммов микроорганизмов, выделенных от больных с нозокомиальными инфекциями. МПК диоксидина определялись методом серийных разведений в бульоне. Цитотоксичность диоксидина изучали с помощью МТТ-метода определения жизнеспособности клеточных культур. **Результаты.** Диоксидин в концентрациях от 2 до 1024 мкг/мл был активен в отношении 279/300 (93%) исследованных штаммов. Препарат подавлял рост всех грамотрицательных бактерий, наибольшая активность отмечена в отношении энтеробактерий по сравнению с неферментирующими грамотрицательными бактериями: медиана, минимум и максимум МПК диоксидина составили 12 (4—32) и 32 (16—64) мкг/мл соответственно. Менее активен диоксидин был в отношении грамположительных бактерий и грибов. При этом для 7/70 (10%) протестированных стафилококков, 9/28 (32%) энтерококков и всех исследованных штаммов грибов рода *Candida* МПК диоксидина была >1024 мкг/мл. IC_{50} диоксидина составила $2,4 \pm 0,3$ mM (низкая цитотоксичность). **Выводы.** Полученные результаты свидетельствуют о целесообразности использования диоксидина в качестве антимикробного препарата для местного лечения грамотрицательных бактериальных инфекций при условии обеспечения адекватных тканевых концентраций.

Ключевые слова: нозокомиальные инфекции, антимикробная терапия, диоксидин.

In vitro activity of dioxidin against pathogens of nosocomial infections and its cytotoxicity were estimated. The study involved 300 isolates from patients with nosocomial infections. The MICs of dioxidin were determined with the method of serial dilutions in broth. The dioxidin cytotoxicity was investigated with the MTT assay to assign the cell culture viability. In concentrations of 2 to 1024 mcg/ml dioxidin was active against 279/300 (93%) strains. The drug inhibited the growth of all the gramnegative isolates. The highest activity was observed against Enterobacteriaceae vs. nonfermenting gramnegative bacteria: the median, minimum and maximum MICs of dioxidin were 12 (4—32) and 32 (16—64) mcg/ml respectively. The dioxidin activity against gramnegative bacteria and fungi was lower. The MIC of dioxidin for 7/70 (10%) staphylococcal isolates, 9/28 (32%) enterococcal isolates and all the *Candida* isolates was > 1024 mcg/ml. The IC_{50} of dioxidin was 2.4 ± 0.3 mM (low cytotoxicity). The results showed that the use of dioxidin as an antimicrobial for local application was advisable in the treatment of gramnegative bacterial infections provided adequate tissue concentrations were attained.

Key words: nosocomial infections, antimicrobial therapy, dioxidin.

Памяти профессора Е. Н. Падейской посвящается.
Диоксидин — это значительная часть сердца
Елены Николаевны! Многие многие тысячи спасённых
больных от сепсиса, от тяжёлых последствий
раневых инфекций — результат использования диоксидина

Введение

Несмотря на строгое соблюдение правил асептики и антисептики, совершенствование хирургической техники и послеоперационного ухода, а также на внедрение новых антимикробных препаратов, инфекции остаются важной проблемой современных стационаров. Гнойно-септические осложнения приводят к существенному уве-



© Коллектив авторов, 2013

Адрес для корреспонденции: 117997 Москва, Б. Серпуховская, 27.
Институт хирургии им. А. В. Вишневского

личению длительности госпитализации и резкому возрастанию затрат на лечение, препятствуют снижению показателей летальности.

В последние годы в этиологической структуре нозокомиальных инфекций практически повсеместно наблюдаются неблагоприятные тенденции к значимому возрастанию доли полирезистентных штаммов микроорганизмов [1, 2]. Особую проблему при этом представляют граммотрицательные мультirezистентные бактерии, в частности штаммы *Acinetobacter baumannii*, характеризующиеся резистентностью к карбапенемам и сульбактаму [3], а также энтеробактерии — продуценты карбапенемаз [4]. При этом крайне тревожной является тенденция по выявлению фенотипов резистентности, характерных для госпитальных возбудителей, во внебольничной среде [5].

Лечение инфекций, вызванных неферментирующими граммотрицательными бактериями (НФГБ) и энтеробактериями, обладающими механизмами быстрого формирования резистентности, в настоящее время представляет собой существенные трудности в плане выбора эффективных схем антибактериальной терапии. Крайне ограниченный и прогрессивно сужающийся арсенал средств, сохранивших эффективность при инфекциях указанной этиологии, обуславливает возрастание интереса к препаратам, имевшим широкое применение в недалеком прошлом, но практически оставленным в связи с появлением новых препаратов. Речь идет о диоксидине — отечественном синтетическом препарате широкого спектра действия, производном ди-N-оксида хиноксалина.

Диоксидин был разработан в конце 60-х годов прошлого века во Всесоюзном научно-исследовательском химико-фармацевтическом институте им. Серго Орджоникидзе (г. Москва) [6]. Большой вклад в доклинические и клинические стадии изучения диоксидина, а также в обобщение опыта его применения в медицинской практике был сделан проф. Е. Н. Падейской. Препарат разрешён для использования в клинической практике с 1976 г., в настоящее время производится на территории Российской Федерации и доступен в виде водных растворов для внутривенного и внутримышечного введения, а также в виде различных лекарственных форм для наружного применения.

Диоксидин, по результатам исследований *in vitro*, проведённых в 80-х годах прошлого века, характеризовался высокой бактерицидной активностью в отношении широкого спектра микроорганизмов, включая анаэробные [7, 8]. Наибольшая активность диоксидина была выявлена в отношении энтеробактерий, менее чувствительными оказались НФГБ, стафилококки и стрептококки. Механизм антибактериального действия диокси-

дина связан с повреждением бактериальных клеток за счёт активации свободнорадикальных механизмов, приводящих, в частности, к необратимым изменениям структуры нуклеоида, причём уже при воздействии субингибирующих концентраций. В анаэробных условиях было отмечено возрастание антибактериальной активности препарата в 8—128 раз в зависимости от вида возбудителя [7,8]. Перекрёстная резистентность с другими антимикробными препаратами отсутствует. При местном применении диоксидин не обладает раздражающими свойствами, причём, наряду с антибактериальным действием, он способствует более быстрому течению репаративных процессов и эпителизации раны [8].

Многолетний разноплановый опыт широкого практического использования диоксидина свидетельствует о высокой эффективности данного препарата, как при местном (в виде раствора, мази, импрегнированных перевязочных средств и шовного материала), так и при системном его применении. Описаны успешные результаты его применения у больных при инфекциях кожи и мягких тканей, остеомиелите, тяжёлой пневмонии, эмпиеме плевры, у пациентов абдоминального и урологического профиля, а также в оториноларингологии [8]. В течение многих лет диоксидин, наряду с традиционными антибиотиками рутинно, применялся для периоперационной профилактики, в том числе при операциях на сердце и магистральных сосудах [9]. Недавно был предложен способ использования данного препарата в качестве стерилизующего агента, применяемого при производстве и предимплантационном хранении имплантируемых материалов (заплат, клапанов сердца) из ксеногенной и аллогенной ткани [10]. Следует также отметить разработки мыла с антимикробными свойствами, содержащего липосомальный диоксидин [11].

В связи с отсутствием удовлетворяющих современным требованиям доказательных данных по безопасности парентерального введения диоксидина, системное применение данного препарата может быть показано только в качестве средства крайнего резерва. При местном и внутримышечном использовании диоксидина следует учитывать возможность резорбтивного эффекта, особенно при обширном характере поражения. Несмотря на устоявшуюся практику, в настоящее время не рекомендуется использование любых лекарственных форм диоксидина в детском возрасте.

В связи с тем, что с момента последних публикаций по результатам исследований антимикробной активности диоксидина прошло более 20 лет, назрела необходимость оценки чувствительности к данному препарату современных нозокомиальных патогенов, а также уточнение данных по его

токсичности с «прицелом» на местное применение. Поиск ответов на эти вопросы явился целью настоящего исследования.

Материал и методы

В рамках многоцентрового исследования *in vitro* определена чувствительность 300 штаммов микроорганизмов: грамотрицательных бактерий — 197, из них энтеробактерий — 102, НФГБ — 95, грамположительных — 98 бактерий, из них стафилококков — 70, энтерококков — 28, а также дрожжеподобных грибов — 5, выделенных от взрослых больных с инфекционными очагами различной локализации. Среди последних основные виды — послеоперационные, посттравматические гнойные раны кожи и мягких тканей, синдром диабетической стопы, обширные трофические язвы, медиастинит, эмпиема плевры, катетер-ассоциированные инфекции кровотока, нозокомиальная пневмония. В исследовании приняли участие 5 крупных хирургических стационарах различного профиля г. Москвы.

При изучении анамнеза заболевания и анализе проводившегося лечения было установлено, что все больные, от которых были выделены исследованные штаммы, получали антимикробную терапию, в том числе с применением препаратов из групп карбапенемов, фторхинолонов, цефалоспоринов III–IV поколений, включая защищенные (цефоперазон/сульбактам). Это во многом обусловило то обстоятельство, что все выделенные микроорганизмы обладали выраженной устойчивостью к антимикробным препаратам: метициллинорезистентные стафилококки, полирезистентные НФГБ, энтеробактерии — продуценты бета-лактамаз расширенного спектра.

Источники выделения исследованных штаммов указаны в табл. 1.

Видовой состав микроорганизмов, включённых в исследование, приведен в табл. 2.

Определение минимальных подавляющих концентраций (МПК) диоксида в отношении исследованных штаммов осуществлялось методом серийных разведений в бульоне с использованием стерильных 96-луночных полистироловых планшетов по стандартной методике (Методические указания МУК 4.2. 1890-04 — определение чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препаратам). При этом в каждую лунку планшета вносили по 0,1 мл триптиказо-соевого бульона (ТСБ). Количество лунок определялось необходимым диапазоном разведений диоксида, последняя лунка использовалась для постановки контроля инокулюма.

Приготовление серийных разведений производили путём титрования исходного рабочего раствора диоксида, приготовленного с использованием 1% раствора диоксида и ТСБ и содержащего 4096 мкг/мл препарата. Рабочий раствор в количестве 0,1 мл при помощи микропипетки со стерильным наконечником вносили в первую лунку, содержащую 0,1 мл бульона. Тщательно перемешивали смесь и переносили 0,1 мл смеси во вторую лунку, содержащую первоначально 0,1 мл бульона. Процедуру повторяли до приготовления ряда разведений от 2048 до 1 мкг/мл.

Для инокуляции использовали микробную взвесь тестируемых микроорганизмов в концентрации 10^6 КОЕ/мл, приготовленную на питательном бульоне. По 0,1 мл инокулюма вносили в лунку, содержащую по 0,1 мл соответствующего разведения диоксида, а также в последнюю лунку с питательным бульоном без диоксида (контроль инокулюма).

Таблица 1. Источники выделения исследованных штаммов

Материал для исследования	Количество выделенных штаммов
Отделяемое нижних дыхательных путей	86
Раневое отделяемое	63
Кровь	47
Отделяемое по дренажу	39
Моча	23
Биоптат	19
Жёлчь	7
Сосудистый катетер	4
Ликвор	3
Прочее	9
Всего	300

Таблица 2. Состав исследованных микроорганизмов

Микроорганизм	n	%
<i>Acinetobacter baumannii</i>	47	15,7
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	47	15,7
<i>Staphylococcus</i> spp., коагулазоотрицательный	43	14,3
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	41	13,7
<i>Escherichia coli</i>	27	9
<i>Staphylococcus aureus</i>	27	9
<i>Enterococcus</i> spp.	23	7,6
<i>Enterobacter cloacae</i>	16	5,3
<i>Proteus mirabilis</i>	8	2,6
<i>Enterococcus faecalis</i>	5	1,7
<i>Candida parapsilosis</i>	3	1
<i>Burkholderia cepacia</i>	3	1
<i>Pseudomonas putida</i>	2	0,7
<i>Candida albicans</i>	2	0,7
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	2	0,7
<i>Serratia marcescens</i>	2	0,7
<i>Proteus vulgaris</i>	1	0,3
<i>Citrobacter freundii</i>	1	0,3
Всего	300	100

При этом с учётом разведения инокулюмом диапазон конечных концентраций диоксида составил от 1024 до 0,5 мкг/мл. Планшеты, закрытые стерильной плёнкой, инкубировали в аэробных условиях при температуре 35°C в течение 16–20 ч. Учёт результатов проводили визуально путём просмотра планшетов в проходящем свете. Рост культуры в присутствии диоксида сравнивали с ростом культуры в референтной ячейке без диоксида (контроль инокулюма). При этом определяли наименьшую концентрацию диоксида, полностью подавляющую рост тестируемого микроорганизма. В рамках контроля качества приготовленная суспензия тестируемых микроорганизмов проверялась на чистоту путём посева на плотные питательные среды, а также контролировался рост культуры в бульоне без диоксида.

Цитотоксичность диоксида, т. е. свойство данного вещества вызывать патологические изменения в клетках, изучали с помощью МТТ-метода определения жизнеспособности клеточных культур. Эксперименты проводили на клетках аденокарциномы шейки матки человека (HeLa) которые выращивались при температуре 37°C в атмосфере с 5% CO₂ в среде DMEM, содержащей 10% сыворотку новорождённых телят.

Суть МТТ-теста заключается в способности живых клеток превращать растворимый жёлтый бромид 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-тетразолия (МТТ) в нерастворимые пурпурно-синие внутриклеточные кристаллы МТТ-формаза. Нежизнеспособные мёртвые клетки такой способностью не обладают. Эксперимент проводился по методике, описанной М. Niks и М. Otto [12] с небольшими модификациями. Клетки рассеивали в культуральные планшеты, через 24 ч в среду добавляли исследуемый препарат в разных концентрациях. Через 24 ч после внесения препарата в среду добавляли МТТ до конечной концентрации 0,5 мг/мл, и клетки инкубировали далее в течение 4 ч. Затем клетки лизировали, образование кристаллов формазана в живых клетках определяли измерением оптической плотности полученных клеточных лизатов при 570 нм при фоновой длине волны 650 нм.

Для эксперимента использовали различные конечные концентрации водного раствора диоксида, максимальная из которых была 4,5 млМ. Было проведено 5 серий экспериментов, по результатам которых определено значение дозы IC₅₀ (концентрация препарата, вызывающая снижение МТТ-окрашивания на 50%).

Результаты исследований

Существенных различий в чувствительности *in vitro* к диоксиду микроорганизмов одного вида, выделенных из различных биоматериалов в различных исследовательских центрах, выявлено не было, поэтому данные приведены в объединённом виде (табл. 3 и 4, рис. 1).

В связи с отсутствием активности препарата в концентрациях <2 мкг/мл результаты представлены, начиная с концентрации 2 мкг/мл.

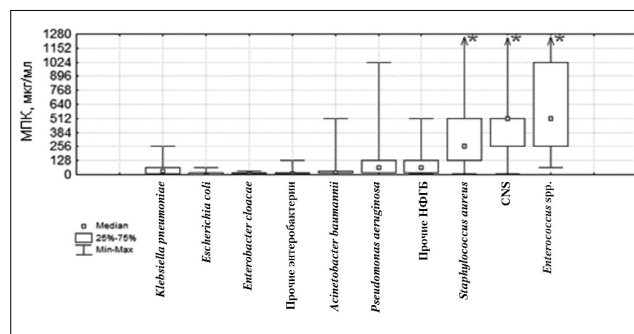


Рис. 1. Распределение исследованных штаммов по величине МПК диоксида, (медиана, интерквартильный размах, минимум и максимум).

* — максимальные значения МПК для данных микроорганизмов превышают верхний предел исследованных концентраций.

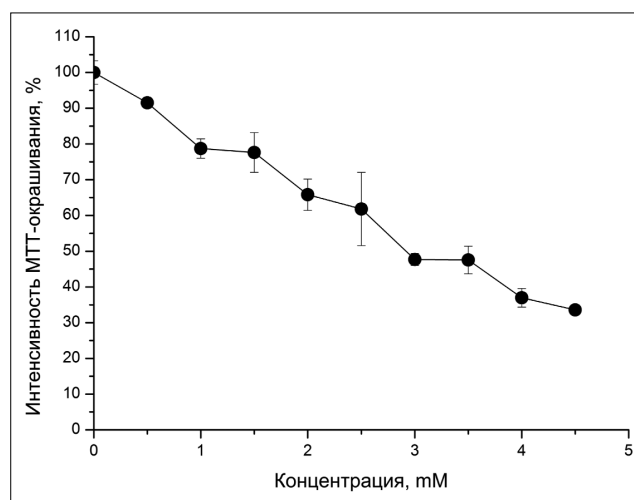


Рис. 2. Изменение МТТ-окрашивания клеток HeLa при действии диоксида.

Из представленных данных следует, что диоксид в концентрациях от 2 до 1024 мкг/мл был активен в отношении 279/300 (93%) исследованных штаммов госпитальных микроорганизмов. В указанном диапазоне препарат подавлял рост всех исследованных штаммов грамотрицательных бактерий, при этом в целом отмечена большая активность в отношении энтеробактерий по сравнению с НФГБ. Штаммы *K.pneumoniae* ха-

Таблица 3. Распределение исследованных штаммов по величине МПК диоксида, мкг/мл (в%)

Микроорганизм	n	2	4	8	16	32	64	128	256	512	1024	>1024
<i>K.pneumoniae</i>	47	4,3	17	8,5	10,6	29,8	21,3	6,4	2,1	0	0	0
<i>E.coli</i>	27	11,1	40,7	22,2	11,1	7,4	7,4	0	0	0	0	0
<i>E.cloacae</i>	16	6,3	12,5	50	25	6,3	0	0	0	0	0	0
Прочие энтеробактерии	12	8,3	8,3	33,3	33,3	8,3	0	8,3	0	0	0	0
<i>A.baumannii</i>	47	0	4,3	8,5	57,4	19,1	2,1	0	4,3	4,3	0	0
<i>P.aeruginosa</i>	41	0	7,3	4,9	14,6	22	19,5	14,6	9,8	2,4	4,9	0
Прочие НФГБ	7	0	0	14,2	14,2	0	28,6	28,6	0	14,2	0	0
<i>Staphylococcus</i> spp. CN	43	0	0	2,3	2,3	0	0	14	23,3	27,9	18,6	11,6
<i>S.aureus</i>	27	0	0	3,7	0	0	14,8	18,5	14,8	22,2	18,5	7,4
<i>Enterococcus</i> spp.	28	0	0	0	0	0	3,6	10,7	3,6	32,1	17,9	32,1

Таблица 4. Величина МПК диоксида в отношении исследованных штаммов (минимум и максимум) (в мкг/мл)

Микроорганизм	n	МПК _{мин}	МПК _{макс}
<i>K.pneumoniae</i>	47	2	256
<i>E.coli</i>	27	2	64
<i>E.cloacae</i>	16	2	32
Прочие энтеробактерии	12	2	128
<i>A.baumannii</i>	47	4	512
<i>P.aeruginosa</i>	41	4	1024
Прочие НФГБ	7	8	512
<i>Staphylococcus</i> spp. CN	43	8	>1024
<i>S.aureus</i>	27	8	>1024
<i>Enterococcus</i> spp.	28	64	>1024

рактиковалась несколько большей устойчивостью по сравнению с другими протестированными энтеробактериями — медиана и интерквартильный размах МПК диоксида для данного вида микроорганизмов составили 32 (8—64) мкг/мл по сравнению с 4 (4—16) мкг/мл для *E.coli* и 8 (8—16) мкг/мл для *E.cloacae*. Среди НФГБ штаммы *A.baumannii* были более чувствительны по сравнению с *P.aeruginosa* — медиана и интерквартильный размах МПК диоксида составили 16 (16—32) мкг/мл и 64 (16—128) мкг/мл соответственно. Существенно менее активным диоксидин был в отношении грамположительных бактерий и грибов. При этом в отношении 7/70 (10%) протестированных стафилококков, 9/28 (32%) энтерококков и всех исследованных штаммов грибов рода *Candida* МПК диоксида были >1024 мкг/мл. Активность препарата в отношении штаммов коагулазонегативных и золотистого стафилококков значимо не различалась.

Результаты исследования цитотоксичности диоксида МТТ-методом показаны на рис. 2. Значение IC₅₀ для диоксида по результатам 5 независимых экспериментов составило 2,4±0,3 mM.

Заключение

Полученные нами результаты определения МПК диоксида в отношении наиболее распространённых возбудителей госпитальных инфекций согласуются с ранее опубликованными данными [7, 8]. При этом за истекшие несколько десятков лет, несмотря на широкое практическое использование данного препарата, его МПК в отношении ряда микроорганизмов не только не возросли, но даже несколько снизились. Так, в соответствии с [8] МПК диоксида в отношении *K.pneumoniae* находились в пределах 4—128 мкг/мл, *E.coli* — 8—250 мкг/мл, *P.aeruginosa* — 31,2—1000 мкг/мл, *Staphylococcus* spp. CN — 65,2—1000 мкг/мл, что превышает нижние пороговые значения МПК, определённые в настоящем исследовании (табл. 4).

Существенных различий в чувствительности к диоксиду микроорганизмов одного вида, выделенных из различных биоматериалов, в различных исследовательских центрах выявлено не бы-

ло, что может свидетельствовать об отсутствии формирования и распространения приобретённой резистентности.

Следует отметить, что, в соответствии с данными литературы и результатами настоящего исследования, МПК диоксида в отношении большинства клинически значимых микроорганизмов существенно превышают показатели, характерные для используемых на практике антибактериальных препаратов. Поэтому, принимая во внимание узкую широту терапевтического действия и недостаточное количество доказательных данных об эффективности и безопасности системного применения диоксида, с учётом полученных в настоящем исследовании результатов, данный препарат следует рассматривать преимущественно в качестве средства для местного лечения бактериальных инфекций при условии обеспечения адекватных тканевых концентраций, т. е. как антисептик.

Препарат сохранил активность в отношении современных штаммов бактерий, выделенных при микробиологическом исследовании отделяемого из дренажей у пациентов с панкреонекрозом, эмпиемой жёлчного пузыря, перитонитом, гнойных ран в клинике гнойной хирургии и травматологии-ортопедии — традиционных областей применения диоксида.

В связи с большой важностью проблемы зоокомиальных, в том числе ИВЛ-ассоциированных пневмоний, вызванных поли- и панрезистентными грамотрицательными бактериями (*A.baumannii*, *P.aeruginosa*), весьма перспективным представляется топическое ингаляционное применение диоксида в комплексной терапии данных осложнений и, возможно, для их профилактики. На эффективность такого пути введения данного препарата указывают публикации [8, 13]. Как и при любой ингаляционной терапии, при этом следует учитывать риск развития бронхоспастических реакций.

Недавно была показана возможность снижения частоты колонизации нижних дыхательных путей (НДП) путём ингаляционного применения диоксида у 102 взрослых больных, находящихся на продлённой (≥72 ч) искус-

венной вентиляции лёгких после операций на открытом сердце [14]. В качестве контроля проанализированы данные 75 сопоставимых больных, не получавших ингаляционную терапию диоксидином. Колонизация НДП зарегистрирована у 67/102 (66%) пациентов в исследуемой группе и у всех больных в контрольной группе ($p < 0,001$), видовой состав колонизирующих микроорганизмов был сходным. Время с момента начала ИВЛ до первого положительного результата при микробиологическом исследовании отделяемого НДП в исследуемой группе составило 9 (7–15) суток (от 3 до 20 суток), в контроле — 5 (4–8) суток (от 3 до 14 суток), $p = 0,03$. Препарат характеризовался хорошей переносимостью, нежелательных явлений, связанных с проведением ингаляционной терапии зарегистрировано не было. Данный способ позволяет значительно сократить частоту и отсрочить время наступления колонизации НДП у больных на продлённой ИВЛ, что может способствовать снижению риска развития ИВЛ-ассоци-

ированных пневмоний. Последнее нуждается в дальнейшем изучении.

Результаты определения IC_{50} диоксидина в соответствии с принятой классификацией позволяют отнести его к категории веществ, обладающих низкой цитотоксичностью [15].

Таким образом, на основании имеющихся в настоящее время данных по антимикробной активности, переносимости и токсичности диоксидин представляется перспективным препаратом для использования в современной клинической практике для местного лечения бактериальных инфекций, а также для профилактики развития инфекций НДП у больных, находящихся на ИВЛ. При использовании диоксидина следует иметь в виду его более выраженную активность *in vitro* в отношении грамотрицательных бактерий на фоне меньшей чувствительности стафилококков. Клиническая значимость данного феномена, по-видимому, нивелируется за счёт создания высоких концентраций препарата в инфекционном очаге при его местном применении.

ЛИТЕРАТУРА

1. Попов Д. А., Вострикова Т. Ю. Микробиологический мониторинг в кардиохирургическом стационаре — опыт за 10 лет. Бюлл НЦ ССХ им. А. Н. Бакулева РАМН 2012; 5: 68–76.
2. Lynch J. P. 3rd, Clark N. M., Zhanel G. G. Evolution of antimicrobial resistance among Enterobacteriaceae (focus on extended spectrum β -lactamases and carbapenemases). Expert Opin Pharmacother 2013; 14: 2: 199–210.
3. Mera R. M., Miller L. A., Amrine-Madsen H., Sahm D. F. *Acinetobacter baumannii* 2002–2008: increase of carbapenem-associated multiclass resistance in the United States. Microb Drug Resist 2010; 16: 3: 209–215.
4. Cantón R., Akóva M., Carmeli Y., Giske C. G., Glupczynski Y., Gniadkowski M., Livermore D. M., Miriagou V., Naas T., Rossolini G. M., Samuelsen Ø., Seifert H., Woodford N., Nordmann P.; European Network on Carbapenemases. Rapid evolution and spread of carbapenemases among Enterobacteriaceae in Europe. Clin Microbiol Infect 2012; 18: 5: 413–431.
5. Pitout J. D. Enterobacteriaceae that produce extended-spectrum β -lactamases and AmpC β -lactamases in the community: the tip of the iceberg? Curr Pharm Des 2013; 19: 2: 257–263.
6. Елина А. С., Цырульникова Л. Г., Магидсон О. Ю. Способ получения 1,4-ди-1-окси-2,3-бис(оксиметил) хиноксалина. А.с. № 207917, Бюлл изобретений 1968; 3: 19.
7. Большаков Л. В. Антибактериальная активность диоксидина в условиях аэро- и анаэробноз. Антибиотики и мед биотехнология 1986; 10: 760–764.
8. Падейская Е. Н. Антибактериальный препарат диоксидин: особенности биологического действия и значение в терапии различных форм гнойной инфекции. Инфекции и антимикроб тер 2001; 5: 150–155.
9. Богомолова Н. С., Орешикина Т. Д., Большаков Л. В. Профилактика и лечение послеоперационных гнойно-воспалительных осложнений с использованием цефуроксима. Антибиотики и химиотер 1999; 6: 27–32.
10. Костава В. Т., Бакулева Н. П., Лютова И. Г., Анучина Н. М., Кондратенко Ж. Е., Зеливанская М. В., Терещенкова И. А. Способ стерилизации и предимплантационного хранения биологических протезов из ксеногенной и аллогенной ткани для сердечно-сосудистой хирургии. Патент России № 2457867, 05.05.2011.
11. Барбинов В. В., Самцов А. В., Бабкин А. В., Атаманчук В. Н., Грашин Р. А., Лизунов Ю. В., Макаров П. П. Влияние нового антибактериального мыла с липосомами на бактерицидность и аутомикрофлору кожи. Что может стать альтернативой триклозану? Журн дерматовенерол косметол 2002; 1: 12–16.
12. Niks M., Otto M. Towards an optimized MTT assay. J Immunol Methods 1990; 130: 1: 149–151.
13. Практическое руководство по антиинфекционной химиотерапии / Под ред. Страчунского Л. С., Белоусова Ю. Б., Козлова С. Н. Смоленск, изд-во НИИХ СГМА, 2002; 586.
14. Попов Д. А., Вострикова Т. Ю., Анучина Н. М. Способ снижения частоты колонизации нижних дыхательных путей в раннем послеоперационном периоде у кардиохирургических больных на продлённой искусственной вентиляции лёгких. Сбор тезисов XVII Ежегодной сессии НЦ ССХ им. А. Н. Бакулева РАМН, Москва, 19–21 мая 2013 г.
15. Reichling J., Schnitzler P., Suschke U., Saller R. Essential oils of aromatic plants with antibacterial, antifungal, antiviral, and cytotoxic properties — an overview. Forsch Komplement med 2009; 16: 2: 79–90.

Иммунотропная терапия арбовирусных инфекций у детей

О. Г. КИМИРИЛОВА¹, М. Г. РОМАНЦОВ², Г. А. ХАРЧЕНКО¹

¹ ГБОУ ВПО «Астраханская государственная медицинская академия»

² ГБОУ ВПО «Северо-Западный медицинский университет им. И. И. Мечникова», Санкт-Петербург

Immunotropic Therapy of Arbovirus Infections in Children

O. G. KIMIRILOVA, M. G. ROMANTSOV, G. A. KHARCHENKO

Astrakhan State Medical Academy, Astrakhan

I. I. Mechnikov North-Western Medical University, St. Petersburg

Представлен материал по изучению цитохимических показателей лейкоцитов периферической крови, позволяющий оценить степень тяжести заболевания и контроль эффективности проводимой иммунотропной терапии. Показано, что дисбаланс интерлейкоцитарных микробицидных систем (ИМС) нейтрофилов отражает неспецифическую резистентность и состояние системы фагоцитоза, являясь объективным критерием адаптационного синдрома. Сочетание недостаточности компонентов ИМС и фибронектина плазмы крови предрасполагает к развитию бактериальных осложнений. Циклоферон, активизируя метаболическую активность фагоцитов, способствует ликвидации основных клинических симптомов заболевания (острого инфекционного поражения мозговых оболочек, повышенной температурной реакции, проявлений интоксикации), сокращая сроки пребывания пациентов в стационаре.

Ключевые слова: арбовирусный менингит, циклоферон, интралейкоцитарная микробицидная система фагоцитов.

Cytochemical indices of peripheral blood leukocytes were investigated. The results allowed to estimate the level of the disease severity and to control the immunotropic therapy efficacy. Dysbalance of the interleukocytic microbicidal systems (IMS) of neutrophils reflected the nonspecific resistance and the state of the phagocytic system as an objective criterion of the adaptation syndrome. Association of the deficiency of the IMS components and blood serum fibronectin were considered as a predisposition of bacterial complications. Cycloferon activated the phagocyte metabolic activity and promoted elimination of the main clinical symptoms of the disease (acute infective damage of the meninges, temperature elevation, intoxication signs), thus making shorter the hospitalization terms.

Key words: arbovirus meningitis, cycloferon, phagocyte interleukocytic microbicidal system.

Проблема арбовирусных инфекций в детском возрасте остается одной из актуальных, в связи с циркуляцией 10 арбовирусов, вызывающих заболевание. Несмотря на благоприятное течение арбовирусных инфекций, у 40—50% детей формируются остаточные явления в виде эпилепсии, гидроцефалии, органического поражения ЦНС [1—3].

Лечение арбовирусных инфекций основано на патогенетической и симптоматической терапии. Назначение противовирусных препаратов носит рекомендательный характер, ограничиваясь возрастными рамками из-за возможных побочных эффектов. Среди патогенетических факторов развития инфекционного процесса немаловажная роль принадлежит иммунной системе, поэтому применение иммунотропных средств обоснованно. Актуальными остаются

проблема рациональной терапии иммунотропными препаратами арбовирусных менингитов у детей, а также изучение клинической и прогностической значимости цитохимических показателей компонентов микробицидной системы лейкоцитов при арбовирусных заболеваниях. У детей фагоцитоз и обеспечивающие его завершённый характер интралейкоцитарные микробицидные системы (ИМС) оказывают влияние на течение и исход заболевания [4—8].

Цель работы — изучение метаболических процессов, цитохимических показателей лейкоцитов периферической крови для оценки степени тяжести, прогнозирования характера течения заболевания и контроля эффективности иммунотропной терапии.

Материал и методы

Основу исследования составили клинические наблюдения за 80 больными детьми с арбовирусным менингитом. Этиологический диагноз в группе исследования подтверждался выделением вирусных РНК из крови и ликвора методом ПЦР, серологическим исследованием — ИФА с использова-

© Коллектив авторов, 2013

Адрес для корреспонденции: 191015 Санкт-Петербург, ул. Кирочная, д. 41. СЗМУ им. И. И. Мечникова

нием парных сывороток крови для определения антител. Диагностическим считался титр IgM 1:800. Из 120 больных в группе исследования у 98 (81,7%) заболевание было вызвано вирусом Западного Нила, у 12 (10%) — штаммом 913-64, у 10 (8,3%) — штаммом «Астрахань-12».

Методом случайной выборки сформированы две группы больных. Контрольную группу составили 40 детей (20 детей в среднетяжёлой и 20 детей в тяжёлой форме арбовирусных менингитов), получавших стандартную терапию. Основную группу наблюдения составили также 40 детей (22 ребенка со среднетяжёлой и 18 — с тяжёлой формой арбовирусных менингитов), получавшие циклоферон дополнительно к стандартной терапии.

Основной фармакологический эффект циклоферона обусловлен способностью индуцировать титры α - и β -интерферона в органах и тканях, содержащих лимфоидные элементы. Препарат нарушает репликацию вируса, блокирует инкорпорацию вирусных ДНК или РНК в капсиды, увеличивает количество дефектных вирусных частиц и снижает вирус-индуцированный синтез белков в клетках. Он оказывает иммуномодулирующее, противовирусное и противовоспалительное действие, преодолевает гематоэнцефалический барьер [9].

Критериями оценки эффективности циклоферона служили продолжительность основных клинических симптомов заболевания (температурной реакции, интоксикации и менингеального синдрома), быстрота исчезновения нарушенных лабораторных показателей ликвора, крови и отсутствие нежелательных реакций, связанных приёмом циклоферона.

Использованы методы, с помощью которых определены компоненты интралейкоцитарной микробицидной системы гранулоцитов — неферментные катионные белки (НКБ), активность миелопероксидазы (МП) и показатель НСТ-теста (тест восстановления нитросинего тетразолия) у здоровых и больных детей. По разнице вариантов НСТ-теста судили о величине фагоцитарного резерва (ФР), так как абсолютная величина ФР не всегда является объективным показателем [7].

Стандартная терапия включала оксигенотерапию (40—60% O_2) как метод борьбы с гипоксией, проводимую через носовые катетеры. Учитывая риск развития бактериальных осложнений, использованы антибиотики из группы цефалоспоринов и аминогликозидов. Протившоковая терапия включала введение препаратов волемического действия (гелофузин, 5% альбумин) и глюкокортикоидов с учётом тяжести состояния и глубины шока. Гепаринотерапия проводилась с учётом стадии ДВС-синдрома, под контролем коагулограммы и времени свертывания. Симптоматическая терапия включала жаропонижающие средства (панadol), нестероидные противовоспалительные средства (индометацин).

Статистическую обработку полученных данных провели с помощью пакетов сертифицированных программ «MS Excel-2003» и «Statistica 7.0».

Результаты и обсуждение

Среди наблюдаемых пациентов преобладали больные со среднетяжёлой формой заболевания (68% от общего числа наблюдаемых). Сопутствующая патология представлена анемией, частыми ОРВИ в анамнезе (соответственно 18 и 41% от общего числа). При анализе клинических проявлений заболевания у детей наблюдаемых групп отмечено повышение температуры тела до 38,5°C и выше (87,5 и 90% среди больных группы контроля и основной соответственно), наличие менингеального синдрома (головная боль и рвота, не связанные с приёмом пищи, положительные менингеальные симптомы, воспалительные изменения в ликворе).

Применение циклоферона в ранние сроки заболевания (1—2 дня) способствовало более быстрой ликвидации симптомов острого инфекционного поражения мозговых оболочек, признаков менингеального синдрома, повышенной температурной реакции, проявлений интоксикации, более быстрому клиническому восстановлению нарушенных функций организма. Циклоферон сокращал сроки пребывания больных в стационаре в среднем на 3 дня (табл. 1). Показательно влияние препарата на динамику температурной реакции. Если до начала лечения детей температурная реакция была $>38^\circ\text{C}$, то уже на следующий день, после приёма циклоферона число детей с высокой лихорадкой сократилось в 1,8 раза (табл. 2).

Максимальное количество случаев снижения температуры на фоне приёма циклоферона наблюдалось к 3-му дню от начала приёма препарата. Если у больных контрольной группы повышенная температура тела сохранялась в 37,5%, то на фоне приёма препарата — лишь в 17,5% случаев ($p<0,01$) (см. табл. 2).

При субъективной оценке лечебной эффективности циклоферона «отличный» эффект имел место у 3 детей (7,5%), «хороший» — у 21 ребенка (52,5%) и «удовлетворительный» — у 16 (40%).

С целью выяснения иммунокорректирующего влияния циклоферона сопоставлены показатели

Таблица 1. Продолжительность клинических симптомов у детей в зависимости от степени тяжести заболевания

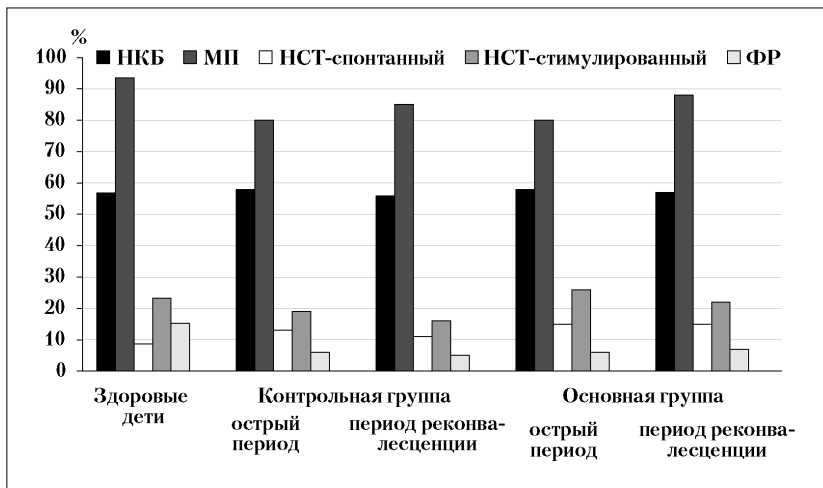
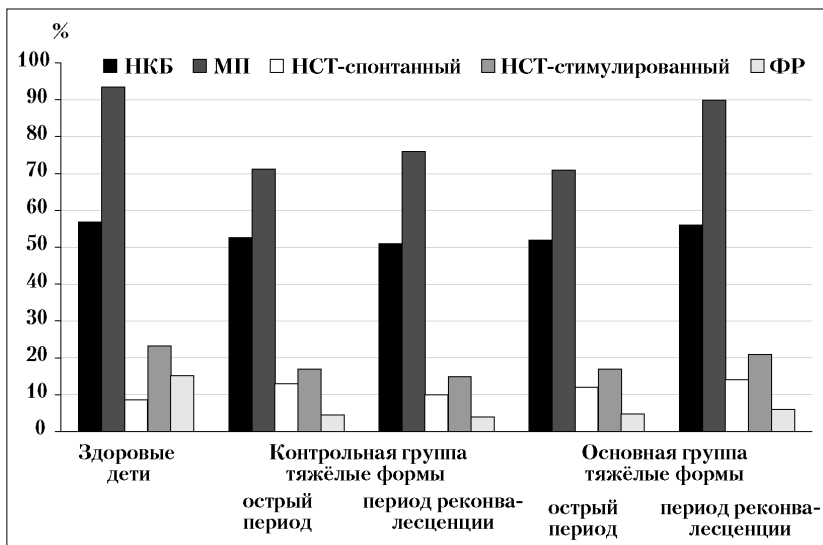
Клинические симптомы	Контрольная группа		Основная группа	
	тяжёлые больные (n=20)	среднетяжёлые больные (n=20)	тяжёлые больные (n=18)	среднетяжёлые больные (n=22)
Лихорадка, дни	4,0 $\pm$ 0,27	2,9 $\pm$ 0,11	2,9 $\pm$ 0,15*	1,7 $\pm$ 0,12*
Интоксикация, дни	5,8 $\pm$ 0,24	2,1 $\pm$ 0,27	2,2 $\pm$ 0,21*	1,7 $\pm$ 0,12*
Общемозговые симптомы, дни:				
головная боль	6,5 $\pm$ 0,26	5,0 $\pm$ 0,31	3,0 $\pm$ 0,1*	1,9 $\pm$ 0,18*
гиперестезия	7,0 $\pm$ 0,14	8,0 $\pm$ 0,24	4,5 $\pm$ 0,19*	2,7 $\pm$ 0,25*
рвота	3,1 $\pm$ 0,14	2,5 $\pm$ 0,18	1,5 $\pm$ 0,1*	1,2 $\pm$ 0,1*
Длительность менингеальных симптомов, дни	9,1 $\pm$ 0,31	8,2 $\pm$ 0,27	5,9 $\pm$ 0,3*	5,1 $\pm$ 0,25*

Примечание. * — различия показателей достоверны ($p<0,05$) по сравнению с контрольной группой.

Таблица 2. Динамика температурной реакции у детей с арбовирусными менингитами при приёме препарата циклоферон

Показатель	До поступления	1-й	2-й	3-й	4-й	5-й	6-й	7-й день
Контрольная группа (n=40)								
Всего с повышенной t°C, в том числе	40/100	32/80,0	25/62,5	15/37,5	6/15	3/7,5	2/5	2/5
37,0—37,9°C	13/32,5	18/45	20/50	12/30	5/12,5	3/7,5	2/5	2/5
38,0—38,9°C	20/50	12/30	5/12,5	3/7,5	1/2,5	0	0	0
>39,0°C	7/17,5	2/5	0	0	0	0	0	0
Основная группа (n=40)								
Всего с повышенной t°C, в том числе	40/100	24/60	16/40*	7/17,5*	2/5,1*	1/2,5*	0	0
37,0—37,9°C	13/32,5	12/30	11/27,5	6/15	2/5,0	1/2,5	0	0
38,0—38,9°C	17/42,5	9/22,5	5/12,5	1/2,5	0	0	0	0
>39,0°C	10/25	3/7,5	0	0	0	0	0	0

Примечание. * — различия достоверны ($p < 0,05$) при сравнении соответствующего показателя с группой контроля; n — число детей. В числителе — число больных, в знаменателе — процент от общего количества больных.

**Рис. 1.** Показатели микробицидной системы лейкоцитов у детей (n=22) с арбовирусными менингитами средней тяжести, находившихся на разных терапевтических режимах.**Рис. 2.** Показатели микробицидной системы лейкоцитов у детей (n=18) с тяжёлой формой арбовирусных менингитов, находившихся на разных терапевтических режимах.

микробицидной системы гранулоцитов — НКБ, МП, НСТ-тест и фагоцитарный резерв (ФР), позволяющие судить о завершённости фагоцитоза. Исходные показатели ИМС больных сравниваемых групп характеризовались увеличением показателя НСТ-теста, снижением величины ФР и показателя МП (рис. 1 и 2).

Показатели НКБ, МП, стимулированного НСТ-теста и ФР были ниже значений здоровых лиц, а к периоду выздоровления (4-я неделя заболевания) их нормализации не наблюдали (см. рис. 1 и 2), что объясняется иммуносупрессивным действием липополисахаридов вируса или микробов-ассоциантов, частота выделения которых возрастала к 3 неделе болезни.

У больных со среднетяжёлыми формами заболевания активность компонентов ИМС была выше, быстрее купировались общеинфекционные симптомы (лихорадка, интоксикационный синдром), определилась тенденция уменьшения воспалительного процесса в мозговых оболочках. Более выраженное снижение активности компонентов ИМС отмечали при тяжёлых формах заболевания (см. рис. 2).

При изучении метаболической активности лейкоцитов периферической крови в спонтанном и стимулированном НСТ-тесте установлено, что, независимо от степени тяжести заболевания, показатели спонтанного НСТ-теста были выше, а стимулированного ниже показателей у здоровых лиц. У больных с тяжёлой формой ме-

Таблица 3. Показатели ФН плазмы крови и компонентов микробицидной системы лейкоцитов у детей

Клинические группы	ФН, мкг/мл	НСТ-тест спонтанный, %	ФР, %	КБ, %	МП, %
Здоровые дети (n=30)	101,0±2,0	8,6±0,72	14,6±0,6	56,9±1,4	93,6±2,14
Острый период					
Среднетяжёлая форма (n=80)	64,8±3,5	13,2±0,7	5,8±0,9	57,9±0,7	80,1±1,4
Тяжёлая форма (n=30)	56,9±4,0	12,7±1,1	4,4±0,7	52,7±0,9	71,3±1,5
С латентным дефицитом МС (n=7)	21,2±3,7*	7,4±0,6*	3,1±0,4	50,5±2,6	48,6±1,5*
1-й вариант гранулоцитопатии					
Критическая ситуация (n=3)	13,6±2,5*	6,5±0,8*	3,0±0,6	48,6±3,1	42,4±2,6*
2-й вариант гранулоцитопатии					
Период реконвалесценции					
Среднетяжёлая форма (n=82)	112,1±4,9	11,0±0,7	4,6±0,6	56,0±1,1	80,0±1,5
Тяжёлая форма (n=33)	98,5±6,2	10,4±0,9	4,2±0,5	51,1±1,5	76,3±1,6
Затяжное течение (n=4)	49,6±3,7**	7,5±0,6	3,5±0,4	46,2±1,3**	66,9±10,4**
2-й вариант гранулоцитопатии					
Летальный исход (n=1)	8,0	5,0	2,0	34,0	38,0

Примечание. * — $p < 0,05$ достоверность относительно показателей без исходной супрессии тяжёлых форм; ** — $p < 0,05$ достоверность латентного дефицита к затяжному течению.

нингита спонтанный НСТ-тест (на 1-й и 2-й неделе заболевания) колебался от 9,5 до 13,8% (в норме $8,6 \pm 0,7\%$). Величина стимулированного НСТ-теста в эти же сроки составила от 13,6 до 18,0% (в норме $23,2 \pm 0,84\%$). У пациентов со среднетяжёлой формой инфекции показатель спонтанного НСТ-теста составлял от 10,3 до 13,9%, а стимулированный НСТ-тест от 15 до 20,5%. Показатель ФР больных со среднетяжёлой и тяжёлой формами заболевания в 3 раза ниже нормы. Наблюдали нарушение соотношения клеток с различной степенью активности в показателях НКБ и МП, что чётко фиксировалось соотношением клеток с высокой и умеренной активностью (K_1), а также количеством клеток с высокой активностью от общего количества положительно реагирующих клеток (K_2). Коэффициенты снижены в 2–3 раза, за счёт иммуносупрессивного действия возбудителя и его токсина, но усиленное поглощение фагоцитами нитросинего тетразолия указывает на относительную сохранность их метаболической активности.

У больных основной группы (рис. 1–3), отмечено стимулирующее влияние циклоферона на функционально-метаболическую активность лейкоцитов. В отличие от показателей больных контрольной группы, величина НКБ увеличилась как при тяжёлых, так и при среднетяжёлых формах заболевания, приближаясь к уровню нормы $56,9 \pm 1,4\%$ [10].

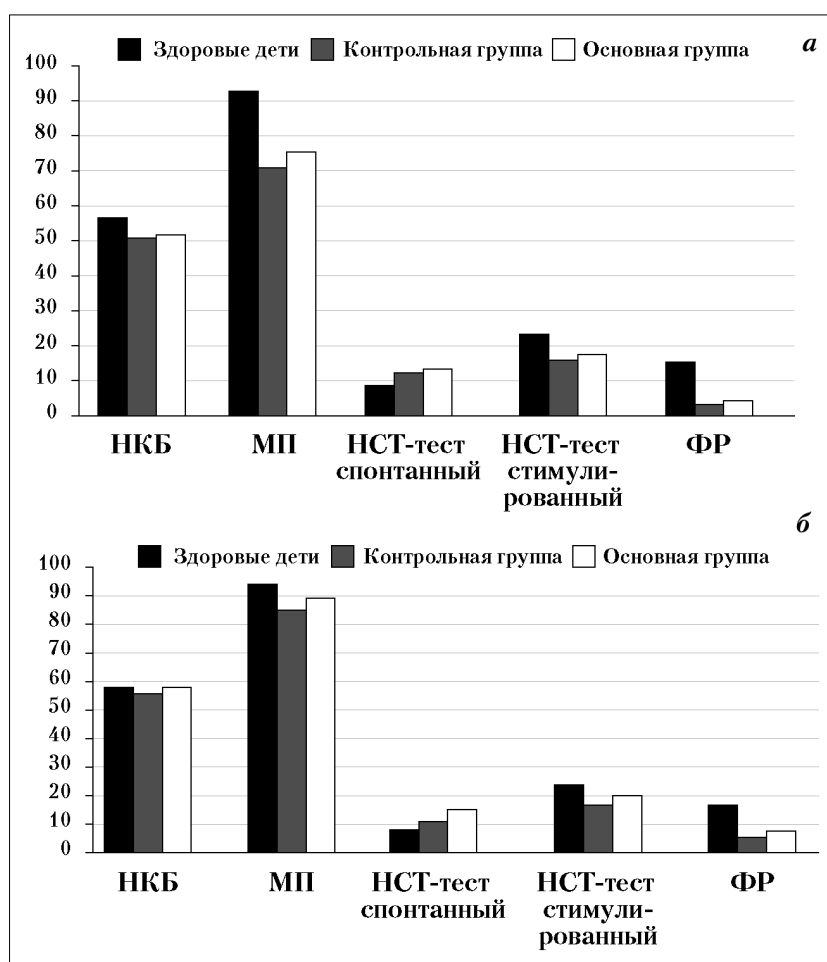


Рис. 3. Динамика показателей ИМС лейкоцитов при арбовирусных менингитах у детей в зависимости от степени тяжести и проводимой терапии.
а — тяжёлые формы заболевания; б — среднетяжёлые формы.

Показатель МП увеличивался на 18,5% при тяжёлых формах (с $70,96 \pm 1,4\%$ до $89,5 \pm 1,6\%$), при среднетяжёлых — на 8% (с $80,0 \pm 1,2\%$ до $88,0 \pm 1,3\%$ при норме $93,6 \pm 2,14\%$); K_1 и K_2 при

тяжёлых формах менингита увеличивался в 1,3—1,5 раза, а при среднетяжёлых соответственно в 1,5—2 раза.

Нами установлен стереотипный характер метаболической адаптации, независящий от штамма возбудителя, вызвавшего заболевание, но меняющийся в зависимости от степени тяжести и периода заболевания (табл. 3). Общим для острого периода арбовирусного заболевания явилось увеличение количества лейкоцитов с «выходом» катионных белков (КБ) за пределы клетки и существенное снижение удельного веса лейкоцитов с высоким их содержанием, что приводило к снижению коэффициентов 1 и 2. Установлена зависимость между тяжестью состояния и исходным уровнем КБ: тяжёлым формам соответствовало снижение общего количества положительно реагирующих на КБ лейкоцитов до $51,6 \pm 0,6\%$ ($p < 0,05$), за счёт увеличения числа лейкоцитов с умеренным содержанием КБ, которые составляли $37,0 \pm 1,2\%$ ($p < 0,001$), и уменьшения количества лейкоцитов с высокой активностью. K_1 при тяжёлых формах снижался в 8,8 раза, а K_2 — в 4 раза.

Таким образом, для острого периода заболевания характерны нарушения в соотношении клеток с различной степенью активности и увеличение количества клеток с «выходом» КБ за пределы цитоплазмы. Нормализации показателей КБ в период реконвалесценции не происходило, причём отклонения коррелировались с тяжестью перенесённого заболевания (см. табл. 3).

Острый период характеризовался снижением общего числа положительно реагирующих на миелопероксидазу (МП) лейкоцитов параллельно степени тяжести. Одновременно менялось соотношение лейкоцитов с различной активностью МП. Число лейкоцитов с высоким содержанием снижалось в 2—3 раза, с умеренным количеством увеличивалось почти в 2 раза, а с «выходом» превышало контроль в 40—50 раз. Данные изменения активности лейкоцитов фиксировались K_1 и K_2 , снижение которых шло параллельно степени тяжести. Так, при среднетяжёлых формах K_1 снижался в 4,1 раза, при тяжёлых — в 5,6 раза, а K_2 соответственно снижался в 1,9 и 2,3 раза по сравнению с нормой. Нормализации показателей МП в период реконвалесценции не происходило (см. табл. 3). Информативными критериями изменений активности МП являлись не только процентное соотношение различных степеней активности, но и K_1 и K_2 , отражающие их соотношение. Падение уровня КБ и МП гранулоцитов объясняется их выходом в межклеточные пространства или кровь в начальной стадии фагоцитоза, сопровождающимся переносом компонентов ИМС из цитоплазматических гранул в фагоцитарную вакуоль, вызывая гибель возбудителя и его распад, в результате электростатического взаимодействия

между анионными компонентами вируса и КБ. Показатель спонтанного НСТ-теста в остром периоде превышал показатель нормы в 1,7—1,6 раза (см. табл. 3).

Величина стимулированного НСТ-теста снижалась соответственно степени тяжести в 1,1—1,3 раза, а фагоцитарный резерв снижался в 2,5—3,6 раза. Показатели стимулированного НСТ-теста и фагоцитарного резерва снижались, составляя при среднетяжёлой форме $15,3 \pm 0,4\%$ и $4,5 \pm 0,45\%$ при величине острого периода — $20,4 \pm 1,1\%$ и $6,1 \pm 0,95\%$ соответственно. При тяжёлой форме стимулированный НСТ-тест был равен $14,5 \pm 0,5\%$, а ФР — $4,0 \pm 0,64\%$, не отличаясь от показателя острого периода (см. табл. 3).

Сопоставление компонентов ИМС по исходной активности гранулоцитов, длительности течения и исходу заболевания позволило выявить различия, которые максимально проявлялись при тяжёлых формах и затяжном течении заболевания. Так, при затяжном течении процесса показатели спонтанного НСТ-тест, КБ оставались низкими, величина фагоцитарного резерва достоверно повышалась по сравнению с показателем острого периода (см. табл. 3). Показатель МП, повышаясь по сравнению с острым периодом, оставался ниже контроля в 1,4 раза, т. е. имел место 2-й вариант гранулоцитопатии, характеризующейся дефицитом обеих систем. Латентный дефицит МС характеризовался уменьшением только ФР и МП при стабильности других показателей, указывал на развитие 1-го варианта гранулоцитопатии, характеризующегося недостаточностью оксидазной МС и МП при нерезких нарушениях активности КБ (см. табл. 3). Следовательно, нарушение активности даже одного из компонентов ИМС может привести к снижению фагоцитарной активности лейкоцитов, что влечет за собой снижение общей резистентности организма.

При изучении фибронектина (ФН) плазмы крови выявлен ряд характерных изменений: снижение исходных показателей у больных, независимо от степени тяжести, с максимально низкими величинами при тяжёлых формах — $56,9 \pm 4,0$ мкг/мл, при норме $101,0 \pm 2,0$ мкг/мл (см. табл. 3). Повышение показателя наблюдали при тяжёлых формах ($98,5 \pm 6,2$ мкг/мл), который увеличен и при среднетяжёлой ($112,1 \pm 4,9$ мкг/мл) степени заболевания. Исходная фибронектинемия ($49,6 \pm 3,7$ мкг/мл), выявленная у 6,4% больных от общего числа обследованных, наблюдалась у больных с затяжным течением заболевания, а уменьшение концентрации фибронектина в плазме крови обусловлено функциональной недостаточностью клеток, вырабатывающих ФН. Недостаток ФН в плазме крови приводил к нарушению опсонизации микроорганизмов и снижению напряжённости фагоцитоза.

Сочетание разных вариантов недостаточности компонентов ИМС и ФН плазмы крови указывает на развитие у больных иммунодепрессии, предрасполагающей к развитию вторичных бактериальных осложнений.

Применение в комплексной терапии арбовирусных инфекций у детей препарата циклоферон в первые 3 дня заболевания сопровождалось сокращением длительности проявлений интоксикации и менингеального синдрома. Так, в контрольной группе на 3-й день лечения повышение температуры тела сохранялось у 37,5% больных, у получавших циклоферон — у 17,5% больных. Аналогичная динамика отмечалась и по длительности сохранения симптомов интоксикации и менингеального синдрома.

Выводы

1. Параметры дисбаланса ИМС нейтрофилов и ФН плазмы крови служат объективными

критериями адаптационного синдрома, отражающего неспецифическую резистентность и состояние системы фагоцитоза.

2. Сохранение повышенных показателей НСТ-теста на фоне клинического благополучия указывает на возможность развития осложнений, а также наклонность заболевания к затяжному течению; снижение уровня фагоцитарного резерва указывает на возможность развития вторичных гранулоцитопатий.

3. Циклоферон обеспечивает ликвидацию клинических симптомов (лихорадки, токсикоза, менингеального синдрома) заболевания, стимулирует неспецифические защитные системы организма, активизируя метаболическую активность фагоцитов, что позволяет рекомендовать циклоферон в комплексной терапии арбовирусных инфекций.

ЛИТЕРАТУРА

1. Астапов А. А. Диагностика менингитов энтеровирусной этиологии. Актуальные вопросы инфекционной патологии у детей: материалы второго конгресса педиатров-инфекционистов. М.: 2003
2. Железникова Г. Ф., Иванова В. В. Значение иммунологических исследований при инфекционных болезнях у детей. Дет инфекц 2007; 6: 3: 7—16.
3. Железникова Г. Ф. Варианты иммунопатогенеза острых инфекций у детей. СПб.: 2007; 259.
4. Бойков С. А., Соболева Н. Г., Шатохина Н. С., Могильная Г. М. Активность микробицидных систем нейтрофилов до и после терапии ювенильного ревматоидного артрита с бактериальными провоцирующими факторами. Журн науч-практ Союза педиатров России «Вопросы современной педиатрии». 2006; 5: 1: 695.
5. Кокорева С. П., Куприна Н. П., Панина О. А. Современная комплексная терапия вирусных нейроинфекций у детей. Дет инфекц 2007; 6: 4: 47—53.
6. Куприна Н. П. Клинико-иммунологические основы лечения гнойных и серозных менингитов у детей: автореф. дис. ... докт. мед. наук. Воронеж, 1999; 32.
7. Нестерова И. В. Интралейкоцитарная микробицидная система нейтрофильных гранулоцитов у здоровых детей и детей с гнойно-септическими заболеваниями: автореф. дис. ... канд. мед. наук. М.: 1980; 22.
8. Сорокина М. Н., Скрипченко Н. В. Вирусные энцефалиты и менингиты у детей. М.: 2004; 416.
9. Романцов М. Г., Горячева Л. Г., Коваленко А. Л. Противовирусные и иммуностропные препараты в детской практике. СПб.: 2008; 121.
10. Berton G., Mócsai A., Lowell C. A. Src and Syc kinases: key regulators of phagocytic cell activation. Trends Immunol 2005; 26: 208—214.

**АНТИБИОТИКИ, ВЛИЯЮЩИЕ НА ПОЯВЛЕНИЕ
УСТОЙЧИВЫХ БАКТЕРИЙ: НАЦИОНАЛЬНОЕ
МНОГОУРОВНЕВОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ
ПРЕДПОЛАГАЕТ РАЗЛИЧИЯ ВНУТРИ
КЛАССОВ АНТИБИОТИКОВ.**

**ANTIBIOTICS INVOLVED IN THE OCCURRENCE
OF ANTIBIOTIC-RESISTANT BACTERIA: A NATIONWIDE
MULTILEVEL STUDY SUGGESTS DIFFERENCES
WITHIN ANTIBIOTIC CLASSES / H. GBAGUIDI-HAORE*,
C. DUMARTIN, F. L'HÉRITEAU, M. RÉFAU,
D. HOCQUET, A.-M. ROGUES, X. BERTRAND,
ON BEHALF OF THE ATB-RAISIN NETWORK
STEERING COMMITTEE // JOURNAL
OF ANTIMICROBIAL CHEMOTHERAPY 2013;
68: 2: 461—470.**

Задачей исследования было определить антибиотики, способные в наибольшей степени влиять на появление устойчивых бактерий, с точки зрения экологической перспективы в лечебных учреждениях (ЛУ). Исследование было выполнено на основе данных Французской службы мониторинга антибиотиков (ATB-RAISIN, 2007–09). Потребление антибиотиков выражали в DDD (средняя поддерживающая доза лекарственного препарата при его использовании по основному показанию) /1000 пациентов/день. Количество антибиотикоустойчивых бактерий (АУБ) соотносили к числу пациентов/день. К АУБ были отнесены штаммы *Escherichia coli*, устойчивые к цефалоспорином 3-го поколения (ЗПЦ) и ципрофлоксацину, *Enterobacter cloacae*, устойчивые к цефотаксиму, метициллиноустойчивого *Staphylococcus aureus* и *Pseudomonas aeruginosa*, устойчивые к цефтазидиму, имипенему и ципрофлоксацину. Для расчёта иерархической структуры данных были созданы трёхуровневые модели негативной биномной регрессии (1 уровень — повторные ежегодные измерения количества исходов, время, антибиотики; 2 уровень — ЛУ, тип и размер; 3 уровень — регионы, географические зоны). Всего было проанализировано 701 ЛУ в 20 регионах и до 1339 ЛУ/год. Применение цефтриаксона, но не цефотаксима, положительно коррелировало с числом случаев устойчивости *E.coli* к ЗПЦ и ципрофлоксацину, а использование обоих цефалоспоринов — с показателем устойчивости *E.cloacae* к цефотаксиму. Высокие уровни применения ципрофлоксацина и/или офлоксацина, но не левофлоксацина, ассоциировались с более высоким числом случаев устойчивости *E.coli* к ЗПЦ и ципрофлоксацину, *E.cloacae* — цефотаксиму, *P.aeruginosa* — к цефтазидиму и ципрофлоксацину и метициллиноустойчивого *S.aureus*. Результаты исследования предполагают различия между антибиотиками одного класса в способности развивать устойчивость. Авторы обозначили цефтриаксон, ципро-

фоксацин и офлоксацин как первоочередные препараты, подлежащие сокращённому применению в здравоохранении в целях снижения уровня антибиотикоустойчивых бактерий в ЛУ Франции.

* Service d'Hygiène Hospitalière, Centre Hospitalier Universitaire Besançon, Hôpital Jean Minjoz, 3 Bd Fleming, 25030 Besançon, Cedex, France.

**ПОНИМАНИЕ ВРАЧАМИ ПЕРВИЧНОГО
МЕДИЦИНСКОГО ЗВЕНА ЗНАЧЕНИЯ
АНТИБИОТИКОУСТОЙЧИВОСТИ:
МЕЖДУНАРОДНОЕ КАЧЕСТВЕННОЕ
ИССЛЕДОВАНИЕ ПУТЁМ ОПРОСА.**

**PRIMARY CARE CLINICIANS' PERCEPTIONS
OF ANTIBIOTIC RESISTANCE: A MULTI-COUNTRY
QUALITATIVE INTERVIEW STUDY / F. WOOD*,
C. PHILLIPS, L. BROOKES-HOWELL, K. HOOD,
T. VERHEIJ, S. COENEN, P. LITTLE, H. MELBYE,
M. GODYCKI-CWIRKO, K. JAKOBSEN, P. WORBY,
H. GOOSSENS, C. C. BUTLER // JOURNAL
OF ANTIMICROBIAL CHEMOTHERAPY 2013;
68: 1: 237—243.**

Изучали и сравнивали понимание врачами первичного медицинского звена (ПМЗ) значения антибиотикоустойчивости при лечении внебольничной инфекции нижних дыхательных путей в условиях различных европейских стран. В качественном опросе приняли участие 80 врачей ПМЗ из 9 европейских стран. Полученные данные были подвергнуты 5-стадийному рамочному анализу (ознакомление; разработка рамочного тематического вопросника и тем, вытекающих из полученных данных; индексация; построение диаграмм; составление плана изучения для интерпретации данных). Сообщения с предварительным анализом были разосланы для утверждения. Большинство врачей заявили, что антибиотикоустойчивость не является проблемой в их практике. Некоторые из них рекомендовали усилить обратную связь в вопросе знания местного уровня устойчивости. Респонденты северной Европы предпочитали использовать препараты самого узкого спектра на основании существующей устойчивости, тогда как респонденты южной/восточной Европы больше руководствовались получением быстрого эффекта лечения за счёт эмпирического применения антибиотиков широкого спектра. Неудачи лечения относили, в основном, больше к вирусной этиологии, чем к устойчивости бактерий. Врачи, в целом, соглашались, что устойчивость будет становиться всё более серьёзной проблемой без совершенствования руководств по антибиотико-

терапии и разработки новых лекарств. Если принять, что антибиотикоустойчивость может приводить к значительным неудачам в лечении, то обеспечение врачей данными о местной устойчивости должно усилить понимание ими важности вопроса. Меры по повышению качества предписания антибиотиков врачами ПМЗ, особенно в южной и восточной Европе, следует направить на осознание того, что польза для пациента от лечения антибиотиками, как в целом, так и новейшими более широкого спектра действия по сравнению с антибиотиками узкого спектра, должна перевешивать ущерб, наносимый больным и обществу от связанного с этим влияния на антибиотикоустойчивость.

* Cochrane Institute of Primary Care and Public Health, School of Medicine, Cardiff University, Neuadd Meirionnydd, Heath Park, Cardiff, Wales, UK.

«НУЛЕВОЙ» ПОДХОД: ВЛИЯНИЕ ВО ВРЕМЕНИ ПОЛИТИКИ ОГРАНИЧЕНИЯ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ АНТИБИОТИКОВ НА ВНУТРИБОЛЬНИЧНЫЕ ШТАММЫ *CLOSTRIDIUM DIFFICILE*, ОБРАЗУЮЩИХ БЕТА-ЛАКТАМАЗЫ РАСШИРЕННОГО СПЕКТРА КОЛИФОРМ И МЕТИЦИЛЛИНОУСТОЙЧИВОГО *STAPHYLOCOCCUS AUREUS*.

APPROACHING ZERO: TEMPORAL EFFECTS OF A RESTRICTIVE ANTIBIOTIC POLICY ON HOSPITAL-ACQUIRED *CLOSTRIDIUM DIFFICILE*, EXTENDED-SPECTRUM β -LACTAMASE-PRODUCING COLIFORMS AND METICILLIN-RESISTANT *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* / J. DANCER*, P. KIRKPATRICK, D. S. CORCORAN, F. CHRISTISON, D. FARMER, C. ROBERTSON, HEALTH PROTECTION SCOTLAND, GLASGOW, UK; INTERNATIONAL PREVENTION RESEARCH INSTITUTE, LYON, FRANCE // INTERNATIONAL JOURNAL OF ANTIMICROBIAL AGENTS 2013; 41: 2: 137–142.

Программа по ограничению использования антибиотиков, исключая рутинное применение цефтриаксона и ципрофлоксацина, была осуществлена в 450-кочной муниципальной больнице после разъяснительной кампании. Ежемесячно отслеживалось потребление 9 антибиотиков, выраженное в DDD / 1000 пациентов-занятых коек-день (1000 п-к-д) на протяжении 9 месяцев до и 16 мес. после начала эксперимента. Были определены случаи выявления внутрибольничных штаммов *Clostridium difficile*, метициллиноустойчивого *Staphylococcus aureus* (MRSA) и колиформ, образующих бета-лактамазы расширенного спектра (БЛРС), в месяц / 1000 п-к-д во всей больнице. В период от 1-го до последних 6 месяцев исследования средний ежеме-

сячный расход цефтриаксона снизился на 95% (с 46.213 до 2.129 DDD / 1000 п-к-д) и ципрофлоксацина на 72,5% (с 109.804 до 30.205 DDD / 1000 п-к-д). В эти же периоды уровень внутрибольничной *C.difficile* снизился на 77% (с 2.398 до 0.549 случаев / 1000 п-к-д), MRSA — на 25% (с 1.187 до 0.894 случая / 1000 п-к-д), а БЛРС-продуцирующих колиформ — на 17% (с 1.480 случаев до 1.224/1000 п-к-д). Моделирование времени латентного периода подтвердило связь между использованием цефтриаксона и случаями *C.difficile* за 1 месяц (корреляция 0,83; $p<0,005$) и между ципрофлоксацином и количеством случаев БЛРС-продуцирующих колиформ за 2 месяца (корреляция 0,649; $p=0,002$). Аудиторская проверка спустя 3 года после начала эксперимента показала существенное снижение уровней *C.difficile* (0.259 случаев / 1000 п-к-д) и дополнительное снижение MRSA (0.409 случаев / 1000 п-к-д) и БЛРС-продуцирующих колиформ (0.809 случаев / 1000 п-к-д). Итак, результатом исключения 2 антибиотиков было быстрое и значительное снижение случаев внутрибольничной *C.difficile* и возможное более долгосрочное влияние на уровень MRSA и БЛРС-продуцирующих колиформ. Управление назначением антибиотиков является основополагающим для контроля за основными внутрибольничными патогенами.

* Department of Microbiology, Hairmyres Hospital, East Kilbride, Lanarkshire G75 8RG, UK.

СВЯЗЬ МЕЖДУ ПРИМЕНЕНИЕМ ЭРТАПЕНЕМА И АНТИПСЕВДОМОНАДНЫХ КАРБАПЕНЕМОВ И УСТОЙЧИВОСТЬЮ *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* К КАРБАПЕНЕМАМ В 12 БОЛЬНИЦАХ КВИНСЛЕНДА, АВСТРАЛИЯ.

ASSOCIATION OF ERTAPENEM AND ANTIPSEUDOMONAL CARBAPENEM USAGE AND CARBAPENEM RESISTANCE IN *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* AMONG 12 HOSPITALS IN QUEENSLAND, AUSTRALIA / D. A. J. MCDUGALL*, A. P. MORTON, E. G. PLAYFORD // JOURNAL OF ANTIMICROBIAL CHEMOTHERAPY 2013; 68: 2: 457–460.

Определяли связь между применением эртапенема и антипсевдомонадных карбапенемов (АПК) и устойчивостью *Pseudomonas aeruginosa* к карбапенемам в 12 больницах Квинсленда, Австралия. Данные по применению эртапенема и других АПК, выраженные в DDD / 1000 пациентов / день (п-д), были детально сверены с общегосударственной программой распределения медикаментов в период с января 2007 г. по июнь 2011 г. За этот же период были собраны неповторяющиеся устойчивые к карбапенемам штаммы *P.aerug-*

inosa с помощью государственных лабораторных информационных систем. Для определения взаимосвязи между потреблением эртапенема и АПК и карбапенемной устойчивостью *P.aeruginosa* использовали модели смешанных эффектов (mixed-effects models). Связи между применением эртапенема и устойчивостью *P.aeruginosa* к карбапенемам установлено не было. Применение эртапенема не заменяло в значительной степени назначение АПК. Вместе с тем была продемонстрирована связь между более высоким применением АПК и возросшим уровнем карбапенемной устойчивости *P.aeruginosa*. Единственным механизмом, который может улучшить показатели устойчивости *P.aeruginosa* является использование эртапенема не как дополнение к АПК, а как их заместителя.

* Pharmacy Department, Princess Alexandra Hospital; Infection Management Services, Princess Alexandra Hospital, Queensland, Australia.

К ВОПРОСУ ОБ ОПРЕДЕЛЕНИИ ПОЯВЛЯЮЩИХСЯ БЕТА-ЛАКТАМАЗ У ГРАМОТРИЦАТЕЛЬНЫХ БАКТЕРИЙ ПО ФЕНОТИПУ.

TOWARDS A PHENOTYPIC SCREENING STRATEGY FOR EMERGING β -LACTAMASES IN GRAM-NEGATIVE BACILLI / E. WILLEMS, J. VERHAEGEN, K. MAGERMAN, S. NYS, R. CARTUYVELS* // INTERNATIONAL JOURNAL OF ANTIMICROBIAL AGENTS 2013; 41: 2: 99–109.

Выполнен обзор литературных данных и руководств по фенотипическому определению бета-лактамаз расширенного спектра (БЛРС), AmpC и карбапенемаз у грамотрицательных бактерий для выработки рекомендаций по оптимальному их выявлению. Было установлено, что хромогенные методы выявления БЛРС отвечают требованиям для определения БЛРС-продуцирующих Enterobacteriaceae непосредственно в клинических образцах. Индикаторными антибиотиками выбора для определения БЛРС у грамотрицательных бактерий являются цефтазидим (CAZ) и цефтриаксон или цефотаксим (CTX). У неиндуцибельных Enterobacteriaceae надёжным методом обнаружения БЛРС может быть двойное комбинированное синергидное тестирование на агаре с дисками (CDDST), содержащими в качестве индикаторов CTX и CAZ и дополнительно цефепим. Двумя самыми подходящими методами, подтверждающими образование БЛРС у Enterobacteriaceae, одновременно продуцирующих AmpC, являются модификации CDDST: 1) добавление 3-аминофенилборониевой кислоты к CTX- и CAZ-дискам; 2) добавление клоксациллина (CLO) в агар Мюллера-Хинтон. Сни-

женная чувствительность к цефокситину и понижение чувствительности к цефотетану рассматриваются в качестве тестов для плазмидных и дерепрессированных AmpC. Наилучшим методом подтверждения наличия AmpC является CLO- CDDST с CTX и CAZ в качестве индикаторов. Карбапенемазы у штаммов Enterobacteriaceae могут быть определены по пограничной концентрации меропенема, равной 0,5 мкг/мл. Для подтверждения присутствия карбапенемаз класса А рассматривается использование коммерческих или приготовленных в лаборатории на основе борониевой кислоты CDDST. Для выявления металло-бета-лактамаз рекомендованы лабораторные методы, основанные на использовании этилендиамин-тетрауксусной кислоты. Наиболее удобные методы (CDDST или DDST), как и индикаторные антибиотики, варьируют в зависимости от рода бактерий.

* Department of Clinical Microbiology, Jessa Hospital, Stadsomvaart 11, 3500 Hasselt, Belgium.

АКТИВНОСТЬ КАРБАПЕНЕМОВ В КОМБИНАЦИИ С ME1071 (ДИНАТРИЙ 2,3- ДИЭТИЛМАЛЕАТ) В ОТНОШЕНИИ ENTEROBACTERIACEAE И ACINETOBACTER SPP., ОБРАЗУЮЩИХ КАРБАПЕНЕМАЗЫ, ВКЛЮЧАЯ NDM ФЕРМЕНТЫ.

ACTIVITY OF CARBAPENEMS WITH ME1071 (DISODIUM 2,3-DIETHYLMALATE) AGAINST ENTEROBACTERIACEAE AND ACINETOBACTER SPP. WITH CARBAPENEMASES, INCLUDING NDM ENZYMES/ D. M. LIVERMORE*, S. MUSHTAQ, A. MORINAKA, T. IDA, K. MAEBASHI, R. HOPE // JOURNAL OF ANTIMICROBIAL CHEMOTHERAPY 2013; 68: 1: 153–158.

ME1071 — малеиновая кислота, ингибирующая металло-бета-лактамазы (MBL). Способность ME1071 усиливать действие различных карбапенемов в отношении MBL-продуцирующих Enterobacteriaceae была исследована по результатам кинетики ингибирования у штаммов Enterobacteriaceae и *Acinetobacter*, образующих IMP, VIM и NDM MBL. В качестве контроля служили бактерии с другими механизмами устойчивости к карбапенемам. Титрование по методу «шахматной доски» выполнено разведениями в CLSI агаре. Карбапенемазы клонировали в pET-28a(+) и очищали на хроматографической колонке. Кинетические параметры определяли спектрометрическим методом. Основными результатами исследования были следующие: 1) значения МПК карбапенемов широко варьировали у штаммов, образующих одну и ту же карбапенемазу, но самыми устойчивыми были проду-

центры бета-лактамаз NDM типа; 2) биापением подвергался действию MBL всех типов наименее других карбапенемов, имея более низкий кинетический коэффициент гидролиза (k_{cat}/K_m), что соответствовало более низкому аффинитету (более высокое значение K_m); 3) из всех карбапенемов ME1071 подавляла только MBL, что подтверждало специфичность его действия; 4) независимо от типа карбапенема синергидное действие ME1071 в наименьшей степени было выражено в отношении бактерий, образующих MBL NDM типа, и в наибольшей — у продуцентов MBL IMP типа, что согласовывалось со слабым аффинитетом (наибольшая K_m) NDM-1 и сильным аффинитетом IMP-1. Итак, синергидное снижение МПК карбапенемов при комбинации с ME1071 у бактерий, продуцирующих MBL NDM-1, было слабее, чем у продуцентов IMP и VIM MBL. Это коррелировало с более слабым аффинитетом ME1071 к NDM-1, чем к IMP и VIM-2 MBL. Биापением как самый слабый субстрат MBL был наиболее защищённым от действия бета-лактамаз.

* Norwich Medical School, University of East Anglia, Norwich NR4 7TJ, UK.

ВЛИЯНИЕ ПРИОБРЕТЁННЫХ БЕТА-ЛАКТАМАЗ НА СПОНТАННУЮ УСТОЙЧИВОСТЬ *ESCHERICHIA COLI* К КАРБАПЕНЕМАМ.

INFLUENCE OF ACQUIRED β -LACTAMASES ON THE EVOLUTION OF SPONTANEOUS CARBAPENEM RESISTANCE IN *ESCHERICHIA COLI* / M. ADLER, M. ANJUM, D. I. ANDERSSON, L. SANDEGREN* // JOURNAL OF ANTIMICROBIAL CHEMOTHERAPY 2013; 68: 1: 51—59.

Исследовали влияние плазмидных бета-лактамаз на развитие спонтанной устойчивости к карбапенемам у *Escherichia coli* и издержки фитнеса, связанные с устойчивостью. Была выполнена ступенчатая селекция устойчивых к карбапенемам мутантов, содержащих и не содержащих кодируемые плазмидой pUUN239. 2 бета-лактамазы расширенного спектра (БЛРС), и определены уровень мутаций и мутационный механизм устойчивости. *In vitro* селекционированные и сконструированные мутанты были охарактеризованы по МПК карбапенемов, профилю экспрессии поринов, скорости роста, наличию мутаций в пориновых генах *ompC/ompF* и их регуляторных генах. Определено влияние плазмидных бета-лактамаз TEM-1, OXA-1 и CTX-M-15 на развитие устойчивости. Как показали результаты быстрое снижение чувствительности *E.coli* и соответствующий клинический уровень устойчивости уста-

новились в результате сочетания утраты поринов и увеличенной экспрессии бета-лактамаз, особенно в отношении эртапенема. Все проверенные бета-лактамазы (CTX-M-15, TEM-1 и OXA-1) способствовали снижению чувствительности к карбапенемам в отсутствие экспрессии поринов. Полная утрата экспрессии поринов приводила к 20% издержкам фитнеса за счёт снижения скорости роста. Основным фактором устойчивости была повышенная экспрессия бета-лактамазы за счёт спонтанной амплификации гена на плазмиде. Таким образом, плазмидные бета-лактамазы, включая не-БЛРС, оказывают сильное влияние на частоту и уровень спонтанных карбапенемоустойчивых мутантов. Изменения фитнеса, связанные с утратой *OmpC/OmpF* у *E.coli*, состоят, главным образом, в снижении жизнеспособности пориновых мутантов, и это является объяснением, почему они не представляют клинической проблемы.

* Department of Medical Biochemistry and Microbiology, Uppsala University, SE-751 23 Uppsala, Sweden.

НОВАЯ ЖИЗНЬ СТАРОГО ЛЕКАРСТВА: АНТИГЕЛЬМИНТНЫЙ ПРЕПАРАТ НИКЛОЗАМИД ПОДАВЛЯЕТ КВОРУМ СЕНСИНГ *PSEUDOMONAS AERUGINOSA*.

NEW LIFE FOR AN OLD DRUG: THE ANTHELMINTIC DRUG NICLOSAMIDE INHIBITS *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* QUORUM SENSING / F. IMPERI, F. MASSAI, C. R. PILLAI, F. LONGO, E. ZENNARO, G. RAMPIONI, P. VISCA, L. LEONI* // ANTIMICROBIAL AGENTS CHEMOTHERAPY 2013; 57: 2: 996—1005.

Поиск и идентификация ингибиторов кворум сенсинга (ИКС) обусловлены потребностью в новых стратегиях антибиотикотерапии и пониманием важности явления кворум сенсинга (КС) в бактериальных инфекциях. Однако клиническое применение ИКС рассматривалось как отдалённое будущее из-за сложности их применения у человека. Решением этой проблемы явился поиск анти-КС активности как побочного действия среди тысяч уже применяемых в клинике лекарств. Предложена стратегия поиска ИКС в базе данных FDA (Управление по контролю качества пищевых продуктов и медикаментов, США) по их способности подавлять КС отклик у *Pseudomonas aeruginosa*. Было установлено, что антигельминтный препарат никлозамид сильно подавляет КС отклик у *P.aeruginosa* и образование сигнальных молекул КС, лактона арил-гомосерина. Анализ с помощью микрочипов показал, что никлозамид влияет на транскрипцию примерно 250 генов, и с большей специфичностью на КС-зависимый ре-

гулон. Фенотипическими методами продемонстрировали подавление никлозамидом поверхностной подвижности и образования выделяемых вирулентных факторов, эластазы, пиоцианина, рамнолипидов, а также снижение образования биоплёнок. Из-за высокой антивирулентной активности *in vitro* никлозамид предотвращал развитие патогенного процесса на модели острой инфекции *P.aeruginosa* у насекомых. Кроме обнаружения одобренного FDA лекарства с высокой антивирулентной активностью в отношении одного наиболее антибиотикоустойчивого патогена, настоящее исследование подтвердило правильность концепции о том, что анти-КС активность в качестве побочного действия может быть обнаружена у лекарств, уже применяемых в медицине, и что новый подход позволяет обнаружить ИКС, быстро внедряемые в клиническую практику.

* Department of Biology, University Roma Tre, Rome, Italy.

**НОВЫЕ КАРБАПЕНЕМНЫЕ АНТИБИОТИКИ
ДЛЯ ПАРЕНТЕРАЛЬНОГО И ПЕРОРАЛЬНОГО
ПРИМЕНЕНИЯ: *IN VITRO* И *IN VIVO* АКТИВНОСТЬ
2-АРИЛКАРБАПЕНЕМОВ И ФАРМАКОКИНЕТИКА
У ЛАБОРАТОРНЫХ ЖИВОТНЫХ.**

**NOVEL CARBAPENEM ANTIBIOTICS FOR PARENTERAL
AND ORAL APPLICATIONS: *IN VITRO* AND *IN VIVO*
ACTIVITIES OF 2-ARYL CARBAPENEMS AND THEIR
PHARMACOKINETICS IN LABORATORY ANIMALS/
K. FUJIMOTO, K. TAKEMOTO*, K. HATANO, T. NAKAI,
S. TERASHITA, M. MATSUMOTO, Y. ERIGUCHI,
K. EGUCHI, T. SHIMIZUDANI, K. SATO, K. KANAZAWA,
M. SUNAGAWA, Y. UEDA//ANTIMICROBIAL AGENTS
CHEMOTHERAPY 2013; 57: 2: 697–707.**

SM-295291 и SM-369926 — новые парентеральные 2-арилкарбапенемы, высокоактивные в отношении таких возбудителей внебольничных инфекций, как метициллиночувствительный *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae* (включая устойчивые к пенициллину, (ПУ) штаммы), *Streptococcus pyogenes*, *Enterococcus faecalis*, *Klebsiella pneumoniae*, *Moraxella catarrhalis*, *Haemophilus influenzae* (включая устойчивые к ампициллину не образующие бета-лактамазу, АмПУ нБЛ, штаммы) и *Neisseria gonorrhoeae* (включая ципрофлоксациноустойчивые штаммы) с МПК₉₀ ≤1 мкг/мл. В отличие от тебипенема (МПК₅₀, 8 мкг/мл), SM-295291 и SM-369926 были неактивны в отношении внутрибольничных патогенов, например, *Pseudomonas aeruginosa* (МПК₅₀, ≥128 мкг/мл). Бактерицидная активность SM-295291 и SM-369926 в отношении ПУ *Streptococcus pneumoniae* и АмПУнБЛ *H.influenzae* была равна или пре-

восходила активность тебипенема и выше, чем цефдиторена, что соответствовало их *in vitro* активности. Фармакокинетика SM-295291 и SM-369926 у обезьян при в/в введении была подобна таковой меропенема по значению времени полувыведения (0,4 ч). SM-295291 и SM-369926 были устойчивы к действию дегидропептидазы I человека. Медоксомильные эфиры изучаемых соединений (SM-295291 и SM-369926), соответственно SM-368589 и SM-375769, показали хорошую пероральную биодоступность у крыс, собак и обезьян (4,2–62,3%). Итак, 2-арилкарбапенемы являются перспективными препаратами с идеально широким спектром для лечения внебольничных инфекций, обусловленных ПУ *S.pneumoniae* и АмПУнБЛ *H.influenzae*, оказывают низкое селективное давление на устойчивые к антипсевдомонадным карбапенемам патогены и пригодны для парентеральной, пероральной и ступенчатой терапии.

* Drug Research Division, Dainippon Sumitomo Pharma Co., Ltd., Osaka, Japan.

**ГЛОБАЛЬНАЯ ЭВОЛЮЦИЯ КЛОНОВ *ACINETOBACTER
BAUMANNII* С МНОЖЕСТВЕННОЙ ЛЕКАРСТВЕННОЙ
УСТОЙЧИВОСТЬЮ.**

**GLOBAL EVOLUTION OF MULTIDRUG-RESISTANT
ACINETOBACTER BAUMANNII CLONAL LINEAGES/
R. ZARRILLI*, S. POURNARAS, M. GIANNOULI,
A. TSAKRIS//INTERNATIONAL JOURNAL
OF ANTIMICROBIAL AGENTS 2013; 41: 1: 11–19.**

Быстрое распространение в последнее десятилетие клинических штаммов *Acinetobacter baumannii*, устойчивых к карбапенемам и почти всем используемым антибиотикам, является угрожающим. Явное глобальное преобладание нескольких клонов с мультилекарственной устойчивостью подчёркивает важность выяснения механизма распространения и эпидемиологии штаммов *A.baumannii* как в отдельной больнице, так и в масштабах страны и на глобальном уровне. Эволюционное преимущество доминирующих клонов заключается в способности пангенома *A.baumannii* включать детерминанты устойчивости. В частности, одновременное присутствие дивергентных штаммов международного клона II и их повсеместно возрастающее распространение в больницах ещё раз подтверждает продолжающуюся адаптацию этого клона к условиям больницы. Геномные и генетические исследования прояснили роль мобильных генетических элементов в передаче генов антибиотикоустойчивости и значительного уровня генетических изменений, связанных с приобретением *A.baumannii* различных генов устойчивости, включая гены карбапенемаз ОХА-типа и ме-

талло-бета-лактамаз. Также установлено значение отдельных нуклеотидных полиморфизмов и мутагенеза транспозонов в эволюции *A.baumannii*. Учреждение сети референс-лабораторий в разных странах позволит создать более полную картину и даст более полное понимание важности клонов *A.baumannii* высокого риска в международной диссеминации антибиотикоустойчивости.

* Department of Preventive Medical Sciences, University of Napoli Federico II, Naples, Italy.

NVC-422 ИНАКТИВИРУЕТ ТОКСИНЫ STAPHYLOCOCCUS AUREUS.

**NVC-422 INACTIVATES STAPHYLOCOCCUS AUREUS
TOXINS / A. JEKLE, J. YOON, M. ZUCK, R. NAJAFI,
L. WANG, T. SHIAU, C. FRANCAVILLA, S. A. RANI,
C. EITZINGER, M. NAGL, M. ANDERSON, D. DEBAVOV* /
ANTIMICROBIAL AGENTS CHEMOTHERAPY 2013;
57: 2: 924—929.**

Патогенные бактерии образуют специфические вирулентные факторы (например, токсины), которые играют существенную роль в степени патогенности и инвазивности в организме человека. Молекулы вирулентных факторов образуются патогеном, который способен к колонизации, снижению и подавлению иммунитета, получению питательных веществ от хозяина и проникновению внутрь его клеток. Патогенный процесс может быть вызван за счёт подавления или стимуляции некоторых функций хозяина. Так, при системных *Staphylococcus aureus* инфекциях такие вирулентные факторы, как токсин, вызывающий синдром токсического шока (TSST-1), стафилококковые энтеротоксин А (SEA) и энтеротоксин В (SEB), вызывают сепсис или токсический шок за счёт неконтролируемой стимуляции Т-лимфоцитов и выброса цитокинов. *In vitro* данные суперантигены стимулируют пролиферацию одноядерных клеток в периферической крови и высвобождение многих цитокинов. NVC-422 (*N,N*-дихлор-2,2-диметилтаурин) — антибактериальное вещество быстрого местного бактерицидного действия с широким спектром в отношении патогенных бактерий, в т. ч. устойчивых к антибиотикам. Методом масс-спектрометрии было показано, что NVC-422 окисляет остатки метионина в TSST-1, SEA, SEB и эксфолиативном токсине А (ЭТА). Экспозиция вирулентных факторов с 0,1% NVC-422 в течение 1 час. предотвращает TSST-1-, SEA-, SEB-, и ЭТА- индуцируемые пролиферацию клеток и выделение цитокинов. Более того, NVC-422 замедляет и снижает агглютинацию культур *S.aureus*, вызванную протеином А и агглютинирующим фактором. Таким образом, было показано,

что в дополнение к хорошо известному бактерицидному действию NVC-422 может инактивировать вирулентные факторы *S.aureus* через быстрое окисление метионина.

* NovaBay Pharmaceuticals, Inc., Emeryville, California, USA

ПРОБЛЕМА ПОЯВЛЕНИЯ УСТОЙЧИВОГО К ЛИНЕЗОЛИДУ STAPHYLOCOCCUS.

**THE EMERGING PROBLEM OF LINEZOLID-RESISTANT
STAPHYLOCOCCUS / BING GU, T. KELESIDIS,
S. TSIODRAS, J. HINDLER, R. M. HUMPHRIES*//
JOURNAL OF ANTIMICROBIAL CHEMOTHERAPY 2013;
68: 1: 4—11.**

Оксазолидиноновый антибиотик линезолид высокоактивен в отношении грамположительных патогенных бактерий, включая метициллиноустойчивые стафилококки. Выполнен систематический обзор сообщений об инфекциях, обусловленных устойчивым к линезолиду *Staphylococcus* (LRS) и определены эпидемиологические, микробиологические и клинические характеристики указанных инфекций. Линезолид сохраняет активность в отношении >98% *Staphylococcus*, устойчивыми были 0,05% *Staphylococcus aureus* и 1,4% коагулазонегативных *Staphylococcus* (CoNS). Во всех сообщённых случаях до выделения LRS больные получали линезолид в среднем за 20,0±47,0 мес. в случае *S.aureus* и 11,0±8,0 дней — CoNS. Самыми общими механизмами устойчивости к линезолиду были мутация (G2576T) в 23S rRNA (63,5% LRSA и 60,2% LRCoNS) или наличие трансмиссивной *cfr* рибосомальной метилтрансферазы (54,5% LRSA и 15,9% LRCoNS). Появление у *Staphylococcus* устойчивости к линезолиду порождает серьёзные проблемы в лечении инфекций, вызванных стафилококками, особенно CoNS.

* Department of Pathology and Laboratory Medicine, David Geffen School of Medicine at UCLA, 10833 Le Conte Ave., Brentwood Annex, Los Angeles, CA 90095-1732, USA.

АНТИСТАФИЛОКОККОВАЯ АКТИВНОСТЬ КАТИОНОВ СЕРЕБРА (AG⁺): ИССЛЕДОВАНИЯ МЕХАНИЗМОВ ДЕЙСТВИЯ И УСТОЙЧИВОСТИ.

**THE SILVER CATION (AG⁺): ANTISTAPHYLOCOCCAL
ACTIVITY, MODE OF ACTION AND RESISTANCE
STUDIES / C. P. RANDALL, L. B. OYAMA,
J. M. BOSTOCK, I. CHOPRA, A. J. O'NEILL*//
JOURNAL OF ANTIMICROBIAL CHEMOTHERAPY
2013; 68: 1: 131—138.**

Задачей исследования было исследовать слабо понимаемые и спорные аспекты антибактериальной активности серебра (Ag^+), в т. ч. бактерицидность (cidality), механизм действия, распространённость устойчивости среди клинических штаммов стафилококков и склонность *Staphylococcus aureus* развивать Ag^+ -устойчивость. Действие Ag^+ на жизнеспособность, синтез макромолекул и целостность мембран у *S. aureus* SH1000 оценивали по общепринятой методологии. МПК нитрата серебра определяли у стафилококковых штаммов ($n=1006$), собранных в больницах Европы и Канады в 1997–2010 гг. Биоплёнки *S. aureus* выращивали в Calgary Biofilm Device. Для определения *in vitro* развития устойчивости стафилококков к Ag^+ , бактерии непрерывно культивировали в присутствии суб-МПК концентраций Ag^+ . В забуференном растворе серебро оказывало бактерицидное действие на *S. aureus*, а на питательной среде — бактериостатическое, и было не способно *in vitro* ликвидировать стафилококковые биоплёнки. Взаимодействие *S. aureus* с Ag^+ приводило к быстрой утрате целостности мембран и подавлению основных путей биосинтеза макромолекул. Все клинические штаммы стафилококков были чувствительны к ≤ 16 мг/л нитрата серебра, а пролонгированная экспозиция (42 дня) с Ag^+ *in vitro* не вызывала селекции устойчивых мутантов. Наблюдаемая быстрая и обширная утрата целостности мембран свидетельствует о том, что антибактериальная активность Ag^+ напрямую связана с разрушением бактериальных мембран. Общая чувствительность стафилококков и отсутствие селекции устойчивости к Ag^+ даёт основание считать, что соединения серебра остаются пригодными для профилактики и лечения местных стафилококковых инфекций.

* Antimicrobial Research Centre and School of Molecular and Cellular Biology, University of Leeds, Leeds LS2 9JT, UK.

АНТИМИКРОБНАЯ ФОТОДИНАМИЧЕСКАЯ ИНАКТИВАЦИЯ ПОДАВЛЯЕТ ВИРУЛЕНТНЫЕ ФАКТОРЫ *CANDIDA ALBICANS* И СНИЖАЕТ *IN VIVO* ПАТОГЕННОСТЬ.

ANTIMICROBIAL PHOTODYNAMIC INACTIVATION INHIBITS *CANDIDA ALBICANS* VIRULENCE FACTORS

AND REDUCES *IN VIVO* PATHOGENICITY / I. T. KATO*, R. A. PRATES, C. P. SABINO, B. B. FUCHS, G. P. TEGOS, E. MYLONAKIS, M. R. HAMBLIN, M. S. RIBEIRO// ANTIMICROBIAL AGENTS CHEMOTHERAPY 2013; 57: 1: 445–451.

Целью исследования было определение нарушения сублетальной антимикробной фотодинамической инактивацией (АФДИ) патогенности *Candida albicans* и сохранения этих изменений в дочерних клетках. Для этого клетки *C. albicans* подвергались действию АФДИ с метиленовым синим (МС) в качестве фотосенсибилизатора (0,05 мМ) в сочетании с GaAlAs диодным лазером (λ 660 нм, 75 мВт/см², 9 – 27 Дж/см²). *In vitro* оценивали действие АФДИ на рост *C. albicans*, образование проростковых трубок, чувствительность к окислительному и осмотическому стрессу, целостность клеточной стенки и чувствительность к флуконазолу. На модели системной инфекции у мышей оценивали патогенность *C. albicans* и ежедневную выживаемость животных. Сублетальная МС-опосредованная АФДИ снижала скорость роста и способность *C. albicans* образовывать проростковые трубки по сравнению с необработанными клетками ($p < 0,05$). Выживаемость мышей с системной инфекцией *C. albicans*, предварительно обработанной АФДИ, значительно увеличивалась по сравнению с выживаемостью мышей, инфицированных необработанными дрожжами ($p < 0,05$). АФДИ повышала чувствительность *C. albicans* к додецилсульфату натрия, кофеину и перекиси водорода. МПК флуконазола также снижалась в результате сублетальной МС-АФДИ. Но в дочерних клетках *C. albicans*, подвергнутых АФДИ, ни один параметр патогенности не изменился. Полученные данные позволяют предположить, что АФДИ может подавлять вирулентные факторы и снижать *in vivo* патогенность *C. albicans*. Отсутствие изменений у дочерних клеток означает ограниченный во времени характер действия АФДИ. Снижение МПК флуконазола свидетельствует о возможности комбинировать применение антимикотика с АФДИ при лечении *C. albicans* инфекций.

* Center for Lasers and Applications, IPEN-CNEN/SP, São Paulo, Brazil.

Подготовлено
Бондаревой Н. С.

П Р А В И Л А Д Л Я А В Т О Р О В

Редакция обращает внимание авторов на следующие правила и форму представления рукописей для публикации в журнале «Антибиотики и химиотерапия».

1. Рукописи статей в 2 экз. (вместе с электронной версией текста на диске) с приложением в 2 экз. иллюстраций (в отдельном конверте) направляются по адресу: **113105 Москва, ул. Нагатинская, д. 3а. Редакция журнала «Антибиотики и химиотерапия»**. Рукопись должна иметь сопроводительное письмо, подписанное руководителем учреждения, в котором выполнена работа. Статья подписывается всеми авторами с указанием ответственного за переписку (Ф.И.О., адрес, телефон).

2. В выходных данных статьи указываются: название, инициалы, фамилии авторов, наименование учреждений, всех авторов, их должности, e-mail.

3. Статья печатается на одной стороне стандартного листа через 1,5–2 интервала при ширине полей слева 3 см.

4. Объём оригинальной статьи (как правило) не должен превышать 12 страниц, включая таблицы и иллюстрации, общее количество иллюстраций — не более 5. Объём обзорной статьи не должен превышать 20 страниц, а список цитируемой литературы — не более 60 названий. Объём заказанных статей устанавливается по договоренности.

5. Оригинальная статья должна включать (по порядку) следующие основные разделы: «**Резюме**» — не более 1 страницы; введение с кратким обзором литературы и постановкой цели исследования; «**Материал и методы**» — с детальным описанием объектов исследований, методических приёмов и квалификаций использованных реагентов (фирм-изготовителей); «**Результаты исследований**» и «**Обсуждение результатов**» или «**Результаты и обсуждение**», «**Заключение**» или «**Выводы**» (по пунктам); «**Литература**» — с указанием цитируемых источников.

6. Таблицы должны быть пронумерованы, иметь название, заголовки граф точно соответствовать их содержанию, а цифры в таблицах — цифрам в тексте. Необщепринятые сокращения в графах не допускаются. На каждую таблицу в тексте статьи должны быть сноска.

7. Иллюстрации (графики, диаграммы, формулы) должны быть чёткими, фотографии — контрастными. На обороте каждого рисунка указывается фамилия первого автора статьи, номер рисунка, обозначается верх рисунка. В тексте статьи обязательны ссылки на рисунок. Рисунки и таблицы не должны дублировать друг друга. Подписи к рисункам делаются на отдельном листе с указанием номера рисунка и его названия. Для графиков и диаграмм отмечается, что дано по осям координат на приведенных кривых и т. п.

8. В формулах должны быть чётко размечены все элементы: строчные (м) и прописные (М) буквы, синим подчеркнуты латинские буквы, красным — греческие (с вынесением разметки на поля), четко выделяются подстрочные и надстрочные индексы; в случае цифр и букв, сходных по написанию (0 — цифра, О — буква), должны быть сделаны соответствующие пометки.

9. Сокращения слов, названий (кроме общепринятых сокращений мер физических, химических, а также математических величин и терминов) не допускаются. Меры даются по Международной системе единиц (СИ) в русском обозначении, температура по шкале Цельсия.

10. Латинские названия микроорганизмов приводятся в соответствии с современной классификацией. При первом упоминании название микроорганизма дается полностью — род и вид (например, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Streptomyces lividans*), при повторном упоминании родовое название сокращается до одной буквы (*E.coli*, *S.aureus*, *S.lividans*).

11. Названия генетических элементов даются в трёхбуквенном обозначении латинского алфавита строчными буквами, курсивом (*tet*), кодируемыми соответствующими генетическими элементами продукты — прописными прямыми буквами (TET).

12. В журнале используются международные непатентованные названия (МНН) препаратов. Торговые (патентованные) названия, под которыми препараты выпускаются различными фирмами, приводятся в разделе «Материал и методы», с указанием фирмы-изготовителя и их международным непатентованным названием.

13. Цитируемые источники литературы во всех видах публикаций нумеруются в порядке их упоминания в тексте и заключаются в квадратные скобки. В библиографическом описании указываются фамилия, инициалы автора, название статьи, журнала, год, том, номер журнала, номера страниц «от» и «до»; в случае монографии — фамилия и инициалы автора (редактора), название, город, год, количество страниц.

14. Статьи, ранее опубликованные или направленные в какой-либо другой журнал или сборник, не должны присылаться.

15. При несоблюдении указанных правил статьи редакцией не принимаются.

16. Статьи, принятые в журнал, проходят рецензирование. Редакция и издательство не несут ответственности за мнения, изложенные в публикациях, а также за содержание рекламы.

17. Рукописи отклонённых работ редакция не возвращает.

ЦИКЛОФЕРОН®



- Первый российский низкомолекулярный индуктор интерферона
- Безопасность, надежность и доказанная эффективность
- Производится в соответствии с международным стандартом качества GMP

Самый быстрый индуктор интерферона

Корректор естественного иммунитета
Широкий спектр противовирусного действия

Форма выпуска:

раствор для инъекций
125 мг/мл в ампулах по 2 мл №5;
таблетки по 150 мг, покрытые
кишечнорастворимой оболочкой, № 10 (50)
линимент 5% тубы по 5 мл и 30 мл

Показания к применению:

Таблетки

(Reg№ 001049/02):
вирусные инфекции
(грипп, ОРЗ, гепатиты, герпес),
кишечные инфекции,
нейроинфекции

Инъекции

(Reg№ 001049/03):
вирусные инфекции,
заболевания передаваемые
половым путем, кишечные
инфекции, нейроинфекции

Линимент

(Reg№ 001049/01):
вагиниты, парадонтиты,
герпетическая инфекция
кожи и слизистых оболочек

Противопоказания:

беременность, период лактации,
повышенная чувствительность к
компонентам препарата,
детский возраст до 4-х лет,
декомпенсированный цирроз печени

мы создаем
УНИКАЛЬНОЕ

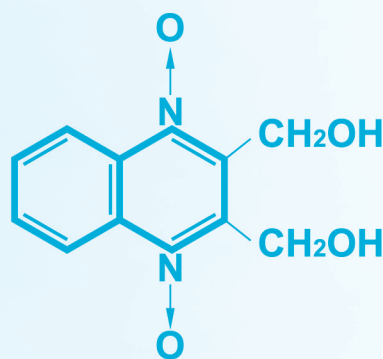
 ПОЛИСАН

191119, Россия, Санкт-Петербург,
Лиговский пр. д. 112.
Тел: + 7 (812) 710-82-25
E-mail: marketing@poly-san.ru



ДИОКСИДИН

Первый удар решает исход битвы



ООО «МИР-ФАРМ», МО, Киевское шоссе,
Бизнес-центр «Румянцево», стр. 1А,
Офис «МИР-ФАРМ»
Тел/факс: +7 (495) 984-28-40/41/47
www.mirpharm.ru