На правах рукописи

ШУБНИКОВА Елена Владимировна

ВЛИЯНИЕ ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИХ ФАКТОРОВ И ФОРМ АДАПТИВНОЙ ИЗМЕНЧИВОСТИ НА ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ ПАТОГЕННЫХ БУРКХОЛЬДЕРИЙ К ХИМИОТЕРАПЕВТИЧЕСКИМ ПРЕПАРАТАМ

03.02.03 – микробиология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Волгоград – 2015

Работа выполнена в Федеральном казенном учреждении здравоохранения Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека

Научный руководитель:

доктор медицинских наук, профессор,
заслуженный деятель науки РФ — Илюхин Владимир Иванович

Официальные оппоненты:

Попов Юрий Алексеевич - доктор биологических наук, профессор, заведующий отделом образовательных программ и подготовки специалистов, ФКУЗ «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб» Роспотребнадзора

Водопьянов Сергей Олегович - доктор медицинских наук, заведующий лабораторией биохимии микробов, ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора

Ведущая организация: ФГУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека

Защита диссертации состоится « »_____2015 г. в_____часов на заседании диссертационного совета Д 208. 008. 06 по защите докторских и кандидатских диссертаций при Волгоградском государственном медицинском университете по адресу: 400131, г. Волгоград, пл. Павших Борцов, д. 1. E-mail: http**://** www.volgmed.ru**.**

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ГБОУ ВПО «Волгоградский государственный медицинский университет» (400131, г. Волгоград, пл. Павших Борцов, д. 1) и на сайтах: http:// www.volgmed.ru, http:// vak2.ed.gov.ru.

Автореферат разослан « »_____2015 г.

Ученый секретарь диссертационного совета,
доктор социологических наук,
кандидат медицинских наук, профессор Ковалева Марина Дмитриевна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы. Сап и мелиоидоз – инфекционные заболевания, вызываемые высокопатогенными для человека и многих видов животных бактериями *Burkholderia mallei* и *Burkholderia pseudomallei* [Wiersinga W.J. et al., 2006; Rotz L.D. et al., 2002; Waag D.M. et al., 2004]. Лечение сапа и мелиоидоза осложнено природной устойчивостью возбудителей к химиотерапевтическим препаратам различных групп, включая аминогликозиды, пенициллины, цефалоспорины. Оба вида относительно устойчивы к хинолонам и макролидам, что также ограничивает выбор химиотерапевтических средств [Cheng A.C., Currie B.J., 2005; Thibault F.M. et al., 2004; Heine M. et al., 2001].

Наряду с этим, сложности в стратегии химиотерапии инфекций, вызываемых буркхольдериями, возникают в связи с легкостью формирования антибиотикорезистентных штаммов в процессе лечения, а также с затруднениями в выборе химиопрепаратов, так как нередко препараты, достаточно активные в опытах *in vitro,* оказываются неэффективными в экспериментах на зараженных животных и при лечении больных людей [Бриан Л.Е., 1984; Cheng A.C., Currie B.J., 2005; Илюхин В.И. и др., 1994]. Это связано с различными факторами, проявляющимися в процессе взаимодействия микроорганизма с химиопрепаратами в условиях *in vivo*: постантибиотическим эффектом, повышением антибиотикорезистентности бактерий при формировании биопленки, внутриклеточной персистенцией и, наконец, прямым воздействием на антибиотик физико-химических факторов внутренней среды макроорганизма [Walsh A.L. et al., 1997; Vorachit M. et al., 1993; Pruksachartvuthi S. et al., 1990; Илюхин В.И., Батманов В.П., 1997; Corkill J.E. et al., 1994].

При заболевании человека острыми формами сапа или мелиоидоза принципиальное значение имеет раннее начало лечения эффективными химиотерапевтическими препаратами. Для правильного выбора химиотерапевтических средств или их комбинации при лечении больных инфекционными заболеваниями в настоящее время используют различные методы определения чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препаратам *in vitro* (количественные, качественные). На неоднозначность оценки результатов определения чувствительности патогенных буркхольдерий к химиопрепаратам большое влияние оказывает ряд физико-химических факторов, проявляющих себя при взаимодействии микроорганизма с макроорганизмом (pH, температура, концентрация CO_2, сывороточный фактор), которые могут существенно изменять чувствительность бактерий к определенному виду антибактериальных препаратов [Ericsson, H.M.,1972].

В настоящее время известно, что большинство микроорганизмов в природных экосистемах и организме инфицируемых хозяев существуют не в виде свободно плавающих планктонных клеток, а в виде адгезированных к биотической и абиотической поверхности сообществ - биопленок. Согласно современным представлениям формирование биопленочных сообществ – один из основных механизмов выживания бактерий не только в окружающей среде, но и в организме человека и животных. В составе биопленки бактерии приобретают качественно новые свойства (биопленочный фенотип), отличные от планктонных культур. Это

касается, в первую очередь, способности биопленочной популяции к длительной персистенции вследствие большей защищенности от неблагоприятных факторов, таких как антибактериальные препараты, дезинфектанты и факторы иммунной системы макроорганизма [Costerton J.W. et al. 1999; Davey M.E., O'Toole G.A., 2000]. В частности, бактерии в биопленках в 100-1000 раз более резистентны к химиотерапевтическим средствам, чем микроорганизмы того же вида, находящиеся в планктонном состоянии [O'Toole G.A. et al., 2000; Rodney M. et al. 2002].

Кроме того, известно, что буркхольдерии, обладая рядом факторов вирулентности, выживают и размножаются в клетках фагоцитарного ряда (лейкоцитах и макрофагах), а также в нефагоцитарных клетках и клетках простейших [Beveridge T.J. et al.,1996; Inglis T.J. et al., 2003; Inglis T.J., 2000; Charoensap J. et al., 2009; Pruksachartvuthi S.,1990; Allwood E. et al., 2011]. Очевидно, что обеспечение успешной терапии сапа и мелиоидоза требует учета особенностей патогенеза, поскольку подбор химиопрепаратов в стандартных условиях рассчитан, в основном, на планктонные клетки, изолированные друг от друга, в то время как, бактерии, сохраняющиеся внутри биопленок и клеток макроорганизма, размножаются и вновь распространяются после завершения курса лечения, приводя к развитию хронических форм и рецидивов заболевания.

На основании изложенного представляется актуальным изучение антибактериальной активности химиотерапевтических препаратов в отношении ряда буркхольдерий, имеющих медицинское значение, в условиях, моделирующих характер взаимодействия химиопрепаратов с микроорганизмами *in vivo* (в физиологических диапазонах меняющихся температуры и pH среды, наличия 5 % двуокиси углерода в атмосфере и 10 % крови в питательной среде). Важным является изучение чувствительности к антибактериальным препаратам патогенных буркхольдерий в составе биопленок и персистирующих внутриклеточно с целью отбора объективных и доступных методов для получения максимума информации при выборе препаратов для проведения эффективной антибактериальной терапии и интерпретации результатов.

Цель работы. Изучение физико-химических факторов и форм адаптивной изменчивости патогенных буркхольдерий, влияющих на их чувствительность к химиотерапевтическим препаратам.

Задачи исследования:

1. Определить чувствительность буркхольдерий к химиотерапевтическим препаратам различными методами.
2. Выявить влияние некоторых физико-химических факторов (температуры, pH среды, добавления к среде 10 % крови и культивирования в атмосфере, содержащей 5 % двуокиси углерода) на чувствительность патогенных буркхольдерий к антибактериальным препаратам.
3. Изучить чувствительность возбудителей сапа и мелиоидоза в составе биопленок к ряду химиотерапевтических средств; сравнить действие химиопрепаратов на биопленочную и планктонную субпопуляции буркхольдерий.
4. Дать оценку чувствительности к химиотерапевтическим препаратам патогенных буркхольдерий, персистирующих в эукариотических клетках.

5. Подобрать антибактериальные препараты для адекватной терапии сапа и мелиоидоза.

Научная новизна работы. Проведено комплексное исследование чувствительности *B. mallei, B. pseudomallei, Burkholderia cepacia, Burkholderia thailandensis* к химиопрепаратам в стандартных условиях и условиях, моделирующих характер взаимодействия микроорганизма с макроорганизмом *in vitro.* Установлены значительные различия в антибиотикочувствительности буркхольдерий, зависящие от влияния физико-химических факторов среды (pH, температуры, наличия 5 % двуокиси углерода в атмосфере и белков плазмы крови в питательной среде).

Приоритетность исследований по изучению влияния физико-химических факторов на показатели чувствительности буркхольдерий к химиопрепаратам подтверждена патентом на изобретение № 2404252 от 27.04.2009 г. «Способ подбора высокоактивного антибактериального средства для лечения заболеваний, вызываемых патогенными буркхольдериями».

Впервые в рамках одной работы продемонстрирована принципиальная способность различных видов буркхольдерий к образованию биопленок на абиотических поверхностях в условиях *in vitro.* Проведена сравнительная оценка антибиотикочувствительности планктонных и биопленочных культур буркхольдерий. Установлено, что *B. mallei* и *B. pseudomallei* в составе зрелых биопленок высокорезистентны к химиотерапевтическим препаратам, применяемым при лечении сапа и мелиоидоза. Выявлена ингибирующая активность антибактериальных препаратов на ранних стадиях образования культурами биопленок.

Впервые в качестве моделей для изучения чувствительности к химиотерапевтическим средствам буркхольдерий, персистирующих в эукариотических клетках, использовали перитонеальные мышиные макрофаги и свободноживущие простейшие вида *Tetrahymena pyriformis*. Было выявлено, что патогенные буркхольдерии, интернированные в эукариотические клетки (макрофаги или простейшие), обладают повышенной резистентностью к химиотерапевтическим средствам, входящим в стандартные схемы лечения сапа и мелиоидоза. Оценка резистентности буркхольдерий, защищенных клетками тетрахимен и макрофагов, позволяет считать наиболее перспективным препаратом для лечения - меропенем.

Установлены различия в показателях чувствительности буркхольдерий к антибактериальным препаратам при определении ее в модифицированных условиях, коррелирующие с активностью препаратов *in vivo*, которые позволяют отобрать наиболее эффективные из них для проведения адекватного лечения заболеваний, вызываемых патогенными буркхольдериями.

Впервые показана высокая эффективность экстренной профилактики и лечения острого экспериментального сапа липосомальными формами меропенема. Приоритетность исследований подтверждена патентом на изобретение № 2490013 от 06.07.2012 г. «Способ лечения экспериментального сапа».

Теоретическая и практическая значимость работы. Материалы настоящего исследования использованы при написании главы «Мелиоидоз» в методических указаниях 4.2.2787-10. 4.2. «Методы контроля. Биологические и микробиологические факторы. Лабораторная диагностика мелиоидоза», утвержденных

Руководителем Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека Г.Г. Онищенко 06.12.2010 г.

Два патента зарегистрированы в Государственном реестре изобретений Российской Федерации: «Способ подбора высокоактивного антибактериального средства для лечения заболеваний, вызываемых патогенными буркхольдериями», № 2404252 от 27.04.2009 г.; «Способ лечения экспериментального сапа», № 2490013 от 06.07.2012 г.

Подготовлены и оформлены «Методические рекомендации по созданию селективных сред для возбудителей сапа и мелиоидоза», утвержденные директором ФКУЗ Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора В.В. Алексеевым 29.12.2010 г., протокол №10.

Материалы диссертационной работы используются при проведении курса лекций и практических занятий отделом подготовки специалистов по особо опасным инфекциям ФКУЗ Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора.

Методология и методы исследования. В работе использованы экспериментальные методы исследования: микробиологические (культивирование микроорганизмов на питательных средах, оценка чувствительности бактерий к антибактериальным препаратам), микроскопические (световая и электронная микроскопия микроорганизмов), биологические (моделирование и лечение инфекций на лабораторных животных), статистические.

Положения, выносимые на защиту:

1. Анализ чувствительности различных видов буркхольдерий к антибактериальным препаратам с использованием метода серийных разведений, и дискодиффузионного метода позволяет подобрать эффективные средства (комбинированные сульфаниламиды, тетрациклины, фторхинолоны и карбапенемы) для проведения профилактики и лечения буркхольдериозов. Применение ускоренного биохимического метода с индикатором сокращает время получения данных по чувствительности культур к антибактериальным препаратам до 4-6 ч.
2. Определение антибиотикочувствительности буркхольдерий в условиях, моделирующих характер взаимодействия химиопрепаратов с микроорганизмами *in vivo* (в физиологических диапазонах меняющихся температуры и pH среды, при добавлении 10 % крови к питательной среде и культивировании в атмосфере с 5 % CO_2), повышает ценность прогноза эффективности рекомендуемых химиотерапевтических средств.
3. В условиях *in vitro* на абиогенных поверхностях *B. mallei* и *B. pseudomallei* образуют биопленки, приобретая при этом, в отличие от бактерий находящихся в планктонной форме, повышенную резистентность к химиотерапевтическим препаратам. Антибактериальные препараты, применяемые при лечении сапа и мелиоидоза, активны в отношении формирующихся биопленок и не эффективны против полностью сформированных (зрелых), за исключением биопленок сапных культур.

4. Патогенные буркхольдерии, персистирующие в эукариотических клетках (макрофагах, клетках простейших), высокорезистентны к большинству антибактериальных препаратов, входящих в стандартные схемы терапии сапа и мелиоидоза. Наиболее активным против интернированных внутриклеточно буркхольдерий является препарат группы карбапенемов - меропенем.

5. Меропенем в липосомальной форме проявляет высокую эффективность при лечении острых форм сапа в эксперименте, обеспечивая санацию животных от интернированных в эукариотические клетки макроорганизма бактерий возбудителя, тем самым предупреждая возможность развития рецидивов заболевания.

Степень достоверности и апробация результатов. Диссертационная работа выполнена в лаборатории диагностики и химиотерапии ФКУЗ Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора в рамках трех НИР: «Изучение факторов, влияющих на объективную оценку чувствительности патогенных буркхольдерий к химиопрепаратам» (048-2-08), «Влияние форм физиологической адаптации патогенных буркхольдерий на чувствительность к антибактериальным препаратам» (058-3-11), «Подбор высокоактивного антибактериального средства для лечения заболеваний, вызываемых патогенными буркхольдериями» (070-6.11-11).

Результаты исследования получены с использованием современного сертифицированного и прошедшего метрологическую проверку оборудования, с последующей статистической обработкой и научным анализом полученных данных.

Материалы диссертации были представлены на научно-практической конференции «Современные аспекты эпидемиологического надзора и профилактики особо опасных и природно-очаговых болезней» (Иркутск, 2009); X Межгосударственной научно-практической конференции «Актуальные проблемы предупреждения и ликвидации последствий чрезвычайных ситуаций в области санитарно-эпидемиологического благополучия населения государств-участников СНГ» (Ставрополь, 2010); Всероссийской научно-практической конференции с международным участием, посвященной 80-летию кафедры эпидемиологии и доказательной медицины «Актуальные проблемы эпидемиологии на современном этапе» (Москва, 2011); X съезде ВНПОЭМП (Москва, 2012); научной конференции «Патогенные буркхольдерии» (Волгоград, 2012); научно-практической конференции «Диагностика и профилактика инфекционных болезней» (Новосибирск, 2013); научно-практической конференции молодых ученых и специалистов «От эпидемиологии к диагностике инфекционных заболеваний: подходы, традиции, инновации» (Санкт-Петербург, 2014); Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Актуальные вопросы обеспечения противоэпидемических мероприятий в зоне чрезвычайных ситуаций» к 80-летию Федерального казенного учреждения здравоохранения «Иркутского ордена Трудового Красного Знамени научно-исследовательского противочумного института Сибири и Дальнего Востока» (Иркутск, 2014); научно-практической конференции посвященной 80-летию Ростовского-на-Дону научно-исследовательского противочумного института «Современные аспекты изучения особо опасных и других инфекционных болезней» (Ростов-на-Дону, 2014).

Публикации. По теме диссертации опубликовано 14 работ, в том числе, 6 статей в рецензируемых журналах, рекомендованных ВАК РФ для опубликования основных научных результатов диссертаций на соискание ученой степени кандидата и доктора наук. Получены два патента на изобретения.

Структура и объем работы. Диссертация изложена на 167 страницах компьютерного текста, иллюстрирована 20 рисунками и 15 таблицами. Работа состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, изложения и обсуждения результатов собственных исследований, заключения, выводов и списка использованной литературы, включающего 282 источника, из них 54 на русском и 228 на английском языках.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАННИЕ РАБОТЫ

Материалы и методы. В работе использовали 20 штаммов *B. pseudomallei,* 14 штаммов *B. mallei*, 14 штаммов *B. cepacia,* предоставленных коллекционным центром ФКУЗ Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора. Также были использованы 5 штаммов *B. thailandensis*, выделенные в Таиланде, предоставленные D. Woods, Калгари, 2002 г., и 1 штамм ресничных инфузорий *Tetrahymena pyriformis* GL, полученный из Института цитологии РАМН, Санкт-Петербург.

Штаммы буркхольдерий выращивали в жидких и на плотных агаризованных питательных средах: триптиказо-соевый агар и бульон (ТСА, ТСБ), псевдомонадный агар (F-агар), LB-бульон («Difco», США). Опыты по определению чувствительности к химиопрепаратам проводили на агаре и в бульоне Мюллер-Хинтона (МХА, МХБ) («HiMedia», Индия), Antibiotic medium 3 (АМ 3) («Difco», США), глюкозо-триптонной среде с индикатором (ГТСИ).

Чувствительность культур к химиопрепаратам определяли следующими методами: методом серийных разведений на плотной или в жидкой питательной среде МХА или МХБ, содержащей заданные убывающие концентрации препаратов; диско-диффузионным и с помощью Е-тестов («HiMedia», Индия). Для приготовления рабочих растворов антибиотиков использовали субстанции антибактериальных препаратов с известной активностью. Постановка опытов и учет результатов соответствовали общепринятым стандартам [МУК 4.2.1890-04, 2004; МУК 4.2.2495-09, 2009].

Влияние температуры и pH среды на антибиотикочувствительность буркхольдерий изучали на плотной среде МХА, в которой pH устанавливали фосфатным буфером (6,0, 7,2 и 8,0). Суточные бульонные культуры буркхольдерий высевали на агар, помещали в термостат с температурой 32, 37 и 41 °С. За контрольные принимали результаты, полученные на чашках в стандартных условиях: pH 7,0 инкубация при 37 ºС. Оценку чувствительности буркхольдерий к химиотерапевтическим препаратам при культивировании в атмосфере с повышенным содержанием CO_2 и на среде с добавлением 10 % крови проводили на среде МХА с добавлением свежей гепаринизированной крови («Richter», 5 МЕ/мл) лабораторных животных (белых крыс, золотистых хомячков) в атмосфере, содержащей 5 %

CO_2 (CO_2 инкубатор «Thermo Scientific», США). Чувствительность к химиотерапевтическим средствам определяли диско-диффузионным методом.

Для ускоренного определения чувствительности буркхольдерий к химиотерапевтическим препаратам готовили ГТСИ с индикатором бромтимоловым синим. В качестве контроля использовали среды МХА и АМ 3, на поверхность агара, засеянного микроорганизмами, накладывали диски, пропитанные антибиотиками, результаты учитывали через 24-48 ч [Илюхин В.И. и др., 2007; Илюхин В.И. и др., 2008].

Пассирование культур проводили на белых мышах, исходное заражение начинали введением $5x10^8$ м.к. Погибших мышей вскрывали, селезенку и печень дезинтегрировали в растворе 0,9 % NaCl, полученную суспензию в объеме 0,5 мл вводили подкожно следующим в пассаже животным. Всего пассажей на каждом штамме проведено от 10 до 30, прекращение заражения и выделение окончательной пассированной культуры с последующей лиофилизацией выполняли после определения Dlm. Пассирование культур на питательных средах осуществляли путем многократных (20-30) пересевов 2-суточных культур на ТСА. Антибиотикочувствительность штаммов буркхольдерий определяли диско-диффузионным методом.

Биопленки получали при выращивании буркхольдерий в ТСБ на абиотических поверхностях в течение 24-72 ч при 37 °С. Состояние биопленок оценивали микроскопически через 24-72 ч роста, после фиксации в 96 % этиловом спирте и окрашивания 1 % раствором генцианвиолета [Тец Г.Ю. и др., 2004]. Световую микроскопию буркхольдериальных биопленок проводили на микроскопе PrimoStar («Zeiss», Германия), в режиме проходящего света. Изображения получали с использованием цифровой фотокамеры AxioCamERc 5s («Zeiss», Германия).

Подготовку препаратов к исследованию в ультратонких срезах осуществляли, используя двойную глутаральдегидно-осмиевую фиксацию материала (биопленки, сокультуры тетрахимен с буркхольдериями) [Гаер Г., 1974]. Для выявления кислых экзополисахаридов, входящих в состав межклеточного матрикса биопленок, использовали окраску препаратов 0,1 % раствором рутениевого красного («Serva», США) по J.H. Luft [Luft J.H., 1971]. Дальнейшую подготовку препаратов для электронной микроскопии проводили по общепринятой методике. Ультратонкие срезы исследовали в электронном микроскопе JEM-100 SX (Япония).

Чувствительность к антибактериальным препаратам биопленочной популяции буркхольдерий определяли методом серийных разведений в МХБ, содержащем заданные убывающие концентрации химиопрепаратов. Контролем служили пробы с предварительно сформированными биопленками, помещенные в МХБ без добавления химиопрепаратов. Изучение влияния химиотерапевтических средств на процесс формирования буркхольдериями биопленок проводили путем добавления к суточной бульонной культуре антибактериальных препаратов в концентрациях, создаваемых препаратами в тканях макроорганизма при введении их в средних терапевтических дозах. Затем в течение 1-3 сут наблюдали за процессом формирования биопленок. Контролем служили бульонные культуры бурк-

хольдерий, образующие биопленки в среде без добавления химиотерапевтических препаратов.

В качестве моделей для оценки чувствительности бактерий, персистирующих в эукариотических клетках, использовали перитонеальные макрофаги и простейшие вида *T. pyriformis*. Макрофаги получали от белых беспородных мышей на 4-й день после предварительного введения в асептических условиях в брюшную полость 2 мл стерильного 1 % пептонного бульона. Культивирование макрофагов проводили в среде RPMI-1640 с добавлением глютамина (ФГУП им. М.П. Чумакова РАМН») и 10 % фетальной телячьей сыворотки (HyClone Fetal Bovine Serum) при 37 ºС в атмосфере с 5 % CO_2.

Аксенические культуры *T. pyriformis* выращивали в LB-бульоне при температуре 28 ºС. Тетрахимены и макрофаги соединяли с буркхольдериями в соотношении 1:100, 1:10 соответственно. После 24-48 часовой экспозиции из пробирок с отсутствием видимого роста производили высев на ТСА. Оценивали МБК препаратов отдельно для планктонных бактерий, сокультур буркхольдерий с простейшими и бактерий, интернированных в макрофаги.

Для определения вирулентности культур буркхольдерий подкожно инфицировали золотистых хомячков и белых крыс суспензией суточной агаровой культуры с интервалом в 1 lg. $ЛД_{50}$ рассчитывали по методике Кербера [Ашмарин И.П., Воробьев А.А., 1962].

Экспериментальный мелиоидоз моделировали на золотистых хомячках массой 100-120 г и на белых крысах массой 150-200 г, которых заражали подкожно 0,5 мл суспензии суточной агаровой культуры возбудителей в 0,9 % растворе NaCl в дозе 10^3 $ЛД_{50}$. Лечение сапа проводили только на модели золотистых хомячков. Терапию начинали через 24 ч после инфицирования и проводили в течение 10 дней. Дозы препаратов определяли в соответствии с рекомендациями по лечению острых форм мелиоидоза и сапа [Cheng A.C., Currie B.J., 2005].

Препараты вводили один раз в сутки: ципрофлоксацин, хлорамфеникол, цефтазидим, рифампицин, ко-тримоксазол, доксициклин - давали *per os* в суспензии подсолнечного масла, меропенем вводили подкожно. Об эффективности лечебного действия препаратов судили по числу выживших леченых животных, результатам их бактериологического исследования, по средней продолжительности жизни павших животных. Препарат считали эффективным, если он предохранял от гибели не менее 50 % зараженных животных при 100 % гибели животных в контроле.

Терапию экспериментального сапа клатратными и липосомальными формами препаратов проводили на золотистых хомячках массой 90-110 г. Инфицировали животных подкожно культурой *B. mallei* Ц-5 в дозе 10^4 м.к., что составляло 10^3 Dlm. Введение химиопрепаратов начинали через 4, 24 и 48 ч после заражения. Химиопрепараты вводили *per os* в виде суспензии в подсолнечном масле и парентерально в 0,9 % растворе NaCl, или в виде клатратного соединения препаратов с 6 % полиглюкин-декстраном с молекулярной массой 60000 (ОАО «Биохимик»). Кроме того, препараты вводили в составе липосом, которые готовили по методу Szoka [Szoka, J.F., 1978].

Препараты вводили ежедневно, за исключением липосомальных форм, которые вводили внутрибрюшинно с интервалом в 2 сут [Rotov K.A., 2012]. Доза вводимых препаратов определялась величиной максимально достижимой концентрации в крови. После завершения курса лечения животных наблюдали не менее 21 сут, затем усыпляли хлороформом.

Статистическую обработку результатов проводили с использованием непараметрических критериев анализа: достоверность различий выживаемости животных в опытной и контрольной группах при лечении оценивали по критерию Уайта, сравнение показателей чувствительности к антибиотикам в разных условиях постановки проводили по критерию знаков [Paulson D.S., 2008, Лакин Г.Ф., 1990], в качестве средних величин использовали медиану. Достоверность различия уровня выживаемости животных опытных и контрольных групп оценивалась по методу Фишера для групп наблюдений по качественным показателям [Генес В.С., 1964].

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Оценка влияния ряда факторов на чувствительность буркхольдерий к химиопрепаратам

Чувствительность различных видов буркхольдерий к химиотерапевтическим средствам. В ходе исследования оценили чувствительность к антибактериальным препаратам четырех видов буркхольдерий (*B. mallei, B. pseudomallei, B. cepacia* и *B. thailandensis*) стандартными и ускоренным методами. Сравнительная оценка полученных антибиотикограмм буркхольдерий, исследованных методом серийных разведений и диско-диффузионным, не выявляла существенных различий в результатах чувствительности у большинства изученных штаммов буркхольдерий. Значения МПК, полученные Е-тестом и методом серийных разведений, являются также сопоставимыми. Время получения результатов при использовании всех вышеперечисленных стандартизованных способов составляет в среднем 24 ч. Выбор метода для определения чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препаратам зависит от конкретных условий. Было показано, что диско-диффузионный метод, в том числе Е-тест удобен и прост, незаменим при большом объеме исследований. Однако наиболее точным является метод серийных разведений.

Анализ антибиотикочувствительности буркхольдерий показал, что исследованные штаммы *B. mallei, B. pseudomallei, B. cepacia, B. thailandensis* проявляют высокую чувствительность к химиотерапевтическим препаратам следующих групп: карбапенемам, фторхинолонам, некоторым комбинированным сульфаниламидам и β-лактамам, умеренную – к рифампицину, хлорамфениколу и тетрациклинам. В целом эти данные не отличаются от результатов ранее проведенных исследований, за исключением появления в перечне химиопрепаратов до этого неизвестных [Антонов Ю.В. и др., 1991; Cheng A.C., Currie B.J., 2005].

Данные по определению МПК методом серийных разведений на среде Мюллер-Хинтона представлены в таблице 1. При сравнении видовой чувствительности буркхольдерий можно заключить, что наиболее устойчивы к химиоте-

рапевтическим средствам штаммы сапрофитических видов, а максимальная чувствительность проявляется у штаммов единственного среди буркхольдерий патогена завершенного типа *B. mallei.*

Таблица 1 - Чувствительность буркхольдерий к химиотерапевтическим препаратам

Препараты	МДК	МПК $_{50}$		S-R интервал	МПК $_{50}$	
		B. mallei (14)	*B. pseudomallei* (20)		*B. cepacia* (14)	*B. thailandensis* (5)
Амоксиклав	40	3,1(1,5-6,2)	6,2(3,1-12,5)	6-24	6,2(3,1-50)	6,2(3,1-25)
Ампициллин	47	50(25->100)	100(100-100)	4-16	>100(>100)	>100(>100)
Гентамицин	4	1,5(0,7-5)	25(12,5-100)	4-16	>100(>100)	>100(>100)
Доксициклин	4	0,1(0,1-1,5)	0,7(0,7-3,1)	4-16	12,5(6,2-25)	12,5(3,1-25)
Ко-тримоксазол	100	1,5(0,7-3,1)	12,5(6,2-50)	40-80	25(3,1-50)	12,5(3,1-25)
Меропенем	100	0,7(0,7-1,5)	1,5(0,7-3,1)	4-16	6,2(1,5-12,5)	3,1(1,5-6,2)
Офлоксацин	10	1,5(0,7-6,2)	3,1(1,5-12,5)	2-8	3,1(1,5-6,2)	6,2(3,1-12,5)
Пиперациллин	350	50(50-100)	>100	16-64	>100	>100
Полимиксин В	15	>100	>100	14-18	>100	>100
Рифампицин	20	3,1(3,1-12,5)	12,5(3,1-25)	4-16	6,2(6,2-25)	12,5(6,2-25)
Хлорамфеникол	20	3,1(3,1-12,5)	12,5(6,2-25)	8-32	6,2(3,1-50)	12,5(6,2-25)
Цефтазидим	70	3,1(1,5-12,5)	6,2(3,1-50)	8-32	3,1(3,1-25)	6,2(3,1-25)
Ципрофлоксацин	4	1,5(1,5-6,2)	3,1(0,7-6,2)	1-4	1,5(0,7-3,1)	3,1(1,5- 6,2)

Примечания:
1. МДК – максимально достижимая концентрация препарата в крови, мкг/мл;
2. Цифры после обозначения вида буркхольдерий – количество изученных штаммов;
3. Цифровой материал таблицы – МПК$_{50}$ препарата (медиана), мкг/мл;
4. В скобках амплитуда колебания показателя МПК;
5. S-R интервал определен по МУК 4.2.2495-09.

Для укорочения времени получения и интерпретации результатов по антибиотикочувствительности применяли метод ускоренного ее определения, разработанный в нашей лаборатории. Метод основан на использовании плотной глюкозо-триптонной среды с индикатором бромтимоловым синим. Буркхольдерии при расщеплении глюкозы в среде культивирования вызывают сдвиг pH в кислую сторону, и этот процесс можно контролировать за счет изменения цвета индикатора.

Показано, что при выращивании буркхольдерий в течение 4-6 ч среда закисляется, что выражается в пожелтении агара в месте высева бактериальной взвеси, когда визуально рост культур еще не определяется. При дальнейшем размножении бактерий зона роста культур желтеет, а цвет среды вокруг дисков с химиопрепаратами с видимой зоной подавления роста остается с неизмененным зеленым цветом. Установлено, что размер зон подавления роста буркхольдерий на стандартных средах и на среде с индикатором отличаются незначительно. В то же время получение результатов на ГТСИ существенно ускоряется по сравнению со стандартной средой (4-6 ч и 24-48 ч соответственно) [Илюхин В.И. и др., 2008].

Чувствительность к химиопрепаратам культур буркхольдерий, пассированных на лабораторных животных и питательных средах. При исследовании вариабельности вирулентности и чувствительности к химиотерапевтическим препаратам культур буркхольдерий, установлено, что многократные пересевы

штаммов *B. mallei* и *B. pseudomallei* на питательных средах незначительно влияют на уровень чувствительности культур к антибактериальным препаратам.

В отличие от этого, длительное пассирование через организм животных приводит не только к повышению вирулентности культур, но и, как правило, к достоверному снижению устойчивости патогенных буркхольдерий к химиотерапевтическим препаратам. Так, чувствительность к ломефлоксацину, имипенему, доксициклину, ко-тримоксазолу, рифампицину пассированных на белых мышах штаммов *B. pseudomallei* С-141, 5677 и *B. mallei* 10230, В-120, Ц-5 достоверно повышалась по сравнению с исходными непассированными штаммами, о чем свидетельствовало увеличение диаметров зон задержки роста вокруг дисков с химиотерапевтическими препаратами.

Вирулентность большинства культур буркхольдерий после многократных пересевов на ТСА снижалась.

Влияние физико-химических факторов среды на чувствительность буркхольдерий к химиопрепаратам. Наряду с определением чувствительности в стандартных условиях по общепринятым методикам, чувствительность культур к химиопрепаратам определяли на среде Мюллер-Хинтона в различных опытах: изменяли pH среды и температуру инкубирования, добавляли к среде 10 % крови лабораторных животных и проводили культивирование в атмосфере, содержащей 5 % CO_2.

В ходе исследования выявлено, что антибиотикочувствительность типовых штаммов буркхольдерий: *B. mallei* 10230, *B. pseudomallei* С-141, *B. thailandensis* 264, *B. cepacia* 25416 может существенно изменяться в зависимости от показателей pH. Так, было отмечено, что у изученных штаммов буркхольдерий при снижении значения pH понижается чувствительность к антибактериальным препаратам. Влияние колебаний температуры разнонаправленное, но также весьма существенно меняющее величину МПК.

Кроме того, было изучено *in vitro* влияние на активность различных химиопрепаратов таких факторов, как культивирование в атмосфере с 5 % двуокиси углерода и добавление к питательной среде 10 % крови лабораторных животных (золотистых хомячков, белых крыс).

Как видно из данных, приведенных в таблице 2, в большинстве случаев устойчивость к антибактериальным препаратам в измененных условиях достоверно повышалась, наибольшее снижение чувствительности буркхольдерий наблюдалось в опытах с рифампицином ($p<0,05$). Зона подавления роста рифампицином уменьшилась до 8 мм, выйдя за показатель резистентности штаммов (<14 мм). В то же время размер зоны подавления роста штаммов ко-тримоксазолом и в модифицированных условиях значительно превышал стандартное значение чувствительности к данному антибактериальному препарату, равняясь величине в пределах 28-33 мм при показателе чувствительности >16 мм. В большинстве случаев повышение антибиотикорезистентности культур выявлялось в опытах с кровью высокочувствительного к буркхольдериям вида экспериментальных животных – золотистых хомячков.

Таблица 2 - Чувствительность к химиопрепаратам буркхольдерий на среде Мюллер-Хинтона с добавлением крови лабораторных животных в атмосфере 5 % CO_2

Химиопрепараты	С	<R->S	Штаммы											
			B. mallei 10230			*B. pseudomallei* С-141			*B. cepacia* 25416			*B. thailandensis* 264		
			к	з.х.	б.к.	к	з.х.	б.к.	к	з.х.	б.к.	к	з.х.	б.к.
Ципрофлоксацин	5	16-21	30	22*	28	30	25*	28	30	30	25*	33	30	29
Меропенем	10	13-16	33	22*	32	30	20*	28	25	10*	10*	25	20*	17*
Цефтазидим	30	14-18	27	20*	29	25	20*	20*	22	8*	15*	25	20*	23
Хлорамфеникол	30	12-18	30	30	30	28	25	22*	25	11*	15*	25	25	22
Доксициклин	10	12-16	30	25	30	25	20*	20*	20	15*	18	25	25	22
Рифампицин	30	14-19	20	8*	15*	12	8*	11	12	8*	11	12	10	11
Ко-тримоксазол	25	10-16	35	33	32	30	28	28	30	25	24	28	26	27

Примечания:
1. С – содержание препарата в диске, мкг;
2. <R ->S – зона оценки резистентности (R), чувствительности (S) буркхольдерий к данному антибиотику, мм;
3. К – контроль – зона задержки роста на среде Мюллер-Хинтона;
4. З.х. и б.к. – зоны задержки роста на среде Мюллер-Хинтона с добавлением крови золотистых хомячков или белых крыс в атмосфере с 5 % CO_2;
5. Цифры – медиана 5 опытов;
6. * - достоверность различия показателя с контролем превышает 95 % ($p<0,05$).

Изучение влияния форм адаптивной изменчивости на чувствительность буркхольдерий к химиопрепаратам

Чувствительность к химиотерапевтическим препаратам буркхольдерий, образующих биопленки. Была изучена способность буркхольдерий к образованию биопленок на различных поверхностях *in vitro*. Для получения биопленок исследуемых штаммов буркхольдерий использовали метод, основанный на способности бактерий колонизировать различные абиогенные поверхности, то есть рост на границе раздела фаз «жидкость - твердое вещество». Кроме того, биопленки получали в бульоне на границе раздела фаз «жидкость - воздух» [Merritt J.H. et al., 2011].

Было показано, что все изученные виды буркхольдерий легко образуют биопленки на поверхности жидких питательных сред. Причем, плотную, зрелую биопленку на поверхности ТСБ у штаммов *B. cepacia, B. thailndensis, B. pseudomallei* можно увидеть через 24 ч культивирования при 37 °С. В отличие от этого, штаммы *B. mallei* образуют тонкую, неравномерную, легко разрушающуюся биопленку не ранее, чем через 48 ч роста, при этом, интенсивность и характер биопленкообразования зависят от штамма.

Для более детального изучения особенностей формирования биопленок данными видами была проведена световая и электронная микроскопия. Микроскопическое исследование препаратов биопленок, окрашенных генцианвиолетом, позволило выявить многослойные структуры, включающие группы адгезированных к абиогенной поверхности бактерий, заключенных в межклеточный матрикс интенсивно фиолетового цвета на микрофотографиях (рис.1). Микроскопически биопленки исследуемых видов имели сходную организацию.

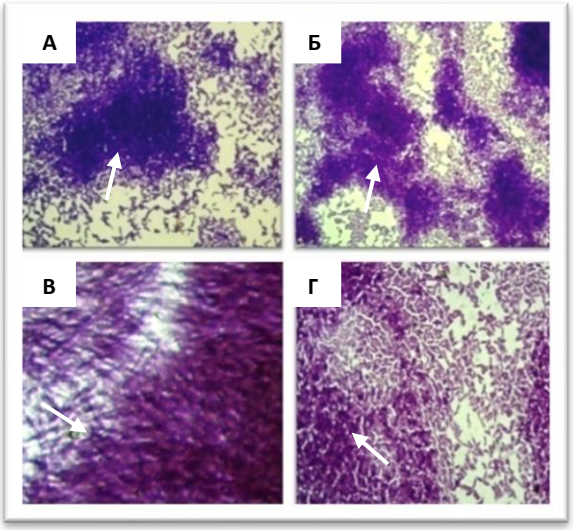

Рисунок 1. Световая микроскопия биопленок буркхольдерий, образованных на твердой поверхности. Окрашивание генцианвиолетом, х 1,000. Стрелка – внеклеточный матрикс; **А** - *B. thailandensis* 264 (24 ч); **Б** - *B. pseudomallei* VPA (24 ч); **В** - *B. mallei* 10230 (72 ч); **Г** - *B. cepacia* 25416 (24 ч).

При электронной микроскопии ультратонких срезов биопленок, образованных на различных поверхностях *in vitro*, были обнаружены агрегаты тесно контактирующих между собой клеток буркхольдерий, окруженные диффузным рутений позитивным матриксом (рис. 2). При этом, электронно-микроскопическая визуализация показала экзополисахаридную природу межклеточного вещества, окружающего бактериальные клетки.

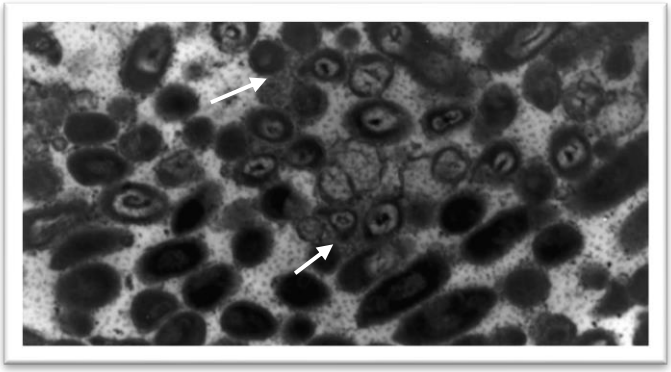

Рисунок 2. Ультратонкий срез биопленки *B. pseudomallei* 107, образованной на полистироловой поверхности. Стрелки – экзополисахаридный матрикс. Увеличение х 8,000.

Анализ антибиотикочувствительности планктонных культур и биопленок штаммов возбудителей сапа и мелиоидоза к меропенему, доксициклину, цефтазидиму, ко-тримоксазолу и рифампицину показал, что буркхольдерии в составе полностью сформированных (зрелых) биопленок высокорезистентны ко всем изученным препаратам. Установлено повышение резистентности биопленочных культур к антибактериальным препаратам более чем в 10 раз, по сравнению с планктонными, о чем свидетельствует увеличение показателей МПК. Возбудитель мелиоидоза в составе биопленки более устойчив, чем возбудитель сапа.

Все изученные препараты были не активны против зрелых мелиоидозных биопленок. При этом, в отношении сформированных сапных биопленок был эффективен меропенем, в концентрациях, не превышающих МДК. Кроме того, выявлена ингибирующая активность антибактериальных препаратов на ранних стадиях формирования культурами биопленок. Так, все изученные антибактериальные препараты препятствовали образованию биопленки сапных культур в концентрациях, которых они достигают в тканях макроорганизма при введении их в терапевтических дозах. Против биопленочных культур остальных видов буркхольдерий высокоэффективными были меропенем, цефтазидим и ко-тримоксазол.

Чувствительность к химиотерапевтическим средствам патогенных буркхольдерий, персистирующих в эукариотических клетках. Персистенция буркхольдерий в макроорганизме рассматривается как важное звено в патогенезе инфекционного процесса и реализуется через адаптацию бактерий к факторам защиты, приводя к хроническому рецидивирующему течению. В связи с этим, было изучено влияние на буркхольдерии, персистирующие в эукариотических клетках (мышиных макрофагах, простейших вида *T. pyriformis*), основных химиопрепаратов (меропенема, доксициклина, цефтазидима, ко-тримоксазола), применяемых при лечении сапа и мелиоидоза.

В ходе исследования показано, что штаммы *B. pseudomallei*, *B. mallei*, интернированные в эукариотические клетки, проявляют более высокую резистентность к химиотерапевтическим средствам, по сравнению с их планктонными культурами, о чем свидетельствует увеличение МБК в три и более раз в зависимости от штамма и антибактериального препарата. Оценка резистентности буркхольдерий на модели «макрофаг - буркхольдерия» показала, что наиболее эффективным из препаратов является меропенем, активность которого особенно выражена в отношении возбудителя сапа (МБК 111 мкг/мл) (рис. 3).

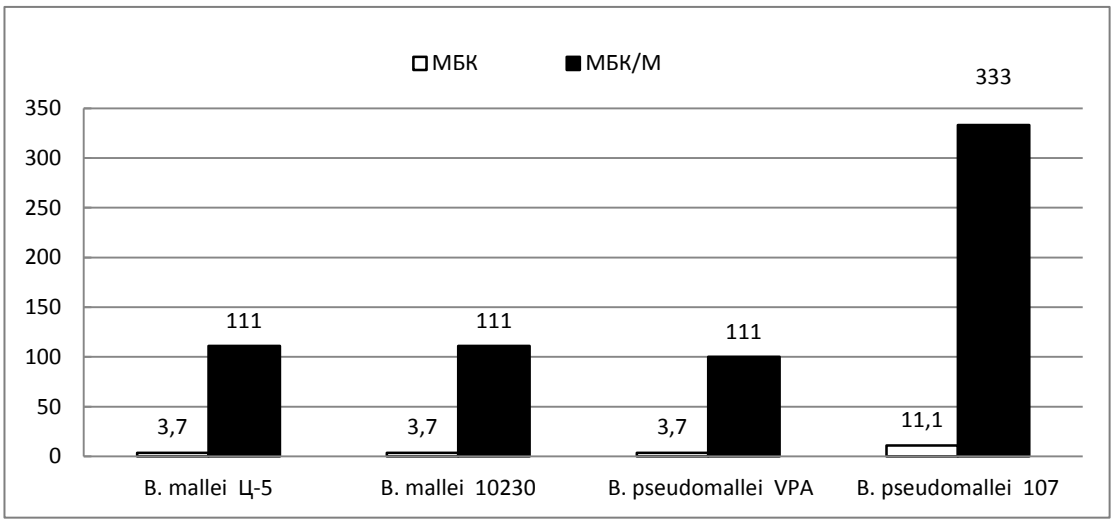

Рисунок 3. Показатели чувствительности к меропенему буркхольдерий, интернированных в макрофаги

Обозначения*:* МБК - минимальная бактерицидная концентрация препарата по отношению к планктонным взвесям буркхольдерий, мкг/мл; МБК/М - минимальная бактерицидная концентрация препарата для буркхольдерий, интернированных в макрофаги, мкг/мл; по оси ординат - концентрация меропенема, мкг/мл; по оси абсцисс - штаммы буркхольдерий

Изучение резистентности буркхольдерий, защищенных клетками тетрахимен, также позволяет считать наиболее активным препаратом меропенем (МБК 11,1-100 мкг/мл), так как его бактерицидные концентрации сопоставимы с концентрацией данного химиопрепарата в тканях макроорганизма при введении средних терапевтических доз (50-112 мкг /мл) (рис. 4).

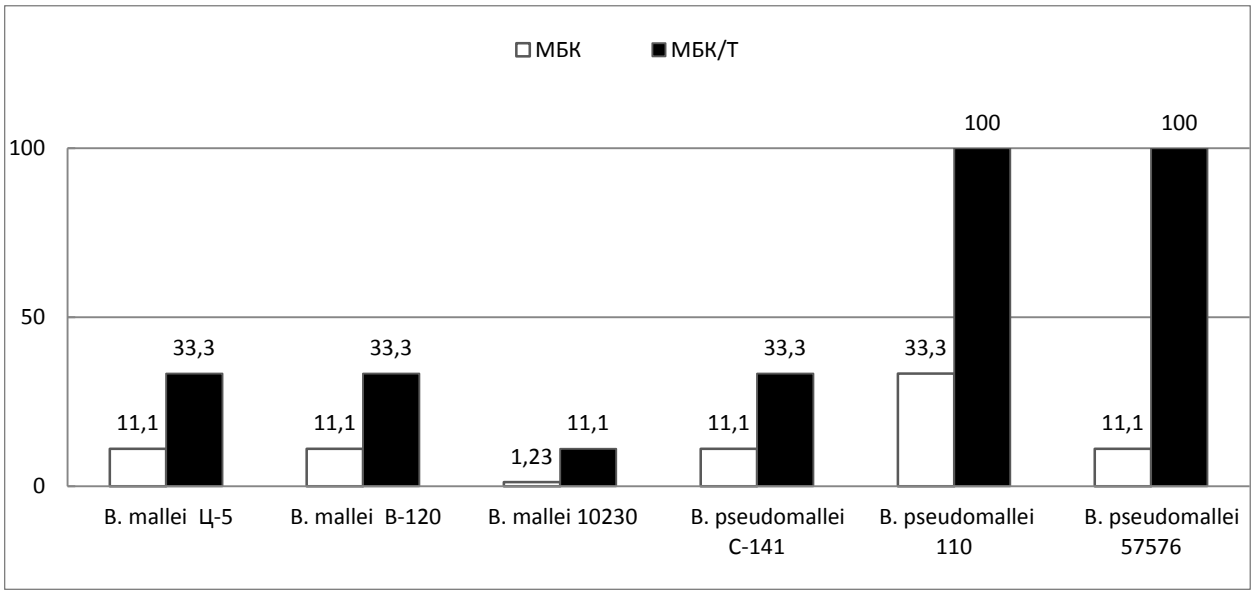

Рисунок 4. Показатели чувствительности к меропенему буркхольдерий, интернированных в тетрахимены

Обозначения*:* МБК - минимальная бактерицидная концентрация препарата по отношению к планктонным взвесям буркхольдерий, мкг/мл; МБК/Т- минимальная бактерицидная концентрация препарата для буркхольдерий, интернированных в тетрахимены, мкг/мл**;** по оси ординат – концентрация меропенема, мкг/мл; по оси абсцисс - штаммы буркхольдерий

По результатам МБК/М, МБК/Т очевидно, что доксициклин, цефтазидим и ко-тримоксазол не оказывают существенного влияния на внутриклеточно расположенные возбудители сапа и мелиоидоза в концентрациях, сопоставимых с МДК препаратов в тканях при введении их в терапевтических дозах. Таким образом, из полученных данных следует, что патогенные буркхольдерии, интернированные в эукариотические клетки (макрофаги или простейшие), обладают повышенной резистентностью к антибактериальным препаратам, что во многом объясняет не только устойчивость некоторых из них во внешней среде, но и недостаточную эффективность лечения заболеваний, вызываемых ими у человека и животных.

Терапевтическая эффективность химиопрепаратов при лечении экспериментального сапа и мелиоидоза. Была изучена терапевтическая эффективность химиопрепаратов, отобранных на основании их МПК *in vitro* (цефтазидима, меропенема, ципрофлоксацина, доксициклина, рифампицина, хлорамфеникола, ко-тримоксазола), на модели высокочувствительных к сапу и мелиоидозу золотистых хомячках.

Из выбранных химиопрепаратов для терапии сапа и мелиоидоза наиболее эффективным оказался ко-тримоксазол, достоверно снизивший уровень летальности при заражении возбудителем сапа и увеличивший продолжительность жизни животных при обеих инфекциях. Достаточной

активностью при терапии сапа обладали ципрофлоксацин и доксициклин, которые, однако, при мелиоидозной инфекции не предотвращали летальность животных, но достоверно увеличивали продолжительность их жизни. Изучение терапевтического действия антибактериальных препаратов при экспериментальной мелиоидозной инфекции белых крыс показало, что эффективными являются все изученные препараты, за исключением хлорамфеникола.

Показатели эффективности антибактериальных препаратов (летальность и продолжительность жизни экспериментальных животных) коррелировали с уровнем чувствительности к ним штаммов буркхольдерий при определении МПК в среде с добавлением 10 % крови экспериментальных животных и культивировании в атмосфере с 5 % CO_2. Уровень защиты при химиотерапии сапа и мелиоидоза зависел также от характера течения инфекции. При заражении равноэффективной дозой 10^3 $ЛД_{50}$ скорость инфекционного процесса распределялась в следующем порядке: мелиоидоз (золотистые хомячки), сап (золотистые хомячки), мелиоидоз (белые крысы). Терапевтическая эффективность изученных химиопрепаратов соответствовала той же тенденции.

Наша модификация метода оценки чувствительности буркхольдерий к антибактериальным препаратам позволяет по степени снижения антибиотиокочувствительности исследуемых культур высказать предположение об эффективности тех или иных препаратов при лечении заболеваний, вызываемых патогенными буркхольдериями. Эффективность антибактериального препарата оценивается по показателю сохранения его активности в условиях, максимально приближенных к процессу, протекающему в макроорганизме, на уровне характеристик роста бактерий в стандартных условиях. При этом, зона подавления роста может существенно превышать показатель чувствительности микроорганизма к данному противомикробному средству. Следовательно, прогнозирование результатов лечения различными химиотерапевтическими средствами становится более точным при использовании методов оценки взаимодействия в системе «микроб – химиопрепарат» в условиях, максимально приближенных к макроорганизму.

Наиболее активными антибактериальными препаратами *in vitro* в отношении культур *B. mallei* считаются цефтазидим, доксициклин, ко-тримоксазол и меропенем [Thibault F.M., 2004; Estes D.M. et al., 2010]. Сравнение показателей МПК и МБК высокоактивных *in vitro* препаратов с их концентрациями в плазме крови человека, достигаемыми при назначении средних терапевтических доз, предполагает их эффективность при лечении сапной инфекции. Однако полученные в настоящем исследовании данные по МБК этих же препаратов против буркхольдерий, интернированных в клетки простейших и перитонеальные мышиные макрофаги, ставят под сомнение эффективность лечения острых форм сапа всеми препаратами, кроме меропенема, так как МБК меропенема для внутриклеточных бактерий *B. mallei* ниже или сопоставимы с МДК. Установленные различия между МБК препаратов для планктонных взвесей *B. mallei* и бактерий, интернированных в эукариотические клетки, предполагают высокую вероятность рецидивов заболе-

вания после окончания терапии, так как именно в этот период, несмотря на отсутствие жизнеспособных бактерий в плазме крови, становится возможным выход возбудителя сапа из эукариотических клеток и появления симптомов реинфекции.

Накопленные к настоящему времени экспериментальные и клинические данные позволяют считать, что липосомальная форма химиотерапевтических препаратов обладает рядом преимуществ перед свободными формами. Доказано, что включение препарата в состав липосом увеличивает его биодоступность за счет направленного транспорта химиотерапевтических средств внутрь клеток (например, макрофагов), где локализуются возбудители инфекции. Кроме того, использование липосом позволяет повысить эффективность терапии путем удлинения времени полувыведения и увеличения плазменной концентрации препарата в 8-10 раз по сравнению с его свободной формой [Kamps J.A., 1999; Фирсов, Г.М., 2004]. Поэтому для повышения эффективности химиотерапии сапа нами было проведено лечение инфицированных сапом животных химиопрепаратами в клатратной и липосомальной формах. Острую форму сапа моделировали на высокочувствительных к *B. mallei* Ц-5 золотистых хомячках. Лечение животных эмульсией *per os* и инъекционными препаратами, эффективными по данным МПК *in vitro* (доксициклином, цефтазидимом, ко-тримоксазолом, меропенемом), привело лишь к удлинению продолжительности жизни павших животных (табл. 3).

Таблица 3 - Эффективность антибактериальных препаратов при экспериментальном сапе

Препарат	Доза, мг/ кг/ сут	Форма введения	Начало лечения, ч	Длительность введения,сут	Уровень защиты, %	Срок жизни павших, сут
Доксициклин	4	эмульсия	4	15	50*	12
Цефтазидим	100	эмульсия	4	10	20	8,5
Цефтазидим	100	эмульсия	24	15	30	11,0
Ко-тримоксазол	120	эмульсия	4	10	40	18,0
Ко-тримоксазол	120	эмульсия	24	15	20	17,0
Контроль	-	-	-	-	0	5,0
Меропенем	5	0,9 % NaCl	4	10	0	7,0
Ко-тримоксазол	4	0,9 % NaCl	4	10	10	12,0
Доксициклин	120	0,9 % NaCl	4	10	10	11,5
Доксициклин	4	клатрат	4	10	80*	21,0
Контроль	-	-	-	-	0	4,5
Меропенем	5	липосомы	4	9	60*	17,5
Меропенем	5	липосомы	4	15	100*	-
Меропенем	5	липосомы	24	15	100*	-
Меропенем	5	липосомы	48	15	100*	-
Контроль	-	-	-	-	0	4,5

Примечания:

1. Эмульсия - препараты в подсолнечном масле вводили *per os*;
2. 0,9 % NaCl – «чистый» препарат вводили подкожно в виде раствора в 0,9 % NaCl;
3. клатрат – комплексное соединение антибиотика с полиглюкином, вводили подкожно; начало лечения через 4, 24 и 48 ч после заражения животных;
4. *- достоверность уровня защиты по сравнению с контролем превышает 95 %;
5. материалы каждой строки таблицы получены в опыте на группе из 10 золотистых хомячков.

Отчетливое повышение эффективности химиопрепаратов наблюдалось при введении их в клатратной и особенно липосомальной формах. Так, лечение доксициклином в клатратной форме обеспечивало 80 % выживаемость животных, в то время как, введение его в виде эмульсии защищало только 50 % золотистых хомячков. Липосомальные формы меропенема оказались наиболее эффективным средством при экстренной профилактике и лечении острых форм сапа у золотистых хомячков, обеспечивая не только 60-100 % выживаемость животных, но и санацию организма от сапного микроба, снижая тем самым вероятность возникновения рецидивов заболевания.

Таким образом, в ходе проведенных экспериментов, определена взаимосвязь между бактерицидной активностью антибактериального агента в эукариотических клетках с эффективностью при лечении сапной инфекции и выявлена возможность использования моделей «макрофаг - буркхольдерия», «тетрахимена - буркхольдерия» для прогнозирования активности и отбора антибактериальных препаратов в опытах *in vivo* при лечении экспериментальных инфекций на животных.

Результаты полученные в рамках настоящего исследования, служат подтверждением того, что успех антибактериальной терапии инфекций, вызываемых патогенными буркхольдериями, в значительной степени зависит, наряду с правильностью выбора препарата, от целого ряда факторов, к числу которых следует отнести время применения химиотерапевтических средств с момента инфицирования, величину доз препаратов и продолжительность курса лечения, особенности клинического течения заболевания. Существенное значение имеют свойства штаммов возбудителей - их вирулентность и степень видовой адаптации к макроорганизму (формирование биопленок, внутриклеточная персистенция).

Повышение эффективности терапии и профилактики данных инфекций может быть достигнуто за счет применения наиболее активных химиопрепаратов и их комбинаций с препаратами, повышающими активность клеточного звена иммунной системы, а также препятствующими образованию биопленок *in vivo*. Важным представляется также поиск препаратов и разработка режимов их введения при латентном течении мелиоидозной и сапной инфекции, патогенез которых связан с некультивируемыми или длительно персистирующими в организме субпопуляциями клеток возбудителей, эрадикация которых представляет значительные трудности.

ВЫВОДЫ

1. Определена чувствительность *B. mallei, B. pseudomallei B. cepacia, B. thailandensis* к химиотерапевтическим препаратам в условиях *in vitro* различными методами (серийных разведений, диско-диффузионным, а также ускоренным). Установлено, что буркхольдерии всех четырех видов проявляют высокую чувствительность к карбапенемам, фторхинолонам, некоторым комбинированным сульфаниламидам и *β*-лактамам, умеренную – к рифампицину, хлорамфениколу и тетрациклинам.

2. Показано, что чувствительность буркхольдерий к антибактериальным препаратам существенно изменяется в зависимости от физико-химических факторов (pH, температуры, содержания CO_2 в атмосфере и крови экспериментальных животных в среде). Выявлено, что определение минимальных подавляющих концентраций химиотерапевтических препаратов диско-диффузионным методом на средах с добавлением 10 % крови экспериментальных животных и культивирование в атмосфере, содержащей 5 % углекислого газа, позволяет более обоснованно подойти к выбору антибактериальных препаратов, эффективных для лечения заболеваний, вызываемых патогенными буркхольдериями.
3. Продемонстрирована способность патогенных буркхольдерий к образованию биопленок на абиогенных поверхностях *in vitro*. Установлено, что в составе зрелых сообществ *B. mallei* и *B. pseudomallei* высокоустойчивы к химиотерапевтическим средствам, входящим в стандартные схемы лечения сапа и мелиоидоза. Выявлена ингибирующая активность химиопрепаратов на ранних стадиях формирования культурами биопленок.
4. Установлено, что патогенные буркхольдерии, персистирующие в эукариотических клетках, устойчивы к антибактериальным препаратам, применяемым при терапии сапа и мелиоидоза. Достаточно активным химиопрепаратом против интернированных внутриклеточно буркхольдерий можно считать меропенем (МБК 11,1-111 мкг/мл). Показана возможность использования моделей «макрофаг – буркхольдерия», «тетрахимена – буркхольдерия» для предварительной оценки активности антибактериальных препаратов.
5. Выявлено, что при лечении экспериментальных инфекций, вызванных патогенными буркхольдериями, эффективность монотерапии определяется не только уровнем МПК химиотерапевтических препаратов, но и характером и скоростью течения инфекционного процесса в макроорганизме. Наиболее эффективными препаратами для лечения экспериментального сапа и мелиоидоза являются меропенем, ко-тримоксазол, ципрофлоксацин и доксициклин.
6. Показано, что пероральное и инъекционное введение высокоактивных *in vitro* препаратов не гарантирует достаточно эффективную защиту при экспериментальном сапе у золотистых хомячков. Терапевтическая эффективность антибактериальных препаратов повышается при введении их в клатратной и особенно в липосомальной формах. Липосомальная форма меропенема является наиболее эффективным средством для экстренной профилактики и лечения экспериментального сапа у золотистых хомячков, обеспечивающим не только 100 % выживаемость животных, но и санацию организма от сапного микроба, снижая вероятность возникновения рецидивов заболевания.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО МАТЕРИАЛАМ ДИССЕРТАЦИИ

1. Илюхин, В.И. Проблемы соответствия антибиотикочувствительности *in vitro* и эффективности химиотерапии инфекций, вызванных патогенными буркхольдериями / В.И. Илюхин, Т.В. Сенина, Е.В. Шубникова, Ю.В. Антонов, Н.В. Андропова // Антибиотики и химиотерапия. - 2009. - № 7-8. - С. 19-23.

2. Сенина, Т.В. Адекватность показателей антибиотикочувствительности *in vitro* и эффективности химиотерапии инфекций, вызванных патогенными буркхольдериями / Т.В. Сенина, **Е.В. Шубникова** // Материалы научно-практической конференции «Современные аспекты эпидемиологического надзора и профилактики особо опасных и природно-очаговых болезней». Журнал инфекционной патологии - 2009. - Т. 16, № 3. - С. 194-195.

3. Трушкина, М.Н. Изучение факторов, влияющих на объективную оценку чувствительности патогенных буркхольдерий к химиопрепаратам / М.Н. Трушкина, **Е.В. Шубникова,** Е.В. Молчанова, Д.В. Викторов // Материалы X научно-практической конференции государств-участников СНГ. - 2010. - С. 234 - 235.

4. **Шубникова, Е.В.** Сравнительная чувствительность патогенных буркхольдерий к антибактериальным препаратам в условиях *in vitro* и *in vivo* / Е.В. Шубникова // Актуальные проблемы эпидемиологии на современном этапе. Всероссийская научно-практическая конференция с международным участием, посвященная 80-летию кафедры эпидемиологии и доказательной медицины. – Москва. - 2011. - С. 440-442.

5. Илюхин, В.И. Проблемы химиотерапии острых форм сапа в эксперименте / В.И. Илюхин, К.А. Ротов, Т.В. Сенина, Е.А. Снатенков, С.Н. Тихонов, Н.Г. Плеханова, А.А. Куликова, Е.В. Шубникова, Е.В. Король, М.О. Нехезина // Антибиотики и химиотерапия. - 2012. - № 1. - С. 11-15.

6. Молчанова, Е.В. Влияние *Tetrahymena pyriformis* на чувствительность к антибиотикам патогенных видов *Burkholderia* / Е.В. Молчанова, Е.В. Король, **Е.В. Шубникова**, А.С. Антюфеева, Л.К. Меринова // Материалы X съезда ВНПОЭМП. - Москва. - 2012. - Т. 2, № 1-2. - С. 300.

7. **Шубникова, Е.В.** Резистентность биопленок патогенных буркхольдерий к химиотерапевтическим препаратам // Материалы X съезда ВНПОЭМП. – Москва. - 2012. - № 1-2. - С. 214.

8. Ряпис, Л.А. Сравнительная характеристика буркхольдерий группы *Pseudomallei* / Л.А. Ряпис, В.И. Илюхин, Т.В.Сенина, Е.В. Шубникова, А.А. Будченко, А.С. Куликова // Журн. микробиол. эпидемиол. иммунобиол. - 2013. - № 1. - С. 3-8.

9. **Шубникова, Е.В.** Резистентность патогенных буркхольдерий, персистирующих в эукариотических клетках, к химиотерапевтическим средствам / **Е.В. Шубникова**, Е.В. Король, Т.В. Сенина, А.С. Куликова, М.О. Нехезина // Материалы конференции «Диагностика и профилактика инфекционных болезней» Новосибирск. - 2013. - С. 109-110.

10. Король, Е.В. Корреляция цитотоксичности штаммов возбудителя мелиоидоза (*Burkholderia pseudomallei*) для клеток *Tetrahymena pyriformis* с их вирулентностью / Е.В. Король, Р.О. Абдрахманова, С.Н. Тихонов / **Е.В. Шубникова** // Материалы научно-практической конференции молодых ученых и специалистов «От эпидемиологии к диагностике инфекционных заболеваний: подходы, традиции, инновации». Инфекция и иммунитет. - 2014. - Т. 4, № 1 - С. 72-73.

11. Король, Е. В. Цитотоксическое действие *Burkholderia cepacia* на клетки *Tetrahymena pyriformis* при совместном культивировании / Е.В. Король, Л.К. Меринова, М.О. Нехезина, Е.В. Шубникова // Вестник ВолгГМУ, 2014. – № 49. - С. 125-127.

12. Сенина, Т.В. Мелиоидоз: основные этапы научных исследований / Т.В. Сенина, Е.В. Шубникова // Проблемы особо опасных инфекций, вып. 3, 2014. - С. 61-64.

13. Сенина, Т.В. Изменение антибиотикочувствительности штаммов патогенных буркхольдерий при пассировании на животных и питательных средах / Т.В. Сенина, Е.В. Илюхин, Е.В. Шубникова // Дальневосточный Журнал Инфекционной Патологии. - 2014. - № 25. - С. 144-146.

14. **Шубникова, Е.В**. Резистентность биопленочных буркхольдерий к антибактериальным препаратам /Е.В. Шубникова // Материалы научно-практической конференции посвященной 80-летию Ростовского-на-Дону научно-исследовательского противочумного института «Современные аспекты изучения особо опасных и других инфекционных болезней». - Ростов-на-Дону. - 2014. - С. 127-129.