

ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА ПО НАДЗОРУ В СФЕРЕ ЗАЩИТЫ ПРАВ ПОТРЕБИТЕЛЕЙ И БЛАГОПОЛУЧИЯ ЧЕЛОВЕКА  
ФЕДЕРАЛЬНОЕ КАЗЕННОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ЗДРАВООХРАНЕНИЯ  
ВОЛГОГРАДСКИЙ НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ПРОТИВОЧУМНЫЙ ИНСТИТУТ  
(ФКУЗ Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора)

*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

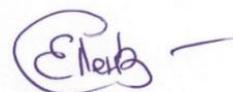
**Диссертация**

на соискание ученой степени

кандидата медицинских наук

Научный руководитель:  
доктор медицинских наук,  
профессор,  
засл. деятель науки РФ

Илюхин Владимир Иванович



Волгоград, 2015

## ОГЛАВЛЕНИЕ

<b>ВВЕДЕНИЕ</b> .....	5
<b>ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ</b> .....	16
1.1. Чувствительность патогенных буркхольдерий к химиотерапевтическим средствам и ее оценка <i>in vitro</i> .....	16
1.2. Факторы, влияющие на чувствительность микроорганизмов к химиотерапевтическим препаратам.....	26
1.3. Клиническая картина и принципы химиотерапии сапа и мелиоидоза.	38
<b>ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ</b> .....	47
2.1. Штаммы микроорганизмов, использованные в работе.....	47
2.2. Химиотерапевтические средства.....	47
2.3. Питательные среды и условия культивирования.....	48
2.4. Стандартные методы определения чувствительности микроорганизмов к химиотерапевтическим средствам.....	50
2.5. Метод ускоренного определения чувствительности буркхольдерий к химиотерапевтическим препаратам.....	52
2.6. Определение антибиотикочувствительности буркхольдерий в условиях изменения температуры и рН среды.....	53
2.7. Оценка чувствительности буркхольдерий к химиотерапевтическим препаратам при культивировании в атмосфере с повышенным содержанием CO <sub>2</sub> и на среде с добавлением 10 % крови животных .....	54
2.8. Изучение способности буркхольдерий к образованию биопленок.....	55
2.9. Определение чувствительности к химиотерапевтическим препаратам биопленочной популяции буркхольдерий.....	56
2.10. Получение мышинных перитонеальных макрофагов.....	57

2.11. Оценка чувствительности к химиотерапевтическим препаратам буркхольдерий, персистирующих в эукариотических клетках (макрофагах, простейших).....	57
2.12. Определение чувствительности к химиопрепаратам штаммов буркхольдерий, предварительно пассированных на лабораторных животных и питательных средах.....	59
2.13. Микроскопические исследования.....	59
2.14. Моделирование и химиотерапия сапа и мелиоидоза.....	61
2.15. Статистическая обработка результатов.....	64
<b>ГЛАВА 3. ОЦЕНКА ВЛИЯНИЯ РЯДА ФАКТОРОВ НА ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ БУРКХОЛЬДЕРИЙ К ХИМИОПРЕПАРАТАМ.....</b>	<b>65</b>
3.1. Чувствительность различных видов буркхольдерий к химиотерапевтическим средствам.....	65
3.2. Чувствительность к химиопрепаратам культур буркхольдерий, пассированных на лабораторных животных и питательных средах.....	74
3.3. Влияние физико-химических факторов среды на чувствительность микроорганизмов к химиотерапевтическим средствам.....	78
<b>ГЛАВА 4. ИЗУЧЕНИЕ ВЛИЯНИЯ ФОРМ АДАПТИВНОЙ ИЗМЕНЧИВОСТИ НА ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ БУРКХОЛЬДЕРИЙ К ХИМИОПРЕПАРАТАМ .....</b>	<b>84</b>
4.1. Чувствительность к химиотерапевтическим препаратам буркхольдерий, образующих биопленки.....	84
4.2. Чувствительность к химиотерапевтическим средствам патогенных буркхольдерий, персистирующих в эукариотических клетках..	96
<b>ГЛАВА 5. ТЕРАПЕВТИЧЕСКАЯ ЭФФЕКТИВНОСТЬ ХИМИОПРЕПАРАТОВ ПРИ ЛЕЧЕНИИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО САПА И МЕЛИОИДОЗА.....</b>	<b>108</b>

<b>ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....</b>	<b>119</b>
<b>СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ.....</b>	<b>136</b>
<b>СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....</b>	<b>137</b>

## ВВЕДЕНИЕ

### Актуальность темы исследования

Сап и мелиоидоз – инфекционные заболевания, вызываемые высокопатогенными для человека и многих видов животных бактериями *Burkholderia mallei* и *Burkholderia pseudomallei* [206, 231, 277, 278].

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 [64, 90, 173, 175].

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 [7, 54, 90, 145].

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 [20, 125, 157, 172, 227, 229, 238].

При подозрении на заболевание человека острыми формами сапа и 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 (рН и температура окружающей среды, концентрация CO<sub>2</sub>, сывороточный фактор), которые могут существенно изменять чувствительность бактерий к определенному виду антибактериальных препаратов. Поэтому стандартные методы лабораторных исследований не всегда могут быть достаточными для достоверного определения чувствительности бактерий к антибактериальным препаратам [7, 42, 132].

Оптимальный режим для роста буркхольдерий на питательных средах 37 °С, рН 6,8-7,0. При повышении температуры культивирования нарушается синтез ряда ферментов, при 42 °С ингибируется рост некоторых буркхольдерий.

Наличие 5 % двуокиси углерода в атмосфере при инкубировании культур приводит к снижению рН, что может сопровождаться изменением их чувствительности к ряду химиотерапевтических средств [79, 96, 132, 239].

Добавление 5-10 % крови или сыворотки к питательной среде, в целом, мало влияет на методику определения чувствительности, но при исследовании препаратов, обладающих высоким сродством к белкам плазмы крови, зоны задержки роста могут значительно уменьшаться. Для некоторых препаратов с высокой степенью комплексообразования с протеинами плазмы эта ситуация отражает те взаимоотношения, которые происходят в условиях *in vivo* [132].

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 [106, 107, 113].

В частности, бактерии в биопленках в 100-1000 раз более резистентны к химиотерапевтическим средствам, чем микроорганизмы того же вида, находящиеся в планктонном состоянии [107, 113, 219, 242, 258].

Кроме того, установлено, что субингибирующие концентрации антибактериальных препаратов могут усиливать формирование бактериями биопленок [62].

Известно, что образование и развитие микробных сообществ координируется системой «*quorum sensing*» (QS, «чувство кворума»), функция которой состоит в продукции сигнальных молекул, феромонов, или аутоиндукторов и способности бактерий воспринимать эти сигналы. Система QS осуществляет контроль над плотностью клеток бактериальной популяции, выработкой многих внеклеточных факторов патогенности, что обеспечивает бактериям возможность для преодоления защитных механизмов макроорганизма при инфекции. В случае подавления QS снижается продукция факторов вирулентности бактерий и нарушается формирование биопленки [155, 184, 203, 207].

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 [115, 137, 180, 185, 216, 229, 253].

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 исследования** - 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, рН 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 исследования

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 (рН, 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 мышинные 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.

### Основные положения диссертации, выносимые на защиту

1. Анализ чувствительности различных видов буркхольдерий к антибактериальным препаратам с использованием метода серийных разведений, и диско-диффузионного 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<sub>2</sub>), 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 формирующих-

ся 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 «Иркутский ордена Трудового Красного Знамени научно-исследовательский противочумный институт 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).

### **Личный вклад соискателя**

Автором проведен анализ литературы по изучаемой проблеме. Экспериментальные данные, на основе которых сформулированы выносимые

на защиту положения и выводы, получены соискателем самостоятельно. Автор принимал непосредственное участие в постановке задач исследования, подготовке и проведении экспериментальных работ, обработке и обсуждении полученных результатов, подготовке публикаций. Отдельные эксперименты были выполнены совместно с сотрудниками ФКУЗ Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора. Соискатель искренне благодарит коллег и своего научного руководителя доктора медицинских наук, профессора, заслуженного деятеля науки РФ Владимира Ивановича Илюхина за предложенное направление исследования и всестороннюю поддержку.

### **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 229 на английском языках.

## ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

### 1.1. Чувствительность патогенных буркхольдерий к химиотерапевтическим средствам и ее оценка *in vitro*

В род *Burkholderia* входит более 50 видов бактерий, из которых только *B. mallei* и *B. pseudomallei* являются высокопатогенными видами, вызывающими заболевания сапом и мелиоидозом у человека и многих видов животных [142, 278]. Остальные представители этого рода являются свободно живущими сапрофитами или фитопатогенами, обитателями различных экологических ниш - почвы, воды, ризосферы, хотя некоторые из них способны вызывать оппортунистические инфекции у иммунокомпрометированных лиц [8, 95]. В экологических нишах и организме инфицируемых хозяев буркхольдерии находятся в виде высокоорганизованных сообществ (биопленок) или в интернированном в эукариотические клетки состоянии [157, 178].

Возбудители сапа и мелиоидоза являются филогенетически родственными микроорганизмами, близкими по своим фенотипическим и генетическим свойствам. Мультилокусное секвенс-типирование штаммов *B. pseudomallei* K96243 и *B. mallei* ATCC23344 показало высокое родство этих микроорганизмов [21, 24, 151].

*B. mallei* можно считать клоном *B. pseudomallei*, но в отличие от него, геном *B. mallei* эволюционировал путем редукции и изменений в структуре более чем 1400 генов. В частности, делеции в кластере генов, ответственных за выживание в окружающей среде, и мутация в гене флагелина (*fliP*) [104, 254] привели к его неподвижности, низкой устойчивости во внешней среде и адаптации к более обособленной

экологической нише – макроорганизму непарнокопытных (облигатному внутриклеточному паразитизму) [144, 151].

Возбудитель мелиоидоза - сапрофит, способный долгое время сохраняться в почве и воде, обладая высокой устойчивостью к изменяющимся физико-химическим факторам (температуре, рН, дегидратации, анаэробным условиям), включая длительный дефицит питательных веществ, присутствие дезинфицирующих средств, детергентов и антибактериальных препаратов [90, 178].

### **1.1.1. Чувствительность и механизмы устойчивости буркхольдерий к химиотерапевтическим препаратам**

Выбор химиотерапевтического препарата, определение чувствительности к нему и интерпретация результатов базируются на данных о природной антибиотикочувствительности микроорганизма, о распространении среди бактерий приобретенной устойчивости и клинически подтвержденной эффективности препарата при соответствующих заболеваниях [2, 43].

Первой работой по изучению чувствительности *B. mallei* и *B. pseudomallei* к антибактериальным препаратам и лечению экспериментального сапа и мелиоидоза является работа С. Howe и W.R. Miller (1947), в которой показано, что наиболее активным препаратом *in vitro* против возбудителя мелиоидоза оказался сульфадиазин натрия. Авторами отмечено, что на штаммы *B. mallei* сульфадиазин натрия, сульфатаiazол натрия и стрептомицин оказывали бактериостатический эффект в обычных терапевтических дозах [166].

В 70-80 годах ряд авторов изучили чувствительность большого количества штаммов *B. pseudomallei* и *B. mallei* к наиболее эффективным антибактериальным препаратам того времени, была отмечена высокая

чувствительность штаммов возбудителя мелиоидоза к тетрациклинам, рифампицину и хлорамфениколу [60, 61, 230, 263].

Результаты по чувствительности *B. mallei* к хлорамфениколу были противоречивы. Некоторые исследователи сообщали о чувствительности [64, 173], в то время как другие регистрировали устойчивость сапных культур к данному антибиотику [61, 175]. Это несоответствие возможно связано с использованием различных методов определения чувствительности бактерий к антибактериальным препаратам.

В исследованиях E.D. Everett и R.A. Kishimoto (1973) была проверена чувствительность *in vitro* штаммов *B. pseudomallei* к триметоприму, котримоксазолу и их комбинации. Монотерапия мелиоидоза триметопримом была неэффективна, а рост большинства штаммов ингибировался комбинацией сульфаметаксазола с триметопримом (ко-тримоксазол) в концентрациях терапевтически достижимых [135].

В работах Н.А. Лозовой (1989) было показано, что сульфаниламиды в комбинации с триметопримом проявляют высокую *in vitro* активность в отношении штаммов *B. mallei* [27]. Как известно, комбинированное применение антибактериальных препаратов является одним из способов повышения эффективности химиотерапии, что в дальнейшем и было использовано при лечении сапа и мелиоидоза.

Результаты исследований, проведенных в последующем, свидетельствуют о том, что большинство исследованных культур *B. pseudomallei* чувствительны *in vitro* к цефалоспорином III-IV поколения [52, 67], доксициклину [30, 52, 64, 173], сульфаниламидам [66], карбапенемам [67, 281], фторхинолонам [5, 9] и хлорамфениколу [66, 67, 175, 244, 250].

Возбудитель сапа обладает сходной антибиотикограммой, однако минимальные подавляющие концентрации антибактериальных препаратов гораздо ниже, чем у возбудителя мелиоидоза [64, 173, 175].

Оба патогена обладают природной устойчивостью к большинству  $\beta$ -лактамных антибактериальных препаратов (цефалоспорином I-II

поколения, пенициллинам) и ко всей группе полимиксинов [2, 64, 84, 90, 194, 199, 263]. Кроме того, *B. pseudomallei* в отличие от *B. mallei* резистентен к аминогликозидам и большинству макролидов [208, 254].

Известно, что резистентность бактерий к  $\beta$ -лактамным антибактериальным препаратам определяется ферментами  $\beta$ -лактамазами, которые участвуют в деструкции  $\beta$ -лактамов в периплазматическом пространстве бактериальной клетки, а также снижением чувствительности данных ферментов к их ингибиторам, например - клавулановой кислоте [43, 47, 138].

Менее распространенной причиной резистентности могут быть мутации в генах пенициллинсвязывающих белков, ведущие к пониженному сродству этих белков к  $\beta$ -лактамным антибактериальным препаратам. Реже устойчивость к таким антибиотикам вызывается сниженным поглощением их клеткой вследствие изменений в ее оболочке и/или активного выброса из бактериальной клетки проникшего препарата [43, 47, 138, 201, 226].

По результатам секвенирования генома штамма *B. pseudomallei* K96243 установлено, что возбудитель мелиоидоза имеет несколько генов  $\beta$ -лактамаз классов А, В, и D. Кроме того, предполагается наличие металло- $\beta$ -лактамаз класса В с расширенным спектром действия, обладающих гидролитической активностью в отношении большого числа  $\beta$ -лактамных антибактериальных препаратов, включая группу пеноксов (меропенем, имипенем) [84, 90, 144, 237].

В частности, установлено, что *BPS-1* или  $\beta$ -лактамаза класса А, также известная как *penA*, инактивирует большинство антибиотиков цефалоспоринового ряда, а точечные мутации в кодирующей ее последовательности *blaA* приводят к формированию устойчивости к ингибиторам -  $\beta$ -лактамаз, например, клавулановой кислоте, и вместе с тем, возможно развитие устойчивости к цефтазидиму, который применяется в стандартных схемах лечения мелиоидоза [84, 92, 211].

Более того, чрезмерная экспрессия лактамаз класса D (ОХА-42, ОХА-43 и ОХА-57) также способствует развитию устойчивости к цефтазидиму [140, 218]. Тем не менее, оба вида чувствительны к комбинациям  $\beta$ -лактамных антибактериальных препаратов с ингибиторами  $\beta$ -лактамаз (амоксиклаву, цефоперазону и сульбактаму) [199].

В 1999 г. M.N. Burtnick и D.E. Woods обнаружили возможные детерминанты устойчивости возбудителя мелиоидоза к антимикробным пептидам, связанные с процессом биологического синтеза липополисахарида (ЛПС) клеточной стенки. Исследователи установили, что *B. pseudomallei* обладает резистентностью к высоким концентрациям полимиксина В. Однако мутации предположительно в трех генах, участвующих в биосинтезе ЛПС, ведут к образованию мутантных штаммов, чувствительных к данному антибиотику [87].

В настоящее время известно, что устойчивость к аминогликозидам и макролидам, а также к ряду других антибактериальных средств, связана с тем, что у патогенных буркхольдерий имеется более 10 эффлюкс-систем. Эти системы относятся к RND (Resistance/Nodulation/Division) суперсемейству транспортных белков, участвующих в транспорте и выведении из бактериальной клетки различных соединений, в том числе и антибактериальных [191, 195].

У возбудителя мелиоидоза наиболее подробно изучены две из этих систем (эффлюкс-система AmrAB-OprA и система BreAB-OprB) [81, 89, 127, 191]. Транспозонный мутагенез показал, что эффлюкс-система AmrAB-OprA отвечает за высокую устойчивость буркхольдерий к аминогликозидам (тобрамицину, канамицину и гентамицину) и макролидам (эритромицину, кларитромицину) [89, 127, 210, 244, 254]. Авторами отмечено также, что инактивация генов *amrA* или *amrB* оперона AmrAB-OprA сопровождается увеличением чувствительности штаммов *B. pseudomallei* к аминогликозидам [127].

Напротив, *B. mallei* обладает чувствительностью к данной группе химиотерапевтических средств вследствие делеции в гене *amr* оперона AmrAB-OrpA, кодирующего систему транспорта аминогликозидов и макролидов [162]. Вместе с тем, следует отметить, что *B. mallei* является облигатным внутриклеточным патогеном и использование в лечении сапа аминогликозидов не эффективно, поскольку их концентрация в фагоцитах не достигает желаемого терапевтического уровня.

В 2004 г. Y.Y. Chan et al. (2004) обнаружили вторую эффлюкс-систему, которая представлена опероном генов BreAB-OrpB и отвечает за внутриклеточный транспорт макролидов, фторхинолонов и тетрациклинов [81]. Предполагалось, что данная система транспорта у штамма *B. pseudomallei* KHW принимает участие в секреции сигнальных молекул системы кворум-сенсинг контролирующей синтез ряда факторов вирулентности (например, сидерофоров и фосфолипазы C) и процесс образования биопленки [89, 105]. Тем не менее, последующие исследования T. Mima et al. (2010) показали, что эффлюкс-система BreAB-OrpB, обнаруженная у штамма *B. pseudomallei* 1026b, не участвует в продукции факторов вирулентности и сигнальных молекул системы QS, что указывает на потенциальные различия между штаммами возбудителя мелиоидоза [209].

На сегодняшний день известно, что высокая чувствительность бактерий к фторхинолонам связана с их способностью накапливаться в клетках фагоцитарного ряда и ингибировать фермент ДНК-гиразу, что, в свою очередь, приводит к нарушению репликации и транскрипции ДНК у грамотрицательных бактерий [43, 47].

Возбудитель мелиоидоза обладает довольно высокой *in vitro* чувствительностью к фторхинолонам. В то же время, у возбудителя сапа выявлены точечные мутации в гене ДНК-гиразы *gyrA*, приводящие к развитию множественной устойчивости к этому ряду антибактериальных средств [100, 163, 170].

В последующем у *B. pseudomallei* была обнаружена третья эффлюкс-система, представленная опероном генов *WpeEF-OpгC*, предположительно субстратами данной системы являются триметоприм и хлорамфеникол [192]. Показано, что в связи с этим 13 % штаммов *B. pseudomallei* приобретают устойчивость к триметоприму, который в комбинации с сульфаметоксазолом широко используется в клинической практике для лечения мелиоидоза [269, 270].

### **1.1.2. Методы определения чувствительности патогенных буркхольдерий к химиотерапевтическим средствам**

При подозрении на заболевание человека сапом или мелиоидозом принципиальное значение имеет раннее начало лечения наиболее эффективными химиотерапевтическими препаратами. Тяжесть клинического течения, природная устойчивость возбудителей к химиотерапевтическим препаратам различных групп и формирование антибиотикорезистентных штаммов в процессе лечения делают терапию сапа и мелиоидоза недостаточно эффективной [64, 90, 173, 175].

Кроме того, длительная внутриклеточная персистенция и формирование биопленок значительно ограничивают терапевтические возможности при лечении инфекций, вызванных данными патогенами [157, 229, 238].

Постоянно появляются и внедряются в медицинскую практику новые химиотерапевтические средства, значительно отличающиеся от своих предшественников по активности, фармакокинетике, фармакодинамике и другим свойствам [2].

Своевременное определение антибиотикограмм для выделяемых из клинического материала культур возбудителей сапа и мелиоидоза является основой для проведения эффективной терапии этих особо опасных инфекционных заболеваний.

В настоящее время для правильного подбора антибактериальных препаратов или их комбинации при терапии инфекции наиболее часто используют две группы стандартизированных методов определения чувствительности бактерий к химиотерапевтическим средствам *in vitro*. Это - методы серийных разведений в жидкой (бульоне) или плотной (агаре) питательной среде и диффузионные (метод дисков, насыщенных антибиотиками, E-тесты) [36, 40, 93, 94].

### ***Определение антибиотикочувствительности микроорганизмов методом серийных разведений***

Метод последовательных разведений антибиотика в питательной среде в стандартных условиях является более надежным и точным количественным методом. Он базируется на определении количественного показателя, характеризующего микробиологическую активность химиотерапевтического препарата - величины его минимальной подавляющей концентрации (МПК). Основанием для определения чувствительности методом серийных разведений является необходимость получения количественных данных (преимущественно при тяжелом течении процессов) для проведения регулируемой антибактериальными препаратами терапии (разработка режимов введения).

Метод заключается в приготовлении серии разведений антибактериального препарата в питательной среде и внесении во все разведения исследуемой культуры. Существуют модификации этого метода в жидкой и плотной питательной среде. Жидкая питательная среда удобна для единичного определения чувствительности; на чашке с плотной питательной средой можно посеять одновременно большое количество штаммов, поэтому плотная среда удобна для множественных определений при массовых исследованиях [36, 40, 94].

Основными достоинствами методов разведения являются следующие: менее выраженное влияние скорости роста микроорганизмов и количества инокулята на результаты исследований; возможность определения бактерицидных концентраций и более четкое выявление конечного этапа роста. Недостатком метода при применении его в лабораторной практике является сложность и длительность выполнения [36, 94, 132].

### ***Диско-диффузионный метод определения чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препаратам***

Диффузионные методы определения чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препаратам основаны на диффузии антибиотика из носителя в плотную питательную среду и подавлении роста исследуемой культуры в той зоне, где концентрация препарата превосходит МПК. Метод диффузии в агар (метод бумажных дисков) или метод Керби - Бауэра наиболее прост и широко распространен. Размер зоны подавления роста бактерий определяется расстоянием от центрального источника, содержащего антибактериальное средство, до линии, на которой создается критическая концентрация препарата. На основании полученных диаметров зон ингибирования роста микроорганизма вокруг дисков с антибиотиками тестируемые штаммы подразделяют на чувствительные, умеренно резистентные и резистентные [36, 93, 132, 134].

При использовании метода диффузии в агар на результаты исследований влияют толщина слоя питательной среды, ее влажность, скорость диффузии антибактериальных препаратов, скорость роста исследуемых микроорганизмов и др [73, 132].

Диффузионный метод при соблюдении стандартных условий постановки обладает достаточной точностью. Вследствие простоты, скорости и легкости проведения он широко используется для определения микробной

чувствительности практическими лабораториями, однако является лишь качественным [36].

Метод Е-тестов является модификацией диско-диффузионного метода определения чувствительности бактерий к химиотерапевтическим средствам. Разница заключается в том, что вместо диска с антибиотиком используют пластиковую тест-полоску, содержащую последовательные разведения антибактериального препарата от максимального к минимальному. По месту пересечения эллипсоидной зоны ингибирования роста с полоской Е-теста определяют значение МПК. Достоинством является простота и быстрота проведения тестирования [37].

При изучении чувствительности патогенных буркхольдерий к химиотерапевтическим препаратам используют все перечисленные методы. Однако данные антибиотикограмм *B. mallei* и *B. pseudomallei*, выделенных в различных регионах, неоднозначны, и это может быть обусловлено или колебаниями чувствительности, или нестандартностью методик определения МПК.

При использовании стандартизованных методов определения чувствительности ответ может быть получен через 24 ч от начала исследования (с учетом времени, необходимого для выделения чистых культур - через 48-72 ч). Ускоренные методы определения чувствительности микроорганизмов к химиопрепаратам дают возможность получить ответ в более короткое время [18].

Имеются данные, что ускорение выдачи результатов лабораторных исследований по антибиотикочувствительности достоверно снижает летальность и длительность пребывания пациентов в клинике [72, 74, 118].

Очевидна необходимость более активного внедрения в практику работы бактериологических лабораторий ускоренных методов определения чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препаратам. Одновременно с этим следует продолжать исследования по сравнитель-

ной оценке имеющихся методов и разработке новых, более чувствительных и стандартных методик [18].

## **1.2. Факторы, влияющие на чувствительность микроорганизмов к химиотерапевтическим препаратам**

Определение чувствительности бактерий, в том числе и буркхольдерий, к химиотерапевтическим средствам проводится в условиях, значительно отличающихся от тех, в которых препарат действует в макроорганизме, причем, нередко препараты, достаточно активные в опытах *in vitro*, оказываются неэффективными при лечении больных людей и в экспериментах на зараженных животных.

По-видимому, это связано как с прямым воздействием физико-химических факторов внутренней среды макроорганизма, существенно изменяющих чувствительность бактерий к антибактериальным препаратам [20, 125, 132], так и с повышением резистентности при внутриклеточной персистенции [102, 185] и формировании возбудителем биопленки [1, 16, 121, 157].

### **1.2.1. Влияние физико-химических факторов среды на чувствительность микроорганизмов к химиотерапевтическим средствам**

В работе М. Barber и Р. Waterworth (1965) была изучена чувствительность бактерий рода (*Staphylococcus*, *Sarcina*, *Klebsiella*, *Pseudomonas*) диско-диффузионным методом к 13 антибактериальным препаратам в аэробных условиях и в условиях с добавлением в атмосферу 10 % CO<sub>2</sub>. Кроме того, было изучено влияние различных значений рН среды (6,0, 6,5 и 7,3) и избытка в атмосфере CO<sub>2</sub> на чувствительность бактерий к антибактериальным препаратам методом серийных разведений [132].

Установлено, что МПК пенициллина, хлорамфеникола, бацитрацина, полимиксина и колистина мало изменялись при определении чувствительности в стандартных условиях и в атмосфере с повышенным содержанием  $\text{CO}_2$ . Изменение pH среды также не влияло на активность данных антибактериальных препаратов.

При определении чувствительности микроорганизмов к стрептомицину, канамицину, эритромицину и олеандомицину в атмосфере углекислого газа МПК препаратов повышались, а диаметры зоны задержки роста уменьшались. Кроме того, антибактериальные препараты были менее активны при показателях pH среды 6,0 и 6,5, чем при pH, равном 7,3.

Также было показано, что тетрациклин, хлортетрациклин, метициллин и новобиоцин более активны в атмосфере 10 %  $\text{CO}_2$ , их МПК на 4-8 разведений ниже, а диаметры зон задержки роста на 5-10 мм больше, чем при определении чувствительности к ним в аэробных условиях. Диаметры зон задержки роста у первых трех антибактериальных препаратов в кислой среде также увеличивались [132].

Наличие двуокиси углерода (5-10 %) в атмосфере при инкубировании культур приводит к снижению pH, что может сопровождаться изменением их чувствительности к некоторым препаратам. Например, показано, что присутствие 5 %  $\text{CO}_2$  приводит к очень быстрому - в течение одного часа - снижению pH питательной среды с 7,3 до 7,1, что существенно уменьшает активность макролидов [79].

Некоторые другие исследователи отметили, что антибактериальные препараты аминогликозидной группы также менее активны в кислой среде. Так, гентамицин в концентрации 0,1 мкг/мл ингибирует рост клебсиелл в питательной среде при pH равном 7,4. Однако в инфицированной клебсиеллами ткани легкого, в которой pH составляет 6,4-6,5, эффективность данных препаратов снижается в 20 раз, относительно активности при pH 7,4 [77, 124, 189, 243].

Известно, например, что макролидные антибиотики более активны при  $\text{pH} > 7,5$  и менее - при  $\text{pH} < 7,0$  [158, 249]. Показано, что лечение инфекций мочевыделительной системы эритромицином более эффективно при щелочной реакции ( $\text{pH}$ ) мочи [133].

Для описания этого эффекта E.F. Fiese и S. Steffen в 1990 г. выдвинули следующую гипотезу. У основных радикалов молекул макролидов, в частности азитромицина и эритромицина,  $\text{pK}$  составляют 8,4-8,8, поэтому при  $\text{pH}$  среды 8,0, молекулы макролидных антибиотиков в неионизированной форме легче проходят через цитоплазматическую мембрану клетки микроорганизма и связываются с рибосомами. Поскольку значение  $\text{pH}$  среды в клетках более нейтрально, чем снаружи ( $\text{pH} 7,2$  и  $\text{pH} 8,0$  соответственно), макролиды в клетках сильно ионизируются, что приводит к накоплению антибактериальных препаратов в клетках бактерий. При  $\text{pH}$  питательной среды 6,0 макролиды полностью ионизируются и утрачивают способность диффундировать через цитоплазматическую мембрану микробной клетки [136].

В работах других исследователей было установлено, что особенно чувствительны к различным значениям  $\text{pH}$  диритромицин и азитромицин (их МПК при  $\text{pH} 8,0$ , выше на 3-4 разведения, чем при  $\text{pH} 7,2$ ). Менее чувствительны к изменению  $\text{pH}$  среды рокситромицин, спирамицин, эритромицин, кларитромицин (МПК отличались на 1-2 разведения) и особенно устойчивы при изменении  $\text{pH}$  – джосамицин, миокамицин, рокитамицин (различий в МПК не было) [96, 239].

В работе L. Grriffit et al. (1965) было проверено влияние дефибрированной и цитратной крови кролика, лошади, коровы, козла и человека на чувствительность микроорганизмов к антибиотикам методом диффузии в агар. Выявлены несущественные различия в диаметрах зон задержки роста, менее 3 мм, и показано, что вид крови не влияет на чувствительность микроорганизмов к антибактериальным препаратам [132].

Е.С. Jay et al. (1966) определили чувствительность штаммов *Escherichia coli* и *Staphylococcus aureus* к 10 антибактериальным препаратам методом диффузии в агар. Установлено, что различия в диаметре зон задержки роста между контрольными опытами и в среде с кровью незначительные (диаметры зоны задержки роста отличаются менее, чем на 2 мм). При изучении авторами чувствительности к антибиотикам в среде с добавлением цитратной и дефибринированной крови были получены практически идентичные результаты, за исключением чувствительности к тетрациклину (диаметр зон задержки роста в опытах с дефибринированной кровью был на 2-4 мм больше, чем в опытах с цитратной кровью). Вероятно, цитрат образует хелатные комплексы с определенными катионами тетрациклина, ингибируя тем самым его активность [132].

Что касается буркхольдерий, то имеются немногочисленные данные о влиянии физико-химических факторов среды на их чувствительность к антибактериальным препаратам.

Так, в исследованиях J.E. Corkill et al. (1994) было изучено влияние pH среды и углекислого газа на чувствительность штаммов *B. ceratia*, выделенных от больных муковисцидозом легких, к  $\beta$ -лактамам. Установлено снижение активности антибиотиков при значениях pH среды менее 7,5 и содержании углекислого газа в атмосфере 5 % (значения pH среды и концентрация углекислого газа характерные для бронхо-легочной системы макроорганизма) [125].

Другими авторами было продемонстрировано изменение чувствительности патогенных буркхольдерий (*B. mallei* и *B. pseudomallei*) к ряду химиотерапевтических средств в зависимости от температуры и pH среды [20].

Тем не менее, в перечисленных работах исследовали лишь влияние физико-химических факторов на чувствительность микроорганизмов к различным химиопрепаратам без какой-либо взаимосвязи с эффективностью антибактериальных препаратов *in vivo*.

В то же время, как нам кажется, физико-химическому состоянию среды, в которой происходит взаимодействие микроорганизма с антибактериальными препаратами, уделяется недостаточное внимание.

Как известно, инфекции, вызываемые патогенными буркхольдериями, часто развиваются у лиц с ослабленным иммунитетом и не имеют строгого сродства к определенным органам - патологические процессы возникают в легких, мышцах, коже, железах, мочеполовой системе. Отсюда следует, что рост микроорганизмов и процесс взаимодействия с химиопрепаратами может проходить в диапазоне температур от 30-32 °С (кожа конечностей) до 42 °С, при рН от 5-6 (моча, пот, слюна, легкие) до 8-8,5 (желчь, лимфа, кишечное содержимое), в атмосфере с 5-6 % углекислого газа (легкие, венозная кровь) [20].

Таким образом, представленные данные свидетельствуют о целесообразности изучения антибактериальной активности химиопрепаратов в отношении буркхольдерий в условиях, максимально приближенных к процессу, происходящему в макроорганизме. Возможно, эти исследования позволят получить дополнительную информацию для выявления причин низкой терапевтической эффективности некоторых препаратов при сравнительно высокой их активности *in vitro*.

### **1.2.2. Влияние форм адаптивной изменчивости (формирования биопленок и внутриклеточной персистенции) на чувствительность микроорганизмов к химиопрепаратам**

Известно, что большинство микроорганизмов в природе существуют не в виде планктонных клеток, а в виде специфически организованных и прикрепленных к субстратам сообществ (биопленок), образование которых представляет собой многостадийный, сложно регулируемый биологический процесс [19, 34, 106, 188].

Впервые свойства биопленок исследовали J.W. Costerton et al. в 1987 г., изучившие экстрацеллюлярные полимерные соединения, удерживающие вместе сообщество микроорганизмов [107, 113, 258].

Согласно современным представлениям биопленка – непрерывный тонкий слой микроорганизмов, адгезированных к биотической или абиотической поверхности и друг к другу, заключенных в биополимерный матрикс [41, 107, 113, 120, 258]. В состав биополимерного матрикса могут входить как белки, липиды, полисахариды, так и нуклеиновые кислоты. [252, 256].

Установлено, что бактерии образуют биопленки как во внешней среде, так и в организме инфицируемых хозяев. Такие сообщества могут быть образованы бактериями одного или нескольких видов и состоять как из активно функционирующих клеток, так и из некультивируемых или покоящихся форм (VBNC - жизнеспособные, но некультивируемые). В цикле формирования сообщества выделяют пять стадий с общими особенностями, независимо от типа микроорганизмов: первичная адгезия микроорганизмов к поверхности из окружающей среды; стадия необратимого связывания с поверхностью; стадия созревания; рост и образование зрелой биопленки в экзополисахаридном матриксе; стадия распространения [15, 41, 53].

В исследованиях последних лет способность к существованию в форме биопленки рассматривают как основной фенотип многих видов бактерий как в естественных средах обитания, так и в организме человека. Благодаря существованию в виде сообществ популяция бактерий усиливает свою защиту от неблагоприятных факторов - ультрафиолетового излучения, дегидратации, бактериофагов, фагоцитоза, а также от антибактериальных препаратов и факторов иммунной системы макроорганизма. В частности, биопленочные сообщества бактерий выдерживают концентрации антимикробных средств в 100-1000 раз больше, чем микроорганизмы, находящиеся в планктонном состоянии [113, 121, 219, 242, 258, 268].

В настоящее время идет интенсивное изучение причин высокой устойчивости бактерий к химиотерапевтическим препаратам в биопленках. Установлено, что повышенная выживаемость определяется как свойствами клеток, так и внеклеточного матрикса. Устойчивость, обусловленную свойствами клеток биопленок, связывают с уменьшением их свободной поверхности за счет контактов друг с другом и образованием бактерий «персистеров» [16, 70, 247].

«Персистер» – фенотипический вариант бактериальных клеток с обычным для данного штамма генотипом, но с сильно замедленным метаболизмом. Известно, что химиопрепараты более активны в отношении быстро растущих и размножающихся клеток, угнетая жизненно важные биохимические процессы. Бактериальные клетки в силу резко замедленного метаболизма временно находятся в состоянии устойчивости ко многим химиотерапевтическим препаратам, вследствие этого инфекция приобретает хроническое течение и плохо поддается лечению [16, 38, 224].

Наблюдения *in vitro* показали, что матрикс биопленок может связывать, не пропускать и/или инактивировать химиопрепараты [28]. Биополимеры (полисахариды, белки, липиды, ДНК, РНК), составляющие матрикс биопленки, образуя трехмерную архитектуру сообщества, задерживают диффузию антибактериальных препаратов, и растворенные вещества диффундируют внутри биопленки гораздо медленнее, чем в водной среде [1].

Так, установлено, что аминогликозиды медленнее проникают в биопленки, образованные псевдомонадами, вследствие их связывания с полисахаридным внеклеточным соединением - альгинатом [164].

Кроме того, высокая антибиотикорезистентность может быть связана с повышенной мутабельностью бактерий в биопленках. На примере *Pseudomonas aeruginosa*, было показано, что оксидативное повреждение ДНК и нарушение в системе репарации является частой причиной мутаций у бактерий. В результате накопления мутаций возможна селекция штаммов с

множественной устойчивостью к химиотерапевтическим препаратам [1, 176].

В последнее время обнаружен еще один феномен, осложняющий борьбу с биопленками. Оказалось, что ряд химиопрепаратов в суббактериостатических концентрациях не только не подавляет рост сообществ, но даже стимулирует его. Так, например, аминогликозидный антибиотик тобрамицин в субингибирующих концентрациях индуцирует образование биопленок у *P. aeruginosa* и *Escherichia coli* [62].

Исследователи полагают, что процесс формирования биопленок реализуется только при наличии достаточно высокой плотности популяции (кворума), регулируется и управляется не только сигналами из окружающей среды, но и межклеточными связями. Это явление носит название «чувство кворума» («*quorum sensing*») и означает восприятие клетками изменений среды, которые наступают при достижении культурой некоторой пороговой численности, а также реакцию на эти изменения в виде продукции сигнальных молекул (аутоиндукторов), причем, с увеличением плотности популяции возрастает и количество аутоиндукторов. Достигнув определенной концентрации, сигнальные молекулы связываются с рецепторами на поверхности мембран соседних бактериальных клеток и активируют внутриклеточные сигнальные пути, под действием которых изменяется экспрессия ряда генов [14, 184, 203].

Грамотрицательные бактерии продуцируют и используют универсальные сигнальные молекулы из семейства ацил-гомосерин-лактонов (AHL) [155, 207]. В результате их действия бактериальная популяция приобретает возможность к преодолению защитных механизмов макроорганизма и повышению вирулентности [184, 203].

Показано, что бактерии рода *Burkholderia* в природных экосистемах и организме инфицированного хозяина могут колонизировать любую нишу и формировать биопленку. Образование биопленок является важным адап-

тационным механизмом, обеспечивающим выживание, размножение и распространение буркхольдерий во внешней среде.

Достаточно хорошо изучен процесс образования биопленок у бактерий входящих в *BBC* (бактерии комплекса *B. ceratia*), например, у *Burkholderia cenocepacia*. Этот микроорганизм вызывает инфекционный процесс в легких у лиц со сниженным иммунитетом и у детей с наследственным заболеванием – кистозным фиброзом, образуя вязкие биопленки в бронхах и альвеолах легких больных. Биопленки в дыхательных путях разрушают барьер из гликокаликса, изменяют актиновый скелет и вызывают некроз эпителиальных клеток базального слоя люминальных отделов альвеол.

Установлено, что процесс образования биопленок у *B. cenocepacia* находится под контролем ряда генетических систем: трех QS систем [236], *RpoN* - альтернативного сигма фактора, *ShvR*, *LysR* [75] и *AtsR* (регуляторов транскрипции), а также киназы, которая участвует в регуляции *T6SS* (шестого типа секреции белков у бактерий) [69]. Кроме того, формирование и структура биопленок зависят от содержания в среде ионов железа [256], подвижности бактерий [143] и продукции экзополисахаридного матрикса [183].

В ряде экспериментальных исследований было установлено, что бактерии *B. cenocepacia* в составе биопленки более устойчивы к антибактериальным препаратам и дезинфицирующим агентам, чем планктонная популяция [98, 177].

Наиболее эффективными в уничтожении биопленок *B. cenocepacia* оказались комбинации антибиотиков с ингибиторами системы QS, которые также способствовали повышению выживаемости инфицированных бактериями *Caenorhabditis elegans*, *Galleria mellonella*, а также снижению бактериальной нагрузки у мышей с легочной инфекцией [221, 235].

В 1993 г. М. Vorachit было установлено, что возбудитель мелиоидоза *in vitro* и *in vivo* образует микроколонии и биопленки, в дальнейшем была

изучена чувствительность штамма *B. pseudomallei* к антибактериальным препаратам (цефтазидиму и ко-тримоксазолу) в составе биопленок, которые были образованы *in vitro* бактериями, адгезированными к абиотической поверхности [128, 238]. Было выявлено, что МПК цефтазидима для планктонной популяции бактерий незначительно отличается от МПК для биопленочной, в то время как МПК ко-тримоксазола для биопленочной популяции в 200 раз превышает МПК для планктонных клеток у одного и того же штамма [238].

Интересно, что потенциальная способность *B. pseudomallei* к формированию биопленки количественно различается между штаммами, однако, следует отметить, что не выявлено корреляции между продукцией биопленки штаммами буркхольдерий и их вирулентностью *in vivo* [276].

В немногочисленных исследованиях последних лет также показано, что культуры *B. pseudomallei* образуют биопленки *in vitro*, буркхольдерии в составе биопленок обладают повышенной резистентностью к ряду химиотерапевтических средств [65, 157, 171].

Кроме того, рядом исследователей установлено, что биопленки *B. pseudomallei* являются барьером для диффузии имипенема и цефтазидима. Скорость диффузии препаратов для штамма с высоким уровнем образования биопленки значительно медленнее, чем для штамма с низкой биопленкообразующей способностью. Наряду с этим, ко-тримоксазол с легкостью диффундировал через экстрацеллюлярный матрикс, независимо от биопленкообразующей способности штамма. При этом эффективность всех изученных антибактериальных препаратов против биопленочных бактерий была не высока [116].

На сегодняшний день у возбудителя мелиоидоза не достаточно хорошо изучены системы, регулирующие процесс формирования биопленок и механизмы высокой устойчивости патогена к антибактериальным препаратам в составе биопленок. Вследствие того, что образование биопленок -

многостадийный, генетически регулируемый процесс, скорее всего, кроме системы QS, есть и другие механизмы регуляции.

В геноме *B. pseudomallei* закодировано три ацил-гомосерин-лактонные системы, гомологичные генетической системе *luxI-luxR* (кворум - зависимая система у *Vibrio fischeri*). Одна из них, *Bps I- BpsR*, где *BpsI* (N-ацилгомосерин лактон синтаза), продуктом действия которой является N-октаноилгомосерин лактон ( $C_8HL$ ), а *BpsR* – белок регулятор транскрипции;  $C_8HL$  связываясь с *BpsR*, активирует его, в результате чего изменяется экспрессия различных генов – мишеней. Предполагается, что данная система принимает непосредственное участие в регуляции образования биопленок у возбудителя мелиоидоза [141, 214].

Полагают, что возбудитель сапа тоже образует биопленку, однако на сегодняшний день процесс ее образования и регуляторные системы недостаточно изучены. Как и у остальных представителей рода *Burkholderia* в геноме *B. mallei* закодированы системы QS, которые, возможно, принимают участие в регуляции ряда процессов, в том числе и в регуляции биопленкообразования [122, 141, 275].

Наряду с этим, буркхольдерии, обладая рядом факторов вирулентности, выживают и размножаются в клетках фагоцитарного ряда (лейкоцитах и макрофагах) [115, 185, 216, 229, 253, 257], а также в нефагоцитарных клетках [68, 126, 205, 253], в клетках простейших (*Acanthamoeba astronyxys*, *A. castellanii*, *A. polyphaga*, *Hartmanella vermiformis*) [137, 180, 257].

Известно, что в адгезии и интернализации буркхольдерий в клетки макроорганизма участвуют следующие факторы патогенности: капсула [68, 97], пили IV типа [56], флагеллин [55, 91], буркхольдерияльный протеин (Bim A) [58, 117, 126, 274], третий (T3SS) [63, 161, 240, 253] и шестой тип секреции белков (T6SS) [82, 117, 169, 248, 253, 264].

В результате многочисленных исследований было установлено, что после проникновения в клетки макрофагального ряда буркхольдерии, пре-

пятствуя слиянию фагосом с лизосомами клеток хозяина, высвобождаются из фагосом в цитоплазму, где выживают и размножаются, избегая фазы завершеного фагоцитоза. Этому способствует ряд механизмов, в том числе, устойчивость буркхольдерий к дефенизинам, ингибирование синтеза белков, подавление экспрессии индуцибельной синтазы оксида азота в макрофагах (iNOS), фермента, необходимого для образования активных форм азота [86, 185, 216, 234].

Более того, инвазия и распространение буркхольдерий среди эукариотических клеток определяются их способностью запускать механизмы внутриклеточной полимеризации актинового цитоскелета клеток хозяина с последующей индукцией их слияния и формирования многоядерных гигантских клеток *in vivo* и *in vitro*, подобно *Shigella flexneri* и *Listeria monocytogenes*. Такой тип распространения позволяет бактериям избегать воздействия иммунных факторов макроорганизма, персистировать и приводить к хроническому рецидивирующему течению инфекционного процесса [58, 85, 141, 168, 196].

Поэтому можно говорить о том, что для повышения эффективности терапии инфекций, вызванных патогенными буркхольдериями, необходимо учитывать особенности патогенеза, так как бактерии, сохраняющиеся внутри биопленок и клеток макроорганизма, размножаются и вновь распространяются после завершения курса лечения, приводя к развитию хронических форм и рецидивов заболевания. Поскольку планктонные клетки хуже защищены, чем биопленочные и персистирующие внутриклеточно бактерии, то химиотерапевтические препараты, высоко активные *in vitro* при тестировании в чистой культуре, при испытаниях *in vivo* показывают низкую терапевтическую эффективность. В связи с высокой устойчивостью бактериальных сообществ и интернированных в эукариотические клетки микроорганизмов к химиопрепаратам должны существенно меняться и принципы проведения лечения.

### 1.3. Клиническая картина и принципы химиотерапии сапа и мелиоидоза

#### 1.3.1. Клиническая картина сапа и мелиоидоза

Человек отличается довольно высокой резистентностью к заболеванию сапом. Инфицирование людей всегда имело спорадический характер даже во времена широкого распространения этого заболевания среди лошадей [51, 279]. Основную массу больных составляли лица, контактировавшие с больными животными семейства лошадиные (конюхи, кавалеристы, ветеринарные работники, сотрудники бактериологических лабораторий и научно-исследовательских учреждений) [22, 108, 149, 153, 166, 204, 217, 241, 273].

Патогенез сапа во многом зависит от способа инфицирования, вирулентности, дозы возбудителя, а также состояния иммунной системы макроорганизма [146]. При попадании возбудителя через поврежденную кожу в небольших дозах на месте внедрения формируются специфические узелки (локальная форма), которые при благоприятном течении подвергаются казеозному распаду. В более тяжелых случаях сап характеризуется развитием острой воспалительной реакции с образованием очагов гнойного расплавления тканей. В дальнейшем вследствие лимфо - и гематогенной диссеминации *B. mallei* по всему организму процесс приобретает септико-пиемический характер с образованием множественных специфических гранулем в различных органах.

При благоприятном течении болезни узелки могут подвергаться осумковыванию и обызвествлению, при неблагоприятном течении подвергаются расплавлению с образованием абсцессов в мышцах и внутренних органах (наиболее часто в легких, печени, селезенке) [24, 150].

При острой форме сапа инкубационный период составляет 1-5 суток [148]. Заболевание начинается с озноба, резкого подъема температуры тела до 38-39 °С с периодами подъема и спада, как при сепсисе, головной боли, миалгии и артралгии. На месте внедрения возбудителя последовательно образуются темно-красная папула, затем пустула, окруженная багрово красной зоной, пустула изъязвляется, на ее месте формируется язва с характерным для сапа «сальным» дном и подрытыми краями. Как правило, формирование первичных очагов сопровождается регионарным лимфаденитом и лимфангоитом. На 5-7-е сутки отмечается появление множественной кожной сыпи, преобразующейся последовательно в папулы, везикулы, пустулы. Папулезно-пустулезный процесс сопровождается резким ухудшением состояния больного, развитием тяжелой плевропневмонии с кровохарканьем, реже клиническую картину обуславливают абсцессы различных органов. Летальность при острой форме сапа достигает 100 % [6, 24].

Хронический сап развивается медленнее и характеризуется фазами ремиссии и обострения. Выделяют три формы сапа: кожную, легочную и носоглоточную [57, 59, 150, 212, 277].

Наиболее часто встречается кожная форма, которая сопровождается лихорадкой, лимфангоитами, лимфаденитами и множественными подкожными и внутримышечными «холодными» абсцессами. При их самопроизвольном вскрытии образуются плохо заживающие свищи [76, 78, 119, 190].

При легочной форме сапа отмечается лихорадка, плевропневмония и абсцедирование легких. При легочной форме возможны одновременные изменения в мышцах (абсцессы, свищи) [6, 59, 76].

Для носоглоточной формы типичны слизисто-сукровичные, кровянистые и слизисто-гнойные выделения, образование желто-зеленых корочек на поверхности язв и распространение изъязвлений на зев и трахею. Прогноз при хронических формах сапа также неблагоприятный, летальность более 50 % [6, 24].

Клиническая картина мелиоидоза у человека и животных весьма разнообразна. В литературе равноправно существуют 2 классификации – одна построена на скорости течения болезни (молниеносная, острая, подострая и латентная), другая - на анатомических проявлениях (септическая, септико-пиемическая, местная, включая легочную). Более распространенной является первая классификация клинических форм мелиоидоза [6, 109, 139, 233].

Инкубационный период при точно установленном начале мелиоидозной инфекции обычно составляет 3-4 дня [131, 154, 193, 233]. Однако при мелиоидозе манифестация клинических проявлений может наступать через несколько месяцев и даже лет (максимально, из достоверно описанных случаев, через 24 и 26 лет) после пребывания в эндемичной зоне [24, 109, 114, 193, 233, 245].

В зависимости от превалирующей симптоматики поражения органов и скорости течения выделяют следующие основные формы заболевания. [6, 109, 233].

Молниеносная (септическая) форма характеризуется резким подъемом температуры, ознобом, сильными головными и мышечными болями, нарушением сознания. Длительность течения – 2-5 дней. Лихорадочный синдром сопровождается многократной рвотой, частым жидким стулом и, как следствие, обезвоживанием и судорогами. Прогноз всегда неблагоприятный [24, 83, 90, 205, 278].

Острая септицемическая форма сопровождается расстройствами желудочно-кишечного тракта, слабостью, лихорадкой, головными болями. На коже и слизистых оболочках появляется пустулезная сыпь, геморрагии, изъязвления. Выделения из этих участков поражения содержат в достаточно высоких концентрациях возбудитель, идентификация которого и позволяет установить окончательный диагноз. Высыпания сопровождаются лимфаденитами, чаще шейными и подмышечными. Продолжительность

острой формы мелиоидоза - 7-15 дней, исход практически всегда летальный [24, 83, 205].

При подострой форме течение заболевания более длительное, вялое. Симптоматика зависит от локализации и множественности специфических абсцессов. Чаще всего образуются вялотекущие абсцессы в легких. По клинической симптоматике легочная форма напоминает туберкулез, но без характерной для последнего избирательности поражений верхних долей легкого. Возбудитель у этих больных можно выделить из мокроты, реже из крови. В отличие от предыдущих двух форм летальность при современных методах лечения подострой формы гораздо ниже (10-20 %), но следует помнить, что после кажущегося выздоровления в 15-30 % случаев возможны рецидивы [24, 110].

Основным клинико-морфологическим признаком хронической формы являются локальные заживающие абсцессы во внутренних органах. Характерны абсцессы в лимфатических узлах, подкожной жировой клетчатке, костях и суставах. Септицемия отсутствует. Заболевание длится годами, у больных отмечается кратковременная субфебрильная температура, слабость, кахексия. Диагноз ставится на основании анамнеза и данных бактериологического анализа, чаще всего, как случайная находка при обострении процесса [24, 267].

Инаппарантная (латентная) форма заболевания проявляется через многие годы, как у жителей эндемичных районов, так и после возвращения лиц из эндемичных по мелиоидозу районов. Только в США таких лиц по данным серологических обследований насчитывается более 200 тысяч [167, 193]. При этой форме заболевания невозможно выделить культуру обычными бактериологическими методами, вероятно, *B. pseudomallei* сохраняется в макроорганизме в L-формах или в виде VBNC [3, 17, 24, 178].

### 1.3.2. Принципы химиотерапии сапа и мелиоидоза

В преантибиотическую эру сап и мелиоидоз являлись неизлечимыми заболеваниями, летальность при острых формах этих инфекций достигала абсолютных значений. Первые успехи в лечении сапа и мелиоидоза были отмечены при внедрении в клиническую практику сульфаниламидов и антибактериальных препаратов.

Как известно, *B. mallei* обладает довольно высокой устойчивостью к препаратам пенициллинового ряда, полимиксидам и аминогликозидам [64, 175]. Исследования ряда авторов показали, что наиболее эффективны *in vitro* против возбудителя сапа тетрациклины, фторхинолоны, пенемы и сульфаниламиды [64, 173, 175].

Первыми наиболее эффективными препаратами при лечении сапа оказались сульфаниламиды. Впервые N. Muntiu в 1943 г. была показана эффективность сульфатиазола при лечении человека, зараженного сапом [190].

В 1946 г. С. Howe и W. Miller описали несколько случаев внутрилабораторного аэрозольного заражения персонала сапом. Инфекцию предупредили, применяя в течение 2-3 недель сульфадиазин [166].

На сегодняшний день при острых формах сапа рекомендуют внутривенно вводить цефтазидим в дозе 50 мг/кг каждые 8 ч, доксициклин 40 мг/кг, меропенем в дозе 25 мг/кг каждые 8 ч или ко-тримоксазол 8 мг/кг в день, продолжительность лечения не менее 2-х недель [112, 147, 149]. Затем при улучшении состояния больного переходят на поддерживающую комбинированную терапию с приемом *per os* препаратов (доксициклин или рифампицин в сочетании с ко-тримоксазолом). Длительность поддерживающей терапии варьирует от 4 до 8 недель [112, 149]. За реконвалесцентами устанавливают многолетнее наблюдение с госпитализацией при появлении аденопатий и лихорадочных состояний, так как высока вероятность рецидивов.

Карантинные мероприятия не проводятся из-за низкой контагиозности заболевания. Основным средством профилактики и предотвращения завоза инфекции в масштабах страны является ветеринарный надзор с целью выявления больных животных и их уничтожения [24].

При лечении мелиоидоза следует учитывать форму и тяжесть заболевания на момент госпитализации, возраст, иммунный статус пациента, и, конечно, необходимо определять чувствительность выделенной культуры *B. pseudomallei* к химиопрепаратам. Выявлено, что возбудитель мелиоидоза высокорезистентен к большинству известных в настоящее время антибактериальных препаратов [24, 90, 129, 228].

Наиболее эффективными химиотерапевтическими препаратами являются тетрациклины, цефалоспорины третьей генерации, карбапенемы, некоторые фторхинолоны и ко-тримоксазол. При этом следует отметить, что многие химиопрепараты, активные *in vitro*, в процессе лечения оказываются неэффективными как по причине внутриклеточного расположения возбудителя, так и вследствие формирования *in vivo* биопленки. В обоих случаях возбудитель мелиоидоза оказывается в значительной мере более резистентным к воздействию химиопрепарата, чем при исследовании *in vitro* в планктонном состоянии [157, 228]. Так как в процессе лечения возможна селекция резистентных клонов *B. pseudomallei*, необходимо проводить повторные исследования чувствительности к антибактериальным препаратам [24].

До 1989 г. терапия острых форм мелиоидоза в Тайланде заключалась во введении различных комбинаций таких химиопрепаратов, как хлорамфеникол, ко-тримоксазол и доксициклин, продолжительностью от 6 недель до 6 месяцев, при этом уровень смертности составлял 80 %. Включение в последующем в схемы лечения антибактериальных средств из группы цефалоспоринов (цефтазидима) снизило уровень смертности до 43 % [130, 159].

Хлорафеникол, ко-тримоксазол и доксициклин обладают бактериостатическим эффектом. Имеются данные о развитии резистентности у бактерий к данным антибактериальным препаратам [263]. Кроме того, хлорамфеникол и сульфаниламиды высокотоксичны и не могут длительно использоваться при лечении детей и беременных женщин. В последующем препаратом выбора при лечении детей и беременных женщин стал амоксиклав как менее токсичный и обладающий хорошей *in vitro* активностью против возбудителя мелиоидоза (МПК 2 мг/мл) [103, 181].

Таким образом, все терапевтические средства, применяемые для лечения, можно разделить на 3 группы.

Первая группа - давно известные и рекомендуемые средства (хлорамфеникол, тетрациклины, ко-тримоксазол). Это бактериостатические препараты которые применяют в комбинации с другими антибактериальными средствами. Тем не менее, в процессе лечения этими препаратами появляются устойчивые штаммы, причем возникновение резистентности к хлорамфениколу, как правило, сопровождается снижением чувствительности к тетрациклинам и к ко-тримоксазолу.

Вторая группа включает цефтазидим в сочетании с ко-тримоксазолом, и применяется для лечения острых форм мелиоидоза. При этой комбинации резистентные формы появляются крайне редко [223].

В третью группу входят пенымы, амоксициллин-клавулановая кислота (ко-амоксиклав) и некоторые препараты хинолоновой группы. У пенымов наиболее низкая величина МПК, хорошая бактерицидная активность и высокая эффективность против внутриклеточно локализованных микроорганизмов. Ко-амоксиклав рекомендуется для терапии детей и беременных женщин. Он оказался первым эффективным при мелиоидозе препаратом, применяемым *per os*. Ципрофлоксацин – бактериостатический препарат, однако он хорошо проникает в эукариотические клетки и рекомендуется в комбинации с цефтазидимом для поддерживающей терапии [24].

В современных рекомендациях терапия мелиоидоза состоит из двух фаз (начальной и фазы продолжения лечения) [111, 179, 246, 278].

Начальная фаза лечения (внутривенное введение химиопрепаратов) направлена на подавление быстро размножающейся и активно метаболизирующей популяции бактерий. Следующая фаза, более длительная - поддерживающая терапия (пероральный прием препаратов) - это воздействие на оставшуюся медленно размножающуюся и метаболизирующую популяцию буркхольдерий, в большинстве своем находящуюся внутриклеточно в виде персистирующих форм с целью предотвращения рецидивов заболевания.

Несмотря на то, что имеется несколько вариантов рекомендаций по лечению, для всех характерна стандартная схема: интенсивное внутривенное введение в течение 10-14 дней цефтазидима с последующим длительным приемом *per os* в течение 12-20 недель ко-тримоксазола в комбинации с доксициклином или без него [130, 200, 220, 213, 246, 266].

В настоящее время наиболее эффективной считается следующая схема лечения. При тяжелых формах мелиоидоза с явлениями септицемии и\ или пневмонии на первом этапе проводится внутривенное введение цефтазидима в дозе 100-120 мг/кг/сут в сочетании с ко-тримоксазолом - 48-72 мг/кг/сут. Наряду с этим может быть использован меропенем (25-50 мг/кг/сут). Курс парентеральной терапии, как правило, продолжается 10-14 дней до появления отчетливых признаков улучшения клинического состояния пациента. После этого назначают пероральную поддерживающую терапию в течение 8-20 недель, при которой используют чаще всего доксициклин, ко-тримоксазол, ко-амоксиклав. Критерием выздоровления больных служит оценка состояния клинических признаков в сочетании с результатами серологических исследований [21, 24, 90, 111, 114, 228, 233].

Учитывая тяжесть клинического течения и природную резистентность возбудителей сапа и мелиоидоза к большинству химиотерапевтических средств, ведущая роль в лечении этих заболеваний принадлежит раннему

назначению адекватной химиотерапии наиболее эффективными антибактериальными препаратами.

Существенными факторами, осложняющими терапию, являются снижение чувствительности возбудителей к антибактериальным препаратам при образовании биопленок и внутриклеточной персистенции, высокий уровень вирулентности и формирование антибиотикорезистентных штаммов в процессе лечения, а также ограниченный набор эффективных химиопрепаратов и отсутствие средств для специфической профилактики этих заболеваний.

Приведенные данные свидетельствуют о том, что для обеспечения успешной терапии сапа и мелиоидоза необходимо своевременное и достоверное определение чувствительности возбудителей к антибактериальным препаратам, разработка и соблюдение рациональных режимов и схем этиотропного лечения, сочетанное с внедрением принципиально новых подходов.

## ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

### 2.1. Штаммы микроорганизмов, использованные в работе

Объектом исследования служили 20 штаммов *B. pseudomallei*, 14 штаммов *B. mallei*, 14 штаммов *B. ceracia*, предоставленные коллекционным центром ФКУЗ Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора, принадлежность культур к виду подтверждена стандартными микробиологическими и генетическими методиками [8, 48]. В работе использовали также 5 штаммов *B. thailandensis*, выделенные в Таиланде, были предоставлены D.Woods, Калгари, 2002 г., и 1 штамм ресничных инфузорий *Tetrahymena pyriformis* GL полученный из Института цитологии РАН, Санкт-Петербург.

Экспериментальную работу с возбудителями сапа и мелиоидоза проводили с соблюдением требований режима работы с особо опасными инфекциями, предусмотренных СП 1.3.1285-03 «Безопасность работы с микроорганизмами I-II групп патогенности (опасности) [44].

### 2.2. Химиотерапевтические средства

Список химиотерапевтических препаратов, использованных в работе, приведен в таблице 1. Для приготовления рабочих растворов антибиотиков использовали субстанции антибактериальных препаратов с известной активностью.

**Таблица 1 - Химиотерапевтические средства**

Химиопрепарат	Фирма производитель
Азитромицин	«Плива», Хорватия
Амоксиклав	«SmithKlineBeecham», США
Ампициллин	«Синтез», Россия
Ванкомицин	«Синтез», Россия
Гентамицин	«Синтез», Россия
Доксициклина гидрохлорид	«Феррейн», Россия
Имипенем	«Merck Sharp&Dohme», Швейцария
Канамицин	«Синтез», Россия
Ко-тримоксазол	«Польфа», Польша
Меропенем	«АстраЗенека», Швеция
Офлоксацин	«Haechst», Германия
Пиперациллин	«Wyeth lederle», Италия
Полимиксин В	«Нижфарм», Россия
Рифампицин	«Фармасинтез» ОАО, Россия
Хлорамфеникол	«Нижфарм», Россия
Цефтазидим	«Glaxo Wellcome», США
Ципрофлоксацин	«Bayer», Германия

### 2.3. Питательные среды и условия культивирования

Штаммы буркхольдерий выращивали в жидких и на плотных агаризованных питательных средах: триптиказо-соевый агар (ТСА), триптиказо-соевый бульон (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) (таблица 2).

В опытах по определению чувствительности к химиопрепаратам использовали Е-тесты, представляющие собой бумажные полоски с градиен-

том концентраций данного антибиотика и диски с антибиотиками диаметром 6 мм фирмы «HiMedia», Индия.

Биопленки получали при выращивании буркхольдерий в ТСБ на различных поверхностях в течение 24, 42, 72 ч при 37 °С.

Культивирование монослоя перитонеальных макрофагов проводили в среде RPMI-1640 с добавлением глутамина («ФГУП им. М.П. Чумакова РАМН») и 10 % фетальной телячьей сыворотки («HyClone Fetal Bovine Serum», США), при 37 °С в атмосфере с 5 % CO<sub>2</sub> (CO<sub>2</sub> инкубатор «Thermo Scientific», США).

Аксенические культуры *T. pyriformis* выращивали в LB-бульоне (ингредиенты «Difco, США») при температуре 28 °С.

**Таблица 2 - Основные среды, использованные в ходе работы**

Питательная среда	Состав:	г /л
ТСА рН = 7,3	Бакто – триптон	15
	Бакто – сойтон	5
	NaCl	5
	Бакто – агар	15
	Дистиллированная вода	до 1,0 л
F-агар рН = 7,0	Бакто-триптон	10
	Бакто – протеаза пептон № 3	10
	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1,5
	Сульфат магния	1,5
	Бакто – агар	15
	Дистиллированная вода	до 1,0 л
МХА рН = 7,3	Мясной бульон	300
	Гидролизат казеина	17,5
	Крахмал	1,5
	Агар	17
	Дистиллированная вода	до 1,0 л
МХБ рН 7,4	Мясной бульон	300
	Гидролизат казеина	17,5
	Крахмал	1,5
	Дистиллированная вода	до 1,0 л

## Продолжение таблицы 2

AM 3 рН = 7,3	Мясной экстракт	1,5
	Дрожжевой экстракт	3,0
	Пептон	6,0
	Агар	15,0
	Дистиллированная вода	до 1,0 л
ГТСИ рН=6,8	Триптон	2
	NaCl	5
	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,3
	Бромтимоловый синий	0,08
	Глюкоза	10
	Агар	15
	Дистиллированная вода	до 1,0 л
LB-бульон	Бакто-триптон	10
	Дрожжевой экстракт	5
	NaCl	5
	Дистиллированная вода	до 1,0 л

### 2.4. Стандартные методы определения чувствительности микроорганизмов к химиотерапевтическим средствам

Использовали в своей работе следующие методы определения чувствительности к химиопрепаратам:

- метод серийных разведений на плотной питательной среде (МХА);
- метод серийных разведений в бульоне (МХБ);
- диско-диффузионный метод на плотной питательной среде (МХА);
- метод определения чувствительности с помощью Е-тестов на плотной питательной среде (МХА).

Постановка опытов и учет результатов соответствовали общепринятым стандартам [32, 36, 93, 94, 132, 134].

### **2.4.1. Метод серийных разведений на плотной и в жидкой питательной среде**

Бактерии выращивали на TSA или TSB. МПК химиопрепаратов определяли методом двукратных серийных разведений на плотной или жидкой питательной среде МХА или МХБ, содержащей заданные убывающие концентрации препаратов.

Для приготовления инокулята из чистых культур готовили суспензию по стандарту McFarland 0,5 в 0,9 % растворе NaCl.

Посевная доза возбудителей составляла  $10^6$  м.к./мл. За МПК принимали минимальную концентрацию препаратов, при которой отсутствовал видимый рост через 24 ч инкубации при 37 °С у возбудителя мелиоидоза и через 48 ч – у возбудителя сапа.

Для определения бактерицидной концентрации химиопрепарата из 2-3 последних пробирок с отсутствием видимого роста производили посев на чашки с агаром. Через 24-48 ч инкубации в термостате при 37 °С отмечали ту наименьшую концентрацию препарата в пробирке, посев из которой не дал роста, и принимали ее за минимальную бактерицидную концентрацию (МБК).

### **2.4.2. Диско-диффузионный метод**

Диско-диффузионный метод с использованием стандартных бумажных дисков диаметром 6 мм, пропитанных антибактериальными препаратами («HiMedia», Индия), осуществляли следующим образом: бактерии в концентрации  $10^7$  м.к./мл высевали «газоном» на чашки с МХА, затем на поверхность агара укладывали стандартные бумажные диски, пропитанные препаратами, которые диффундировали в агар, создавая градиент концентрации. После инкубирования при 37 °С измеряли диаметры зон задержки роста вокруг дисков и по специальным таблицам

определяли степень чувствительности к данному антибиотику [32, 36, 93, 94, 132, 134].

### **2.4.3. Метод определения чувствительности к химиопрепаратам с помощью E-тестов**

E-тесты представляют собой бумажные полоски, пропитанные рядом убывающих концентраций определенного антибиотика. E-тесты укладывали на поверхность агара, засеянного исследуемой культурой в виде «газона». Для инокуляции использовали микробную взвесь тестируемых микроорганизмов в концентрации  $10^6$  м.к./мл, приготовленную в 0,9 % растворе NaCl.

После инкубации вокруг полоски формировалась эллипсоидная зона задержки роста, сужающаяся в области малых концентраций и пересекающая полоску на уровне, соответствующем величине МПК. Время получения результатов при использовании вышеперечисленных методик составляет в среднем 24 ч.

### **2.5. Метод ускоренного определения чувствительности буркхольдерий к химиотерапевтическим препаратам**

Для ускоренного определения чувствительности буркхольдерий к химиотерапевтическим препаратам готовили плотную глюкозо-триптонную среду с индикаторами: бромтимоловым синим с зоной перехода окраски 6,0-7,6 (кислая - желтая, щелочная - синяя) или бромкрезоловым пурпурным с зоной перехода окраски 5,2-6,8 (кислая – желтая, щелочная - пурпурная), исходное значение pH среды 6,8 для обоих индикаторов. На чашки наносили  $10^8$  м.к. взвеси исследуемого микроорганизма в количестве 0,2 мл, равномерно распределяли шпателем и затем на чашку помещали диски, пропитанные химиопрепаратами [23, 45].

После 4-6 ч инкубации при температуре 37 °С учитывали результат: зоны подавления роста микроорганизмов около дисков сохраняют зеленоватый цвет, а в зонах роста культур без действия антибактериальных препаратов наблюдается пожелтение среды за счет закисления ее в результате окисления глюкозы размножающимися бактериями [23, 45].

В качестве контроля использовали среды МХА и АМ 3 на поверхность агара, засеянного испытуемыми микроорганизмами, накладывали диски, пропитанные антибиотиками, учет результатов проводили через 24-48 ч. Использовали препараты: ципрофлоксацин, цефтазидим, хлорамфеникол, меропенем, рифампицин, доксициклин, ко-тримоксазол, амоксицилав, ломефлоксацин, гентамицин.

Результаты учитывали, измеряя зоны подавления роста микроорганизмов около дисков, включая диаметр диска через, 24-48 ч инкубации при 37 °С. Отсутствие зоны ингибирования роста микроба вокруг диска свидетельствует о том, что исследуемый штамм не чувствителен к данному антибактериальному препарату. Если диаметр зоны подавления роста бактерий больше величины указанной в инструкциях к дискам, то штамм характеризуется как чувствительный к данному химиопрепарату.

## **2.6. Определение антибиотикочувствительности буркхольдерий в условиях изменения температуры и рН среды**

Влияние температуры и рН среды на чувствительность буркхольдерий к антибактериальным препаратам изучали следующим образом: предварительное подращивание культур проводили в течение 24 ч в ТСБ при 37 °С. Антибиотическую активность изучали на плотной среде МХА, в которой рН устанавливали фосфатным буфером (6,0, 7,2 и 8,0). Одну каплю суточной бульонной культуры буркхольдерий наносили на сектора агара, помещали в термостат с температурой 32, 37 и 41 °С.

Учет результатов и расчет МПК проводили через 24 и 48 ч. Антибиотики разводили *ex tempore* и добавляли в соответствующих концентрациях в агар перед разливом его в чашки Петри. Для исследования были отобраны типичные штаммы *B. mallei* 10230, *B. pseudomallei* C-141, *B. ceracia* 25416, *B. thailandensis* 264.

Также чувствительность бактерий определяли с помощью Е-тестов на плотной среде МХА, рН 6,0; 7,0 и 8,0. Суточную культуру высевали «газоном» на чашки с рН среды 6,0, 7,0, 8,0 и сверху помещали Е-тесты. Инкубировали при разных температурах: 32 °С, 37 °С и 41 °С.

Учет результатов проводили через 24 ч. За контрольные принимали результаты, полученные на чашках в стандартных условиях: рН 7,0 инкубация при 37 °С. Посевы на средах с рН 6,0 и 8,0 инкубировали при 37 °С, а с рН 7,0 помещали в термостаты на 32 °С и 41 °С.

### **2.7. Оценка чувствительности буркхольдерий к химиотерапевтическим препаратам при культивировании в атмосфере с повышенным содержанием CO<sub>2</sub> и на среде с добавлением 10 % крови животных**

Влияние на эффективность антибактериальных препаратов присутствия в атмосфере инкубирования 5 % CO<sub>2</sub> и 10 % крови в питательной среде изучали на среде МХА с добавлением свежей гепаринизированной («Richter», 5 МЕ/мл) крови лабораторных животных (белых крыс, золотистых хомячков) в атмосфере, содержащей 5 % CO<sub>2</sub> (CO<sub>2</sub> инкубатор «Thermo Scientific», США). Чувствительность к химиотерапевтическим средствам определяли диско-диффузионным методом на плотной питательной среде, как описано ранее.

## 2.8. Изучение способности буркхольдерий к образованию биопленок

Формирование штаммами буркхольдерий биопленок изучали по их способности к адгезии на различных абиотических поверхностях (стекло, пластик, гельбонд), а именно, на границе раздела фаз «жидкость – твердое вещество». Кроме того, биопленки исследовали на поверхности раздела фаз «жидкость – воздух», наблюдали за ростом культур на жидких питательных средах [156].

Буркхольдерияльные биопленки получали в стеклянных флаконах, пробирках и на пластиковых чашках Петри. В стеклянные флаконы помещали стерильные (покровные стекла, гельбонд) необходимого размера, затем вносили 2,7 мл ночной бульонной культуры в концентрации  $10^7$  м.к./мл для штаммов *B. thailandensis*, *B. ceracia*, *B. pseudomallei* и  $10^8$  м.к./мл для штаммов *B. mallei*. Посевы инкубировали 24, 48 и 72 ч при 37 °С. В стерильные пластиковые чашки Петри диаметром 40 мм вносили по 2,0 мл ночной бульонной культуры бактерий и инкубировали 24, 48 и 72 ч при 37 °С.

Структуру образованных биопленок исследовали микроскопически через 24, 48, и 72 ч роста. Состояние биопленки оценивали, извлекая из флаконов (покровные стекла, гельбонд), трижды отмывая 0,9 % раствором NaCl, с последующей фиксацией в 96 % этиловом спирте и окраской 1 % раствором генцианвиолета [11]. Таким же образом фиксировали и окрашивали биопленки, полученные на поверхности пластиковых чашек Петри.

Световую микроскопию буркхольдерияльных биопленок проводили на микроскопе Primo Star («Zeiss», Германия), в режиме проходящего света. Изображения получали с использованием цифровой фотокамеры Axio Cam ERc 5s («Zeiss», Германия). Изображения обрабатывали с помощью программного обеспечения AxioVision 4.7.2 («Zeiss», Германия). Из био-

пленок, полученных на поверхности чашек Петри и в пробирках с бульоном, готовили препараты для электронной микроскопии.

## **2.9. Определение чувствительности к химиотерапевтическим препаратам биопленочной популяции буркхольдерий**

Предварительно сформированные на абиотической поверхности биопленки изучаемых штаммов буркхольдерий отмывали 3-кратно 0,9 % раствором NaCl от планктонных бактерий и затем переносили в пробирки с МХБ для определения их чувствительности к химиопрепаратам.

МПК препаратов определяли методом серийных разведений в жидкой питательной среде, содержащей заданные убывающие концентрации химиопрепаратов. Контролем служили пробы с предварительно сформированными биопленками и помещенные в МХБ без добавления химиопрепаратов. Все опыты проводили трижды.

### **2.9.1. Изучение влияния химиотерапевтических препаратов на процесс формирования буркхольдериями биопленок**

К суточной бульонной культуре изучаемых штаммов буркхольдерий в концентрации  $10^7$  м.к./мл добавляли химиопрепараты (меропенем, цефтазидим, доксициклин, ко-тримоксазол, амоксиклав, азитромицин, рифампицин) в концентрациях, создаваемых препаратами в тканях макроорганизма (или крови) при введении их в средних терапевтических дозах.

Затем в течение 1-3 суток наблюдали за процессом формирования буркхольдериями биопленок. Контролем служили бульонные культуры буркхольдерий, образующие биопленки в среде без добавления антибактериальных препаратов.

## 2.10. Получение мышинных перитонеальных макрофагов

Перитонеальный элюат получали от белых беспородных мышей на 4-й день после предварительного введения в асептических условиях в брюшную полость 2 мл стерильного 1 % пептонного бульона. На 4-е сутки животное декапитировали под легким эфирным наркозом. Брюшную полость в стерильных условиях промывали холодной средой RPMI-1640 с небольшим количеством стерильного воздуха, после этого стенку брюшка слегка массировали. Образующуюся суспензию отбирали шприцем. Флакон с макрофагами помещали на лед, чтобы избежать прикрепления клеток к стенкам сосуда. Культивирование макрофагальных клеток проводили в среде RPMI-1640 с добавлением глутамина и 10 % фетальной телячьей сыворотки 24 ч при 37 °С в атмосфере с содержанием 5 % CO<sub>2</sub>.

Количество выделенных клеток подсчитывали в камере Горяева под микроскопом Primo Star («Zeiss», Германия) при увеличении x400 и при необходимости доводили их число до 2x10<sup>6</sup> м.к./мл средой RPMI-1640.

## 2.11. Оценка чувствительности к химиотерапевтическим препаратам буркхольдерий, персистирующих в эукариотических клетках (макрофагах, простейших)

Суспензию клеток, полученную от стимулированных белых беспородных мышей, доводили средой RPMI-1640 до концентрации 10<sup>6</sup> м.к./мл, разливали в стеклянные пробирки и/или пластиковые чашки Петри, затем инкубировали в среде RPMI-1640 с добавлением глутамина и 10 % фетальной телячьей сыворотки 2-3 ч при 37 °С в атмосфере с 5 % CO<sub>2</sub> для адгезии макрофагов к поверхности.

В каждую пробирку с монослоем макрофагов добавляли по 0,1 мл взвеси буркхольдерий для получения соотношения бактерия/макрофаг (1:10) и инкубировали 2,5-3 ч при 37 °С в атмосфере 5 % CO<sub>2</sub>. После этого

адгезированные к стеклянной поверхности макрофаги отмывали от неприкрепившихся клеток и добавляли свежую среду RPMI-1640, содержащую необходимые концентрации химиопрепаратов. Инкубирование проводили в течение 24 ч при 37 °С в атмосфере 5 % CO<sub>2</sub>.

Через 24 ч инкубации из пробирок удаляли культуральную жидкость и добавляли для разрушения эукариотических клеток по 1,0 мл 0,1 % Triton X-100 («Serva», США) на 15 минут [101]. Затем из исследуемых проб делали высевы по 0,1 мл на ТСА или F-агар для определения МБК для бактерий, поглощенных макрофагами. Результаты учитывали через 24 ч инкубации при 37 °С в атмосфере 5 % CO<sub>2</sub>. Контролем служили пробы, содержащие интернированные в макрофаги буркхольдерии и выращенные без добавления химиопрепаратов. Оценивали МБК препаратов отдельно для планктонных бактерий и бактерий, интернированных в макрофаги.

Аксенические культуры *T. pyriformis* выращивали в LB-бульоне при температуре 28 °С. Оценка антибиотикочувствительности сокультур производилась в LB-бульоне в соотношении тетрахимены/буркхольдерии 10<sup>5</sup>/10<sup>7</sup> клеток/мл.

Для определения МБК в опытные пробы вносили цефтазидим, котримоксазол, меропенем, доксициклин в возрастающих для каждого препарата концентрациях, начиная от МПК. После 24-часовой экспозиции из пробирок с отсутствием видимого роста производили высеv осажденных центрифугированием (2000 об/мин, 5 мин) тетрахимен на ТСА. Оценивали МБК препаратов отдельно для планктонных бактерий и сокультур буркхольдерий с простейшими.

## **2.12. Определение чувствительности к химиопрепаратам штаммов буркхольдерий, предварительно пассированных на лабораторных животных и питательных средах**

Пассирование культур проводили на белых мышах, исходное заражение начинали введением  $5 \times 10^8$  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. Первые 5 белых мышей заражали на фоне введения гидрокортизона (5 мг/мышь), последующие заражения проводили на интактных животных. Всего пассажей на каждом штамме проведено от 10 до 30, прекращение заражения и выделение окончательной пассированной культуры с последующей лиофилизацией выполняли после определения DIm (*dosis letalis minima*). Пассирование культур на питательных средах осуществляли путем многократных (20-30) пересевов 2-суточных культур на TCA.

Антибиотикочувствительность штаммов буркхольдерий определяли диско-диффузионным методом на МХА, все среды и диски с антибактериальными препаратами фирмы («HiMedia», Индия).

## **2.13. Микроскопические исследования**

### **2.13.1. Световая микроскопия**

#### ***Исследование фагоцитирующей способности мышинных макрофагов in vitro***

Материалом для микроскопических исследований служили перитонеальные макрофаги мышей, полученные по методике описанной выше. Адгезию макрофагов к стеклянной или пластиковой поверхности наблюдали через 2-3 ч культивирования в среде RPMI-1640 с добавлением глутамина и 10 % фетальной телячьей при 37 °С в атмосфере с 5 % CO<sub>2</sub>. Затем

в каждую пробу добавляли 0,1 мл взвеси буркхольдерий и инкубировали 24 ч при 37 °С в атмосфере 5 % CO<sub>2</sub>, после чего стекла и чашки Петри подсушивали на воздухе, фиксировали в течение 20 мин метиловым спиртом и окрашивали по Романовскому-Гимзе и просматривали в световом микроскопе.

### ***Изучение взаимодействия *T. pyriformis* с буркхольдериями***

Для микроскопии использовали суточную культуру *T. pyriformis*, выращенную в LB-бульоне. Тетрахимены соединяли с бактериями в LB-бульоне в соотношении 1:100 и инкубировали при температуре 28 °С, после чего сокультуры обеззараживали 10 % формалином и просматривали в световом микроскопе при увеличении  $\times 400$  в камере Горяева.

## **2.13.2. Электронная микроскопия**

### ***Электронно-микроскопическое изучение структуры буркхольдерияльных биопленок***

Материалом для микроскопических исследований служили биопленки буркхольдерий, сформированные на поверхности раздела фаз «жидкость - воздух», «жидкость - твердое тело». Биопленки осторожно отделяли от абиотической поверхности 0,9 % раствором NaCl и помещали в 2,5 % глютаральдегидный фиксатор на 0,1 М фосфатном буфере pH 7,2 на 1,5 ч при 4 °С, трижды отмывали в буфере, на котором был приготовлен фиксатор. Затем дополнительно фиксировали в 1 % осмиевом фиксаторе по общепринятой методике в течение 2 ч при комнатной температуре [12].

Для выявления кислых экзополисахаридов, входящих в состав межклеточного матрикса, использовали окраску 0,1 % раствором рутениевого красного («Serva», США) по J.H. Luft [198].

Материал, прошедший фиксацию, дегидратировали в серии спиртов возрастающей концентрации (30, 50, 70, 96, 100 %), окиси пропилена (2 раза по 30 мин) и заключали в эпоксидную смолу. Ультратонкие срезы получали на ультратоме «ЛКВ» (Швеция), снимали на медные сетки, покрытые вольфрамовой пленкой, последовательно окрашивали раствором уранилацетата («Serva», США) и водным раствором цитрата свинца («Serva», США) и исследовали в электронном микроскопе JEM-100 SX (Япония) [12]

### ***Электронная микроскопия *T. pyriformis****

Объектом исследования служила аксеническая культура инфузорий и клетки различных видов буркхольдерий. Суточную культуру тетрахимен соединяли с буркхольдериями в соотношении 1:100, затем инкубировали 30 мин в термостате при 28 °С. Через 30 мин внеклеточные бактерии (непоглощенные инфузориями) отмывали дважды, осаждая простейших путем центрифугирования суспензии в холодном (4 °С) 0,2-Н фосфатном буфере (рН 7,2) при 3000 об/мин (10 мин). Затем осадки фиксировали в 1,0 мл 4 % раствора глутарового альдегида («Serva», США) в течение 1 ч при комнатной температуре. После отмывания в фосфатном буфере материал дополнительно фиксировали в 1 мл 1 % раствора тетраоксида осмия («Serva», США) 24 ч при 10 °С. Далее пробы обезвоживали в спиртах, заливали в эпоксидные смолы и получали ультратонкие срезы на ультратоме «ЛКВ» (Швеция). Препараты просматривали в электронном микроскопе JEM-100 SX (Япония) [12].

#### **2.14. Моделирование и химиотерапия сапа и мелиоидоза**

Для определения вирулентности (ЛД<sub>50</sub>) культур буркхольдерий подожно заражали золотистых хомячков и белых крыс суспензией суточной

агаровой культуры с интервалом в 1 Ig. ЛД<sub>50</sub> рассчитывали по методике Кербера [4].

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 изотоническом растворе хлорида натрия (рН 7,2-7,4) в дозе 10<sup>3</sup> ЛД<sub>50</sub>. У обоих видов лабораторных животных эти дозы вызывали генерализованную инфекцию. Лечение сапа проводили только на модели золотистых хомячков [255].

Химиотерапию начинали через 24 ч после инфицирования. Дозы препаратов определяли в соответствии с рекомендациями по лечению острых форм мелиоидоза и сапа: ципрофлоксацин – 40 мг/кг, хлорамфеникол – 40 мг/кг, цефтазидим – 120 мг/кг, меропенем – 50 мг/кг, рифампицин – 20 мг/кг, ко-тримоксазол – 60 мг/кг, доксициклин – 40 мг/кг [54, 90, 175].

Все препараты, кроме меропенема, давали *per os* в суспензии подсолнечного масла, меропенем вводили подкожно в объеме 0,5 мл один раз в день. Длительность лечения 10 сут, окончательный учет результатов через 30 сут после прекращения лечения.

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.

#### **2.14.1. Лечение инфицированных сапом животных клатратными и липосомальными формами препаратов**

Исследования проводили на предварительно 10-кратно пассированном на золотистых хомячках вирулентном штамме *B. mallei* Ц-5. Культуру сапа выделяли от павших животных после последнего пассажа, затем го-

товили бактериальную суспензию для постановки опытов по заражению. В предварительных опытах DIm этого штамма составляла  $\leq 10^1$  м.к.

Терапию экспериментального сапа проводили на золотистых хомячках обоего пола массой 90-110 г. Инфицировали животных подкожно в область правой паховой складки культурой *B. mallei* Ц-5 в дозе  $10^4$  м.к., что составляло  $10^3$  DIm.

Введение химиопрепаратов начинали через 4 ч (экстренная профилактика) и через 24 ч и 48 ч (лечение) 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 [260].

Липосомы имели размер 1,0-1,5 мкм и содержали в 1,0 мл 30 мг препарата. Липосомальные формы химиопрепаратов были изготовлены на базе лаборатории экологии и дезинфекции ФКУЗ Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора. Автор приносит свою искреннюю благодарность за предоставленные охарактеризованные препараты заведующему лабораторией экологии и дезинфекции к.м.н. К.А. Ротову [71, 225].

Препараты вводили ежедневно, за исключением липосомальных форм, которые вводили внутрибрюшинно с интервалом в 2 сут, что определялось особенностями фармакокинетики липосомальных форм антибиотиков [225].

Длительность введения химиопрепаратов варьировала в зависимости от задач конкретного опыта. Доза вводимых препаратов определялась величиной максимально достижимой концентрации в крови.

После завершения курса лечения животных наблюдали не менее 21 дня, затем усыпляли хлороформом и вскрывали с целью выявления хро-

нических форм (производился высеив отпечатками паренхиматозных органов и лимфоузлов на ТСА).

### **2.15. Статистическая обработка результатов**

Статистическая обработка результатов проведена 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 [31, 26, 222], в качестве средних величин использовали медиану,  $LD_{50}$  рассчитывали по Керберу [4]. Достоверность различия уровня выживаемости животных опытных и контрольных групп оценивалась по точному методу Фишера для групп наблюдений по качественным показателям [13].

## ГЛАВА 3. ОЦЕНКА ВЛИЯНИЯ РЯДА ФАКТОРОВ НА ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ БУРКХОЛЬДЕРИЙ К ХИМИОПРЕПАРАТАМ

### 3.1. Чувствительность различных видов буркхольдерий к химиотерапевтическим средствам

Нами была изучена чувствительность четырех видов буркхольдерий (*B. mallei*, *B. pseudomallei*, *B. ceracia*, *B. thailandensis*) к химиотерапевтическим препаратам стандартными методами в жидкой и плотной питательной среде Мюллер-Хинтона (методом серийных разведений и диско-диффузионным). Данные по МПК и диаметры зон подавления роста буркхольдерий химиопрепаратами представлены в таблицах 3-5.

Как видно из данных, приведенных в таблице 3, штаммы *B. pseudomallei* являются резистентными к пенициллинам (ампициллин), аминогликозидам (гентамицин), полимиксину В, умеренно чувствительными к цефалоспорином (цефтазидим, цефтриаксон), рифампицину, тетрациклинам (доксциклин), хлорамфениколу, высокочувствительными к пенемам (имипенем, меропенем), фторхинолонам (офлоксацин, ципрофлоксацин), отдельным комбинированным препаратам сульфаниламидов (котримоксазол) и ингибиторзащищенным  $\beta$ -лактамам (амоксиклав).

Результаты определения *in vitro* чувствительности культур *B. mallei* к химиопрепаратам, представленные в таблице 3-5, свидетельствуют, что штаммы *B. mallei* высокочувствительны к цефалоспорином, рифампицину, тетрациклинам, хлорамфениколу, фторхинолонам и отдельным комбинированным препаратам сульфаниламидов и  $\beta$ -лактамов. Значения МПК данных препаратов для большинства изученных штаммов значительно ниже, чем для штаммов *B. pseudomallei*.

Кроме того, исследованные штаммы были чувствительны к антибактериальным препаратам аминогликозидной группы (гентамицин). Не эффективными *in vitro* против штаммов *B. mallei* были пенициллины (ампициллин) и полимиксин В.

Антибиотикограммы *B. ceracia* и *B. thailandensis* отражены в таблице 4. Изученные нами штаммы демонстрировали умеренную чувствительность к препаратам, рекомендуемым при лечении заболеваний, вызываемых буркхольдериями. Наиболее активными в отношении исследованных штаммов *B. ceracia* и *B. thailandensis* были антибактериальные препараты из группы карбапенемов, цефалоспоринов, комбинированных сульфаниламидов, ингибитор защищенных  $\beta$ -лактамов. Рифампицин и хлорамфеникол также были умеренно активны против данных видов буркхольдерий.

Таким образом, полученные нами данные, свидетельствуют о том, что наиболее устойчивы к химиотерапевтическим средствам штаммы сапрофитических видов, а максимальная чувствительность проявляется у штаммов единственного среди буркхольдерий патогена завершенного типа *B. mallei* [8].

Принципиально эти данные не отличаются от ранних наблюдений по этой проблеме [52, 64, 90, 175], за исключением, появления в списке ранее неизвестных химиопрепаратов [39].

Как известно, наиболее адекватными методами определения чувствительности химиопрепаратов для лечения инфекционных заболеваний являются методы серийных разведений, но в клинических лабораториях наиболее часто используют диско-диффузионный как менее трудоемкий.

Таблица 3 - Чувствительность штаммов *B. mallei* и *B. pseudomallei* к химиотерапевтическим препаратам

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

## 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<sub>50</sub> препарата (медиана), мкг/мл; в скобках амплитуда колебания показателя МПК;
4. S-R интервал определен по МУК 4.2.2495-09 [32];
5. R, S, I- резистентный, чувствительный, промежуточный тип устойчивости соответственно.

**Таблица 4 - Чувствительность штаммов *B. ceracia* и *B. thailandensis* к химиотерапевтическим препаратам**

Препараты	МДК	МПК <sub>50</sub>		S-R интервал	Показатели чувствительности	
		<i>B. ceracia</i> (14)	<i>B. thailandensis</i> (5)		<i>B. ceracia</i>	<i>B. thailandensis</i>
Амоксиклав	40	6,2(3,1-50)	6,2(3,1-25)	6-24	I	I
Ампициллин	25	>100(>100)	>100(>100)	4-16	R	R
Гентамицин	4	>100(>100)	>100(>100)	4-16	R	R
Доксициклин	4	12,5(6,2-25)	12,5(3,1-25)	4-16	I	I
Ко-тримоксазол	100	25(3,1-50)	12,5(3,1-25)	40-80	S	S
Меропенем	100	6,2(1,5-12,5)	3,1(1,5-6,2)	8-16	S	S
Офлоксацин	10	3,1(1,5-6,2)	6,2(3,1-12,5)	2-8	I	I
Пиперациллин	350	>100	>100	16-64	R	R
Полимиксин В	15	>100	>100	14-18	R	R
Рифампицин	20	6,2(6,2-25)	12,5(6,2-25)	4-16	I	I
Хлорамфеникол	20	6,2(3,1-50)	12,5(6,2-25)	8-32	S	I
Цефтазидим	70	3,1(3,1-25)	6,2(3,1-25)	8-32	S	S
Ципрофлоксацин	4	1,5(0,7-3,1)	3,1(1,5- 6,2)	1-4	S	I

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<sub>50</sub> препарата (медиана), мкг/мл; в скобках амплитуда колебания показателя МПК;
4. S-R интервал определен по МУК 4.2.2495 - 09 [32];
5. R, S, I - устойчивый, чувствительный, промежуточный тип устойчивости соответственно.

**Таблица 5 - Диапазон диаметров зон подавления роста патогенных буркхольдерий химиопрепаратами**

Препараты	Содержание препарата в диске, мкг	Диаметр зон подавления роста, мм		R-S интервал	Показатели чувствительности	
		<i>B. mallei</i> (14)	<i>B. pseudomallei</i> (20)		<i>B. mallei</i>	<i>B. pseudomallei</i>
Амоксиклав	30	26-32	20-31	14-21	S	S
Доксициклин	10	16-22	14-22	12-16	S	S
Имипенем	10	28-35	28-32	13-16	S	S
Ко-тримоксазол	25	22-28	16-28	10-16	S	S
Ломефлоксацин	10	24-30	20-28	18-22	S	S
Меропенем	10	24-35	25-32	13-16	S	S
Офлоксацин	5	22-28	18-28	12-16	S	S
Пиперациллин	75	20-30	16-31	25-33	R	R
Рифампицин	30	18-24	16-22	14-19	S	S
Спарфлоксацин	5	18-30	16-30	16-20	S	S
Хлорамфеникол	30	14-25	14-22	12-18	S	S
Цефтазидим	30	15-26	14-22	14-18	S	S
Цефтриаксон	30	14-22	13-22	13-21	I	I
Ципрофлоксацин	5	18-30	16-30	16-21	S	S

Примечания:  
 1. S-R интервал определен по МУК 4.2.2495 - 09 [32];  
 2. R, S, I - устойчивый, чувствительный, промежуточный тип устойчивости соответственно.

Сравнительная оценка полученных нами антибиотикограмм буркхольдерий, исследованных методом серийных разведений и диско-диффузионным, не выявляла существенных различий в результатах чувствительности у большинства изученных штаммов буркхольдерий. Поэтому мы считаем целесообразным для оценки чувствительности буркхольдерий к химиотерапевтическим средствам, наряду с методами серийных разведений, использовать и диско-диффузионный метод как менее трудоемкий, простой в выполнении и интерпретации.

Современные стандартные методы определения чувствительности микроорганизмов к химиотерапевтическим препаратам позволяют определять чувствительность к ним через 24-48 ч [32, 36].

Эффективность антибактериальной терапии тяжелых инфекционных заболеваний значительно повышается при своевременном назначении этиотропного лечения, которое можно обеспечить использованием методов и средств быстрого определения чувствительности к химиотерапевтическим препаратам [72, 74, 118].

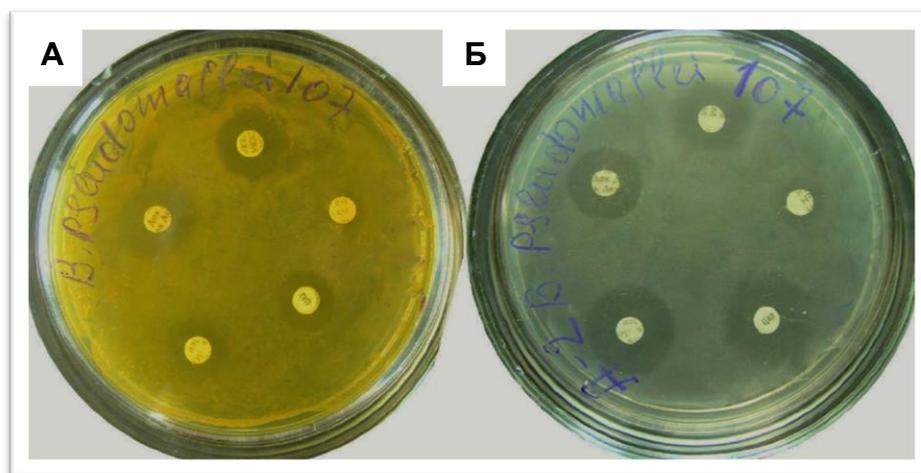
Для сокращения времени получения и интерпретации результатов по антибиотикочувствительности буркхольдерий в нашей лаборатории был разработан метод ее ускоренного определения. Метод ускоренной оценки антибиотикочувствительности основан на применении плотной глюкозо-триптонной среды с индикатором бромтимоловым синим, у которого зона перехода окраски находится в диапазонах рН 6,0-7,6 (кислая - желтая, щелочная - синяя), исходный рН среды 6,8. Как и большинство видов бактерий буркхольдерии являются гликолитическими микроорганизмами, вызывающими при окислении глюкозы сдвиг рН среды в кислую сторону, и этот процесс можно контролировать за счет изменения цвета индикатора [23, 45].

Среду с индикатором готовили непосредственно перед посевами. В качестве контроля использовали среды МХА и АМ 3. На поверхность ага-

ра с инокулятами исследуемых штаммов буркхольдерий размещали диски, пропитанные химиопрепаратами, результаты учитывали через 24 ч.

В результате проведенных экспериментов показано, что при культивировании буркхольдерий на ГТСИ в течение 4-6 ч среда закисляется, что выражается в пожелтении агара в месте высева бактериальной взвеси, когда визуально рост культур еще не выявляется. В случае дальнейшего размножения буркхольдерий зона роста культур желтеет, а цвет среды около дисков с химиотерапевтическими препаратами с заметной зоной подавления роста бактерий не изменяется [23, 45].

Как видно на рис 1 А, при оценке чувствительности штамма *B. pseudomallei* 107 к доксициклину, цефтазидиму, ломефлоксацину гентамицину, хлорамфениколу, зоны ингибирования роста культуры вокруг дисков с препаратами остаются с неизменным зеленым цветом, а в зонах роста культуры, где антибактериальные препараты уже не действуют, среда желтеет.



**Рисунок 1. Диаметры зон задержки роста *B. pseudomallei* 107 на средах:**  
А – ГТСИ, инкубация при 37 °С в течение 5 ч;  
Б – Antibiotic medium 3, инкубация при 37 °С в течение 24 ч.

На рисунке 1 (А-Б) показано, что диаметр зон задержки роста бактерий на обеих средах практически одинаков, в то время как учет результатов по предлагаемому способу на среде ГТСИ значительно ускорен по сравнению со стандартной средой (4-6 ч и 24 ч соответственно) [23, 45].

Сравнительные данные по чувствительности различных видов буркхольдерий к антибактериальным препаратам, полученные диско-диффузионным методом на стандартных средах и ГТСИ, представлены в таблице 6. Из приведенных в таблице данных видно, что размеры зон задержки роста на ГТСИ и на стандартных средах отличаются незначительно ( $p \leq 0,01$ ). Оценку достоверности направленности изменений показателей, представленных в табл. 6, проводили с использованием критерия знаков [26, 31, 222].

При замене индикатора бромтимолового синего на бромкрезоловый пурпурный размеры зон ингибирования роста не отличались между собой, но скорость пожелтения среды при культивировании различных штаммов была на 30 мин медленнее на средах с бромкрезоловым пурпурным [23, 45].

Таким образом, применяемый нами ускоренный метод определения антибиотикочувствительности буркхольдерий позволяет через 4-6 ч от момента выделения культуры дать достаточно информации для назначения экстренного лечения, однако он должен быть в дальнейшем подтвержден методом серийных разведений.

Для определения чувствительности буркхольдерий к химиопрепаратам нами был применен метод с использованием Е-тестов, который является менее трудоемким, требует немного времени для его подготовки и проведения, а результаты, полученные с помощью данного метода, вполне адекватны.

**Таблица 6 - Сравнение размера зон задержки роста культур буркхольдерий на стандартных средах и ГТСИ**

Вид микроорганизма	t	Диаметр зон подавления роста (Me), мм														
		Do			Lo			G			Ca			C		
		1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
<i>B. mallei</i> (5)	4	20	22	23	19	20	22	12	14	15	12	14	15	12	13	15
<i>B. pseudomallei</i> (5)	5	20	21	23	22	23	25	R	R	R	18	19	21	14	15	18
<i>B. cepacia</i> (5)	4	12	13	16	18	19	21	R	R	R	16	18	20	18	19	21
<i>B. thailandensis</i> (5)	5	21	21	24	16	18	20	R	R	R	16	17	18	14	14	16

**Примечания:**

- В колонках указан размер зоны ингибирования роста микроорганизмов в мм на различных средах под цифрами:
- 1- ГТСИ при учете изменения цвета среды через 4-6 ч; 2-3 – на средах МХА и АМ 3 через 24 ч соответственно;
  - R - отсутствие зон подавления роста вокруг дисков;
  - t – время пожелтения среды в часах;
  - Me – средний показатель (медиана) зон подавления роста штаммов каждого вида;
  - Обозначения дисков: Do – доксициклин 10 мкг; Lo – ломефлоксацин 10 мкг; G – гентамицин 10 мкг; Ca – цефтазидим 30 мкг; C – хлорамфеникол 30 мкг.

Однако метод серийных разведений более чувствителен и точен. Это видно из таблицы 7. Метод с использованием бумажных полосок с градиентом концентраций антибиотика удобен при большом объеме исследований.

**Таблица 7 – Значения МПК, полученные с помощью Е-теста и методом серийных разведений (на плотной питательной среде МХА)**

Штаммы	Рифампицин		Цефтазидим		Ко-тримоксазол	
	Е	МСП	Е	МСП	Е	МСП
<i>B. mallei</i> 10230	5	6,2	2,0	3,2	0,5	1,5
<i>B. pseudomallei</i> C-141	25	12,5	5,0	6,2	10	6,2
<i>B. ceracia</i> 25416	25	12,5	45	25	8	12,5
<i>B. thailandensis</i> 264	15	12,5	2,5	3,2	15	25

Примечания:  
 1. Е – результаты, полученные с помощью Е-тестов;  
 2. МСП – метод серийных разведений на плотной питательной среде (МХА);  
 3. Цифровой материал таблицы – МПК препаратов, мкг/мл.

### **3.2. Чувствительность к химиопрепаратам культур буркхольдерий, пассированных на лабораторных животных и питательных средах**

Особый интерес представляет изучение характера изменчивости вирулентности и антибиотикочувствительности культур буркхольдерий, выделяемых в процессе пассирования на лабораторных животных и при многократных пересевах на питательных средах.

Пассирование культур буркхольдерий через организм животных и пересевы на питательных средах в определенной мере моделируют динамику приспособляемости микроорганизмов в ходе инфекционного процесса и в условиях поддержания культур в лабораториях. В этой связи нами

была изучена чувствительность к химиотерапевтическим средствам культур буркхольдерий, пассированных через организм животных и на питательных средах.

Для оценки чувствительности к химиопрепаратам пассированных штаммов использовали метод диск-диффузии на плотной питательной среде, контролем служили результаты по чувствительности исходных, не пассированных штаммов буркхольдерий. Кроме того, в ходе исследования определяли вирулентность культур, пассированных на лабораторных животных. Данные по чувствительности и вирулентности исследуемых культур к химиопрепаратам представлены в таблице 8.

В результате проведенных экспериментов установлено, что многократные пересевы штаммов *B. mallei* и *B. pseudomallei* на питательных средах незначительно влияют на уровень чувствительности культур к химиопрепаратам (табл. 8).

Изменения чувствительности пассированных на питательных средах штаммов *B. thailandensis* (264, 251, 265, 295, 299) к химиопрепаратам носили разнонаправленный характер. Некоторые штаммы *B. thailandensis* повысили или утратили резистентность к отдельным химиопрепаратам.

Нами было выявлено, что пассирование через организм животных приводящее к повышению вирулентности культур, как правило, вызывает достоверное снижение устойчивости патогенных буркхольдерий к изученным химиотерапевтическим препаратам, используемым в настоящее время в практике лечения сапа и мелиоидоза. Снижение показателей антибиотикорезистентности в парах исходных и пассированных штаммов по критерию знаков характеризовалось величиной  $z = 8$  при  $n = 30$ , что соответствует уровню вероятности достоверности различий с  $p = 0,01$ .

Так, два штамма *B. pseudomallei* (С-141, 56770) и три штамма *B. mallei* (10230, В-120, Ц-5) были резистентны к цефтазидиму, но чувствительны к ломефлоксацину, имипенему, доксициклину и ко-тримоксазолу. Чувствительность к ним пассированных *in vivo* штаммов *B. pseudomallei* достовер-

но повысилась по сравнению с исходными контрольными штаммами, о чем свидетельствует увеличение диаметров зон задержки роста вокруг дисков с химиопрепаратами (таблица 8). Кроме штамма *B. mallei* В-120, чувствительность сапных культур к имипенему, доксициклину, ломефлоксацину и рифампицину значительно повысилась после пассирования на белых мышях.

При определении вирулентности показано, что животные погибали только в случае их заражения возбудителями сапа и мелиоидоза, DIm этих микроорганизмов для золотистых хомячков не превышала  $10^1$  КОЕ, а DIm *B. thailandensis* находилась в пределах  $10^6$ - $10^8$  КОЕ.

DIm двух исходных штаммов *B. pseudomallei* для мышей не отличалась, составляя  $10^4$  КОЕ. Пассирование *B. pseudomallei* на мышях привело к снижению DIm на  $10^3$  Ig (штаммы С-141, 56770). Исходные штаммы *B. mallei* вызывали гибель отдельных мышей при введении  $>10^8$  КОЕ. Резкое снижение DIm наблюдалось и при пассировании *B. mallei* через организм мышей (на  $>10^5$ - $10^4$  Ig, в зависимости от штамма).

С другой стороны, DIm для мышей штаммов *B. pseudomallei*, пересеваемых на ТСА, увеличилась, а в случае с *B. mallei* этот показатель не изменился. Культуры *B. thailandensis*, пересеваемые на ТСА, за одним исключением (штамм 265), снизили вирулентность.

Как известно, характер соотношения вирулентности и резистентности к химиопрепаратам у патогенных микроорганизмов может быть различным: наиболее часто повышение вирулентности культур сопровождается снижением их устойчивости [202, 261].

Одной из причин повышения вирулентности и снижения резистентности культур в процессе многократных пассажей через организм животных исследователи считают ускоренное размножение штаммов с повышенной вирулентностью, показано одновременное укорочение lag-фазы и ускорение времени генерации [10, 261, 271].

**Таблица 8 - Вирулентность и чувствительность к химиопрепаратам штаммов патогенных буркхольдерий, пассированных на белых мышах и питательных средах**

Штаммы		Dlm	Ca 30	Lo 10	R 30	I 10	Do 10	Co 25
<i>B. pseudomallei</i> C-141	исх.	10 <sup>4</sup>	8	24	27	30	32	30
	б/м	10 <sup>1</sup>	10	30	46	40	36	36
	п.с.	10 <sup>7</sup>	8	30	44	40	34	34
<i>B. pseudomallei</i> 56770	исх.	10 <sup>4</sup>	11	24	16	40	30	28
	б/м	10 <sup>1</sup>	12	26	19	46	34	30
	п.с.	10 <sup>7</sup>	11	26	16	40	32	30
<i>B. mallei</i> 10230	исх.	>10 <sup>8</sup>	8	32	36	44	40	32
	б/м	10 <sup>3</sup>	8	40	40	50	50	30
	п.с.	>10 <sup>8</sup>	8	30	26	50	32	32
<i>B. mallei</i> B-120	исх.	>10 <sup>8</sup>	8	32	30	50	48	40
	б/м	10 <sup>4</sup>	10	40	30	40	40	43
	п.с.	>10 <sup>8</sup>	10	38	36	42	38	38
<i>B. mallei</i> Ц-5	исх.	>10 <sup>8</sup>	8	31	27	32	34	32
	б/м	10 <sup>3</sup>	8	34	40	52	45	36
	п.с.	>10 <sup>8</sup>	8	30	25	40	40	25
<i>B. thailandensis</i> 264	исх.	10 <sup>6</sup>	14	26	20	40	24	16
	п.с.	10 <sup>8</sup>	12	26	22	44	28	20
<i>B. thailandensis</i> 251	исх.	10 <sup>6</sup>	12	22	22	46	24	12
	п.с.	10 <sup>8</sup>	18	26	22	45	30	15
<i>B. thailandensis</i> 265	исх.	10 <sup>8</sup>	15	26	24	44	30	18
	п.с.	10 <sup>7</sup>	15	30	22	46	30	22
<i>B. thailandensis</i> 295	исх.	10 <sup>7</sup>	15	26	22	44	30	16
	п.с.	10 <sup>8</sup>	20	8	25	46	36	10
<i>B. thailandensis</i> 299	исх.	10 <sup>6</sup>	8	15	30	46	30	12
	п.с.	>10 <sup>9</sup>	15	15	15	40	14	8

Примечания:

1. Dlm (в микробных клетках) для штаммов *B. pseudomallei* и *B. mallei* определяли на белых мышах, для *B. thailandensis* – на золотистых хомячках;
2. Lo - ломефлоксацин, R - рифампицин, I - имипинем, Do - доксициклин, Co - котримоксазол, Ca- цефтазидим;
3. цифры на дисках – содержание препарата, мкг;
4. цифры в колонках – зона задержки роста культур, мм;
5. при обозначении штаммов: исх. – исходная культура, б/м и п.с. – культуры, пассированные на белых мышах и питательных средах соответственно.

Замедление фаз роста микробной популяции, в свою очередь, существенно повышает резистентность к химиотерапевтическим средствам.

Так, при резком снижении уровня кислорода в среде до анаэробных условий буркхольдерии прекращают размножение на длительный период (более 14 дней) и становятся устойчивыми к действию антибактериальных препаратов, затем при восстановлении аэробных условий вновь происходит рост популяции [261].

Многократные пересевы буркхольдерий на питательных средах, как правило, сопровождаются снижением вирулентности культур, чувствительность к химиотерапевтическим средствам при этом может повышаться, понижаться, или не изменяться, в зависимости от штамма [25, 202].

### **3.3. Влияние физико-химических факторов среды на чувствительность буркхольдерий к химиопрепаратам**

Полученные *in vitro* результаты определения чувствительности буркхольдерий были скорректированы с некоторыми условиями, проявляющимися в процессе взаимодействия микроорганизма с химиопрепаратами *in vivo*, а именно температурой, pH среды, добавлением 5 % CO<sub>2</sub> в атмосферу и крови экспериментальных животных в среду при культивировании.

В ряде опытов было изучено влияние температуры и pH среды на чувствительность к химиопрепаратам типовых штаммов буркхольдерий: *B. mallei* 10230, *B. pseudomallei* C-141, *B. thailandensis* 264, *B. ceracia* 25416. Данные, полученные в результате исследования (табл. 9), показали, что эффект влияния температуры и pH среды на чувствительность буркхольдерий к химиопрепаратам - разнонаправленный.

Как видно из данных, приведенных в таблице 9, при увеличении температуры культивирования величина МПК доксициклина для *B. pseudomallei* C-141 значительно повышалась, а для штаммов *B. mallei* 10230, *B. ceracia*, *B. thailandensis* 264 оставалась без существенных изменений. Наря-

ду с этим, увеличение рН питательной среды сопровождалось снижением резистентности всех видов буркхольдерий к доксициклину.

**Таблица 9 – Антибиотикочувствительность буркхольдерий при различных значениях рН питательной среды и температуры культивирования**

Штаммы	Химиопрепараты	рН питательной среды и температура культивирования, °С				
		рН 7,0 Т 37 °С	6,0 37 °С	8,0 37 °С	7,0 32 °С	7,0 41 °С
<i>B. mallei</i> 10230	доксициклин	0,1	0,25	0,1	0,1	0,1
	ципрофлоксацин	1,0	5,0	0,1	0,5	0,25
	хлорамфеникол	6,2	12,5	6,2	6,2	3,1
<i>B. pseudomallei</i> C-141	доксициклин	2,5	2,5	0,5	0,25	0,5
	ципрофлоксацин	2,5	5,0	0,5	0,5	2,5
	хлорамфеникол	12,5	25	6,2	12,5	3,1
<i>B. ceracia</i> 25416	доксициклин	25	25	12,5	25	12,5
	ципрофлоксацин	2,5	2,5	2,5	10	1,0
	хлорамфеникол	25	50	12,5	25	6,2
<i>B. thailandensis</i> 264	доксициклин	3,1	6,2	3,1	6,2	3,1
	ломефлоксацин	10	30	20	15	8
	рифампицин	20	30	25	10	30
Примечания: 1. цифровой материал таблицы – МПК, мкг/мл; 2. Т- температура культивирования, °С.						

Установлено, что чувствительность к ципрофлоксацину в 5-10 раз повышается в щелочной среде для всех буркхольдерий, кроме *B. ceracia* 25416, в то же время для этого штамма отмечено наиболее существенное снижение минимальной подавляющей концентрации при повышении температуры культивирования. Чувствительность *B. pseudomallei* C-141, *B. mallei* 10230 к ципрофлоксацину в пределах изученного диапазона температур изменялась незначительно.

Значения МПК хлорамфеникола в отношении штаммов *B. pseudomallei* C-141, *B. mallei* 10230 и *B. ceracia* 25416 при повышении температуры от 32 °С до 41 °С и рН от 6,0 до 8,0 снижались в 2-4 раза.

Наибольшая чувствительность *B. thailandensis* 264 к ломефлоксацину отмечена при нейтральном рН среды и при Т °41 °С, хотя разница в показателях в зависимости от температуры невелика. Зависимость от рН распределилась следующим образом: максимальная чувствительность при рН 7,0, затем при 8,0 и при рН 6,0. Отсюда следует, что при смещении рН среды в кислую или щелочную сторону чувствительность бактерий к препарату снижается.

В опытах с рифампицином наибольшая чувствительность также проявлялась при нейтральном рН, однако к данному препарату этот вид был наиболее чувствительным при 32 °С, а наименее - при 41 °С. Зависимость от рН такая же, как и у ломефлоксацина.

Таким образом, проведенные исследования свидетельствуют о том, что чувствительность буркхольдерий к химиотерапевтическим средствам может значительно изменяться в зависимости от температуры и показателей рН окружающей среды.

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

Для этого исследуемую культуру *B. mallei* и *B. pseudomallei* в дозе  $10^4$  засеивали на среду Мюллер-Хинтона, помещали диски с антибактериальными препаратами (цефтазидим, меропенем, циплофлоксацин, доксициклин, рифампицин, хлорамфеникол, ко-тримоксазол) и культивировали при 37 °С в течении 24 ч в обычных условиях и параллельно в этой же концентрации исследуемые культуры высевали на среду Мюллер-Хинтона с добавлением 10 % свежей гепаринизированной крови золотистых хомячков и белых крыс, наносили диски с антибактериальными препаратами и культивировали при 37 °С в течении 24 ч в атмосфере, содержащей 5 %  $\text{CO}_2$ . Учет результатов по чувствительности культур проводили путем измерения зон задержки роста микроорганизма вокруг диска с антибактериаль-

ным препаратом. Результаты оценки антибиотикочувствительности штаммов представлены в таблицах 10-11.

**Таблица 10 - Чувствительность к химиотерапевтическим препаратам патогенных буркхольдерий на среде Мюллер-Хинтона с добавлением крови лабораторных животных в атмосфере 5 % CO<sub>2</sub>**

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

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 5 % CO<sub>2</sub>;
5. Цифры – медиана 5 опытов;
6. \* - достоверность различия показателя с контролем превышает 95 % (p<0,05).

**Таблица 11 – Чувствительность к химиотерапевтическим препаратам непатогенных буркхольдерий на среде Мюллер-Хинтона с добавлением крови лабораторных животных в атмосфере 5 % CO<sub>2</sub>**

Химиопрепараты	С	<R->S	Штаммы					
			<i>B. ceracia</i> 25416			<i>B. thailandensis</i> 264		
			К	з.х.	б.к.	К	з.х.	б.к.
Ципрофлоксацин	5	16-21	30	30	25*	33	30	29
Меропенем	10	13-16	25	10*	10*	25	20*	17*
Цефтазидим	30	14-18	22	8*	15*	25	20*	23
Хлорамфеникол	30	12-18	25	11*	15*	25	25	22
Доксициклин	10	12-16	20	15*	18	25	25	22
Рифампицин	30	14-19	12	8*	11	12	10	11
Ко-тримоксазол	25	10-16	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 с Мюллер-Хинтона с добавлением крови золотистых хомячков или белых крыс в атмосфере 5 % CO<sub>2</sub>;
5. Цифры – медиана 5 опытов;
6. \* - достоверность различия показателя с контролем превышает 95 % (p<0,05).

Как видно из данных, приведенных в таблицах, 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 котримоксазолом 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.

Является интересным то, что достоверное уменьшение диаметров зон подавления роста вокруг дисков с химиопрепаратами наблюдается в 25 случаях, из которых в большинстве своем (19 раз), это явление отмечено в опытах с кровью наиболее чувствительного к буркхольдериям вида – золотистых хомячков.

Это можно объяснить двумя причинами: с одной стороны, в атмосфере с повышенным содержанием CO<sub>2</sub> падает рН среды и снижается эффективность действия ряда химиопрепаратов, а с другой - добавление крови к среде Мюллер-Хинтона повышает ее ростовые свойства. В наших опытах при высеве взвеси буркхольдерий 10<sup>4</sup> м.к./мл на модифицированную среду количество колоний и их размер в среднем повысились на 20 % через трое суток культивирования.

Полученные нами данные позволяют предположить, что изучение антибиотикочувствительности буркхольдерий в стандартных условиях не может служить единственным определяющим фактором при отборе препаратов для лечения сапа и мелиоидоза. Для оценки эффективности химиотерапевтических препаратов в отношении патогенных буркхольдерий *in vitro* уместно воспроизвести условия, моделирующие характер взаимоотношений микроорганизма с антибиотиком *in vivo*, а именно добавить к среде Мюллер-Хинтона кровь экспериментальных животных и провести культивирование в атмосфере, содержащей 5 % углекислого газа.

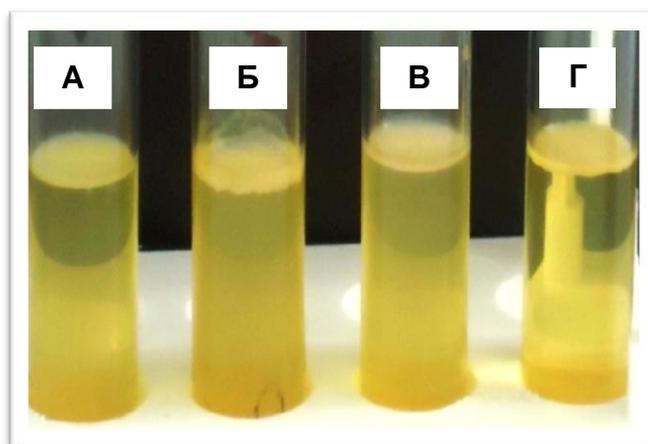
## **ГЛАВА 4. ИЗУЧЕНИЕ ВЛИЯНИЯ ФОРМ АДАПТИВНОЙ ИЗМЕНЧИВОСТИ НА ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ БУРКХОЛЬДЕРИЙ К ХИМИОПРЕПАРАТАМ**

### **4.1. Чувствительность к химиотерапевтическим препаратам буркхольдерий, образующих биопленки**

Известно, что буркхольдерии способны к образованию на какой-либо поверхности (биотической, абиотической) сложных сообществ - биопленок, приобретая при этом качественно новые свойства, (биопленочный фенотип) отличающие их от бактерий, находящихся в планктонной форме [38, 113, 121, 219].

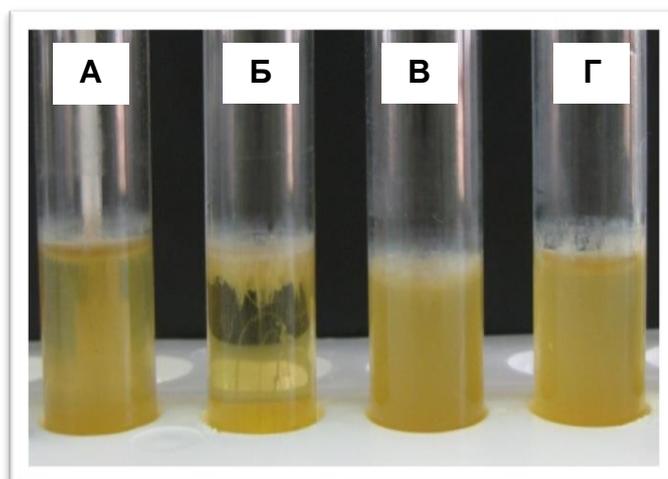
В связи с этим нами была изучена способность буркхольдерий к образованию биопленок на различных поверхностях. Для получения биопленок исследуемых штаммов буркхольдерий использовали метод, основанный на способности бактерий колонизировать различные абиотические поверхности, то есть рост на границе раздела фаз «жидкость - твердое вещество» [156]. Кроме того, биопленки получали в бульоне ТСБ, МХБ на границе раздела фаз «жидкость - воздух». МПК препаратов к биопленкам и бактериальным взвесям буркхольдерий определяли методом серийных разведений в жидкой питательной среде МХБ, содержащей убывающие концентрации следующих химиотерапевтических средств: цефтазидим, ко-тримоксазол, меропенем, доксициклин и рифампицин.

В результате проведенных экспериментов установлено, что рост буркхольдерий в жидкой питательной среде имеет характерные особенности. Визуально все четыре вида буркхольдерий легко образуют биопленки в жидких питательных средах (поверхность раздела фаз «жидкость-воздух»). Особенности роста различных видов буркхольдерий в жидкой питательной среде (ТСБ) представлены на рисунках 2-3.



**Рисунок 2. Рост штаммов буркхольдерий в жидкой питательной среде:**  
 А - *B. ceracia* 25416; Б - *B. thailandensis* 264; В - *B. pseudomallei* 107; Г - *B. pseudomallei* VPA.

Показано, что штаммы *B. ceracia* 25416, *B. thailandensis* 264, *B. pseudomallei* 107, *B. pseudomallei* VPA образуют плотную, зрелую биопленку на поверхности триптиказо-соевого бульона уже через 24 ч культивирования при 37 °С. В последующие сутки культивирования плотность и размер биопленки увеличивается.

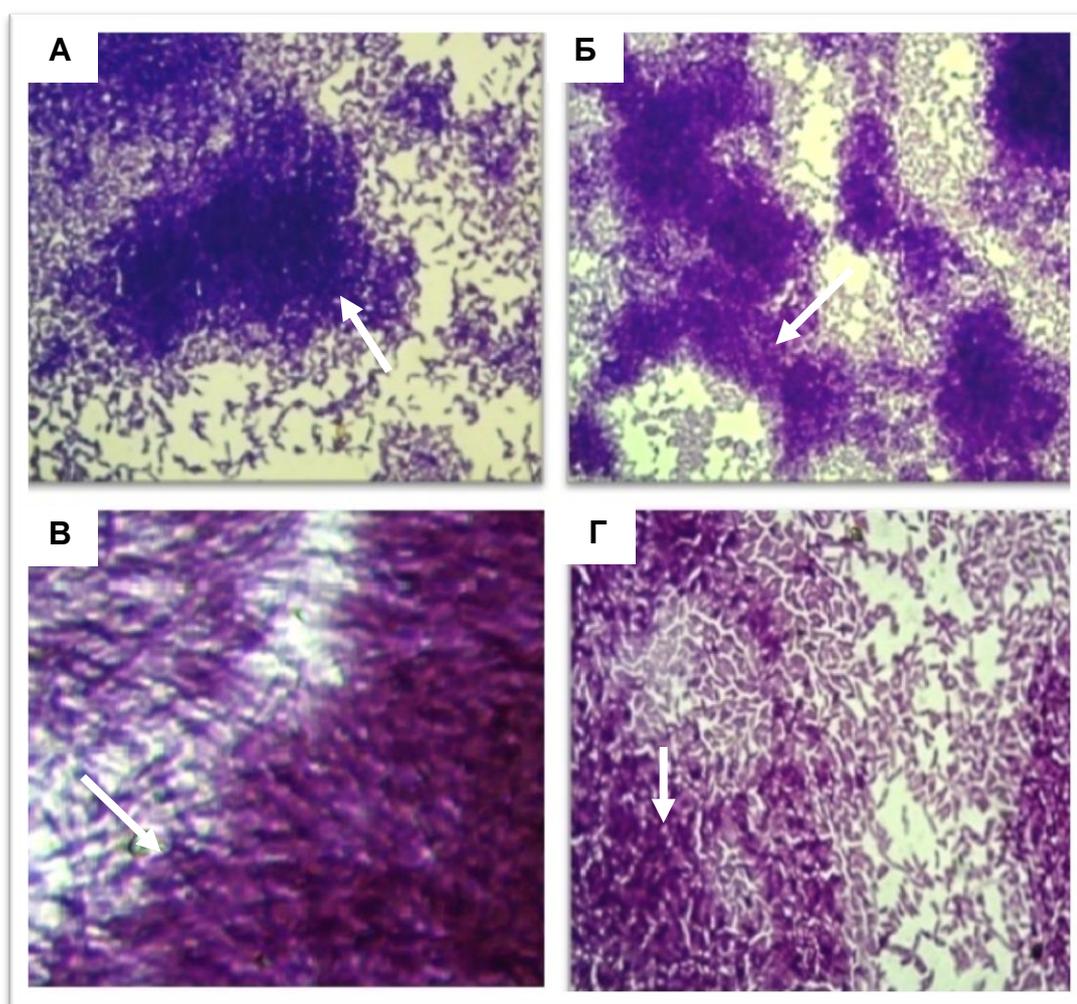


**Рисунок 3. Рост сапных штаммов в жидкой питательной среде через 72 ч культивирования:** А - *B. mallei* B-120; Б - *B. mallei* P1; В - *B. mallei* 10230; Г - *B. mallei* Ц-5.

Такой же тип роста в жидкой питательной среде характерен и для большинства других штаммов данных видов буркхольдерий. Кроме того, выявлено, что штаммы *B. mallei* также образуют биопленку только через 48-72-96 ч роста в бульоне в зависимости от штамма. Следует отметить,

что биопленка у культур возбудителя сапа более тонкая, неравномерная и легко разрушается при встряхивании (рис. 3).

Для более детального изучения особенностей формирования биопленок бактериями рода *Burkholderia* была проведена световая и электронная микроскопия препаратов буркхольдериальных биопленок. Световая микроскопия препаратов биопленок, образованных на полистироле, окрашенных раствором генцианвиолета, выявила многослойные структуры, состоящие из групп бактерий, адгезированных к поверхности и заключенных в плотный внеклеточный матрикс интенсивно фиолетового цвета на микрофотографиях (рис. 4).

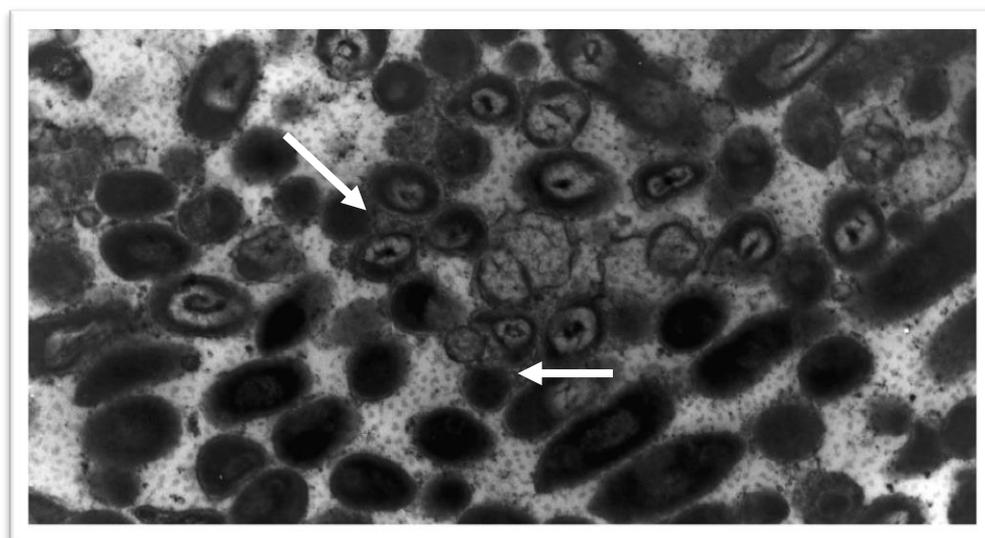


**Рисунок 4. Световая микроскопия биопленок буркхольдериий, образованных на твердой поверхности. Окрашивание генцианвиолетом, х 1000. Стрелка – внеклеточный матрикс; А - *B. thailandensis* 264 (24 ч); Б - *B. pseudomallei* VPA (24 ч); В - *B. mallei* 10230 (72 ч); Г - *B. cepacia* 25416 (24 ч).**

Микроскопически биопленки исследуемых видов имели сходную организацию.

**Трансмиссионная электронная микроскопия буркхольдеральных биопленок, образованных на поверхности раздела сред «жидкость – твердое вещество»**

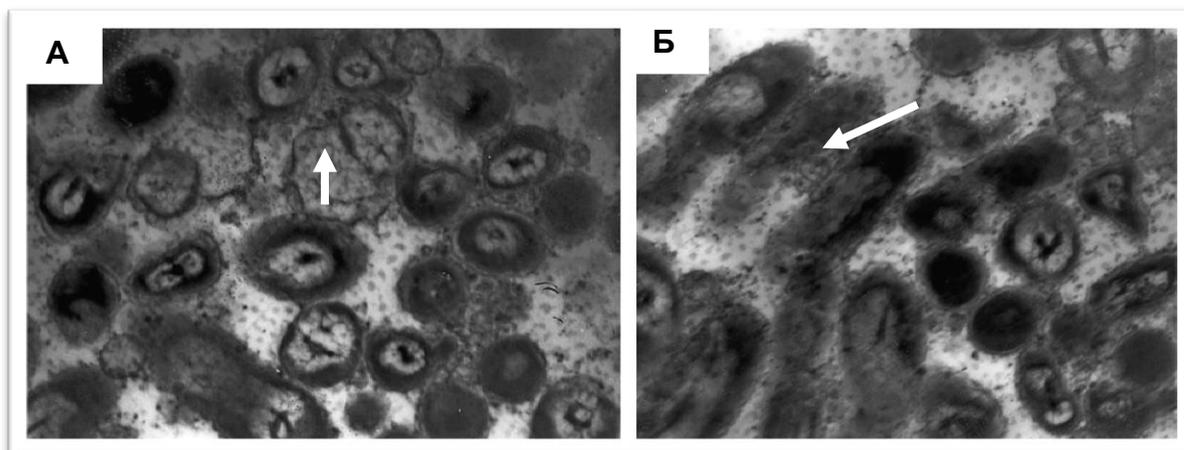
Проведенное нами электронно-микроскопическое изучение буркхольдеральных сообществ методом позитивного контрастирования ультратонких срезов выявило некоторые особенности их строения. На рисунках 5-6 показаны ультратонкие срезы 2-суточной биопленки штамма *B. pseudomallei* 107, контрастированные рутениевым красным для цитохимической визуализации экзополисахаридного матрикса [198].



**Рисунок 5. Ультратонкий срез биопленки *B. pseudomallei* 107, образованной на полистироловой поверхности. Стрелки – экзополисахаридный матрикс. Увеличение x 8,000**

На препаратах видны агрегаты тесно контактирующих между собой клеток буркхольдерий, окруженные диффузным рутений позитивным экзополисахаридным матриксом. Рутениевый красный позволяет выявлять на ультратонких срезах кислые полисахариды. Бактериальные клетки сооб-

щества отличались между собой формой, размером и электронной плотностью цитоплазмы. Некоторые из них имели типичную, сходную с планктонными клетками морфологию, другие были меньших размеров и с более плотной цитоплазмой (рис. 6).



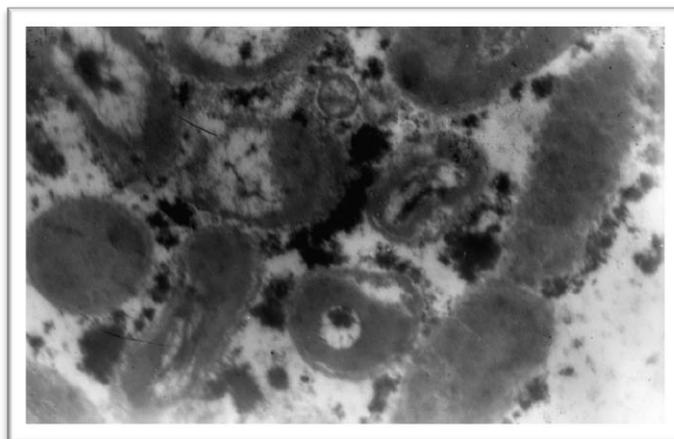
**Рисунок 6. Ультратонкие срезы фрагментов биопленки *B. pseudomallei* 107, образованной на полистироловой поверхности (А, Б). Стрелки – диффузный экзополисахаридный матрикс. Увеличение x 10,000**

Очевидно, что такая структура биопленочного сообщества способствует специфическому межклеточному общению, передаче коммуникативных сигналов и обмену генетической информацией [35].

### ***Трансмиссионная электронная микроскопия биопленок, образованных на поверхности раздела сред «воздух-жидкость»***

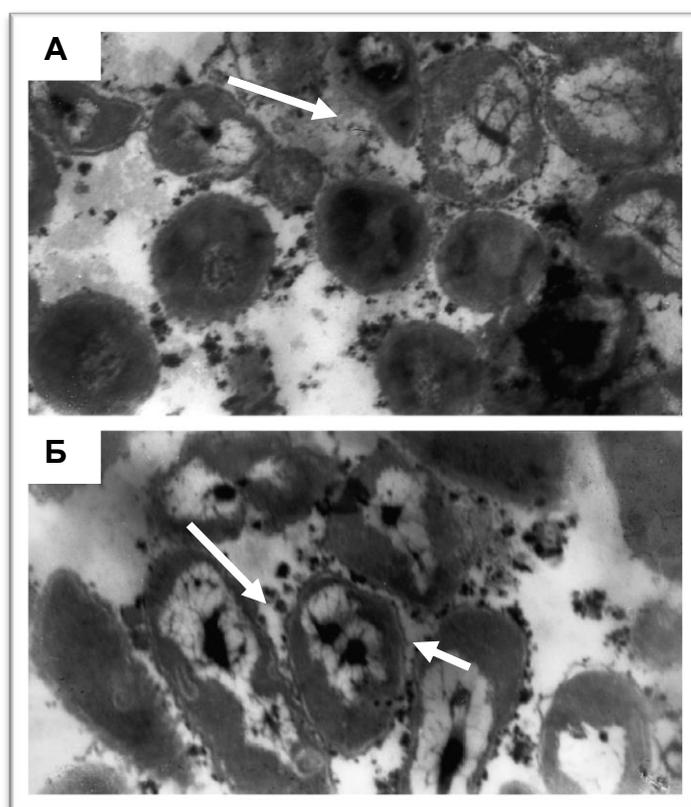
При визуальной оценке консистенция биопленки *B. pseudomallei* 107, образованной на поверхности бульона, более плотная и прочная, чем на полистироловой поверхности. На рисунках 7-9 показаны ультратонкие срезы 2-х суточной биопленки штамма *B. pseudomallei* 107, образованной на поверхности триптиказо-соевого бульона.

При электронной микроскопии на ультратонких срезах биопленки нами были обнаружены агрегаты бактериальных клеток, тесно контактирующие между собой (рис. 7).



**Рисунок 7.** Ультратонкий срез биопленки *B. pseudomallei* 107, образованной на поверхности бульона. Увеличение x 20,000.

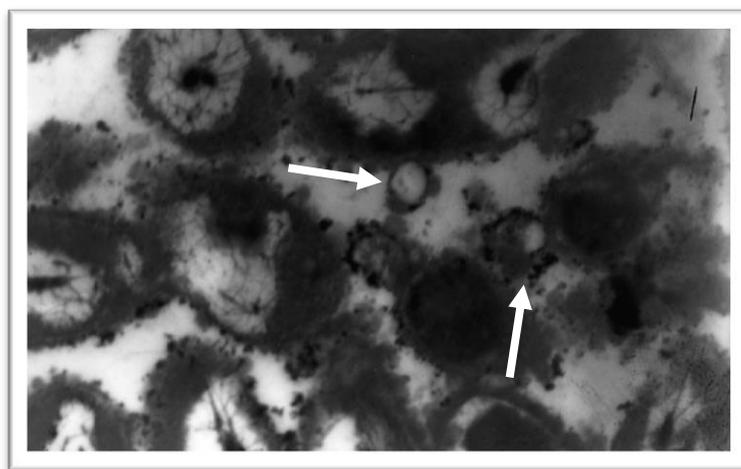
В архитектонике биопленочного сообщества отчетливо видны различные типы межклеточных контактов (плотные слипания наружной мембраны клеточной стенки, цитоплазматические перемычки и т.д), образуемые поверхностными структурами клеточной стенки буркхольдерий (рис. 8).



**Рисунок 8.** Ультратонкие срезы различных фрагментов биопленки штамма *B. pseudomallei* 107, образованной на поверхности бульона. А - ЭПС; Б - межклеточные контакты, увеличение x 20, 000.

Межклеточные контакты позволяют бактериальным клеткам взаимодействовать между собой и с биогенными и абиогенными поверхностями. Поверхностные структуры клеточной стенки непосредственно принимают участие в инициализации процесса биопленкообразования, способствуя процессам адгезии, агрегации и колонизации бактериями различных экологических ниш.

Кроме того, на поверхности клеточной стенки некоторых бактериальных клеток были выявлены многочисленные мембранные везикулы, умеренной электронной плотности, в которых, как известно, заключены продукты секреции бактериальных клеток. Характерным для грамотрицательных микроорганизмов, в том числе и буркхольдерий, является накопление в клетках бактерий везикул с молекулами поли- $\beta$ -оксибутирата и высвобождение его в межклеточное пространство (матрикс), где он используется при неблагоприятных условиях как дополнительный источник питания [46, 53].



**Рисунок 9. Микрофотография фрагмента биопленки штамма *B. pseudomallei* 107; образованной на поверхности бульона, мембранные везикулы (стрелки). Увеличение x 20,000.**

Таким образом, нами установлено, что патогенные буркхольдерии хорошо образуют биопленку в экспериментальных условиях на границе раздела различных сред. Как видно из результатов исследования, биопле-

ночное сообщество, образованное *in vitro*, имеет сложную специфическую ультраструктуру, которая в итоге обеспечивает его высокую выживаемость и устойчивость к неблагоприятным факторам окружающей среды.

Анализ литературных данных показал, что бактерии в составе биопленки обладают высокой резистентностью к химиотерапевтическим средствам. При этом биопленочная популяция бактерий способна выживать при воздействии химиопрепаратов в концентрациях, в десятки раз превышающих стандартные терапевтические дозы [1, 120]. Не исключено, что способность буркхольдерий существовать в составе биопленок ведет к длительной персистенции бактерий и формированию хронических форм заболеваний.

Как правило, определяют чувствительность к химиопрепаратам планктонной популяции бактерий, и, поскольку планктонные клетки защищены хуже, чем биопленки, то препараты, высоко активные *in vitro* при тестировании в чистой культуре, при испытаниях *in vivo*, когда преобладает фенотип биопленок, показывают снижение эффективности. В связи с этим, нами была изучена чувствительность буркхольдерий в составе биопленок к химиотерапевтическим препаратам, применяемым в стандартных схемах лечения (доксциклину, ко-тримоксазолу, цефтазидиму, рифампицину, меропенему).

В результате проведенных экспериментов установлено, что биопленочная популяция буркхольдерий повышает свою резистентность к изученным химиопрепаратам более чем в 10 раз, по сравнению с планктонными культурами тех же штаммов, о чем свидетельствует достоверное увеличение МПК (табл. 12).

Как видно из данных, приведенных в таблице, биопленки штаммов *B. pseudomallei* высокорезистентны ко всем изученным химиотерапевтическим средствам. Следует отметить, что ни один из изученных препаратов не является эффективным в отношении зрелых предварительно сформированных мелиоидозных биопленок. Так, МПК цефтазидима, меропенема,

доксциклина, рифампицина и ко-тримоксазола для всех изученных биопленочных культур более 500 мкг/мл, что в десятки раз больше, чем МПК для планктонных бактерий.

Возбудитель мелиоидоза в составе биопленки более устойчив к химиопрепаратам, чем возбудитель сапа, хотя формирование биопленок также приводит к значительному повышению резистентности сапных штаммов к химиопрепаратам по сравнению с чувствительностью планктонных культур.

**Таблица 12 - Сравнительная оценка чувствительности к химиопрепаратам штаммов буркхольдерий, образующих биопленку**

Штамм	Химиопрепарат	МПК, мкг/мл	
		Планктонные бактерии	Биопленка
<i>B. thailandensis</i> 264	Меропенем	1,23	>500
	Доксициклин	3,7	>500
	Цефтазидим	3,7	>500
	Рифампицин	33,3	>500
	Ко-тримоксазол	33,3	>500
<i>B. pseudomallei</i> VPA	Меропенем	3,7	>500
	Доксициклин	3,7	>500
	Цефтазидим	3,7	>500
	Рифампицин	11,1	>500
	Ко-тримоксазол	33,3	>500
<i>B. pseudomallei</i> 107	Меропенем	1,23	>500
	Доксициклин	3,7	>500
	Цефтазидим	3,7	>500
	Рифампицин	33,3	>500
	Ко-тримоксазол	11,1	>500
<i>B. pseudomallei</i> C-141	Меропенем	1,23	>500
	Доксициклин	1,23	>500
	Цефтазидим	11,1	>500
	Рифампицин	11,1	>500
	Ко-тримоксазол	33,3	>500

## Продолжение таблицы 12

<i>B. mallei</i> Ц-5	Меропенем	<1,23	11,1
	Доксициклин	1,23	33,3
	Цефтазидим	11,1	100
	Рифампицин	11,1	100
	Ко-тримоксазол	11,1	>100
<i>B. mallei</i> 10230	Меропенем	<1,23	100
	Доксициклин	3,7	>100
	Цефтазидим	3,7	100
	Рифампицин	11,1	100
	Ко-тримоксазол	11,1	>100
<i>B. mallei</i> В-120	Меропенем	<1,23	33,3
	Доксициклин	3,7	100
	Цефтазидим	11,1	>100
	Рифампицин	11,1	100
	Ко-тримоксазол	11,1	>100
Примечание - Цифровой материал таблицы - МПК для планктонной взвеси и биопленок исследуемых культур, мкг/мл.			

Как видно из данных, приведенных в таблице 12, биопленки, образованные сапными штаммами, наиболее чувствительны к препарату группы карбапенемов - меропенему. Так, МПК меропенема для биопленок штамма *B. mallei* Ц-5 составляла 11,1 мкг/мл, для штаммов *B. mallei* 10230 и В-120 - 100 мкг/мл и 33,3 мкг/мл соответственно. Важно отметить, что меропенем обладал хорошей активностью в отношении сапных биопленок в концентрациях, близких к тем, которых препарат достигает в тканях при введении его в терапевтических дозах.

Остальные изученные антибактериальные препараты (доксициклин, цефтазидим, рифампицин и ко-тримоксазол), применяемые в стандартных схемах по лечению сапа, не обладали достаточной активностью против биопленок сапных культур (значения МПК  $\geq 100$  мкг/мл).

Биопленки непатогенного сапрофитного вида *B. thailandensis* также были высокоустойчивы ко всем изученным химиопрепаратам по сравнению с планктонной культурой.

### ***Влияние химиотерапевтических средств на процесс формирования буркхольдериями биопленок***

Следует отметить, что лечение экспериментальных острых форм сапа и мелиоидоза необходимо начинать до того, как в органах - мишенях сформируются биопленки. Поэтому мы посчитали целесообразным изучить влияние химиопрепаратов на процесс формирования биопленок различными штаммами патогенных буркхольдерий. Для исследования использовали штаммы бактерий, способные к образованию биопленки при культивировании на питательных средах.

Для этого в среду культивирования перед формированием буркхольдериями биопленок одновременно с бактериальным инокулятом вносили препараты в концентрациях, которых они достигают в тканях макроорганизма при лечении сапа и мелиоидоза: меропенем - 30 мкг/мл, цефтазидим - 30 мкг/мл, доксициклин - 4 мкг/мл, ко-тримоксазол - 100 мкг/мл, амоксициклав - 25 мкг/мл, азитромицин - 25 мкг/мл, рифампицин - 15 мкг/мл.

После 24-48 часовой инкубации визуально определяли наличие биопленок в опытных пробирках, контролем служили пробы с биопленкой исследуемого штамма без добавления антибактериального средства. Полученные данные суммированы в таблице 13.

В ходе исследования выявлено, что химиопрепараты (меропенем, цефтазидим, ко-тримоксазол, доксициклин, рифампицин, амоксициклав, азитромицин) в терапевтических концентрациях подавляли образование биопленок у всех изученных сапных культур.

Как видно из таблицы 13, в опытах с культурами *B. ceracia*, *B. thailandensis* и *B. pseudomallei* наблюдалась зависимость биопленкообразования как от препарата, так и от штамма. Так, меропенем, цефтазидим и ко-тримоксазол в изученных концентрациях эффективно подавляли образование биопленок у всех штаммов *B. ceracia*, *B. thailandensis* и *B. pseudomallei*.

**Таблица 13 – Сравнительная оценка образования биопленок штаммами буркхольдерий при воздействии на них химиопрепаратов**

Препарат	К	Штаммы			
		<i>B. mallei</i> (3)	<i>B. pseudomallei</i> (3)	<i>B. ceracia</i> (3)	<i>B. thailandensis</i> (3)
Меропенем	30	0	0	0	0
Цефтазидим	30	0	0	0	0
Доксициклин	4	0	1	2	3
Ко-тримоксазол	100	0	0	0	0
Амоксиклав	25	0	1	3	2
Азитромицин	25	0	3	3	3
Рифампицин	15	0	1	2	3

Примечания:  
1. К – концентрация химиопрепарата в тканях макроорганизма при введении его в средних терапевтических дозах, мкг/ мл;  
2. Цифровой материал таблицы - число штаммов, образующих биопленки;  
3. Штаммы: *B. mallei* 10230, В-120, Ц-5; *B. pseudomallei* VPA, С-141, 107; *B. ceracia* 25416, 3189, 8235; *B. thailandensis* 251, 264, 295.

У штаммов *B. pseudomallei* С-141 и VPA рифампицин, амоксиклав и доксициклин предотвращали формирование биопленок, в то время как у *B. pseudomallei* 107 образование биопленки сохранялось. Доксициклин и рифампицин ингибировали образование биопленки только у одного штамма *B. ceracia* 3189.

Все изученные культуры *B. thailandensis* сохраняли способность к образованию биопленки в присутствии доксицилина и рифампицина. Амоксиклав подавил биопленкообразование только у *B. thailandensis* 251.

Азитромицин не влиял на образование биопленок у изученных штаммов *B. ceracia*, *B. thailandensis* и *B. pseudomallei*.

Таким образом, проведенные исследования показали, что изученные антибактериальных препараты в концентрациях, которых они достигают в тканях макроорганизма при лечении терапевтическими дозами, препятствуют образованию биопленок сапными культурами. Против биопленок остальных видов буркхольдерий высоко активными были меропенем, цефтазидим и ко-тримоксазол.

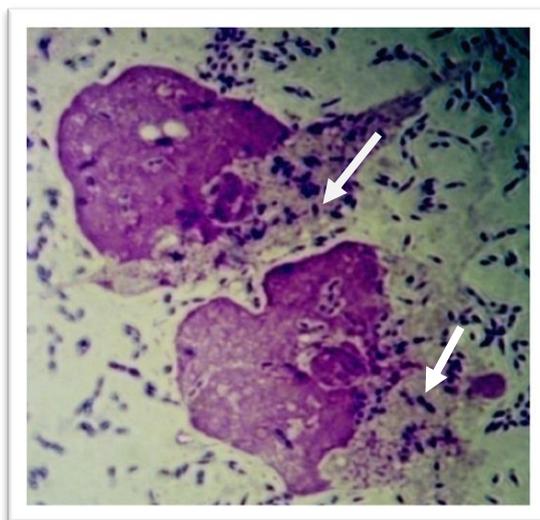
Полученные нами данные свидетельствуют о необходимости соблюдения рациональных методов и схем химиотерапии инфекций, вызванных буркхольдериями, так как своевременное начало лечения снижает вероятность формирования возбудителем биопленки и перехода болезни в хроническую форму, трудно поддающуюся лечению.

#### **4.2. Чувствительность к химиотерапевтическим средствам патогенных буркхольдерий, персистирующих в эукариотических клетках**

Возбудители сапа и мелиоидоза способны выживать внутри клеток макроорганизма, длительное время персистировать, размножаться и вновь распространяться после завершения курса химиотерапии, приводя к развитию хронических форм и рецидивов заболевания. При таком развитии инфекционного процесса необходимо применение препаратов, способных действовать на микроорганизмы, интернированные в клетки хозяина. Далеко не все из химиопрепаратов обладают хорошей способностью проникать в клетки организма, создавать в них достаточную концентрацию и сохранять свою биологическую активность.

Поэтому нами была изучена чувствительность буркхольдерий, интенированных в эукариотические клетки, к ряду химиотерапевтических средств, рекомендуемых для лечения сапа и мелиоидоза (меропенем, цефтазидим, доксициклин, ко-тримоксазол) [90, 233].

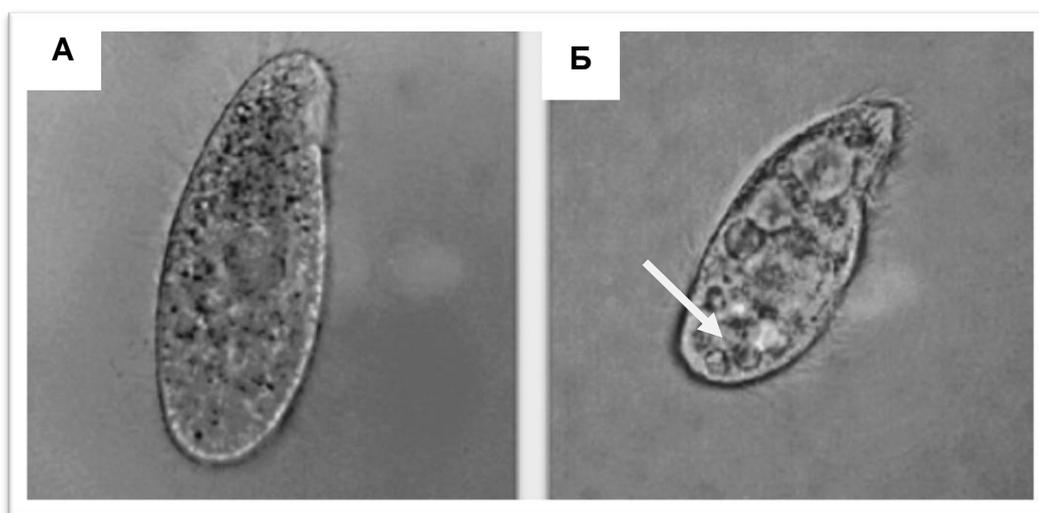
В качестве моделей для оценки чувствительности к химиопрепаратам внутриклеточно персистирующих буркхольдерий были выбраны перитонеальные мышинные макрофаги (рис. 10) и простейшие вида *T. pyriformis* (рис. 11), которые в настоящее время широко применяются при изучении биологических свойств бактерий (адгезивности, инвазивности, устойчивости к фагоцитозу и патогенности) [29, 80, 101, 232, 262].



**Рисунок 10.** Фагоцитоз *B. pseudomallei* 107 мышинными перитонеальными макрофагами на 2-е сутки культивирования, окраска по Романовскому-Гимзе, иммерсия, увеличение  $\times 1000$ . Стрелки – интернированные буркхольдерии.

На рисунке 10 показаны перитонеальные мышинные макрофаги, фагоцитирующие клетки *B. pseudomallei* 107. Цитоплазма фагоцитов вакуолизирована, в вакуолях видны бактериальные клетки интенсивно фиолетового цвета.

При соединении *T. pyriformis* с буркхольдериями через 5-10 минут после начала контакта в эндоплазме тетрахимены появляются пищеварительные вакуоли, заполненные бактериями, их количество быстро увеличивается.



**Рисунок 11. Световая микроскопия клеток тетрахимен после поглощения буркхольдерий: А - интактная клетка *T. pyriformis*; Б - вакуолизирующая клетка *T. pyriformis*, содержащая *B. pseudomallei* 57576; увеличение  $\times 400$ . Стрелки - пищеварительные вакуоли.**

#### **4.2.1. Чувствительность к химиопрепаратам буркхольдерий, персистирующих в перитонеальных мышечных макрофагах**

Изучали влияние некоторых химиотерапевтических препаратов (меропенем, доксициклина, цефтазидима, ко-тримоксазола) на патогенные буркхольдерии, персистирующие в перитонеальных мышечных макрофагах. Оценивали МБК препаратов отдельно для планктонных бактерий и бактерий, интернированных в макрофаги.

Следует отметить, что для многих химиопрепаратов цитоплазматическая мембрана клетки, в том числе и макрофагов, является значительным или абсолютным барьером.

Так, например,  $\beta$ -лактамы химиотерапевтические препараты обладают слабой способностью проникать в макрофагальные клетки [88, 182]. Кроме того, исследователями установлено, что меропенем, в отличие от других препаратов группы  $\beta$ -лактамов, не только легко проникает в макрофаги, но и накапливается в них, увеличивая скорость и интенсивность фагоцитоза макрофагами бактерий. Более того, меропенем отличается до-

вольно высокой устойчивостью к гидролизу различными типами  $\beta$ -лактамаз [123, 197, 265].

Наряду с этим, известно, что сульфаниламиды способны проникать через цитоплазматическую мембрану и связываться с органоидами клетки [160].

Проникающая способность химиопрепаратов тетрациклинового ряда в макрофаги оценивается большинством авторов как довольно высокая [29, 30, 182, 215].

Все это может определять различную эффективность антибактериальных препаратов при лечении сапа и мелиоидоза.

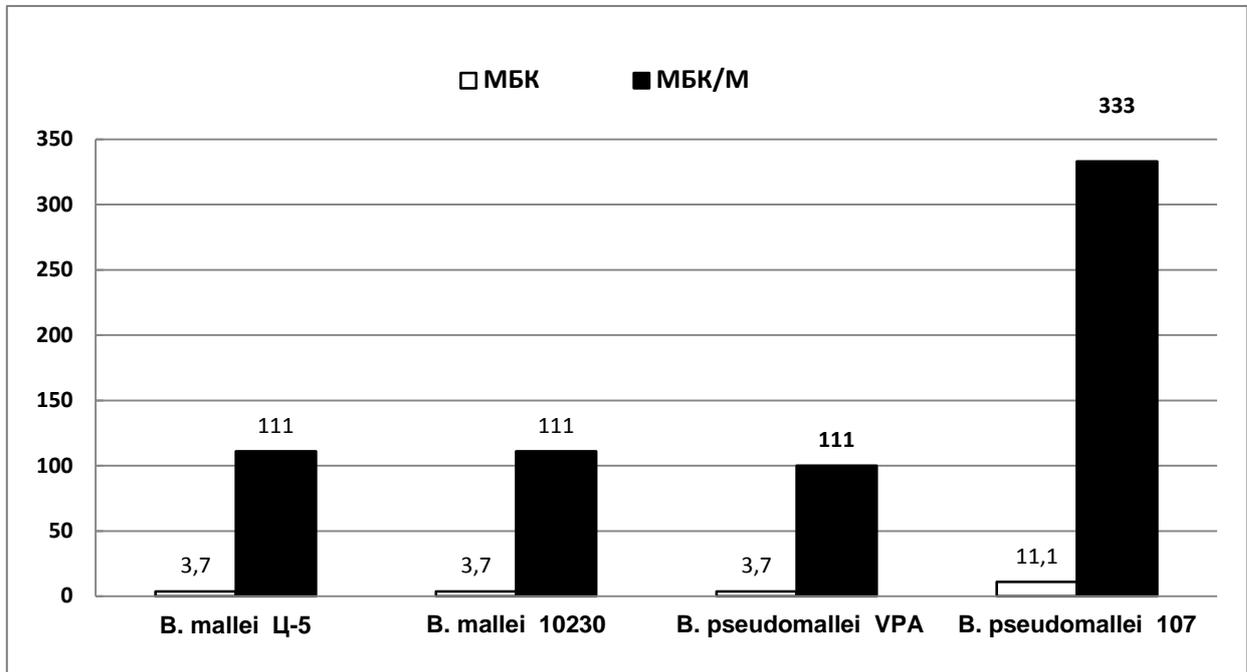
Проведенные нами исследования показали, что *B. mallei* и *B. pseudomallei*, интернированные в макрофаги, более резистентны к изученным химиопрепаратам по сравнению с их планктонными культурами, о чем свидетельствует значительное увеличение МБК для интернированных буркхольдерий (рис. 12-15).

Оценка резистентности буркхольдерий на модели «макрофаг - буркхольдерия» показала, что наиболее эффективным из препаратов является меропенем, активность которого особенно выражена в отношении возбудителя сапа.

Сопоставление МБК препаратов для планктонных культур возбудителя сапа с их минимальной бактерицидной концентрацией (МБК/М) для культур в макрофагах показывает, что МБК меропенема повышалась независимо от штамма в 30 и более раз. Следует отметить, что меропенем можно считать довольно эффективным в отношении сапных культур, так как показатели МБК/М для *B. mallei* Ц-5, 10230 находились в пределах концентраций, которых препарат достигает в тканях макроорганизма при лечении.

Как видно из данных, приведенных на рисунке 12, клетки *B. pseudomallei*, интернированные в макрофаги, более устойчивы к меропенему, чем

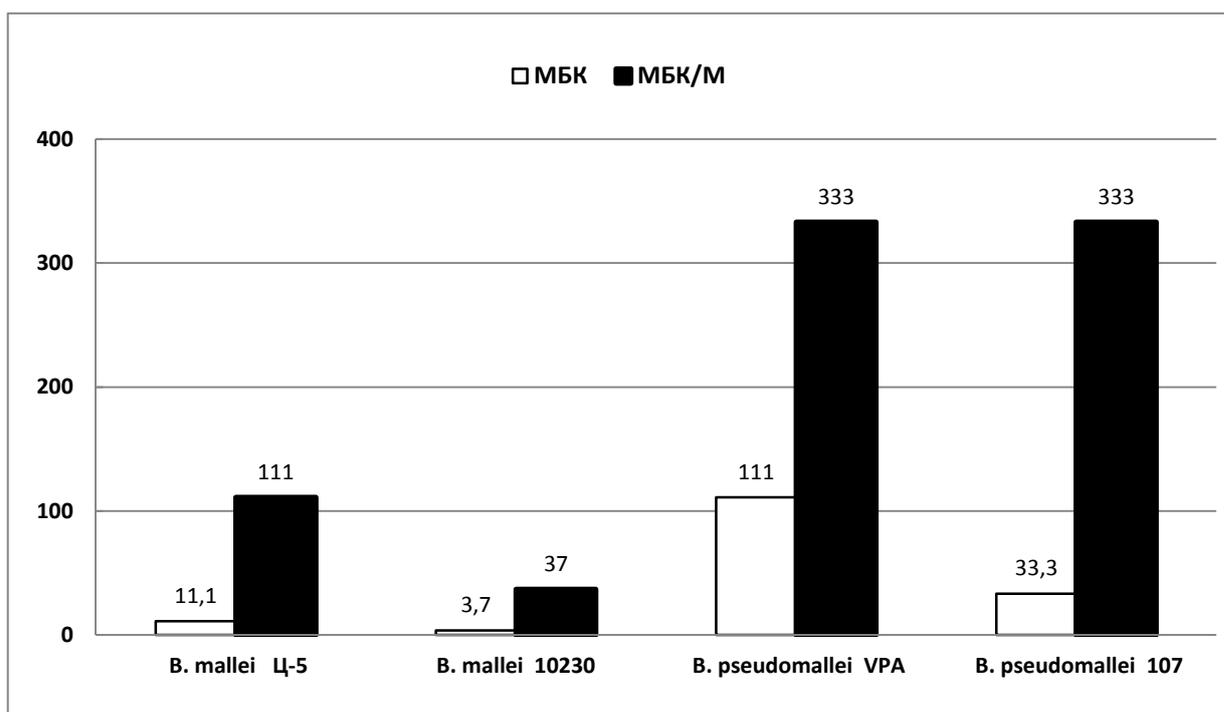
сапные, и для подавления роста требуются концентрации препарата более чем в 30 раз превышающие МБК для планктонных культур.



**Рисунок 12. Показатели чувствительности к меропенему буркхольдерий, интернированных в макрофаги**

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

В опытах с доксициклином также проявляется высокая устойчивость к препарату буркхольдерий, интернированных в макрофаги (рис. 13). Так, сапные и мелиоидозные клетки, персистирующие в макрофагах, повышали резистентность в 3-10 раз. По результатам МБК/М очевидно, что доксициклин подавляет рост и размножение персистирующих буркхольдерий, однако лишь в концентрациях, превышающих МДК препарата в 10 и более раз.

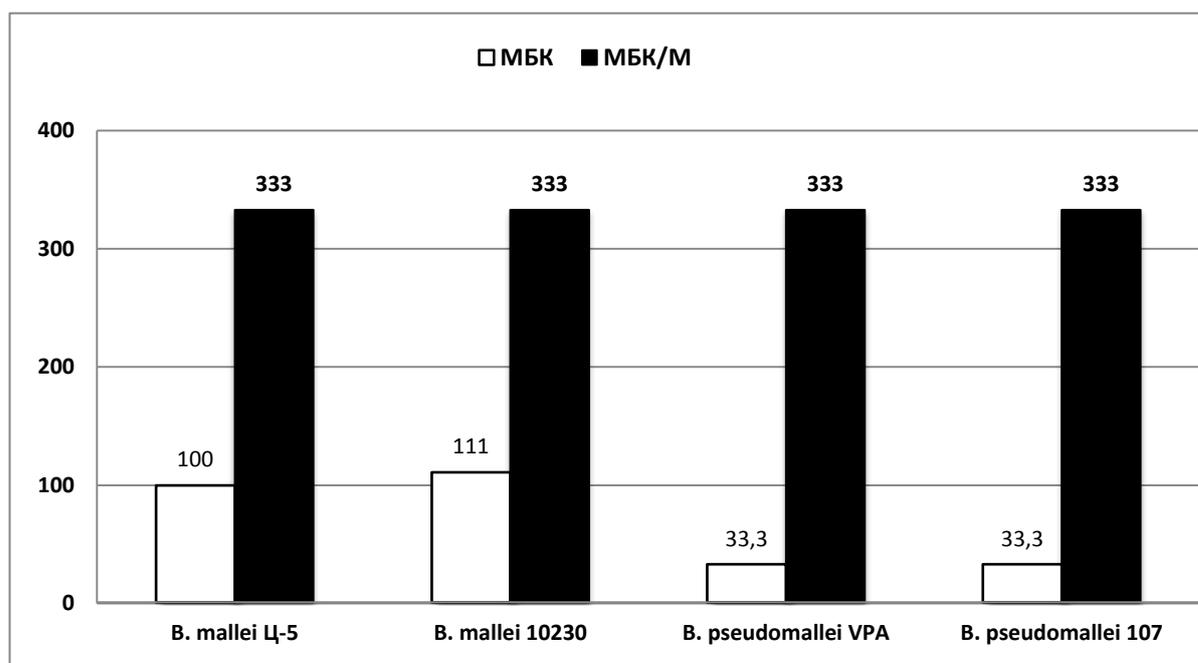


**Рисунок 13. Показатели чувствительности к доксициклину буркхольдерий, интернированных в макрофаги**

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

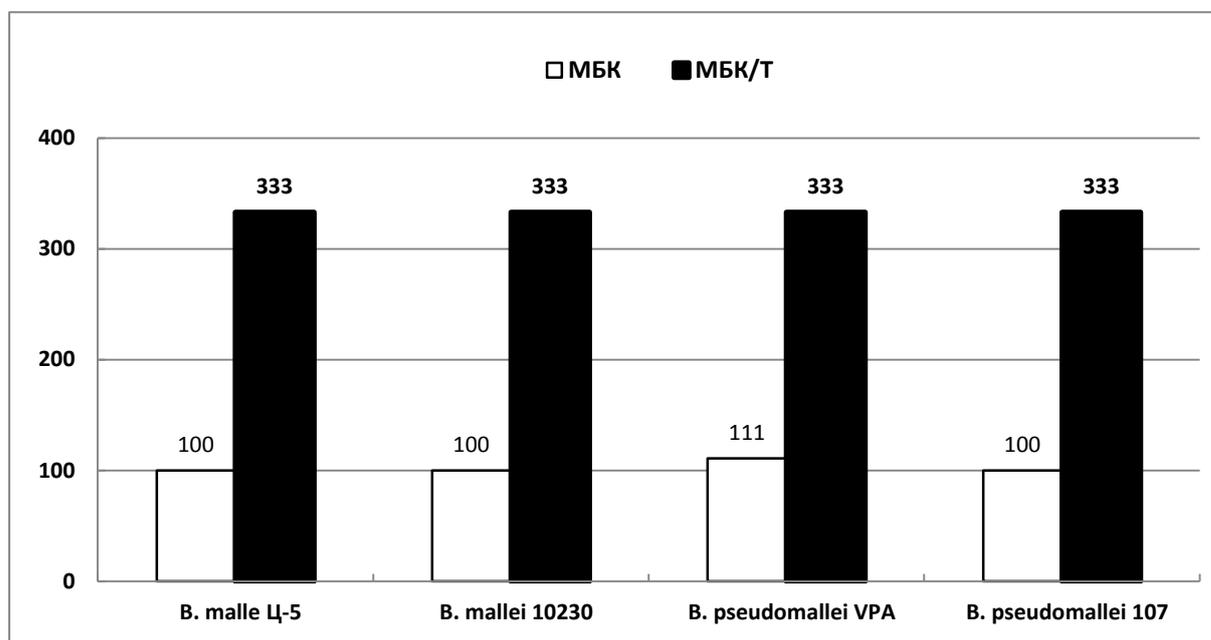
Внесение в опытные пробы цефтазидима и ко-тримоксазола вызывало гибель интернированных буркхольдерий обоих видов, в концентрациях, превосходящих МБК для планктонных культур более, чем в три раза. Минимальные бактерицидные концентрации исследуемых препаратов для буркхольдерий, интернированных в макрофаги, превышали 333 мкг /мл, независимо от штамма и вида буркхольдерий (рис. 14-15).

Как следует из результатов наших исследований, меропенем вызывает гибель бактерий в макрофагах, доксициклин и цефтазидим 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.



**Рисунок 14. Показатели чувствительности к цефтазидиму буркхольдерий, интернированных в макрофаги**

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



**Рисунок 15. Показатели чувствительности к ко-тримоксазолу буркхольдерий, интернированных в макрофаги**

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

Эти данные подтверждают мнение исследователей о том, что карбапенемы легче проникают и накапливаются в макрофагах, обеспечивая санацию эукариотических клеток, предотвращая размножение и распространение возбудителей в тканях макроорганизма [29, 30, 123, 197, 265].

В то же время, можно предположить, что доксициклин и цефтазидим или накапливаются в макрофагах в низких концентрациях, или инактивируется в них, вследствие этого не оказывают должного бактерицидного действия на персистирующие буркхольдерии.

Более того, этим можно объяснить наличие определенной активности химиопрепаратов при прямом их воздействии на возбудители сапа и мелиоидоза в экспериментах *in vitro* и отсутствие терапевтического эффекта при лечении экспериментальных инфекций *in vivo*.

Что касается ко-тримоксазола, то он считается довольно эффективным химиопрепаратом при лечении данных инфекций. Однако в наших исследованиях он обладал довольно низкой активностью, вероятно, в связи с присутствием в среде для культивирования макрофагов ПАБК, которая могла снижать активность препарата.

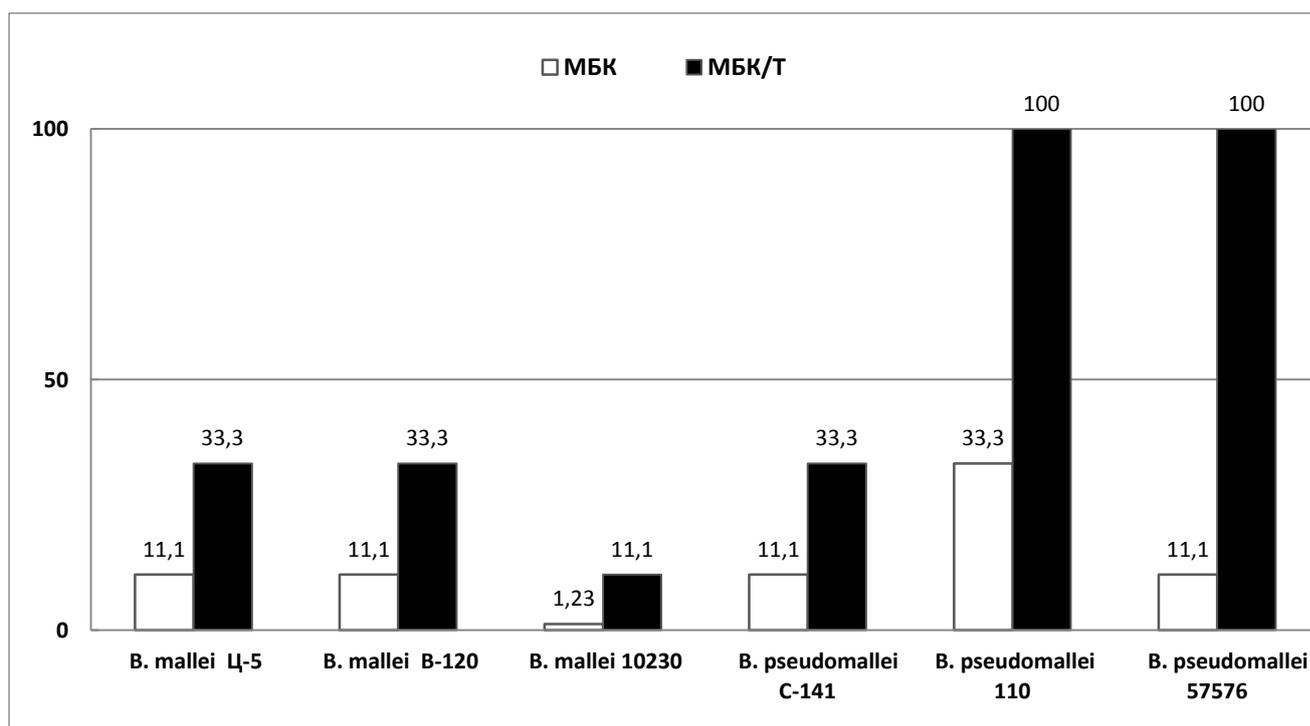
#### **4.2.2. Чувствительность к химиопрепаратам буркхольдерий, персистирующих в клетках простейших**

В опытах с простейшими на модели «тетрахимена - буркхольдерия» установлено, что в сокультурах рост микроорганизмов подавляется концентрациями химиотерапевтических препаратов, в десятки раз превышающими исходные МПК для планктонных взвесей. При высеве осажденных центрифугированием и разрушенных клеток *T. pyriformis* на Мюллера-Хинтон агаре через 24 ч появляется рост колоний изучаемых штаммов. Таким образом, буркхольдерии сохраняют свою жизнеспособность в интернированном состоянии в эукариотических клетках, находившихся в

среде, содержащей антибиотика в бактерицидной концентрации для внеклеточных бактерий *B. mallei* и *B. pseudomallei*.

Очевидно, что буркхольдерии в сокультуре с простейшими более резистентны ко всем изученным химиопрепаратам по сравнению с планктонными культурами, о чем свидетельствует значительное увеличение МБК/Т.

Так, показатели МБК/Т бактерий обоих видов, ассоциированных с тетрахименами, повышались в 3-10 раз, по сравнению с МБК планктонных бактерий тех же штаммов. Оценка резистентности буркхольдерий, защищенных клетками тетрахимен, позволяет считать наиболее высоко активным препаратом меропенем (МБК/Т 11,1-100 мкг/мл), так как его бактерицидные концентрации были сопоставимы с концентрацией данного химиопрепарата в тканях макроорганизма при введении средних терапевтических доз (рис. 16).

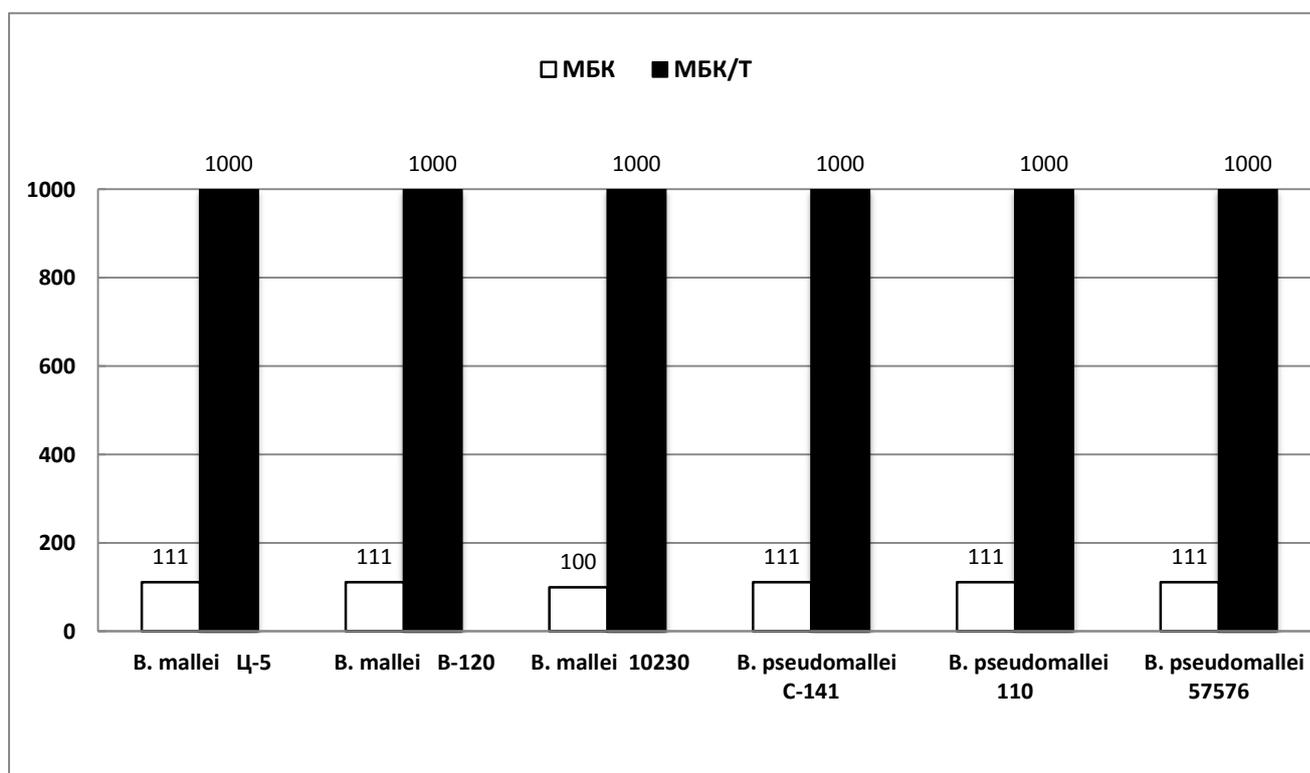


**Рисунок 16. Показатели чувствительности к меропенему буркхольдерий, интернированных в тетрахимены**

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

Изученные штаммы *B. mallei* Ц-5, B-120 и 10230, ассоциированные с тетрахименами, повышали свою резистентность к меропенему в 3, 3 и 9 раз соответственно (рис. 16). Наибольшее повышение устойчивости в интернированном состоянии (в 9 раз) к меропенему продемонстрировал штамм *B. mallei* 10230 в то время, как планктонная популяция данного штамма была наиболее чувствительна к данному препарату. Также было установлено, что штаммы *B. pseudomallei* C-141, 110, 57576, персистирующие в тетрахименах, повышали свою резистентность к меропенему в 3-9 раз (рис. 16).

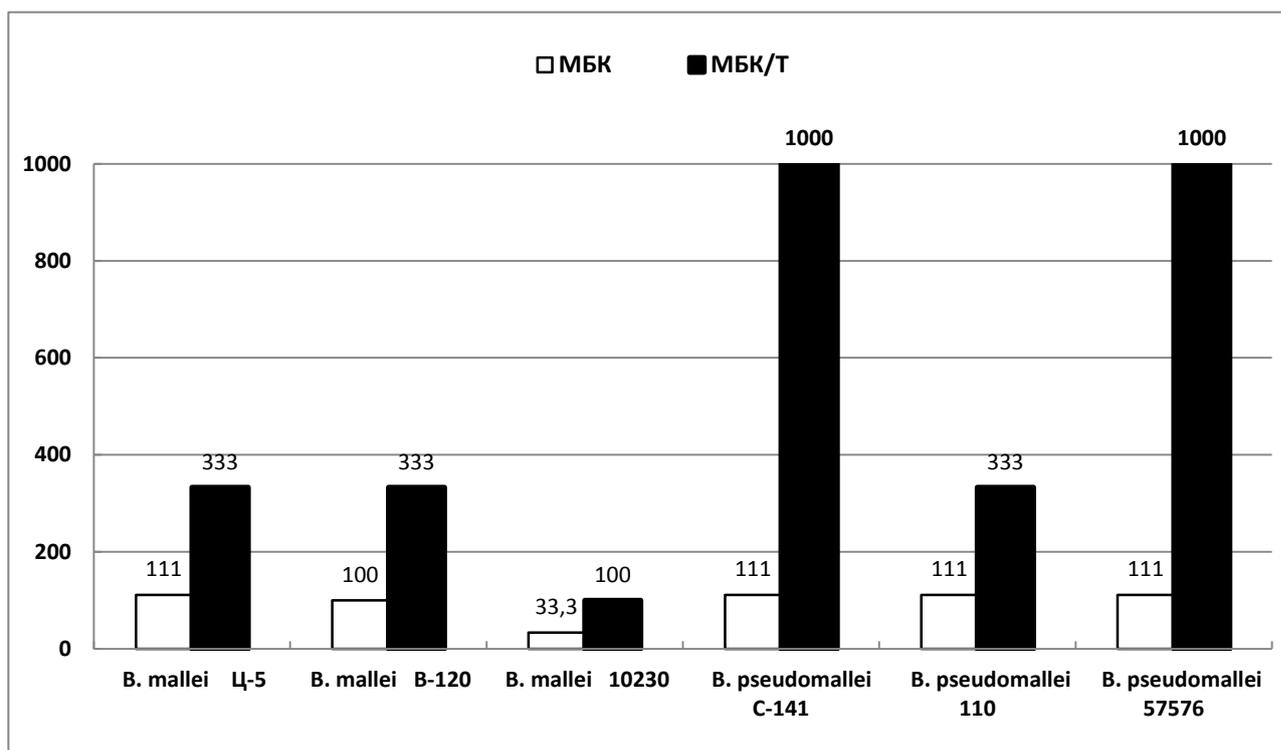
Максимальное увеличение показателей устойчивости сокультур, вне зависимости от вида и штамма, было отмечено к цефтазидиму (МБК/Т $\geq$ 1000 мкг/мл), (рис. 17).



**Рисунок 17. Показатели чувствительности к цефтазидиму буркхольдерий, интернированных в тетрахимены**

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

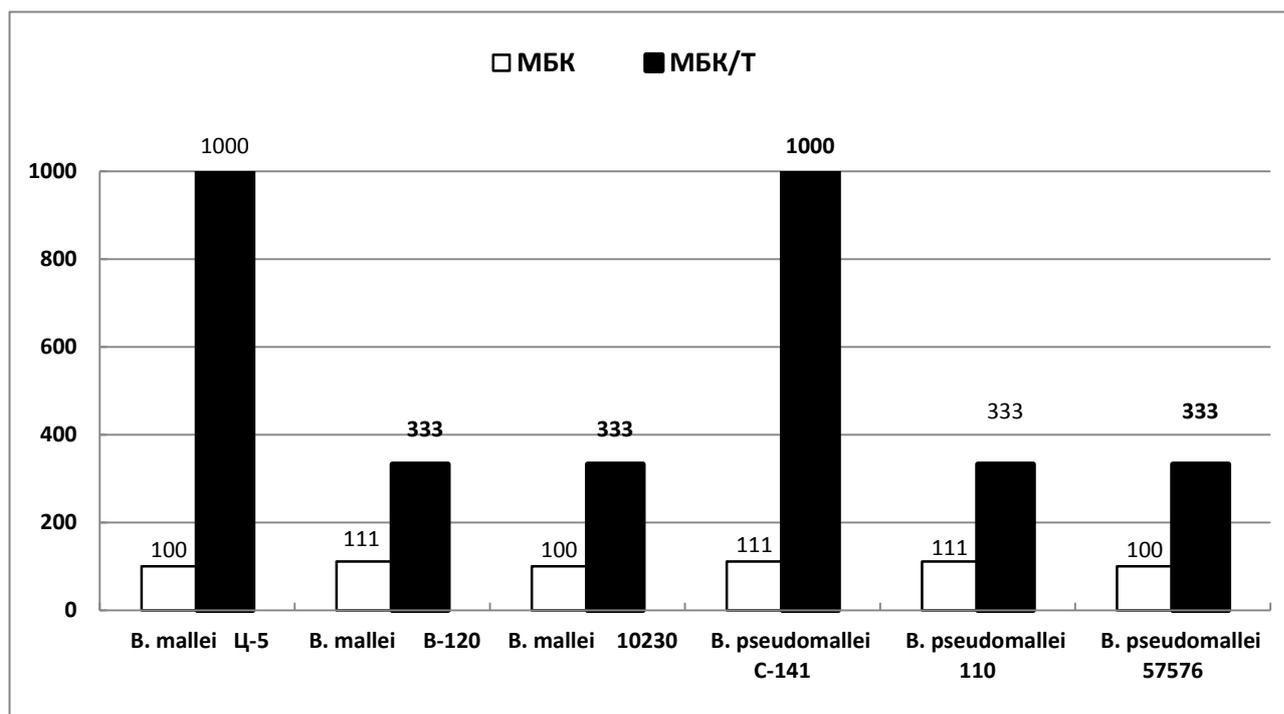
Выявлено также, что доксициклин не обладает достаточно высокой активностью в отношении бактерий сапа и мелиоидоза, интернированных в тетрахимены, так как величины МБК/Т для доксициклина превышали концентрации препарата в тканях макроорганизма при введении его в средних терапевтических дозах (рис. 18).



**Рисунок 18. Чувствительность к доксициклину буркхольдерий, интернированных в тетрахимены**

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

Из диаграмм, представленных на рисунке 19, видно, что котримоксазол также показал низкую активность в отношении всех изученных штаммов возбудителей сапа и мелиоидоза, интернированных в тетрахимены.



**Рисунок 19. Чувствительность к ко-тримоксазолу буркхольдерий, интернированных в тетрахимены**

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

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. Следует отметить, что только меропенем обладает достаточно высокой активностью в отношении всех изученных штаммов сапа и мелиоидоза, интернированных в простейшие и макрофаги, так как, величины МБК/Т и МБК/М для меропенема не превышают концентрации препарата в тканях макроорганизма при введении его в средних терапевтических дозах.

## ГЛАВА 5. ТЕРАПЕВТИЧЕСКАЯ ЭФФЕКТИВНОСТЬ ХИМИОПРЕПАРАТОВ ПРИ ЛЕЧЕНИИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО САПА И МЕЛИОИДОЗА

### ***Сравнение активности химиотерапевтических препаратов различных классов, используемых для лечения сапа и мелиоидоза***

В основе создания схем профилактики и лечения сапа и мелиоидоза у человека лежит оценка терапевтической эффективности того или иного антибактериального препарата при экспериментальной сапой и мелиоидозной инфекции у лабораторных животных. Успех этиотропного лечения зависит от чувствительности возбудителей *B. mallei* и *B. pseudomallei* к химиотерапевтическим средствам. Антибиотикочувствительность буркхольдерий изучают в опытах *in vitro* (определение МПК и МБК) и *in vivo* (оценка терапевтического действия химиопрепарата на зараженных животных).

Для проведения химиотерапии экспериментального сапа и мелиоидоза были выбраны штаммы буркхольдерий *B. mallei* 10230, *B. pseudomallei* С-141с показателями антибиотикочувствительности, соответствующими средним значениям МПК для каждого изучаемого вида.

Кроме того, мы основывались на полученных в настоящей работе результатах определения чувствительности патогенных буркхольдерий к химиотерапевтическим препаратам с учетом факторов, влияющих на взаимодействие антибиотика с микроорганизмом *in vivo*, а именно, культивировании в среде с добавлением крови лабораторных животных в атмосфере содержащей 5 % CO<sub>2</sub>, а также при различных диапазонах рН и температуры.

Перед проведением лечения инфекций были определены ЛД<sub>50</sub> штаммов для двух видов экспериментальных животных (золотистых хомячков и белых крыс). Так как наибольшей чувствительностью к патогенным буркхольдериям обладают золотистые хомячки [8, 54, 99], культуры

всех изученных видов буркхольдерий были проверены на вирулентность на этом виде животных.

Для типовых штаммов ЛД<sub>50</sub> составили: *B. mallei* 10230 -  $1,4 \times 10^1$  м.к., *B. pseudomallei* С-141 -  $0,8 \times 10^1$  м.к., *B. cepacia* 25416 -  $>5 \times 10^8$  м.к., *B. thailandensis* 264 -  $2 \times 10^6$  м.к. При заражении белых крыс была установлена их резистентность к инфицированию *B. mallei*, *B. cepacia* и *B. thailandensis*, и среди животных, получавших максимальную дозу  $10^9$  м.к., гибели не наблюдалось. Вирулентность культур *B. pseudomallei* для белых крыс варьирует и в широких пределах, также как и форма заболевания - от локальных абсцессов до септической инфекции. Максимальную вирулентность для этого вида животных проявляет штамм *B. pseudomallei* 100, ЛД<sub>50</sub> которого составляла  $0,8 \times 10^3$  м.к.

Для инфицирования экспериментальных животных была выбрана равноэффективная доза, соответствующая  $10^3$  ЛД<sub>50</sub>. Химиотерапию начинали через сутки после заражения и продолжали 10 дней. Терапевтические дозы антибактериальных препаратов, в связи с более интенсивным уровнем обмена и высоким коэффициентом соотношения площади поверхности к массе тела у экспериментальных животных по сравнению с человеком, были немного выше предлагаемых для лечения людей [33, 54, 90].

В результате проведенных исследований установлено, что из отобранных препаратов для терапии высокочувствительных к мелиоидозной и сапной инфекции золотистых хомячков наиболее эффективным оказался ко-тримоксазол в суточной дозе 100 мг/кг (табл. 14). Эффективность заключалась в достоверном снижении уровня летальности хомячков при заражении *B. mallei* 10230 (выжило 80 % леченных животных) и значительном увеличении продолжительности жизни павших животных, как при сапе, так и при мелиоидозе.

Активными препаратами при лечении сапной инфекции у золотистых хомячков оказались также ципрофлоксацин в суточной дозе 50 мг/кг (вы-

жило 60 % леченых животных) и доксициклин в суточной дозе 50 мг/кг (выжило 50 % леченых животных). В то же время указанные препараты оказались не эффективными при лечении экспериментального мелиоидоза (летальность животных составляла 80-100 %), хотя продолжительность жизни в опытной группе животных по сравнению с контрольной достоверно увеличивалась.

**Таблица 14 - Терапевтическая эффективность антибактериальных препаратов при лечении экспериментального сапа и мелиоидоза у золотистых хомячков**

Препараты	Штамм	Доза, мг/ кг/ сут	Л	Т, сут
Цефтазидим	<i>B. mallei</i> 10230 (10 <sup>4</sup> м.к.)	120	10/10	7,5
Меропенем		50	10/10	6,5
Ципрофлоксацин		50	4/10*	14,2*
Доксициклин		50	5/10*	16,5*
Рифампицин		50	10/10	15,5*
Хлорамфеникол		80	10/10	6,2
Ко-тримоксазол		100	2/10*	8,5
Контроль		-	10/10	5,2
Цефтазидим	<i>B. pseudomallei</i> С-141 (10 <sup>4</sup> м.к.)	120	10/10	7,0
Меропенем		50	10/10	6,2
Ципрофлоксацин		50	8/10	15,5*
Доксициклин		50	10/10	18*
Рифампицин		50	10/10	5
Хлорамфеникол		80	10/10	5
Ко-тримоксазол		100	7/10	30*
Контроль		-	10/10	4,0
Примечания:				
1. Л – летальность среди зараженных животных, где числитель – количество павших, знаменатель – общее число зараженных;				
2. Т – средняя продолжительность жизни павших животных в сутках;				
3. * - достоверность различия показателя с контролем превышает 95 % (p < 0,05).				

Представляло интерес также изучение терапевтической активности этих препаратов в опытах на белых крысах, инфицированных возбудителем мелиоидоза. Все указанные в таблице 14 препараты, за исключением хлорамфеникола, при 100 % летальности в контрольной группе обеспечивали 50-100 % выживаемость экспериментальных животных после 10-дневного лечения.

Следует отметить, что эффективность терапии сапа и мелиоидоза коррелировала не только с уровнем МПК препаратов, но и характером течения инфекции. При заражении равноэффективной дозой  $10^3$  ЛД<sub>50</sub> скорость течения инфекционного процесса, в зависимости от вида животных, распределялась следующим образом: мелиоидоз у золотистых хомячков, сап у золотистых хомячков, мелиоидоз у белых крыс. Терапевтическая эффективность антибактериальных препаратов соответствовала той же тенденции.

Кроме того, ранее нами было установлено, что резистентность буркхольдерий к изученным химиотерапевтическим препаратам достоверно повышается при определении чувствительности к ним в модифицированных условиях, близких к среде макроорганизма (культивировании в питательной среде с добавлением крови лабораторных животных и в атмосфере содержащей 5 % CO<sub>2</sub>). Особенно отчетливо это было видно в опытах с кровью золотистых хомячков, когда наблюдалось значительное снижение чувствительности буркхольдерий именно к тем антибактериальным препаратам, которые не проявляли эффективности при лечении сапа и мелиоидоза у золотистых хомячков.

В то же время активность ко-тримоксазола *in vitro* в измененных условиях достоверно повышалась и коррелировала с его терапевтической эффективностью в опытах *in vivo*.

Вместе с тем, нами было показано значительное изменение чувствительности буркхольдерий к химиотерапевтическим средствам в зависимости от температуры и показателей pH окружающей среды.

Таким образом, сопоставляя данные по терапевтической эффективности препаратов при экспериментальной сапной и мелиоидозной инфекции у животных с данными по антибиотикочувствительности буркхольдерий в условиях, аналогичных среде макроорганизма, можно заключить, что недостаточная эффективность препаратов при лечении этих инфекций может быть связана с влиянием физико-химических факторов внутренней среды макроорганизма.

**Экстренная профилактика и лечение инфицированных сапом золотистых хомячков клатратными и липосомальными формами антибактериальных препаратов**

Антибактериальная терапия острых форм сапа у экспериментальных животных в большинстве случаев приводит лишь к увеличению продолжительности жизни павших животных, а среди выживших после лечения наблюдается высокая частота рецидивов заболевания.

Наиболее активными антибактериальными препаратами *in vitro* в отношении культур *B. mallei* считаются цефтазидим, доксициклин, котримоксазол и меропенем [24, 39, 64, 228, 277]. Сравнение показателей МПК и МБК высокоактивных *in vitro* препаратов с их концентрациями в плазме крови человека, достигаемыми при назначении средних терапевтических доз (МДК), 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 мышечные 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 заболевания 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.

Экспериментальный сап моделировали на золотистых хомячках массой 90-110 г, заражая животных подкожно в область правой паховой складки культурой *B. mallei* Ц-5 в дозе  $10^4$ . Лечение начинали через 4 (экстренная профилактика), 24 ч, 48 ч после заражения и проводили в течение 15 сут. Препараты вводили один раз в сутки перорально в виде суспензии в подсолнечном масле, парентерально в 0,9 % растворе NaCl, в виде клатратов и в составе липосом. У нелеченых золотистых хомячков, высокочувствительных к сапу, заболевание протекало в острой форме и заканчивалось летально в течение 3-7 сут.

Для повышения эффективности экстренной профилактики и терапии острых форм сапа с использованием меропенема было проведено лечение инфицированных *B. mallei* золотистых хомячков химиопрепаратами в клатратной и липосомальной формах. Внутривентральное введение меропенема экспериментальным животным именно в липосомальной форме, с одной стороны, заменяло многократную внутривенную капельную инфузию антибактериального препарата, с другой - обеспечивало длительное поступление активного компонента в лимфоток с последующим выходом в кровеносную систему.

Наряду с этим, доказано, что включение препарата в состав липосом увеличивает его биодоступность за счет направленного транспорта химиотерапевтических средств внутрь клеток (например, макрофагов), где локализируются возбудители инфекции [49, 50, 186, 187].

Острая форма сапа у золотистых хомячков характеризовалась следующими признаками. Через 4 ч после заражения температура тела у животных была в пределах физиологической нормы 37,6-38,2 °С. Поведение, аппетит, состояние внешних покровов не отличались от таковых у контрольных животных. При вскрытии умерщвленных хлороформом животных культура возбудителя сапа выделялась только из места введения инфекта и регионарного лимфатического узла. Высевы из крови, легких и паренхиматозных органов были отрицательными.

Через сутки после инфицирования у животных, не подвергавшихся лечению, наблюдалось повышение температуры до 39,0 °С, снижение двигательной активности и аппетита. Шерсть становилась липкой, грязной, взъерошенной. Следует отметить, что за 15-20 ч до гибели температура тела у золотистых хомячков снижалась ниже нормы, опускаясь в агональном состоянии до 35,0 °С. Гибель животных в контрольной группе регистрировалась в среднем через 4,5 дня после инфицирования и составляла 100 %. При вскрытии у павших животных были обнаружены многочисленные абсцессы в паренхиматозных органах (селезенка, печень, легкие), из крови и мочи выделялась культура сапа.

В результате проведенных исследований установлено (табл. 15), что лечение животных перорально эмульсией в подсолнечном масле и инъекционными препаратами, эффективными по данным МПК *in vitro*, приводило лишь к удлинению продолжительности жизни павших животных. При этом отмечается два пика падежа золотистых хомячков: 1-й – в ходе лечения на 5-6 сутки, и второй - через 6-7 дней после прекращения терапии. Второй пик объясняется реинфицированием, возникающим в результате выхода персистентных форм бактерий *B. mallei* из эукариотических клеток.

**Таблица 15 - 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;
4. начало лечения через 4, 24 и 48 ч после заражения животных;
5. \*- достоверность уровня защиты по сравнению с контролем превышает 95 %;
6. материалы каждой строки таблицы получены в опыте на группе из 10 золотистых хомячков.

Эффективность химиотерапии экспериментального сапа значительно повышалась при введении антибактериальных препаратов в клатратной форме (комплексное соединение с высокомолекулярным декстраном) и особенно в липосомальной форме. Так, лечение доксициклином в клатратной форме обеспечивало 80 % - ную выживаемость животных, в то

время как, введение его в виде эмульсии защищало только 50 % золотистых хомячков. Клатратные и липосомальные формы гарантировали не только длительное поддержание высокой концентрации препаратов в плазме крови, но и проникновение их в лимфатическую систему, а, как известно, в патогенезе сапа лимфангоиты и лимфадениты играют существенную роль [24, 173, 277].

Наибольшая эффективность при экстренной профилактике и лечении острых форм сапа у золотистых хомячков была достигнута при использовании липосомальной формы меропенема (60-100 % выживших животных). Следует отметить, что длительность введения препарата должна быть не менее двух недель, так как терапия менее десяти дней даже при использовании липосомальных форм химиопрепаратов в режиме экстренной профилактики не обеспечивает 100 % защиту. К моменту завершения лечения все животные были живы (100 %), однако через 6-11 дней последующего наблюдения 4 хомячка погибли (40 %) с характерными морфологическими проявлениями, типичными для сапной инфекции, и выделением культуры из крови, легких и абсцессов в паренхиматозных органах.

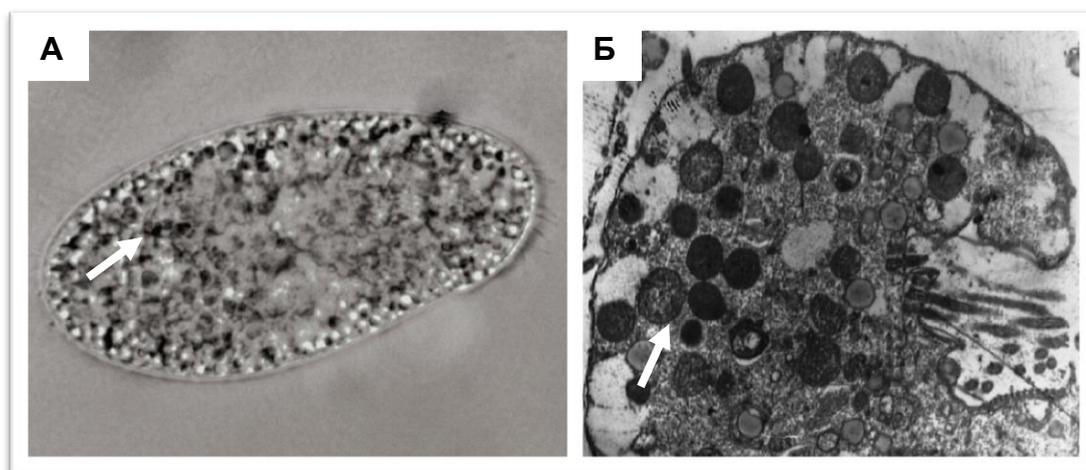
В проведенных нами исследованиях увеличение сроков введения липосомального меропенема до 15 дней обеспечивало 100 % выживаемость животных и санацию организма от патогена даже при начале терапии через двое суток после инфицирования. Следует отметить высокую saniрующую активность липосомального меропенема, поскольку выделить культуру возбудителя сапа от умерщвленных на 22 сутки после заражения животных не удалось. Из этого следует, что липосомальная форма меропенема является высокоэффективным средством лечения, обеспечивающим 60-100 % выживаемость и санацию организма от сапного микроба даже при начале лечения через 48 ч после заражения.

Таким образом, установлено, что пероральное и инъекционное введение высоко активных *in vitro* антибактериальных препаратов не оказывает защитного действия при экспериментальной сапной инфекции, но не-

сколько удлиняет жизнь павших животных и не избавляет выживших хомячков от рецидивов заболевания. В то же время клатратные и, в особенности, липосомальные формы химиопрепаратов обеспечивают эффективную защиту животных от острых форм сапа.

Важно, что использование липосомальных форм меропенема обеспечивает не только выживание животных при острой форме сапа, но и санацию организма от интернированных в эукариотические клетки возбудителя, снижая вероятность возникновения рецидивов инфекции.

В опытах на модели «тетрахимена - буркхольдерия» было показано, что уже через 2-3 ч совместного культивирования взвеси *B. mallei* Ц-5 и липосом с меропенемом в бульоне с *T. pyriformis* наблюдается скопление липосом и бактерий в вакуолях простейших (рис. 20), что обеспечивает длительное воздействие на микроорганизмы химиопрепаратов, выделяющихся из липосом.



**Рисунок 20. Микроскопия *T. pyriformis*, содержащих клетки *B. mallei* Ц-5 и липосомы с меропенемом: А - Световая микроскопия, увеличение x 400; Б - Ультратонкий срез фрагмента клетки *T. pyriformis*, увеличение x 3,000. Стрелками указаны вакуоли, заполненные липосомами и буркхольдериями**

Повышенная активность липосомальных форм антибактериальных препаратов отмечена исследователями в отношении ряда других микроорганизмов [71, 174].

Более того, выявлена, корреляция между активностью антибактериальных препаратов в опытах *in vivo* при лечении экспериментального сапа у животных и на клеточных моделях «макрофаг - буркхольдерия», «тетрахимена - буркхольдерия». Следует отметить, что при определении МПК (МБК) выявляется непосредственное воздействие химиотерапевтических препаратов на бактериальную клетку, в то время, как на изученных моделях «макрофаг - буркхольдерия», «тетрахимена - буркхольдерия», демонстрируется их внутриклеточная активность, что в большей степени моделирует условия экспериментов *in vivo*. Это могло бы послужить основанием для применения клеточных моделей, с целью предварительной оценки активности химиопрепаратов *in vitro* и отбора наиболее эффективных из них для терапии сапа и мелиоидоза.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В настоящее время, несмотря на наличие широкого спектра антибактериальных препаратов, лечение сапа и мелиоидоза вызывает значительные сложности из-за устойчивости *B. mallei* и *B. pseudomallei* к большинству химиотерапевтических средств. Внутриклеточная локализация возбудителя, образование биопленок, высокая вирулентность, вариабельность биологических свойств, часто приводящая к формированию антибиотикорезистентности, послужили поводом для более углубленного изучения вопросов лечения [7, 229, 238].

Недостаточную эффективность антибактериальных препаратов, имеющих в условиях *in vitro* низкие значения МПК с бактериальными взвешивками *B. mallei* и *B. pseudomallei*, при лечении сапной и мелиоидозной инфекции можно объяснить, в определенной мере, способностью возбудителей к внутриклеточной персистенции и формированию биопленок. Более того, физико-химические факторы внутренней среды макроорганизма могут существенно изменять чувствительность буркхольдерий к некоторым группам химиотерапевтических средств. На основании изложенного, мы в своей работе изучили влияние ряда факторов на чувствительность патогенных буркхольдерий к антибактериальным препаратам.

В ходе исследования оценили антибиотикочувствительность четырех видов буркхольдерий (*B. mallei*, *B. pseudomallei*, *B. cepacia* и *B. thailandensis*) стандартными и ускоренным методами. Метод серийных разведений является точным, количественным, но очень трудоемким. Диффузионный метод более прост в выполнении, но является лишь качественным. Кроме того, применяли метод с использованием градиентных полосок (Е-тест), сочетающий и количественные, и качественные характеристики чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препа-

ратам. Нами был использован при определении антибиотикочувствительности буркхольдерий, наряду со стандартными, этот метод, который позволяет ускорить получение результатов, является менее трудоемким, и простым в интерпретации. Значения МПК, полученные Е-тестом и методом серийных разведений, являются сопоставимыми. Время получения результатов при использовании всех вышеперечисленных стандартизованных способов составляет в среднем 24 ч.

Рядом авторов показано, что эффективность антибактериальной терапии тяжелых инфекционных заболеваний повышается при раннем назначении этиотропного лечения, которое можно обеспечить использованием методов ускоренного определения чувствительности возбудителей к химиотерапевтическим препаратам [18, 72, 74, 118].

Для укорочения времени получения и интерпретации результатов по антибиотикочувствительности в нашей лаборатории ранее был разработан метод ускоренного определения чувствительности буркхольдерий к химиопрепаратам. Метод основан на использовании плотной глюкозотриптонной среды с индикатором бром-тимоловым синим. Буркхольдерии при расщеплении глюкозы в среде культивирования вызывают сдвиг рН в кислую сторону, и этот процесс можно контролировать за счет изменения цвета индикатора [23, 45].

Установлено, что при выращивании буркхольдерий в течение 4-6 ч среда закисляется, что выражается в пожелтении агара в месте посева бактериальной взвеси, когда визуально рост культур еще не определяется. В случае дальнейшего размножения бактерий зона роста культур желтеет, а цвет среды вокруг дисков с химиопрепаратами с видимой зоной подавления роста остается с неизменным зеленым цветом. Показано, что размер зон подавления роста буркхольдерий на стандартных средах и на среде с индикатором отличаются незначительно. В то же время получение результатов на среде с индикатором существенно ускоряется по сравнению со стандартной средой (4-6 ч и 24-48 ч соответственно) [23, 45].

Выбор метода для определения чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препаратам зависит от конкретных условий. Было показано, что метод с использованием Е-тестов удобен и прост. Он незаменим при большом объеме исследований. При необходимости получить быстрый результат прибегают к ускоренным методам. Однако наиболее точным является метод серийных разведений.

В результате проведенного анализа антибиотикочувствительности установлено, что буркхольдерии всех четырех видов (*B. mallei*, *B. pseudomallei*, *B. ceracia*, *B. thailandensis*) проявляют высокую чувствительность к химиопрепаратам следующих групп: карбапенемам, фторхинолонам, некоторым комбинированным сульфаниламидам и  $\beta$ -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 [52, 64, 90, 175]. При сравнении видовой чувствительности буркхольдерий к химиотерапевтическим средствам можно заключить, что наибольшей резистентностью обладают штаммы сапрофитических видов (*B. ceracia*, *B. thailandensis*, *B. pseudomallei*), а максимальная чувствительность проявляется у штаммов патогена завершенного типа *B. mallei*.

Интересным является изучение характера изменчивости вирулентности и антибиотикочувствительности культур буркхольдерий, выделяемых в ходе инфекционного процесса *in vivo* и в период поддержания и идентификации культур в лабораторных условиях *in vitro*. Для моделирования динамики приспособляемости бактерий *in vivo* и *in vitro* было проведено длительное пассирование штаммов буркхольдерий через организм животных и многократные пересевы на питательных средах. Затем была изучена вариабельность вирулентности и чувствительности к химиотерапевтическим препаратам культур, выделенных в процессе пассирования на лабораторных животных и при пересевах на ТСА.

Как известно, характер соотношения вирулентности и антибиотико-резистентности у патогенных микроорганизмов варьирует, однако чаще всего повышение вирулентности культур сопровождается снижением устойчивости к химиотерапевтическим препаратам [202, 261, 271].

В наших исследованиях длительное пассирование через организм животных также приводит не только к повышению вирулентности культур, но и, как правило, к достоверному снижению устойчивости патогенных буркхольдерий к изученным химиотерапевтическим препаратам. Так, исходные, непассированные штаммы *B. pseudomallei* и *B. mallei* были резистентны к цефтазидиму, но чувствительны к ломефлоксацину, имипенему, доксициклину, ко-тримоксазолу и рифампицину. Чувствительность к препаратам пассированных на белых мышях штаммов *B. pseudomallei* и *B. mallei* достоверно повысилась по сравнению с исходными контрольными штаммами, о чем свидетельствует увеличение диаметров зон задержки роста вокруг дисков с химиотерапевтическими препаратами.

Есть предположение, что одной из причин этого явления может быть интенсивное размножение штаммов с повышенной вирулентностью, сопровождающееся укорочением lag-фазы и сокращением времени генерации [10, 261, 271]. А поскольку известно, что замедление фаз роста микробной популяции, в свою очередь, существенно повышает резистентность к химиотерапевтическим препаратам, то очевидно, что при резком снижении содержания кислорода в среде, до анаэробных условий, буркхольдерии прекращают свой рост на длительный период и становятся невосприимчивыми к действию химиопрепаратов, затем при восстановлении аэробных условий вновь происходит их размножение [261].

Пассирование буркхольдерий на питательных средах, как правило, ведет к снижению вирулентности культур, чувствительность к антибактериальным средствам при этом может повышаться, понижаться или оставаться на прежнем уровне. [25, 202].

В наших экспериментах многократные пересевы на питательных средах практически не влияли на уровень чувствительности буркхольдерий к химиотерапевтическим препаратам. Вирулентность большинства культур после пассажей на TSA снижалась.

Не вызывает сомнения то, что дальнейшее изучение корреляционной связи между вирулентностью культур буркхольдерий и их устойчивостью к антибактериальным препаратам является интересным как в отношении понимания биологической сути патогенности микроорганизмов, так и решения конкретных задач лечения инфекций и расшифровки эпидемиологических процессов.

Полученные нами данные по антибиотикочувствительности буркхольдерий были скорректированы с некоторыми условиями, проявляющимися в процессе взаимодействия микроорганизма с химиопрепаратами *in vivo*, а именно температурой, рН, концентрацией углекислого газа и белков плазмы крови в питательной среде. Для этого, наряду с методами определения чувствительности в стандартных условиях по общепринятым методикам, чувствительность культур к химиопрепаратам определяли на среде Мюллер-Хинтона в различных опытах: изменяли рН среды и температуру инкубирования, добавляли к среде Мюллер-Хинтона 10 % крови лабораторных животных и проводили культивирование в атмосфере, содержащей 5 % CO<sub>2</sub>.

В ходе исследований было показано, что чувствительность буркхольдерий к антибактериальным препаратам может существенно изменяться в зависимости от показателей рН и температуры окружающей среды. Так, было отмечено, что у изученных штаммов буркхольдерий при снижении значения рН понижается чувствительность к антибактериальным препаратам. Влияние колебаний температуры разнонаправленное, но также весьма существенно меняющее значения МПК. Установленные нами различия в чувствительности буркхольдерий к антибактериальным средствам могут быть связаны как с оптимумом активности исследуемых

препаратов, так и с видовыми особенностями метаболизма бактерий, например, с активностью ферментных систем, изменением проницаемости цитоплазматической мембраны клеток.

Практически во всех случаях выявлено повышение устойчивости буркхольдерий к химиопрепаратам при инкубировании в атмосфере с 5 %  $\text{CO}_2$  и добавлении к питательной среде 10 % крови животных. Особенно заметное достоверное снижение чувствительности буркхольдерий в модифицированных условиях наблюдалось в опытах с рифампицином ( $p < 0,05$ ). В большинстве случаев повышение антибиотикорезистентности культур выявлялось в опытах с кровью высокочувствительного к буркхольдериям вида экспериментальных животных – золотистых хомячков. Это можно объяснить, по крайней мере, двумя причинами: во-первых, в условиях повышенного содержания углекислого газа снижается эффективность действия некоторых антибактериальных препаратов, во-вторых, добавление крови к среде Мюллер-Хинтона увеличивает ее ростовые свойства.

Наряду с этим, была изучена терапевтическая эффективность химиопрепаратов, отобранных на основании их МПК *in vitro* (цефтазидима, меропенема, циплофлоксацина, доксициклина, рифампицина, хлорамфеникола, ко-тримоксазола), на модели высокочувствительных к сапу и мелиоидозу золотистых хомячков. 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 цiproфлоксацин 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<sub>2</sub>. Уровень защиты при химиотерапии сапа и мелиоидоза зависел также от характера течения инфекции. При заражении равноэффективной дозой 10<sup>3</sup> ЛД<sub>50</sub> скорость инфекционного процесса распределялась в следующем порядке: мелиоидоз (золотистые хомячки), сап (золотистые хомячки), мелиоидоз (белые крысы). Терапевтическая эффективность изученных химиопрепаратов соответствовала той же тенденции. Очевидно, что оценка чувствительности патогенных буркхольдерий к антибактериальным препаратам только в стандартных условиях не может служить единственным критерием отбора антибактериальных средств для лечения сапа и мелиоидоза. Большое влияние на эффективность лечения оказывает характер инфекционного процесса в конкретном макроорганизме, скорость и форма патологического процесса.

Некоторые другие исследователи также отмечали влияние физико-химических факторов на чувствительность буркхольдерий к различным химиопрепаратам, однако в этих работах не выявляли какой-либо связи между антибиотикочувствительностью микроорганизмов *in vitro* и эффективностью препаратов *in vivo* [20, 125].

Наша модификация метода оценки чувствительности буркхольдерий к антибактериальным препаратам позволяет по степени снижения антибиотикочувствительности 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 характери-

стик 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.

В настоящее время установлено, что большинство микроорганизмов в окружающей среде и организме инфицируемых хозяев образуют биопленки. Структура биопленки, физиолого-биохимические особенности объединенных в сообщество бактерий обеспечивают повышение их устойчивости к действию иммунной системы и других факторов макроорганизма, а также к химиопрепаратам и дезинфектантам.

Способность к биопленкообразованию *B. mallei* и *B. pseudomallei* - один из возможных факторов, определяющих особенности течения инфекционного процесса и трудности в лечении. В наших исследованиях была продемонстрирована способность буркхольдерий к образованию биопленки на различных поверхностях *in vitro*.

Было показано, что все изученные виды буркхольдерий легко образуют биопленки на жидких питательных средах (поверхность раздела фаз «жидкость - воздух»). Причем, плотную, зрелую биопленку на поверхности ТСБ у штаммов *B. ceracia*, *B. thailandensis*, *B. pseudomallei* можно увидеть уже через 24 ч культивирования при 37 °С.

В отличие от этого, штаммы *B. mallei* образуют тонкую, неравномерную, легко разрушающуюся биопленку на поверхности бульона 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, окрашен-

ных генцианвиолетом, позволило выявить многослойные структуры, включающие группы адгезированных к поверхности бактерий, заключенных в экстрацеллюлярный матрикс. Микроскопически биопленки исследуемых видов имели сходную организацию.

При электронной микроскопии ультратонких срезов биопленок были обнаружены агрегаты тесно контактирующих между собой клеток бактерий, окруженные диффузным рутений позитивным матриксом. При этом, электронно-микроскопическая визуализация показала экзополисахаридную природу межклеточного вещества, окружающего бактериальные клетки.

Исследователи полагают, что высокая выживаемость клеток в биопленках по сравнению с планктонными бактериями связана с существованием следующих специфических механизмов устойчивости - присутствием в биопленках относительно большого количества метаболически заторможенных клеток – персистеров, нечувствительных к химиотерапевтическим средствам; фильтрующей способностью матрикса, затрудняющей доставку химиопрепаратов во внутренние слои биопленки; более эффективной индукцией в биопленках систем эффлюкса и ферментативного расщепления антибактериальных препаратов; селекцией штаммов бактерий с множественной антибиотикорезистентностью [1, 16, 38, 176, 224].

Проведенное нами сравнение антибиотикочувствительности планктонных культур и биопленок штаммов сапа и мелиоидоза к меропенему, доксициклину, цефтазидиму, ко-тримоксазолу и рифампицину показало, 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 мелиои-

дозных биопленок. При этом, следует отметить, что 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.

Повышенная выживаемость буркхольдерий в биопленках по сравнению с планктонными бактериями свидетельствует о реализации особых механизмов устойчивости, характерных для сообществ.

Возможно, в наших исследованиях причинами снижения чувствительности *B. pseudomallei* и *B. mallei* в составе зрелых биопленок к большинству химиопрепаратов являются способность экзополисахаридного матрикса связывать, не пропускать или инактивировать химиотерапевтические средства и формирование клеток - персистеров.

Данные, полученные нами, согласуются с исследованиями зарубежных исследователей. Авторы установили, что биопленки штаммов *B. pseudomallei* являются барьером для диффузии имипенема и цефтазидима. Причем, скорость диффузии препаратов для штамма, хорошо образующего биопленку, значительно медленнее, чем для штамма с низкой биопленкообразующей способностью. Однако ко-тримоксазол с легкостью проникал сквозь нее, не зависимо от биопленкопродуцирующей способности штамма. При этом, эффективность препаратов против биопленочных бактерий была не высока [116].

В наших исследованиях чувствительность биопленочных культур *B. mallei* к меропенему гипотетически можно объяснить как структурно – морфологическими особенностями биопленок возбудителя сапа (тонкие,

легко разрушаются), то есть низкой барьерной функцией экзополисахаридного матрикса, так и устойчивостью микробов к гидролитическим ферментам и более низким значением МПК для возбудителя сапа.

Однако, скорее всего, уникальная устойчивость сообществ к антибактериальным препаратам реализуется как за счет специфических механизмов резистентности, характерных для биопленки, так и классических механизмов устойчивости бактериальных клеток (например, модификация мишени, эффлюкс, уменьшение проницаемости клеточных структур, формирование метаболического шунта) [1, 38, 43].

В связи с высокой устойчивостью буркхольдериальных сообществ к химиотерапевтическим препаратам необходимо соблюдение рациональных методов и схем химиотерапии сапа и мелиоидоза, сочетанное с внедрением новых подходов, которые могут состоять в выборе химиопрепаратов на основании определения МПК к биопленочной популяции бактерий; поиске и создании лекарственных средств на основе антагонистов системы QS, применении в составе комплексной терапии препаратов, блокирующих образование биопленок (ингибиторов адгезии бактерий к поверхности), веществ, блокирующих синтез или разрушающих внеклеточный матрикс биопленки, и, тем самым, облегчающих доступ химиотерапевтических средств; препаратов, обеспечивающих эффективную комбинированную терапию сапа и мелиоидоза [152, 272].

Возбудители сапа и мелиоидоза способны длительное время выживать (персистировать) в клетках макроорганизма, сохраняя свой патогенный потенциал [253].

Персистенция бактерий в макроорганизме рассматривается как важное звено в патогенезе инфекционного процесса и реализуется через адаптацию бактерий к факторам защиты, приводя к хроническому рецидивирующему течению. При таком развитии патологического процесса необходимо применение препаратов, способных действовать на микроорганизмы, интернированные в клетки хозяина.

Из большого числа химиотерапевтических средств лишь немногие обладают способностью проникать в клетки организма хозяина, в макрофаги и фаголизосомы, не инактивируясь в них, так как кислый рН среды в фаголизосомах может в значительной мере влиять на антибактериальную активность некоторых препаратов. Кроме того, при оценке антибактериальной эффективности следует учитывать возможность изменения активности химиопрепарата, вплоть до полной внутриклеточной инактивации его, вследствие адсорбции субклеточными структурами.

В связи с этим, мы изучили влияние на буркхольдерии, персистирующие в эукариотических клетках, основных химиопрепаратов (меропенема, доксициклина, цефтазидима, ко-тримоксазола), применяемых при лечении сапа и мелиоидоза. В качестве моделей для оценки чувствительности к химиопрепаратам внутриклеточно персистирующих буркхольдерий использовали простейших вида *T. pyriformis* и перитонеальные мышинные макрофаги.

Проведенные нами исследования показали более высокую резистентность к химиотерапевтическим средствам штаммов *B. pseudomallei*, *B. mallei*, интернированных в эукариотические клетки, по сравнению с их планктонными культурами, о чем свидетельствует значительное увеличение МБК. Так, бактерии обоих видов, интернированные в эукариотические клетки, повышали свою резистентность в три и более раз в зависимости от штамма и антибактериального препарата.

Эти различия между чувствительностью клеток буркхольдерий в планктонном и интернированном состоянии могут определять высокую вероятность рецидивов заболевания после прекращения химиотерапии, так как в этот период, несмотря на отсутствие жизнеспособных микробов в плазме крови, появляется высокая вероятность выхода возбудителя сапа и мелиоидоза из фагоцитарных клеток и появление симптомов реинфекции.

Оценка резистентности буркхольдерий, защищенных клетками тетрахимен, 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). Что касается модели «макрофаг-буркхольдерия», то по ее результатам эффективным также является меропенем, активность которого отчетливо проявляется в отношении возбудителя сапа (МБК 111 мкг/мл).

Таким образом, на основании полученных данных по МБК для буркхольдерий, интернированных в эукариотические клетки, меропенем является препаратом первого ряда при лечении экспериментального сапа, тогда как, показатели МБК остальных химиопрепаратов ставят под сомнение их эффективность.

Показано, что меропенем высокоэффективен при инфекциях, вызываемых другими видами буркхольдерий (*B. pseudomallei* и *B. ceracia*), тогда как, данные о его терапевтической эффективности при естественных и экспериментальных заболеваниях сапом не представлены в литературе [39, 90].

Определенным аналогом эффективности в настоящее время можно считать схему терапии острых форм сапа, включающую внутривенное введение цефтазидима, доксициклина, ко-тримоксазола в течение двух недель с последующим длительным курсом поддерживающей терапии доксициклином и азитромицином [228, 282]. В указанных работах эффективность химиотерапии сапа достигала 40-60 %.

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 [49, 50, 186, 187]. 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 [255]. Лечение животных эмульсией *per os* и инъекционными препаратами, эффективными по данным МПК *in vitro* (доксциклином, цефтазидимом, ко-тримоксазолом, меропенемом), привело лишь к удлинению продолжительности жизни павших животных. Отчетливое повышение эффективности химиопрепаратов наблюдалось при введении их в клатратной (комплексное соединение с высокомолекулярным декстраном) и особенно в липосомальной формах. Липосомальные формы меропенема оказались наиболее эффективным средством при экстренной профилактике и лечении острых форм сапа у золотистых хомячков, обеспечивая не только 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.

Кроме того, на основании данных по чувствительности изученных видов буркхольдерий отобраны химиотерапевтические препараты и красители в качестве селективных факторов для разработки питательных сред

для культивирования сапа и мелиоидоза. Получены варианты селективных сред с химиопрепаратами (полимиксином В, гентамицином, ванкомицином), которые можно применять для выделения патогенных буркхольдерий. Разработаны методические приемы работы с данными средами.

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).

На сегодняшний день продолжаются исследования по подбору наиболее эффективных химиотерапевтических препаратов и разработке схем лечения людей при сапе и мелиоидозе. 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, такими как GM-CSF - гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор, а также препятствующими образованию биопленок *in vivo*. [21, 22, 90, 228].

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. ceracia*, *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  $\beta$ -лактамам, умеренную – к рифампицину, хлорамфениколу и тетрациклинам.
2. Показано, что чувствительность буркхольдерий к антибактериальным препаратам существенно изменяется в зависимости от физико-химических факторов (рН, температуры, содержания CO<sub>2</sub> 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 СОКРАЩЕНИЙ**

ГТСИ - глюкозо-триптонная среда с индикатором

КОЕ - колониеобразующая единица

ЛПС - липополисахарид

м.к. - микробная клетка

МБК - минимальная бактерицидная концентрация

МДК – максимально достижимая концентрация препарата в крови

МПК - минимальная подавляющая концентрация

МПК<sub>50</sub> - минимальная подавляющая концентрация антибиотика для 50 %  
исследованных штаммов

МХА - Мюллер-Хинтона агар

МХБ - Мюллер-Хинтона бульон

ТСА - триптиказо-соевый агар

ТСБ - триптиказо-соевый бульон

ТЭМ - трансмиссионная электронная микроскопия

ЭПС - экзополисахарид

AHL – *N*-Acyl homoserine lactone (ацил-гомосерин-лактон)

*BBC* - *Burkholderia cepacia complex* (бактерии комплекса *B. cepacia*)

DLm - *dosis letalis minima* (минимальная смертельная доза)

GM-CSF - *granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*

фактор (гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий)

LD<sub>50</sub> - доза микроорганизма, летальная для 50% зараженных животных

QS - *quorum sensing* (чувство кворума)

VBNC - *viable but non culturable* (жизнеспособные, но некультивируемые)

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Антибиотикорезистентность биопленочных бактерий / И.В. Чеботарь, А.Н. Маянский, Е.Д. Коначакова и др. // Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. – 2012. – Том 14, № 1. – С. 51-58.
2. Антибактериальные лекарственные средства. Методы стандартизации препаратов / под ред. Р.У. Хабриева. – М.: Медицина, 2004 – 944 с.
3. Антонов, Ю.В. Лабораторный контроль эффективности химиотерапии при мелиоидозе / Ю.В. Антонов, В. И. Илюхин, В.П. Батманов // Антибиотики и химиотерапия. – 1995. - №2. – С. 41-44.
4. Ашмарин, И.П. Статистические методы в микробиологических исследованиях / И.П. Ашмарин, А.А. Воробьев. - М.: Медгиз., 1962. – 180 с.
5. Батманов, В.П. Чувствительность *Pseudomonas mallei* к фторхинолонам и эффективность их при экспериментальном сапе / В.П. Батманов // Антибиотики и химиотерапия. – 1991. – № 9. – С. 31-34.
6. Беляков, В.Д. Псевдомонады и псевдомонозы / В.Д. Беляков, Л.А. Ряпис, В.И. Илюхин. - М. : Медицина, 1990. – 224 с.
7. Бриан, Л.Е. Бактериальная резистентность и чувствительность к химиопрепаратам / Л.Е. Бриан. - М. : Медицина, 1984. - 270 с.
8. *Burkholderia thailandensis*: биологические свойства, идентификация и таксономическая позиция / В.И. Илюхин, Т.В. Сенина, В.А. Антонов и др. // Мол. генет., микробиол. и вирусол. - 2002. - № 1. - С. 7-11.
9. Васильев, П.Г. Актуальные проблемы химиотерапии бактериальных инфекций / П.Г. Васильев, В.Б. Калининский, И.Д. Кравец // Тез. докл. Всесоюзн. конф. - М., 1991. - С. 108-109.
10. Велянов, Д. Исследование R- и S- форм *Pseudomonas pseudomallei*: I. Морфология колоний и вирулентность для белых мышей и морских свинок

/ Д. Велянов, Д. Харбов, И. Димова // Acta microbiol bulg. – 1982. – Vol. 11. – P. 104-108.

11. Влияние экзогенных протеолитических ферментов на бактерии / В.В. Тец, Г.Ю. Кнорринг, Н.К. Артеменко и др. // Антибиотики и химиотерапия. – 2004. - Том 49, № 12. – С. 3-7.

12. Гайер, Г. Электронная гистохимия / Г. Гайер. - М: Мир, 1974. – 488 с.

13. Генес, В.С. Таблицы достоверных различий между группами наблюдений по качественным показателям. Пособие по статистической обработке результатов наблюдений и опытов в медицине / В.С. Генес. - М. : Медицина, 1964. - 81с.

14. Гинцбург, А.Л., “*Quorum sensing*” или социальное поведение бактерий / А.Л. Гинцбург, Т.С. Ильина, Ю.М. Романова // Журн. микробиол. эпидемиол. иммунол. - 2003. - № 5. - С. 86-93.

15. Голуб, А.В. Бактериальные биопленки – новая цель терапии? / А.В. Голуб // Клин. Микробиол. Антимикроб. химиотер. – 2012. – Том 14, № 1. – С. 23-29.

16. Евдокимова, Н.В. Персистирующие клетки микроорганизмов – новый взгляд на старую проблему / Н.В. Евдокимова, Т.В. Черненькая // Клин. микробиол. антимикроб. химиотер. – 2013. – Том 15, № 3. – С. – 192-197.

17. Замараев, В.С. Л-трансформация возбудителей как один из путей реализации хронического носительства бактерий рода *Pseudomonas* / В.С. Замараев, В.И. Илюхин, С.Р. Саямов // Микробиол. журн. – 1987. – Т. 49, № 3. – С. 91-96.

18. Змушко, Л.С. Ускоренные методы определения чувствительности микроорганизмов к антибиотикам / Л.С. Змушко, А.А. Андрейченко // Лабораторное дело. – 1980. - № 8. – С. 451-454.

19. Ильина, Т.С. Биопленки как способ существования бактерий в окружающей среде и организме хозяина: феномен, генетический контроль и системы регуляции их развития / Т.С. Ильина, Ю.М. Романова, А.Л. Гинцбург // Генетика. – 2004. – № 11. – С. 1-12.

20. Илюхин, В.И. Влияние температуры и рН среды на чувствительность патогенных буркхольдерий / В.И. Илюхин, В.П. Батманов // Антибиотики и химиотерапия. - 1997. - № 4. - С. 21-23.
21. Илюхин, В.И. Мелиоидоз: итоги столетнего изучения, современные проблемы и зримые перспективы / В.И. Илюхин, Т.В. Сенина // Эпидемиология и инфекционные болезни. – 2012. - № 5. – С. 41-46.
22. Илюхин, В.И. Сап в XXI веке: распространение, научные достижения / В.И. Илюхин, Т.В. Сенина // Ветеринария. – 2014. - № 3. – С. 14-17.
23. Илюхин, В.И. Способ ускоренной предварительной оценки чувствительности бактерий к химиопрепаратам / В.И. Илюхин, Т.В. Сенина, Н.П. Андропова // Антибиотики и химиотерапия. - 2007. - № 52. - С. 1-2.
24. Илюхин, В.И., Алексеев В.В., Королев Ю.С. Буркхольдерии - возбудители сапа и мелиоидоза // в кн.: Руководство по мед. микробиол. под ред. А.С. Лабинской и др. – М. - 2010, книга 2. – С. 755-787.
25. Крылов, В.Д. Ослабление вирулентности *B. mallei* / В.Д. Крылов // Практическая ветеринария. – 1929 – № 5. – С. 432-440.
26. Лакин, Г.Ф. Биометрия: Учебное пособие для биол. спец. вузов / Г.Ф. Лакин. - М. : Высш. шк., 1990. - 352 с.
27. Лозовая, Н.А. Чувствительность *P. mallei* к комбинированным сульфаниламидам *in vitro* / Н.А. Лозовая // Антибиотики и химиотерапия. - 1989. – Том 34, № 1. - С.48-45.
28. Мальцев, С.В. Что такое биопленка? / С.В. Мальцев, Г.Ш. Мансурова // Практ. медицина. – 2011. – Том 5, № 53. – С. 7–10.
29. Манзенюк, И.Н. Изучение чувствительности штаммов *Pseudomonas mallei* к антибактериальным препаратам в опытах *in vitro* на модели клеточных культур / И.Н. Манзенюк, А.И. Марченко, Э.А. Светоч // Антибиотики и химиотерапия. - 1996. – Том 41, № 11. - С. 14-17.
30. Манзенюк, И.Н. Эффективность антибактериальных препаратов в отношении *Pseudomonas mallei* в опытах *in vitro* и *in vivo* / И.Н. Манзенюк,

- В.В. Дорохин, Э.А. Светоч // Антибиотики и химиотерапия. - 1994. - № 2/3. - С. 26-30.
31. Мерков, А.М. Санитарная статистика / А.М. Мерков. - М., 1974. - 384 с.
32. МУК 4.2.2495-09. Определение чувствительности возбудителей опасных бактериальных инфекций (чума, сибирская язва, холера, туляремия, бруцеллез, сап, мелиоидоз) к антибактериальным препаратам: Методические указания. - М.: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2010. - 59 с.
33. Навашин С.М., Фомина И.П., Архангельский А.М. и др. Инструкция по единой методике экспериментального изучения и клинических испытаний новых антибиотиков и химиопрепаратов для экстренной профилактики и лечения опасных инфекционных заболеваний. – М. – 1980. – 15 с
34. Николаев, Ю.А. Биопленка – “город микробов” или аналог многоклеточного организма? / Ю.А. Николаев, В.К. Плакунов // Микробиология. - 2007. – Том 76, № 2. - С. 149–163.
35. Образование биопленок – пример “социального поведения” бактерий / Ю.М. Романова, Т.А. Смирнова, А.Л. Андреев, Т.С. Ильина и др. // Микробиология. - 2006. - Том 75, № 4. - С. 481–485.
36. Определение чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препаратам (Методические указания МУК 4.2.1890-04) // Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. - 2004. – Том 6, № 4. - С. 307–59.
37. Организация антибактериальной терапии распространенных заболеваний / С.В. Дьяченко, Е.В. Слободенюк, В.Г. Дьяченко // Учебное пособие. Под редакцией проф. Е.В. Слободенюк. Изд. центр ГОУ ВПО ДВГМУ, 2010. - 475 с.
38. Плакунов, В.К. Персистенция и адаптивный мутагенез в биопленках / В.К. Плакунов, Е.А. Стрелкова, М.В. Журина // Микробиология. - 2010. – Том 79, № 4. – С. 447–458.

39. Проблемы соответствия антибиотикочувствительности *in vitro* и эффективности химиотерапии инфекций, вызванных патогенными буркхольдериями / В.И. Илюхин, Т.В. Сенина, М.Н. Трушкина., Е.В. Шубникова, Ю.В. Антонов, Н.В. Андропова // Антибиот. и химиотер. – 2009. - № 7-8. – С. 19–23.
40. Решедько, Г.К. Особенности определения чувствительности микроорганизмов диско-диффузионным методом/ Г.К. Решедько, О.У. Стецюк // Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия – 2001. - Том 3, № 4. - С. 348-354.
41. Романова, Ю.М. Бактериальные биопленки как естественная форма существования бактерий в окружающей среде и в организме хозяина / Ю.М. Романова, А.Л. Гинцбург // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. - 2011. - № 3. - С. 99-109.
42. Руководство по микробиологии, клинике и эпидемиологии инфекционных болезней / Под ред. Г.П. Руднева. - М.: Медицина, 1964. - Т 4. - С. 602-670.
43. Сидоренко, С.В. Молекулярные основы резистентности к антибиотикам / С.В. Сидоренко, В.И. Тишков // Успехи биологической химии. - 2004. - Том. 44. - С. 263-306.
44. Санитарно-эпидемиологические правила СП 1.3.1285 – 03. Безопасность работы с микроорганизмами I - II групп патогенности (опасности) // Госсанэпиднадзор России. - М., 2003. – 103с.
45. Способ ускоренного определения чувствительности буркхольдерий к химиопрепаратам: пат. 2319746 Рос. Федерация: МПК<sup>51</sup> С 12 Q 1/04 / В.И. Илюхин, Т.В. Сенина, В.П. Батманов, Н.А. Андропова: заявитель и патентообладатель ФКУЗ Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора. – 2006111133/13, 05.04.2006; опубл. 20.03.2008, Бюл. № 8.- 7с.
46. Способность к формированию биопленок в искусственных системах у различных штаммов *Salmonella typhimurium* / Ю.М. Романова, Н.В.

- Алексеева, Т.А. Смирнова, А.Л. Андреев и др. // Журн. микробиол. эпидемиол. иммунол. - 2006. - № 4. - С. 38–42.
47. Супотницкий, М.В. Механизмы развития резистентности к антибиотикам у бактерий / М.В. Супотницкий // Биопрепараты. - 2011. - № 2. - С. 4-44.
48. Фенотипическая и генотипическая идентификация бактерий комплекса *Burkholderia ceracia* / В.А. Антонов, В.И. Илюхин, Т.В. Сенина и др. // Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунол. – 2008. - № 4. – С. 78-82.
49. Фирсов, Г.М. Фармакологическая и терапевтическая активность липосомного гентамицина и поликатана при послеродовых эндометритах у коров: автореф дис. канд. вет. наук: 16.00.07, 16.00.01. / Фирсов Григорий Михайлович. – Саратов, 2004. – 24 с.
50. Хворостов, И.Н. Экспериментальное фармакологическое и токсикологическое изучение липосомальных форм антибиотиков группы аминогликозидов: автореф. дис. канд. мед. наук: 14.00.25. / Хворостов Игорь Николаевич. – Волгоград, 2001. – 24 с.
51. Цветков, Н.Е. Сап / Н.Е. Цветков, В.З. Черняк. – М. : Сельхозиздат, 1947. – 257 с.
52. Чувствительность псевдомонад к современным антибактериальным препаратам / Ю.В. Антонов, В.И. Илюхин, Л.Д. Поповцева, В.П. Батманов // Антибиотики и химиотерапия. – 1991. - № 1. – С. 14-16.
53. Электронно-микроскопическое изучение биопленок, образуемых бактериями *Burkholderia ceracia* / Т.А. Смирнова, Л.В. Диденко, А.Л. Андреев и др. // Микробиология. - 2008. - Том 77, № 1. - С. 63–70.
54. Эффективность лечения экспериментального сапа при аэрогенном заражении / В.И. Илюхин, В.В. Алексеев, Ю.В. Антонов и др. // Антибиотики и химиотерапия. – 1994. - № 9 -10. – С. 45-48.
55. A Role of *Burkholderia pseudomallei* flagella as a virulent factor / T. Chuaygud, S. Tungpradabkul, S. Sirisinha et al. // Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. – 2008. - Vol. 102. – P. 140-144.

56. A Type IV Pilin, PilA, Contributes To Adherence of *Burkholderia pseudomallei* and Virulence In Vivo / A.E. Essex-Lopresti, J.A. Boddey, R. Thomas et al. // *Infect. Immun.* - 2005. – Vol. 73. – P. 1260-1264.
57. Acha, P.N. In: Zoonoses and Communicable Diseases Common to Man and Animals, 2nd ed. / P.N. Acha, B. Szyfres. - Pan American Health Organization, Washington, DC, 1989. - P. 86–89.
58. Actin-based motility of *Burkholderia pseudomallei* involves the Arp 2/3 complex, but not N-WASP and Ena /WASP proteins / K. Breitbach, K. Rottner, S. Klocke et al. / *Cell Microbiol.* - 2003. – Vol. 5, № 6. - P. 385-93.
59. Al-Ani, F.K. Glanders in horses: a review of the literature / F.K. Al-Ani, J. Roberson // *Vet. Arhiv.* – 2007. - № 77. - P. 203-218.
60. Alexander, A.D. In vitro susceptibility of strains of *Pseudomonas pseudomallei* to rifampin / A.D. Alexander, L.C. Williams // *Appl. Microbiol.* - 1971. - Vol. 22, № 1. - P.11-112.
61. Al-Izzi, S.A. In vitro susceptibility of *Pseudomonas mallei* to antimicrobial agents / S.A. Al-Izzi, L.S. Al-Bassam // *Comp Immunol Microbiol Infect Dis.* - 1989. – Vol. 12, № 1-2. - P. 5-8.
62. Aminoglycoside antibiotics induce bacterial biofilm formation / R.L. Hoffman, D.A. D'Argenio, J. Michael MacCoss, Z. Zhaoying et al. // *Nature.* – 2005. – Vol. 436, № 7054. – P. 1171-5.
63. An Inv/Mxi-Spa-Like type III protein secretion system in *Burkholderia pseudomallei* modulates Intracellular behaviour of the pathogen / M.P. Stevens, M.W. Wood, L.A. Taylor et al. / *Mol. Microbiol.* - 2002. – Vol. 46. - P. 649-659.
64. Antibiotic susceptibility of 65 isolates of *Burkholderia pseudomallei* and *Burkholderia mallei* to 35 antimicrobial agents / F.M. Thibault, E. Hernandez, D.R. Vidal et al. // *Antimicrobial Chemother.* - 2004. - Vol. 54. - P.1134-1138.
65. Antimicrobial and anti biofilm activity of LL-37 and its truncated variants against *Burkholderia pseudomallei* / S. Kanthawong, J.G.M. Bolscher, E.C.I. Veerman, et al. *Int. J. Antimicrob Agents.* – 2012. – Vol. 39. – P. 39–44.

66. Antimicrobial Susceptibility of 41 *Burkholderia mallei* Isolates From Spontaneous Outbreaks of Equine Glanders in Punjab, Pakistan / Abeera Naureen, Muhammad Saqib, Faqeer Muhammad et al. // J. of Equine Veterinary Science. - 2010. – Vol. 30, № 3. - P. 134-140.
67. Antimicrobial susceptibility patterns of *Burkholderia pseudomallei* among melioidosis cases in Kedah, Malaysia / M.R. Hassan, N. Vijayalakshmi, S.P. Pani et al. // Southeast Asian J. Trop. Med Public Health. – 2014. – Vol. 45, № 3. – P. 680-688.
68. Attachment of *Burkholderia pseudomallei* to pharyngeal epithelial cells: a highly pathogenic bacteria with low attachment ability / K. Ahmed, H.D. Enciso, H. Masaki et al. // Am. J. Trop. Med. Hyg. - 1999. – Vol. 60, № 1. - P. 90-93.
69. Aubert, D.F. A novel sensor-kinase-response regulator hybrid controls bio-film formation and type VI secretion system activity in *Burkholderia cenocepacia* / D.F. Aubert, R.S. Flannagan, M.A. Valvano // Infect. Immun. – 2008. – Vol. 76, № 5. – P. 1979–1991.
70. Bacterial biofilms and infection / I. Lasa, J.I. Del pozo, J.R. Penades, J. Leiva // An. Sist. Sanit. navar. - 2005. - Vol. 28. - P. 163-175.
71. Bactericidal efficacy of liposomal aminoglycosides against *Burkholderia cenocepacia* / M. Halwani, C. Mugabe, A.O. Azghani et al. // J. Antimicrob. Chemother. – 2007. – Vol. 60. - P. 760-769.
72. Barenfanger, J. Clinical and financial benefits of rapid bacterial identification and antimicrobial susceptibility testing / J. Barenfanger, C. Drake, G. Kacich // J. Clin. Microbiol. - 1999. -Vol. 37, № 5. - P. 1415-1418.
73. Barry, A.L. Agar diffusion: general considerations / A.L. Barry // In: The antimicrobial susceptibility test: principles and practices. - Lea & Febiger, Philadelphia, PA, USA, 1976. – P. 163-179.
74. Benefit of appropriate empirical antibiotic treatment: thirty-day mortality and duration of hospital stay / A. Fraser , M. Paul , N. Almanasreh et al. // TREAT Study Group. Am. J. Med. – 2006. – Vol. 119, № 11. – P. 970-976.

75. Bernier, S.P. A LysR-type transcriptional regulator in *Burkholderia cenocepacia* influences colony morphology and virulence / S.P, Bernier, D.T. Nguyen, P.A. Sokol // Infect. Immun. - 2008. – Vol. 76, № 1. - P. 38–47.
76. Bichat guidelines for the clinical management of glanders and melioidosis and bioterrorism-related glanders and melioidosis / P. Bossi, A. Tegnell, A. Baka et al. // Euro Surveil. J. - 2004. – Vol. 9. – P. 17–18.
77. Blaser, J. Comparative study on antagonistic effects of low pH and cation supplementation on *in vitro* activity of quinolones and aminoglycosides against *Pseudomonas aeruginosa* / J. Blaser, R. Liithy // Journal of Antimicrobial Chemotherapy. – 1988. –Vol. 22, № 1. – P. 15-22.
78. Blue, S.R. Glanders and melioidosis. In: Zoonoses: biology, clinical practice and public health control / S.R. Blue, D.J. Pombo, M.L. Woods // ed. by S.R. Palmer, L. Soulsby, D.I.H. Simpson. - Oxford, England: Oxford University Press, 1998. – P. 105-113.
79. Bolmstrom, A. Effects of CO<sub>2</sub> incubation on macrolides / A. Bolmstrom, K. Esberg, A. Wiman, et al. // In: The 36 th International Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy. New Orleans. – 1996. – C. 38.
80. Bozzone, D. An investigative approach to the study of phagocytosis in *Tetrahymena* / D. Bozzone, S. Karcher // In: Tested studies for laboratory teaching. – 1998. – Vol. 19. - P. 347-350.
81. BpeAB-OprB, a multidrug efflux pump in *Burkholderia pseudomallei* / Y.Y. Chan, T.M. Tan, Y.M. Ong, K.L. Chua // Antimicrob. Agents Chemother. - 2004. – Vol. 48, № 4. – P. 1128–1135.
82. BPSS1504, a cluster 1 type VI secretion gene, is involved in intracellular survival and virulence of *Burkholderia pseudomallei* / V. Hopf, A. Göhler, K. Eske-Pogodda et al. // Infect Immun. – 2014. - Vol. 82, № 5, P. 2006-2015.
83. Brett, P.J. Pathogenesis of and immunity to melioidosis / P.J. Brett, D.E. Woods // Acta Trop. - 2000. – Vol. 74, № 2-3. - P. 201-210.
84. *Burkholderia pseudomallei* class a beta-lactamase mutations that confer selective resistance against ceftazidime or clavulanic acid inhibition / C. Tibud-

dharat, R.A. Moore, Patricia Baker, D.E. Woods, et al // *Antimicrob. Agents Chemother.* - 2003. – Vol. 47, № 7. - P. 2082-2087.

85. *Burkholderia pseudomallei* induce cell fusion and actin-associated membrane protrusion: a possible mechanism for cell-to-cell spreading / W. Kes-pichayawattana, S. Rattanachetkul, T. Wanun, P. Utaisincharoen et al. / *Infect. Immun.* – 2000. – Vol. 68. – P. 5377-5384.

86. *Burkholderia pseudomallei* RpoS regulates multinucleated giant cell formation and inducible nitric oxide synthase expression in mouse macrophage cell line (RAW 264.7) / P. Utaisincharoen, S. Arjcharoen, K. Limposuwan, S. Tungpradabkul et al. // *Microb. Pathogenesis.* – 2006. – Vol. 40. – P.184–189.

87. Burtnick, M.N. Isolation of Polymyxin B-Susceptible Mutants of *Burkholderia pseudomallei* and Molecular Characterization of Genetic Loci Involved in Polymyxin B Resistance / M.N. Burtnick , D.E. Woods // *Antimicrob. Agents Chemother.* – 1999. - Vol. 43, № 11. - P. 2648-2656.

88. Cellular uptake and cell-associated activity of third generation cephalosporins / R.F. Jacobs, J.W. Thompson, D.P. Kiel, D. Johnson // *Pediatr. Res.* – 1986. – Vol. 20. – P. 909–912.

89. Chan, Y.Y. The *Burkholderia pseudomallei* BpeAB-OprB efflux pump: expression and impact on quorum sensing and virulence / Y.Y. Chan, K.L. Chua // *J. Bacteriol.* - 2005. – Vol. 187, № 14. - P. 4707-4719.

90. Cheng, A.C. Melioidosis: epidemiology, pathophysiology, and management / A.C. Cheng, B.J. Currie // *Clin. Microbiol. Rev.* – 2005. – Vol. 18, № 2. – P. 383–416.

91. Chua, K.L. Flagella are Virulence Determinants of *Burkholderia pseudomallei* / K.L. Chua, Y.Y. Chan, Y.H. Gan // *Infect. Immun.* – 2003. - Vol. 71. – P. 1622-1629.

92. Cloning and expression of class A beta-lactamase gene blaA (BPS) in *Burkholderia pseudomallei* / T.K. Cheung, P.L. Ho, P.C. Woo et al. // *Antimicrob. Agents Chemother.* - 2002. – Vol. 46, № 4. - P. 1132-1135.

93. CLSI Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests; Approved Standard-Eleventh Edition. - 2012. - Vol. 32. - № 1.
94. CLSI Performance Standards for Antimicrobial susceptibility Testing. Twenty-Second Informational Supplement. - 2012. - Vol. 32. - № 3.
95. Coenye, T Diversity and significance of *Burkholderia* species occupying diverse ecological niches / T. Coenye , P. Vandamme // Environmental Microbiology. – 2003. – Vol. 5, № 9. – P. 719–729
96. Comparative in vitro activities of new 14-, 15- and 16-membered macrolides / D.J. Hardy, D.M. Hensey, J.M. Beyer et al. / Antimicrob. Agents Chemother. – 1988. - Vol. 32. - P. 1710-1719.
97. Comparative *in vivo* and *In vitro* analyses of putative virulence factors of *Burkholderia pseudomallei* using lipopolysaccharide, capsule and flagellin mutants/ C. Wikraiphat, J. Charoensap, P. Utaisincharoen, S. Wongratcheewin et al. // *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* - 2009. – Vol. 56. - P. 253-259.
98. Comparison of antibiotic susceptibility of *Burkholderia cepacia* complex organisms when grown planktonically or as biofilm *in vitro* / E. Caraher, G. Reynolds, P. Murphy et al. // *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* – 2007. - Vol. 26, № 3. – P. 213–216.
99. Comparison of efficacy of ciprofloxacin and doxycycline against experimental melioidosis and glanders / P. Russell, S.M. Eley, J. Ellis et al. // *J. Antimicrob. Chemother.* – 2000. – Vol. 45. – P. 813 -818.
100. Comparison of gatifloxacin, moxifloxacin and ciprofloxacin for treatment of experimental *Burkholderia pseudomallei* infection / J. Steward, T. Piercy, M.S. Lever, M. Nelson, A.J. Simpson et al. // *Antimicrobial Chemother.* - 2005. - Vol. 55. - P. 523-527.
101. Comparison of the *in vitro* and *in vivo* susceptibilities of *Burkholderia mallei* to Ceftazidime and Levofloxacin [электронный ресурс] / M.J. Barbara, C.W. Gregory, A.G. Torres, D.M. Estes // *BMC Microbiology.* – 2009. – Vol. 9. – e88. – Режим доступа: <http://www.biomedcentral.com/1471-2180/9/88>. - Загл. с экрана.

102. Comparison of the susceptibilities of *Burkholderia pseudomallei* to meropenem and ceftazidime by conventional and intracellular methods / T.J. Inglis, F. Rodrigues, P. Rigby, R. Norton et al. // *Antimicrob. Agents Chemother.* – 2004. – Vol. 48. – P. 2999–3005.
103. Consensus guidelines for dosing of amoxicillin-clavulanate in melioidosis / A.C. Cheng, W. Chierakul, W. Chaowagul, P. Chetchotisakd et al. // *Am. J. Trop. Med. Hyg.* – 2008. – Vol. 78. – P. 208-209.
104. Continuing evolution of *Burkholderia mallei* through genome reduction and large-scale rearrangements / L. Losada, C.M. Ronning, D. DeShazer, D. Woods et al. // *Genome Biology and Evolution.* – 2010 – Vol. 2. - P. 102-116.
105. Control of quorum sensing by a *Burkholderia pseudomallei* multidrug efflux pump / Y.Y. Chan, H.S. Bian, T.M. Tan et al. // *J. Bacteriol.* - 2007. – Vol. 189, № 11. - P. 4320-4324.
106. Costerton, J. W. The role of bacterial surface structures in pathogenesis / J. W. Costerton, R.T. Irvin., K.J. Cheng // *Crit. Rev. Microbiol.* - 1981. - Vol. 8. - P. 303-338.
107. Costerton, J.W. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections / J.W. Costerton, P.S. Stewart, E.P. Greenberg // *Science.* – 1999. – Vol. 284. – P. 1318–1322.
108. Currie, B.J. *Burkholderia pseudomallei* and *Burkholderia mallei*: Melioidosis and Glanders. In: G. Mandell A, J.E. Bennet, R. Dolin editors. *Principles and Practice of Infectious Diseases*. 6th. New York City: Churchill Livingstone, 2005. - P. 2622–2632.
109. Currie, B.J. The epidemiology and clinical spectrum of melioidosis: 540 cases from the 20 year Darwin prospective study [электронный ресурс] / B.J. Currie, L. Ward, A.C. Cheng // *PLoS Negl. Trop. Dis.* – 2010. – Vol. 4. – e900. – Режим доступа: <http://journals.plos.org/plosntds/article?id=10.1371/journal.pntd.0000900>. – Загл. с экрана.

110. Cutaneous melioidosis in a man who was taken as a prisoner of war by the Japanese during World War II. / V. Ngauy, Y. Lemeshev, L. Sadkowski, G. Crawford . // J. Clin. Microbiol. - 2005. – Vol. 43, № 2. - P. 970-972.
111. Dance, D. Treatment and prophylaxis of melioidosis / D. Dance // International Journal of Antimicrobial Agents. – 2014. – Vol. 43. – P. 310–318.
112. Darling, R.G. Glanders and Melioidosis / R.G. Darling, J.B. Woods // In US Army Medical Research Institute of Infectious Diseases Medical Management of Biological Casualties Handbook. 5th ed. Fort Detrick, MD: USAMRIID. - 2004. – P. 32-39.
113. Davey, M.E. Microbial biofilms: from ecology to molecular genetics / M.E. Davey, G.A. O'Toole // Microbiol. Mol. Biol. Rev. – 2000. – Vol. 64. – P. 847–867.
114. Deris, Z.Z. Clinical characteristics and outcomes of bacteraemic melioidosis in a teaching hospital in a northeastern state of Malaysia: a five – year review / Z.Z. Deris, H. Hasan, M.N. Suraiya // J. Infect. Dev. Ctries. – 2010. - Vol. 4. – P. 430-435.
115. Differential intracellular fate of *Burkholderia pseudomallei* 844 and *Burkholderia thailandensis* UE5 in human monocyte-derived dendritic cells and macrophages [электронный ресурс] / J. Charoensap, P. Utaisincharoen, A. Engering, S. Sirisinha / BMC Immunol. – 2009. – Vol. 10. – Режим доступа: <http://www.biomedcentral.com/1471-2172/10/20>. - Загл. с экрана.
116. Diffusion and activity of antibiotics against *Burkholderia pseudomallei* biofilms / P. Pibalpakdee , S. Wongratanacheewin , S. Taweechaisupapong , P.R. Niumsup // Int. J. Antimicrob. Agents. – 2012. – Vol. 39, № 4. -P. 356-359.
117. Dissection of the *Burkholderia* Intracellular Life Cycle Using a Photothermal Nanoblade / C.T. French, I.J. Toesca, T.H. Wu, et al. // Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. - 2011.– Vol. 108. – P. 12095-12100.
118. Doern, G. Clinical impact of rapid in vitro susceptibility testing and bacterial identification / G. Doern, R. Vautour, B. Levy // J. Clin. Microbiol. - 1994. - Vol. 32. - P. 1757-1762.

119. Domma, K. Glanders in humans and animals / K. Domma // Wiener Tierärztliche Monatsschrift. – 1953. – Vol. 40. – P. 426–432.
120. Donlan, R.M. Biofilms: Microbial life on surfaces / R.M. Donlan // Emerg. Infect. Dis. - 2002. - Vol. 8. - P. 1–20.
121. Donlan, R.M. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms / R.M. Donlan, J.W. Costerton // Clin. Microbiol. Rev. – 2002. – Vol. 15. – P. 167-193.
122. Duerkop, B.A. The *Burkholderia mallei* BmaR3-Bmal3 quorum-sensing system produces and responds to *N*- 3-hydroxy-octanoyl homoserine lactone / B.A. Duerkop, J.P. Herman, R.L. Ulrich // J. Bacteriol. – 2008. - Vol. 190. – P. 5137-5141.
123. Easmon, C.S. Interaction of meropenem with humoral and phagocytic defences / C.S. Easmon // Ibid. – 1989. – Vol. 9, № 24. – P. 259-264.
124. Effect of peritoneal fluid pH on outcome of aminoglycoside treatment of intraabdominal infections / H.P. Simmen, H. Battaglia, T. Kossman, J. Blaser // World J. Surg. - 1993. – Vol. 17. – P. 393–397.
125. Effect of pH and CO<sub>2</sub> on in vitro susceptibility of *Pseudomonas cepacia* to beta-lactams / J.E. Corkill, J. Deveney, J. Pratt et al. // Pediatr. Res. – 1994. - Vol. 35. – P. 299–302.
126. Effects of *Burkholderia pseudomallei* and Other *Burkholderia* Species on Eukaryotic Cells in Tissue Culture / V.S Harley, D.A. Dance, B.S. Drasar, G. Tovey // *Microbios*. - 1998. - Vol. 96. - P. 71-93.
127. Efflux-mediated aminoglycoside and macrolide resistance in *Burkholderiapseudomallei* / R.A. Moore, D. DeShazer, S. Reckseidler, A. Weissman // Antimicrob. Agents Chemother. - 1999. – Vol. 43. – P. 465–470.
128. Electron microscopy study of the mode of growth of *Pseudomonas pseudomallei* in vitro and in vivo / M. Vorachit, K. Lam, P. Jayanetra, J.W. Costerton // J. Trop. Med. Hyg. - 1995. – Vol. 98. P. 379–391.

129. Emergence of *Burkholderia pseudomallei* and pandrug-resistant non-fermenters from southern Karnataka, India / C. Mukhopadhyay, K. Chawla, S. Krisha et al. // Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg. – 2008. – Vol. 102. – P. 12 -17.
130. Empirical Cephalosporin Treatment of Melioidosis / W. Chaowagul, A.J. Simpson, Y. Suputtamongkol, N.J. White // Clin. Infect. Dis. – 1999. - Vol. 28, № 6. - P. 1328-1328.
131. Endemic melioidosis in tropical northern Australia: a 10-year prospective study and review of the literature / B.J. Currie, D.A. Fisher, D.M. Howard et al. // Clin. Infect. Dis. – 2000. - .Vol. 31. – P. 981-986.
132. Ericsson, H.M. Antibiotic Sensitivity Testing. Report of an International Collaborative Study / H.M. Ericsson, J.C. Sherris // Acta Pathol. Microbiol. Scand. Suppl. – 1971. - Vol. 217. – P. 1–90
133. Erythromycin plus alkalinization in treatment of urinary infections / S.H. Zlner, L.D. Sabath, J.I. Casey, M. Finland // Antimicrob. Agents Chemother. - 1970. - P. 413-416.
134. EUCAST Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 3.0, 2013 URL: <http://www.eucast.org> .
135. Everett, E.D. *In Vitro* Sensitivity of 33 Strains of *Pseudomonas pseudomollei* To Trimethoprim and Sulfamethoxazole / E.D. Everett, R.A. Kishimoto // The journals of infections disease. - 1973. - Vol. 128. - P. 539.
136. Fiese, E.F. Comparison of the acid stability of azithromycin and erythromycin / E.F. Fiese, S. Steffen // J. Antimicrob. Chemother. – 1990. – Vol. 25. – P. 39-47.
137. Flagellum-Mediated Adhesion by *Burkholderia pseudomallei* Precedes Invasion of *Acanthamoeba astronyxis* / T.J. Inglis, T. Robertson, D.E. Woods et al. // Infect. Immun. – 2003. – Vol. 71, № 4. – P. 2280–2282.
138. Fluit, A.C. Molecular detection of antimicrobial resistance / A.C. Fluit, M.R. Visser, F. Schmitz // Clin. Microbiol. Rev. - 2001. - Vol. 14, № 4. - P. 836–871.

139. Fournier, J. La melioidose, maladie, d' actualite et le bacille de Whitmore (*Malleomyces pseudomallei*) // J. Fournier, L. Chambon / Paris: Ed. Med. Flammarion. - 1958. - P. 47-90.
140. Functional characterization of OXA-57, a class D betalactamase from *Burkholderia pseudomallei* / K.E. Keith, P.C. Oyston, B. Crossett et al. // *Antimicrob. Agents Chemother.* – 2005. – Vol. 49, № 4. – P. 1639–1641.
141. Galyov, E.E. Molecular Insights into *Burkholderia pseudomallei* and *Burkholderia mallei* Pathogenesis / E.E. Galyov, P.J. Brett, D. De Shazer // *Annu. Rev. Microbiol.* - 2010. - Vol. 64. – P. 495-517.
142. Garrity, G.M. Taxonomic Outline of the Bacteria and Archaea (Formerly the Taxonomic Outline of the Prokaryotes) / G.M. Garrity et al. // Release 7.7. New York: Springer, 2007. – P. - 112-147.
143. Genetic analysis of functions involved in the late stages of biofilm development in *Burkholderia cepacia* H111 / B. Huber, K. Riedel, M. Kothe et al. // *Mol. Microbiol.* – 2002. – Vol. 46. - P. 411–426.
144. Genomic plasticity of the causative agent of melioidosis, *Burkholderia pseudomallei* / M.T.G. Holden, R.W. Titball, S.J. Peacock et al. // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* – 2004. – Vol. 101. – P. 14240-14245.
145. Gibson, R.L. Pathophysiology and management of pulmonary infections in cystic fibrosis / R.L. Gibson, J.L. Burns, B.W. Ramsey // *Am. J. Resp. Crit Care Med.* - 2003. – Vol. 168. – P. 918-951.
146. Gilad, J. *Burkholderia mallei* and *Burkholderia pseudomallei* as Bioterrorism / J. Gilad // *Agents: National Aspects of Emergency Preparedness.* - 2007. – Vol. 9. - P. 499–503.
147. Glanders – A Re emerging Zoonotic disease: A Review / Amit Kumar Verma, Mani Saminathan, Neha et al. // *J. Biol. Sciences.* – 2014. – Vol. 14, № 1. - P. 38-51.
148. Glanders a comprehensive review / M.B. Wittig et al. // *Dtsch Tierarztl Wochenschr.* - 2006. – Vol. 113. - P. 323–230.

149. Glanders in a military research microbiologist / A. Srinivasan, C.N. Kraus, D. DeShazer et al. // N. Engl. J. Med. – 2001. – Vol. 345. - P. 256-258.
150. Glanders, Equine—Iran ex Iraq. Nov 29, 2007. ProMED Mail. Archive No. 20071129.3854. Available at: [www.promedmail.org](http://www.promedmail.org). Accessed Dec 4, 2007.
151. Godoy, D. Multilocus sequence typing and evolutionary relationships among the causative agents of melioidosis and glanders, *Burkholderia pseudomallei* and *Burkholderia mallei* / D. Godoy, G. Randle, A.J. Simpson // J. of Clinical Microbiology. - 2003. – Vol. 41, № 5. - P. 2068-2079.
152. Gomes, M.Z.V. Evaluation of rhamnolipid and surfactin to reduce the adhesion and remove biofilms of individual and mixed cultures of food pathogenic bacteria / M.Z.V. Gomes, M. Nitschke // Food Control. – 2012. - Vol. 25. - P. 441-447.
153. Graber, M.A. *Burkholderia mallei* (glanders) attack / In: Disaster medicine. - 3rd - ed / M.A. Graber // ed. by G.R. Ciottone, P.D. Anderson, E. - Auf Der Heide. - Philadelphia: Mosby/ Elsevier, 2006. – chap 114. - P. - 647–649.
154. Green, R.N. Laboratory acquired melioidosis / R.N. Green, P.G. Tuffnell // Am. J. Med. – 1968. – Vol. 44. –P. 599-605.
155. Greenberg, E. Quorum-sensing in bacteria / E. Greenberg, S. Winans // Ann. Rev. Microbiol. - 1996. - Vol. 50. - P. 727-751.
156. Growing and analyzing static biofilms / Merritt J.H. et al. // Current Protocols in Microbiology. – 2011. P. 1B.1.1-1B.1.18.
157. Growing *Burkholderia pseudomallei* in Biofilm Stimulating Conditions Significantly Induces Antimicrobial Resistance [электронный ресурс] / C. Sawasdidoln , S. Taweechaisupapong , R.W. Sermswan et al. // PLoS One. – 2010. - Vol. 5, № 2. – e9196. - Режим доступа: <http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0009196>. - Загл. с экрана.
158. Haight, T.H. The antibacterial action of erythromycin / T.H. Haight, M. Fnland. // Proc. Soc. Exp. Biol. Med. - 1952. - Vol. 11. - P. 175-183.

159. Halving of mortality of severe melioidosis by ceftazidime / N.J. White, D. A. Dance, W. Chaowagul, Y. Wattanagoon, et al. // *Lancet*. – 1989. – Vol. 2. - P. 697-701.
160. Hand, W.L. The entry of antibiotics into human monocytes / W.L. Hand, N.L. King-Thompson // *J. Antimicrob. Chemother.* – 1989. – Vol. 23. - P. 681–689.
161. Haraga, A. *Burkholderia thailandensis* As A Model System for the Study of the Virulence-Associated Type III Secretion System of *Burkholderia pseudomallei*. / A. Haraga, T.E. West, M.J. Brittnacher // *Infect. Immun.* - 2008. – Vol. 76. – P. 5402-5411.
162. Harland, D.N. ATP-binding cassette systems in *Burkholderia pseudomallei* and *Burkholderia mallei* / D.N. Harland, E. Dassa, R.W. Titball // *BMC Genomics*. – 2007. – Vol. 8. – P. 83.
163. High level resistance to fluoroquinolones and cephalosporins in *Burkholderia pseudomallei* and closely related species / D.V. Viktorov, I.B. Zakharova, M.V. Podshivalova et al. // *Trans R. Soc. Trop. Med. Hyg.* – 2008. – Vol. 102. S. 103–110.
164. High-level antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm: the *ndvB* gene is involved in the production of highly glycerol-phosphorylated  $\beta$ -(1→3)-glucans, which bind aminoglycosides. I. Sadovskaya, E. Vinogradov, J. Li, A. Hachani et al. // *Glycobiology*. – 2010. – Vol. 20. – P. 895-904.
165. Horn, J.K. Bacterial agents used for bioterrorism / J.K. Horn // *Surg. Infect (Larchmt)*. – 2003. – Vol. 4, № 3. - P. 281-287.
166. Howe, C. Human glanders: report of six cases / C. Howe, W.R. Miller // *Ann. Intern. Med.* – 1947. – Vol. 26. – P. 93–115.
167. Howe, C. The *pseudomallei* group: a review / C. Howe, A. Sampath, M. Spotnitz // *J. Infect. Dis.* – 1971. – Vol. 124, № 6. – P. 598 – 606.
168. Identification of a bacterial factor required for actin-based motility of *Burkholderia pseudomallei* / M.P. Stevens, J.M. Stevens, R.L. Jeng et al. // *Mol Microbiol.* - 2005. – Vol. 56, № 1. - P. 40-53.

169. Identification of *Burkholderia pseudomallei* Genes Required for the Intracellular Life Cycle and *In Vivo* Virulence / S. Pilatz, K. Breitbach, N. Hein et al. // *Infect. Immun.* - 2006. – Vol. 74. - P. 3576-3586.
170. Implications of Amino Acid Substitutions in GyrA at Position 83 in Terms of Oxolinic Acid Resistance in Field Isolates of *Burkholderia glumae*, A Causal Agent of Bacterial Seedling Rot and Grain Rot of Rice / Y. Maeda, A. Kiba, K. Ohnishi, Y. Hikichi // *Appl. Environ. Microbiol.* - 2004. – Vol. 70. – P. 5613-5620.
171. *In vitro* activities of amoxicillin-clavulanate, doxycycline, ceftazidime, imipenem, and trimethoprim-sulfamethoxazole against biofilm of Brazilian strains of *Burkholderia pseudomallei* / T.J. Bandeira, C.A. Moreira, R.S. Brilhante et al. // *Antimicrob. Agents Chemother.* – 2013. – Vol. 57. – P. 5771–3.
172. *In vitro* antibacterial activities of the fluoroquinolones PD 117596, PD 124816, PD 127391 / M.A. Cohen, M.D. Huband, G.B. Mailloux et al. // *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* – 1991. – Vol. 14. – P. 245–258.
173. *In vitro* antibiotic susceptibilities of *Burkholderia mallei* (causative agent of glanders) determined by broth microdilution and E-test / H. Heine, M. England, D. Waag, W. Byrne // *Antimicrob. Agents Chemother.* - 2001. – Vol. 45. – P. 2119–2121.
174. *In vitro* antimicrobial activity of liposomal meropenem against *Pseudomonas aeruginosa* strains / Z. Drulis-Kawa, J. Gubernator, A. Doratkiewicz-Jach et al. // *Intern. J. Pharm.* – 2006. – Vol. 315, № 1–2. – P. 59-66.
175. *In vitro* susceptibilities of *Burkholderia mallei* in comparison to those of other pathogenic *Burkholderia* spp. / D.J. Kenny, P. Russell, D. Rogers et al. // *Antimicrob. Agents. Chemother.* – 1999. - Vol. 43. – P. 2773–2775.
176. Increased mutability of *Pseudomonas aeruginosa* in biofilms / K. Driffield K. Miller, J.M. Bostock, et al. // *J. Antimicrob. Chemother.* – 2008. – Vol. 61, № 5. – P. 1053-1056
177. Increasing resistance of planktonic and biofilm cultures of *Burkholderia cepacia* to ciprofloxacin and ceftazidime during exponential growth / M. Desai,

- T. Buhler, P.H. Weller, M.R. Brown // J. Antimicrob. Chemother. - 1998. – Vol. 42. – P. 153–160.
178. Inglis, T.J. Environmental factors that affect the survival and persistence of *Burkholderia pseudomallei* / T.J. Inglis, J.L. Sagripanti // Appl. Environ. Microbiol. – 2006. – Vol. 72. – P. 6865-6875.
179. Inglis, T.J. The Treatment of Melioidosis / T.J. Inglis // Pharmaceuticals. – 2010. – Vol. 3. – P. 1296-1303.
180. Interaction between *Burkholderia pseudomallei* and *Acanthamoeba* species results in coiling phagocytosis, endamebic bacterial survival, and escape / T.J. Inglis, P. Rigby, T.A. Robertson et al. // Infect. Immun. – 2000. – Vol. 68. – P. 1681–1686.
181. Interactions In-vitro between agents used to treat melioidosis / D.A.B. Dance, V. Wuthiekanun, W. Chaowagul, N.J. White // J. Antimicrob. Chemother. - 1989b. – Vol. 24. – P. 311–316.
182. Intracellular pharmacodynamics of antibiotics / S. Carryn, H. Chanteux, C. Seral, M.P. Mingeot-Leclercq et al. // Infect Di. Clin. North. Am. – 2003. – Vol. 17. - P. 615-634.
183. Iron availability influences aggregation, biofilm, adhesion and invasion of *Pseudomonas aeruginosa* and *Burkholderia cenocepacia* / F. Berlutti, C. Morea, A. Battistoni et al. // Int. J. Immunopathol. Pharmacol. - 2005. - Vol. 18, № 4. - P. 661–670.
184. Jayaraman, A. Bacterial Quorum Sensing: Signals, Circuits, and Implications for Biofilms and Disease / A. Jayaraman, T.K. Wood // Annu. Rev. Biomed. Eng. - 2008. - № 10. - P. 145–67.
185. Jones, A.L. Intracellular survival of *Burkholderia pseudomallei* / A.L. Jones, T.J. Beveridge, D.E. Woods // Infect. Immun. – 1996. – Vol. 64. - P. 782-90.
186. Juliano, B.L. The effect of particle size and change on the clearance rates liposomes and liposome encapsulated drugs / B.L. Juliano, D. Stamp // Biochem. Biophys. Res. com. – 1975. – Vol. 63. – P. 651-658.

187. Kamps, J.A. Uptake of liposomes containing phosphatidylserine by liver cells in vivo and by sinusoidal liver cells in primary culture in vivo-in vitro differences / J.A. Kamps, H.W. Morselt, G.L. Scherphof // *Biochem. biophys. Res. commun.* – 1999. – Vol. 256, № 1. – P. 57-62.
188. Karatan, E. Signals, regulatory networks, and materials that build and break bacterial biofilms/ E. Karatan, P. Watnick // *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* - 2009. - Vol. 73. - P. 310-347.
189. Konig, C. Effect of pathological changes of pH, pO<sub>2</sub>, and pCO<sub>2</sub> on the activity of antimicrobial agents in vitro / C. Konig, H.P. Simmen, J. Blaser // *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* – 1993. – Vol. 12. – P. 519–526.
190. Kovalev, G.K. Glanders (Review) / G.K. Kovalev // *Zh. Mikrobiol. Epidemiol. Immunobiol.* – 1971. – Vol. 48. - P. 63–70.
191. Kumar, A. Expression of resistance-nodulation-cell-division efflux pumps in commonly used *Burkholderia pseudomallei* strains and clinical isolates from northern Australia / A. Kumar, M. Mayo, L.A. Trunck et al. // *Trans R. Soc. Trop. Med. Hyg.* - 2008. – Vol. 102. - P. 145-51.
192. Kumar, A. Method for regulated expression of single-copy efflux pump genes in a surrogate *Pseudomonas aeruginosa* strain: identification of the BpeEF-OprC chloramphenicol and trimethoprim efflux pump of *Burkholderia pseudomallei* 1026b / A. Kumar, K.L. Chua, H.P. Schweizer // *Antimicrob. Agents Chemother.* - 2006. – Vol. 50, № 10. - P. 3460-3463.
193. Laboratory-acquired infection with *Pseudomonas pseudomallei* (melioidosis) / W.F. Schlech, J.B. Turchik, R.E. Westlake et al. // *N. Engl. J. Med.* – 1981. – Vol. 305 – P. 1133-1135.
194. Leelarasamee, A. Melioidosis: review and update / A. Leelarasamee, S. Bovornkitti // *Rev. Infect. Dis.* – 1989. – Vol. 11 - P. 413-25.
195. Li, X.Z. Efflux-Mediated Drug Resistance in Bacteria: An Update / X.Z. Li, H. Nikaido // *Drugs.* - 2009. – Vol. 69. – P. 1555-1623.

196. Life on the inside: The intracellular lifestyle of cytosolic bacteria / K. Ray, B. Marteyn, P.J. Sansonetti, C.M. Tang / Nat. Rev. Microbiol. – 2009. – Vol. 7. – P. 333–340.
197. Livermore, D.M. Interplay of impermeability and chromosomal beta-lactamase activity in imipenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* / D.M. Livermore // Ibid. – 1992. – Vol. 9, № 36. - P. 2046-2048.
198. Luft, J.H. Rutenium red and violet. I. Chemistry, purification, methods and use of electron microscopy and mechanism of action / J.H. Luft // Anat. Res. – 1971. – № 2. – P.347 –368.
199.  $\beta$ -Lactamase of *Pseudomonas pseudomallei* and its contribution to antibiotic resistance / D.M. Livermore, P.Y. Chau, A.I. Wong, Y.K. Leung // J. Antimicrob. Chemother. - 1987. - Vol. 20. – P. 313–321.
200. Management of accidental laboratory exposure to *Burkholderia pseudomallei* and *B. mallei* [электронный ресурс] / S.J. Peacock, H.P. Schweizer, D.A.B. Dance et al. // Emerg. Infect. Dis. - 2008. – Vol. 14. - e2. - Режим доступа: [http://wwwnc.cdc.gov/eid/article/14/7/07-1501\\_article](http://wwwnc.cdc.gov/eid/article/14/7/07-1501_article). - Загл. с экрана.
201. Marquez, B. Bacterial efflux systems and efflux pumps inhibitors / B. Marquez // Biochim.- 2005. – Vol. 87, № 12. - P. 1137-1147
202. Martinez, J.L. Interaction among strategies associated with bacterial infection: pathogenicity, epidemicity, and antibiotic resistance / J.L. Martinez, F. Baquera // Clin. Microbiol. Rev. - 2002. – Vol. 15. - P. 647 - 679.
203. Matthew, R. Sociomicrobiology: the connections between quorum sensing and biofilms / R. Matthew Parsek, E.P. Greenberg // Trends in Microbiology. - 2005. - Vol. 1. – P. 27-33.
204. McGilvray, C.D. The transmission of glanders from horse to man / C.D. McGilvray // Can. J. Public Health. – 1944. - Vol. 35. – P. 268–275.
205. Melioidosis: insights into the pathogenicity of *Burkholderia pseudomallei* / W.J. Wiersinga, T. Poll, N.J. White, N.P. Day, S.J. Peacock // Nat. Rev. Microbiol. – 2006. – Vol. 4. – P. 272–282.

206. Microscopy analysis of *B. mallei*-infected cells / L.D. Rotz, A.S. Khan S.R. Lillibridge et al. // *Emerg. Infect. Dis.* - 2002. - Vol. 8. - P. 225–230.
207. Miller, M.B. Quorum sensing in bacteria / M.B. Miller, B.L. Bassler // *Ann. Rev. Microbiol.* - 2001. - Vol. 55. - P. 165–199.
208. Mima, T. In vitro activity of cethromycin against *Burkholderia pseudomallei* and investigation of mechanism of resistance / T. Mima, H.P. Schweizer, Xu Z-Q. // *J. Antimicrob. Chemother.* – 2011. – Vol. 66. - P. 73–78.
209. Mima, T. The BpeAB-OprB efflux pump of *Burkholderia pseudomallei* 1026b does not play a role in quorum sensing, virulence factor production, or extrusion of aminoglycosides but is a broad-spectrum drug efflux system / T. Mima, H.P. Schweizer // *Antimicrob. Agents Chemother.* - 2010. – Vol. 54, № 8. - P. 3113-3122.
210. Molecular Basis of Rare Aminoglycoside Susceptibility and Pathogenesis of *Burkholderia pseudomallei* Clinical Isolates from Thailand [электронный ресурс] / L.A. Trunck, K.L. Propst, V. Wuthiekanum et al. // *PLOS Neglected Tropical Disease* – 2009. – Vol. 3 № 9. – e519. - Режим доступа: <http://dx.doi.org/10.1371%2Fjournal.pntd.0000519>. - Загл. с экрана.
211. Molecular Investigations of PenA-mediated beta-lactam Resistance in *Burkholderia pseudomallei* / D.A. Rholl, K.M. Papp-Wallace, A.P. Tomaras et al. // *Front. Microbiol.* – 2011. - Vol. 2. - P. 139.
212. Muhammad, G. Clinico-microbiological and therapeutic aspects of glanders in equines / G. Muhammad, M.Z. Khan, M. Athar // *Equine Sci.* – 1998 – Vol. 9. – P. 93-96.
213. Multicenter prospective randomized trial comparing ceftazidime plus cotrimoxazole with chloramphenicol plus doxycycline and co-trimoxazole for treatment of severe melioidosis / M. Sookpranee, P. Boonma, W. Susaengrat, K. Bhuripanyo et al. // *Antimicrob. Agents Chemother.* - 1992. – Vol. 36. - P. 158-162.
214. *N* - Octanoylhomoserine lactone signalling mediated by the BpsI-BpsR quorum sensing system plays a major role in biofilm formation of *Burkholderia*

- pseudomallei* / Akshamal Mihiranga Gamage, Guanghou Shui, R. Markus Wenk, Kim Lee Chua // *Microbiology*. - 2011. – Vol. 157, № 4. - P. 1176–1186.
215. Najar, I. Kinetics of the uptake of rifampicin and tetracycline into mouse macrophages: in vitro study of the early stages / I. Najar, J. Oberti, J. Teyssier, R. Caravano // *Pathol. Biol. (Paris)*. – 1984. – Vol. 32. – P. 85-89.
216. Nathan, S.A. An electronmicroscopic study of the interaction of *Burkholderia pseudomallei* and human macrophages / S.A. Nathan, S.D. Puthucheary // *Malaysian J. Pathol.* – 2005. – Vol. 27. – P. 3-7.
217. Nicoletti, P.L. Glanders. In: *Equine infectious diseases 9th* / P.L. Nicoletti, D.C. Sellon, M.T. Long et al. // St. Louis: Saunders, 2007. – P. 345–348.
218. Niumsup, P. Cloning of the class D beta-lactamase gene from *Burkholderia pseudomallei* and studies on its expression in ceftazidime-susceptible and -resistant strains / P. Niumsup, V. Wuthiekanun // *J. Antimicrob. Chemother.* - 2002. – Vol. 50, № 4. - P. 445-455.
219. O'Toole, G.A. Biofilm formation as microbial development / G.A. O'Toole, H.B. Kaplan, R. Kolter // *Ann. Rev. Microbiol.* – 2000. – Vol. 54. – P. 49–79.
220. Open-label randomized trial of oral trimethoprim-sulfamethoxazole, doxycycline, and chloramphenicol compared with trimethoprim sulfamethoxazole and doxycycline for maintenance therapy of melioidosis / W. Chaowagul, W. Chierakul, A.J. Simpson, J.M. Short et al. // *Antimicrob. Agents Chemother.* – 2005. – Vol. 49. – P. 4020-4025.
221. Pan, J. Quorum sensing inhibitors: a patent overview / J. Pan, D. Ren // *Expert Opin. Ther. Pat.* – 2009. – Vol. 19. – P. 1581–1601.
222. Paulson, D.S. *Biostatistics and Microbiology – A Survival Manual* / D.S Paulson. - New York: Springer, 2008. – p. 221
223. Pawana, P. Antimicrobial agents and *Burkholderia pseudomallei*: perspectives from Thailand / P. Pawana // *Asian Biomedicine*. - 2014. - Vol. 8, № 2. P. 167-172.

224. Persister cells mediate tolerance to metal oxyanions in *Escherichia coli* / J.J. Harrison, H. Ceri, N.J. Roper et al. // *Microbiology*. - 2005. - Vol. 151. - P. 3181-3195.
225. Pharmacokinetics of liposomal gentamicin / K.A. Rotov, S.N. Tikhonov, V.V. Alekseev, E.A. Snatnikov // *Bull. Expert Biol. Med.* – 2012. – Vol. 4. - P. 464 - 466.
226. Poole, K. Efflux-mediated antimicrobial resistance / Poole, K. // *J. Antimicrob. Chemother.* - 2005.- Vol. 56. – P. 20-51.
227. Postantibiotic effect and *Burkholderia (Pseudomonas) pseudomallei*: an evaluation of current treatment / A.L. Walsh, M.D. Smith, V. Wuthiekanum, N.J. White // *J. Antimicrob. Chemother.* – 1995. – Vol. 39. – P. 2356-2358.
228. Present and future therapeutic strategies for melioidosis and glanders / D.M. Estes, S.W. Dow, H.P. Schweizer, A.G. Torres // *Expert Rev. Anti-Infect. Ther.* – 2010. – Vol. 8. – P. 325-338.
229. Pruksachartvuthi, S. Survival of *Pseudomonas pseudomallei* in human phagocytes / S. Pruksachartvuthi, N. Aswapokee, K. Thankerngpol // *J. Med. Microbiol.* – 1990. – Vol. 31. – P.109-114.
230. *Pseudomonas pseudomallei*: susceptibility to chemotherapeutic agents / T.C. Eickhoff, J.V. Bennett, P.S. Hayes, J. Feeley // *J. infect. Dis.* – 1970. –Vol. 121. - P. 95-102.
231. Public health assessment of potential biological terrorism agents / L.D. Rotz, A.S. Khan, S.R. Lillibridge et al. // *Emerg. Infect. Dis.* - 2002. – Vol. 8. - P. 225-230.
232. Pushkareva, V.I. *Listeria monocytogenes* virulence factor Listeriolysin O favors bacterial growth in co-culture with the ciliate *Tetrahymena pyriformis*, causes protozoan encystment and promotes bacterial survival inside cysts humans [электронный ресурс] / V.I. Pushkareva, S.A Ermolaeva // *BMC Microbiology*. – 2010. – Vol.10, № 26 – Режим доступа: <http://www.biomedcentral.com/content/pdf/1471-2180-10-26.pdf> - Загл. с экрана.
233. Puthucheary, S.D. Human melioidosis / S.D. Puthucheary, J. Vadivelu. –

Singapore, 2002. – 95 p.

234. Puthucheary, S.D., Comparison by electron microscopy of intracellular events and survival of *Burkholderia pseudomallei* in monocytes from normal subjects and patients with melioidosis / S.D. Puthucheary, S.A. Nathan // Singapore Med. J. – 2006. – Vol. 47. - P. 697-703

235. *Quorum sensing* inhibitors increase the susceptibility of bacterial biofilms to antibiotics *in vitro* and *in vivo* / G. Brackman, P. Cos, L. Maes et al. // Antimicrob. Agents Chemother. - 2011. – Vol. 55, № 6. - P. 2655-2661.

236. Quorum-sensing mutations affect attachment and stability of *Burkholderia cenocepacia* biofilms / K.L. Tomlin, R.J. Malott, G. Ramage et al. // Appl. Environ. Microbiol. – 2005. - Vol. 71. - P. 5208–5218.

237. Rasmussen, B.A. Carbapenem-hydrolyzing betalactamases / B.A. Rasmussen, K. Bush // Antimicrob. Agents Chemother. – 1997. – Vol. 41. - P. 223-232.

238. Resistance of *Pseudomonas pseudomallei* growing as a biofilm on silastic discs to ceftazidime and co-trimoxazole / M. Vorachit, K. Lam, P. Jayanetra, J.W. Costerton // Antimicrob Agents Chemother. - 1993. – Vol. 37, № 9. - P. 2000-2002.

239. Retsema , J.A. Effects of the environmental factors on the *in vitro* potency of azithromycin / J.A. Retsema, L.A. Brennan, A.E. Girard // Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. – 1991. – Vol. 10. – P. 834-842.

240. Ribot, W.J. The Animal Pathogen-Like Type III Secretion System is Required for the Intracellular Survival of *Burkholderia mallei* Within J774.2 Macrophages / W.J. Ribot, R.L. Ulrich // Infect. Immun. - 2006. – Vol. 74. - P. 4349-4353.

241. Risk of occupationally acquired illnesses from biological threat agents in unvaccinated laboratory workers / J.M. Rusnak, M.G. Kortepeter, R.J. Hawley et al. // Biosecur. Bioterror. – 2004. – Vol. 2. – P. 281–293.

242. Rodney, M. Biofilms: Survival Mechanisms of Clinically Relevant Microorganisms / M. Rodney, J. Donlan, W. Costerton // *Clinical Microbial. Reviews.* - 2002. - Vol. 15 - P. 167–193.
243. Rosenblatt J.E. Effect of Several Components of Anaerobic Incubation on Antibiotic Susceptibility Test Results / E.J. Rosenblatt, F. Schoenknecht // *Antimicrob Agents Chemother.* – 1972. – Vol. 1, № 5. - P. 433–440.
244. Sam, I.C. Variations in ceftazidime and amoxicillin-clavulanate susceptibilities within a clonal infection of *Burkholderia pseudomallei* / I.C. Sam, K.H. See, S.D. Puthucheary // *J. Clin. Microbiol.* - 2009. – Vol. 47. – P. 1556–1558.
245. Schlech, W.F. Human melioidosis / W.F. Schlech, J. Vadivelu – Singapore, 2002. – 95 p.
246. Schweizer, H.P. Mechanisms of antibiotic resistance in *Burkholderia pseudomallei*: implications for treatment of melioidosis / H.P. Schweizer // *Future Microbiol.* – 2012. – Vol. 7. – P. 1389–99.
247. Shah, K.D. Specialized persister cells and the mechanism of multidrug tolerance in *Escherichia coli* / K.D. Shah, A.N. Spoering, K.K. Lewis // *Bacteriol.* - 2004. - Vol. 186. - P. 8172-8180.
248. Shalom, G. *In vivo* expression technology Identifies a type VI secretion system Locus in *Burkholderia pseudomallei* that is Induced upon invasion of macrophages / G. Shalom, J.G. Shaw, M.S. Thomas. // *Microbiology.* - 2007. – Vol. 153. - P. 2689-2699.
249. Shoemaker, E.H. Clinical evaluation of erythromycin / E.H. Shoemaker, E.M. Yaw. // *Arch. Intern. Med.* – 1954. – Vol. 93. – P. 397-406.
250. Short report: Melioidosis in Myanmar: forgotten but not gone? / V. Wuthiekanun, S. Langa, W. Swaddiwudhipong, W. Jedsadapanpong et al. // *Am.J Trop. Med. Hyg.* – 2006. – Vol. 75. – P. 945-946.
251. Simpson, A.J. Aminoglycoside and Macrolide Resistance in *Burkholderia pseudomallei* / A.J. Simpson, N.J. White, V. Wuthiekanun // *Antimicrob. Agents Chemother.* – 1999. – Vol. 43. – P. 2332.

252. Sponza, D.T. Investigation of extracellular polymer substances (epS) and physicochemical properties of different activated sludge flocs under steady-state conditions / D.T. Sponza // *Enzyme Microb. Technol.* - 2003. - Vol. 32. - P. 375-385.
253. Strategies for Intracellular Survival of *Burkholderia pseudomallei* / E. Allwood, R.J. Devenish, M. Prescott et al. // *Front Microbiol.* – 2011. – Vol. 2. – P. 170.
254. Structural flexibility in the *Burkholderia mallei* genome / W.C. Nierman, D. DeShazer, H.S. Kim, H. Tettelin et al. / *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2004. – Vol. 101. – P. 14246–14251.
255. Studies on Certain Biological Characteristics of *Malleomyces mallei* and *Malleomyces pseudomallei*: II. Virulence and Infectivity for Animals / W.R. Miller, L. Pannell, L. Cravitz, W.A. Tanner et al. // *Journal of Bacteriology* – 1948 – Vol. 55, № 1. – P. 127-135.
256. Studies on the involvement of the exopolysaccharide produced by cystic fibrosis-associated isolates of the *Burkholderia cepacia* complex in biofilm formation and in persistence of respiratory infections / M.V. Cunha, S.A. Sousa, J.H. Leitaõ et al. // *J. Clin. Microbiol.* - 2004. - Vol. 42. – P. 3052–3058.
257. Survival and persistence of opportunistic *Burkholderia* species in host cells / M.A. Valvano, K.E. Keith et al. // *Current Opinion in Microbiology.* - 2005. – Vol. 8. - P. 99–105.
258. Survival strategies of infectious biofilms / J.W. Costerton, C.A. Fux, P.S. Stewart et al. / *Trends in Microbiology.* - 2005. - Vol. 13. – P. 34-40.
259. Sutherland, I.W. Biofilm exopolysaccharides: a strong and sticky framework / I.W. Sutherland // *Microbiology.* - 2001. - Vol. 147. - P. 3-9.
260. Szoka, J.F. Procedure for preparation of liposomes with large internal aqueous space and high capture by reverse-phase evaporation. / J.F. Szoka, D. Papahadjopoulos // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* – 1978 – Vol. 75, № 9. P. 4194–4198.
261. Tandhavanant, S. Effect of colony morphology variation of *Burkholderia pseudomallei* on intracellular survival and resistance to antimicrobial environ-

- ments in human macrophages in vitro / S. Tandhavanant, A. Thanwisai, D. Limmathurotsakul // BMC Microbiol. – 2010. – Vol. 10. – P. 303-315.
262. *Tetrahymena*: an alternative model host for evaluating virulence of *Aeromonas* strains [электронный ресурс] / Panq M-D., Lin X-Q., Hu M et al. // PLoS ONE. – 2012. - Vol.7, № 11. - e48922. – Режим доступа: <http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0048922>. – Загл. с экрана.
263. The antimicrobial susceptibility of *Pseudomonas pseudomallei*. Emergence of resistance In-vitro and during treatment / D.A.B. Dance, V. Wuthiekanun, W. Chaowagul, N.J. White // J. Antimicrob. Chemother. - 1989a. – Vol. 24. – P. 295–309.
264. The Cluster 1 Type VI Secretion System is a Major Virulence Determinant in *Burkholderia pseudomallei* / M.N. Burtnick, P.J. Brett, S.V. Harding et al. // Infect. Immun. – 2011. – Vol. 79, № 4. – P. 1512-1525.
265. The entry of meropenem into human macrophages and its immunomodulating activity / A.M. Cuffini, V. Tullio, A. Allocco et al. // Ibid – 1993. – Vol.11, № 32. – P. 695-697.
266. The epidemiology of melioidosis in Australia and Papua New Guinea / B.J. Currie, D.A. Fisher, D.M. Howard et al. // Acta Tropica. – 2000. – Vol. 74. – P. 121-127.
267. The molecular and cellular basis of pathogenesis in melioidosis: how does *Burkholderia pseudomallei* cause disease? / N.R. Lazar, B. Govan, M. Cullinane et al. // FEMS Microbiol. Rev. - 2009. - Vol. 33, № 6. - P. 1079-1099.
268. The physiology and collective recalcitrance of microbial biofilm communities / P. Gilbert, T. Maira - Litran, A.J. Mcbain et al. // Adv. Microb. physiol. - 2002. - Vol. 46. - P. 202-256.
269. Treatment of Pulmonary Melioidosis with Combination of Trimethoprim and Sulfamethoxazole / P.B. Fuller, D.E. Fisk, R.B. Byrd et al. // Chest. – 1978. - Vol. 74. - P. 222-224.

270. Trimethoprim/Sulfamethoxazole Resistance in Clinical Isolates of *Burkholderia pseudomallei* / V. Wuthiekanun, A.C. Cheng, W. Chierakul, P. Amornchai et al. // *J. Antimicrob. Chemother.* - 2005. – Vol. 55. – P. 1029-1031.
271. Ulett, G.C. *Burkholderia pseudomallei* virulence: definition, stability and association with clonality / G.C. Ulett, B.J. Currie, T.W. Clair // *Microbes Infect.* – 2001. – Vol. 3. - P. 621-631.
272. Use of the quorum sensing inhibitor furanone C-30 to interfere with biofilm formation by *Streptococcus mutans* and its luxS mutant strain / Z. He, Q. Wang, Y. Hu et al. // *International Journal of Antimicrobial Agents.* – 2012. – Vol. 40. – P. 30-35.
273. Van Der Lugt, J.J. Glanders / J.J. Van Der Lugt, G.C. Bishop // In: *Infectious Diseases of Livestock*, ed. by J.A.W. Coetzer, R.C. Tustin. - Oxford, England: Oxford University Press, 2004. - Vol. 3. - 2nd - ed. – P. 1500-1504.
274. Variable Virulence Factors in *Burkholderia pseudomallei* (Meloidosis) Associated with Human Disease [электронный ресурс] / D.S. Sarovich, E.P. Price, J.R. Webb et al. // *PLoS ONE.* – 2014. – Vol. 9, №3. - e91682. – Режим доступа:<http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0091682>. - Загл. с экрана.
275. Virulence of *Burkholderia mallei* Quorum-Sensing Mutants / Majerczyk, L. Kinman, T. Han, R. Bunt, et al. // *Infection and Immunity.* - 2013. - Vol. 81, № 5. - P. 1471–1478.
276. Virulence of *Burkholderia pseudomallei* does not correlate with biofilm formation / S. Taweechaisupapong, C. Kaewpa, C. Arunyanart, P. Kanla, P. Homchampa et al. // *Microb. Pathog.* – 2005. - Vol. 39. - P. 77–85.
277. Waag, D.M. Glanders: new insights into an old disease. In: *Biological weapons defense: infectious diseases and counter bioterrorism* / D.M. Waag, D. DeShazer // ed. by L.E. Lindler, F.J. Lebeda, G.W. Korch. N.J. Totowa. - Humana Press, 2004. - P. 209–237.

278. Wiersinga, W.J. Melioidosis / W.J. Wiersinga, B.J. Currie , S.J. Peacock // N. Engl. J. Med. – 2012. - Vol. 367, №11. – P. 1035-1044.
279. Woods, D.E. In: The Prokaryotes. Proteobacteria: Alpha and Beta Subclasses. - 3rd - ed. / D.E. Woods, P.A. Sokol // ed. by M. Dworkin, S. Falkow, E. Rosenberg, K.H Schleifer, E. Stackebrandt. - Springer. New York, 2006. - Vol. 5. - P. 443-450.
280. Wuthiekanun, V. Management of melioidosis / V. Wuthiekanun, S.J. Peacock // Expert Rev. Anti Infect. Ther. – 2006. – Vol. 4. – P. - 445–455.
281. Yamamoto, T. In vitro susceptibility of *Pseudomonas pseudomallei* to 27 antimicrobial agents / T. Yamamoto, P. Naigowit, S. Dejsirilert // Antimicrob. Agents Chemother. – 1990. – Vol. 32. – P. 2027-2029.
282. Zandt, K.E.V. Glanders: an overview of infection in humans [электронный ресурс] / K.E.V. Zandt, M.T. Greer, H.C. Gelhaus // Journal of Rare Diseases. – 2013. – Vol. 8. – e131. – Режим доступа: <http://www.ojrd.com/content/8/1/131>. - Загл. с экрана.