

Бердалиева Ф.А.

ОБОСНОВАНИЕ ПОДХОДОВ К ЭТИОТРОПНОМУ ЛЕЧЕНИЮ БРУЦЕЛЛЁЗА

F.A. Berdalieva

SUBSTANTIATION OF APPROACHES TO AETIOTROPIC TREATMENT OF BRUCELLOSIS

УДК:532.546.56

Оценивалась эффективность существующих схем этиотропной терапии бруцеллёза *in vitro* и *in vivo* с учётом внутриклеточного паразитирования возбудителя. Исследование проводилось в три этапа: на первом была оценена эффективность противобруцеллёзных препаратов в Е-тесте, а на втором – в культуре клеток, а на третьем оценивалась эффективность существующих схем лечения бруцеллёза с использованием изученных на 1-м и 2-м этапах препаратов. Наиболее эффективными противобруцеллёзными препаратами *in vitro* являются доксициклин и ципрофлоксацин, которые также проявили высокую внутриклеточную активность. Наибольшая частота рецидивов отмечена в группе больных, получавших комбинацию доксициклин плюс гентамицин, что находит объяснение в отсутствии внутриклеточной активности у гентамицина.

Ключевые слова: бруцеллёз, антимикробные препараты, лечение

Effectiveness of existing schemes of a causal treatment of brucellosis in vitro and in vivo taking into account an intracellular parasitism of the agent was estimated. Research was carried out to three stages: on the first one effectiveness of antibrucella preparations in the E-test, and on the second — in culture of cells was estimated, and on the third effectiveness of existing schemes of treatment of brucellosis with use preparations studied on the 1st and 2nd stages was estimated. The most efficient antibrucella preparations in vitro are doxycycline and ciprofloxacin which also showed high intracellular activity. The most frequency of relapses was noted in a group of patients receiving a combination of doxycycline plus gentamycin that finds an explanation in lack of intracellular activity of gentamycin.

Key words: brucellosis, antimicrobials, treatment

Персистенция бруцелл в макроорганизме во многом обусловлено способностью этих бактерий к внутриклеточному существованию в макрофагах хозяев [1]. Как следствие, противобруцеллёзные агенты должны быть способны проникать внутрь клеток в дозах, достаточных для действия на бруцеллы [1]. Тем не менее, лишь ограниченное число препаратов обладает такими свойствами. В 1986 году ВОЗ выпустила рекомендации по лечению бруцеллёза у людей с использованием доксициклина в комбинации либо с рифампицином, либо со стрептомицином [2]. Хотя эти рекомендации всё ещё актуальны, и изоляты бруцелл в целом чувствительны к вышеупомянутым препаратам, имеются отдельные сообщения об антибиотикорезистентности бруцелл [3, 4]. Как свидетельствуют данные литературы, чувствительность к антибактериальным препаратам бруцелл может варьировать в различные периоды времени и в различных регионах [5-6]. Высокая частота побочных эффектов от исполь-

зования традиционных схем лечения бруцеллёза и значительная частота рецидивов после проведённой этиотропной терапии побуждают к поиску новых подходов к лечению данной инфекции. Фторхинолоны, как препараты, проникающие внутрь клеток, могут служить хорошей альтернативой традиционно применяющимся антибиотикам [7, 8].

Тем самым, эрадикация бруцелл возможна лишь при их уничтожении во внутриклеточной нише. Оценка внутриклеточной активности антибактериальных препаратов в отношении бруцелл позволяет рекомендовать обоснованные режимы этиотропного лечения.

Цель работы: Оценить эффективность существующих схем этиотропной терапии бруцеллёза *in vitro* и *in vivo* с учётом внутриклеточного паразитирования возбудителя.

Материалы и методы

Исследование проводилось в три этапа: на первом была оценена эффективность противобруцеллёзных препаратов в Е-тесте, а на втором – в культуре клеток, а на третьем оценивалась эффективность существующих схем лечения бруцеллёза с использованием изученных на 1-м и 2-м этапах препаратов.

I этап исследования

Бактериальные штаммы: 126 штаммов *Brucella melitensis*, выделенных на территории Южно-Казахстанской области из различных клинических источников (кровь, ликвор, синовиальная жидкость) в период с 2004 по 2010 годы. В качестве контрольного для биотипирования и оценки антибиотикочувствительности использовался референтный штамм *B. melitensis* 16М из коллекции Казахского научного центра карантинных и зоонозных инфекций.

Изучение чувствительности к антибактериальным препаратам: определялась минимальная ингибирующая концентрация (МИК) доксициклина, рифампицина, гентамицина, ципрофлоксацина и комбинации триметоприм-сульфаметоксазол (ТМП/СМ) с помощью Е-теста (Biometrieux, Швеция) на бруцелл-агаре (Hi-media, Индия) с добавлением 5% овечьей сыворотки с оценкой результатов через 48 часов инкубции на воздухе (вне CO₂-инкубатора) при температуре 37°C.

II этап исследования

Человеческие моноциты были использованы как наиболее полно соответствующие по своим характеристикам макрофагам больного человека. В качестве модельной культуры был использован

типовой штамм *Brucella melitensis* 1251, поскольку в Казахстане преобладает бруцеллёз козе-овечьего типа. Культура *B. melitensis* 1251 выращивалась пересевом музейных штаммов на чашки с Бруцелла-агаром производства Hi-media (India) и инкубировалась в течение 48 часов при температуре 37°C. Эти первичные чашки использовались для моделирования внутриклеточной бруцеллёзной инфекции.

Как предварительная часть исследования нами было выполнено определение минимальной ингибирующей концентрации в отношении бруцелл каждого из изучавшихся препаратов (рифампицин, ципрофлоксацин, тетрациклин, доксициклин, гентамицин и стрептомицин) методом серийных разведений в печёночном бульоне.

Инфицированная культура клеток была пролечена 8, 4, 1 и 0,25 × минимальными подавляющими концентрациями (МИК) каждого из препаратов.

В качестве контрольной группы служила неинфицированная линия клеток, пролеченная теми же препаратами в тех же дозах.

Инкубация осуществлялась в течение 2 часов, после чего клеточный пул собирался посредством центрифугирования при 200 × g в течение 6 минут. Среда, содержащая антибактериальный препарат, удалялась посредством отсасывания. Клетки дважды отмывались фосфатным буфером для удаления остатка антибактериального препарата. После этого к клеткам добавляли 0,1% Triton X-100 (Sigma-Aldrich) для провокации их лизиса и высвобождения внутриклеточного возбудителя. Об уровне эрадикации внутриклеточных бруцелл судили по числу КОЕ после посева клеточного лизата на твёрдую питательную среду.

III этап исследования

Под нашим проспективным наблюдением находилось 84 больных с острым бруцеллёзом с положительной гемокультурой (во всех случаях была выделена *B. melitensis*), получавшие лечение согласно схеме. В настоящее исследование включены только случаи, когда больные принимали предписанные препараты корректно и полностью завершили курс лечения.

Из 84 наблюдавшихся 56 (66,7%) были мужчины, а 28 (33,3%) - женщины. Возраст пациентов варьировал от 14 до 62 лет (36,4±5,26).

У всех пациентов отмечались симптомы, характерные для острого бруцеллёза. У 12 больных были симптомы спондилита, у 1- сакроилеита, у 8- орхита.

У каждого больному выполнялись стандартные диагностические серологические исследования (Роз-Бенгал проба, реакции Райта и Хеддльсона), а также не менее 4 исследований на гемокультуру бруцелл. Идентификация бруцелл проводилась общепринятыми методами.

Определение минимальной ингибирующей концентрации в отношении бруцелл каждого из изучавшихся препаратов (рифампицин, ципрофлоксацин, тетрациклин, доксициклин, гентамицин и

стрептомицин) методом серийных разведений в печёночном бульоне.

Наличие симптомов основного заболевания у больного после проведения курса этиотропного лечения расценивалось как несостоятельность терапии.

Пациенты были разбиты на три группы по 28 человек в каждой, получавшие различные режимы антибактериальной терапии: группа А получала доксициклин по 100 мг 2 раза в день плюс гентамицин 2 мг / кг в три приёма внутримышечно; группа Б получала доксициклин по 100 мг 2 раза в день плюс ципрофлоксацин по 1 г 4 раза в день; группа В получала доксициклин по 100 мг 2 раза в день плюс рифампицин по 150 мг 4 раза в день. Продолжительность лечения гентамицином составила 14 дней, пероральными антибактериальными препаратами – 45 дней.

После проведения лечения больные наблюдались в течение 3 месяцев с ежемесячной постановкой серологических реакций на бруцеллёз и посевом крови на гемокультуру бруцелл.

Полученные результаты

I этап исследования

В настоящем исследовании мы провели изучение активности *in vitro* в отношении клинических изолятов бруцелл традиционно применяемых для лечения бруцеллёза в Казахстане антибиотиков (доксициклин, рифампицин, гентамицин) и сульфаниламидов (ТМП/СМ), а также фторхинолона, введённого в схему этиотропной терапии данной инфекции в последнее время – ципрофлоксацина.

В целом все изучавшиеся штаммы бруцелл оказались чувствительными к исследуемым антибактериальным препаратам.

В соответствии с МИК₉₀ наиболее эффективным *in vitro* в отношении бруцелл препаратом оказался доксициклин (0,07 мг/мл). Второе место по эффективности занял ципрофлоксацин (0,098 мг/мл). Несмотря на то, что рифампицин *in vitro* оказался эффективен в отношении клинических изолятов бруцелл,стораживают его относительно высокие МИК, необходимые для подавления бактериального роста. Это можно связать с тем, что на территории Южно-Казахстанской области помимо бруцеллёза также широко распространён и туберкулёз, для лечения которого широко применяется данный препарат. Это может приводить к селекции устойчивых штаммов бруцелл, например, при микст-инфекции.

Несмотря на появление новых противобруцеллёзных препаратов, производные тетрациклина всё ещё остаются наиболее часто назначаемыми антибиотиками для лечения бруцеллёза в Казахстане в связи с их отличными фармакокинетическими характеристиками. Оправданность такого подхода подтверждают и наши исследования. Доксициклин как по МИК₅₀, так и МИК₉₀ оказался наиболее эффективен в отношении клинических изолятов бруцелл *in vitro*.

Другим препаратом выбора для лечения бруцеллёза, согласно схеме ВОЗ 1986 года, является рифампицин. В нашем исследовании этот антибиотик, хотя и оказался эффективен в отношении клинических изолятов бруцелл, потребовал относительно более высоких концентраций по сравнению с другими препаратами. Это может свидетельствовать о нарастании антибиотикорезистентности по отношению к рифампицину в регионе южного Казахстана.

Гентамицин показал относительно низкую эффективность в отношении бруцелл. В этой связи и в связи с его известной ототоксичностью следует пересмотреть практику частого включения данного антибиотика в схему лечения бруцеллёза у детей.

ТМП/СМ показал достаточно высокую эффективность в отношении бруцелл. Его низкая стоимость и простота применения (перорально) делает его перспективным для лечения неосложнённых форм бруцеллёза.

Наше исследование, проведённое в отношении цiproфлоксацина, показало, что этот фторхинолон более эффективен в отношении бруцелл, нежели другие препараты, хотя и уступает доксициклину. В этой связи случаи клинической неэффективности цiproфлоксацина (in vitro) нуждаются в дополнительном изучении.

II этап исследования

На протяжении всего периода наблюдения не было выявлено каких-либо токсических эффектов от применённых антибактериальных препаратов в отношении не инфицированной клеточной линии.

Внутриклеточной эрадикации бруцелл удалось достичь лишь при использовании 8 МИК гентамицина и стрептомицина, поскольку эти антибиотики практически не проникали внутрь клеток.

Рифампицин и тетрациклины успешно снижали число внутриклеточных бактерий уже при 0,25 МИК, а цiproфлоксацин – при 1 МИК.

Таким образом, стрептомицин и гентамицин, входящие в рекомендуемые ВОЗ схемы этиотропного лечения бруцеллёза, не позволяют достичь эффективной эрадикации внутриклеточного возбудителя. Наибольшую эффективность в отношении внутриклеточных бруцелл показали тетрациклины и рифампицин.

III этап исследования

Начальный период этиотропного лечения у всех наблюдавшихся больных протекал благоприятно и сопровождался угасанием симптомов общей интоксикации: аксилярная температура снижалась до нормальных цифр на 1-3 сутки от начала заболевания, снижалась или исчезала слабость, головная боль, общее недомогание.

Рецидив бруцеллёза отмечался у 6 (21,4%) больных из группы А, у 3 (10,7%) - из группы Б и у 2 (7,1%) - из группы В. В 1 случае рецидив наступил в первый месяц после окончания этиотропного лечения, в 9 – на второй и в 2 – на третий. В 18 случаях после окончания этиотропного лечения наблюдалось повторное выделение культуры *B. melitensis*.

Среди больных с рецидивами бруцеллёза не было выявлено статистически значимых различий в поле, возрасте и длительности заболевания до начала этиотропного лечения. Наибольшую частоту рецидивов дал режим А, что находит объяснение в отсутствии внутриклеточной активности у гентамицина.

Минимальные ингибирующие концентрации (МИК) исследуемых препаратов в отношении клинических изолятов бруцелл у больных с и без рецидивов были схожими.

МИК для бруцелл, выделенных в начале заболевания, и для микроорганизмов, выделенных в период рецидива не дали статистических различий для всех изучаемых препаратов.

Выводы:

1. Наиболее эффективными противобруцеллёзными препаратами in vitro по данным Е-теста являются доксициклин и цiproфлоксацин, которые также проявили высокую внутриклеточную активность.

2. Отмечается тенденция к нарастанию резистентности по отношению к рифампицину у клинических изолятов бруцелл, выделенных в Южно-Казахстанской области.

3. Бруцеллы в период всего заболевания, согласно нашим наблюдениям, сохраняют сходную чувствительность по отношению к этиотропным агентам, которая не изменяется и в период рецидива. Тем самым, можно полагать, что в основе несостоятельности лечения бруцеллёза лежат механизмы внутриклеточного выживания возбудителя.

Литература:

1. Pappas G., Papadimitriou P., Akritidis N. et al. The new global map of human brucellosis // Lancet Infect. Dis. - 2006. - V. 6. - P. 91-99
2. Joint Food and Agriculture Organization / World Health Organization. FAO-WHO Expert Committee on Brucellosis (sixth report). WHO technical report series №740. - Geneva: WHO, 1986. - P. 56-57
3. Baykam N., Esener H., Ergonul O. et al. In vitro antimicrobial susceptibility of Brucella species // Intern. J. Antimicrob. Agents. - 2004. - V. 23. - P. 405-407
4. Lopez-Merino A., Contreras-Rodriguez A., Migranas-Ortiz R. et al. Susceptibility of Mexican brucella isolates to moxifloxacin, ciprofloxacin and other antimicrobials used in the treatment of human brucellosis // Scand. J. Infect. Dis. - 2004. - V. 36. - P. 636-638
5. De Rautlin de la Roy Y.M., Grignon B., Grollier G., Coindreau MFBecq-Giraudon B. Rifampicin resistance in a strain of Brucella melitensis after treatment with doxycycline and rifampicin // J. Antimicrob. Chemother. - 1986. - V. 18. - P. 648-649
6. Kinsara A., Al-Mowallad A., Osoba O.A. Increasing resistance of Brucellae to co-trimoxazole // Antimicrob. Agents Chemother. - 1999. - V. 43. - P. 1531
7. Kilic S., Dizbay M., Cabadak H. In vitro activity of tigecycline, tetracycline and fluoroquinolones against Brucella melitensis. J. Chemother. - 2008. - V.20. - P.33-37
8. Garcia-Rodriguez J.A., Garcia-Sanchez J.E., Trujillano I. Lack of effective bactericidal activity of new quinolones against Brucella spp. // Antimicrob Agents Chemother. - 1991. - V. 35. - P. 756-759

Рецензент: к.м.н. Имашев У.Д.