

Сарсенбаев С.Е.

СОВРЕМЕННЫЕ ПОДХОДЫ К ЛЕЧЕНИЮ ПСЕВДОМОНАДОЗОВ

S.E. Sarsenbaev

CURRENT APPROACHES TO TREATMENT PSEUDOMONADS

УДК: 546.8:616.981.48

Было выполнено исследование, направленное на повышение эффективности этиотропной терапии заболеваний, обусловленных псевдомонадами. Исследование состояло из двух фрагментов: изучение влияния антибактериальных препаратов как на планктонные штаммы псевдомонад, так и образующих биоплёнки, *in vitro*, и клиническая апробация результатов, полученных в первом фрагменте. Установлено, что в присутствии антибактериальных препаратов, проникающих внутриклеточно, снижается образование биоплёнок клиническими изолятами псевдомонад. Папаин потенцирует действие антибактериальных препаратов, направленное на снижение образования биоплёнок псевдомонадами. Использование клинического протокола антипсевдомонадной терапии, основанного на этих данных, позволило повысить эффективность этиотропного лечения псевдомонадозов.

Was carried out research aimed at improving the efficiency of causal treatment of diseases caused by pseudomonads. The study consisted of two fragments: study of the influence of antibiotics as planktonic strains of Pseudomonas, as well as forming biofilms, in vitro, and clinical validation of the results obtained in the first fragment. Found that, in the presence of antimicrobial drugs that penetrate intracellularly, reduced the formation of biofilms by clinical isolates of Pseudomonas. Papain potentiates the action of antibacterial agents aimed at reducing the formation of biofilms pseudomonads. Using a clinical protocol antipseudomonadnoy therapy based on these data would improve the effectiveness of treatment etiotrop pсевdomonadov.

Известно, что способность псевдомонад образовывать биоплёнки значительно повышает их резистентность к антибактериальным препаратам. В то же время известно, что некоторые препараты, например, левофлоксацин, активны в отношении псевдомонад, как находящихся в планктонной форме, так и образующих биоплёнки [1-8].

В этой связи нами было запланировано исследование, направленное на повышение эффективности этиотропной терапии заболеваний, обусловленных псевдомонадами. Исследование состояло из двух фрагментов: изучение влияния антибактериальных препаратов как на планктонные штаммы псевдомонад, так и образующих биоплёнки *in vitro*, и клиническая апробация результатов, полученных в первом фрагменте.

Целью первого фрагмента исследования явилось изучение *in vitro* активности антибактериальных препаратов, проникающих в клетки эукариотов (азитромицин, левофлоксацин, ципрофлоксацин), изолированно и в сочетании с ферментным препаратом папаин в отношении образующих биоплёнки псевдомонад.

Выбор антибактериальных препаратов был обусловлен, во-первых, их хорошей биодоступностью, в частности, способностью проникать внутрь клеток макроорганизма, а во-вторых, практикой их клинического применения у больных муковисцидозом и нозокомиальными псевдомонадозами. В исследование был включён один антибиотик (азитромицин) и два фторхинолона (левофлоксацин и ципрофлоксацин), полученные из аптеки Военного клинического госпиталя Министерства Обороны Республики Казахстан (ВКГ МО РК).

В исследование были включены клинические изоляты, полученные от больных терапевтического и хирургического профиля, находившихся на стационарном лечении в ВКГ МО РК, всего 1019 культур, в том числе 429 - полученных от пациентов с соматической патологией и 590 - от пациентов с хирургической патологией.

Видовой состав использованных штаммов был следующим: *Pseudomonas aeruginosa* – 601 изолят (58,98%), *P.cepacia* – 249 (24,44%), *P.maltophilia* – 89 (8,73%), *P. putida* – 46 (4,51%), *P. stutzeri* – 29 (2,85%), *P. alcaligenes* – 3 (0,29%), *P. diminuta* – 2 (0,20%).

Оценка выживаемости псевдомонад после воздействия антибактериальных препаратов осуществлялась в 24-часовых биоплёнках в присутствии противомикробного агента изолированно и в сочетании с ферментным препаратом (папаин) по изменению оптической плотности и образованию колониеобразующих единиц (КОЕ) на твёрдой питательной среде. КОЕ определяли, снимая материал со дна 10 лунок пластиковых планшетов с биоплёнками псевдомонад, который объединяли в один пул и высевали на плотные питательные среды после двукратного разведения. Контролем служил интактный пул, получаемых из 10 лунок без добавления антибактериальных препаратов и ферментов.

Все использованные штаммы обладали культуральными и тинкториальными свойствами, характерными для данного вида микроорганизмов, согласно «Определителю бактерий Берджи» (2004). При выращивании на плотных питательных средах псевдомонады образовывали колонии, колониеподобные сообщества, смешанные сообщества, а в лунках планшет – и биоплёнки. Биоплёнки изученных штаммов через 24 часа роста покрывали всю поверхность дна использованной посуды непрерывным «ковром» с зонами утолщения, образованными многослойными скоплениями клеток и участками, в которых при световой микроскопии бактерии не выявляются.

Минимальные подавляющие концентрации (МПК) у различных видов псевдомонад находились примерно в одном диапазоне и колебались от 0,2 до 50,0 мг/л; МПК₅₀ определялась как медиана из 25 измерений и составила 2,0-8,0 мг/л.

Формирование микробных сообществ псевдомонад в присутствии папаина и действие фермента на уже сформированные биоплёнки

Добавление папаина в питательную среду одновременно с засевом псевдомонад для получения микробных сообществ у всех изученных штаммов вызывало снижение оптической плотности биоплёнок (100%). Действие папаина на бактериальные биоплёнки оценивали, добавляя одновременно с засевом бактерий растворы, содержащие фермент в количестве от 0,25 мкг/мл до 500 мкг/мл (концентрации 0,25; 0,5; 0,75; 1,0; 1,25; 2,0; 2,5; 3,0; 3,5; 5,0; 10,0; 15,0; 50,0; 100,0; 125,0; 250,0; 500,0 мкг/мл). Состояние биоплёнки определяли через 24 часа инкубации при 37°C. Оптическая плотность биоплёнок, выращенных при добавлении папаина в количестве от 5 до 15,0 мкг/мл, не отличалась от контрольных, при более высоких концентрациях фермента отмечалось снижение их оптической плотности.

В присутствии папаина в биоплёнке зарегистрировано также снижение числа КОЕ. Вместе с тем, имеется несоответствие в степени снижения оптической плотности биоплёнки и уменьшения в ней числа КОЕ. В целом папаин, добавленный в низких концентрациях (от 15,0 до 50,0 мкг/мл, вызывает уменьшение оптической плотности биоплёнки более чем на 20%, не приводя к изменениям числа КОЕ. Максимальное снижение числа КОЕ в биоплёнках у различных видов псевдомонад было схожим и наблюдалось при концентрации папаина свыше 50,0 мкг/мл. Дальнейшее увеличение концентрации фермента не приводило к дополнительному, существенному уменьшению числа КОЕ, однако оптическая плотность биоплёнки продолжала снижаться.

При действии на сформированные биоплёнки, папаин также вызывает снижение их биомассы. Уменьшение оптической плотности 24-часовых биоплёнок псевдомонад достигало 64% и зависело от концентрации фермента.

Действие на биоплёнки псевдомонад антибактериальных препаратов, способных проникать внутрь клетки

Действие на биоплёнки антибактериальных препаратов, способных проникать в клетки эукариот, было исследовано на примере ципрофлоксацина, левофлоксацина и азитромицина. Полученные результаты свидетельствуют, что данные препараты в количествах от 1 до 100 МПК, влияют на формирование, а также действуют на уже сформированные биоплёнки испытанных штаммов. Полного угнетения образования биоплёнок не происходит ни в одном случае, что можно объяснить наличием в биоплёнке гетеро-

генной бактериальной популяции, представители которой отличаются активностью энергетических процессов, транспортных систем и т.п. Можно говорить, что азитромицин и фторхинолоны проникают через липидсодержащую поверхностную оболочку биоплёнок псевдомонад различных видов, вызывая снижение её оптической плотности.

Совместное действие папаина и антибактериальных препаратов было изучено добавлением последних при засеве пула псевдомонад в субингибирующих концентрациях (ниже МПК в 5 раз). Антибактериальные препараты, добавленные при посеве снижали оптическую плотность образовавшейся биопленки в среднем на 10-15% (азитромицин) и 25-35% (фторхинолоны). При совместном действии фермента и антибактериального препарата зарегистрировано усиление угнетения формирования биоплёнок. Комплексы препаратов с папаином снижали оптическую плотность биоплёнки на 60-70%.

Целью второго фрагмента явилась апробация полученных ранее результатов, разработка протокола антипсевдомонадной терапии и оценка его эффективности.

При выборе тактики применения антибиотиков необходимо ответить на следующие вопросы: какие ситуации требуют применения антибиотиков, какие препараты следует использовать, когда необходимо начинать введение антибиотиков, какие препараты необходимо назначить, какая должна быть продолжительность применения антибиотиков.

В протокол должны быть включены только те рекомендации, эффективность которых подкреплена данными доказательной медицины с высокой достоверностью. Нами на основании изучения данных литературы и собственных исследований была разработана методика подготовки и внедрения совокупности правил (протокол) применения антипсевдомонадных средств в ВКГ МО РК (таблица 1).

Мы руководствовались данными об антибиотикочувствительности, прежде всего, основных штаммов – возбудителей инфекционных осложнений у военнослужащих и гражданских лиц, *P.cepacia* и *P. aeruginosa*.

На первом этапе нами был разработан типовой протокол применения антибиотиков в отделениях ВКГ МО РК, основанный как на данных наших исследований, так и на данных литературы (таблица 1).

Таблица 1

Протокол применения антипсевдомонадных средств в ВКГ МО РК

Этап микробиологической диагностики	Комбинация антибактериальных препаратов
Выделение представителя рода <i>Pseudomonas</i>	Карбапенемы (имипенем, меропенем) + аминогликозиды (тобрамицин, амикацин,

<i>Этап микробиологической диагностики</i>	<i>Комбинация антибактериальных препаратов</i>
	гентамицин)
Выявление мультирезистентного штамма псевдомонад	Карбапенемы + аминогликозиды + фторхинолоны (ципрофлоксацин)
Установление факта образования биоплёнки основным изолятом	Карбапенемы + аминогликозиды + фторхинолоны + полиэнзимы (вобэнзим, флогэнзим)

В протокол были включены антибактериальные средства, которые снижают риск развития нозокомиальных инфекций псевдомонадной этиологии и в то же время обладают достаточно широким спектром действия.

Острые формы псевдомонадозов, на наш взгляд, должны лечиться комбинацией антибактериальных препаратов. Препаратами выбора для лечения псевдомонадной инфекции, по данным наших исследований, являются карбапенемы (имипенем, меропенем). Комбинация их с аминогликозидами призвана предотвратить образование лекарственноустойчивых мутантов. Данная комбинация весьма эффективна в отношении планктонных штаммов псевдомонад, однако может оказаться недостаточно эффективной в отношении изолятов, образующих биоплёнку.

Препаратами резерва в острую стадию, согласно предложенному протоколу, являются фторхинолоны, которые подключаются к этиотропному лечению в случае выявления полирезистентности этиологического агента.

Длительность приёма антипсевдомонадных антибактериальных препаратов - от 14 до 21 дня (2-3 недели). Обязателен динамический (количественный и качественный) анализ мокроты, как предиктор неблагоприятных исходов при псевдомонадозах.

В том случае, если основной изолят обладает способностью к образованию биоплёнки, целесообразно перейти на парентеральное введение ципрофлоксацина с введением полиферментных препаратов (вобэнзим, флогэнзим), содержащих папаин, потенцирующий действие этиотропных агентов и способствующий редукции биоплёнки. Продолжительность парентерального курса - 1-2 недели (при необходимости может быть продлён до 3 недель), путь введения - внутривенный.

Вторым этапом было обсуждение протокола с администрацией и сотрудниками отделений. После обсуждения он был адаптирован к условиям каждого из отделений с учётом контингента больных и мониторинга антибиотикочувствительности циркулирующих штаммов, включая НФГОБ.

Разделение протокола на части, в зависимости от этапов микробиологической диагностики псевдомонадозов, оказалось наиболее удобным для его практического использования.

После внесения изменений протокол был представлен всему персоналу на клинической конференции госпиталя и каждая часть роздана в соответствующее отделение.

Третий этап включал внесение обоснованных дополнений (формы выписки этиотропных агентов, списки замен препаратов, патогенетическое лечение) в протокол в зависимости от специфики отделения.

Для измерения качества выполнения протокола был организован сбор форм выписки антибиотиков. С целью оценки полноты заполнения форм был организован ежедневный сбор медсестринских выписок назначений в отделениях.

Результатом внедрения протокола явилось снижение заболеваемости послеоперационных осложнений инфекционной этиологии на 6,2%, летальность от псевдомонадной инфекции не регистрировалась. После внедрения протокола количество дополнительных суточных доз антибиотиков снизилось в среднем с 1,75 на 1 больного до 0,14 на 1 больного, что свидетельствует о повышении эффективности этиотропной терапии псевдомонадной инфекции.

Таким образом, в присутствии антибактериальных препаратов, проникающих внутриклеточно, снижается образование биоплёнок клиническими изолятами псевдомонад. Папаин потенцирует действие антибактериальных препаратов, направленное на снижение образования биоплёнок псевдомонадами.

Использование клинического протокола антипсевдомонадной терапии, основанного на этих данных, позволило повысить эффективность этиотропного лечения псевдомонадозов.

Литература:

1. Evaluation of rapid drying hand disinfectant preparations in the intensive care unit / K. Tanaka, K. Kumon, T. Hirata et al. // Crit. Care Med. - 1988. - V.16, №5. - P. 540-542
2. Holmes A., Govan J., Goldstein R. Agricultural Use of Burkholderia (Pseudomonas) cepacia: A Threat to Human Health? Emerging Infectious Diseases. - 1998. - V. 4, №2. - P. 221-227
3. Infections and pseudo-infections due to povidone-iodine solution contaminated with Pseudomonas cepacia / A.L. Panlilio, C.M. Beck-Sague, J.D. Siegel et al. // Clin. Infect. Dis. - 1992. - V. 14, №5. - P. 1078-1083
4. Investigations of intrinsic Pseudomonas cepacia contamination in commercially manufactured povidone-iodine/ R.L. Anderson, R.W. Vess, J.H. Carr et al. // Infect. Control Hosp. Epidemiol. - 1991. - V. 12, №5. - P. 297-302
5. Palleroni N.J., Holmes B. Pseudomonas cepacia, sp. nov., nom.rev. // Int. J. Syst. Bacteriol. - 1981. - V.31. - P. 479-481
6. Беляков В.Д., Ряпис Л.А., Илюхин В.И. Псевдомонады и псевдомонадозы. - М.: Медицина, 1990. - 224 с.
7. Илюхин В.И. Псевдомонадные инфекции в патологии человека // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии. - 1985. - №2. - С. 110-114
8. Китаров Б.А. Инфекционный контроль в профилактике нозокомиальных инфекций: Автореф....к.м.н. - Алматы, 2003. - 28 с.

Рецензент: д.м.н., профессор Василевский М.Г.