

ISSN 0235-2990

# АНТИБИОТИКИ И ХИМИОТЕРАПИЯ

Том 59



9-10'2014

Научно-практический журнал

# ВНИМАНИЕ!

## ЛЕЧЕНИЕ ГРИППА И ОРВИ ПО МАКСИМУМУ!



# NEW!

**! НОВАЯ ФОРМА ВЫПУСКА**

**! ДВОЙНАЯ СИЛА В ОДНОЙ КАПСУЛЕ\***

**! ЛУЧШАЯ ПРИВЕРЖЕННОСТЬ ЛЕЧЕНИЮ  
СО СТОРОНЫ ПАЦИЕНТОВ**

\* 1 капсула Арбидол Максимум содержит 200 мг умифеновира, что в 2 раза больше, чем содержание умифеновира в капсуле Арбидола 100мг

## Учредители:

Министерство здравоохранения  
Российской Федерации

Государственный научный  
центр по антибиотикам

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

«Antibiotics and Chemotherapy»  
Published 12 times a year  
since 1956

## АДРЕС РЕДАКЦИИ:

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

## ОТДЕЛ РЕКЛАМЫ:

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

## ИЗДАТЕЛЬ:

Издательство «ОКИ»



Подписка по каталогу Роспечать:

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

Подписка через объединённый каталог  
«Пресса России»:

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

Журнал зарегистрирован  
в Комитете РФ по печати  
Рег. свид. № 01110694 от 25 мая 1993 г.

Установочный тираж 5000 экз.

© ГНЦА 2014

Типография:

ООО «Новелла»

Дата выхода: 15.12.2014

Свободная цена

# АНТИБИОТИКИ И ХИМИОТЕРАПИЯ

ANTIBIOTICS AND CHEMOTHERAPY

Том 59

9—10'2014

ЕЖЕМЕСЯЧНЫЙ НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКИЙ ЖУРНАЛ  
MONTHLY JOURNAL

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

Зам. главного редактора — к. м. н. Буданов С. В.  
Отв. секретарь — к. м. н. Гучев И. А.  
Отв. за выпуск — Белоусов Д. Ю.

## РЕДАКЦИОННАЯ КОЛЛЕГИЯ

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

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

## РЕДАКЦИОННЫЙ СОВЕТ

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

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

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

## Оригинальные статьи

Григорян С. С., Петров А. Ю., Исаева Е. И.,  
Музыкин М. А., Коваленко А. Л., Романцов М. Г.  
Индукция интерферонов 1-, 2- и 3-го типов солями  
акридонуксусной кислоты  
Подборонов В. М., Смирнова И. П.  
Персистенция бактерий и вирусов в организме *Ixodes*  
Черникова Н. К., Михайлов В. В., Борисевич С. В.  
Экспериментальная оценка иммуномодулирующей  
активности нового отечественного синтетического  
препарата «Тубосан»  
Ленёва И. А., Фалынская И. Н., Леонова Е. И.,  
Федякина И. Т., Махмудова Н. Р., Осипова Е. А.,  
Лепеха Л. Н., Михайлова Н. А., Зверев В. В.  
Эффективность умифеновира (Арбидола)  
на модели экспериментальной сочетанной  
вирусно-бактериальной пневмонии мышей  
Торопова А. А., Николаев С. М., Разуваева Я. Г.,  
Федоров А. В., Самбуева З. Г., Убева И. П.  
Влияние экстракта *Hypocoum erectum*  
на морфофункциональное состояние печени крыс  
при тетрациклиновом гепатите

## В помощь практикующему врачу

Кулапина О. И., Михайлова М. С.  
Изучение фармакокинетики цефуроксима  
по динамике его распределения в жидкости  
ротовой полости больных синуситами  
Сиволодский Е. П., Горелова Г. В.,  
Богословская С. П., Зуева Е. В.  
Чувствительность к антибиотикам и идентификация  
клинических штаммов *Pseudomonas fulva*  
Гончар Н. В., Партина И. В., Ныrkova О. И., Дран А. С.  
Антибиотико- и фагорезистентность клинических  
штаммов кишечной палочки у госпитализированных детей  
Санкт-Петербурга, больных эшерихиозами

## По страницам журналов 44 Abstracts

## Original Papers

- 3 Grigoryan S. S., Petrov A. Yu., Isaeva E. I.,  
Muzykin M. A., Kovalenko A. L., Romantsov M. G.  
Induction of Type 1, 2 and 3  
Interferons by Acridone Acetates
- 10 Podboronov V. M., Smirnova I. P.  
Persistence of Bacteria and Viruses in *Ixodes*
- 13 Chernikova N. K., Mikhailov V. V., Borisevich S. V.  
Experimental Estimation of Immunomodulating  
Activity of Tubosan, a New Russian  
Synthetic Drug
- 17 Leneva I. A., Falynskova I. N., Leonova E. I.,  
Fedyakina I. T., Makhmudova N. R., Osipova E. A.,  
Lepekha L. N., Mikhailova N. A., Zverev V. V.  
Umifenovir (Arbidol) Efficacy in Experimental  
Mixed Viral and Bacterial Pneumonia  
of Mice
- 25 Toropova A. A., Nokolaev S. M., Razuvaeva Ya. G.,  
Fedorov A. V., Sambueva Z. G., Ubeeva I. P.  
Effect of *Hypocoum erectum* Extract  
on Morphofunctional State of the Liver in Rats  
with Tetracycline-Associated Hepatitis

## Guidelines For Practitioners

- 29 Kulapina O. I., Mikhailova M. S.  
Study on Pharmacokinetics of Cefuroxime  
by Dynamics of Its Distribution in Oral Fluid  
of Patients with Sinusitis
- 33 Sivolodsky E. P., Gorelova G. V.,  
Bogoslovskaya S. P., Zueva E. V.  
Antibiotic Susceptibility and Identification  
of Clinical *Pseudomonas fulva* Isolates
- 38 Gonchar N. V., Partina I. V., Nyrkova O. I., Drap A. C.  
Resistance of Clinical Strains of Pathogenic *E.coli*  
to Antibiotics and Bacteriophage in Hospitalized Children with  
Escherichiosis in St.Petersburg

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

# Индукция интерферонов 1-, 2- и 3-го типов солями акридонуксусной кислоты

С. С. ГРИГОРЯН<sup>1</sup>, А. Ю. ПЕТРОВ<sup>2</sup>, Е. И. ИСАЕВА<sup>1</sup>, М. А. МУЗЫКИН<sup>2</sup>, А. Л. КОВАЛЕНКО<sup>3</sup>, М. Г. РОМАНЦОВ<sup>4</sup>

<sup>1</sup> ФГБУ «НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Н. Ф. Гамалеи» Минздрава России, Москва

<sup>2</sup> ООО «НТФФ «ПОЛИСАН», Санкт-Петербург

<sup>3</sup> ФМБА ФГБУН «Институт токсикологии Федерального медико-биологического агентства», Санкт-Петербург

<sup>4</sup> ГБОУ ВПО «Северо-Западный государственный медицинский университет им. И. И. Мечникова», Санкт-Петербург

## Induction of Type 1, 2 and 3 Interferons by Acridone Acetates

S. S. GRIGORYAN, A. YU. PETROV, E. I. ISAEVA, M. A. MUZYKIN, A. L. KOVALENKO, M. G. ROMANTSOV

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

POLYSAN Co., St. Petersburg

Institute of Toxicology of Federal Medico-Biological Agency, St. Petersburg

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

В статье показан профиль индукции эндогенных интерферонов трёх типов под действием меглуминовой и натриевой солей акридонуксусной кислоты, отмечены особенности в кинетике аккумуляции и продолжительности циркуляции разных типов интерферонов в крови экспериментальных животных. Меглуминовая соль акридонуксусной кислоты обеспечивает сбалансированную индукцию, продукцию и циркуляцию в крови интерферонов трёх типов, в сравнении с натриевой солью в тех же условиях. Установлена оптимальная доза меглуминовой соли акридонуксусной кислоты (2,0–3,5 мг/мышь) с эффективной, последовательной, перекрывающей индукцией—продукцией интерферонов трёх типов, обеспечивая пролонгированную циркуляцию в крови интерферонов в течение 72 часов после однократного введения.

**Ключевые слова:** акридонуксусная кислота, интерферон-альфа, -гамма и -лямбда, меглуминовая соль акридонуксусной кислоты (циклоферон).

The induction profile of endogenous interferons of three types under the action of meglumine acridone acetate and sodium acridone acetate, as well as the characteristics of the kinetics of their accumulation and circulation in the blood of experimental animals are described. Meglumine acridone acetate provided balance in induction, production and circulation of the interferons in the blood vs. sodium acridone acetate under the same conditions. The optimal dose of meglumine acridone acetate (2.0–3.5 mg/mouse) with effective, consecutive and overlapping induction-production of the interferons ensured their prolonged (for 72 hours) circulation in the blood after a single administration.

**Key words:** acridone acetic acid, interferons (alpha, gamma and lambda), meglumine acridone acetate (cycloferon).

## Введение

Акридонуксусная кислота (АУК) [C<sub>15</sub>H<sub>11</sub>NO<sub>3</sub>] впервые описана как противовирусное средство в 1972 году. Изучены натриевая, аммониевая, калиевая, магниевая, метилглюкаминовая и кальциевая соли. Привлекательным свойством для использования в медицинских целях является её активность в отношении как РНК-, так и ДНК-содержащих вирусов, обусловленная индукцией эндогенного интерферона. Мощные внутри- и межмолекулярные водородные связи между гидроксильными группами и вторичным азотом обеспечивают её высокую солюбилизующую активность и растворимость в органических растворителях, позволяя использовать для создания

новых растворимых лекарственных форм или для стабилизации физико-химических свойств лекарственных препаратов [1].

Семейство интерферонов (ИФН) — ключевой компонент естественного и адаптивного иммунитета, обеспечивающий первую линию защиты организма от различных инфекционных агентов [2]. В настоящее время идентифицированы три типа ИФН: ИФН 1-го типа, включающий ИФН- $\alpha$ , ИФН- $\beta$ , продуцируемые ядродержащими клетками, оказывает прямое противовирусное действие на репликацию вирусов в инфицированных клетках, предупреждает инфицирование окружающих и, активируя каскад антивирусных сигнальных путей, включает естественный иммунитет, способствуя развитию адаптивных иммунных ответов [3, 4]. ИФН 2-го типа — ИФН- $\gamma$ , который продуцируется различными субпопуляциями Т-лимфоцитов и естественных киллеров (НК),

© Коллектив авторов, 2014

Адрес для корреспонденции:  
123098 ул. Гамалеи 18. НИИЭМ им. Н. Ф. Гамалеи

регулируя гомеостаз, обеспечивает функциональную эффективность специфического адаптивного иммунитета [5]. Недавно открытый 3-й тип ИФН, представленный ИФН-λ1, ИФН-λ2, ИФН-λ3 (известных также как интерлейкины IL-29, IL-28A и IL-28B), функционально тесно связан с ИФН 1-го типа, экспрессия рецепторов которых определяется на узком спектре клеток, ограничивая ответ на ИФН 3-го типа [6]. Мишенью ИФН-λ являются, прежде всего, эпителиальные клетки верхних дыхательных путей, лёгких, желудочно-кишечного тракта, половых органов и кожи, а также гепатоциты и особенно плазмочитарные дендритные клетки [7–9]. Являясь, также как и ИФН 1-го типа, медиаторами противовирусных эффектов, ИФН 3-го типа обеспечивают дополнительную защиту входных ворот инфекции, но не обладают характерными для ИФН 1-го типа побочными эффектами [10]. Все три типа ИФН выполняют роль первой линии защиты организма не только при вирусных, но и при бактериальных и паразитарных заболеваниях [11, 12]. Важно отметить, что ИФН продуцируются не только при различной инфекционной патологии или под действием микробов-комменсалов, но также и под действием ряда высоко- и низкомолекулярных соединений — индукторов ИФН [3, 13].

В целях оптимизации клинического применения индукторов ИФН представлялось целесообразным впервые в рамках доклинического изучения солей акридонуксусной кислоты изучить не только возможность индукции различных типов ИФН, но и последовательность индукции, продукции, аккумуляции, а также продолжительность циркуляции в крови экспериментальных животных каждого из трёх типов ИФН; помимо этого — установить зависимость динамики их индукции и продукции от дозы каждого из исследуемых соединений.

## Материал и методы

**Соли акридонуксусной кислоты.** В исследовании использовали меглуминовую (меглумина акридонуксусная соль) и натриевую соли акридонуксусной кислоты в возрастающих концентрациях, а также плацебо в виде инертного вещества и дистиллированной воды. Перед применением соли растворяли в стерильной дистиллированной воде до дозы, необходимой для введения экспериментальным животным. Соли вводили мышам однократно, перорально (внутрижелудочно) с помощью специального дозированного зонда в дозах 0,5, 1, 2, 3,5, 5,0 и 7,0 мг/мышь в объёме 50 мкл.

**Животные.** Исследования проводились на 30 линейных мышках СВА, самках, массой 18–20 г, полученных из питомника «Андреевка» ФГБУ «НЦБМТ» РАМН. Животные подвергались 5-дневному карантину. Подбор животных в группы осуществляли методом случайной выборки. На каждый срок исследования использовали по 5 мышей СВА.

Содержание, питание и уход за животными в ходе эксперимента осуществляли в соответствии с требованиями «Правил проведения работ с использованием экспериментальных животных» (Приказ Минздравсоцразвития РФ от 23 августа 2010 г. № 708н). Этические принципы обращения с лабораторными животными соблюдались в соответствии с «European

Convention for the Protection of Vertebral Animals Used for Experimental and Other Scientific Purposes. CETS No. 123».

Забор крови у животных обеих групп проводили методом декапитации в стерильных условиях, через 2, 6, 12, 24, 48 и 72 ч после введения солей акридонуксусной кислоты. Образцы крови, полученные в каждый срок исследования, состояли из пула (смеси) крови от 5 мышей в объёме 5 мл (по 1 мл от каждой особи), из которого после центрифугирования в режиме 5000 об/мин — 15 мин отбирали надосадочную сыворотку в объёме 1,5 мл в стерильные пробирки — эпипиндорфы. Сыворотки крови мышей, соответствующие каждому сроку забора, разделяли на аликвоты по 0,5 мл в три стерильные пробирки (эппиндорфы), которые хранили при температуре  $-20^{\circ}\text{C}$  до проведения соответствующего иммуноферментного анализа.

**Метод иммуноферментного анализа.** Количественное содержание в сыворотке крови мышей ИФН 1-го типа — ИФН альфа (ИФН-α), 2-го типа — ИФН-γ и 3-го типа ИФН-λ определяли методом ИФА с использованием следующих тест-систем производства R&D Systems (США): набора Mouse IFN-alpha ELISA kit, 42 120-1, набора Mouse IFN-lambda 2/3 (IL — 28 A/B) DuoSet ELISA development kit, DY 1789B, набора Mouse IFN-gamma DuoSet ELISA kit, DY 485.

Расчёт оптической плотности исследуемых проб проводили на спектрофотометре — ридере Anthos Labtec с использованием вошера и шейкера (Instruments GmbH, Австрия) с последующей обработкой и преобразованием данных оптической плотности в пикограммы в 1 мл (пкг/мл) по компьютерной программе Software ADAP. Все исследования проводили в двух повторностях.

**Статистическая обработка.** Результаты подвергались статистической обработке путём расчёта среднего арифметического ( $M$ ), стандартной ошибки среднего ( $\pm m$ ). Оценка статистической значимости различий при межгрупповых сравнениях производилась методом  $v$ ANOVA (дисперсионный однофакторный анализ с повторными измерениями).

## Результаты и обсуждение

**Динамика индукции и продукции ИФН-α (1-го типа) при пероральном введении меглуминовой и натриевой солей акридонуксусной кислоты.** Однократное пероральное введение меглуминовой соли акридонуксусной кислоты (МГАУК) в возрастающих дозах от 0,5 (25 мг/кг) до 3,5 мг/мышь (70 мг/кг) вызывало дозозависимую индукцию продукции ИФН-α в сыворотке крови экспериментальных животных, количественное содержание которого в дозах 0,5 мг/мышь и 1,0 мг/мышь составляло  $208 \pm 7,0$  пкг/мл и  $155 \pm 9,0$  пкг/мл соответственно и определялось только через 24 ч после введения (рис. 1, а).

Увеличение дозы МГАУК до 2,0–3,5 мг/мышь сокращало как сроки инициации индукции ИФН-α, так и достижения максимальной его аккумуляции в крови. Индукция продукции ИФН-α в указанных дозах определялась в сыворотке крови животных уже через 2 ч после введения препарата, пик содержания которого в концентрации  $293 \pm 33$  пкг/мл при дозе 2,0 мг/мышь достигался через 12 ч после его введения, а при дозе 3,5 мг/мышь — в концентрации  $416,5 \pm 9,5$  пкг/мл — через 6 ч. Однако дальнейшее увеличение дозы МГАУК до 5,0 и 7,0 мг/мышь не только не повышало содержание ИФН-α в крови, но и вызывало эффект его полного отсутствия во все сроки исследований (см. рис. 1, а).

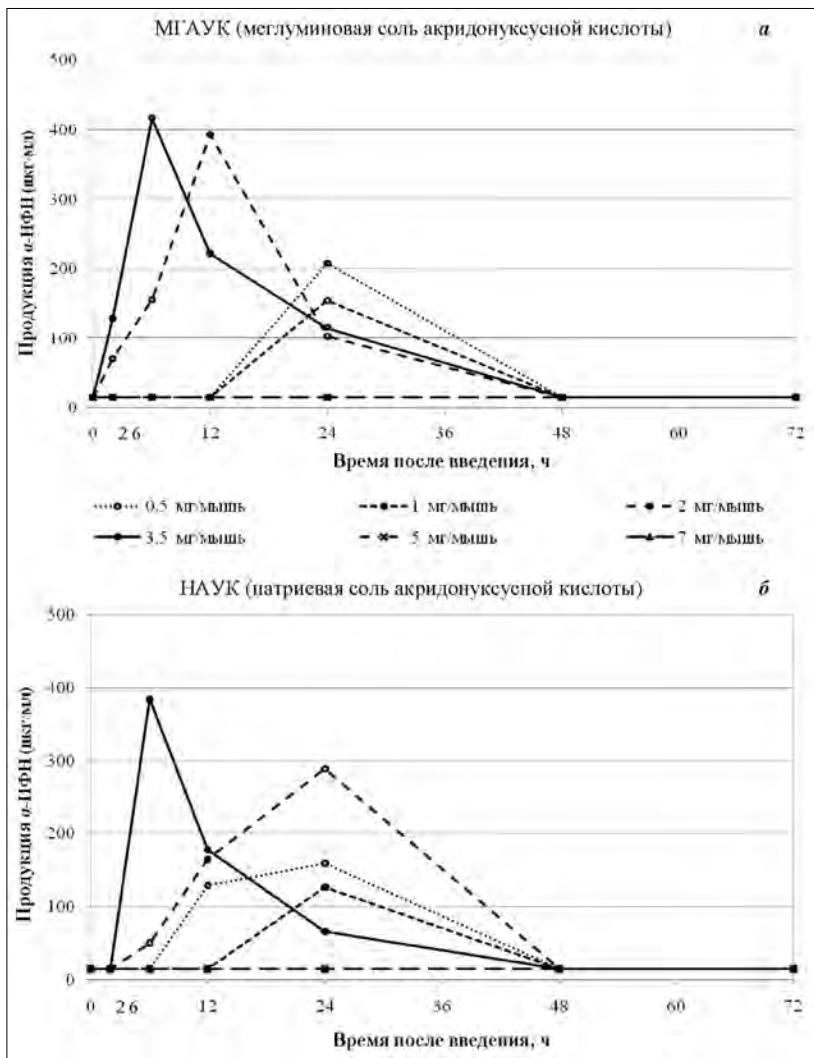


Рис. 1. Динамика продукции ИФН- $\alpha$  (1-го типа)

Сопоставимая динамика индукции и накопление ИФН- $\alpha$  в крови определялись под действием натриевой соли акридонуксусной кислоты (НАУК) (рис. 1, б) При низких дозах НАУК (0,5–1,0 мг/мышь) максимальные количества ИФН- $\alpha$  в крови мышей составляли  $159,5 \pm 6,5$  —  $127,0 \pm 3,0$  пкг/мл, которые достигались через 24 ч после его введения. Увеличение дозы НАУК до 2,0 мг/мышь повышало содержание ИФН- $\alpha$  в крови в этот же срок после введения до  $289 \pm 50,5$  пкг/мл, а в дозе 3,5 мг/мышь вызывало не только стимуляцию, но и сдвиг пика его максимальной продукции в концентрации  $385,5 \pm 60,5$  пкг/мл к 6 ч. Однако при последующем увеличении перорально вводимой НАУК до 5,0 и 7,0 мг/мышь, также как и при использовании МГАУК в таких же дозах, ИФН- $\alpha$  в сыворотке крови мышей не тестировался (рис. 1, б).

**Динамика индукции и продукции ИФН- $\gamma$  (2-го типа) при пероральном введении меглуминовой и натриевой солей акридонуксусной кислоты.** Независимо от дозы МГАУК, ИФН- $\gamma$  в сыворотке крови мышей определялся через 24 ч, с тенденцией

увеличения его содержания через 48 ч и некоторого снижения к 72 ч после введения. Однако в дозе 3,5 мг/мышь отмечался сдвиг начала индукции ИФН- $\gamma$  и его появление в крови экспериментальных животных через 12 ч после введения МГАУК. Выраженный дозозависимый характер индукции ИФН- $\gamma$  определялся на пике динамики его продукции — через 48 ч после введения МГАУК, когда с увеличением его дозы от 0,5 до 7,0 мг/мышь содержание ИФН- $\gamma$  в сыворотке крови мышей последовательно повышалось от  $486,5 \pm 6,5$  пкг/мл до  $776,5 \pm 16,5$  пкг/мл соответственно. Закономерность продукции ИФН- $\gamma$  на достаточном уровне его содержания — от  $185 \pm 15$  пкг/мл до  $235 \pm 55$  пкг/мл сохранялась и через 72 ч после введения возрастающих доз МГАУК (рис. 2, а). В целом, индукция ИФН- $\gamma$  в крови экспериментальных животных под действием МГАУК, хотя и начинала определяться только через 24 ч после его однократного перорального введения, носила пролонгированный характер в течение 3 суток включительно (срок наблюдения). Динамика индукции и продукции ИФН- $\gamma$  под действием НАУК имела сопоставимый с введением МГАУК дозозависимый характер (см. рис. 2, б).

Начало индукции ИФН- $\gamma$  в крови мышей, независимо от дозы введённого НАУК, определялось через 24 ч, с нарастанием его количественного содержания через 48 ч (пик продукции) и снижением через 72 ч после введения. Однако при использовании НАУК в дозе 2,0 мг/мышь и особенно в высокой дозе 7,0 мг/мышь наблюдалось сокращение срока инициации индукции ИФН- $\gamma$  и его появление в крови через 12 ч после введения (см. рис. 2, б).

**Динамика индукции и продукции ИФН- $\lambda 2$  и ИФН- $\lambda 3$  (3-го типа) при пероральном введении меглуминовой и натриевой солей акридонуксусной кислоты.** Индукция и продукция ИФН- $\lambda 2$  и ИФН- $\lambda 3$  под действием МГАУК имела также прямую зависимость от дозы его однократного введения (рис. 3, а). Причём в дозах 0,5–1,0 мг/мышь МГАУК вызывал индукцию ИФН- $\lambda 2$  и ИФН- $\lambda 3$  в крови мышей через 12 и 24 ч после введения, составляя  $297,5 \pm 12,5$  пкг/мл —  $314,5 \pm 6,5$  пкг/мл и  $405 \pm 4,5$  пкг/мл —  $569 \pm 45$  пкг/мл соответственно. В дозах же от 2,0 до 7,0 мг/мышь МГАУК опосредовал не только последовательное

увеличение продукции ИФН- $\lambda 2/\lambda 3$  через 12 ч и особенно через 24 ч после введения, но и пролонгированную его циркуляцию в крови до 48 ч включительно, достигая от  $234 \pm 19$  до  $580 \pm 13$  пкг/мл. Однако независимо от использованной дозы, индукция продукции ИФН- $\lambda 2/\lambda 3$  всегда тестировалась не ранее, чем через 12 ч после введения МГАУК, а пик его аккумуляции в сыворотке крови мышей — через 24 ч (см. рис. 3, а).

Несколько иная тенденция индукции — продукции ИФН- $\lambda 2/\lambda 3$  выявлялась под действием НАУК. В дозах 0,5 мг/мышь и 5,0 мг/мышь ИФН- $\lambda 2/\lambda 3$  в сыворотке крови мышей определялся через 12 и 24 ч после введения сопоставимых количеств (от  $361,5 \pm 5,5$  пкг/мл до  $630 \pm 17$  пкг/мл и от  $315,5 \pm 3,5$  пкг/мл до  $438,5 \pm 17,5$  пкг/мл соответственно) (рис. 3, б).

Дозозависимый характер индукции ИФН- $\lambda 2$  и ИФН- $\lambda 3$  более выражен через 24 ч после введения. Пролонгированная же до 48 ч после введения включительно индукция и продукция ИФН в сыворотке крови экспериментальных животных в количестве  $443,5 \pm 12,5$  пкг/мл тестировалась только при использовании НАУК в высокой дозе — 7,0 мкг/мышь (см. рис. 3, б).

**Сравнительная характеристика индукции и продукции ИФН 1-го, 2-го и 3-го типов солями акридонуксусной кислоты.** Суммарные результаты исследований индукции — продукции ИФН- $\alpha$ , - $\gamma$  и - $\lambda 2/\lambda 3$  (1-й, 2-й и 3-й типы соответственно) и её зависимости от дозы свидетельствуют о прямом дозозависимом характере индукции и аккумуляции в крови экспериментальных животных всех трёх типов ИФН при использовании МГАУК в дозах 0,5—3,5 мг/мышь. Оптимальными дозами МГАУК, обеспечивающими эффективную индукцию ИФН 1-го, 2-го и 3-го типов, были 2,0—3,5 мг/мышь. Индукция ИФН- $\alpha$  при введении МГАУК в этих дозах начиналась уже через 2 ч после введения ( $71 \pm 6,0$  —  $128,5 \pm 13,5$  пкг/мл), достигая пика максимальных значений через 6—12 ч ( $416,5 \pm 9,5$  —  $393 \pm 33,0$  пкг/мл) и снижаясь к 24 ч после введения до  $115 \pm 5,0$  —  $103 \pm 13$  пкг/мл соответственно. Индукция ИФН- $\lambda 2/\lambda 3$  (3-го типа) определялась через 12 ч после введения МГАУК в концентрации  $389,5 \pm 2,5$  пкг/мл и  $593 \pm 28$  пкг/мл при дозе 2,0 и 3,5 мг/мышь соответственно, увеличиваясь в дозе 2,0 мг/мышь до  $443 \pm 8,0$  пкг/мл к 24 ч с некото-

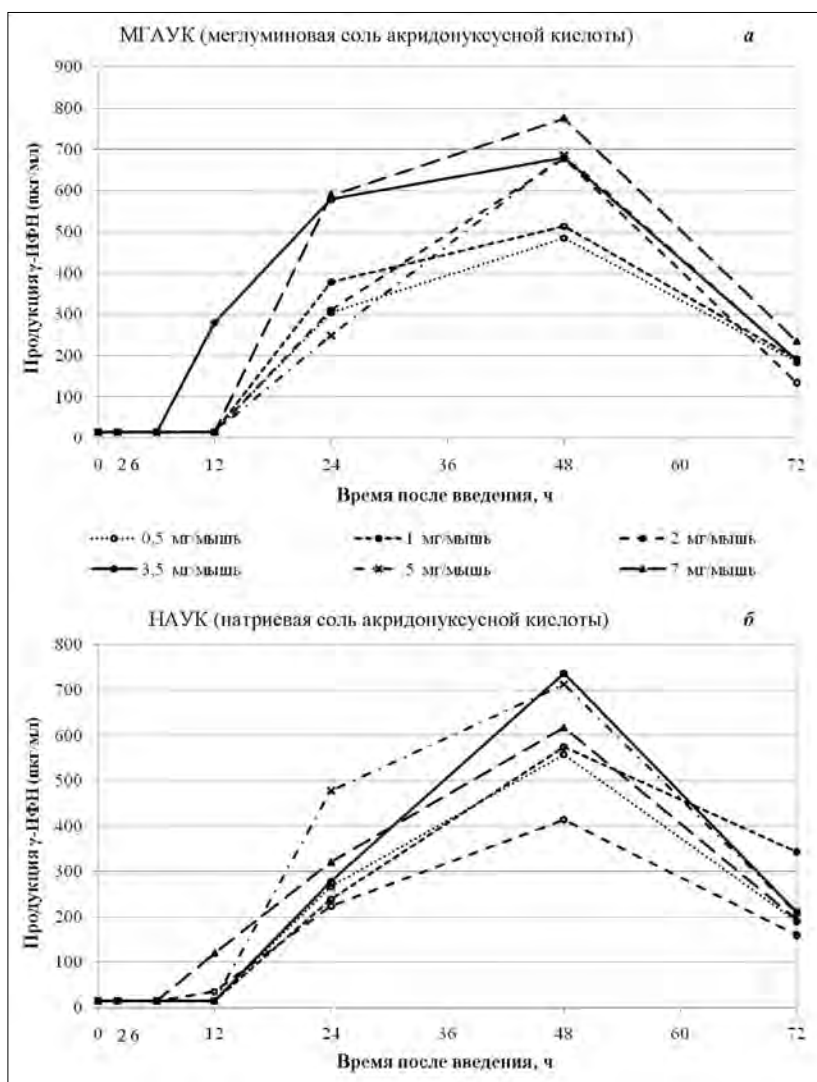


Рис. 2. Динамика продукции ИФН- $\gamma$  (2-го типа)

рым снижением до  $234 \pm 19$  пкг/мл к 48 ч после введения или сохраняясь на достигнутом уровне при дозе 3,5 мг/мышь через 24 и 48 ч после введения ( $583 \pm 16$  пкг/мл и  $475,6 \pm 37,5$  пкг/мл соответственно).

Индукция и продукция ИФН- $\gamma$  (2-го типа) в дозе 2,0 мг/мышь начинала выявляться в сыворотке крови мышей через 24 ч после введения МГАУК в концентрации  $311 \pm 1,0$  пкг/мл, достигала максимума через 48 ч ( $678 \pm 6,4$  пкг/мл), снижаясь до  $135 \pm 15$  пкг/мл к 72 ч после его введения. Использование МГАУК в дозе 3,5 мг/мышь сокращало срок индукции ИФН- $\gamma$ , который начинал определяться в крови мышей уже через 12 ч после его введения в количестве  $280 \pm 80$  пкг/мл, нарастая и сохраняясь на уровне  $580 \pm 10,0$  пкг/мл и  $681,5 \pm 31,5$  пкг/мл через 24 ч и 48 ч после введения, с тенденцией снижения к 72 ч до  $190 \pm 30$  пкг/мл.

Таким образом, МГАУК в дозах 2,0 и 3,5 мг/мышь обеспечивала эффективное раннее начало



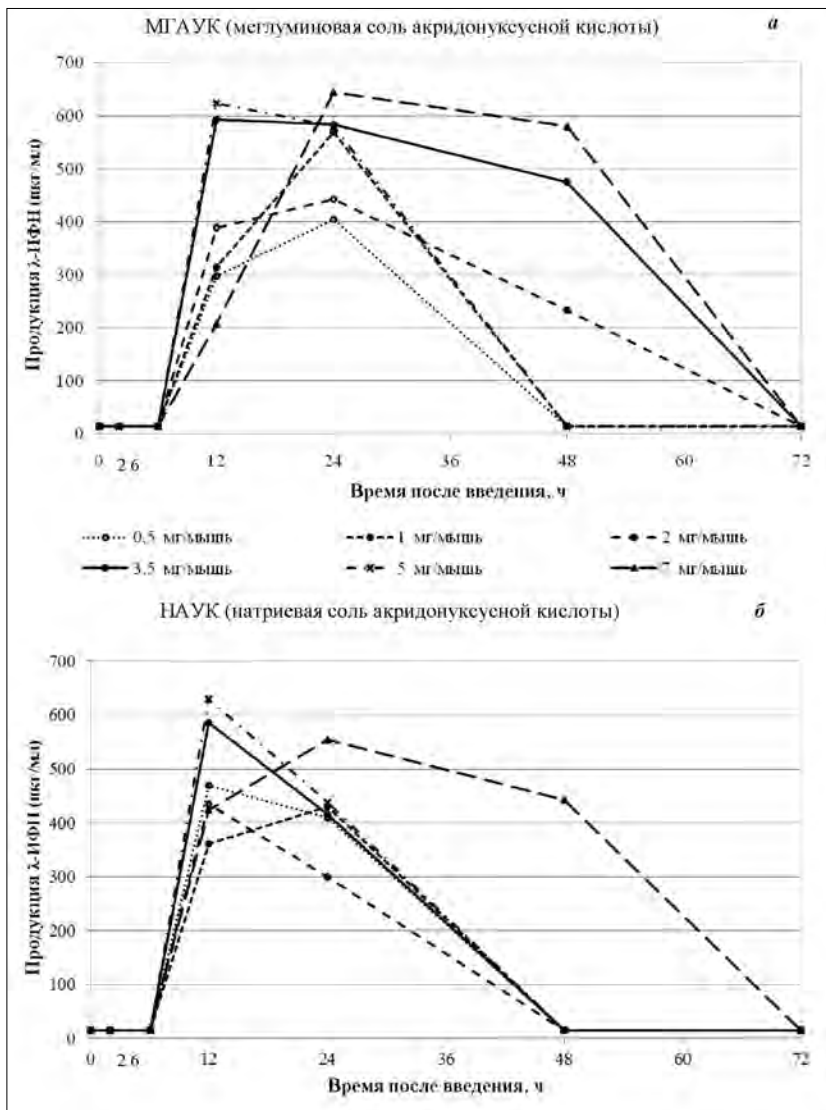


Рис. 3. Динамика продукции ИФН-λ2/λ3 (3-го типа).

индукции—продукции сывороточного ИФН в виде ИФН 1-го типа с последующим присоединением индукции—продукции ИФН 3-го типа через 12 ч после введения и ИФН 2-го типа через 24 ч или даже через 12 ч после введения. Такая характерная для цитокинов последовательная и перекрывающаяся индукция—продукция ИФН различных типов обеспечивала пролонгированную циркуляцию в крови ИФН 1-го, 2-го и 3-го типов в течение 72 ч после однократного перорального введения МГАУК в дозах 2,0—3,5 мг/мышь (рис. 4, а).

Совокупность результатов по индукции ИФН-α, -γ, -λ2 и -λ3 возрастающими дозами НАУК показала, что в диапазоне низких доз (0,5—1,0 мг/мышь) инициация индукции ИФН-α (1-го тип) в сыворотке крови определяется через 12 ч после его введения, а через 24 ч в дозах от 0,5 до 2,0 мг/мышь прослеживается дозозависимый характер индукции ИФН-α, количественное содержание которого в этот срок колеблется от 159±6,5 до

289,5±50,5 пкг/мл соответственно. Но динамика индукции—продукции сывороточного ИФН-α под действием НАУК в дозах 2,0 и 3,5 мг/мышь различаются. В дозе 2,0 мг/мышь происходит сдвиг начала индукции ИФН-α к 6 ч в виде незначительной продукции ИФН-α в количестве 50,5±1,5 пкг/мл, а максимальный уровень его продукции определяется через 24 ч после введения НАУК. Увеличение же дозы НАУК до 3,5 мг/мышь вызывает не только смещение инициации индукции ИФН-α, но и пика его продукции к 6 ч, который достигает 385±60,5 пкг/мл.

Однако, несмотря на указанные отличия, наиболее эффективными дозами НАУК, обеспечивающими оптимальную индукцию и аккумуляцию ИФН-α в крови экспериментальных животных, являлись 2,0 и 3,5 мг/мышь, при которых инициация индукции ИФН-α под действием НАУК определялась через 6 часов после его введения, причём в дозе 2,0 мг/мышь наблюдалось постепенное увеличение количества ИФН-α в крови через 12 и 24 ч до 166±9,0 и 289,5±50,5 пкг/мл соответственно, а в дозе 3,5 мг/мышь изначально синтезированный и аккумулированный в крови через 6 ч после введения высокий уровень ИФН-α в количестве 385±60,5 пкг/мл через 12 и 24 ч постепенно снижался и составлял 178±10,0 и 66±4,0

пкг/мл соответственно. Индукция ИФН-λ2 и -λ3 (3-го типа) в дозах 2,0 и 3,5 мг/мышь под действием НАУК, оптимальных для индукции ИФН-α, определялась в количестве 435±3,0 и 585,5±39,5 пкг/мл соответственно через 12 ч и 315±3,5—425,5±9,5 пкг/мл через 24 ч после введения. Более продолжительная индукция и аккумуляция ИФН-λ2 и -λ3 до 48 ч включительно в количестве 443,5±12,5 пкг/мл отмечалась только в высокой дозе — 7,0 мг/мышь, что сопоставимо с содержанием ИФН-λ2 и -λ3 в крови мышей при использовании в 2 раза меньшей дозы МГАУК — 3,5 мг/мышь.

Таким образом, дозозависимый характер индукции ИФН-λ2 и -λ3 под действием НАУК определялся только через 12 ч после его введения в возрастающих дозах от 0,5 до 7,0 мг/мышь.

Динамика индукции—продукции ИФН-γ (2-го типа) под действием возрастающих доз НАУК

была аналогична таковой МГАУК. Как правило, независимо от использованной дозы продукция сывороточного ИФН- $\gamma$  в пределах  $225 \pm 35$  —  $478 \pm 1,5$  пкг/мл началась через 24 ч после введения НАУК и продолжалась до 72 ч включительно. Пик максимального содержания ИФН- $\gamma$  в крови мышей на уровне от  $558 \pm 2,0$  до  $738 \pm 1,5$  пкг/мл определялся через 48 ч после введения НАУК. В дозе 7,0 мг/мышь, однако, наблюдался сдвиг инициации индукции ИФН- $\gamma$  к 12 ч после его введения, подобно тому, как это происходило под действием МГАУК в 2 раза меньшей дозе — 3,5 мг/мышь.

Таким образом, в дозах 2,0—3,5 мг/мышь НАУК обеспечивал оптимальную индукцию ИФН 1-го и 2-го типов, которая начиналась через 6 часов и продолжалась до 24 часов после его введения включительно в виде продукции ИФН- $\alpha$  и перекрывалась началом индукции и пролонгированной продукцией ИФН- $\gamma$  от 24 до 72 ч, включительно (рис. 4, б). Эти же дозы НАУК от 12 до 24 ч после введения включительно индуцировали продукцию ИФН- $\lambda 2$  и - $\lambda 3$  на уровне  $435 \pm 3,0$  —  $585,5 \pm 39,5$  и  $315 \pm 3,5$  —  $425,5 \pm 9,5$  пкг/мл соответственно. Более оптимальным относительно продолжительности нахождения в крови мышей ИФН 3-го типа с 12 до 48 часов являлась НАУК в дозе 7,0 мг/мышь.

### Заключение

В работе идентифицированы типы ИФН и исследован профиль их индукции под действием меглуминовой и натриевой солей акридонуксусной кислоты — индукторов ИФН. Изученные производные акридонуксусной кислоты (МГАУК и НАУК) при однократном пероральном введении в различных дозах вызывали индукцию известных трёх типов ИФН, динамика продукции и циркуляции которых в сыворотке крови мышей обусловлена проявлением фармакологической активности самой акридонуксусной кислоты. Вместе с тем в кинетике аккумуляции и продолжительности циркуляции различных типов ИФН в крови экспериментальных животных отмечались некоторые различия.

Инициация индукции ИФН- $\alpha$  (1-го типа) при введении оптимальных доз МГАУК определялась

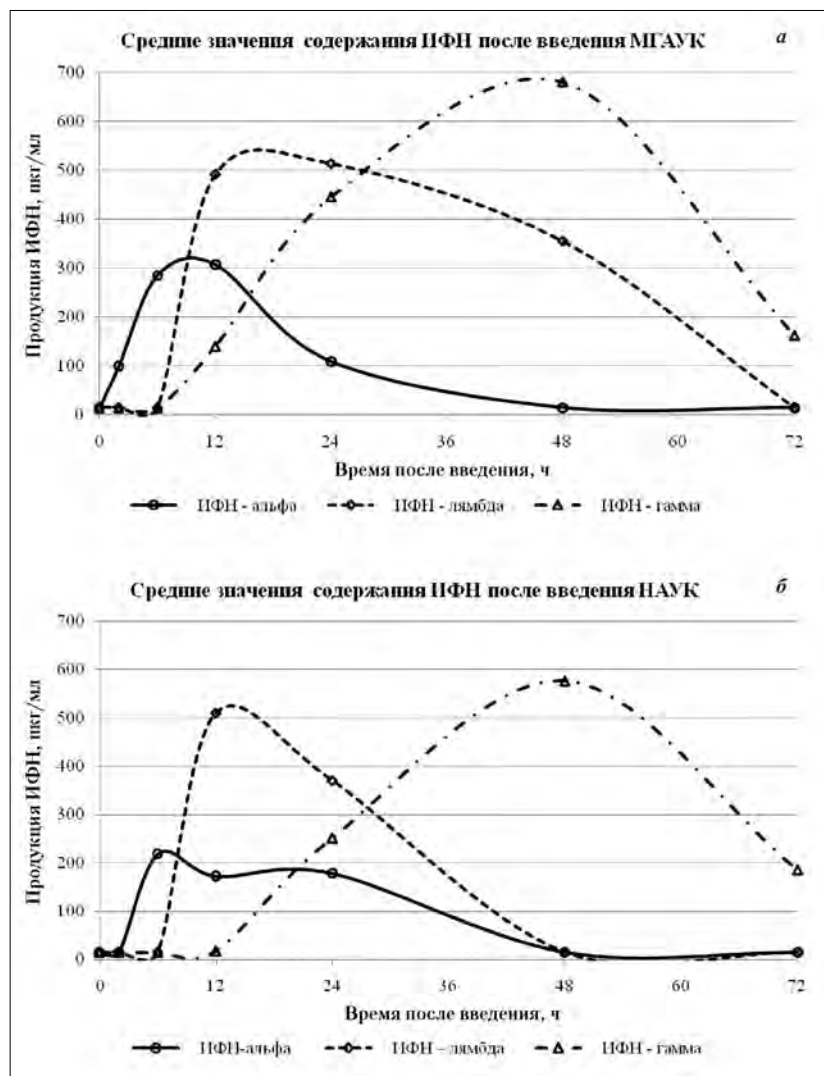


Рис. 4. Средние значения содержания ИФН 1-го, 2-го и 3-го типов (при дозах МГАУК и НАУК — 2,0—3,5 мг/мышь).

уже через 2 ч после его введения и, продолжаясь до 24 ч включительно, всегда количественно тестировалась на более высоком уровне. Под действием оптимальных доз НАУК таковая определялась через 6 ч после введения, постепенно снижаясь к 24 ч. Различия в сроках начала индукции и регистрации продукции ИФН- $\alpha$  между исследуемыми солями связаны, возможно, с большей аффинностью соответствующих рецепторов к МГАУК, о чем свидетельствует также более продолжительная (48 ч), чем под действием НАУК (24 ч), циркуляция в крови индуцированного им в оптимальных дозах ИФН- $\lambda 2$  и - $\lambda 3$  (3-го типа). Особенно обращает внимание тот факт, что как МГАУК, так и НАУК в высоких дозах 5,0—7,0 мг/мышь вызывают синдром отмены индукции — продукции и циркуляции в крови мышей ИФН- $\alpha$ , хотя продукция и циркуляция ИФН 2-го и 3-го типов с повышением доз солей продолжает нарастать. Подавление индукции ИФН- $\alpha$  тесно связано с ингибирующим действием белков SOCS

(suppressors of cytokine signaling), которые в физиологических условиях продуцируются параллельно с ИФН или другими цитокинами и негативно влияют на сигнальные пути провоспалительных цитокинов. Связывая и разрушая рецепторы провоспалительных цитокинов, в том числе и ИФН 1-го типа, они предупреждают их избыточную продукцию и опосредованные ими возможные избыточные воспалительные реакции [14, 15]. Поскольку рецепторы ИФН 1-го типа, в отличие от рецепторов ИФН 2-го и 3-го типов, представлены практически на всех клетках организма, увеличение доз МГАУК или НАУК до 5,0–7,0 мг/мышь приводит к их более ранней гиперстимуляции, которая вызывает SOCS-опосредованную ингибицию сигнальных путей ИФН 1-го типа, предупреждающую его гиперпродукцию. Ввиду ограниченного спектра клеток, экспрессирующих рецепторы ИФН- $\gamma$  и ИФН- $\lambda$ , их гиперстимуляция и последующая гиперпродукция ИФН- $\gamma$  и ИФН- $\lambda$  под действием солей акридонуксусной кислоты в дозах 5,0–7,0 мг/мышь не происходит. Подавление и прекращение индукции — продукции ИФН- $\gamma$  и ИФН- $\lambda$  произойдет, вероятно, при использовании солей акридонуксусной кислоты в дозах больше, чем 7,0 мг/мышь.

Таким образом, пероральное введение меглуминовой или натриевой соли акридонуксусной кислоты вызывает прямую дозозависимую индукцию — продукцию сывороточных ИФН трёх типов: в дозах 0,5–3,5 мг/мышь — ИФН 1-го типа, в дозах 0,5–7,0 мг/мышь — ИФН 2-го и 3-го типов. После однократного перорального введения меглуминовой и натриевой соли акридонуксусной кислоты в оптимальных дозах 2,0–3,5 мг/мышь обеспечивают последовательную, перекрывающую индукцию — продукцию и пролонгированную циркуля-

цию в крови ИФН 1-го, 2-го и 3-го типов в течение 72 ч включительно. Меглуминовая соль акридонуксусной кислоты в оптимальных дозах 2,0–3,5 мг/мышь опосредует индукцию и циркуляцию в крови ИФН 1-го типа в течение 46 ч после введения (с 2 ч по 48 ч включительно); натриевая соль — в течение 18 ч после введения (с 6 по 24 часа включительно). Оптимальные дозы меглуминовой соли акридонуксусной кислоты — 2,0–3,5 мг/мышь, вызывают индукцию — продукцию сывороточного ИФН 3-го типа в течение 36 ч после введения (с 12 по 48 ч включительно); натриевая соль — в течение 12 ч после введения (с 12 по 24 ч включительно). Индукция — продукция и циркуляция в крови ИФН 2-го типа под действием оптимальных доз меглуминовой соли акридонуксусной кислоты (2,0–3,5 мг/мышь) определялась в течение 60 ч после однократного введения (с 12 по 72 ч включительно); под действием натриевой соли акридонуксусной кислоты — в течение 48 ч (с 24 по 72 ч включительно). Однократное пероральное введение меглуминовой соли акридонуксусной кислоты в оптимальных дозах обеспечивает более сбалансированную индукцию, продукцию и циркуляцию в крови ИФН 1-го, 2-го и 3-го типов до 72 часов после введения включительно, чем использование натриевой соли акридонуксусной кислоты в тех же условиях.

Для уточнения механизмов индукции ИФН производными акридонуксусной кислоты целесообразно провести исследования, которые позволили бы рассматривать их агонистами противовирусных Toll-like рецепторов (TLR 3, 7, 8 или 9), опосредующих включение естественного и активацию адаптивного иммунных ответов так, как это показано для производных имидазохинолинов, отнесённых к агонистам TLR 7 и TLR 7/8 соответственно [16–18].

## ЛИТЕРАТУРА

1. Коваленко А. Л. Фармакологическая активность оригинальных лекарственных препаратов на основе 1-дезоксид-1-(N-метиламино)-D-глюцитолола. Автореф. дисс. ... д.б.н. СПб.: 2005; 48.
2. Shapira S. D., Hacohen N. Systems biology approaches to dissect mammalian innate immunity. *Curr Opin Immunol* 2011; 23: 2373–2377.
3. Hertzog P. J. Type 1 interferons as primers, activators and inhibitors of innate and adaptive immune responses. *Immunol Cell Biol* 2012; 90: 471–473.
4. Hervas-Stubs S., Perez-Garcia J. L. et al. Direct effects of type 1 interferons on cells of immune system. *Clin Cancer Res* 2011; 17: 2619–2627.
5. Choubey D., Moudgi K. D. Interferons in autoimmune and inflammatory diseases: regulation and roles. *J Interferon & Cytokine Research* 2011; 12: 857–865.
6. Hillyer Ph., Mane V. P. et al. Expression profiles of human interferon-alpha and interferon-lambda subtypes are ligand- and cell-dependent. *Immunol Cell Biol* 2012; 90: 774–783.
7. Mordstein M., Neugebauer E. et al. Lambda interferon renders epithelial cells of respiratory and gastrointestinal tracts resistant to viral infections. *Virology* 2010; 11: 5670–5677.
8. Jewell N. A., Cline T. et al. Lambda interferon is the predominant interferon induced by influenza A virus infection *in vivo*. *Virology* 2010; 11515–1122.
9. Donnelly R. P., Kotenko S. V. Interferon-lambda: a new addition to an old family. *J. Interferon & Cytokine Res* 2010; 8: 555–564.
10. Kotenko S. V. IFN- $\lambda$ s. *Curr Opin Immunol* 2011; 23: 1–8.
11. Levy D. E., Marie I. J. Induction of type 1 and 3 interferon in response to viral infection. *Curr Opin Virol* 2011; 1: 476–486.
12. Wang B. X., Fish E. N. The yin and yang of viruses and interferons. *Trend Immunol* 2012; 33: 190–197.
13. Интерферон — 2011. Сборник научных статей. М.: 2012.
14. Nowoslawski L., Benveniste E. N. Viral exploitation of host SOCS protein functions. *Virology* 2011; 1912–1921.
15. Forsbach A., Muller Ch. et al. Negative regulation of type 1 interferon signaling pathway. *J Interferon & Cytokine Res* 2012; 6: 254–268.
16. Miller R. L., Meng T. C., Tomai M. A. The antiviral activity of Toll-like receptor 7 and 7/8 agonists. *Drug News Perspect* 2008; 21: 2: 69–87.
17. Ahn M. Y., Kwon S. M. et al. Toll-like receptor 7 agonist, imiquimod, inhibits oral squamous carcinoma cells through apoptosis and necrosis. *J Oral Pathol Med* 2012; 41: 7: 540–546.
18. Puig M., Tosh K. W. et al. CpG ODN and imiquimod induce distinct type interferon responses in humans and non-human primates. *J Leukoc Biol* 2012; 91: 147–158.

# Персистенция бактерий и вирусов в организме Ixodes

В. М. ПОДБОРОНОВ<sup>1</sup>, И. П. СМЕРНОВА<sup>2</sup>

<sup>1</sup> НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Н. Ф. Гамалеи Минздрава России, Москва

<sup>2</sup> Российский университет дружбы народов, Москва

## Persistence of Bacteria and Viruses in Ixodes

V. M. PODBORONOV, I. P. SMIRNOVA

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

Russian Peoples' Friendship University, Moscow

Проведено углублённое изучение поведения вирусов и сальмонелл в клещах при раздельном и комбинированном заражении их на лабораторных животных с бактериемией или вирусемией. При одновременном заражении клещей *Ixodes ricinus* вирусом клещевого энцефалита и сальмонеллами отмечено снижение титра вируса к 30—40 суткам, а через 60 дней наблюдается полная его гибель. При заражении нимф *I. ricinus* количество вируса при смешанном заражении через 60 дней наблюдения было на два порядка ниже, чем при заражении одним вирусом, и не достигало заражающей дозы. При смешанном инфицировании клещей одновременно двумя возбудителями инфекций (вирусом клещевого энцефалита и сальмонеллами) происходит угнетение роста и развития как вируса клещевого энцефалита, так и сальмонелл.

**Ключевые слова:** персистенция, клещи, бактерии, вирусы, выживаемость.

Behaviour of viruses and salmonellas in ticks after their single or combined contamination was thoroughly studied on laboratory animals with bacteriemia or viraemia. When *Ixodes ricinus* was contaminated simultaneously with forest-spring encephalitis virus and salmonellas there were observed a decrease in the virus titer by the 30<sup>th</sup>—40<sup>th</sup> days and its death in 60 days. In case of the *I. ricinus* nymphs contamination, the virus titer after the combined contamination was by a factor of 10<sup>2</sup> lower in 60 days vs. the contamination with the virus alone and did not reach the contamination dose. The simultaneous contamination of the ticks with two pathogens (forest-spring encephalitis virus and salmonellas) resulted in inhibition of the growth and development of both the virus and the salmonellas.

**Key words:** persistence, ticks, bacteria, viruses, survival.

В настоящее время основное внимание исследователей уделяется изучению смешанных инфекций в организме клещей в природных условиях. Этот вопрос исследовался в экспериментах с вирусной и бактериальной инфекциями, проведён широкий литературный обзор клещевых микстинфекций [1—5].

Однако экспериментальных работ по микстинфекциям клещевого энцефалита (КЭ) и сальмонеллёза крайне мало [6, 7], и в связи с этим целью настоящего изучения стало проведение экспериментальных исследований по выяснению характера поведения вирусов и сальмонелл в клещах при раздельном и комбинированном заражении их на лабораторных животных с бактериемией или вирусемией.

## Материал и методы

Экспериментальной моделью служили клещи *Ixodes ricinus* (Linnaeus, 1758) — специфические переносчики кле-

щевого энцефалита. Исследования проводили на клещах лабораторной линии, свободной от патогенной флоры. Для инфицирования использовали вирус КЭ штамм «Софьин» и бактериальную культуру *Salmonella typhimurium* LT-2; заражение смешанной инфекцией белых мышей производили внутрибрюшинно. Для заражения клещей использовали титрованную 10% суспензию мозга больных мышей и бактериальную культуру сальмонеллы. Клещей кормили на заражённых мышках. На заражённость вирусом и бактериями проверяли только полностью напивавшихся клещей. Исследование проводили в сроки, указанные в табл. 1 и 2. Повторность опытов 2—3-кратная. Определение вируса в клещах проводили путём титрования на белых мышках. Для титрования брали 2 половозрелых клеща и 3 нимфы. Обработанных физраствором и 96% спиртом клещей растирали в фарфоровой ступке, добавляли 1 мл физиологического раствора, который содержал 1000 единиц канамидина для оседления суспензии от сальмонелл. Делали посев суспензии на мясо-пептонный бульон для проверки наличия сальмонелл. Затем суспензию центрифугировали при 3000 об/мин в течение 10 мин, делали разведения с 10<sup>-1</sup> до 10<sup>-10</sup>. Затем каждым разведением заражали мышей (по 5 мышей) интрацеребральным введением.

На заражённость сальмонеллами клещей проверяли по той же схеме и 10-кратные разведения суспензии высевали по 0,1 мл на агаровые пластинки. Посевы инкубировали в термостате 2—5 суток при температуре 37°C, затем учитывали количество выросших колоний.

© В. М. Подборонов, И. П. Смирнова, 2014

Адрес для корреспонденции: 123098, г. Москва, ул. Гамалеи, дом 18. НИИЭМ им. Н. Ф. Гамалеи

**Таблица 1.** Изменение титра вируса клещевого энцефалита (в Ig LD<sub>50</sub>/0,03 мл) при заражении иксодовых клещей вирусом клещевого энцефалита и сальмонеллами

| Вид клещей              | Стадия развития | Период между заражением и исследованием клещей (метод титрования) |      |      |      |      |       |        |        |        |        |        |               |
|-------------------------|-----------------|---|------|------|------|------|-------|--------|--------|--------|--------|--------|---------------|
|                         |                 | 0 ч   | 12 ч | 24 ч | 48 ч | 72 ч | 6 сут | 12 сут | 18 сут | 24 сут | 30 сут | 40 сут | 60 сут        |
| Имаго <i>I. ricinus</i> | опыт            | 6,4   | 4,2  | 4,1  | 4,9  | 5,0  | 5,9   | 4,8    | 4,0    | 4,1    | 3,9    | 3,5    | Не обнаружено |
|                         | контроль        | 7,8   | 6,1  | 5,3  | 5,5  | 7,4  | 7,9   | 8,1    | 6,2    | 5,9    | 5,2    | 5,0    | 4,7           |
| Нимфы <i>I. ricinus</i> | опыт            | 7,6   | 7,2  | 7,1  | 5,4  | 5,2  | 5,0   | 5,0    | 4,4    | 4,2    | 4,0    | 3,7    | 3,4           |
|                         | контроль        | 7,8   | 7,4  | 7,6  | 7,2  | 7,1  | 6,5   | 6,2    | 6,1    | 6,0    | 5,8    | 5,4    | 4,9           |

**Примечание.** Контроль – заражение только вирусом клещевого энцефалита.

**Таблица 2.** Изменение числа жизнеспособных бактерий *S. typhimurium* (10×10<sup>7</sup> микробных клеток на 1 особь) при заражении иксодовых клещей вирусом клещевого энцефалита и сальмонеллами

| Вид клещей              | Стадия развития | Период между заражением и исследованием клещей (метод посева) |                     |                     |                     |                     |                     |                     |                     |                     |                     |                     |
|-------------------------|-----------------|---|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|
|                         |                 | 0 ч   | 12 ч                | 24 ч                | 48 ч                | 72 ч                | 6 сут               | 12 сут              | 18 сут              | 24 сут              | 30 сут              | 60 сут              |
| Имаго <i>I. ricinus</i> | Опыт            | 1,0×10 <sup>8</sup>   | 1,3×10 <sup>8</sup> | 50                  | 17                  | 6                   | 2                   | Роста нет           | Роста нет           | Роста нет           | Роста нет           | Роста нет           |
|                         | Контроль        | 1,0×10 <sup>8</sup>   | 1,0×10 <sup>6</sup> | 6,4×10 <sup>5</sup> | 2,3×10 <sup>5</sup> | 8,5×10 <sup>3</sup> | 1,1×10 <sup>4</sup> | 9,0×10 <sup>2</sup> | 5,3×10 <sup>2</sup> | 4,3×10 <sup>2</sup> | 120                 | 58                  |
| Нимфы <i>I. ricinus</i> | Опыт            | 1,0×10 <sup>8</sup>   | 2,5×10 <sup>6</sup> | 2,0×10 <sup>4</sup> | 1,3×10 <sup>2</sup> | 88                  | 40                  | 4                   | Роста нет           | Роста нет           | Роста нет           | Роста нет           |
|                         | Контроль        | 1,0×10 <sup>8</sup>   | 1,0×10 <sup>7</sup> | 6,5×10 <sup>5</sup> | 2,4×10 <sup>5</sup> | 1,8×10 <sup>5</sup> | 1,2×10 <sup>5</sup> | 3,1×10 <sup>4</sup> | 2,8×10 <sup>4</sup> | 8,5×10 <sup>3</sup> | 4,9×10 <sup>3</sup> | 2,0×10 <sup>3</sup> |

**Примечание.** Контроль – заражение только вирусом клещевого энцефалита.

## Результаты и обсуждение

Сериями опытов установлено, что половозрелые клещи *I. ricinus* могут быть резервуаром для вируса КЭ, сохраняя его в течение всего срока наблюдения (60 дней). Инфицированные клещи способны сохранять вирулентный штамм *S. typhimurium* LT-2. Как видно из табл. 1, количество вируса и сальмонелл уменьшалось по мере увеличения срока пребывания в их организме.

При заражении нимф *I. ricinus* вирус в их организме сохранялся в течение всего срока наблюдения как при заражении только вирусом, так и при заражении смешанной инфекцией.

Через 60 суток наблюдения титр вируса при смешанном заражении (вирусом КЭ и сальмонеллами) был на порядок ниже, чем в контроле и составлял Ig LD 50/0,03 мл — 3,4, а в контроле Ig LD 50/0,03 мл — 4,9.

Динамика выживания бактерий при заражении нимф *I. ricinus* сальмонеллами и вирусом КЭ изменялась и в течение 12 суток соотношение уровней их численности резко снижалось. Число бактерий через 6 суток составляло 2 колонии, через 12, 18, 24, 30 и 60 суток сальмонеллы при посеве не выявлялись. В контроле нимф, заражённых только сальмонеллами, бактерии высевались с ростом колоний в течение 60 суток, однако число их снижалось с 1,0×10<sup>8</sup> КОЕ/мл до 2,0×10<sup>3</sup> КОЕ/мл к 60 суткам (табл. 2).

Таким образом, в организме клещей *I. ricinus* угнетение роста возбудителей болезней при смешанном заражении происходит быстрее, чем в контроле. Результаты экспериментов подтверждают сделанный ранее вывод, что гибель вирусов и бактерий в клещах зависит не только от свойств

штаммов возбудителей и их антагонистических взаимоотношений, но и от защитных механизмов клещей [8–11].

Большой интерес представляют работы по микстинфекциям (клещевой энцефалит и *Borrelia afzelii*) по взаимодействию внеклеточных и внутриклеточных патогенов в организме клещей *I. ricinus*. Авторы делают выводы, что аномальное потемнение экологических изменений) и нормальных самок клещей чаще является более чувствительным к заражению КЭ и в связи с этим более эпидемически опасным. При совместном попадании в организм клеща вируса КЭ и бактерии возможно антагонистическое взаимодействие между возбудителями [1, 5].

Н. П. Мишаева и др. установили, что вирус КЭ стимулирует активность клещей, а боррелии, наоборот, снижают. Боррелии вызывающие менее тяжёлую бактериальную инфекцию, конкурируя с вирусом КЭ, частично подавляют и ограничивают как распространение, так и тяжесть вирусной болезни. Авторы считают это явление первым в истории науки фактором обнаружения подавления вируса бактерией в одном и том же организме — в клеще переносчике [5].

## Заключение

При одновременном заражении клещей *I. ricinus* вирусом клещевого энцефалита и сальмонеллами отмечено снижение титра вируса к 30–40 суткам, а через 60 дней наблюдается полная его гибель. В контроле, где клещи заражены только одним вирусом клещевого энцефалита, вирус выделялся в течение всего наблюдаемого

срока (60 дней). Отмечена аналогичная картина в изменении количества вируса в организме клещей, которое, однако, было несколько выше, чем при инфицировании двойной инфекцией и несколько ниже по сравнению с исходной заражающей дозой.

При заражении нимф *I. ricinus* вирус в их организме сохранялся в течение всего наблюдаемого срока как при заражении нимф смешанной инфекцией, так и при заражении одним вирусом клещевого энцефалита. Однако количество вируса при смешанном заражении через 60 дней наблюдения было на два порядка ниже, чем при заражении одним вирусом, и не достигало заражающей дозы.

Сальмонеллы при смешанном заражении сохранялись в организме половозрелых клещей *I. ricinus* до 12 суток. В контроле при заражении

одной бактериальной культурой, сальмонеллы сохранялись в течении всего наблюдаемого срока, и их число составляло несколько десятков (58 КОЕ/мл). Аналогичные данные получены при заражении нимф *I. ricinus*. Сальмонеллы погибали при заражении смешанной культурой через 18 суток, в то время как в контроле они оставались жизнеспособными.

При смешанном инфицировании клещей одновременно двумя возбудителями инфекций (вирусом клещевого энцефалита и сальмонеллами) происходит угнетение роста и развития как вируса клещевого энцефалита, так и сальмонелл.

Исходя из вышесказанного, представляется целесообразным продолжение дальнейших исследований в этом направлении, так как полученные результаты могут представлять интерес для целей практической медицины.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Алексеев А.Н., Дубинина Е.В., Мишаева Н.П., Головлёва И.В. О взаимодействии клещевых патогенов в организме беспозвоночного хозяина, клеща *Ixodes ricinus* (*Ixodidae*). Естеств техн науки 2011; 3: 136—139.
2. Коренберг Э.И. Взаимоотношения возбудителей трансмиссивных болезней в микстинфицированных иксодовых клещах (*Ixodidae*). Паразитология 1999; 4: 272—289.
3. Коренберг Э.И. Изучение и профилактика микст-инфекций, передающихся иксодовыми клещами. Вест акад мед наук М.: 2001; 11: 41—45
4. Коренберг Э.И. Микст-инфекции передающиеся иксодовыми клещами: современное состояние проблемы. Успех совр биол 2003; 5: 123: 475—486.
5. Мишаева Н.П., Стегний В.А., Алексеев А.Н., Дубинина Е.В. Антагонистическое взаимодействие возбудителей клещевых инфекций в организме беспозвоночного хозяина. Сахаровские чтения 2011 года: экологические проблемы XXI века. Матер. 11-й международ. Научн. конф. 19—20 мая 2011 г. Минск, Республика Беларусь. Минск: МГЭУ им. А. Д. Сахарова, 2011; 126.
6. Подборонов В.М., Бондаренко В.М., Хмель И.А., Манохина И.М. Вытеснение вирулентных бактерий *Salmonella typhimurium* микроцинпродуцирующим штаммом *Escherichia coli* при их совмещении в гемоцеле членистоногих. ЖМЭИ 1994; 6: 4—5.
7. Подборонов В.М., Бондаренко В.М., Гришин В.П. Взаимовлияние бактерий кишечной палочки и сальмонелл при смешанном заражении клещей. Мед паразитол паразитарн бол 2000; 3: 32—35.
8. Подборонов В.М. Возбудители болезней человека, животных и клещи. М. изд-во «Медицина». 2004; 224.
9. Подборонов В.М., Шелканов М.Ю., Смирнова И.П., Буренкова Л.А., Новикова В.П., Аристова В.А., Новикова Е.Л., Москвитина Г.Г., Иоффе А.М. Бактерицидное действие лизоцима. Антибиотики и химиотер 2013; 58, 3—4: 22—24.
10. Alekseev A.N., Burenkova L.A., Podboronov V.M., Chunikhin S.P. Bactericidal quality of ixodiod ticks (acarina, Ixodidae) salivary cement plugs, a viral tick-borne pathogen. J Med Entomol 1995; 5: 32: 578—582.
11. Podboronov V.M. Antibacterial Protective Mechanisms of Ixodiod Ticks. Modern Acarology, Academia, Prague and SPB Publishing bv. The Hague. 1991; 2: 375—380.

# Экспериментальная оценка иммуномодулирующей активности нового отечественного синтетического препарата «Тубосан»

Н. К. ЧЕРНИКОВА<sup>1</sup>, В. В. МИХАЙЛОВ<sup>2</sup>, С. В. БОРИСЕВИЧ<sup>1</sup>

<sup>1</sup> 48 Центральный научно-исследовательский институт Минобороны России, Сергиев Посад

<sup>2</sup> Биофарм Право-Альфа, Сергиев Посад

## Experimental Estimation of Immunomodulating Activity of Tubosan, a New Russian Synthetic Drug

N. K. CHERNIKOVA, V. V. MIKHAILOV, S. V. BORISEVICH

Central Research Institute No. 48, Ministry of Defense of the Russian Federation, Sergiev Posad

Biopharm Pravo-Alpha, Sergiev Posad

Новый отечественный синтетический иммуностимулятор «Тубосан», относящийся к группе пиримидиновых соединений сульфонового ряда, стимулирует гуморальный противовирусный иммунитет у мышей: увеличивает количество антителообразующих клеток в селезёнке мышей, иммунизированных эритроцитами барана, и титры вируснейтрализующих антител после иммунизации животных инактивированной и живой вакцинами ВЭЛ. Способность тубосана снижать реактогенность живой вакцины ВЭЛ открывает новые перспективы применения иммуностимуляторов данной группы в медицинской практике.

*Ключевые слова:* иммуностимулятор, иммунный ответ, реактогенность.

Tubosan, a new Russian immunostimulator is a derivative of sulfonylpyrimidine. It stimulated the humoral antiviral immunity in mice, provoked increasing the number of the antibody forming cells in the spleen of mice, immunized by sheep's erythrocytes, and increased the titers of the virus-neutralizing antibodies after immunization by inactivated and live vaccines VEE. The Tubosan ability to lower the reactogenicity of the live VEE vaccine provided new perspectives for using such immunomodulators in medical practice.

*Key words:* immunostimulator, immune response, reactogenicity.

### Введение

В настоящее время наблюдается существенный прогресс в знаниях о структуре и функциях иммунной системы человека, что позволяет внедрить в практику здравоохранения информативные методы оценки и коррекции её состояния с помощью целого ряда иммуномодуляторов различной природы [1, 2].

В числе синтетических иммуностимуляторов, имеющих прикладное значение и применяемых для профилактики и лечения иммунодефицитов, в том числе при инфекционных заболеваниях, выделяют пиримидиновые соединения, среди которых более эффективными и менее токсичными являются сульфоновые производные пиримидина [3].

Характерный представитель этой группы соединений — препарат диуцифон, внедрённый в клиническую практику коллективом НИЛ иммунохимиотерапии лепры [4]. Разработаны методики успешной иммунокоррекции диуцифоном

вторичных иммунодефицитов, наблюдаемых при проказе, туберкулёзе, септическом шоке, гнойных хирургических заболеваниях, а также при аутоиммунных состояниях (системная склеродермия, ревматоидный артрит, красная волчанка). Такими же свойствами обладают и другие сульфоновые производные пиримидина. При изучении механизмов, лежащих в основе иммуномодулирующей активности данных соединений, установлено их влияние на синтез РНК и белка в лимфоцитах человека и животных, активацию пролиферации иммунокомпетентных клеток, увеличение абсолютного и относительного количества Т-лимфоцитов, соотношение фракций СД-8 и СД-4 Т-лимфоцитов, усиление бласттрансформации лимфоцитов, деятельность стволовых клеток костного мозга, фагоцитарную активность макрофагов [5].

В 2001 г. во ФГУП ГосНИИ «Кристалл» (г. Дзержинск) в результате направленного синтеза было получено новое соединение сульфопиримидинового ряда — метилдиокситетрагидропиримидинсульфон-изоникотиноилгидразид, выгодно отличающееся от предшественников своими физическими свойствами. В 2008 г. оно было заре-

© Коллектив авторов, 2014

Адрес для корреспонденции: 117105 Москва, Нагатинская ул, д. 3а.  
Редакция журнала Антибиотики и химиотерапия

**Таблица 1. Оценка влияния тубосана на АОК в селезёнке мышей, иммунизированных эритроцитами барана**

| Иммунизирующая доза ЭБ, клеток/мышь | Номер серии препарата | Количество АОК, $X_{cp} \pm I_{95}$ | Индекс стимуляции |
|-------------------------------------|-----------------------|-------------------------------------|-------------------|
| 3×10 <sup>7</sup>                   | 1                     | 66,7±26,1                           | 3,99              |
|                                     | 2                     | 66,5±14,2                           | 3,98              |
|                                     | 3                     | 54,0±14,6                           | 3,23              |
| 2×10 <sup>8</sup>                   | Физ. раствор          | 16,7±5,1                            | —                 |
|                                     | 1                     | 100,6±21,5                          | 1,64              |
|                                     | 2                     | 68,5±17,8                           | 1,11              |
|                                     | 3                     | 106,2±11,1                          | 1,72              |
|                                     | Физ. раствор          | 61,5±11,7                           | —                 |

**Примечание.** 1 — группы животных, которым вместо тубосана вводили физиологический раствор, служили в качестве контрольных; 2 — в каждой группе  $n=10$ ; 3 — тубосан вводили внутривентриально в дозе 500 мкг/мышь; 4 — индекс стимуляции определяли как соотношение средней величины количества АОК в опытной и контрольной группах.

гистрировано ЗАО «Биофарм Право-Альфа» в Реестре лекарственных средств России под номером ЛСР-006593/08 под торговым названием Тубосан. Препарат заявлен как иммуностимулирующее средство, оказывающее влияние на все звенья иммунной системы, активный в отношении микобактерий туберкулёза, лепры и вируса герпеса [6].

Целью настоящей работы стало изучение иммуномодулирующей активности тубосана и оценка возможности применения соединений этого ряда в вакцинологии. Имеется достаточно данных об адьювантном действии иммуномодуляторов и использовании их для усиления иммунного ответа при вакцинации слабоиммуногенными противовирусными вакцинами или для устранения иммуносупрессии [1, 2, 7]. Возрастающее внимание к проблеме реактогенности вакцин и поствакцинальных осложнений, особенно в связи с изменением иммунного статуса населения [8], послужило основанием для изучения возможности снижения с помощью тубосана количества поствакцинальных реакций.

## Материал и методы

Тубосан (метилдиокситетрагидропиримидин-сульфонизоникотиноилгидразид) представляет собой мелкодисперсный порошок светло-жёлтого цвета, легко растворимый в воде. Выпускается в капсулах.

Живые вакцины венесуэльского энцефаломиелиита лошадей (ВЭЛ) эмбриональные на основе штаммов 230 и 15 разработаны в ФГКУ НИЦ «33 ЦНИИИ» Минобороны России [9, 10]. Препараты ранее использовали для иммунизации групп риска, но в настоящее время не применяют в связи с повышенным уровнем реактогенности. Экспериментальный образец инактивированной вакцины ВЭЛ получен в ФГКУ НИЦ «48 ЦНИИИ» Минобороны России на основе очищенного методами дифференциального центрифугирования и ультрафильтрации инактивированного формалином вируса ВЭЛ (штамм 15), выращенного в РКЭ.

Мыши линии Balb/c массой 17–20 г приобретены в питомнике «Столбовая» Подольского района Московской области. Беспородные белые мыши массой 17–20 г и морские свинки массой 200–250 г выращены в питомнике ФГКУ НИЦ «33 ЦНИИИ» Минобороны России.

Препарат перед началом опытов растворяли в изотоническом растворе хлориде натрия и вводили животным внутривентриально или подкожно. Иммунизировали мышей и морских свинок подкожно. Дозы и схемы введения указаны в табл. 1–3.

Вирулицидную активность тубосана исследовали при воздействии препарата в концентрациях 10, 200 и 1000 мкг/мл на вирус ВЭЛ (штамм 15) *in vitro* в течение 1 ч при 37°С. Биологическую активность вируса определяли по цитопатическому действию в первично трипсинизированной культуре клеток куриных фибробластов (КФ).

Иммуностимулирующую активность оценивали по способности усиливать образование антителообразующих клеток (АОК) в селезёнке половозрелых белых мышей, иммунизированных эритроцитами барана (ЭБ), [11], а также по влиянию на образование вируснейтрализующих антител (ВНА) у животных в ответ на иммунизацию инактивированной и живой вакцинами ВЭЛ через 30 дней после иммунизации. Количество антителообразующих клеток (АОК) выявляли через 4 суток после введения эритроцитов методом локального гемолиза в геле. Титры ВНА определяли в реакции нейтрализации на культуре клеток КФ с 10–100 ЦПД<sub>50</sub> штамма 230 вируса ВЭЛ при пятикратном разведении сывороток.

Способность влиять на реактогенность вакцины ВЭЛ (штамм 15) оценивали по выраженности лихорадочной реакции у морских свинок в течение первых пяти суток после вакцинации дозой 3×10<sup>4</sup> ЦПД<sub>50</sub>.

Статистическую обработку результатов проводили согласно руководству по применению статистических методов в биологических исследованиях [12].

## Результаты и обсуждение

На первом этапе исследований при воздействии тубосана в диапазоне доз от 10 до 1000 мкг/мл на культуру штамма 15 вируса ВЭЛ *in vitro* снижения биологической активности вирусосодержащих проб выявлено не было. Величины ЦПД<sub>50</sub> в пробах до и после воздействия тубосана достоверно не отличались друг от друга, что свидетельствовало об отсутствии вирулицидных свойств данного лекарственного средства.

Иммуномодулирующую активность тубосана по способности влиять на образование АОК в селезёнке белых мышей линии Balb/c, иммунизированных эритроцитами барана, оценивали при внутривентриальном введении препарата сразу после иммунизации в дозе 500 мкг на особь. Результаты экспериментов представлены в табл. 1.

Из приведённых данных видно, что при иммунизации мышей 3×10<sup>7</sup> ЭБ/мышь количество АОК в опытных группах достоверно выше, чем в контрольной, что позволяет сделать вывод о выраженной иммуностимулирующей активности



**Таблица 2. Оценка влияния тубосана на образование ВНА при вакцинации белых мышей**

| Вакцина, прививочная доза                          | Разовая доза, мкг/мышь, схема и способ введения тубосана     | Титр ВНА в сыворотках крови, Ме (I <sub>95</sub> ) |
|--|--|--|
| Инактивированная вакцина ВЭЛ, 50 мкг белка         | 500, двукратно, за 1 сутки и 30 мин до вакцинации, подкожно  | 1:69 (1:37—1:84)                                   |
|  | Не вводили   | 1:30 (1:25—1:37)                                   |
| Живая вакцина ВЭЛ, штамм 230, 60 ЦПД <sub>50</sub> | 500, двукратно, за 1 сутки и 30 мин. до вакцинации, подкожно | 1:506 (1:278—1:625)                                |
|  | Не вводили   | 1:103 (1:56—1:125)                                 |

**Примечание.** В каждой группе  $n=20$ , исследовали 4 пула по 5 сывороток.

**Таблица 3. Влияние тубосана на лихорадочную реакцию морских свинок, привитых живой вакциной ВЭЛ (штамм 15) в дозе  $3 \times 10^4$  ЦПД<sub>50</sub>**

| Схема введения препарата относительно вакцинации, разовая доза | Доля животных с лихорадкой, %, $X_{ср}$ (I <sub>95</sub> ) | Время появления лихорадочной реакции, сутки, Ме (I <sub>95</sub> ) | Продолжительность лихорадочной реакции, сутки, Ме (I <sub>95</sub> ) | Выраженность температурной реакции во всей группе привитых животных, °С, Ме (I <sub>95</sub> ) |
|--|--|--|--|--|
| Двукратно (за 24 и 0,5 ч), 50 мг/кг                            | 90 (56—100)  | 3,0 (2,0—3,0)  | 4,0 (1,0—5,0)  | 39,8 (39,7—40,2)   |
| Трёхкратно (за 24, 0,5 и через 24 ч), 50 мг/кг                 | 70 (35—93)   | 3,0 (2,0—4,0)  | 3,0 (2,0—5,0)  | 39,6 (39,3—40,2)   |
| Четырёхкратно (за 24, 0,5 через 24, 48 ч), 50 мг/кг            | 40 (12—41)   | 3,0 (1,0—4,0)  | 1,5 (1,0—2,0)  | 39,5 (39,1—39,8)   |
| Не вводили   | 80 (41—98)   | 2,0 (1,0—4,0)  | 3,5 (1,0—5,0)  | 39,7 (39,5—40,1)   |

препарата. Увеличение иммунизирующей дозы до  $2 \cdot 10^8$  ЭБ/мышь нивелирует различия в количестве АОК в опытных и контрольной группах.

При изучении влияния тубосана на иммуногенность инактивированной (в дозе 50 мкг белка) и живой на основе штамма 230 (в заведомо низкой дозе 60 ЦПД<sub>50</sub>) вакцин ВЭЛ (табл. 2) было установлено, что предварительное введение препарата белым мышам приводило к повышению средних титров антител в 2 и 5 раз соответственно.

Анализируя результаты изучения влияния тубосана на клинические проявления вакцинального процесса (лихорадочную реакцию) у морских свинок, привитых живой вакциной ВЭЛ на основе штамма 15, представленные в таблице 3, можно прийти к заключению, что вакцинация животных на фоне четырёхкратного введения тубосана (за сутки, 0,5 суток до иммунизации и в течение двух суток после неё) приводит к развитию менее выраженной лихорадочной реакции по сравнению с ответом на иммунизацию без предварительного введения препарата в контрольной группе. Уменьшается не только количество лихорадящих особей с 80 до 40%, но и выраженность температурной реакции (замедляется время появления лихорадки и сокращается её продолжительность) в опытной группе животных.

В связи с отсутствием у тубосана прямого вирулицидного действия, подобный эффект, по-видимому, обусловлен его иммуностимулирующими свойствами. Вызванная стимуляция механизмов реакций иммунной системы позволила либо полностью избежать поствакцинальной реакции, либо существенно снизить её про-

явление. При этом важным моментом является тот факт, что средняя величина титров ВНА в опытной группе (1:256) была не ниже аналогичного показателя в контрольной группе (1:125).

Выявленные факты открывают перспективу нового аспекта применения тубосана и подобных ему соединений в практике вакцинологии.

Обобщая результаты воздействия тубосана на различные проявления иммунного процесса, можно высказать предположение, что его влияние на механизмы иммунитета в определённой мере зависит от силы антигенного раздражения и обусловлено изменением соотношения популяций Т-лимфоцитов: при слабом антигенном воздействии (см. табл. 1 и 2) происходит стимуляция Т-хелперов, приводящая к увеличению уровня гуморального иммунитета; при сильном антигенном влиянии, сопровождаемом клиническими проявлениями (поствакцинальной реакцией) (табл. 3), наоборот, происходит активация Т-супрессоров. Другими словами, тубосан устанавливает оптимальный баланс субпопуляций Т-лимфоцитов, обеспечивая поддержание гомеостаза макроорганизма.

### Заключение

Проведённые исследования показали, что тубосан обладает выраженными иммуностимулирующими свойствами и может быть использован для стимуляции гуморального противовирусного иммунитета и уменьшения количества и выраженности поствакцинальных реакций. Целесообразно дальнейшее изучение препарата для внедрения его в практику вакцинологии.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Хаитов Р.М., Пинегин Б.В. Современные иммуномодуляторы: основные принципы их применения. Иммунология 2000; 5: 4—7.
2. Костинов М.П. Иммунокоррекция вакцинального процесса у лиц с нарушенным состоянием здоровья. М.: 2006; 172.
3. Воробьев А.А. Принципы по классификации и стратегии применения иммуномодуляторов в медицине. Журн микробиол 2002; 4: 93—98.
4. Инструкция по применению диуцифона. Утв. начальником Управления по внедрению новых лекарственных средств и медицинской техники МЗ СССР 26.03.1979.
5. Лесков В.П., Костюк Л.Е., Горлина Н.К. и др. Некоторые аспекты действия нового иммуностимулятора диуцифона. Иммунология 1982; 5: 34—36.
6. Реестр лекарственных средств России. М.: 2008.
7. Красильников И.В. Применение новых адьювантов в создании вакцин. Тезисы Всероссийской научно-практической конференции «Вакцинология 2008. Совершенствование иммунобиологических средств профилактики, диагностики и лечения инфекционных болезней». М.: 11—12 ноября 2008 г. М.: 2008; 68.
8. Медуницин Н.В. Вакцинология. М.: 2004; 446.
9. Андреев В.А., Воробьев А.А., Игонин А.М. и др. Живая сухая вакцина против венесуэльского энцефаломиелиита лошадей на основе аттенуированного штамма 230 вируса ВЭЛ. Авторское свидетельство № 35254 от 21.10.1966.
10. Лукин Е.П., Селваненко Г.М., Оссауленко В.Н. и др. Вакцина против венесуэльского энцефаломиелиита лошадей живая лиофилизированная на основе штамма 15 вируса ВЭЛ. Авторское свидетельство № 333313 от 01.09.1992.
11. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств (Иммунобиологические препараты). Ч 2. М.: 2012; 536.
12. Ашмарин И.П., Воробьев А.А. Статистические методы в микробиологических исследованиях. Л.: 1962; 180.

# Эффективность умифеновира (Арбидола) на модели экспериментальной сочетанной вирусно-бактериальной пневмонии мышей

И. А. ЛЕНЁВА<sup>1</sup>, И. Н. ФАЛЫНСКАЯ<sup>1</sup>, Е. И. ЛЕОНОВА<sup>1</sup>, И. Т. ФЕДЯКИНА<sup>2</sup>,  
Н. Р. МАХМУДОВА<sup>1</sup>, Е. А. ОСИПОВА<sup>1</sup>, Л. Н. ЛЕПЕХА<sup>3</sup>, Н. А. МИХАЙЛОВА<sup>1</sup>, В. В. ЗВЕРЕВ<sup>1</sup>

<sup>1</sup> НИИ вакцин и сывороток им. И. И. Мечникова РАМН, Москва

<sup>2</sup> НИИ вирусологии им. Д. И. Ивановского Минздрава России, Москва

<sup>3</sup> Центральный НИИ туберкулеза РАМН, Москва

## Umifenovir (Arbidol) Efficacy in Experimental Mixed Viral and Bacterial Pneumonia of Mice

I. A. LENEVA, I. N. FALYNSKOVA, E. I. LEONOVA, I. T. FEDYAKINA, N. R. MAKHMUDOVA,  
E. A. OSIPOVA, L. N. LEPEKHA, N. A. MIKHAILOVA, V. V. ZVEREV

I. I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Russian Academy of Medical Science, Moscow

D. I. Ivanovsky Institute of Virology, Ministry of Health of the Russian Federation, Moscow

Central Research Institute of Tuberculosis, Russian Academy of Medical Sciences, Moscow

Большинство смертельных исходов вследствие гриппа обусловлено вторичными бактериальными осложнениями, среди которых преобладает пневмония. В нашем исследовании изучена эффективность противогриппозного препарата умифеновир (Арбидол) на модели экспериментальной вирусно-бактериальной пневмонии мышей, индуцированной *S.aureus* после заражения вирусом гриппа А/Калифорния/04/2009 (H1N1). Показано, что лечение мышей умифеновиром в дозах 40 и 60 мг/кг/день эффективно при различных схемах заражения, при этом повышается выживаемость мышей, уменьшается потеря ими массы тела, снижается титр вируса и плотность бактерий в лёгких животных. Клинические, вирусологические и микробиологические данные по эффективности умифеновира коррелировали с результатами патоморфологических исследований, которые свидетельствовали о выраженном терапевтическом эффекте препарата, разрешении фокусов бронхопневмонии в лёгких на модели сочетанной вирусно-бронхиальной инфекции мышей.

**Ключевые слова:** грипп, умифеновир (Арбидол), вторичные пневмонии после гриппозной инфекции, *S.aureus*.

Pneumonia often occurs as a secondary infection after influenza and accounts for a large proportion of the morbidity and mortality associated with seasonal and pandemic influenza outbreaks. The efficacy of umifenovir (Arbidol) was investigated on a murine model of *S.aureus* pneumonia following A/California/04/2009 (H1N1) influenza virus infection. Oral treatment with umifenovir (40 and 60 mg/kg/day) in all the contamination schemes increased the survival rate in the mice from 0% to 90% and lowered the animal weight loss. The umifenovir treatment also decreased the virus titer by  $\geq 2$  logs and the viable bacteria counts in the lungs of the mice. The lungs of the mice treated with umifenovir had less severe histopathologic lesions compared to the control group.

**Key words:** influenza, umifenovir (Arbidol), bacterial pneumonia after influenza, *S.aureus*.

### Введение

Грипп является острым респираторным инфекционным заболеванием, наносящим вред здоровью людей и приводящим к огромным экономическим потерям. Большая часть смертельных исходов при гриппе обусловлена вторичными бактериальными осложнениями, среди которых ведущую роль отводится пневмонии. Из 429,2 млн случаев пневмонии, регистрируемых ежегодно, 200 млн случаев пневмонии развиваются после перенесённых ОРВИ и гриппа, из них 3–4 млн смертельных исходов, что составляет

примерно 7% от общей смертности. К группе особого риска относятся дети младше 5 лет, у которых 43–67% случаев пневмоний зарегистрированы после перенесённых ОРВИ, из них ежегодно примерно 1,4–1,6 млн заканчиваются смертельными исходами [1, 2]. Во время последней пандемии в 2009 г., вызванной H1N1, 25–56% тяжёлых форм заболеваний и смертельных исходов были ассоциированы с бактериальной пневмонией, из них 14–46% привели к смертельным исходам [2].

ВОЗ в дополнение к вакцинации в качестве основной стратегии борьбы с гриппозной инфекцией рекомендует применение противовирусных препаратов. Одним из важнейших критериев эффективности применения противовирусных препаратов в клинике является снижение осложне-

© Коллектив авторов, 2014

Адрес для корреспонденции: 105064, Москва, Малый Казенный переулок, д. 5а. НИИ ВС им. И. И. Мечникова РАМН.  
E-mail: wnyfd385@yandex.ru

ний при гриппозной инфекции, в частности пневмонии [3]. Однако результатов клинических испытаний часто бывает недостаточно для оценки эффективности препаратов, исходя из вторичных осложнений после гриппа. Так, в 2012 г. FDA потребовала предоставить дополнительные экспериментальные и клинические данные по эффективности снижения числа осложнений для Тамифлю (озельтамивир), который в настоящее время является золотым стандартом в противогриппозной терапии. В связи с вышесказанным большой интерес представляет возможность экспериментальной оценки эффективности профилактики и лечения гриппозной инфекции в отношении осложнений. С этой целью нами была разработана валидированная, охарактеризованная по различным параметрам экспериментальная модель сочетанной вирусно-бактериальной пневмонии, индуцированной вирусом гриппом с последующим заражением *S.aureus*.

В России зарегистрирован и широко применяется отечественный препарат Арбидол (умифеновир), являющийся ингибитором слияния вирусной липидной оболочки с внутриклеточными мембранами [4–5], вирусспецифической мишенью действия которого в цикле репродукции вируса гриппа является его поверхностный белок НА [6]. Умифеновир обладает противовирусной активностью в отношении различных штаммов вирусов гриппа А и В, а также возбудителей ряда ОРВИ в культуре клеток и на модели гриппозной пневмонии мышей [7–9]. В настоящее время Всемирной Организацией Здравоохранения умифеновиру присвоен международный код АТХ как препарату прямого противовирусного действия. Эффективность и безопасность применения умифеновира были подтверждены в многочисленных регистрационных и пострегистрационных клинических исследованиях. Тем не менее остается актуальным получение современных дополнительных данных об эффективности и новых свойствах препарата.

Целью нашей работы являлось изучение эффективности умифеновира на модели экспериментальной вирусно-бактериальной пневмонии мышей, индуцированной *S.aureus* после заражения вирусом гриппа А/Калифорния/04/2009 (H1N1).

## Материал и методы

**Препараты, их субстанции и приготовление растворов.** Субстанцию арбидола (ЦХЛС-ВНИХФИ) растворяли в 1% растворе крахмала. Для приготовления озельтамивира содержимое капсул Тамифлю (Хоффман-ля-Рош) растворяли в дистиллированной воде. Дозы всех использованных препаратов готовились непосредственно перед проведением эксперимента и указаны из расчёта содержания чистой субстанции в лекарственной форме.

**Вирусы, клетки, штаммы.** Для моделирования гриппозной инфекции был использован штамм вируса гриппа А/Кали-

форния/04/2009 (пндм H1N1 2009), полученный из ВОЗ, адаптированный к мышам. Культура штамма *Staphylococcus aureus* 1986 из коллекции лаборатории протективных антигенов ФГБУ НИИВС им. И. И. Мечникова хранилась в лиофилизированном состоянии. Для получения живой культуры ампулу в стерильных условиях вскрывали и добавляли 1 мл питательного бульона (ГРМ-БУЛЬОН, ФБУН ГНЦ ПМБ). Суспензию переносили в пробирку объёмом 2 мл и инкубировали 4 ч при температуре 37°C. Затем проводили посев на скошенный питательный агар (ГРМ-агар, ФБУН ГНЦ ПМБ). Пробирки с культурой инкубировали в течение 18 ч при температуре 37°C, по стандарту мутности определяли содержание бактерий в 1 мл объёма и в этот же день использовали для заражения животных.

**Животные.** Мышей BALB/c — самок с массой тела 12–14 г получали из питомника «Андреевка» (Московская обл.) и содержали на стандартном рационе в регламентированных условиях вивария. Содержание и кормление животных соответствовало правилам по устройству, оборудованию и содержанию экспериментально-биологических клиник (вивариев).

**Определение эффективности препаратов на модели вирусно-бактериальной пневмонии мышей.** Предварительно взвешенные мыши инфицировались интраназально вирусом гриппа. Через 4 дня их инфицировали *S.aureus*. В день заражения вирусом начинали лечение животных противовирусными препаратами и продолжали его в течение 5 дней. Дозы препаратов рассчитывали в мг/кг массы тела животных в сутки: озельтамивир — 10 мг/кг/день, арбидол — в дозах 30, 40 и 60 мг/кг/день вводили внутривенно с помощью специальной иглы (лаваж). За лечеными и контрольными животными велось ежедневное наблюдение, в первые 5 дней после инфицирования вирусом мышей взвешивали каждый день, далее через день.

Химиотерапевтическую активность соединений на модели вирусно-бактериальной пневмонии мышей оценивали по следующим критериям: выживаемость животных, увеличение средней продолжительности жизни и уменьшение снижения массы тела [10]. Животные контрольной группы были инфицированы вирусом гриппа и *S.aureus* и не получали никакого лечения.

**Получение образцов лёгких мышей.** На 6-й день после инфицирования вирусом гриппа (на 2-й день после инфицирования *S.aureus*) в каждой группе забивали по три мыши, в стерильных условиях извлекали лёгкие, гомогенизировали их и ресуспендировали в 1 мл холодного стерильного 0,01M фосфатно-солевого буфера. Суспензию осветляли от клеточного дроба центрифугированием при 2000 g в течение 10 мин; 0,1 мл супернатанта отбирали для определения бактериальной плотности, а оставшийся супернатант использовали для определения инфекционного титра вируса в культуре клеток MDCK. Определение титра вируса и плотности бактерий (в колониеобразующих единицах — КОЕ) в лёгких мышей проводили, как описано [10].

**Гистологические исследования.** На 6-й день после инфицирования вирусом гриппа в каждой группе забивали по три мыши, извлекали из них лёгкие, которые фиксировали 10% забуференным формалином, обезвоживали в спиртах восходящей концентрации и заключали в парафин. Гистологические срезы окрашивали гематоксилином и эозином, просматривали в световом микроскопе Olympus-BS250 при различных увеличениях ( $\times 10, 40, 100$ ).

## Результаты исследования

**Изучение эффективности умифеновира на модели вирусно-бактериальной пневмонии мышей, индуцированной внутрибрюшинным или интраназальным заражением *S.aureus* после заражения вирусом гриппа.**

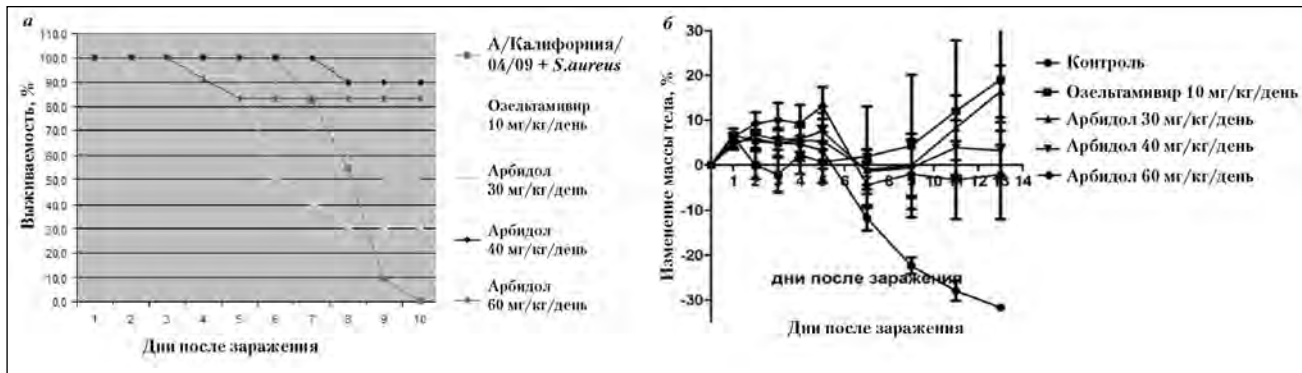


Рис. 1. Влияние умифеновира (арбидола) на выживаемость (а) и изменение массы тела мышей (б), заражённых вирусом гриппа, при внутрибрюшинном заражении *S.aureus*.

Таблица 1. Средняя продолжительность жизни, выживаемость и титр вируса при внутрибрюшинном и интраназальном заражении *S.aureus* в зависимости от введённой дозы умифеновира (арбидола)

| Условия эксперимента                                       | Средняя продолжительность жизни, дни |       | Выживаемость, % |     | Титр вируса, lg ТЦИД <sub>50</sub> |         |
|--|--------------------------------------|-------|-----------------|-----|------------------------------------|---------|
|  | в/б*                                 | и/н** | в/б             | и/н | в/б                                | и/н     |
| Контрольная группа (А/Калифорния/04/09 + <i>S.aureus</i> ) | 10,9                                 | 13,2  | 0               | 20  | 4,4±0,1                            | 6,2±0,6 |
| Озельтамивир 10 мг/кг/день                                 | 10,4                                 | 14,8  | 31              | 60  | 2,25±0,4                           | 3,8±0,7 |
| Арбидол 30 мг/кг/день                                      | 14,4                                 | 18,2  | 50              | 80  | 3,1±0,9                            | 5,3±1,4 |
| Арбидол 40 мг/кг/день                                      | 18,9                                 | 18,1  | 90              | 92  | 3±0                                | 5,1±0,4 |
| Арбидол 60 мг/кг/день                                      | 16,3                                 | 19    | 87              | 90  | 3,3±0,7                            | 4±0     |

Примечание. в/б\* – внутрибрюшинное заражение; и/н\*\* – интраназальное.

В первой серии экспериментов бактериальная пневмония была индуцирована *S.aureus* при двух способах заражения — внутрибрюшинно и интраназально на 4-й день после вирусного заражения. В контрольной группе животных, заражённых вирусом гриппа и *S.aureus* внутрибрюшинно, к 15 дню погибли все животные. Эффективность лечения умифеновиrom зависела от дозы препарата: повышалась при её увеличении. В дозе 30 мг/кг/день данное лечение защищало от смертности половину животных, увеличивая среднюю продолжительность жизни в 1,3 раза. Лечение умифеновиrom в дозах 40 и 60 мг/кг/день было более эффективным: предотвращало смертность 87—90% животных и увеличивало продолжительность их жизни, по сравнению с группой контроля уже в 1,5—1,7 раз. Наименее эффективным было лечение озельтамивиром в дозе 10 мг/кг/день, которое защищало 30% животных, не увеличивая продолжительность их жизни. Во всех группах не было отмечено значительного снижения массы тела, в то время как в группе инфицированных и нелеченых животных снижение массы тела наблюдалось, начиная с 5 дня после заражения вирусом, и достигло 27—30% к 14 дню (рис. 1, табл. 1).

Лечение всеми дозами умифеновира, несмотря на различающуюся эффективность, достоверно и сходным образом подавляло титр вируса в

лёгких по сравнению с группой контроля (см. табл. 1). Несмотря на то что лечение озельтамивиром было наименее эффективным, оно приводило к наибольшему подавлению титра вируса в лёгких животных.

Во второй серии экспериментов была изучена эффективность различных доз умифеновира при втором способе заражения *S.aureus* — интраназальном. В контрольной группе животных, заражённых интраназально *S.aureus* на 4-й день после вирусного заражения и не получавших никакого лечения, начиная с 5 дня наблюдалась гибель, к 15 дню погибли 8 из 10 животных, а 2 оставшихся в живых стали набирать вес. Лечение умифеновиrom во всех изученных дозах значительно не различалось по своей эффективности, защищая от гибели 60—80% инфицированных животных, увеличивая среднюю продолжительность жизни примерно в 1,4 раза. Лечение всеми исследуемыми препаратами позволило предотвратить потерю мышцами массы тела, в то время как в контрольной группе животных наблюдалась потеря массы тела, достигая максимума 20% на 11-й день после заражения (рис. 2, см. табл. 1).

При интраназальном заражении *S.aureus* подавление титра вируса в лёгких леченых животных зависело от дозы умифеновира: снижение его в 10 и 100 раз наблюдалось при лечении дозами 30 и 60 мг/кг/день соответственно (см. табл. 1). При

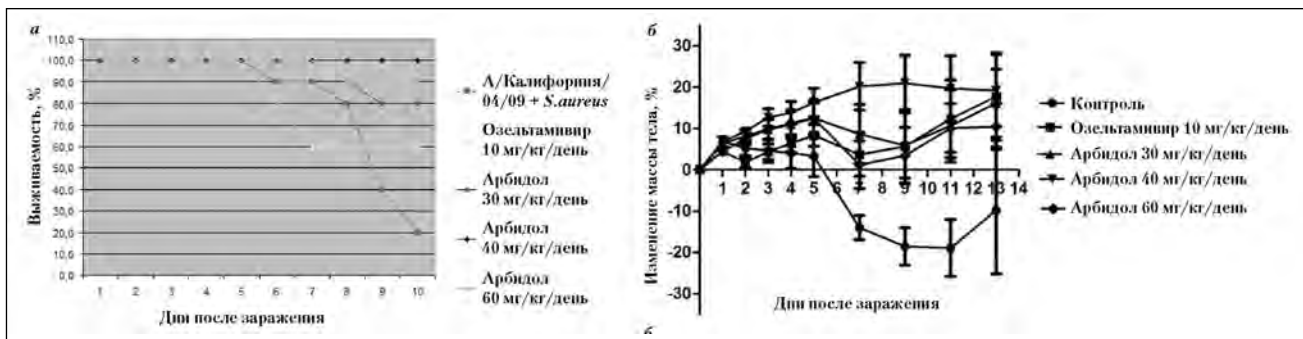


Рис. 2. Выживаемость (а) и изменение массы тела (б) мышей при интраназальном заражении *S.aureus* после заражения вирусом гриппа в зависимости от дозы умифеновира (арбидола).

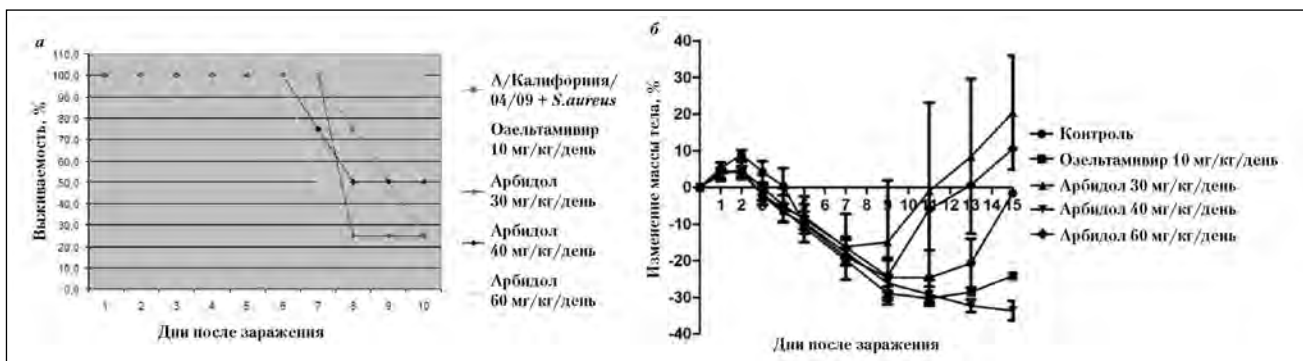


Рис. 3. Выживаемость (а) и изменение массы тела (б) мышей при интраназальном заражении низкой дозой *S.aureus* после заражения вирусом гриппа при лечении умифеновиром (арбидолом) и озельтамивиром.

обоих способах заражения *S.aureus*, лечение озельтамивиром перорально в дозе 10 мг/кг/день наиболее значительно подавляло размножение вируса в лёгких животных по сравнению с группой вирусного контроля (более чем в 100 раз), хотя оно было наименее эффективным по клиническим признакам. Таким образом, проведённые нами исследования на модели вирусно-бактериальной пневмонии мышей, индуцированной вирусным заражением с последующим как внутрибрюшинным, так и интраназальным заражением *S.aureus* показали эффективность лечения умифеновиром. Данное лечение увеличивало выживаемость животных и среднюю продолжительность жизни, снижало или полностью предотвращало потерю веса животных, а также снижало титр вируса в лёгких животных, по сравнению с группой контроля.

**Эффективность умифеновира при пневмонии мышей, индуцированной вирусным заражением с последующим интраназальным заражением *S.aureus* в низкой и высокой дозах.**

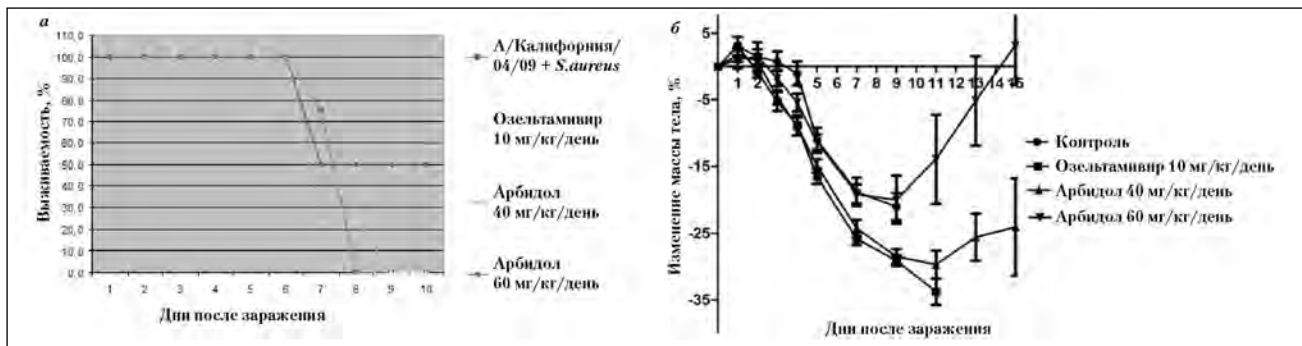
Полученные нами ранее данные при моделировании сочетанной вирусно-бактериальной пневмонии позволяют предположить, что пневмония более выражена при интраназальном, чем при внутрибрюшинном заражении *S.aureus*. Для более детального изучения эффективности умифеновира в следующей серии экспериментов мы использовали интраназальное заражение *S.aureus* в двух дозах — низкой ( $2 \times 10^7$  КОЕ/мл) и высокой ( $2 \times 10^9$  КОЕ/мл). В соответствии с дозой заражения в контрольной группе не получавших лечения животных, заражённых вирусом и низкой дозой *S.aureus*, к 15 дню погибло 75% животных. Лечение умифеновиром в дозе 30 мг/кг/день, так же как и лечение озельтамивиром в дозе 10 мг/кг/день, было практически неэффективно, увеличение дозы умифеновира до 40 мг/кг/день защищало от смертности половину животных, снижая потерю веса в данной группе по сравнению с группой контроля. Наиболее эффективным было лечение умифеновиром в самой высокой из изученных доз 60 мг/кг/день, оно полностью предотвращало гибель животных, и значительно снижало потерю массы тела (рис. 3, табл. 2).

В контрольной группе животных, инфицированных высокой дозой *S.aureus* интраназально, на 4-й день после вирусного заражения, погибли все животные, а максимальная потеря массы наблюдалась на 9-й день и составила 21%. В группах, леченных умифеновиром в высоких дозах — 40 и 60 мг/кг/день выжило 45—50% животных, продолжительность их жизни увеличилась более чем в 1,3 раза по сравнению с контрольной группой. При обеих дозах заражения *S.aureus* лечение

**Таблица 2.** Средняя продолжительность жизни, выживаемость и титр вируса при низкой и высокой дозе интраназального заражения *S.aureus* после заражения вирусом гриппа при введении умифеновира и озельтамивира

| Условия эксперимента  | Средняя продолжительность жизни, дни                       |                                 | Выживаемость, %               |                                 | Титр вируса, lg ТЦИД <sub>50</sub> |                                 | Плотность бактерий, lg КОЕ/мл |                                 |
|-----------------------|--|---------------------------------|-------------------------------|---------------------------------|------------------------------------|---------------------------------|-------------------------------|---------------------------------|
|                       | низкая доза <i>S.aureus</i> *                              | высокая доза <i>S.aureus</i> ** | низкая доза <i>S.aureus</i> * | высокая доза <i>S.aureus</i> ** | низкая доза <i>S.aureus</i> *      | высокая доза <i>S.aureus</i> ** | низкая доза <i>S.aureus</i> * | высокая доза <i>S.aureus</i> ** |
|                       | Контрольная группа (А/Калифорния/04/09 + <i>S.aureus</i> ) | 13,5                            | 9,5                           | 25                              | 0                                  | 8,7±0,3                         | 6,7±1                         | 4,5±0,5                         |
| Озельтамивир          | 11,5   | 8,5                             | 25                            | 0                               | 4,3±0,1                            | 4,1±0,4                         | 0,4±0,5                       | 2±0                             |
| Арбидол 30 мг/кг/день | 12,8   | —                               | 25                            | —                               | 6±0,5                              | —                               | 0,4±0                         | —                               |
| Арбидол 40 мг/кг/день | 15,5   | 13                              | 50                            | 43                              | 6,3±0,3                            | 2±0,5                           | 0,4±0,5                       | 2±0                             |
| Арбидол 60 мг/кг/день | 16   | 14                              | 50                            | 50                              | 5,6±0,1                            | 2±0,9                           | 0,3±0,2                       | 1,5±0,5                         |

**Примечание.** \* —  $2 \times 10^7$  КОЕ/мл; \*\* —  $2 \times 10^9$  КОЕ/мл.



**Рис. 4.** Выживаемость (а) и изменение массы тела (б) мышей при интраназальном заражении высокой дозой *S.aureus* после заражения вирусом гриппа при лечении умифеновиром (арбидолом) и озельтамивиром.

озельтамивиром перорально не защищало животных от гибели, не влияло на среднюю продолжительность их жизни и не влияло на потерю массы тела (рис. 4).

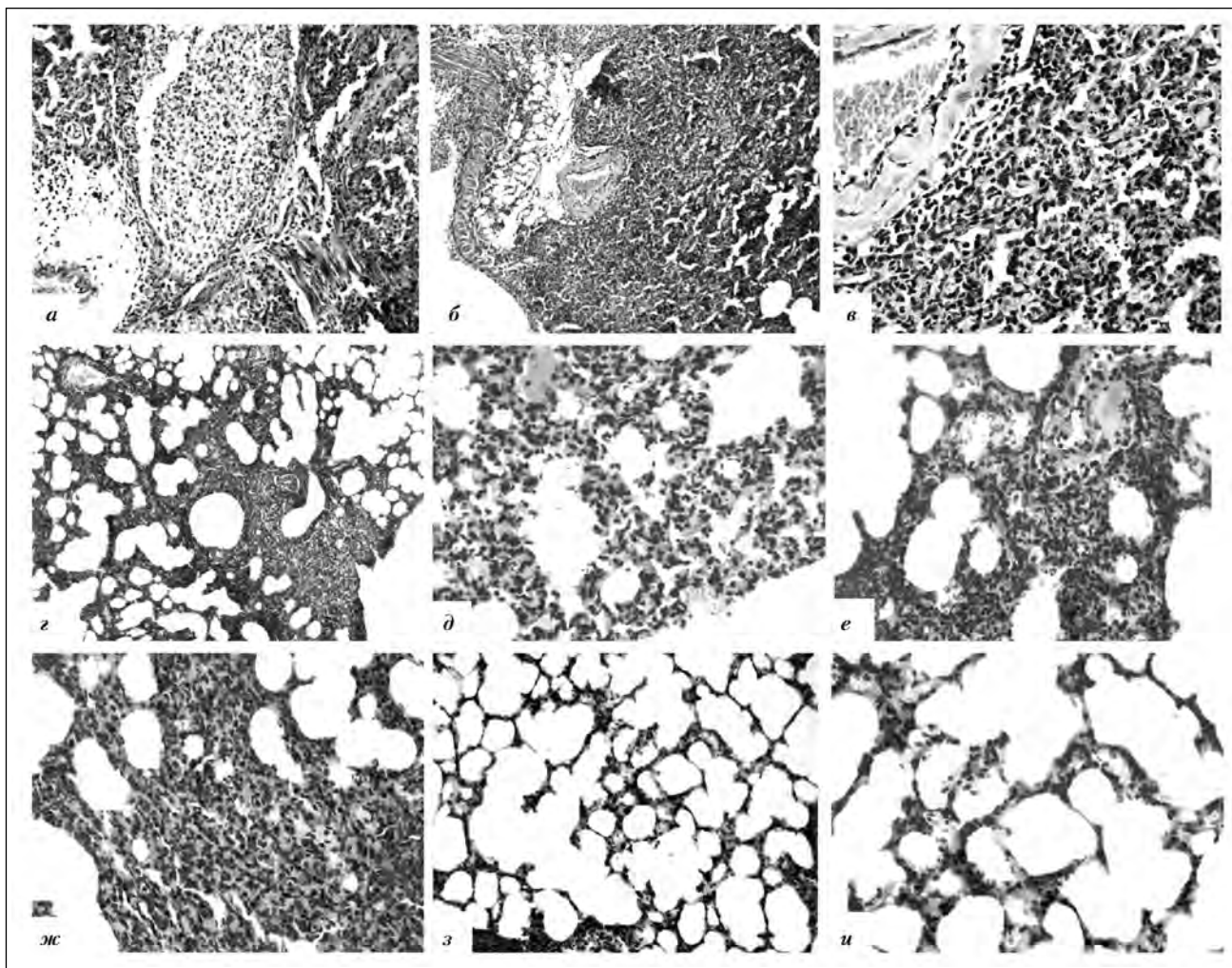
Определение титра вируса в лёгких мышей при обеих дозах заражения показало, что эффективное лечение умифеновиром в дозах 40 и 60 мг/кг/день достоверно подавляло размножение вируса в лёгких инфицированных животных, при этом разница с группой контроля была более выражена при высокой дозе заражения. Важно отметить, что при обеих дозах заражения, несмотря на то что лечение озельтамивиром не защищало от гибели животных, оно значительно подавляло титр вируса и плотность бактерий в их лёгких (см. табл. 1 и 2). Определение количества *S.aureus* в лёгких показало, что плотность бактерий в группах, леченных всеми дозами умифеновира, была сходной, незначительно отличалась от плотности бактерий в группах, леченных озельтамивиром и была значительно ниже, чем плотность бактерий в контрольной группе (см. табл. 2).

#### Морфологическое изучение лёгких мышей с экспериментальной вирусно-бактериальной пневмонией, леченных умифеновиром.

Морфологическое изучение лёгких мышей с сочетанной вирусно-бактериальной пневмонией, леченных умифеновиром в дозе 40 и 60 мг/кг/день, было проведено в сравнении с контрольной группой

инфицированных таким же образом животных, но не получавших лечения. В контрольной группе были выявлены распространённые деструктивные изменения воздухоносных путей в сочетании с обширными фокусами пневмонии в перибронхиальной паренхиме. Отмечена характерная некротизация реснитчатого эпителия с массивными скоплениями полиморфноядерных лейкоцитов (ПЯЛ) в просвете крупных бронхов и заполнение гнойно-слизистым экссудатом более мелких (рис. 5, а). Крупные участки бронхопневмонии консолидируют с обширными зонами периваскулярных и особенно субплевральных пневмонических фокусов (см. рис. 5, б). Некротизация межальвеолярных перегородок сопровождается крупными скоплениями ПЯЛ в этих зонах (см. рис. 5, в). Сохраняющая воздушность лёгочная ткань у нелеченых мышей составляет не более 30% площади среза, межальвеолярные перегородки повсеместно утолщены за счёт отёка и инфильтрации клеточными элементами воспаления, в том числе ПЯЛ.

У опытных животных, принимавших умифеновир в обеих изученных дозах, структурные изменения органов дыхания заметно варьируют в зависимости от использованной дозы препарата. У мышей, получавших 40 мг/кг/день, деструктивные изменения бронхиального дерева и лёгочной паренхимы сохраняются в виде консолидации сформированных фокусов бронхопневмонии и



**Рис. 5.** Деструктивные изменения органов дыхания у мышей с сочетанной вирусно-бактериальной пневмонией (а–в) и морфологические признаки положительной динамики воспалительного процесса в лёгких опытных мышей, леченных умифеновиром (г–и).

**Примечание:** а – гнойно-слизистый экссудат заполняет просвет бронха, ув.  $\times 10$ ; б – консолидация перибронхиальных, периваскулярных и субплевральных пневмонических фокусов, ув.  $\times 10$ ; в – некроз межальвеолярных перегородок, ув.  $\times 40$ ; г – очаговый инфильтрат в стенке бронха,  $\times 10$ ; д – деструкция альвеолярного эпителия, 40 мг/кг/день, ув.  $\times 40$ ; е – фокус некроза, периваскулярный инфильтрат, 40 мг/кг/день, ув.  $\times 20$ ; ж – субплевральный пневмонический фокус содержащий ПЯЛ, 60 мг/кг/день, ув.  $\times 20$ ; з – преобладание воздушной лёгочной паренхимы, 60 мг/кг/день, ув.  $\times 10$ ; и – очаговая инфильтрация межальвеолярных перегородок клеточными элементами воспаления, 60 мг/кг/день, ув.  $\times 40$ .

субплевральных зон воспаления (см. рис. 5, з). Определяются значительные скопления ПЯЛ в участках деструкции респираторного эпителия (рис. 5, д), хотя и выраженные в меньшей степени, чем в контрольной группе. Отдельные фокусы некроза определяются в периваскулярных клеточных инфильтратах (см. рис. 5, е). У мышей, получавших умифеновир в дозе 60 мг/кг/день, терапевтический эффект препарата более выражен, что, прежде всего, отражается на состоянии воздухоносных путей. Эпителиальная выстилка бронхов на значительном протяжении имеет нормальное строение. Небольшие мононуклеарные инфильтраты с примесью ПЯЛ в слизистом и подслизистом слоях определяются относительно редко. В

лёгочной паренхиме сохраняются перибронхиальные и субплевральные пневмонические фокусы, хотя и более редкие по частоте выявления и меньшие по площади, чем во всех остальных терапевтических группах. Среди клеточных элементов, которые располагаются более рыхло, много макрофагов, хотя по-прежнему среди них определяются ПЯЛ; имеются микронекрозы (см. рис. 5, ж). Воздушная лёгочная паренхима в этой группе составляет не менее 60% площади среза (см. рис. 5, з). Межальвеолярные перегородки чаще всего не утолщены или могут быть слабо инфильтрированы клеточными элементами воспаления (см. рис. 5, и), что наиболее заметно в периваскулярных зонах.



## Обсуждение результатов

Многочисленные клинические исследования показывают, что лечение этиотропными противовирусными препаратами, начатое в ранние сроки, приводит к сокращению длительности заболевания, уменьшению симптомов инфекции, сокращению периода выделения вируса и его репродукции в носоглотке, а также к снижению количества осложнений, в частности пневмоний [1, 3]. В настоящее время именно фактор снижения количества осложнений рассматривается как важнейший при оценке эффективности противовирусного препарата, этому аспекту уделяется большое внимание как стороны ВОЗ, так и разрешительных органов. Эти требования инициировали интерес к возможности экспериментальной оценки эффективности противовирусных препаратов на модели сочетанной вирусно-бактериальной пневмонии мышей. С использованием модели сочетанной вирусно-бактериальной пневмонии мышей показано, что применение ингибитора нейраминидазы озельтамивира у мышей, инфицированных вирусом гриппа А с последующим заражением *Streptococcus pneumoniae*, снижает смертность в результате вторичной бактериальной пневмонии, развивающейся после гриппозной инфекции, уменьшает проявление её симптомов и облегчает протекание заболевания [11]. Сходные данные были получены с лицензированным в 2011 г. новым ингибитором нейраминидазы перамивиром [12], а также с находящимся на III стадии клинических испытаний препаратом Флюдаза [13]. На модели сочетанной вирусно-бактериальной пневмонии показано также, что последовательное использование озельтамивира и ампициллина было более эффективно, чем использование одного антибиотика [14].

В нашем исследовании показана эффективность умифеновира на стандартизированной экспериментальной модели сочетанной вирусно-бактериальной пневмонии мышей, индуцированной заражением вирусом гриппа с последующим заражением *S.aureus* при различных схемах заражения и дозах препарата. Эффективность лечения умифеновиrom на этой модели

## ЛИТЕРАТУРА

1. Legand A., Briand S., Shindo N., Brooks W.A., de Jong M., Farrar J., Aguilar J., Hayden F. G. Addressing the public health burden of respiratory viruses the battle against respiratory viruses (BRaVe). Initiative Future Virology. 2013; 8: 10: 953–968.
2. Webster R.G., Govorkova E.A. Continuing challenges in influenza. Ann N Y Acad Sci 2014; 1323: 1: 115–139.
3. Center for Disease Control and Prevention. Antiviral agents for influenza guidance on the use of influenza antiviral agents. Available at: <http://www.cdc.gov/flu/professionals/antivirals/summary-clinicians.htm>. Accessed 5 March 2014.
4. Boriskin Y., Leneva I., Pecheur E., Polyak S. Arbidol: a broad-spectrum antiviral compound that blocks viral fusion. Curr Med Chem 2008; 15: 10: 997–1005.

подтверждалась как клиническими показателями, так и вирусологическими и микробиологическими критериями. Патоморфологическое изучение органов дыхания у мышей, леченных умифеновиrom, коррелировало с данными вирусологических и микробиологических исследований и свидетельствовало о выраженном терапевтическом эффекте препарата и разрешении фокусов бронхопневмонии на модели сочетанной вирусно-бронхиальной инфекции.

Полученные результаты коррелируют с данными клинических исследований умифеновира. Уже в регистрационных клинических испытаниях было отмечено отсутствие осложнений у пациентов при терапевтическом применении препарата, в то время как в группе, получавших плацебо, осложнения составили 13,2% [15]. В дальнейших пострегистрационных исследованиях, проведённых у взрослых и детей, применение Арбидола уменьшало количество осложнённых случаев от 1,66 у военнослужащих до 4 раз у часто болеющих детей [16, 17]. В фармакоэпидемиологическом исследовании ЭГИДА, проведённом среди 523 пациентов в первый постпандемический период в 2010–2011 гг., показано, что терапевтическое применение умифеновира в первые 48 часов после проявления симптомов достоверно снижало количество осложнений, причём пневмония регистрировалась в 0–0,3% случаев, по сравнению с 23,7% у пациентов, принимающих только симптоматическую терапию [18].

В связи с вышесказанным, полученные в настоящей работе данные об эффективности умифеновира на модели сочетанной вирусно-бактериальной пневмонии, индуцированной вирусом гриппом с последующим бактериальным заражением, являются важным дополнением к результатам клинических исследований препарата. Кроме того, эти данные могут быть использованы для разработки дизайна дальнейших клинических исследований умифеновира, являясь основой при выборе схем и доз лечения, с целью оптимизации его применения для профилактики и лечения гриппа и ассоциированной с ним вторичной бактериальной пневмонии.

5. Blaising J., Polyak S.J., Pêcheur E.I. Arbidol as a broad-spectrum antiviral: an update. Antiviral Res 2014; 107: 84–94.
6. Leneva I.A., Russell R.J., Boriskin Y.S., Hay A.J. Characteristics of arbidol-resistant mutants of influenza virus: implications for the mechanism of anti-influenza action of arbidol. Antiviral Res 2009; 81: 2: 132–140.
7. Brooks M.J., Burtseva E.I., Ellery P.J., Marsh G.A., Lew A.M., Slepushkin A.N. et al. Antiviral activity of arbidol, a broad-spectrum drug for use against respiratory viruses, varies according to test conditions. J Med Virol 2012; 84: 1: 170–181.
8. Shi L., Xiong H., He J. et al. Antiviral activity of arbidol against influenza A virus, respiratory syncytial virus, rhinovirus, coxsackie virus and adenovirus *in vitro* and *in vivo*. Arch Virol 2007; 152: 1447–1451.
9. Ленёва И.А., Федякина И.Т., Еропкин М.Ю., Гудова Н.В., Романовская А.А., Даниленко Д.М., Виноградова С.М., Лепешкин А.Ю., Шестопалов А.М. Изучение противовирусной активности отечествен-

- ных противогриппозных химиопрепаратов в культуре клеток и на модели животных. *Вопр вирусол* 2010; 3: 19–27.
10. *Leneva I., Roberts N., Govorkova E. et al.* The neuraminidase inhibitor GS4104 (oseltamivir phosphate) is efficacious against A/Hong Kong/156/97 (H5N1) and A/Hong Kong/1074/99 (H9N2) influenza virus. *Antivir Res* 2000; 48: 101–115.
  11. *McCullers J.A.* Preventing and treating secondary bacterial infections with antiviral agents. *Antivir Ther* 2011; 16: 123–135.
  12. *Tanaka A., Nakamura S., Seki M. et al.* The effect of intravenous peramivir, compared with oral oseltamivir, on the outcome of post-influenza pneumococcal pneumonia in mice. *Antivir Ther* 2014 Feb 12. doi: 10.3851/IMP2744.
  13. *Hedlund M., Aschenbrenner L. M., Jensen K. et al.* Sialidase-based anti-influenza virus therapy protects against secondary pneumococcal infection. *J Infect Dis.* 2010; 201: 1007–1015.
  14. *McCullers J.A.* Effect of antiviral treatment on the outcome of secondary bacterial pneumonia after influenza. *J Infect Dis* 2004; 190: 519–526.
  15. *Гуськова Т.А., Глушков Р.Г.* Арбидол-иммуномодулятор, индуктор интерферона, антиоксидант. М.: Тимотек, 1999; 93.
  16. *Шумилов В.И., Шустер А.М., Лобастов и др.* Эффективность Арбидола при профилактике и лечении острых респираторных инфекций. *Военно-мед журн* 2002; 9: 51–53.
  17. *Учайкин В.Ф., Харламова С.Г., Чешик С.Г. и др.* Применение Арбидола и амиксина в качестве этиотропной терапии гриппа и ОРВИ у детей *Педиатрия*. 2004; 5: 73–77.
  18. *Малеев В.В., Селькова Е.П., Простяков И.В., Осипова Е.А.* Фармакоэпидемиологическое исследование течения гриппа и других ОРВИ в сезоне 2010/11 гг. *Инфекц бол* 2012; 10: 3: 15–23.

# Влияние экстракта *Hypocoum erectum* на морфофункциональное состояние печени крыс при тетрациклиновом гепатите

А. А. ТОРОПОВА<sup>1</sup>, С. М. НИКОЛАЕВ<sup>1</sup>, Я. Г. РАЗУВАЕВА<sup>1</sup>, А. В. ФЕДОРОВ<sup>2</sup>, З. Г. САМБУЕВА<sup>1</sup>, И. П. УБЕЕВА<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Институт общей и экспериментальной биологии СО РАН, Улан-Удэ

<sup>2</sup> Бурятский государственный университет, Улан-Удэ

<sup>3</sup> Иркутская государственная медицинская академия последипломного образования, Иркутск

## Effect of *Hypocoum erectum* Extract on Morphofunctional State of the Liver in Rats with Tetracycline-Associated Hepatitis

A. A. TOROPOVA, S. M. NIKOLAEV, YA. G. RAZUVAEVA, A. V. FEDOROV, Z. G. SAMBUEVA, I. P. UBEEVA

Institute of General and Experimental Biology, Siberian Department, Russian Academy of Sciences, Ulan-Ude

Buryat State University, Ulan-Ude

Irkutsk State Medical Academy for Postgraduate Training, Irkutsk

Исследовано влияние экстракта *Hypocoum erectum* L. на морфофункциональное состояние печени крыс при экспериментальном тетрациклиновом гепатите. Эксперименты проведены на 40 белых крысах линии Wistar. Экстракт *H. erectum* в дозе 50 мг/кг вводили животным в течение 5 дней на фоне применения тетрациклина гидрохлорида (1,0 г/кг массы). На 7-е сутки опыта определяли: концентрацию малонового диальдегида, активность каталазы, содержание АТФ, пирувата и лактата в гомогенате печени, а также содержание восстановленного глутатиона в крови; проводили патоморфологическое изучение печени. Установлено, что экстракт *H. erectum* ингибирует процессы перекисного окисления липидов, повышает активность эндогенной антиоксидантной системы организма, нормализует энергообеспеченность гепатоцитов и ограничивает развитие дистрофических процессов в печени.

**Ключевые слова:** тетрациклиновый гепатит, экстракт *Hypocoum erectum* L., гепатопротекторное влияние, антиоксидантная активность, энергетический обмен.

The effect of *Hypocoum erectum* L. extract on the morphofunctional condition of the liver in rats with experimental tetracycline-associated hepatitis was studied. The experiment included 40 albino rats Wistar. The animals treated with tetracycline hydrochloride (1.0 g/kg body weight) were exposed to the extract in a dose of 50 mg/kg for 5 days. On the 7th day of the experiment the following indices were determined: malonic dialdehyde concentration, catalase activity, the levels of ATP, pyruvate and lactate in the liver homogenate, as well as the blood levels of reduced glutathione. The liver pathomorphological investigation was applied. The *H. erectum* extract was shown to inhibit lipid peroxidation, to increase the activity of the host endogenous antioxidant system, to normalize the hepatocyte energy provision and to limit the liver degeneration.

**Key words:** tetracycline-associated hepatitis, *Hypocoum erectum* L. extract, hepatoprotective effect, antioxidant activity, energy metabolism.

За последнее десятилетие возросла доля токсического поражения печени лекарственными препаратами или иными субстанциями неинфекционного происхождения. Так, на территории России острые медикаментозные поражения печени выявляются у 3–5% госпитализированных больных [1, 2]. Чаще всего их причиной являются противотуберкулёзные препараты, антибиотики (изониазид, амоксициллин/клавулановая кислота, тетрациклин), нестероидные противовоспалительные средства и ненаркотические анальгетики

(парацетамол), а также гормональные средства, цитостатики, антигипертензивные и антиаритмические препараты [3, 4]. В большинстве случаев острых лекарственных поражений печени отмена «причинного» препарата — достаточное условие для обратного развития патологических изменений. Однако нередко возникает ситуация, когда отмена гепатотоксического средства невозможна без создания непосредственной или отсроченной угрозы для жизни пациента. В связи с этим в комплексной терапии заболеваний печени различного генеза требуется использование безопасных многофункциональных гепатопротекторов, защищающих гепатоциты от повреждения и восстанавливающих их функцию. Наиболее перспек-

© Коллектив авторов, 2014

Адрес для корреспонденции: 670047, г. Улан-Удэ, ул. Сахьяновой, 6, ИОЭБ СО РАН

тивным в этом направлении является использование фитопрепаратов, характеризующихся широким спектром фармакологического действия, высокой эффективностью на ранних стадиях заболеваний, при вялотекущих и хронических заболеваниях, а также в периоды ремиссии болезни и реабилитации больных. Кроме того, гепатопротективные средства растительного происхождения, в комплексной фармакотерапии заболеваний печени потенцируют действие базисных средств, а также являются корректорами метаболических нарушений повреждённого органа [5, 6]. Особый интерес представляет дикорастущий вид *Hypocistis erectum* L. (семейство *Papaveraceae*). В тибетской медицине, а также в Монголии и Сибири настой *H. erectum* применяется при гепатитах, инфекционных и онкологических заболеваниях. В частности, установлена возможность использования *H. erectum* при тяжёлой токсической форме инфекционного гепатита с аллергическими реакциями [7, 8]. В экспериментах *in vitro* показано, что экстракт сухой *H. erectum* обладает выраженной мембраностабилизирующей и антиоксидантной активностью [9].

Целью настоящего исследования явилась оценка влияния экстракта сухого *H. erectum* на морфофункциональное состояние печени крыс при экспериментальном лекарственном (тетрациклиновом) гепатите.

## Материал и методы

Исследования выполнены на 40 белых крысах линии Wistar обоего пола с исходной массой 180–200 г. Содержание животных соответствовало «Правилам лабораторной практики» (GLP) и Приказу МЗ РФ № 708Н от 23.08.2010 г. «Об утверждении правил лабораторной практики». Экспериментальную работу осуществляли в соответствии с «Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных» (Приложение к приказу МЗ СССР № 755 от 12.08.77 г.), Правилами, принятыми в Европейской конвенции по защите позвоночных животных (Страсбург, 1986). Протокол исследования согласован с этическим комитетом ИОЭБ СО РАН (протокол № 5 от 05.09.2010). Эвтаназию животных осуществляли методом мгновенной декапитации под лёгким эфирным наркозом.

Экстракт сухой из травы *H. erectum* получен экстракцией высушенной надземной части 96% этанолом двукратно при комнатной температуре в течение 2 ч, в соотношении сырьё: экстрагент (1:10), затем 40% этанолом при температуре  $90 \pm 5^\circ\text{C}$  двукратно в течение 1 ч, затем водой, очищенной при  $40^\circ\text{C}$  в течение 1 ч. Конечный продукт получали высушиванием концентрированного экстракта в вакуум-сушильном шкафу. В полученном экстракте сухом *H. erectum* содержатся: каротиноиды —  $27,97 \pm 0,85$  мг%; полифенолы —  $3,17 \pm 0,09$ %; флавоноиды —  $0,14 \pm 0,01$ %; аскорбиновая кислота —  $3,54 \pm 0,07$ %; водорастворимые полисахариды —  $17,0 \pm 0,8$ %. Методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) обнаружено содержание в экстракте: кверцетин — 14,81 мкг/г; лютеолин — 15,56 мкг/г; цинароза — 98,89 мкг/г; рутин — 430,37 мкг/г.

Лекарственное поражение печени у животных воспроизводили путём внутрижелудочного введения тетрациклина гидрохлорида в дозе 1,0 г/кг массы 1 раз в сутки в течение 5 дней

[10]. Крысам 1-й опытной группы, наряду с введением тетрациклина, вводили *per os* экстракт *H. erectum* в дозе 50 мг/кг (экспериментально-терапевтическая доза) в виде водного раствора, на протяжении 7 дней. Животным 2-й опытной группы в качестве референтного препарата вводили карсил в дозе 50 мг/кг по аналогичной схеме. Контрольная группа животных на фоне введения тетрациклина получала эквивалентное количество воды очищенной по аналогичной схеме. Интервалы между введениями тетрациклина гидрохлорида и фитосредством, а также воды в соответствующих группах животных составляли 4–5 часов с целью предотвращения взаимодействия антибиотика с растительным средством в желудочно-кишечном тракте [10]. Животным интактной группы тетрациклин гидрохлорид не вводили. В каждую группу входило по 10 животных. Исследование морфофункционального состояния печени проводили на 7 сутки от начала введения тетрациклина гидрохлорида.

Для оценки интенсивности процессов перекисного окисления липидов (ПОЛ) определяли концентрацию малонового диальдегида (МДА) в гомогенате печени [11]. О состоянии антиоксидантной системы судили по активности каталазы в гомогенате печени [12], а также по содержанию восстановленного глутатиона (GSH) в крови [13]. Для изучения энергетического обмена клеток печени определяли содержание аденозинтрифосфорной кислоты (АТФ) и концентрацию пировиноградной (пируват) и молочной (лактат) кислот в гомогенате печени [14]. Для патоморфологических исследований кусочки печени крыс фиксировали в 10% растворе нейтрального формалина. Срезы окрашивали гематоксилином и эозином. Для выявления нейтральных липидов свежемороженые срезы, приготовленные на криостате МК-25, окрашивали Суданом IV. На каждом микропрепарате в 20 полях зрения подсчитывали количество (%) гепатоцитов с жировой инфильтрацией. Значимость различий между указанными параметрами среди экспериментальных групп оценивали с помощью U-критерия Манна-Уитни. Различия считали статистически значимыми при  $p \leq 0,05$ .

## Результаты и обсуждение

Результаты исследований показали (табл. 1), что введение животным тетрациклина в высоких дозах вызывает усиление процессов ПОЛ в мембранах гепатоцитов и снижение активности эндогенной антиокислительной системы, о чем свидетельствовало увеличение концентрации МДА в гомогенате печени в 2,1 раза и снижение активности каталазы и GSH в среднем в 2,0 раза по сравнению с данными животных интактной группы (табл. 1). Следует отметить, что GSH — наиболее важный и эффективный антиоксидант тиоловой группы и истощение запасов внутриклеточного глутатиона свидетельствует о выраженном напряжении прооксидантно-антиоксидантного баланса организма.

Установлено, что на фоне введения экстракта *H. erectum* в дозе 50 мг/кг на 7 сутки эксперимента наблюдалось ингибирование свободнорадикальных реакций в биологических мембранах гепатоцитов при стимуляции антиоксидантного потенциала (табл. 1). Так содержание МДА в гомогенате печени животных указанной группы снижалось на 14%, а активность каталазы и содержание GSH повышались на 23 и 58% соответственно, по сравнению с данными у крыс контрольной группы

**Таблица 1.** Влияние экстракта *H. erectum* на показатели перекисного окисления липидов и антиоксидантную систему организма белых крыс при тетрациклиновом повреждении печени

| Показатели              | Группы животных              |  |   |                                |
|-------------------------|------------------------------|--|---|--------------------------------|
|                         | интактная (H <sub>2</sub> O) | контрольная (тетрациклин+H <sub>2</sub> O) | опытная 1 (тетрациклин+ <i>H. erectum</i> ) | опытная 2 (тетрациклин+карсил) |
| МДА, мкмоль/г ткани     | 3,72±0,31                    | 7,77±0,30                                  | 6,58±0,27*                                  | 7,31±0,16*                     |
| Каталаза, мкат/мг белка | 7,19±0,14                    | 3,58±0,25                                  | 4,42±0,18*                                  | 3,99±0,10                      |
| GSH, мкмоль/л           | 14,01±1,02                   | 7,43±0,53                                  | 11,73±0,62*                                 | 11,57±0,85*                    |

**Примечание.** \* — здесь и далее различия значимы по сравнению с данными у животных контрольной группы при  $p \leq 0,05$ .

**Таблица 2.** Влияние экстракта *H. erectum* на показатели энергообеспеченности гепатоцитов белых крыс при тетрациклиновом повреждении печени

| Показатели          | Группы животных              |  |   |                                |
|---------------------|------------------------------|--|---|--------------------------------|
|                     | интактная (H <sub>2</sub> O) | контрольная (тетрациклин+H <sub>2</sub> O) | опытная 1 (тетрациклин+ <i>H. erectum</i> ) | опытная 2 (тетрациклин+карсил) |
| АТФ, мкМ/г ткани    | 2,35±0,16                    | 0,82±0,08                                  | 1,79±0,05*                                  | 1,17±0,13*                     |
| Лактат, мМ/г ткани  | 1,45±0,04                    | 2,71±0,07                                  | 2,17±0,07*                                  | 1,96±0,06*                     |
| Пируват, мМ/г ткани | 0,136±0,012                  | 0,130±0,007                                | 0,145±0,010                                 | 0,139±0,003                    |
| Лактат/ Пируват     | 11:1                         | 20:1                                       | 15:1  | 14:1                           |

(табл. 1). По своей антиоксидантной активности экстракт сухой *H. erectum* не уступал референтному препарату.

Данные, представленные в табл. 2, показывают, что экспериментальное повреждение печени тетрациклином вызывает ухудшение энергообеспеченности гепатоцитов. Так, в гомогенате печени животных контрольной группы отмечалось снижение количества АТФ в 2,8 раза, что свидетельствует о нарушении функций митохондрий. Кроме того, наблюдалось увеличение содержания лактата на 87% по сравнению с показателем животных интактной группы. Все это характеризует напряжённость метаболических процессов аэробного и анаэробного гликолиза в организме. Полученные результаты согласуются с данными литературы о том, что на фоне введения больших доз указанного антибиотика происходит торможение аэробного фосфорилирования и снижение содержания АТФ [15]. Уровень пирувата на фоне тетрациклинового гепатита изменялся не столь значительно, как лактата, в связи с тем что пирувиноградная кислота — величина нестабильная и является «точкой пересечения» многих метаболических путей.

Введение животным испытуемого фитосредства нормализовало энергетическое состояние тканей печени при тетрациклиновом гепатите. Так, концентрация АТФ в гомогенате печени животных указанной группы повышалась в 2,2 раза, содержание лактата снижалось на 20% по сравнению с аналогичными показателями у животных контрольной группы. Соотношение лактат/пируват в опытной группе животных, получавших экстракт *H. erectum*, составляло 15:1, тогда как в контрольной группе — 20:1 (см. табл. 2), что указывает на норма-

лизацию углеводного обмена. По исследуемым в эксперименте параметрам, экстракт сухой *H. erectum* проявлял более выраженное, чем карсил, антиоксидантное и энергопротективное действие.

Патоморфологические исследования показали, что в печени животных контрольной группы выявлялись нарушения микроциркуляции в виде полнокровия центральных и портальных вен, диapedез лейкоцитов. Синусоидальные пространства были неравномерно расширены. В области центральной вены отмечались зернистая дистрофия и фокальный некроз гепатоцитов, сопровождающиеся полиморфноклеточной инфильтрацией. В зоне портальных трактов клеточная инфильтрация была более выражена; наблюдались значительные участки гепатоцитов с мелко- и среднекапельной жировой дистрофией, что подтверждалось гистохимической окраской на жир Суданом IV. Результаты морфометрических исследований показали, что количество гепатоцитов в области портальных трактов, подверженных жировой дистрофии, составляло в среднем 17,5% от всей популяции.

В печени животных, получавших экстракт *H. erectum* и карсил на фоне введения тетрациклина, на 7 сутки наблюдения отмечали менее выраженные структурные изменения по сравнению с контролем, характеризующиеся нарушениями микроциркуляции и умеренно выраженными дистрофическими процессами в печени. Гепатоциты в зоне центральной вены были подвержены зернистой дистрофии, при этом лейкоцитарная инфильтрация была менее выраженной, чем в контроле. На фоне введения испытуемых средств жировая дистрофия гепатоцитов в перипортальной области выявлялась у 70% животных, тогда

как в контроле у 100%. По данным морфометрических исследований, количество гепатоцитов с жировой дистрофией на фоне введения *H. erectum* составляло 8–13%, что было в среднем на 48% ниже показателя контрольных животных.

Таким образом, полученные данные свидетельствуют о том, что поражение печени, вызванное тетрациклином, характеризуется повреждением мембран гепатоцитов, индукцией перекисного окисления липидов, снижением активности эндогенной антиоксидантной системы и развитием энергодефицитного состояния, что является причиной развития органических изменений в органе. Экстракт *H. erectum* в экспериментально-терапевтической дозе 50 мг/кг ограничивает негативное действие тетрациклина гидрохлорида на морфофункциональное состояние исследуемого органа, способствуя ингибированию процессов ПОЛ и повышению активности эндогенной антиоксидантной системы, а также нормализуя энергетический статус гепа-

тоцитов и тем самым ограничивая развитие жировой дистрофии в клетках печени. Установленное влияние исследуемого средства обусловлено преимущественным содержанием в его составе полифенольных соединений, являющихся природными антиоксидантами. Широкий спектр фармакологической активности биофлавоноидов, как известно, обусловлен их влиянием на многочисленные ферментные системы организма [16]. По влиянию на морфофункциональное состояние печени при тетрациклиновом гепатите эффект *H. erectum* сопоставим, а по действию на энергетический обмен превосходит референтный препарат карсил.

Полученные результаты сравнительных исследований позволяют рассматривать сухой экстракт *H. erectum* как безопасный многофункциональный гепатопротектор для фармакологической коррекции морфофункционального состояния печени при её лекарственном повреждении.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Галимова С.Ф. Лекарственные поражения печени (часть I). Трансплантология 2011; 1: 13–21.
2. Хазанов А.И., Плюснин С.В., Васильев А.П. и др. Клинические особенности острых лекарственных гепатитов. Росс журн гастроэнтерол гепатол колопроктол 2009; 4: 31–40.
3. Буторова Л.И., Калинин А.В. Лекарственные поражения печени. М.: 2010; 64.
4. Andrade R. J., Tulkens P.M. Hepatic safety of antibiotics used in primary care. J Antimicrob Chemother 2011; 66: 1431–1446.
5. Демидов В.Н., Назаренко О.А., Егорова Е.Ю. и др. Эффективность применения препарата Прогепап при экспериментальном повреждении печени алкоголем и парацетамолом. Фарматека 2011; 2: 85–90.
6. Николаев С.М. Фитофармакотерапия и фитофармакопрофилактика заболеваний. Улан-Удэ: 2012; 286.
7. Асеева Т.А., Базарон Э.Г., Резанова О.И. Расшифровка тибетского названия растения «Бар-ба-да» и его применение в индо-тибетской медицине. Растит ресурс 1979; 2: 15: 293–296.
8. Тибетская медицина у бурят / Т.А. Асеева, Д.Б. Дашиев, А.Д. Дашиев и др. Новосибирск: 2008; 324.
9. Торопова А.А., Разуваева Я.Г., Николаев С.М., Федоров А.В., Самбуева З.Г. Антиоксидантная и мембраностабилизирующая активность экстрактов *Lomatogonium carinthiacum* (Wulfen) Reichenb and *Hurescoul erectum* L. в модельных системах. Бюллетень ВСНЦ СО РАМН; 2012; 6: 88: 94–97.
10. Николаев С.М. Растительные лекарственные препараты при повреждениях гепатобилиарной системы. Новосибирск: 1992; 155.
11. Стальная И.Д., Гаршвили Т.Г. Метод определения малонового диальдегида с помощью тиобарбитуровой кислоты. Современные методы в биохимии. М.: 1977: 67–69.
12. Королюк М.А., Иванова Л.И., Майорова И.Г. и др. Метод определения активности каталазы. Лаб дело 1988; 1: 16–19.
13. Темирбулатов Р.А., Селезнев Е.И. Метод повышения интенсивности свободнорадикального окисления липидсодержащих компонентов крови и его диагностическое значение. Лаб дело; 1981; 4: 209–211.
14. Методы биохимических исследований / Под ред. М. И. Прохорова. Л.: 1982: 272.
15. Баган Н.Ю. Функционально-биохимическая характеристика и экспериментальная фармакотерапия тетрациклиновых поражений печени: Автореф. дис. ... канд. мед. наук. Киев: 1991.
16. Катикова О.Ю., Костин Я.В., Тишкин В.С. Гепатопротекторное действие препаратов растительного происхождения. Экспер клин фармакол 2002; 1: 41–43.

# Изучение фармакокинетики цефуроксима по динамике его распределения в жидкости ротовой полости больных синуситами

О. И. КУЛАПИНА<sup>1</sup>, М. С. МИХАЙЛОВА<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Кафедра детских болезней Саратовского государственного медицинского университета им. В. И. Разумовского, Саратов

<sup>2</sup> Кафедра аналитической химии и химической экологии Саратовского государственного университета им. Н. Г. Чернышевского, Саратов

## Study on Pharmacokinetics of Cefuroxime by Dynamics of Its Distribution in Oral Fluid of Patients with Sinusitis

O. I. KULAPINA, M. S. MIKHAILOVA

Department of Children Diseases, V. I. Razumovsky Saratov State Medical University, Saratov

Department of Analytical Chemistry and Chemical Ecology, N. G. Chernyshevsky Saratov State University, Saratov

Описан метод количественного определения цефуроксима в смешанной слюне больных синуситами на спектрофотометре Shimadzu UV-1800, совмещённым с IBM PC. Условия определения:  $\lambda=266$  нм, кварцевая кювета, время анализа 10 минут. Подобраны условия спектрофотометрического определения. Данный метод определения цефуроксима характеризуется высокой специфичностью, точностью, использованием малых объёмов жидкости ротовой полости, экспрессностью и может быть рекомендован для внедрения в клинику для оптимизации лечения больных цефуроксимом. Исследована фармакокинетика цефуроксима по динамике его распределения в жидкости ротовой полости больных с различной инфекционно-соматической патологией.

*Ключевые слова: цефуроксим, жидкость ротовой полости, фармакокинетика, УФ-спектрофотометрия.*

A method for quantitative determination of cefuroxime in mixed saliva of patients with sinusitis by using spectrophotometer Shimadzu UV-1800, combined with the IBM PC is described. The conditions of the determination were the following:  $\lambda=266$  nm, a quartz cuvette, the analysis time of 10 minutes. The method for determination of cefuroxime is characterized by high specificity, accuracy, use of small amounts of oral fluid and expressivity. The method may be recommended for the use in the clinical practice for optimizing cefuroxime therapy in patients. The pharmacokinetics of cefuroxime was investigated by the dynamics of its distribution in the oral fluid of patients with various infectious-somatic disorders.

*Key words: cefuroxime, oral fluid, pharmacokinetics, UV spectroscopy.*

## Введение

В настоящее время антибиотики занимают ведущее место в медицине при лечении различных инфекционно-воспалительных заболеваний, для противоинфекционной профилактики в хирургии [1, 2]. Широкое применение антибиотиков привело к развитию резистентных штаммов основных патогенов. Исследователи и клиницисты стараются решить эту проблему следующими путями: синтезом антибиотиков новых поколений, созданием ингибиторов  $\beta$ -лактамаз, комбинированием уже известных антибиотиков, созданием новых лекарственных форм и изменением режима дозирования [1, 2], что в свою очередь требует определения концентрации антибиотиков в различных объектах.

Важной проблемой в настоящее время является создание научных объективных основ эф-

фективного и безопасного применения лекарств, в т.ч. антибиотиков, исследование взаимодействия лекарств с организмом человека, анализ связи между фармакокинетикой лекарств и фармакологическим и терапевтическим эффектами.

Для определения наиболее широко применяемых  $\beta$ -лактамных ( $\beta$ -lac) антибиотиков — различных пенициллинов и цефалоспоринов в лекарственных препаратах, пищевых продуктах, биосредах используются электрохимические, спектроскопические, хемилюминесцентные, хроматографические, микробиологические, иммунологические методы, капиллярный электрофорез [3]. Многие из этих методов требуют дорогостоящего оборудования, реактивов, высококвалифицированных операторов, отличаются длительностью и не применимы для экспресс-контроля за содержанием антибиотиков в клинических и биохимических лабораториях.

При проведении фармакокинетических исследований некоторые препараты довольно быстро подвергаются биотрансформации (окислению,

© О. И. Кулапина, М. С. Михайлова, 2014

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

гидролизу и т.п.). Поэтому используемый метод должен быть достаточно чувствительным для получения надёжных результатов, воспроизводимым, дешёвым и достаточно экспрессным [4].

Одним из перспективных методов определения антибиотиков в фармацевтических формах и биологических жидкостях является спектроскопия. Предложенные спектроскопические методы определения цефалоспоринов отличаются длительностью и многостадийностью, требуют токсичных реагентов, операций нагревания и охлаждения [5, 6], что отрицательно сказывается на состоянии антибиотиков. Данные способы предназначены для определения антибиотиков в лекарственных средах и в силу недостаточной чувствительности не могут быть использованы для анализа биологических сред на содержание антибиотиков.

Неинвазивная оценка основных параметров фармакокинетики и оптимизации назначения препаратов у больных может быть проведена при анализе смешанной слюны (жидкости ротовой полости — ЖРП). В литературе имеются сведения, что из плазмы крови в слюну переносится только свободная фракция препарата [7]. При измерении концентраций препаратов в слюне ширина диапазона терапевтических концентраций практически всегда больше ширины терапевтического диапазона того же препарата в плазме крови [7, 8]. Установлена положительная корреляция между концентрацией антибиотиков в слюне и сыворотке крови [8].

Цель настоящего исследования заключалась в изучении фармакокинетики цефуросима по динамике его распределения в жидкости ротовой полости больных синуситами с использованием спектроскопического метода.

## Материал и методы

В терапии синуситов — воспалениях слизистой оболочки околоносовых пазух — широко применяют  $\beta$ -лактамы антибиотиков: амоксициллин, цефотаксим, цефиксим, цефтриаксон, цефуросим [1]. Достоинством цефуросима является возможность его использования как при внутримышечном введении, так и перорально.

Цефуросим аксетил («Зиннат») является сложным эфиром цефуросима, в котором карбоксильная группа заменена эфирным радикалом, что придает устойчивость данному соединению в желудочном соке. Известно, что цефуросим аксетил разлагается в кишечнике до цефуросима (рН 5,8—6,5).

Спектрофотометрические исследования проводили на спектрофотометре Shimadzu UV-1800 совмещенным с IBM PC, использовались кюветы из кварцевого стекла  $l=1$  см. Концентрацию цефуросима в смешанной слюне определяли способом градуировочного графика. Для отделения белковых компонентов из смешанной слюны использовали центрифугу Wirowka MPW-6. В качестве объекта исследования в работе была выбрана жидкость ротовой полости.

Исследования проведены у практически здоровых лиц ( $n=10$ , средний возраст  $20\pm 2$  года) и больных с инфекцией верхних дыхательных путей — синуситами ( $n=12$ , средний

возраст  $16\pm 2$  года). Фармакокинетические исследования проводили в пробах ЖРП, полученных через каждые два часа после перорального приёма 250 мг цефуросима в течение всего периода применения препарата. Статистическую обработку проводили согласно [9].

Применяли следующие реактивы: сульфат цинка (ч.д.а.), гидроксид натрия (х.ч.), цефуросим (фирма Glaxo Operations UK Limited).

### Методика спектроскопического определения цефуросима в смешанной слюне.

**Пробоподготовка ЖРП.** Процесс пробоподготовки проб для анализа должен быть достаточно простым и воспроизводимым. Вопросы подготовки проб, выбор метода анализа, разработки метода, количественной обработки полученных данных предполагают использование высококвалифицированных специалистов — медиков, биохимиков, химиков-аналитиков [4].

Возможность спектроскопического определения цефуросима в ЖРП была показана при исследовании смешанной слюны практически здоровых лиц с внесёнными добавками цефуросима. Отбор проб смешанной слюны практически здоровых лиц осуществляли путём сплевывания ротовой жидкости в чистые сухие полиэтиленовые пробирки. Пробу отбирали спустя 1—2 часа после приёма пищи, перед сбором ротовую полость ополаскивали водой. Пробу ЖРП центрифугировали в течение 15 мин. при 3500 об/мин. Затем добавляли в пробу 1 мл NaOH ( $c=0,12$  моль/л) и 3 мл  $ZnSO_4$  ( $c=5,4$  г/л) и нагревали на водяной бане. После осаждения белков отбирали надосадочную жидкость и снова центрифугировали 15 мин при 3500 об/мин.

**Приготовление стандартного раствора цефуросима.** Для приготовления серии водных растворов цефуросима навеску таблетки 0,046 г, содержащую 250 мг активного вещества, растворяли в мерной колбе вместимостью 25 мл и до метки доводили дистиллированной водой (концентрации исходного раствора 1 мг/мл). Отбирали 2,5 мл исходного раствора цефуросима в мерную колбу вместимостью 25 мл, получали раствор с концентрацией 100 мкг/мл.

**Построение градуировочного графика.** Для приготовления серии растворов цефуросима в жидкости ротовой полости с внесёнными добавками антибиотика помещали в кювету для измерения 0,1—1 мл раствора цефуросима ( $c=100$  мкг/мл) и до 3 мл добавляли надосадочной жидкости смешанной слюны. Растворы перемешивали и снимали спектры поглощения цефуросима относительно смешанной слюны без добавления антибиотика. Объём исследуемого раствора задается объёмом кварцевой кюветы, в которой осуществляли перемешивание компонентов.

Строили градуировочный график зависимости оптической плотности ( $A$ ) в максимуме поглощения от содержания цефуросима в пробе биологической среды здорового человека.

Аналогичным образом готовили пробу ЖРП больных синуситами, принимающих цефуросим. По градуировочному графику находили содержание цефуросима в смешанной слюне больных.

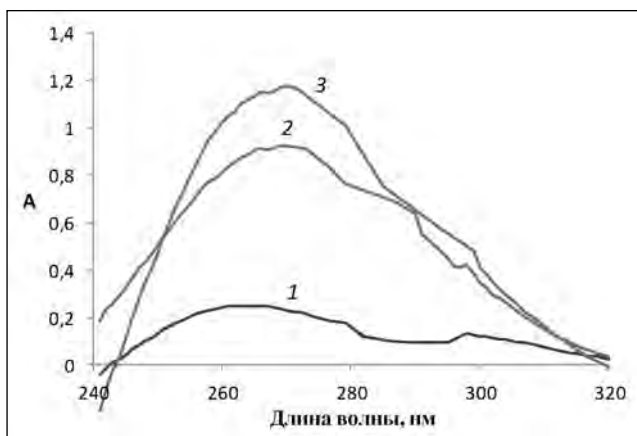
## Результаты и обсуждение

Для спектров поглощения цефуросима на фоне ЖРП установлено, что  $\lambda_{max}=261$  нм (рис. 1).

Молярные коэффициенты светопоглощения цефуросима и цефуросима аксетила в ротовой жидкости равны и составляют  $1,25\cdot 10^4$ .

Зависимость оптической плотности от концентрации цефуросима на фоне ЖРП линейная (рис. 2): диапазон определяемых концентраций цефуросима в ЖРП составляет 1—50 мкг/мл, минимально определяемое содержание антибиотика составляет 1 мкг/мл.





**Рис. 1.** Спектры поглощения цефуроксима на фоне смешанной слюны здорового человека при различных концентрациях.

1 – 10,2 мкг/мл; 2 – 17 мкг/мл; 3 – 42,4 мкг/мл.

Исследована фармакокинетика цефуроксима у больных с синуситами, принимающими 2 раза в сутки перорально по 250 мг цефуроксима. Во время исследования больные не принимали других лекарств.

На рис. 3 в качестве примера представлена усреднённая зависимость, характеризующая динамику концентраций цефуроксима в жидкости ротовой полости больной К.

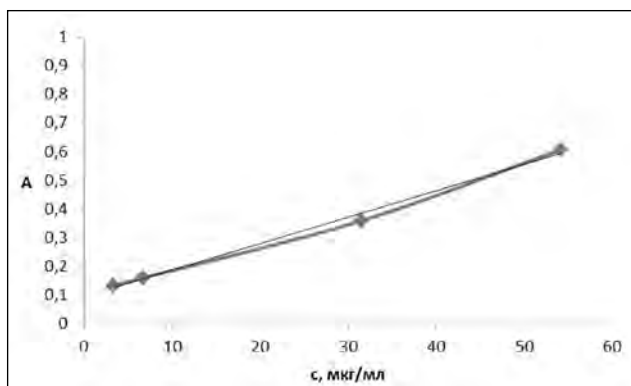
Показано, что максимальная концентрация цефуроксима в ЖРП ( $77 \pm 4$  мкг/3 мл) достигается к 14–15 часам после приёма в 8 утра 250 мг препарата, затем происходит уменьшение концентрации до начальных значений. После вечернего приёма (20 ч) 250 мг цефуроксима концентрация препарата в жидкости ротовой полости снова повышается.

Анализ фармакокинетических кривых был проведён с помощью компьютерной программы *Borgia* (НПП «Наука Плюс»). Рассчитывались значения основных фармакокинетических параметров:  $C_{max}$  — максимальная концентрация, мкг/мл;  $V_{dss}$  — стационарный объём распределения, л;  $K_{el}$  — константа элиминации;  $AUC$  — площадь под фармакокинетической кривой в интервале 0 – 24 ч, мг·ч/л;  $CL_t$  — общий клиренс, мл/мин;  $T_{1/2}$  — период полувыведения, ч.

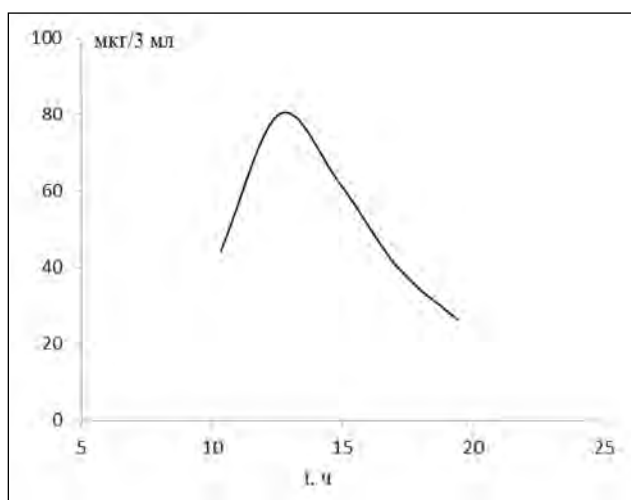
Сравнительная характеристика экспериментальных и литературных данных по фармакокинетике цефуроксима приведена в таблице.

**Сравнительная характеристика экспериментальных и литературных данных по фармакокинетике цефуроксима (доза 250 мг)**

| Параметры          | Экспериментальные данные | Литературные данные [10] |
|--------------------|--------------------------|--------------------------|
| $C_{max}$ , мкг/мл | $15,3 \pm 0,3$           | 14,8                     |
| $V_{dss}$ , л      | $13,7 \pm 0,4$           | 11,1–15,8                |
| $AUC$ , мг·ч/л     | $35,1 \pm 0,1$           | 32,9                     |
| $CL_t$ , мл/мин    | $142,6 \pm 15,7$         | $133,8 \pm 14,7$         |
| $T_{1/2}$ , ч      | $1,3 \pm 0,2$            | 1,2–1,5                  |



**Рис. 2.** Зависимость оптической плотности (А) от концентрации цефуроксима в смешанной слюне  $\lambda_{max} = 261$  нм.



**Рис. 3.** Зависимость усреднённых концентраций цефуроксима в смешанной слюне больной К. после перорального приёма препарата в дозе 250 г.

Полученные экспериментальные данные по фармакокинетике цефуроксима соответствуют литературным [10].

С учётом сложности анализируемых объектов и самого определяемого вещества достоверность полученных результатов при реализации способа оценивалась следующим образом. В пробу смешанной слюны здорового человека вводили определённый объём стандартного раствора цефуроксима и далее пробу проводили через все операции пробоподготовки. Погрешность определения не превышала 4%.

Для оценки возможности спектроскопического определения цефуроксима в лекарственных препаратах исследовано поведение антибиотика в водных средах.

Спектры поглощения водных растворов цефуроксима имеют максимум светопоглощения  $\lambda=281$  нм (рис. 4). При указанной длине волны соблюдается прямолинейная зависимость оптическая плотность — концентрация антибиотика. Диапазон определяемых содержаний цефуроксима в водных растворах составляет 1—50 мкг/мл, минимально определяемое содержание антибиотика составляет 1 мкг/мл.

Для спектров поглощения цефуроксима в водной фазе и на фоне ЖРП, было установлено наличие сдвига  $\lambda_{\max}$  в коротковолновую область спектра ( $\lambda_{\max}=20$  нм) и уменьшение  $A_{\max}$ , что связано с изменением состояния цефуроксима в исследуемых средах (рис. 1, 4). Кислотность свежеприготовленных водных растворов цефуроксима с изменением концентрации не меняется.

Таким образом, нами предложена методика спектроскопического определения цефуроксима в смешанной слюне практически здоровых лиц и больных синуситами. Методика отличается экспрессностью, возможностью определения активной концентрации антибиотиков в широком концентрационном интервале 1—50 мкг/мл и дает возможность определения цефуроксима в смешанной слюне больных при инфекционных заболеваниях. Данный способ определения использован для изучения фармакокинетики цефуроксима по динамике его распределения в жидкости ротовой полости больных синуситами.

Показана возможность определения цефуроксима в водных растворах, что может быть использовано при контроле качества фармацевтических препаратов.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Яковлев В. П., Яковлев С. В. Рациональная антимикробная фармакотерапия. М.: 2007; 784.
2. Егоров Н. С. Основы учения об антибиотиках. М.: 2004; 528.
3. Кулапина Е. Г., Баранова О. В., Кулапина О. И. и др. Современные методы определения антибиотиков в лекарственных и биологических средах. Антибиотики и химиотер 2009; 9—10: 53—60.
4. Соколов А. В. Терапевтический лекарственный мониторинг. Качествен клин практ 2002; 1. url: www.medi.ru/doc 9 920112.htm.
5. Morelli B. Derivative spectrophotometry in the analysis of mixtures of cefotaxime sodium and cefadroxil monohydrate. J Pharm and Biomed Anal 2003; 32: 2: 257—267.

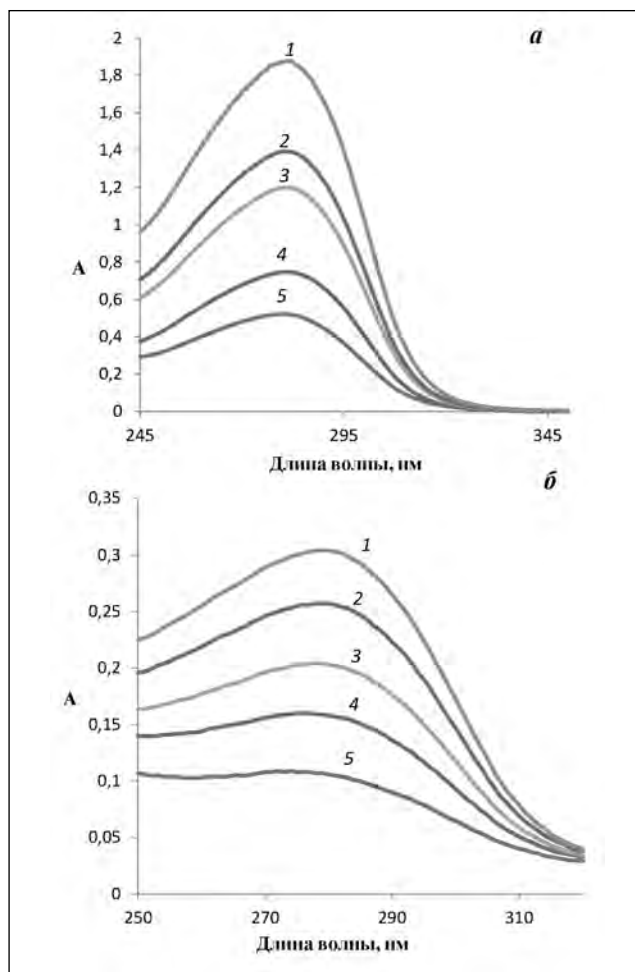


Рис. 4. Спектры поглощения свежеприготовленных водных растворов цефуроксима при различных концентрациях, мкг/мл.

а — 42,4 (1); 33,9 (2); 27,1 (3); 16,9 (4); 10 (5). б — 6 (1); 4,8 (2); 3,6 (3); 2,4 (4); 1,2 (5).

6. Amin A.S. Pyrocatechol violet in pharmaceutical analysis. Part I. A spectrophotometric method for the determination of some  $\beta$ -lactam antibiotics in pure and in pharmaceutical dosage forms. Farmaco. 2001; 56: 3: 211—218.
7. Карнищенко Н. Н., Хоронько В. В., Сергеева С. А. и др. Фармакокинетика. Ростов на Дону: 2001; 384.
8. Гончаров И. Б., Ковачевич И. В., Репенкова Л. Г. и др. Влияние антиортогостатической гипокинезии на фармакокинетику ацетаминофена и распределение его в слюне здоровых добровольцев. Хим фарм журн 2009; 43: 5: 3—6.
9. Реброва О. Ю. Статистический анализ медицинских данных. М.: МедиаСфера 2002; 312.
10. Foord R.D. Cefuroxime: human pharmacokinetics. Antimicrob Agents Chemother 1976; 9: 5: 741—747.

# Чувствительность к антибиотикам и идентификация клинических штаммов *Pseudomonas fulva*

Е. П. СИВОЛОДСКИЙ<sup>1</sup>, Г. В. ГОРЕЛОВА<sup>1</sup>, С. П. БОГОСЛОВСКАЯ<sup>1</sup>, Е. В. ЗУЕВА<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Военно-медицинская академия им. С.М. Кирова, Санкт-Петербург

<sup>2</sup> Научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Пастера, Санкт-Петербург

## Antibiotic Susceptibility and Identification of Clinical *Pseudomonas fulva* Isolates

E. P. SIVOLODSKY, G. V. GORELOVA, S. P. BOGOSLOVSKAYA, E. V. ZUEVA

S. M. Kirov Military Medical Academy, St. Petersburg

L. Pasteur Research Institute of Epidemiology and Microbiology, St. Petersburg

В коллекции культур псевдомонад, выделенных в г. Санкт-Петербурге в 1995—2005 гг., выявлены 8 наиболее ранних клинических штаммов *P. fulva*, что подтверждает медицинскую значимость этого вида. Установлен высокий уровень видовой идентификации всех штаммов *P. fulva* методом MALDI-TOF масс-спектрометрии с использованием прибора Microflex с базой данных MALDI Biotyper (Bruker Daltonics Inc.). Апробированы и предложены тесты традиционных исследований, позволяющие достоверно идентифицировать *P. fulva* без использования генетических методов. Установлен профиль чувствительности к антибиотикам клинических штаммов *P. fulva*. У двух штаммов *P. fulva* выявлена приобретённая резистентность к цефалоспорином III поколения и хлорамфениколу.

**Ключевые слова:** *Pseudomonas fulva*, идентификация, MALDI-TOF масс-спектрометрия, пигменты псевдомонад, чувствительность к антибиотикам, медицинское значение.

The earliest eight clinical strains of *Pseudomonas fulva* were identified in the culture collection of pseudomonads isolated in St. Petersburg in 1995—2005, that confirmed the medical importance of the species. A high level of the species identification of all the strains of *P. fulva* by MALDI-TOF mass-spectrometry with the use of Microflex device with database MALDI Biotyper (Bruker Daltonics Inc.) was shown. Tests for routine studies providing identification of *P. fulva* without the use of genetic methods were approved. The profile of the antibiotic susceptibility of the clinical strains of *P. fulva* was described. Acquired resistance of two *P. fulva* isolates to the 3<sup>rd</sup> generation cephalosporins and chloramphenicol was detected.

**Key words:** *Pseudomonas fulva*, identification, MALDI-TOF mass-spectrometry, pigments of pseudomonads, antibiotic susceptibility, medical value.

## Введение

Бактерии *Pseudomonas fulva* (от греч. *fulva* — жёлто-коричневый) были выделены в Японии с рисовых полей и описаны в 1963 году [1]. Первое сообщение о медицинской значимости *P. fulva* было опубликовано в 2010 году [2]. Клинический штамм был выделен в Аргентине из ликвора девочки с опухолью мозга, осложнённой инфекцией. Первоначально штамм был определен автоматическим микробиологическим анализатором Vitek 2 как *P. putida*, однако методами секвенирования ПЦР-продукта гена 16S рРНК и ДНК-ДНК гибридизации окончательно идентифицирован как *P. fulva*. У штамма была выявлена металло-бета-лактамаза типа VIM-2 с локализацией гена bla<sub>vim-2</sub> в интегрене. В том же году был

опубликован случай выделения *P. fulva* из крови больного в Республике Корея [3]. Идентификация *P. fulva* была проведена по результатам секвенирования гена 16S рРНК и генов *gyrB* и *rpoD*. Штамм был чувствителен ко всем антисинегнойным антибиотикам.

В 2011 году появилось сообщение об идентификации методом MALDI-TOF масс-спектрометрии штамма *P. fulva* непосредственно в культуральной среде с посевом крови [4]. В 2010—2012 гг. в госпитале Чао-Янг (Пекин) были выделены штаммы *P. fulva* у 15 кардиологических больных с бактериемией [5]. Анализатором Vitek 2 бактерии были идентифицированы как *P. putida*, но секвенирование генов 16S рРНК, *gyrB*, *rpoB*, *rpoD* установило их принадлежность к *P. fulva*. Лекарственная чувствительность штаммов не была приведена.

Эти данные свидетельствуют о медицинской значимости *P. fulva*, недостаточности информации о чувствительности штаммов к антибиотикам,

© В. М. Подборонов, И. П. Смирнова, 2014

Адрес для корреспонденции: 194044 Санкт-Петербург, ул. Академика Лебедева 6, ВМедА им. С. М. Кирова

сложности идентификации ввиду фенотипического сходства с *P. putida* и необходимости использовать генетические методы. Представляет интерес изучение пригодности для идентификации *P. fulva* метода MALDI-TOF масс-спектрометрии.

Цель данного исследования — характеристика лекарственной чувствительности клинических штаммов *P. fulva*, оценка их идентификации методом MALDI-TOF масс-спектрометрии и выявление наиболее значимых тестов идентификации традиционными методами исследований.

## Материал и методы

Объектами исследования были 8 штаммов *P. fulva* из рабочей коллекции культур Е. П. Сиволодского (№ 22—27, 30 и 31) и типовые штаммы *P. putida* CIP 52191<sup>T</sup>(ATCC 12633), *P. luteola* CIP 102995<sup>T</sup>(JCM 3352), *P. oryzae* CIP 102996<sup>T</sup>(JCM 2952), полученные из коллекции бактерий Института Пастера (Париж). Штаммы *P. fulva* были выделены в 1995—2005 гг. из мочи беременных и урологических больных в лечебных учреждениях г. Санкт-Петербурга. Они хранились в коллекции как псевдомонады неустановленной видовой принадлежности. Принадлежность их к виду *P. fulva* была установлена в ходе данного исследования методом MALDI-TOF масс-спектрометрии и традиционными тестами. Для выращивания исследуемых бактерий применяли «питательный агар для культивирования микроорганизмов сухой (ГРМ-агар)» производства ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» (г. Оболensk).

Для идентификации видов бактерий методом MALDI-TOF масс-спектрометрии использовали настольный MALDI-TOF масс-спектрометр Microflex с базой данных MALDI Biotyper (Bruker Daltonics Inc., Германия). Подготовку к исследованию чистых культур штаммов бактерий и проведение исследований осуществляли в соответствии с инструкцией к прибору. Уровень идентификации бактерий трактовали по критериям, указанным в инструкции:  $\geq 2.300$ —3.000 высокая вероятность идентификации вида; 2.000—2.299 надёжная идентификация рода, вероятная идентификация вида; 1.700—1.999 вероятная идентификация рода; 0.000—1.699 ненадёжная идентификация.

Чувствительность грамотрицательных бактерий к ионам бария как маркера их принадлежности к роду *Pseudomonas* определяли по методу, описанному в [6]. Оксидазу определяли у культур бактерий, выросших на агаре Мюллера-Хинтона при 26°C в течение 24 ч. Культуру изучали по Ковачу параллельно с реактивом тетраметил-пара-фенилендиамин на полоске OXItest (Erba Lachema) и в 1% водном растворе диметил-пара-фенилендиамина в капле на стекле чашки Петри [7]. Продукцию флуоресцеина выявляли путём посева бактерий на питательную среду King B (bio Merieux) и синтетическую среду King BS, состав которой был разработан нами [8]. Посевы выращивали при 26°C и 35°C в течение 24 и 48 ч. Результат учитывали при ультрафиолетовом освещении. Для обнаружения продуцирования бактериями жёлтого водонерастворимого пигмента колоний засеивали суточные культуры секторами на ГРМ-агар и инкубировали при 26°C в течение 48 ч. Продукцию коричневого водорастворимого пигмента выявляли посевом тех же суточных культур секторами на ГРМ-агар, но инкубацию проводили при 35°C в течение 48 ч. При учёте результатов обращали внимание на появление тёмно-коричневой окраски питательной среды вокруг газонов бактерий. Для усиления продукции коричневого пигмента целесообразно дополнительно вносить в ГРМ-агар перед его стерилизацией 0,05% раствор L-тирозина. Окисление и ферментацию глюкозы изучали О/Ф тестом на среде Хью-Лейфсона [7]. Утилизацию бактериями аминокислот L-лизина и L-лейцина в качестве единственного источника азота и углерода исследовали

по разработанному нами методу [9]. Утилизацию бактериями гипурата натрия изучали на синтетической питательной среде [9]. Наличие у бактерий нитратредуктазы, аргининдигидролазы и гидролиза эскулина определяли микрообъёмным методом с использованием тест-системы «Рапид-Энтер» производства НИИЭМ имени Пастера (Санкт-Петербург).

Чувствительность к антибиотикам бактерий *P. fulva* изучали в отношении 30 антимикробных препаратов с использованием автоматического микробиологического анализатора Vitek 2 (bio Merieux). К некоторым антибиотикам определяли чувствительность диско-диффузионным методом, используя диски производства НИИЭМ имени Пастера. Результаты определения чувствительности оценивали в соответствии с МУК 4.12.1890-04 [10].

## Результаты и обсуждение

Изучение методом MALDI-TOF масс-спектрометрии с использованием прибора Microflex с базой данных MALDI Biotyper (Bruker Daltonics Inc.) 8 штаммов нашей коллекции, продуцирующих жёлтый и коричневый пигменты, установило принадлежность всех штаммов к виду *P. fulva*. При этом были получены максимальные показатели уровня идентификации — у всех штаммов в диапазоне от 2.302 до 2.455, что соответствует высокой вероятности идентификации вида бактерий. Высокий уровень идентификации *P. fulva* был обеспечен обширной базой данных этого прибора, содержащей информацию о большинстве известных видов псевдомонад, включая *P. fulva*.

Информация о *P. fulva* отсутствует в базе данных автоматизированных микробиологических анализаторов Vitek 2 и Phoenix, которые не идентифицируют эти бактерии или ошибочно определяют их как *P. putida* [2, 5]. Сведения о фенотипических признаках *P. fulva* противоречивы, получены на малом количестве штаммов [2, 3, 11], что нуждается в их уточнении.

Наиболее характерными признаками *P. fulva*, определившими название вида, являются продукция жёлтого водонерастворимого пигмента колоний и коричневого водорастворимого пигмента, окрашивающего питательную среду вокруг колоний. Однако бактерии, выращенные при одной температуре, редко имеют оба пигмента. Нами было установлено, что температурный оптимум для синтеза жёлтого и коричневого пигментов различен. Жёлтый пигмент продуцируют все штаммы *P. fulva* на ГРМ-агаре при 26°C в течение 48 ч.

При этом большинство штаммов коричневого пигмента не образуют. Коричневый пигмент продуцируют все штаммы *P. fulva* на ГРМ-агаре при 35°C в течение 48 ч, при этом большинство штаммов жёлтый пигмент не образуют (табл. 1). Такой же коричневого пигмента образуют большинство штаммов *P. putida*, однако они не продуцируют жёлтый пигмент. Поэтому продукцию указанных пигментов следует определять на ГРМ-агаре на отдельных чашках при 26°C (жёлтый пигмент) и 35°C (коричневый пигмент) в течение 48 ч.

**Таблица 1.** Фенотипическая характеристика *P. fulva* и других псевдомонад, продуцирующих жёлтый и коричневый пигменты

| Таксономические признаки                               | Исследуемые штаммы |         |         |         |         |         |         |
|--|--------------------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|
|  | 1* (n=8)           | 2 (n=3) | 3 (n=1) | 4 (n=1) | 5 (n=1) | 6 (n=1) | 7 (n=1) |
| Чувствительность к ионам бария                         | +                  | +       | +       | +       | +       | +       | +       |
| Оксидаза   | +                  | +       | —       | —       | +       | —       | —       |
| Продукция флуоресцеина:                                |                    |         |         |         |         |         |         |
| среда King B при 26°C и 35°C                           | —                  | —       | —       | —       | —       | —       | —       |
| среда King BS при 26°C                                 | +                  | 0       | 0       | 0       | +       | —       | —       |
| при 35°C   | —                  | 0       | 0       | 0       | —       | —       | —       |
| Продукция жёлтого пигмента колоний в течение 48 ч:     |                    |         |         |         |         |         |         |
| при 26°C   | +                  | 0       | 0       | 0       | —       | +       | +       |
| при 35°C   | -/+                | +       | +       | +       | —       | +       | +       |
| Продукция коричневого пигмента вокруг колоний за 48 ч: |                    |         |         |         |         |         |         |
| при 26°C   | -/+                | 0       | 0       | 0       | —       | —       | —       |
| при 35°C   | +                  | 0       | 0       | 0       | +       | —       | —       |
| О/Ф тест с глюкозой                                    | ±                  | ±       | ±       | ±       | ±       | ±       | ±       |
| Утилизация гиппурата натрия                            | —                  | —       | 0       | 0       | +       | —       | —       |
| Утилизация источника N и C:                            |                    |         |         |         |         |         |         |
| L-лизина   | —                  | 0       | 0       | 0       | +       | —       | —       |
| L-лейцина  | —                  | 0       | 0       | 0       | +       | —       | —       |
| Аргининдигидролаза                                     | +                  | +       | +       | +       | +       | +       | —       |
| Нитратредуктаза  | —                  | —       | —       | —       | —       | +       | —       |
| Гидролиз эскулина                                      | —                  | —       | —       | —       | —       | +       | —       |
| Рост при 41°C  | —                  | —       | —       | —       | —       | +       | —       |

**Примечание.** \* 1 — *P. fulva*, наши данные; 2 — *P. fulva* [9]; 3 — *P. fulva* [3]; 4 — *P. fulva* [2]; 5 — *P. putida* (типовой); 6 — *P. luteola* (типовой); 7 — *P. oryzihabitans* (типовой); 0 — не изучался; -/+ — отрицательный результат у большинства штаммов; ± — положительный результат у большинства штаммов.

Сведения о наличии оксидазы у *P. fulva* противоречивы: отмечается наличие оксидазы [11] или её отсутствие [2, 3]. По нашим данным, все 8 изученных штаммов продуцируют оксидазу слабой активности, которая выявляется любым реактивом. Большинство авторов отмечают отсутствие образования флуоресцеина бактериями *P. fulva* на среде King B [2, 3, 11]. Наши результаты подтверждают отсутствие продукции флуоресцеина всеми штаммами *P. fulva* на среде King B (bioMerieux) при 26°C и 35°C в течение 48 ч. Однако на синтетической среде King BS, разработанной нами [8], все штаммы *P. fulva* продуцировали флуоресцеин при 26°C, но не продуцировали при 35°C в течение 48 ч, что подтверждает правильность принадлежности *P. fulva* к группе флуоресцирующих псевдомонад, как было указано при описании этого вида [1].

Бактерии *P. fulva* можно отличить от *P. putida* по отсутствию утилизации гиппурата натрия, а также отсутствию утилизации L-лизина и L-лейцина в качестве единственного источника азота и углерода [9]. Тесты на аргининдигидролазу, нитратредуктазу, гидролиз эскулина, рост при 41°C позволяют отличить *P. fulva* от других видов псевдомонад, продуцирующих жёлтый пигмент — *P. luteola*, *P. oryzihabitans* (см. табл. 1).

Все 8 штаммов *P. fulva* нашей коллекции были выделены из клинического материала: 4 штамма из мочи беременных женщин в родильном доме, остальные — из мочи женщин и мужчин, являвшихся пациентами лечебных учреж-

дений г. Санкт-Петербурга. Концентрация *P. fulva* в моче составляла  $10^4$ — $10^7$  КОЕ/мл, что указывает на их этиологическую значимость. С 2010 г. известны только 4 сообщения о выделении *P. fulva* из клинического материала: 3 публикации по 1 штамму [2—4] и одно сообщение о выделении 15 штаммов [5]. Наши сведения свидетельствуют о более ранней циркуляции клинических штаммов *P. fulva* в период 1995—2005 гг. в России и подтверждают медицинскую значимость *P. fulva*.

Изучение чувствительности к антибиотикам показало (табл. 2), что все 8 клинических штаммов *P. fulva* имеют природную устойчивость к ампициллину, ингибиторозащищённым пенициллинам (ампициллин/сульбактам, ампициллин/клавуланат) и цефалоспорином I и II поколений (цефазолин, цефуроксим). Два штамма (№ 27, 31) имеют приобретённую устойчивость к цефалоспорином III поколения (цефотаксиму, цефтриаксону, цефеперазону/сульбактаму), однако чувствительны к цефтазидиму. Все штаммы сохранили чувствительность к цефепиму, карбапенемам (имипенему, меропенему), а также к азлоциллину, азтреонаму (кроме № 27), пиперациллину/газобактаму, колистину, аминогликозидам (амикацину, гентамицину, тобрамицину, нетилмицину), ципрофлоксацину, левофлоксацину, тетрациклину, тигециклину. Три штамма (№ 23, 27, 31) приобрели устойчивость к хлорамфениколу. Все штаммы резистентны к фосфомицину, рифампицину, эритромицину, нитрофурантоину, триметоприму/сульфаметоксазолу.

**Таблица 2. Чувствительность к антибиотикам клинических штаммов *P. fulva***

| Антибиотики                  | МПК, мг/л (группы SIR) |      |      |      |      |      |      |      |      |      |
|------------------------------|------------------------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|
|                              | 22*                    | 23*  | 24*  | 25*  | 26*  | 27*  | 30*  | 31*  | 1**  | 1*** |
| Ампициллин                   | 32R                    | 32R  | 32R  | 32R  | 32R  | 32R  | 32R  | 32R  |      |      |
| Ампициллин/сульбактам        | 32R                    | 32R  | 16R  | 32R  | 32R  | 32R  | 32R  | 32R  |      |      |
| Ампициллин/клавуланат        | 16I                    | 32R  | 8S   | 32R  | 32R  | 32R  | 32R  | 32R  |      |      |
| Цефазолин                    | 64R                    | 64R  | 64R  | 64R  | 64R  | 64R  | 64R  | 64R  |      |      |
| Цефуроксим                   | 64R                    | 64R  | 8R   | 64R  | 64R  | 64R  | 64R  | 64R  |      |      |
| Цефотаксим                   | 8S                     | 8S   | 1S   | 8S   | 16I  | 64R  | 1S   | 64R  |      | S    |
| Цефтазидим                   | 4S                     | 2S   | 1S   | 2S   | 2S   | 4S   | 1S   | 4S   | 32R  | S    |
| Цефтриаксон                  | 16I                    | 16I  | 2S   | 16I  | 16I  | 64R  | 16I  | 64R  |      |      |
| Цефоперазон/сульбактам       | 16S                    | 8S   | 8S   | 16S  | 16S  | 64R  | 16S  | 64R  |      |      |
| Цефепим                      | 1S                     | 1S   | 1S   | 1S   | 2S   | 2S   | 1S   | 2S   | 8S   | S    |
| Имипенем                     | 1S                     | 1S   | 2S   | 1S   | 2S   | 2S   | 1S   | 2S   | 32R  | S    |
| Меропенем                    | 1S                     | 2S   | 0,2S | 1S   | 2S   | 4S   | 1S   | 4S   | 32R  | S    |
| Амикацин                     | 2S                     | 2S   | 2S   | 2S   | 2S   | 2S   | 2S   | 2S   | 16S  | S    |
| Гентамицин                   | 1S                     | 1S   | 1S   | 1S   | 1S   | 1S   | 1S   | 1S   | 128R | S    |
| Тобрамицин                   | 1S                     | 1S   | 1S   | 1S   | 1S   | 1S   | 1S   | 1S   |      | S    |
| Нетилмицин                   | 1S                     | 1S   | 1S   | 1S   | 1S   | 1S   | 1S   | 1S   |      |      |
| Ципрофлоксацин               | 0,2S                   | 0,2S | 0,2S | 0,2S | 0,2S | 0,5S | 0,2S | 0,5S | 0,5S |      |
| Тетрациклин                  | 1S                     | 1S   | 1S   | 1S   | 1S   | 4S   | 2S   | 4S   |      |      |
| Тигециклин                   | 0,5S                   | 2S   | 1S   | 0,5S | 0,5S | 4I   | 2S   | 4I   |      |      |
| Хлорамфеникол                | 16I                    | 32R  | 8S   | 16I  | 16I  | 64R  | 16I  | 64R  |      | R    |
| Колистин                     | 0,5S                   | 0,5S | 0,5S | 0,5S | 0,5S | 0,5S | 0,5S | 0,5S | 1S   |      |
| Фосфомицин                   | 256R                   | 256R | 256R | 256R | 256R | 256R | 256R | 256R |      |      |
| Нитрофурантоин               | 512R                   | 64I  | 64I  | 512R | 64I  | 128R | 128R | 256R |      |      |
| Пиперациллин/тазобактам      | S                      | S    | S    | S    | S    | S    | S    | S    | 128R | S    |
| Азлоциллин                   | S                      | S    | S    | S    | S    | S    | S    | S    |      |      |
| Азтреонам                    | S                      | I    | S    | S    | I    | R    | I    | S    | 16I  | S    |
| Левифлоксацин                | S                      | S    | S    | S    | S    | S    | S    | S    |      | S    |
| Рифампицин                   | R                      | R    | R    | I    | I    | R    | R    | R    |      |      |
| Эритромицин                  | R                      | I    | R    | I    | R    | R    | R    | I    |      |      |
| Триметоприм/сульфаметоксазол | 160R                   | 80R  | 20S  | 320R | 160R | 320R | 80R  | 320R |      | R    |

**Примечание.** \* – номера штаммов *P. fulva* (наши данные); \*\* – штамм по [2]; \*\*\* – штамм по [3]; группы SIR: S – чувствительность, I – умеренно резистентный, R – резистентный.

Эти результаты свидетельствуют, что в течение 1995–2005 годов некоторые штаммы *P. fulva* приобрели устойчивость к цефалоспорином III поколения и хлорамфениколу. Профиль чувствительности к антибиотикам штамма № 27 (устойчивость к цефотаксиму, цефтриаксону, цефоперазону/сульбактаму, азтреонаму; чувствительность к цефтазидиму и пиперациллину/тазобактаму) характерен для бета-лактамазы расширенного спектра действия типа CTX-M.

Данные о чувствительности к антибиотикам штамма *P. fulva*, выделенного в Республике Корея [3], совпадают с данными по чувствительности большинства наших штаммов (табл. 2). Вызывает интерес сообщение [2] о выделении в Аргентине штамма *P. fulva*, резистентного к карбапенемам, что обусловлено продукцией металло-бета-лактамазы типа VIM-2 с локализацией гена *bla*<sub>VIM-2</sub> в интегрене (см. табл. 2). Там же в 2005 году были выделены два клинических штамма *P. putida* с металло-бета-лактамазой типа VIM-2 [12]. Имеется сообщение [13] о высокой частоте циркуляции в Республике Корея штаммов *P. putida*, устойчивым к карбапенемам (22%). Учитывая, что *P. fulva* часто ошибочно идентифицировали как *P. putida*, следует признать оба вида псевдомонад возможным резервуаром генов карбапенемаз в резистоме [14].

### Заключение

Таким образом, в рабочей коллекции культур псевдомонад, выделенных в Санкт-Петербурге в 1995–2005 гг., выявлены наиболее ранние изоляты клинических штаммов *P. fulva*, что подтверждает медицинскую значимость этого вида псевдомонад. Установлен высокий уровень идентификации всех штаммов *P. fulva* методом MALDI-TOF масс-спектрометрии с использованием прибора Microflex с базой данных MALDI Biotyper (Bruker Daltonics Inc.). Апробированы и предложены тесты традиционных исследований, позволяющие достоверно идентифицировать *P. fulva* без использования генетических методов, среди них: чувствительность к ионам бария; продукция водонерастворимого желтого пигмента колоний при 26°C и водорастворимого коричневого пигмента при 35°C; наличие оксидазы слабой активности; продукция флуоресцеина на синтетической среде King BS при 26°C; отсутствие утилизации гиппурата натрия, L-лизина, L-лейцина и др. Установлен профиль чувствительности к антибиотикам клинических штаммов *P. fulva*. У двух штаммов *P. fulva* выявлена приобретённая резистентность к цефалоспорином III поколения и хлорамфениколу.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Iizuka H., Komagata K. New species of *Pseudomonas* belonged to fluorescent group (studies on the microorganisms of cereal grains. Part V). J Agricul Che Soc Japan 1963; 37: 137–141.
2. Almuzara M.N., Vazquez M., Tanaka N., Turko M., Ramires M.S., Lopez E.L. et al. First case of human infection due to *Pseudomonas fulva*, an environmental bacterium isolated from cerebrospinal fluid. J Clin Microbiol 2010; 48: 2: 660–664.
3. Seok Y., Shin H., Lee Y., Cho I., Na S., Yong D. et al. First report of blood stream infection caused by *Pseudomonas fulva*. J Clin Microbiol 2010; 48: 7: 2656–2657.
4. Kok J., Thomas L.C., Olma T., Chen S.C.A., Iredell J.R. Identification of bacteria in blood culture broths using Matrix-Assisted Laser Desorption-Ionization sepsityper and Time of Flight Mass Spectrometry. PLOS One 2011; 6: 8: e23285.
5. Liu Yingmei, Liu Kun, Yu Xiaomin, Li Binbin, Cao Bin. Identification and control of *Pseudomonas* spp. (*P.fulva* and *P.putida*) bloodstream infection outbreak in a teaching hospital in Beijing, China. Int J Infect Dis 2014; 23: 105–108.
6. Sivolodskii E.P. Determination of the sensitivity of bacteria to barium ions, a taxonomic marker of the genus *Pseudomonas*. Microbiology 2012; 81 (1): 112–117.
7. Герхардт Ф., ред. Методы общей бактериологии. т. 3. М.: Мир; 1983.
8. Сиволодский Е.П. Синтетическая питательная среда King BS для определения синтеза флуоресцеина бактериями рода *Pseudomonas*. Клин лабор диагн 2012; 10: 60–62.
9. Sivolodskii E.P. Application of the profiles of amino acid utilization as the sole carbon and nitrogen sources for pseudomonad taxonomy. Microbiology 2009; 78: 6: 711–716.
10. Методические указания по определению чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препаратам. Методические указания МУК 4.12.1890-04. М.: 2004.
11. Uchino M., Shida O., Uchimura T., Komagata K. Recharacterization of *Pseudomonas fulva* Iizuka and Komagata 1963, and proposals of *Pseudomonas parafulva* sp. nov. and *Pseudomonas cremoricolorata* sp. nov. J Gen Appl Microbiol 2001; 47: 5: 247–261.
12. Almuzara M., Radice M., de Garate N., Kossman A., Cuirolo A., Santella G. et al. VIM-2 — producing *Pseudomonas putida*, Buenos Aires. Emer Infect Dis 2007; 13: 4: 668-669.
13. Seong Eun Kim, Seong -Hwan Park, Kyung-Hwa Park, Su-Hyun Kim, Sock-In Jung, Jong-Hee Shin et al. Nosocomial *Pseudomonas putida* bacteremia: high rates of carbapenem resistance and mortality. Chonnam Med J 2012; 48: 2: 91–95.
14. Виноградова К.А., Булгакова В.Г., Полин А.Н., Кожевин П.А. Устойчивость микроорганизмов к антибиотикам: резистомы, её объем, разнообразие и развитие. Антибиотики и химиотер 2013; 58: 5–6: 38–48.

# Антибиотико- и фагорезистентность клинических штаммов кишечной палочки у госпитализированных детей Санкт-Петербурга, больных эшерихиозами

Н. В. ГОНЧАР<sup>1,2</sup>, И. В. ПАРТИНА<sup>1</sup>, О. И. НЫРКОВА<sup>1,3</sup>, А. С. ДРАП<sup>1</sup>

<sup>1</sup> ФГБУ НИИ детских инфекций ФМБА России, Санкт-Петербург

<sup>2</sup> Северо-Западный государственный медицинский университет им. И. И. Мечникова, Санкт-Петербург

<sup>3</sup> Санкт-Петербургский государственный педиатрический медицинский университет

## Resistance of Clinical Strains of Pathogenic *E.coli* to Antibiotics and Bacteriophage in Hospitalized Children with Escherichiosis in St. Petersburg

N. V. GONCHAR, I. V. PARTINA, O. I. NYRKOVA, A. S. DRAP

Research Institute Children of Infections, St.Petersburg

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

St.Petersburg State Pediatric Medical University, St.Petersburg

Представлены данные о частоте резистентности к антибактериальным препаратам и специфическому колипротейному бактериофагу изолятов диареегенных эшерихий трёх групп: энтеропатогенных (ЭПЭ), энтеротоксигенных (ЭТЭ) и энтероинвазивных (ЭИЭ), выделенных у госпитализированных детей Санкт-Петербурга в 2011—2013 гг. Показано, что средние показатели антибиотикоустойчивости возбудителей эшерихиозов у детей в возрасте от 1 месяца до 18 лет были максимальными у изолятов ЭИЭ и убывали в ряду: ЭИЭ (15,2%), ЭПЭ (6,0%), ЭТЭ (3,3%). У клинических штаммов ЭИЭ не было отмечено резистентности к цефалоспорином III—IV поколения (цефуроксиму, цефепиму) и нитрофуранам. Изоляты трёх изученных групп эшерихий характеризовались высокой степенью резистентности к специфическому бактериофагу, убывающей в ряду: ЭТЭ (44,8%), ЭИЭ (37,0%) и ЭПЭ (28,8%). Множественная устойчивость диареегенных эшерихий исследованных групп к антибактериальным препаратам в среднем составила 2,8%. Максимальная частота резистентности изолятов исследованных групп *E.coli* установлена к налидиксовой кислоте: у ЭИЭ — 28,6%, ЭПЭ — 26,3%, ЭТЭ — 9,1%. Результаты исследований могут быть полезны при определении лечебной тактики при диареегенных эшерихиозах у детей.

**Ключевые слова:** дети, энтеропатогенные эшерихии, энтеротоксигенные эшерихии, энтероинвазивные эшерихии, антибиотикорезистентность, фагорезистентность, колипротейный бактериофаг.

The data on the resistance frequency of the diarrheagenic *E.coli* isolates to antibacterial agents and a specific bacteriophage are presented. The strains were isolated from hospitalized children in St.Petersburg in 2011—2013 and belonged to three groups, i.e. enteropathogenic (EPE), enterotoxigenic (ETE) and enteroinvasive (EIE). It was shown that in the children aged from 1 month to 18 years the average antibiotic resistance was maximum in the EIE isolates and decreased in the following order: EIE (15.2%), EPE (6.0%), ETE (3.3%). The clinical EIE isolates showed no resistance to the new generation cephalosporins (cefuroxime, cephepime) and nitrofurans. The *E.coli* isolates of the three groups were characterized by high resistance to a specific bacteriophage which decreased in the following order: ETE (44.8%), EIE (37.0%), EPE (28.8%). The multiple resistance of the diarrheagenic *E.coli* isolates of the three groups to the antibacterials averaged 2.8%. The maximum frequency of resistance of the clinical isolates of the three groups to nalidixic acid was observed: EIE — 28.6%, EPE — 26.3%, ETE — 9.1%. The results of the study may be useful in the tactics of therapy of diarrheagenic *E.coli* infection in children.

**Key words:** children, enteropathogenic *Escherichia*, enterotoxigenic *Escherichia*, enteroinvasive *Escherichia*, resistance, antibiotics, bacteriophage.

## Введение

Заболевания человека, вызванные *Escherichia coli*, называют эшерихиозами [1]. Эшерихиозы широко распространены во всех странах мира и не утрачивают своих лидирующих позиций в эти-

ологической структуре острых кишечных инфекций (ОКИ) у детей. Энтеропатогенный эшерихиоз (A04.0 по МКБ-10) наиболее часто поражает детей раннего возраста, особенно в 3—12 месяцев. Энтеротоксигенный эшерихиоз (A04.1) встречается повсеместно, это заболевание называют «диареей путешественников». Энтероинвазивный эшерихиоз (A04.2) — ОКИ детей старше 3 лет и взрослых. Энтерогеморрагическим эшерихи-

© Коллектив авторов, 2014

Адрес для корреспонденции: E-mail: nvgonchar@yandex.ru



хиозом (A04.3) чаще болеют дети дошкольного возраста [2].

Среди детей, госпитализированных в стационары Москвы с диагнозом ОКИ, частота диагностики эшерихиозов составляет 15,1% (моноинфекция — 4,8%, сочетанная — 10,3%). В этиологической структуре эшерихиозной моноинфекции энтеропатогенная кишечная палочка составляет 52,6%, энтероагрегативная — 39,5%, энтерогеморрагическая — 5,3% и энтеротоксигенная — 2,6%. Микстинфекция в 70,4% случаев обусловлена ассоциацией эшерихий с вирусами (чаще с ротавирусами), в 17,3% — ассоциацией эшерихий с бактериями и в 12,3% случаев — сочетанием эшерихий с патогенными вирусами и бактериями [3].

Следует отметить, что в последние годы дифференцировать группы диареегенных эшерихий классическими микробиологическими методами достаточно трудно. Наиболее распространённым рутинным методом верификации групп диареегенных эшерихий является определение их серогруппы/серотипа с последующим косвенным определением принадлежности изолята к одной из известных групп. Прямые методы обнаружения специфических факторов вирулентности, осуществляемые с помощью биопроб, методов определения специфических токсинов, выявления способности адгезии к культурам клеток, а также детекции генов вирулентности методом ПЦР применяются редко. Серологические исследования в диагностике эшерихиозов имеют вспомогательное значение [4]. Диагностика энтероагрегативных и диффузно-прикрепляющихся эшерихий в Российской Федерации применяется ограниченно. Кроме того, существуют сложности трактовки выявления патогенных эшерихий, учитывая возможность «здорового» носительства. При этом обнаружение энтероагрегативных и энтеропатогенных эшерихий у детей первого полугодия жизни принято расценивать как клинически значимое.

В настоящее время главной в ряду лечебных мероприятий в отношении больных ОКИ любой этиологии является патогенетическая терапия, в основе которой диетотерапия, оральная дегидратация, инфузионная детоксикация, сорбенты, пробиотические и пребиотические средства, препараты пищеварительных ферментов. По показаниям в лечении лёгких и среднетяжёлых форм эшерихиозов используют бактериофаги (колипротейный бактериофаг, интестифаг) и комплексный иммуноглобулиновый препарат кипферон. Антимикробная терапия используется в лечении среднетяжёлых и тяжёлых форм эшерихиозов, обусловленных энтероинвазивными *E.coli*, и не показана больным с водянистыми диареями, вызванными энтеропатогенными, энте-

ротоксигенными, энтероагрегативными кишечными палочками, а также при эшерихиозе, вызванном энтерогеморрагическими *E.coli*. Антибактериальные препараты (АБП) применяют у лиц с отягощённым преморбидным фоном, в том числе у детей первых месяцев жизни, при микстинфекциях, угрозе генерализации инфекционного процесса [4].

Различные серовары *E.coli* проявляют достаточно высокую устойчивость к АБП. При этом антибиотикорезистентностью обладают как клинические штаммы, выделенные при различных поражениях, так и изоляты, полученные от здоровых лиц [1]. К началу XXI века ситуация с антибиотикорезистентностью *E.coli* обострилась [5, 6].

Исследования последних лет, посвящённые оценке клинической эффективности использования антибактериальных препаратов в терапии эшерихиозов у детей, показывают, что нифуроксазид и налидиксовая кислота имеют преимущества по сравнению с аминогликозидами и цефалоспоридами III поколения [3].

Бактериофаготерапия в современных условиях растущей антибиотикорезистентности инфекционных агентов [7] относится к альтернативным методам антимикробного воздействия и успешно используется у детей раннего возраста [8].

Целью работы явилось изучение устойчивости клинических штаммов *E.coli* у госпитализированных детей Санкт-Петербурга, больных эшерихиозами, к антибактериальным препаратам и специфическому колипротейному бактериофагу.

## Материал и методы

Проведён анализ результатов бактериологического исследования 218 клинических штаммов эшерихий, выделенных из фекалий детей в возрасте от 1 месяца до 18 лет, получавших стационарное лечение в ФГБУ НИИДИ ФМБА России в 2011—2013 гг. по поводу острых кишечных инфекций эшерихиозной этиологии. В анализ были включены изоляты, которые по морфологическим и культуральным свойствам соответствовали энтеропатогенной (ЭПЭ), энтеротоксигенной (ЭТЭ) и энтероинвазивной (ЭИЭ) группам эшерихий. Исследование чувствительности эшерихий к АБП проводили на агаре Мюллера-Хитон дискондиффузионным методом с использованием стандартных дисков и АТСС штаммов. Выделенные штаммы относили к одной из трёх категорий чувствительности: «чувствительные», «умеренно чувствительные» и «резистентные». Тестировали 16 АБП следующих групп: пенициллины широкого спектра действия (ампициллин), аминогликозиды (нетилмицин, амикацин, гентамицин, канамицин); цефалоспорины II поколения (цефуроксим), III поколения (цефотаксим, цефтазидим), IV поколения (цефепим); нитрофураны (фурадонин), сульфаниламиды (ко-тримоксазол), карбапенемы (меропенем, имипенем), фторхинолоны (ципрофлоксацин), хлорамфеникол (левомицетин), налидиксовая кислота.

Литическую активность специфического колипротейного бактериофага (КП БФ) к изолятам эшерихий ( $n=122$ ) оценивали стандартным методом, выделяя выраженную, умеренную, низкую чувствительность и её отсутствие.

**Таблица 1. Результаты оценки чувствительности клинических штаммов ЭПЭ к тестируемым антибактериальным препаратам**

| Антибактериальные препараты | Распределение штаммов по категориям чувствительности, абс. ч. (%) |            |           |
|-----------------------------|---|------------|-----------|
|                             | R   | S          | I         |
| Ампициллин (n=28)           | 7 (25,0)  | 21 (75,0)  | 0         |
| Амикацин (n=71)             | 0   | 65 (91,5)  | 6 (8,5)   |
| Ципрофлоксацин (n=94)       | 5 (5,3)   | 84 (89,4)  | 5 (5,3)   |
| Левомецетин (n=39)          | 3 (7,7)   | 34 (87,2)  | 2 (5,1)   |
| Гентамицин (n=64)           | 5 (7,8)   | 58 (90,6)  | 1 (1,6)   |
| Налидиксовая кислота (n=19) | 5 (26,3)  | 13 (68,4)  | 1 (5,3)   |
| Цефотаксим (n=106)          | 15 (14,2)   | 80 (75,5)  | 11 (10,3) |
| Цефуросим (n=27)            | 4 (14,8)  | 22 (81,5)  | 1 (3,7)   |
| Канамицин (n=8)             | 1 (12,5)  | 6 (75,0)   | 1 (12,5)  |
| Цефтазидим (n=29)           | 3 (10,3)  | 25 (86,2)  | 1 (3,5)   |
| Фурадонин (n=39)            | 0   | 35 (89,7)  | 4 (10,3)  |
| Нетилмицин (n=8)            | 0   | 8 (100,0)  | 0         |
| Цефепим (n=42)              | 1 (2,4)   | 39 (92,9)  | 2 (4,7)   |
| Имипенем (n=44)             | 0   | 43 (97,7)  | 1 (2,3)   |
| Меропенем (n=16)            | 0   | 16 (100,0) | 0         |
| Ко-тримоксазол (n=23)       | 1 (4,3)   | 22 (95,7)  | 0         |

### Результаты исследований

Среди исследованных изолятов ЭПЭ представляли большинство (n=118; 54,1%). Выделено 11 сероваров ЭПЭ, указанных ниже в порядке убывания по частоте: O18ac (33,9%); O111 (21,2%); O44 (10,2%); O142 (9,3%); O126 (6,8%); O86 (4,2%); O127 (4,2%); O26 (3,4%); O125 (3,4%); O55 (1,7%); O128 (1,7%).

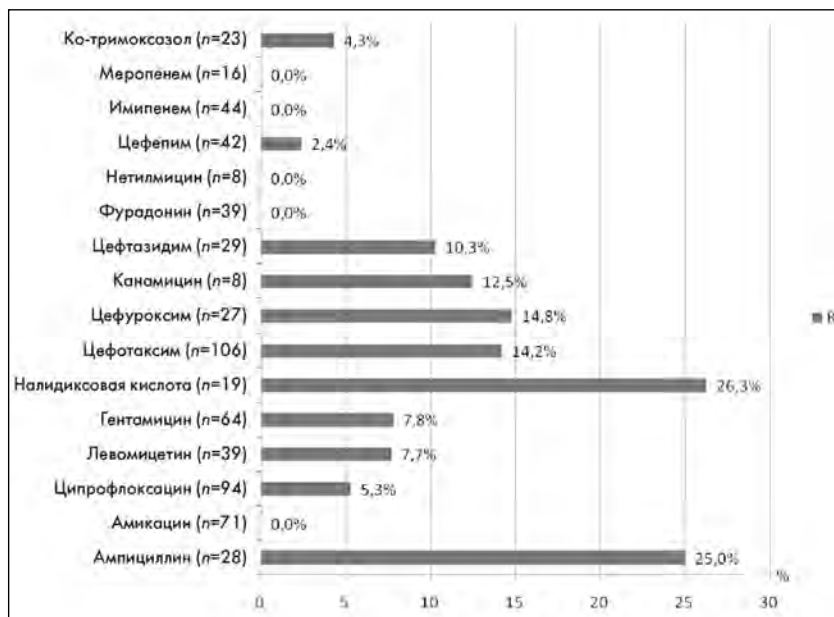
Результаты оценки чувствительности ЭПЭ к АБП представлены в табл. 1. Выраженная чувствительность ЭПЭ (более 95%) была отмечена к нетилмицину (100% штаммов), меропенему (100%), имипенему (97,7%) и ко-тримоксазолу (95,7%).

Сравнение частоты резистентности ЭПЭ к АБП (рис. 1) показало, что она была максимальной к налидиксовой кислоте — у 26,3% штаммов и ампициллину — 25%. Реже отмечалась резистентность к цефуросиму (14,8%), цефотаксиму (14,2%), канамицину (12,5%) и цефтазидиму (10,3%). Наименьшее количество резистентных ЭПЭ отмечено к гентамицину (7,8%), левомецетину (7,7%), ципрофлоксацину (5,3%), ко-тримоксазолу (4,3%) и цефепиму (2,4%). Не было выделено ЭПЭ, резистентных к 6 тестируемым АБП: к 2 из группы карбапенемов (меропенему, имипенему), к 2 из группы аминогликозидов (нетилмицину и амикацину), нитрофуранам (фурадонину). Устойчивость к трём тестируемым АБП была выявлена у 3 (2,5%) изолятов ЭПЭ.

ЭТЭ занимали второе место по частоте обнаружения (n=62; 28,5%). Выделено 6 сероваров ЭТЭ, указанных в порядке убывания по частоте выявления: O75 (54,5%); O25 (19,7%); O6 (10,6%); O20 (10,6%); O15 (3,0%); O115 (1,5%).

Результаты оценки чувствительности ЭТЭ к АБП представлены в табл. 2. Выраженная чувствительность ЭТЭ (более 95%) была отмечена к меропенему (100%), амикацину (97,1%), имипенему (96,9%), цефтазидиму (96,7%).

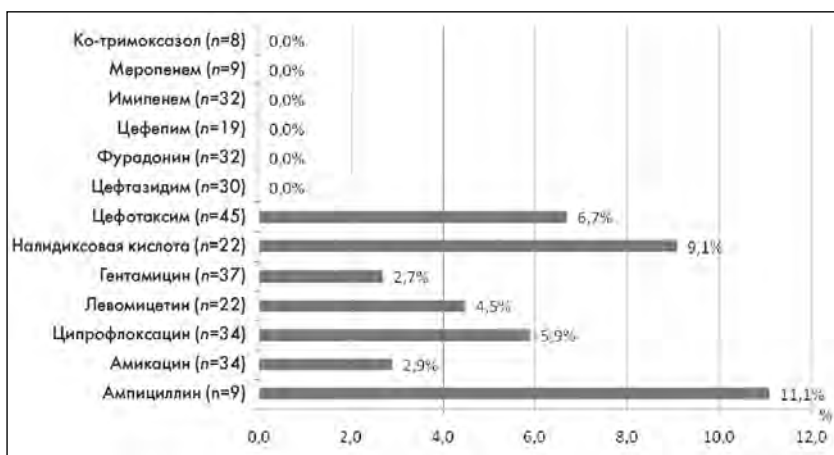
Частота резистентности к большинству АБП у ЭТЭ была несколько ниже, чем у ЭПЭ (рис. 2): к ампициллину в 11,1% случаев (p>0,05), к налидиксовой кислоте в 9,1% (p>0,05), к цефотаксиму в 6,7% (p>0,05), к левомецетину в 4,5% (p>0,05), к



**Рис. 1. Частота выделения антибиотикорезистентных изолятов эшерихиозами от детей, больных эшерихиозами.**

**Таблица 2. Результаты оценки чувствительности клинических штаммов ЭТЭ к тестируемым антибактериальным препаратам**

| Антибактериальные препараты | Распределение штаммов по категориям чувствительности, абс. ч. (%) |            |          |
|-----------------------------|---|------------|----------|
|                             | R   | S          | I        |
| Ампициллин (n=9)            | 1 (11,1)  | 8 (88,9)   | 0        |
| Амикацин (n=34)             | 1 (2,9)   | 33 (97,1)  | 0        |
| Ципрофлоксацин (n=34)       | 2 (5,9)   | 31 (91,2)  | 1 (2,9)  |
| Левомецетин (n=22)          | 1 (4,5)   | 20 (90,9)  | 1 (4,5)  |
| Гентамицин (n=37)           | 1 (2,7)   | 35 (94,6)  | 1 (2,7)  |
| Налидиксовая кислота (n=22) | 2 (9,1)   | 20 (90,9)  | 0        |
| Цефотаксим (n=45)           | 3 (6,7)   | 34 (75,6)  | 8 (17,7) |
| Цефтазидим (n=30)           | 0   | 29 (96,7)  | 1 (3,3)  |
| Фурадонин (n=32)            | 0   | 32 (100,0) | 0        |
| Цефепим (n=19)              | 0   | 17 (89,5)  | 2 (10,5) |
| Имипенем (n=32)             | 0   | 31 (96,9)  | 1 (3,1)  |
| Меропенем (n=9)             | 0   | 9 (100,00) | 0        |

**Рис. 2. Частота выделения антибиотикорезистентных изолятов энтерококковых кишечных палочек (в %) от детей, больных эшерихиозами.**

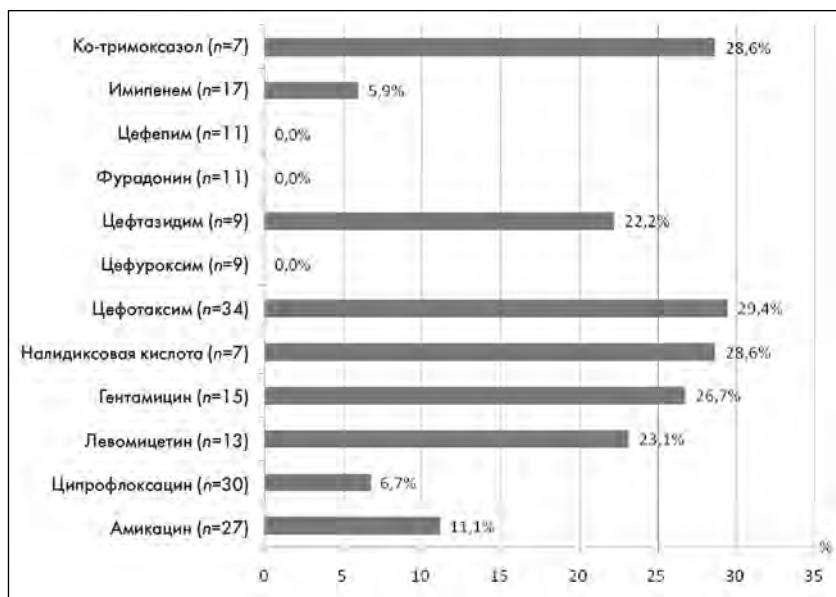
гентамицину в 2,7% случаев ( $p>0,05$ ). У изолятов ЭТЭ не отмечено резистентности к 6 тестируемым АБП: у 2 из группы карбапенемов (меропенему и имипенему), у 2 из группы цефалоспоринов (цефепиму и цефтазидиму), сульфаниламидам (ко-тримоксазолу), нитрофуранам (фурадонину). Резистентность к трём тестируемым АБП была выявлена у 2 (3,2%) изолятов ЭТЭ.

ЭИЭ занимали третье место по частоте выделения ( $n=38$ ; 17,4%). Выделено 8 сероваров ЭИЭ, указанных в порядке убывания по частоте обнаружения: O144 (34,2%); O143 (26,3%); O124 (18,4%); O28 (7,9%); O142 (5,3%); O32 (2,6%); O151 (2,6%); O164 (2,6%).

Частота резистентности к АБП у ЭИЭ (рис. 3, табл. 3) была несколько выше, чем у ЭПЭ: к цефотаксиму — в 29,4% случаев ( $p>0,05$ ); к ко-тримоксазолу — в 28,6% ( $p>0,05$ ); к гентамицину — в 26,7% ( $p>0,05$ ); к левомецетину — в 23,1% ( $p>0,05$ ); к цефтазидиму — в 22,2% ( $p>0,05$ ); к амикацину — в 11,1% ( $p>0,05$ ); к ципрофлоксацину — в 6,7% ( $p>0,05$ ); к имипенему — в 5,9% ( $p>0,05$ ). Не выделено ЭИЭ, резистентных к 3 тестируемым АБП: к 2 препаратам из группы цефалоспоринов (цефуросиму, цефепиму) и нитрофуранам (фурадонину). Множественная устойчивость (к трём тестируемым АБП) была установлена у 1 (2,6%) изолята ЭИЭ.

**Таблица 3. Результаты оценки чувствительности клинических штаммов ЭИЭ к тестируемым антибактериальным препаратам**

| Антибактериальные препараты | Распределение штаммов по категориям чувствительности клинических, абс. ч. (%) |            |          |
|-----------------------------|---|------------|----------|
|                             | R   | S          | I        |
| Амикацин (n=27)             | 3 (11,1)  | 24 (88,9)  | 0        |
| Ципрофлоксацин (n=30)       | 2 (6,7)   | 27 (90)    | 1 (3,3)  |
| Левомецетин (n=13)          | 3 (23,1)  | 8 (61,5)   | 2 (15,4) |
| Гентамицин (n=15)           | 4 (26,7)  | 8 (53,3)   | 3 (20)   |
| Налидиксовая кислота (n=7)  | 2 (28,6)  | 5 (71,4)   | 0        |
| Цефотаксим (n=34)           | 10 (29,4)   | 18 (52,9)  | 6 (17,7) |
| Цефуросим (n=9)             | 0   | 8 (88,9)   | 1 (11,1) |
| Цефтазидим (n=9)            | 2 (22,2)  | 7 (77,8)   | 0        |
| Фурадонин (n=11)            | 0   | 10 (90,9)  | 1 (9,1)  |
| Цефепим (n=11)              | 0   | 11 (100,0) | 0        |
| Имипенем (n=17)             | 1 (5,9)   | 9 (52,9)   | 7 (41,2) |
| Ко-тримоксазол (n=7)        | 2 (28,6)  | 5 (71,4)   | 0        |



**Рис. 3.** Частота выделения антибиотикорезистентных изолятов энтероинвазивных кишечных палочек (в %), выделенных от детей, больных эшерихиозами.

Изучение чувствительности клинических штаммов *E.coli* к специфическому бактериофагу показало, что показатель суммарной частоты низкой чувствительности и отсутствия чувствительности не отличался в изучаемых группах: для ЭПЭ он составил 53,0%, ЭТЭ — 51,8%, ЭИЭ — 52% (табл. 4). Отсутствие чувствительности ЭПЭ к КП БФ установлено в 28,8% случаев. Частота абсолютной резистентности к КП БФ у ЭТЭ была выше, чем у ЭПЭ — 44,8% против 28,8% ( $p>0,05$ ). Частота устойчивости ЭИЭ к КП БФ была выше, чем у ЭПЭ — 37,0% против 28,8% ( $p>0,05$ ), но ниже, чем у ЭТЭ — 37,0% против 44,8% ( $p>0,05$ ).

### Обсуждение результатов

При среднетяжёлых и тяжёлых формах ЭИЭ на старте лечения рекомендуется использование нитрофурановых препаратов (энтерофурил, эрсефурил), препаратов налидиксовой кислоты (неграм, невиврамон), нифурантела (макмирор), триметоприма/сульфаметоксазола (бактрим, бисептол), защищённых пенициллинов (аугментин), аминогликозидов (гентамицина), цефалоспоринов (цефиксима), макролидов (азитромицина). При тя-

жёлых формах ЭТЭ показана эффективность фторхинолонов, нитрофуранов, доксициклина. При назначении АБП для лечения больных ЭПЭ чаще используют аминогликозиды или цефалоспорины последних генераций с последующим переходом (на фоне положительного эффекта) на нитрофураны, триметоприм/сульфаметоксазол [4].

Назначение по показаниям и рациональное использование АБП для лечения больных ОКИ эшерихиозной этиологии предусматривает осведомлённость врача о лекарственной устойчивости штаммов возбудителя, циркулирующих в регионе.

Проведённые исследования показали высокую устойчивость клинических штаммов ЭИЭ к налидиксовой кислоте (28,6%), ко-тримоксазолу (28,6%), гентамицину (26,7%), цефалоспорином III поколения — цефотаксиму (29,4%), цефтазидиму (22,2%) и, напротив, отсутствие устойчивости к фурадонину, цефуросиму и цефепиму, что отчасти не соответствует данным других авторов [3, 9]. Изоляты ЭИЭ проявляли самую высокую устойчивость к АБП.

Исследование антибиотикорезистентности *in vitro* у клинических штаммов ЭТЭ выявили наличие её к ципрофлоксацину (5,9%) и отсутствие к фурадонину (0%). Резистентность изолятов ЭПЭ к аминогликозидам новых генераций (амикацину и нетилмицину) отсутствовала и широко варьировала к цефалоспорином последних поколений (от 14,5% к цефуросиму до 4,2% к цефепиму).

Множественная устойчивость диареогенных эшерихий исследованных групп к АБП в среднем составила 2,8%, что совпадает с общеевропейскими данными [10]. Максимальная частота резистентности изолятов исследованных групп *E.coli* установлена к налидиксовой кислоте: у ЭИЭ — 28,6%, ЭПЭ — 26,3%, ЭТЭ — 9,1%.

Результаты исследования *in vitro* чувствительности клинических штаммов исследованных групп *E.coli* к специфическому бактериофа-

**Таблица 4.** Результаты оценки чувствительности клинических штаммов эшерихий к специфическому колипротейному бактериофагу

| Группы выделенных эшерихий | Чувствительность клинических штаммов эшерихий к колипротейному бактериофагу, абс. (%) |           |           |            | Всего, абс. (%) |
|----------------------------|---|-----------|-----------|------------|-----------------|
|                            | отсутствие  | низкая    | умеренная | выраженная |                 |
| ЭПЭ                        | 19 (28,8)   | 16 (24,2) | 8/12,1%   | 23 (34,9)  | 66 (100)        |
| ЭТЭ                        | 10 (37,0)   | 4 (14,8)  | 1/3,7%    | 12 (44,4)  | 27 (100)        |
| ЭИЭ                        | 13 (44,8)   | 5 (17,2)  | 4 (13,8)  | 7 (24,2)   | 29 (100)        |
| Итого                      | 42 (34,4)   | 25 (20,5) | 13 (10,7) | 42 (34,4)  | 122 (100)       |

гу показали высокий средний уровень суммарной частоты низкой чувствительности и её отсутствия — 52,3%.

### Заключение

Проведённые исследования показали, что антибиотикоустойчивость возбудителей эшерихиозов у детей в возрасте от 1 месяца до 18 лет в 2011—2013 гг. в Санкт-Петербурге была максимальной у изолятов ЭИЭ и убывала в ряду: ЭИЭ (15,2%), ЭПЭ (6,0%), ЭТЭ (3,3%). У клинических

штаммов ЭИЭ не было отмечено резистентности к цефалоспорином новым генераций (цефуроксиму, цефепиму) и нитрофуранам.

Изоляты трёх изученных групп эшерихий характеризовались высокой степенью резистентности к специфическому бактериофагу, которая убывала в ряду: ЭТЭ (44,8%), ЭИЭ (37,0%), ЭПЭ (28,8%).

Результаты проведённых исследований могут быть полезны при определении лечебной тактики при диареогенных эшерихиозах у детей.

### ЛИТЕРАТУРА

1. Поздеев О.К., Федоров Р.В. Энтеробактерии: руководство для врачей. М.: ГЕОТАР-Медиа, 2007; 720.
2. Учайкин В.Ф., Нисевич Н.И., Шамиева О.В. Инфекционные болезни и вакцинопрофилактика у детей: учебник. М.: ГЕОТАР-Медиа, 2007; 688.
3. Бондарева А.В. Клинико-эпидемиологические особенности и терапия эшерихиозов у детей на современном этапе. Автореф. дисс. к.м.н.: Москва, 2013; 23.
4. Бехтерева М.К. Эшерихиозы. В кн.: Справочник по инфекционным болезням у детей / Под ред. Ю.В. Лобзина. СПб.: СпецЛит, 2013; 559—566.
5. Gupta K. Addressing antibiotic resistance. *Dis Mon* 2003; 49: 99—110.
6. Bettelheim K.A. Antibiotic resistance among verocytotoxigenic *Escherichia coli* (VTEC) and non-VTEC isolated from domestic animals and humans. *J Med Microbiol* 2003; 52: 155—162.
7. Van Duijn P.J., Dautzenberg M.J., Oostdijk E.A. Recent trends in antibiotic resistance in European ICUs. *Curr Opin Crit Care* 2011; 17: 658—665.
8. Зоркин С.Н., Шахновский Д.С. Педиатрическая фармакология. 2013; 10: 4: 132—138.
9. Hopkins K.L., Davies R.H., Threlfall E.J. Mechanisms of quinolone resistance in *Escherichia coli* and *Salmonella*: recent developments. *Int J Antimicrob Agents* 2005; 25: 358—373.
10. European Centre for Disease Prevention and Control. Antimicrobial Resistance Surveillance in Europe 2011; Annual Report of the European Antimicrobial Resistance Surveillance Network: Stockholm, Sweden, 2012.

**СКРИНИНГ С ПОМОЩЬЮ ОБРАЗОВАНИЯ КОМПЛЕКСОВ С МЕДЬЮ ВЫЯВЛЯЕТ СОЕДИНЕНИЯ С СИЛЬНЫМИ АНТИБИОТИЧЕСКИМИ СВОЙСТВАМИ В ОТНОШЕНИИ МЕТИЦИЛЛИНОУСТОЙЧИВОГО *STAPHYLOCOCCUS AUREUS*.**

**COPPER COMPLEXATION SCREEN REVEALS COMPOUNDS WITH POTENT ANTIBIOTIC PROPERTIES AGAINST METHICILLIN-RESISTANT *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* / M. HAEILI, C. MOORE, C. J. C. DAVIS, J. B. COCHRAN, S. SHAN, T. B. SHRESTHA, Y. ZHANG, S. H. BOSSMANN, W. H. BENJAMIN, O. KUTSCH\*, F. WOLSCHEENDORF // *ANTIMICROBIAL AGENTS CHEMOTHERAPY* 2014; 58: 7: 3727–3736.**

Антибактериальные свойства макрофагов, выражающиеся в уничтожении чужеродных бактерий, обусловлены ионами меди. Но, несмотря на важность ионов меди в инициации иммунных функций, скоординированных попыток использования ионов меди в терапии бактериальных инфекций пока нет. Предложена новая высокопродуктивная поисковая база, специально разработанная для поиска и характеристики соединений с антибактериальными свойствами в отношении метициллиноустойчивого *Staphylococcus aureus* (MRSA), зависящими от наличия ионов меди. В работе детализирован механизм сильного целенаправленного антибактериального действия одного из идентифицированных соединений, глиоксальбис-N4-метилтиосемикарбазон, GTSM, в отношении MRSA. Полученные данные показывают, что активность комплекса GTSM-медь выходит за пределы общего представления об антибактериальном действии аккумулярованных ионов меди и, в противоположность распространённому мнению, комплексы меди могут сами проявлять специфическую активность по отношению к виду и мишени. На основании экспериментальных данных авторы полагают, что ионы меди вызывают структурные изменения, связываясь лигандой с неактивным GTSM и перенося антибактериальные свойства на хелатное соединение. GTSM в свою очередь определяет специфическую мишень и использует чувствительный к окислительно-восстановительному потенциалу механизм, благодаря которому ионы меди оказываются у мишени или в непосредственной близости от неё. Согласно предложенной доказательной концепции поиска, активация меди нередкое явление и широко распространена среди известных лекарственных средств. Итак, активированные медью соединения могут представлять новый класс анти-MRSA препаратов и расширять зависимые от меди природные иммунные функции хозяина. И, наконец, предложен подробный план поисковой работы, исследующей антибактериальные свойства ионов меди на границе раздела хозяин-патоген.

\* Department of Medicine, Division of Infectious Diseases, University of Alabama at Birmingham, Birmingham, Alabama, USA.

**ART-175 — ВЫСОКОЭФФЕКТИВНОЕ АНТИБАКТЕРИАЛЬНОЕ СРЕДСТВО В ОТНОШЕНИИ МУЛЬТИРЕЗИСТЕНТНЫХ И ПЕРСИСТИРУЮЩИХ ШТАММОВ *PSEUDOMONAS AERUGINOSA*.**

**ART-175 IS A HIGHLY EFFICIENT ANTIBACTERIAL AGAINST MULTIDRUG-RESISTANT STRAINS AND PERSISTS OF *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* / Y. BRIERS, M. WALMAGH, B. GRYMONPREZ, M. BIEBL, J.-P. PIRNAY, V. DEFRAINE, J. MICHIELS, W. CENENS, A. AERTSEN, S. MILLER, R. LAVIGNE\* // *ANTIMICROBIAL AGENTS CHEMOTHERAPY* JULY 2014; 58: 7: 3774–3784.**

Артилизины представляют новый класс антибактериальных соединений с ферментативным механизмом действия, ковалентно связывающих бактериофаговый эндолизин, который разрушает пептидогликан, с пептидом-мишенью, транспортирующим эндолизин через наружную мембрану грамотрицательных бактерий. Art-085 и его оптимизированный гомолог с повышенной термостабильностью Art-175 состоят из овечьего миелоидного пептида, содержащего 29 аминокислотных остатков (SMAP-29) и соединённого с KZ144 эндолизином. В отличие от KZ144 Art-085 и Art-175 проникают через наружную мембрану и быстро и эффективно (5 log единиц) убивают клетки *Pseudomonas aeruginosa*, в т. ч. мультирезистентных штаммов. Микроскопия (с замедленной съёмкой) подтвердила, что Art-175 пробивает пептидогликановый слой в течение 1 мин., индуцируя выпячивание мембраны и полный лизис. Art-175 высокорезистентен к действию спонтанно развивающихся устойчивых мутантов. Более того, устойчивость к 21 применяемому на практике антибиотику, в основе которой лежат различные механизмы, не сопровождалась перекрёстной устойчивостью к Art-175. Поскольку для проявления активности Art-175 не требуются условия для активного метаболизма микроорганизма, он оказывает сильное бактерицидное действие на персистирующую форму *P.aeruginosa* (более 4 log по сравнению с необработанным контролем). Таким образом, Art-175 является принципиально новым антибактериальным средством с широкой областью приложения в гигиене, ветеринарии и медицине и уникальными возможностями в отношении персистирующих хронических инфекций.

\*Laboratory of Gene Technology, Department Biosystems, KU Leuven, Heverlee, Belgium.

**НОВЫЕ АМФИФИЛЬНЫЕ НЕАМИНОВЫЕ ПРОИЗВОДНЫЕ, АКТИВНЫЕ В ОТНОШЕНИИ УСТОЙЧИВОЙ *PSEUDOMONAS AERUGINOSA*, И ИХ ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ С ЛИПОПОЛИСАХАРИДАМИ.**

**NEW AMPHIPHILIC NEAMINE DERIVATIVES ACTIVE AGAINST RESISTANT *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* AND THEIR INTERACTIONS WITH LIPOPOLYSACCHARIDES / G. SAUTREY, L. ZIMMERMANN, M. DELEU, A. DELBAR, L. S. MACHADO, K. JEANNOT, F. VAN BAMBEKE, J. M. BUYCK, J.-L. DECOUT, M.-P. MINGEOT-LECLERCQ\* // ANTIMICROBIAL AGENTS CHEMOTHERAPY AUGUST 2014; 58: 8: 4420—4430.**

Разработка новых антимикробных препаратов необходима для преодоления широко распространённого появления бактерий с мультилекарственной устойчивостью, например устойчивой к колистину *Pseudomonas aeruginosa*. Ранее была синтезирована серия амфифильных неаминовых производных, активно действующих на бактериальные мембраны, среди которых наивысшей активностью и наименьшей цитотоксичностью обладали 3',6-ди-*O*-[(2"-нафтил)пропил]неамин (3',6-di2NP), 3',6-ди-*O*-[(2"-нафтил)бутил]неамин (3',6-di2NB) и 3',6-ди-*O*-нонилнеамин (3',6-diNn). Далее были охарактеризованы активность этих соединений в отношении колистиноустойчивых штаммов *P.aeruginosa* и механизм действия, особенно их способность взаимодействовать с липополисахаридом (ЛПС) и изменять наружную бактериальную мембрану (НБМ). Все три амфифильных неаминовых производных были активны в отношении клинических колистиноустойчивых штаммов (МПК 2—8 мкг/мл). Самое активное соединение (3',6-diNn) оказывало бактерицидное действие при значении концентрации, равной МПК, а при 2МПК — подавляло образование биоплёнки. Они связывались с ЛПС, повышая проницаемость наружной мембраны. Создание длинных и линейных алкильных цепей (нонил) оптимизировало связывание с ЛПС и проницаемость наружной мембраны. Действие амфифильных неаминовых производных на мицеллы ЛПС предположительно состоит в изменении перекрёстных связей липополисахаридов и разрушении гидрофобного ядра мицелл. Форма молекулы 3',6-диалкил неаминовых производных обусловлена природой гибридных гидрофобных частей (нафтилалкил вместо алкил) и подвижностью гидрофобной части и является решающей в разжижающем эффекте и способности замещать катионы мостиковых связей ЛПС. Результаты настоящего исследования могут быть использованы для разработки новых амфифильных неаминовых производных, активных в отношении устойчивых к колистину штаммов *P.aeruginosa*.

\*Université Catholique de Louvain, Louvain Drug Research Institute, Pharmacologie Cellulaire et Moléculaire, Brussels, Belgium.

**НОВЫЙ КЕТОЛИД RBX 14255, АКТИВНЫЙ В ОТНОШЕНИИ МУЛЬТИРЕЗИСТЕНТНОГО *STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE*.**

**A NOVEL KETOLIDE, RBX 14255, WITH ACTIVITY AGAINST MULTIDRUG-RESISTANT *STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE* / V. SAMUEL RAJ, TARANI KANTA BARMAN, VANDANA KALIA, KEDAR PURNAPATRE, SMITA DUBE, RAMKUMAR G., PRAGYA BHATEJA, TARUN MATHUR, TRIDIB CHAIRA, DILIP J. UPADHYAY, YOGESH B. SURASE, R. VENKATARAMANAN, ANJAN CHAKRABARTI, BISWAJIT DAS, PRADIP K. BHATNAGAR // ANTIMICROBIAL AGENTS CHEMOTHERAPY AUGUST 2014; 58: 8: 4283—4289.**

В работе представлен новый кетолид RBx 14255, полусинтетическое производное кларитромицина, и его *in vitro* и *in vivo* активность в отношении чувствительного и устойчивого к макролидам *Streptococcus pneumoniae*. RBx 14255 показал исключительную *in vitro* активность против макролидоустойчивого *S.pneumoniae*, в т. ч. телитромициноустойчивого штамма *S.pneumoniae* 3390 NDDR. RBx 14255 также сильно подавлял синтез белка у *S.pneumoniae* 3390 NDDR. Аффинитет RBx 14255 к рибосомам был выше, чем у других испытанных лекарственных соединений. Эффективность RBx 14255 *in vivo* определяли на модели лёгочной инфекции мышей, индуцированной интраназальной инокуляцией *S.pneumoniae* ATCC 6303, и системной инфекции, вызванной штаммом *S.pneumoniae* 3390 NDDR. Величина 50% эффективной дозы (ED<sub>50</sub>) RBx 14255 в отношении *S.pneumoniae* ATCC 6303 на модели лёгочной инфекции мышей составила 3,12 мг/кг массы тела. Кроме того, при системной инфекции, обусловленной макролидоустойчивым штаммом *S.pneumoniae* 3390 NDDR, препарат RBx 14255 обеспечивал 100% выживание мышей в дозе 100 мг/кг 4 раза в сутки (QID), а в дозе 50 мг/кг QID фармакокинетические показатели RBx 14255 были сравнимы с таковыми телитромицина.

\*Department of Infectious Diseases, New Drug Discovery Research, Ranbaxy Research Laboratories, R & D III, Gurgaon, India.

**НЕОБЫЧНЫЙ КЛАСС АНТРАЦИКЛИНОВ, ПОТЕНЦИРУЮЩИЙ ДЕЙСТВИЕ АНТИБИОТИКОВ НА ГРАМОТРИЦАТЕЛЬНЫЕ БАКТЕРИИ С ПРИРОДНОЙ УСТОЙЧИВОСТЬЮ.**

**AN UNUSUAL CLASS OF ANTHRACYCLINES POTENTIATE GRAM-POSITIVE ANTIBIOTICS IN INTRINSICALLY RESISTANT GRAM-NEGATIVE BACTERIA / G. COX, K. KOTEVA, G. D. WRIGHT\* // JOURNAL OF ANTIMICROBIAL CHEMOTHERAPY 2014; 69: 7: 1844–1855.**

Ортогональный подход в поиске новых антибактериальных средств заключался в идентификации низкомолекулярных соединений, потенцирующих или усиливающих активность существующих антибактериальных препаратов. Задачей исследования было выявить природные адьювантные (вспомогательные) вещества для рифампицина в отношении устойчивой культуры *Escherichia coli*. Штамм *E.coli* BW25113 был обнаружен среди 1120 образцов экстрактов из культуральной жидкости актиномицетов, культивируемых в присутствии субингибиторных концентраций (2 мг/л) рифампицина. Активное вещество, наиболее сильно потенцирующее рифампицин, было выделено методами определения активности и идентифицировано ЯМР-спектроскопией. Механизм потенцирования определяли тестированием чувствительности и биохимическими методами. Антрациклиновый антибиотик 301A<sub>1</sub> был выделен из культуральной жидкости штамма *Streptomyces* (WAC450); он оказывал сильное синергидное действие в комбинации с рифампицином (индекс фракционной ингибиторной концентрации, FIC, равен 0,156) и демонстрировал умеренный синергизм с линезолидом (FIC=0,25) в отношении *E.coli* и *Acinetobacter baumannii*. Активность ассоциировалась с подавлением активного выброса. Но синергидный фенотип утрачивался при тестировании со штаммами *E.coli*, содержащими мутации в *rpoB* гене. При исследовании взаимосвязи структура-активность было установлено, что другие антрациклины не оказывают синергидный эффект в комбинации с рифампицином, а удаление углеводной части молекулы антибиотика 301A<sub>1</sub> лишает его активности. Итак, скрининг части библиотеки природных соединений позволил идентифицировать низкомолекулярное антибиотическое адьювантное соединение, способное повышать чувствительность грамотрицательных бактерий к антибиотикам, к которым они обычно изначально устойчивы. Результаты продемонстрировали большие возможности данного подхода к расширению эффективности антибиотиков перед лицом угрозы возрастающей устойчивости грамотрицательных бактерий.

\* Department of Biochemistry and Biomedical Sciences, M. G. DeGroot Institute for Infectious Disease Research, McMaster University, 1280 Main St W, Hamilton, Ontario L8S 4K1, Canada.

**СТРАТЕГИИ, АЛЬТЕРНАТИВНЫЕ ДОКАЗАТЕЛЬНОМУ ПРИНЦИПУ ИССЛЕДОВАНИЙ АНТИБАКТЕРИАЛЬНЫХ СРЕДСТВ. ОБЗОР.**

**ALTERNATIVE STRATEGIES FOR PROOF-OF-PRINCIPLE STUDIES OF ANTIBACTERIAL AGENTS / A. DALHOFF\*, A. WEINTRAUB, C. E. NORD // ANTIMICROBIAL AGENTS CHEMOTHERAPY AUGUST 2014; 58: 8: 4257–4263.**

Доказательство активности нового антибактериального соединения *in vitro*, а также его эффективности *in vivo* в условиях, релевантных клиническим, достигается 1) использованием соответствующих неклинических моделей инфекций и изучения фармакокинетики-фармакодинамики (ФК-ФД); 2) проверкой результатов исследования в клинических испытаниях, определении доз и схемы лечения во II фазе клинических испытаний. Этот подход требует много времени и затрат средств. Более того, оптимальные показатели ФК-ФД для нового антибактериального соединения не могут быть выведены на основании исследований на экспериментальных животных. Следовательно, должны быть разработаны альтернативные стратегии для подтверждения того, что новый антибактериальный препарат активен в клинически релевантных условиях. В обзоре суммированы доказательства того, что количественный анализ изменений числа жизнеспособных клеток патогена у инфицированных пациентов или оценка влияния ФД исследуемого вещества на индикаторные организмы резидентской микрофлоры человека или колонизирующие бактерии у здоровых волонтеров при параллельном мониторинге ФК в сыворотке и локальном сайте представляют альтернативу классическому доказательному принципу исследований во II фазе испытаний.

\* University Medical Center Schleswig-Holstein, Institute for Infection Medicine, Kiel, Germany.

**D-АМИНОКИСЛОТЫ УСИЛИВАЮТ АКТИВНОСТЬ АНТИМИКРОБНЫХ ПРЕПАРАТОВ В ОТНОШЕНИИ БИОПЛЁНОК КЛИНИЧЕСКИХ РАНЕВЫХ ИЗОЛЯТОВ STAPHYLOCOCCUS AUREUS И PSEUDOMONAS AERUGINOSA.**

**D-AMINO ACIDS ENHANCE THE ACTIVITY OF ANTIMICROBIALS AGAINST BIOFILMS OF CLINICAL WOUND ISOLATES OF STAPHYLOCOCCUS AUREUS AND PSEUDOMONAS AERUGINOSA / C. J. SANCHEZ JR.\*, K. S. AKERS, D. R. ROMANO, R. L. WOODBURY, S. K. HARDY, C. K. MURRAY, J. C. WENKE // ANTIMICROBIAL AGENTS CHEMOTHERAPY 2014; 58: 8: 4353–4361.**



Внутри раны микроорганизмы существуют преимущественно в форме плёнки, что ассоциируется с хроническим течением инфекции и представляет огромную проблему. Поскольку антибиотики часто неэффективны в отношении биоплёнок, представляет интерес использование диспергирующих веществ в местной терапии раневых инфекций, содержащих биоплёнки. Была проведена оценка диспергирующей активности d-аминокислот (d-АК) в отношении биоплёнок, образованных клиническими раневыми изолятами *Staphylococcus aureus* и *Pseudomonas aeruginosa*, и определяли, усиливают ли комбинации d-АК с антибиотиками (клиндамицин, цефазолин, оксациллин, рифампин, ванкомицин для *S.aureus* и амикацин, колистин, ципрофлоксацин, имипенем и цефтазидим для *P.aeruginosa*) активность в отношении биоплёнок. Показано, что d-метионин, d-фенилаланин, d-триптофан в концентрации  $\geq 5$  мМ эффективно диспергировали зрелые биоплёнки клинических штаммов *S.aureus* и *P.aeruginosa*, и эффект усиливался, когда они были объединены в эквимоларной концентрации (d-Met/d-Phe/d-Trp). В комбинации с d-АК активность рифампина в отношении биоплёнок *S.aureus* значительно усиливалась, что выражалось в снижении минимальной подавляющей биоплёнку концентрации (МПБК) с 32 до 8 мкг/мл и количества жизнеспособных клеток в биоплёнке более чем на 2 log по сравнению с контролем. Добавление d-АК также усиливало активность колистина и ципрофлоксацина в отношении биоплёнок *P.aeruginosa*, снижая значение МПБК и число жизнеспособных бактерий на  $>2$  log и 1 log при 64 и 32 мкг/мл соответственно по сравнению с лечением одними антибиотиками. Полученные данные означают, что диспергирующая активность d-АК в комбинации с антибиотиками может представлять эффективную стратегию высвобождения бактерий из биоплёнок, что соответственно приводит к усилению антибиотической активности.

\* United States Army Institute of Surgical Research, Extremity Trauma and Regenerative Medicine, Fort Sam Houston, Texas, USA.

**ОЦЕНКА НОВОЙ КОМБИНАЦИИ ДАПТОМИЦИНА С ЦЕФТРИАКСОНОМ В ОТНОШЕНИИ УСТОЙЧИВЫХ К ВАНКОМИЦИНУ ЭНТЕРОКОККОВ НА *IN VITRO* ФАРМАКОКИНЕТИЧЕСКОЙ-ФАРМАКОДИНАМИЧЕСКОЙ МОДЕЛИ ЭНДОКАРДИАЛЬНЫХ ВЕГЕТАЦИЙ.**

**EVALUATION OF THE NOVEL COMBINATION OF DAPTOMYCIN PLUS CEFTRIAXONE AGAINST VANCOMYCIN-RESISTANT ENTEROCOCCI IN AN**

***IN VITRO* PHARMACOKINETIC/PHARMACODYNAMIC SIMULATED ENDOCARDIAL VEGETATION MODEL / A. H. SNYDER, B. J. WERTH, K. E. BARBER, G. SAKOULAS, M. J. RYBAK\* // JOURNAL OF ANTIMICROBIAL CHEMOTHERAPY 2014; 69: 8: 2148—2154.**

Даптомицин продемонстрировал синергидный эффект с беталактамами в отношении *Enterococcus faecium*, и эта комбинация успешно используется для лечения инфекций, устойчивых к даптомицину. Исследовали один даптомицин и в комбинации с цефтриаксоном в отношении ванкомициноустойчивых энтерококков (VRE) на *in vitro* фармакокинетической-фармакодинамической (ФК-ФД) модели, имитирующей эндокардиальные вегетации (ИЭВ). Проведена оценка даптомицина (6 и 12 мг/кг/сутки) одного или с 2 г цефтриаксона каждые 24 ч в отношении 2 клинических штаммов *E.faecium* (8019 и 5938) и 1 штамма *E.faecalis* (6981) и в течение 96 ч на *in vitro* ФК-ФД ИЭВ модели. Для оценки изменений заряда на поверхности клетки, индуцированных беталактамами, использовали FITC-меченный поли-l-лизин. В отношении штаммов 8019 и 6981 даптомицин (6 мг/кг) плюс цефтриаксон и даптомицин (12 мг/кг) один или в комбинации с цефтриаксоном были значительно активнее, чем один даптомицин (6 мг/кг) от 48 до 96 час. ( $p \leq 0,005$ ). Добавление цефтриаксона существенно усиливало активность даптомицина (6 мг/кг) на 96 ч (для штамма 8019, снижение  $-0,55$  против  $3,64 \log_{10}$  КОЕ/г; для штамма 6981, снижение  $1,11$  против  $5,67 \log_{10}$  КОЕ/г;  $p < 0,001$ ) и улучшало действие даптомицина (12 мг/кг) в отношении штамма 8019 на 96 ч. Комбинация даптомицин (12 мг/кг)+цефтриаксон не демонстрировала заметной активности против 5938 (МПК даптомицина 32 мг/л). К 96 ч у 8019 и 6981 развивалась нечувствительность к даптомицину (6 мг/кг). Экспозиция с ампициллином или цефтриаксоном снижала поверхностный заряд даптомицина у 8019, значительно увеличивая связывание с FITC-поли-l-лизином. Комбинация даптомицина с цефтриаксоном может быть перспективной при эрадикации глубоко расположенных инфекций с большой бактериальной нагрузкой. Дальнейшие исследования позволят проверить усиление активности даптомицина и инициации иммунного бактерицидного действия на VRE под влиянием цефтриаксона и других беталактамов.

\* Anti-Infective Research Laboratory, Eugene Applebaum College of Pharmacy and Health Sciences, Detroit, MI 48201, USA.

**ПРИМЕНЕНИЕ ГЛИКОПЕПТИДОВ СВЯЗАНО С ПОВЫШЕННОЙ СМЕРТНОСТЬЮ ОТ БАКТЕРИЕМИИ, ВЫЗВАННОЙ *ENTEROCOCCUS FAECALIS*.**

**GLYCOPEPTIDE USE IS ASSOCIATED WITH INCREASED MORTALITY IN ENTEROCOCCUS FAECALIS BACTERAEMIA /H. FOO\*, M. CHATER, M. MALEY, S. J. VAN HAL // JOURNAL OF ANTIMICROBIAL CHEMOTHERAPY 2014; 69: 8: 2252–2257.**

Энтерококки — важный возбудитель госпитальных и внебольничных инфекций, из которых самой общей является бактериемия. Несмотря на то, что неадекватная антимикробная терапия ассоциируется с относительно худшими исходами, значение выбора антибиотика, а именно, бета-лактамов вместо гликопептидов, недостаточно описано. Была сделана попытка определить влияние выбора антибиотика на исход лечения *Enterococcus faecalis* (EF) бактериемии. С 2006 по 2013 гг. в Liverpool и Bankstown Lidcombe больницах Сиднея, Австралия, было выполнено ретроспективное когортное исследование с анализом медицинских и лабораторных данных случаев EF бактериемии. Были получены клинические и микробиологические показатели всех больных, получавших соответствующую терапию бета-лактамами или гликопептидами. Были сравнены исходы и прогностические факторы смертности в обеих группах. В случае 172 эпизодов клинически значимой EF бактериемии 126 больных получали соответствующую терапию бета-лактамами, 46 — гликопептидами. Общий показатель 30-дневной смертности составил 15,1% и был значительно выше в группе получавших гликопептиды (26,1% против 11,1%;  $p=0,015$ ). Терапия гликопептидами была независимым прогностическим фактором 30-дневной смертности [OR 2,46 (95% ДИ 1,01–6,02),  $p=0,048$ ], наряду с индексом APACHE [OR 1,10 (95% ДИ 1,02–1,18),  $p=0,011$ ] и злокачественными заболеваниями [OR 2,58 (95% ДИ 1,03–6,49),  $p=0,044$ ]. Таким образом, применение гликопептидов ассоциируется с повышенной смертностью больных при EF бактериемии. При лечении бактериемии, обусловленной чувствительным к бета-лактамам возбудителем, бета-лактамы следует рассматривать как антибиотики выбора.

\* Delogy and Infectious Diseases, Sydney South West Pathology Service, Liverpool, Sydney, NSW, Australia.

**ПРИМЕНЕНИЕ ФТОРХИНОЛОНОВ ЯВЛЯЕТСЯ ФАКТОРОМ РИСКА ПРИОБРЕТЕНИЯ МЕТИЦИЛЛИНОУСТОЙЧИВОГО *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* ПРИ ДОЛГОВРЕМЕННОМ ПРЕБЫВАНИИ В ЛЕЧЕБНОМ УЧРЕЖДЕНИИ: ИССЛЕДОВАНИЕ В ФОРМАТЕ «СЛУЧАЙ–СЛУЧАЙ–КОНТРОЛЬ».**

**FLUOROQUINOLONE USE IS A RISK FACTOR FOR METHICILLIN-RESISTANT *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* ACQUISITION IN LONG-TERM CARE**

**FACILITIES: A NESTED CASE–CASE–CONTROL STUDY / C. COUDERC\*, S. JOLIVET, A. C. M. THIÉBAUT, C. LIGIER, L. REMY, A.–S. ALVAREZ, C. LAWRENCE, J. SALOMON, J.–L. HERRMANN, D. GUILLEMOT, ON BEHALF OF THE ANTIBIOTIC USE AND *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* RESISTANT TO ANTIBIOTICS (ASAR) STUDY GROUP // CLINICAL INFECTIOUS DISEASES 2014; 59: 2: 206–215.**

Назальная колонизация метициллиноустойчивым *Staphylococcus aureus* (MRSA) представляет хорошо известный фактор риска последующей инфекции и ключевой момент её распространения. В данном исследовании идентифицировали специфические факторы риска приобретения MRSA в 4 французских лечебных учреждениях длительного пребывания (январь 2008 г. — октябрь 2010 г.). Состояние назальной колонизации и возможные факторы риска оценивали еженедельно в течение 13 недель после поступления. Вариации, связанные с приобретением *S.aureus*, определяли в наблюдательном «случай–случай–контроль» исследовании, используя условные модели логистической регрессии. В группы «случай» входили больные, приобретшие MRSA или MSSA, «контролем» служили больные с постоянно отрицательными результатами в назальных мазках. Критериями для сравнения были лечебный центр, дата выполнения первого назального мазка и время экспозиции. Из 451 включённого в исследование больного на 76 «случаев» MRSA приходилось 207 «контролей» и на 112 «случаев» MSSA 208 «контролей». В качестве факторов, значимо ассоциированных с приобретением MRSA, согласно данным мультивариантного анализа, были фторхинолоны (OR, 2,17; 95% ДИ, 1,01–4,67), мужской пол (2,09; 1,10–3,98), более интенсивная терапия при поступлении (3,24; 1,74–6,04), а в случае приобретения MSSA — вспомогательные гигиенические процедуры (2,85; 1,27–6,42) и приспособления для мочеиспускания (1,79; 1,01–3,18). Итак, полученные данные дают основание полагать, что фторхинолоны являются фактором риска приобретения MRSA. Меры контроля по ограничению распространения MRSA в лечебных учреждениях длительного пребывания следует основывать на оптимизации назначения фторхинолонов.

\* Unité de Pharmaco-Épidémiologie et Maladies Infectieuses, Institut Pasteur, 25-28 rue du Docteur Roux 75724 Paris Cedex 15, France.

**АНАЛИЗ КЛИНИЧЕСКИХ ШТАММОВ *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* СО СНИЖЕННОЙ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬЮ К ЦЕФТАРОЛИНУ: ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКАЯ И СТРУКТУРНАЯ ПЕРСПЕКТИВЫ.**

**ANALYSIS OF STAPHYLOCOCCUS AUREUS CLINICAL ISOLATES WITH REDUCED SUSCEPTIBILITY TO CEFTAROLINE: AN EPIDEMIOLOGICAL AND STRUCTURAL PERSPECTIVE / R. A. ALM\*, R. E. MCLAUGHLIN, V. N. KOS, H. S. SADER, J. P. IACONIS, S. D. LAHIRI // JOURNAL OF ANTIMICROBIAL CHEMOTHERAPY 2014; 69: 8: 2065—2075.**

Цефтаролин, одобренный к применению в Европе в 2012 г., активен в отношении метициллиноустойчивого *Staphylococcus aureus* (MRSA) со значением МПК 1-2 мг/л в зависимости от географического ареала выделения. В ходе выполнения общеевропейской обзорной программы из 8037 проверенных штаммов были идентифицированы 4 штамма *S. aureus* с МПК более 2 мг/л. Задачей исследования было охарактеризовать эти штаммы, чтобы выяснить механизм устойчивости к цефтаролину. Определения МПК были выполнены методом микроразведений в бульоне, а анализ последовательности — секвенированием целого генома. Изменения, коррелирующие с величиной МПК, выявлены только в пенициллинсвязывающем белке 2a (ПСБ2a) из числа протеинов, известных как необходимые для полного проявления устойчивости к метициллину. Штаммы с МПК цефтаролина 2 мг/л содержали Glu<sub>239</sub>Lys мутацию в не связывающем пенициллин домене, тогда как 4 штамма с МПК цефтаролина 8 мг/л имели дополнительную Glu<sub>447</sub>Lys мутацию в пенициллинсвязывающем домене. Роль этих мутаций была проанализирована с помощью известной рентген-структуры ПСБ2a *S. aureus* и предложенной модели устойчивости к цефтаролину. Анализ геномных ядер показал, что штаммы со сниженной чувствительностью к цефтаролину, эпидемиологически родственны. И так, на активность цефтаролина в отношении MRSA влияют мутации в ПСБ2a. И как показали результаты обзорного исследования, в редких случаях изменения на первой ступени в не связывающем пенициллин домене вместе с изменениями на второй ступени в пенициллинсвязывающем домене могут вести к возрастанию МПК цефтаролина выше 2 мг/л.

\* Infection Innovative Medicines Unit, AstraZeneca R&D Boston, Waltham, MA, USA.

**МЕЖДУ БАКТЕРИОСТАТИЧЕСКИМИ И БАКТЕРИЦИДНЫМИ АНТИБИОТИКАМИ ПРЕОБЛАДАЕТ АНТАГОНИЗМ.**

**ANTAGONISM BETWEEN BACTERIOSTATIC AND BACTERICIDAL ANTIBIOTICS IS PREVALENT / P. S. OCAMPO\*, V. LÁZÁR, B. PAPP, M. ARNOLDINI, P. ABEL ZUR WIESCH, R. BUSA-FEKETE, G. FEKETE,**

**C. PÁL, M. ACKERMANN, S. BONHOEFFER // ANTIMICROBIAL AGENTS CHEMOTHERAPY 2014; 58: 8: 4573—4582.**

При назначении комбинированной терапии редко принимается в расчёт ход эволюции устойчивости при бактериальных инфекциях. Расширение применения комбинированной терапии требует знания взаимодействия лекарств в ингибиторных концентрациях. Свыше 50 лет назад было замечено, что бактерицидные лекарства наиболее сильны в отношении активно делящихся клеток, а эффективность подавления роста, индуцируемого бактериостатическими лекарствами, снижается при комбинировании с бактерицидными лекарствами. Задача работы состояла в системном исследовании данной гипотезы. Вначале были сконструированы кривые гибели клеток во времени (time-kill curve) под действием 5 различных антибиотиков, взятых в клинически значимых концентрациях, которые продемонстрировали при этом наличие антагонизма между бактерицидными и бактериостатическими антибиотиками. Исследования были расширены за счёт отбора комбинационных пар из 21 антибиотика в субингибиторных концентрациях. Было обнаружено, что сильное антагонистическое взаимодействие особенно выражено в комбинациях бактериостатических и бактерицидных антибиотиков. И, наконец, т.к. предложенная гипотеза предполагала действие антибиотиков различных классов на фенотип, указанные эксперименты были воспроизведены в микродинамическом устройстве и с помощью микроскопии с замедленной съёмкой, для того чтобы непосредственно наблюдать и количественно оценивать рост и деление отдельных клеток при контролируемых концентрациях антибиотиков. Наблюдения за отдельными клетками подтверждали существование антагонизма между бактериостатическими и бактерицидными антибиотиками. Однако было обнаружено неожиданное разнообразие откликов клетки на действие комбинаций с антагонистическим эффектом, что предполагает множественность механизмов, лежащих в основе взаимодействия антибиотиков.

\*Institute of Integrative Biology, ETH Zürich, Zürich, Switzerland.

\*Department of Environmental Microbiology, Eawag, Dübendorf, Switzerland.

**IN VITRO И IN VIVO РОСТ БИОПЛЁНКИ STREPTOCOCCUS PYOGENES И ЕЁ РОЛЬ В КОЛОНИЗАЦИИ, ВИРУЛЕНТНОСТИ И ГЕНЕТИЧЕСКОЙ ТРАНСФОРМАЦИИ.**

**STREPTOCOCCUS PYOGENES BIOFILM GROWTH IN VITRO AND IN VIVO AND ITS ROLE IN COLONIZATION, VIRULENCE, AND GENETIC EXCHANGE / L. R. MARKS, L. MASHBURN-WARREN, M. J. FEDERLE, A. P. HAKANSSON\* // THE JOURNAL OF INFECTIOUS DISEASES 2014; 210: 1: 25—34.**

Стрептококки группы А (СГА) обычно колонизируют ротоглотку и повреждённые участки кожи. Колонизация стрептококками мало изучена, и не ясна роль биоплёнки, поскольку на сегодняшний день не проводились эксперименты с биоплёнкой в условиях, воспроизводящих среду хозяина. В данном исследовании биоплёнки СГА выращивали на кератиноцитах человека в различных условиях, и эту модель использовали для оценки колонизации, инвазивности заболевания и естественной изменчивости. СГА, выросшие на эпителиальных клетках, но не образующие биоплёнки на абиотических поверхностях, продуцировали биоплёнки, по свойствам сходные с наблюдаемыми при колонизации *in vivo*. Бактериальная нагрузка этих плёнок в назальной лимфоидной ткани (НЛТ) мышей была в 100 раз выше, чем в случае бактерий, выросших на бульоне; в период септической инфекции клетки были невирулентны, что было связано, в частности, с подавлением генов, задействованных в локализованном инвазивном заболевании. Впервые было показано, что СГА, естественно трансформируются в процессе роста плёнки и колонизации НЛТ *in vivo*. Данные, полученные на новой модели, дают возможность исследовать образование биоплёнки СГА *in vitro* и *in vivo* и её важную роль в процессе СГА колонизации и объяснить известное разнообразие генома в СГА популяции.

\* Department of Microbiology and Immunology, University at Buffalo, State University of New York, 145 BRB, 3435 Main St, Buffalo, NY 14214

**РАЗЛИЧНЫЕ МЕХАНИЗМЫ ЗАЩИТЫ БИОПЛЁНОК ACINETOBACTER BAUMANNII И STAPHYLOCOCCUS AUREUS ВНЕКЛЕТОЧНЫМИ ПОЛИМЕРНЫМИ СОЕДИНЕНИЯМИ ОТ ДЕЙСТВИЯ ТОБРАМИЦИНА.**

**DIFFERENTIAL PROTECTION FROM TOBRAMYCIN BY EXTRACELLULAR POLYMERIC SUBSTANCES FROM ACINETOBACTER BAUMANNII AND STAPHYLOCOCCUS AUREUS BIOFILMS / E. K. DAVENPORT, D. R. CALL, H. BEYENAL\* // ANTIMICROBIAL AGENTS CHEMOTHERAPY AUGUST 2014; 58:8: 4755—4761.**

Определяли механизмы, с помощью которых внеклеточные полимерные соединения (ВПС), обнаруженные в биоплёнках двух патогенов, *Acinetobacter baumannii* и *Staphylococcus aureus*, мо-

гут защищать бактерии от действия тобрамицина. Взаимодействие ВПС-антибиотик следовало изучать в гомогенной среде, не имеющей ограничений в переносе масс. Для этого был разработан метод выращивания биоплёнки, получения ВПС и обработки планктонных культур выделенными ВПС и тобрамицином. Было показано, что планктонные культуры по-разному реагируют на обработку различными ВПС (*A.baumannii* в сравнении с *S.aureus*) в присутствии тобрамицина. ВПС, полученные из *A.baumannii*, действуют как универсальный протектор, подавляя активность тобрамицина в отношении бактериальной клеточной стенки, независимо от вида бактерии; ВПС *S.aureus* не обладали защитным действием. Добавление ионов  $Mg^{2+}$  или  $Ca^{2+}$  снижало защитное действие ВПС *A.baumannii*. При избирательном разрушении белков или ДНК в ВПС защитная способность ВПС не изменялась, что может свидетельствовать о незначительной роли указанных соединений в протекторном действии. Настоящее исследование является первым, в котором было продемонстрировано, как ВПС защищают патогенные бактерии от антибиотиков в гомогенной системе, не имеющей ограничений переноса масс. На основании полученных результатов можно полагать, что ВПС защищают бактериальную популяцию биоплёнки, в частности, сорбируя антибиотики на поверхности и тем самым ограничивая диффузию антибиотика внутрь биоплёнки, что, вероятно, не является единственным механизмом защиты.

\* Gene and Linda Voiland School of Chemical Engineering and Bioengineering, Washington State University, Pullman, Washington, USA.

**БЫСТРАЯ ДИАГНОСТИКА НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ ПРИ ОПРЕДЕЛЕНИИ АНТИБИОТИКОУСТОЙЧВОСТИ ГРАМОТРИЦАТЕЛЬНЫХ БАКТЕРИЙ: ПРИШЛО ВРЕМЯ СМЕНЫ ПАРАДИГМЫ?**

**RAPID NUCLEIC ACID DIAGNOSTICS FOR THE DETECTION OF ANTIMICROBIAL RESISTANCE IN GRAM-NEGATIVE BACTERIA: IS IT TIME FOR A PARADIGM SHIFT? / N. TUIE, K. REDDINGTON, T. BARRY, A. ZUMLA, V. ENNE\* // JOURNAL OF ANTIMICROBIAL CHEMOTHERAPY 2014; 69: 7: 1729—1733.**

Ключевым моментом в решении проблемы серьёзной устойчивости к антибиотикам является применение метода быстрой диагностики нуклеиновых кислот. Успешное введение новых диагностических технологий даёт преимущества не только в лечении больного, но и контроле за инфекцией и управлении антибиотикотерапией.

Но необходимо преодолеть ещё много препятствий, таких, как сложность механизмов устойчивости грамотрицательных бактерий, различия между фенотипом и генотипом, трудность отделения патогенов от фоновых комменсалов. Лишь немногие фирмы производят тест-системы, предназначенные для частичного или специального определения детерминант резистентности грамотрицательных бактерий и основанные на разного типа ПЦР-технологиях. Разработка новых технологий, как-то секвенирование целого генома и комбинация MALDI-TOF с ПЦР является многообещающей с точки зрения введения улучшенных диагностических методов в будущем.

\*Nucleic Acid Diagnostics Research Laboratory (NADRL), Microbiology, School of Natural Sciences, National University of Ireland, Galway, Ireland.

**ЭПИДЕМИОЛОГИЯ И МЕХАНИЗМЫ УСТОЙЧИВОСТИ К КАРБАПЕНЕМАМ У НЕ ЧУВСТВИТЕЛЬНЫХ К КАРБАПЕНЕМАМ ШТАММОВ *PSEUDOMONAS AERUGINOSA*, СОБРАННЫХ В ЕВРОПЕЙСКИХ И СРЕДИЗЕМНОМОРСКИХ СТРАНАХ В 2009—2011 ГГ.**

**EPIDEMIOLOGY AND CARBAPENEM RESISTANCE MECHANISMS OF CARBAPENEM-NON-SUSCEPTIBLE *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* COLLECTED DURING 2009—11 IN 14 EUROPEAN AND MEDITERRANEAN COUNTRIES / M. CASTANHEIRA\*, L. M. DESHPANDE, A. COSTELLO, T. A. DAVIES, R. N. JONES // JOURNAL OF ANTIMICROBIAL CHEMOTHERAPY 2014; 69: 7: 1804—1814.**

Задачей исследования было оценить родственные связи и механизмы устойчивости у не чувствительных к карбапенемам штаммов *Pseudomonas aeruginosa*, собранных в европейских и средиземноморских странах в 2009—2011 гг. У штаммов, не чувствительных к дорипенему (МПК >2 мг/л), определяли чувствительность к имипенему, меропенему, дорипенему, азтреонаму, цефтазидиму, цефепиму при отсутствии или с добавлением фенил-аргинин- $\beta$ -нафтиламида (РА $\beta$ N), ингибитора помпового выброса, или клоксациллина, ингибитора AmpC. Скрининг карбапенемаз выполняли с помощью ПЦР и секвенирования. Экспрессию хромосомальных генов *ampC*, *mexA*, *mexC*, *mexE* и *mexX* определяли количественной ПЦР в реальном времени и мультилокусным сиквенс-типированием (МЛСТ), используя *P.aeruginosa* PA01 или группу чувствительных штаммов в качестве штаммов сравнения. Клональность оценивали гель-электрофорезом в пульсирующем поле (PFGE) и МЛСТ. Из 529 (25,6%) не чувствительных к карбапенемам штаммов *P.aeruginosa*

106 содержали гены металло- $\beta$ -лактамаз (М $\beta$ Л): VIM-2 (76 штаммов), VIM-4 (14), VIM-1 (7) и VIM-5 (5), IMP-15 и 3 новых М $\beta$ Л (IMP-33, VIM-36 и VIM-37) в каждом штамме. Было отмечено возрастающее преобладание продуцентов М $\beta$ Л в 2011 г. (30,6%) по сравнению с предшествующими 2009 и 2010 гг. (13,4 и 12,3% соответственно). Штаммы характеризовались большим генетическим разнообразием, был определён 401 уникальный профиль. В М $\beta$ Л-продуцирующих кластерах были определены CC235 и ST111. Ингибиторное действие комбинации Ра $\beta$ N/клоксациллин было в пределах 90,0—56,5%/1,3—21,2%. Преобладающими механизмами природной устойчивости были снижение или утрата OprD у 94,9% штаммов *P.aeruginosa*, затем наличие AmpC (44,4%) и MexAB-OprM (20,1%). При анализе группы чувствительных штаммов MexAB-OprM по распространённости был сравним со снижением/утратой OprD. Возрастающее преобладание М $\beta$ Л в разных европейских странах вызывает беспокойство, а природные механизмы устойчивости генетически разнообразной популяции не чувствительных к карбапенемам штаммов являются предметом более пристального изучения в этих странах.

\*JMI Laboratories, North Liberty, IA 52317, USA.

**РАЗРАБОТКА И РАТИФИКАЦИЯ КЛИНИЧЕСКОЙ МОДЕЛИ ПРОГНОЗИРОВАНИЯ УСТОЙЧИВОСТИ К БЕТАЛАКТАМАМ СТРЕПТОКОККОВ ГРУППЫ VIRIDANS, ВЫЗЫВАЮЩИХ БАКТЕРИЕМИЮ У НЕЙТРОПЕНИЧЕСКИХ ОНКОЛОГИЧЕСКИХ БОЛЬНЫХ.**

**DEVELOPMENT AND VALIDATION OF A CLINICAL MODEL TO PREDICT THE PRESENCE OF  $\beta$ -LACTAM RESISTANCE IN VIRIDANS GROUP STREPTOCOCCI CAUSING BACTEREMIA IN NEUTROPENIC CANCER PATIENTS / S. A. SHELBURNE III, R. E. LASKY, P. SAHASRABHOJANE, J. T. TARRAND, K. V. I. ROLSTON\* // CLINICAL INFECTIOUS DISEASES 2014; 59: 2: 223—230.**

Озабоченность развитием тяжёлой инфекции, вызванной устойчивыми к бета-лактамам стрептококками группы viridans (СГВ), является главным фактором при выборе эмпирической терапии больных с фебрильной нейтропенией антибиотиками, активными в отношении грамположительных бактерий. Была сделана попытка разработать и проверить правильность модели, прогнозирующей развитие устойчивости к бета-лактамам у СГВ, вызвавших инфекцию кровотока (ИК) у нейтропенических больных. Для разработки клинической прогностической модели были исполь-

зованы данные 569 уникальных случаев ИК, обусловленной СГВ, у нейтропенических больных за период 2000—2010 гг. в MD Anderson Раковом Центре. Проверка модели была проведена в 163 случаях ИК в 2011—2013 гг., а также определена *in vitro* активность бета-лактамов в отношении выделенных в этот период возбудителей ИК. *In vitro* устойчивость к бета-лактамам обычно принимается в расчёт при лечении фебрильной нейтропении только при выделении СГВ с МПК пенициллина  $\geq 2$  мкг/мл. Из 732 больных, инфицированных СГВ, у 129 (17%) были выделены штаммы с МПК пенициллина  $\geq 2$  мкг/мл, а 98% больных этой когорты имели, по крайней мере, один из следующих факторов риска: текущее применение бета-лактамов в качестве профилактической меры; приём бета-лактамов в пред-

шествующие 30 дней; наличие СГВ ИК. Ограничение использования при эмпирической терапии антибиотиков, активных в отношении грамположительной инфекции у нейтропенических больных, имеющих хотя бы 1 из 3 факторов риска, должно состоять в снижении такого назначения до 42%. Итак, простой клинический критерий может помочь при выборе терапии грамположительной инфекции у больных с фебрильной нейтропенией при риске развития серьёзной устойчивости СГВ инфекции к бета-лактамам.

\*Department of Infectious Diseases, MD Anderson Cancer Center, Unit 1460, 1515 Holcombe Blvd, Houston, TX 77030 USA.

**Материал подготовлен Н. С. Бондаревой**



# ЦИКЛОФЕРОН®

умное лекарство для лечения и профилактики гриппа и ОРВИ



- ✓ Быстрый индуктор интерферона\*
- ✓ Обладает прямым противовирусным действием
- ✓ Разрешен детям с 4 лет и взрослым
- ✓ Сохраняет лечебный эффект даже при частом применении\*\*
- ✓ Снижает риск развития осложнений при гриппе и ОРВИ в 9 раз\*\*\*

#### ПРИЁМ ПРЕПАРАТА ПРИ ЛЕЧЕНИИ ГРИППА/ОРВИ

Дни приёма:



#### ПРИЁМ ПРЕПАРАТА ДЛЯ ПРОФИЛАКТИКИ ГРИППА/ОРВИ

Дни приёма:



ООО «НАУЧНО-ТЕХНОЛОГИЧЕСКАЯ  
ФАРМАЦЕВТИЧЕСКАЯ  
ФИРМА «ПОЛИСАН»  
INFO@POLYSAN.RU WWW.POLYSAN.RU

РОССИЯ, 192102, Г. САНКТ-ПЕТЕРБУРГ,  
УЛ. САЛОВА, Д. 72, КОР. 2, ЛИТ. А,  
ТЕЛ.: +7 (812) 710-82-25  
ФАКС: +7 (812) 764-62-84

Интеллект на защите  
здоровья  
**polysan**

\* Ершов Ф. И., Киселев О. И, Интерфероны и их индукторы (от молекулы до лекарств). - М.: ГЭОТАР-Медиа, 2005.

\*\* Л. А. Харитонов, О. Е. Есрафилова, М. Г. Романцов "Коррекция иммунного дисбаланса часто болеющих детей повторными респираторными инфекциями"- Антибиотики и Химиотерапия, 2013, 58; 11-12.

\*\*\* Доказано клинически (Исаков В.А., Романцов М.Г. и соавт: Эффективность Циклоферона в терапии и профилактике гриппа и ОРЗ. РМЖ 11, 2011).