Пробл. особо опасных инф. 2016; 2:79–82. **DOI: 10.21055/0370-1069-2016-2-79-82**

УДК 616.98:579.841.93

В.Ю.Охапкина, Н.В.Пяткова, А.К.Федотов

МЕТОД УСКОРЕННОЙ ОЦЕНКИ ЭФФЕКТИВНОСТИ АНТИБАКТЕРИАЛЬНЫХ ПРЕПАРАТОВ ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ БРУЦЕЛЛЕЗЕ

Филиал ФГБУ «48 Центральный научно-исследовательский институт» Министерства обороны РФ, Киров, Российская Федерация

Цель. Разработка метода предварительной ускоренной оценки эффективности антибактериальных препаратов при бруцеллезе в условиях *in vivo*. **Материалы и методы.** В качестве биологической модели использовали аутбредных белых мышей с остросептической формой экспериментального бруцеллеза, вызванной внутривенным заражением сублетальными дозами возбудителя. Одновременно с заражением животным проводили курсы антибактериальной терапии препаратами различных групп. Определяли изменение количественного содержания микробов во внутренних органах животных на фоне введения антибиотиков бактериологическим методом. На основании полученных данных рассчитывали индекс антимикробной активности, по величине которого возможно ранжирование испытуемых антибактериальных препаратов. **Результаты и обсуждение.** Между результатами оценки активности препаратов, полученными при использовании разработанного метода и при проведении полноценных стандартных курсов терапии, отмечается высокий уровень корреляционной зависимости (величина коэффициента корреляции 0,73), что определяет пригодность метода для скрининга новых антибиотиков в отношении возбудителя бруцеллеза.

Ключевые слова: бруцеллез, антибактериальные препараты, экспериментальная инфекция, антимикробная активность.

Корреспондирующий автор: Охапкина Вероника Юрьевна, e-mail: verona2205@mail.ru

V.Yu.Okhapkina, N.V.Pyatkova, A.K.Fedotov

Method of Accelerated Evaluation of Antimicrobial Preparation Efficacy against Experimental Brucellosis

Affiliated Branch of the 48th Central Research Institute of the Ministry of Defense of the Russian Federation, Kirov, Russian Federation

Objective of the study was to elaborate the method for preliminary accelerated evaluation of antimicrobial preparation efficacy in case of *in vivo* brucellosis. **Materials and methods**. Outbred BALB/c mice with the acute septic experimental brucellosis, caused by intravenous inoculation with sub-lethal doses of the agent, served as biological models. Concurrently with the challenge, animals were given antimicrobial treatment. They took preparations of different types. Further, against the background of antimicrobial therapy, changes of quantitative microbe content in the internal organs of animals were studied, applying bacteriological method. Based on the data obtained index of antimicrobial activity was calculated, according to the value of which, it is possible to rank the drugs under study. **Results and discussion**. Results of preparation potency estimation, received with the help of the developed method, and results obtained after complete standard regimens show high-level correlation dependence (correlation ratio being 0.73), which makes the method suitable for screening of new antimicrobials in reference to brucellosis agent.

Key words: brucellosis, antimicrobial preparations, experimental infection, antimicrobial activity.

Conflict of interest: The authors declare no conflict of interest.

Corresponding author: Veronika Yu. Okhapkina, e-mail: verona2205@mail.ru

Citation: Okhapkina V.Yu., Pyatkova N.V., Fedotov A.K. Method of Accelerated Evaluation of Antimicrobial Preparation Efficacy against Experimental Brucellosis. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections].* 2016; 2:79–82. (In Russ.). DOI: 10.21055/0370-1069-2016-2-79-82

Антибиотики являются ведущим средством этиотропной терапии бруцеллеза. Их использование показано во всех случаях острого, рецидивах и обострениях хронического заболевания [1, 2, 3, 6, 7, 8]. При этом анализ литературы [4, 5, 9, 10, 11] выявляет значительные противоречия данных об эффективности различных антибактериальных препаратов при лечении бруцеллеза, связанные с методическими особенностями проведения испытаний.

Оценка антимикробной активности антибиотиков в отношении конкретного возбудителя традиционно складывается из нескольких этапов. Первичный скрининг препаратов осуществляется обычно с использованием метода диффузии в агар («метода дисков»). В дальнейшем объективность полученных данных подтверждается при количественном определении величин минимальных подавляющих концентраций препаратов. В то же время результаты определения чувствительности бактериальных культур к антибиотикам *in vitro* зачастую не согласуются с их терапевтической эффективностью *in vivo*. Исходя из этого, достоверная оценка антибиотиков возможна только в опытах по экстренной профилактике и лечению экспериментальной инфекции.

Следует отметить, что экспериментальный бруцеллез лабораторных животных, так же как и заболевание человека в естественных условиях, характеризуется длительным затяжным течением. В связи с этим при оценке терапевтической эффективности антибиотиков *in vivo* исследования характеризуются

достаточно большой продолжительностью во времени. Также значительно возрастает риск проявления в опытах различного рода неучитываемых (случайных) внешних воздействий, которые могут значительно повлиять и даже исказить получаемые результаты.

Указанные обстоятельства определяют необходимость разработки для предварительной оценки эффективности антибактериальных препаратов *in vivo* методов, которые в более короткие сроки позволяют получать исходные данные для последующего окончательного изучения лекарственных средств при проведении полноценных курсов профилактики и терапии.

Материалы и методы

В опыте использовали следующие антибактериальные и химиопрепараты в пределах установленных сроков годности: доксициклин-акос (Россия, Курган, ОАО «Синтез»); рифампицин (Республика Беларусь, Минск, РУП «Белмедпрепараты»); сумамед (азитромицин) (Хорватия, Загреб, «Плива»); абактал (пефлоксацин) (Словения, Любляна, «Лек»); цепрова (ципрофлоксацин) (Индия, Мумбай, «ЛЮПИН ЛТД»); ломефлокс (ломефлоксацин) (Индия, Мумбай, «Ипка Лабораториз Лимитед»); спарфло (спарфлоксацин) (Индия, Хайдерабад, «Д-р Реддис»); элефлокс (левофлоксацин) (Индия, Девас, «Ранбакси Лабораториз Лимитед»); офлоксин (офлоксацин) (Чешская Республика, Прага, «ЗЕНТИВА А.С.»); бисептол (Польша, Пабянице, «Польфа»); амоксиклав (амоксициллин + клавулановая кислота) (Словения, Любляна, «Лек»); амикацин-виал (Россия, Москва, ООО «АЛВИС»); оксациллин (Россия, Курган, ОАО «Синтез»). Антибиотики вводили парентерально и перорально согласно прилагаемым инструкциям в дозах, пересчитанных исходя из площади поверхности тела подопытных животных.

Для выделения и накопления культур бруцелл в пробирках и на чашках Петри использовали модифицированную коммерческую сухую среду Эритрит-агар производства ФГУП НПО «Микроген» Минздрава России. Общую концентрацию микробных клеток в суспензиях определяли с помощью стандартного образца мутности ОСО 42-28-85П.

Для воспроизведения инфекционного процесса *in vivo* была взята культура высоковирулентного природного изолята *Brucella melitensis* 21, относящегося к 1 биовару своего вида. В качестве биологических моделей при отработке ускоренной методики были использованы аутбредные белые мыши массой от 18 до 22 г обоего пола. С целью получения у мышей острой генерализованной формы инфекционного процесса их заражали внутривенно (в ретробульбарное венозное сплетение) суспензией двухсуточной агаровой культуры бруцелл. Накопление микробов в печени и селезенке оценивали путем высева серийных разведений гомогената органов (печени и селезенки) на плотную питательную среду в чашках Петри, инкубации с последующим подсчетом числа выросших колоний.

Для оценки эффективности антибиотиков при полных курсах лечения в качестве биологической модели использованы морские свинки обоего пола массой от 250 до 300 г, которых заражали подкожно суспензией двухсуточной агаровой культуры бруцелл. Лечение начинали на 20-е сутки с момента заражения и продолжали в течение 15 сут. Через 30 дней после окончания курсов введения препаратов от животных получали сыворотку для постановки реакции агглютинации и проводили бактериологическое обследование, по результатам которых делали заключение об излечении животных. Реакцию агглютинации ставили общепринятым способом с использованием диагностикума бруцеллезного жидкого для реакции агглютинации, суспензии для диагностических целей (ФКУЗ «СтавНИПЧИ»).

Статистическую обработку данных проводили по критерию Стьюдента, доверительный интервал определяли для вероятности 95 %.

Результаты и обсуждение

На первом этапе исследований была изучена возможность воспроизведения на лабораторных животных острой генерализованной формы инфекционного процесса при внутривенном заражении сублетальными дозами возбудителя бруцеллеза. В этих условиях происходит быстрая и интенсивная диссеминация микробов, которые минуют естественные защитные барьеры и практически полностью попадают в органы, захватываясь тканевыми макрофагами. Кроме того, изучение активности химиопрепаратов в условиях быстро развивающейся остросептической формы экспериментального бруцеллеза без формирования сенсибилизации организма позволяет осуществить количественную оценку непосредственно антимикробного действия антибиотиков без влияния на их активность других патогенетических механизмов заболевания.

Сравнительное изучение динамики накопления микробов штамма *B. melitensis* 21 во внутренних органах белых мышей, инфицированных внутривенно суспензией агаровой культуры бруцелл в диапазоне доз от 1 до 500 млн микробов по оптической концентрации, позволило остановиться в дальнейшем на дозе в 100 млн м.к., дающей возможность получать наиболее быстрый и воспроизводимый результат. В отсутствие воздействия внешних факторов, численный уровень микробной популяции в печени и селезенке инфицированных мышей в этом случае сохранялся на достаточно стабильных значениях (в среднем (5,6±1,2) млн живых микробов в 1 г гомогената органов) на протяжении 20 сут.

В табл. 1 приведены результаты опытов, в ходе которых белым мышам непосредственно после внутривенного инфицирования культурой бруцелл в дозе 100 млн м.к. вводили антибактериальные препараты. Использовали антибиотики разных групп

Таблица 1

Динамика изменения содержания бруцелл в печени и селезенке внутривенно инфицированных мышей в зависимости от кратности введения антибактериальных препаратов ($X \pm I_{95}$, n=5)

Антибиотик	Срок наблюдения	Содержание бруцелл в гомогенате органов при введении доз препарата, млн живых микробов			
		0 (контроль)	1	2	3
Доксициклин	30 мин	12,9±2,8	12,9±2,8	12,9±2,8	12,9±2,8
	1 сут	6,6±1,2	4,6±1,5	-	-
	2 сут	5,0±1,1	1,3±0,4	0,3±0,1	-
	3 сут	6,7±1,3	1,3±0,1	1,2±0,2	0,9±0,3
	4 сут	8,4±2,8	1,2±0,2	0,9±0,2	0,7±0,2
Пефлоксацин	30 мин	13,2±3,1	13,2±3,1	13,2±3,1	13,2±3,1
	1 сут	10,8±2,0	7,9±2,0	-	-
	2 сут	10,2±2,3	5,1±1,2	2,6±1,0	-
	3 сут	8,7±1,9	4,2±1,2	1,3±0,3	0,4±0,1
	4 сут	5,6±1,4	2,9±1,0	2,4±0,8	0,5±0,2
Азитромицин	30 мин	12,9±2,8	12,9±2,8	12,9±2,8	12,9±2,8
	1 сут	6,6±1,2	6,5±1,9	-	-
	2 сут	5,0±1,1	5,9±1,8	8,7±2,0	-
	3 сут	6,7±1,3	4,7±1,5	6,9±1,7	5,0±1,5
	4 сут	8,4±2,8	5,2±1,6	6,0±1,5	5,6±1,7
Оксациллин	30 мин	12,9±2,8	12,9±2,8	12,9±2,8	12,9±2,8
	1 сут	6,6±1,2	5,8±1,7	-	-
	2 сут	5,0±1,1	7,6±2,1	5,1±1,2	-
	3 сут	6,7±1,3	4,9±1,0	6,0±1,6	5,9±1,5
	4 сут	8,4±2,8	7,8±1,9	6,9±1,8	7,9±2,0

Примечание: «-» – исследование не проводили.

с известной активностью в отношении возбудителя бруцеллеза: высокоэффективные пефлоксацин и доксициклин, малоэффективный азитромицин, неэффективный оксациллин. Препараты животным опытных групп вводили от 1 до 3 дней. Суточные дозы препаратов для мышей составляли: 0,5 мг доксициклина, 3 мг пефлоксацина, 1,25 мг азитромицина, 10 мг оксациллина. Доксициклин и азитромицин вводили 1 раз в сутки, пефлоксацин и оксациллин 2 раза в сутки с интервалом в 12 ч. В процессе исследования осуществляли контроль динамики накопления микробов в органах животных.

Анализ данных, представленных в табл. 1, указывает на то, что введение антибиотиков оказывает существенное воздействие на накопление бруцелл во внутренних органах внутривенно инфицированных мышей. При этом влияние изученных антибиотиков на величину указанного показателя весьма отличается. Наиболее отчетливые различия в антимикробной активности препаратов удалось получить при их 3-кратном введении и контроле показателя накопления микробов в органах на 4-е сутки.

На следующем этапе исследований в соответствии с описанной методикой была изучена эффективность ряда антибактериальных препаратов из числа отобранных по результатам предварительной положительной оценки их в условиях *in vitro*. В ходе опыта препараты животным вводили в течение 3 дней. Ломефлоксацин, спарфлоксацин, левофлоксацин и доксициклин вводили в суточной дозе 1 раз в сут, ципрофлоксацин, пефлоксацин, офлоксацин, рифампицин, бисептол, амикацин, амоксиклав – 2 раза в сутки с интервалом в 12 ч. Полученные данные представлены в табл. 2.

Для возможности сравнительной характеристики активности изученных антибактериальных препаратов был предложен индекс антимикробной активности, который рассчитывали по формуле:

$$ИАА = B_к : B_о,$$

где ИАА – индекс антимикробной активности; $B_к$ – содержание микробных клеток в гомогенате органов в контрольной группе к окончанию срока

Таблица 2

Содержание бруцелл в печени и селезенке внутривенно инфицированных мышей после введения различных антибактериальных препаратов ($X \pm I_{95}$, n=10)

Антибиотик	Суточная доза препарата, мг	Содержание бруцелл в 1 г гомогената органов, млн живых микробов
Ломефлоксацин	1,0	1,9±0,2
Ципрофлоксацин	2,5	1,2±0,5
Спарфлоксацин	0,5	0,2±0,1
Левофлоксацин	1,25	3,1±0,3
Пефлоксацин	3,0	0,6±0,2
Офлоксацин	2,0	1,5±0,4
Рифампицин	2,25	0,1±0,1
Доксициклин	0,5	0,2±0,2
Бисептол	4,8	0,9±0,2
Амикацин	2,5	0,9±0,3
Амоксиклав	2,5	4,8±0,7
Контроль	0	9,6±1,9

Таблица 3

Результаты оценки антимикробной эффективности антибактериальных препаратов по предлагаемой методике и при проведении полных курсов лечения (n=10–12)

Антибиотик	Индекс антимикробной активности в опытах на мышах	Эффективность при лечении экспериментальной инфекции морских свинок, процент
Ломефлоксацин	5,05	25,0
Ципрофлоксацин	8,00	50,0
Спарфлоксацин	48,00	83,3
Левофлоксацин	3,09	22,2
Пефлоксацин	16,00	75,0
Офлоксацин	6,40	50,0
Рифампицин	96,00	100,0
Доксициклин	48,00	85,0
Бисептол	10,67	60,0
Амикацин	10,67	66,7
Амоксиклав	2,00	17,0

наблюдения; B_o – содержание микробных клеток в гомогенате органов в опытной группе к окончанию срока наблюдения.

Наибольшие величины данного показателя отмечены для рифампицина, спарфлоксацина и доксициклина (48,00–96,00) и несколько меньше для пефлоксацина (16,00), средние – для бисептола, ципрофлоксацина, офлоксацина и амикацина (от 6,40 до 10,67), минимальные – для ломефлоксацина, левофлоксацина и амоксиклава (от 1,06 до 5,05).

На следующем этапе исследований была проведена оценка эффективности изученных антибиотиков при проведении полноценных курсов лечения экспериментального бруцеллеза. В качестве биологической модели использовали морских свинок, которых заражали подкожно суспензией двухсуточной агаровой культуры штамма *Br. melitensis* 21 в дозе 200 м.к. Лечение начинали через 20 сут после инфицирования. Лечебную эффективность антибактериальных препаратов оценивали по проценту излеченных животных, выявляемых при бактериологическом и серологическом обследовании через 30 сут после окончания курсов введения препаратов.

В табл. 3 представлены обобщенные данные по результатам оценки антимикробной активности антибактериальных препаратов в соответствии с предлагаемой методикой и их терапевтической эффективности при проведении полных курсов лечения экспериментального бруцеллеза.

Величина коэффициента корреляции (0,73) результатов оценки активности препаратов, полученных при использовании методики оценки изменения содержания микробов во внутренних органах на фоне введения антибиотиков и при проведении полных курсов терапии, свидетельствует о высоком уровне корреляционной зависимости.

На основании проведенных исследований можно предложить границы предварительного ранжирования антибиотиков по результатам оценки в соответствии с предложенной методикой: малоэффективные (ИАА от 1 до 6), среднеэффективные (ИАА от 6 до 12), эффективные (ИАА от 12 и более).

Таким образом, результаты проведенных исследований определяют целесообразность использования предлагаемой методики для предварительной сравнительной оценки антимикробной активности антибиотиков химиопрепаратов в отношении культур возбудителя бруцеллеза.

Конфликт интересов. Авторы подтверждают отсутствие конфликта финансовых/нефинансовых интересов, связанных с написанием статьи.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Бунин К.В., Белов Г.Ф. Иммуноантибиотикотерапия рецидивирующих и хронических форм инфекционных болезней. Новосибирск: Наука; 1982. 280 с.

2. Лобзин Ю.В., редактор. Инфекционные болезни: уч. для студентов мед. вузов. СПб.: Фолиант; 2001. 542 с.

3. Лобзин Ю.В., редактор. Руководство по инфекционным болезням. СПб.: Фолиант; 2000. 460 с.

4. Малецкая О.В. Эффективность некоторых новых антибиотиков при лечении экспериментального бруцеллеза. *Антибиотики и химиотерапия.* 2002; 47(11):4–7.

5. Малецкая О.В. Новые подходы к лечению бруцеллеза. *Эпидемиол. и инф. бол.* 2003; 6:32–5.

6. Elberg S.S. Guide to the diagnosis, treatment and prevention of human brucellosis. Geneva: WHO; 1985. P. 345–54.

7. Farreli L.D., Robertson L.R. The treatment of brucellosis. *J. Chemother.* 1980; 6:695–97.

8. Hall W.H. Modern chemotherapy for brucellosis in humans. *Rev. Infect. Dis.* 1990; 12(6):1060–99.

9. Malik G.M. Early clinical response to different therapeutic regimens for human brucellosis *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 1998; 58(2):190–91.

10. Shehabi A., Shakir K. Diagnosis and treatment of 106 cases of human brucellosis. *J. Infect.* 1990; 20(1):5–10. DOI: 10.1016/S0163-4453(90)92214-6.

11. Solera J. Treatment of human brucellosis *J. Med. Liban.* 2000; 48(4):255–63.

References

1. Bunin K.V., Belov G.F. [Immune Antibiotic Treatment of Recurrent and Chronic Forms of Infectious Diseases]. Novosibirsk: Nauka; 1982. 280 p.

2. Lobzin Yu.V., editor. [Infectious Diseases: Textbook for Medical College Students]. St. Petersburg: Foliant; 2001. 542 p.

3. Lobzin Yu.V., editor.[Guidelines on Infectious Diseases]. St. Petersburg: Foliant; 2000. 460 p.

4. Maletskaya O.V. [Potency of certain novel antibiotics in case of experimental brucellosis treatment]. *Antibiot. Khimioterapiya.* 2002; 47(11): 4–7.

5. Maletskaya O.V. [Novel approaches to treatment of brucellosis]. *Epidemiol. Infek. Bol.* 2003; 6:32–5.

6. Elberg S.S. Guide to the diagnosis, treatment and prevention of human brucellosis. Geneva: WHO; 1985. P. 345–54.

7. Farreli L.D., Robertson L.R. The treatment of brucellosis. *J. Chemother.* 1980; 6:695–97.

8. Hall W.H. Modern chemotherapy for brucellosis in humans. *Rev. Infect. Dis.* 1990; 12(6):1060–99.

9. Malik G.M. Early clinical response to different therapeutic regimens for human brucellosis *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 1998; 58(2):190–91.

10. Shehabi A., Shakir K. Diagnosis and treatment of 106 cases of human brucellosis. *J. Infect.* 1990; 20(1):5–10. DOI: 10.1016/S0163-4453(90)92214-6.

11. Solera J. Treatment of human brucellosis *J. Med. Liban.* 2000; 48(4):255–63.

Authors:

Okhapkina V.Yu., Pyatkova N.V., Fedotov A.K. Affiliated Branch of the «48th Central Research Institute» of the Ministry of Defense of the Russian Federation. 119, Oktyabrsky Avenue, Kirov, 610000, Russian Federation.

Об авторах:

Охапкина В.Ю., Пяткова Н.В., Федотов А.К. Филиал ФГБУ «48 Центральный научно-исследовательский институт» Министерства обороны Российской Федерации. Российская Федерация, 610000, г. Киров, Октябрьский проспект, 119.

Поступила 23.07.15.