

Антибактериальная активность тобрамицина в отношении штаммов *Pseudomonas aeruginosa*, выделенных у больных муковисцидозом

П. Переновска, Г. Стоянова, Т. Стратева

Кафедра медицинской микробиологии, Медицинский университет, София, Болгария;
Клиника педиатрии, УМБАЛ «Александровска», Медицинский университет, София, Болгария

Antimicrobial activity of tobramycin against *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from patients with cystic fibrosis

P. Perenovska, G. Stoyanova, T. Strateva

Department of Medical Microbiology, Medical University, Sofia, Bulgaria;
Pediatric Clinic, University Hospital "Alexandrovskia", Medical University, Sofia, Bulgaria

Инфекции нижних дыхательных путей у пациентов с муковисцидозом характеризуются упорно рецидивирующим и тяжелым течением. Для лечения заболеваний, вызванных *Pseudomonas aeruginosa*, в последнее время у детей старше 6 лет успешно применяется тобрамицин в ингаляциях. В настоящем исследовании методом E-test (LIOFILCHEM, Италия) определена антибактериальная активность тобрамицина в отношении 40 штаммов *P. aeruginosa*, выделенных у 25 больных муковисцидозом за период 2005–2009 гг. При этом МПК₅₀ и МПК₉₀ составили соответственно 0,75 и 3,0 мг/мл. Зависимости от возраста пациентов (и длительности колонизации с *P. aeruginosa*) не установлено. Тобрамицин *in vitro* показал высокую активность в отношении штаммов *P. aeruginosa*, выделенных у больных муковисцидозом. Она зависела от морфологии штамма и предшествующего лечения ингаляционным тобрамицином. При назначении ингаляционного лечения в случаях высева среднечувствительных или резистентных штаммов *P. aeruginosa* (согласно критериям CLSI) необходимо интерпретировать оценку их чувствительности исходя из критериев MENSURA Group.

Ключевые слова: дети, муковисцидоз, *P. aeruginosa*, антибактериальная активность, тобрамицин.

In patients with cystic fibrosis, lower respiratory tract infections are characterized by a steadily recurrent and severe course. Recently, inhaled tobramycin has been successfully used to treat *Pseudomonas aeruginosa*-induced diseases in children aged over 6 years. In this trial, the E-test (Liofilchem, Italy) was employed to determine the antimicrobial activity of tobramycin against 40 *P. aeruginosa* strains isolated from 25 patients with cystic fibrosis in the period 2005–2009. At the same time MIC₅₀ and MIC₉₀ were 0,75 and 3,0 mg/ml, respectively. No relationship to patient age (and duration of *P. aeruginosa* colonization) was established. Tobramycin showed high activity *in vitro* against *P. aeruginosa* strains isolated from the patients with cystic fibrosis. The activity was related to the morphology of a strain and previous treatment with inhaled tobramycin. When initiating its inhalation treatment in cases of inoculation of moderately susceptible or resistant *P. aeruginosa* strains (according to the CLSI criteria), it is necessary to interpret their susceptibility test results by following the MENSURA Group criteria.

Key words: children, cystic fibrosis, *P. aeruginosa*, antimicrobial activity, tobramycin.

Муковисцидоз — аутосомно-рецессивное наследственное заболевание, при котором нарушена секреторная функция всех экзокринных желез. Клинические проявления многообразны, но у большей части больных именно поражение легких определяет продолжительность жизни. У этих пациентов хроническая колонизация *Haemophilus influenzae*, *Staphylococcus aureus* и позднее — *Pseudomonas aeruginosa* является неизменной компонентой, определяю-

щей прогрессирование болезни. Патогномичными микроорганизмами считают *P. aeruginosa* и другие грамотрицательные неферментирующие глюкозу бактерии, *Burkholderia cepacia* и *Burkholderia gladioli* с мукоидным морфотипом, который определяет их полирезистентность [1, 2]. Инфицирование *P. aeruginosa* прогностически неблагоприятно, ведет к более тяжелому течению муковисцидоза, прогрессирующему ухудшению функции легких [3, 4]. Большинство клиницистов считают, что антимикробная терапия улучшает функцию легких, увеличивает продолжительность и качество жизни больных, особенно при проведении агрессивного лечения антимикробными лекарственными средствами уже при первом обнаружении *P. aeruginosa*. Важным элементом терапии муковисцидоза в последнее десятилетие стало ингаляционное применение антибиотиков, так как таким путем создается высокая концентрация препаратов в очаге

© Коллектив авторов, 2015

Ros Vestn Perinatol Pediat 2015; 1:89–92

Адрес для корреспонденции: Переновска Пенка Илиева — проф., главный педиатр Республики Болгария, зав. клиникой педиатрии Университетской больницы «Александровска»

Стоянова Гергана Петрова — Детская клиника, УМБАЛ «Александровска» Болгария, София 1431, Бул. Г. Софийски, №1

Стратева Тая Василева — кафедра микробиологии, Медицинский университет

Болгария, София 1431, ул. Здраве, №2

инфекции (в легких) при уменьшении их системного действия. Раствор тобрамицина для ингаляционного применения показан для длительного лечения хронических легочных инфекций, вызванных *Pseudomonas aeruginosa*, у больных муковисцидозом в возрасте 6 лет и старше. Тобрамицин применяют вне периода обострения [5]. Ингаляционное лечение тобрамицином в дополнение к стандартной антимикробной терапии муковисцидоза значительно улучшает показатель ОФВ₁ (объем форсированного выдоха за 1 с), уменьшает обсемененность мокроты *P. aeruginosa*, уменьшает частоту госпитализаций и необходимость внутривенного применения антимикробных средств [4]. Следует отметить, что при традиционной оценке антибактериальной чувствительности выделение чувствительных, среднечувствительных и резистентных штаммов, ориентировано на парентеральное и/или пероральное применение препаратов и не адаптировано для ингаляционного их применения. В случае последнего при оценке чувствительности следует исходить из критериев, предложенных MENSURA Group: чувствительные — при минимальной подавляющей концентрации (МПК) антибиотика ≤64 мг/мл; резистентные — при МПК ≥128 мг/мл [6, 7].

Цель: исследовать *in vitro* антибактериальную активность тобрамицина в отношении штаммов *P. aeruginosa*, выделенных у больных муковисцидозом, инфицированных или хронически колонизированных этим микроорганизмом, а также проанализировать связь активности антибиотика с морфотипом выделенного штамма и предшествующей терапией с включением тобрамицина.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Бактериологическое исследование. За период 4 лет из мокроты 25 пациентов (15 девочек и 10 мальчиков) с муковисцидозом выделено 40 штаммов *P. aeruginosa*. Бактериологическое выделение проводили на кровяном и шоколадном агаре, среде Сабуро и агаре Мак-Конки путем культивирования в течение 18–24 ч при температуре 35–37°C. Очень вязкую мокроту предварительно помещали в термостат (37°C) с панкреатином. Антибактериальную активность тобрамицина в отношении всех выделенных штаммов *P. aeruginosa* оценивали путем определения МПК методом high range (<0,064 — >1024 мг/мл) E-test (LIOFILCHEM, Италия).

Таблица. Антибактериальная активность тобрамицина в отношении выделенных респираторных штаммов *P. aeruginosa* (МПК-диапазон, МПК₅₀ и МПК₉₀, определенные через high range E-test; n=40)

МПК диапазон, мг/мл	МПК ₅₀ , мг/ мл	МПК ₉₀ , мг/ мл	CLSI			MENSURA	
			Количество штаммов, абс. (%)				
			S	I	R	S	R
<0,064 — >1024	0,75	3,00	≤4 мг/мл 37 (92,5)	6 мг/мл 1 (2,5)	≥8 мг/мл 2 (5,0)	≤64 мг/мл 38 (95,0)	≥128 мг/мл 2 (5,0)

Примечание. S — чувствительные; I — среднечувствительные; R — резистентные штаммы.

Критерии отбора клинически значимых штаммов: обнаружение *P. aeruginosa* в мокроте в течение предыдущих 12 мес; возраст пациента ≥6 лет; снижение ОФВ₁ в пределах (≥25% и ≤75%). Больных с обострением легочной инфекции в исследование не включали. В соответствии с международными согласительными документами по муковисцидозу (Cystic Fibrosis Foundation, Consensus Conference, 1994) диагностическими критериями обострения считали наличие не менее 3 из 11 следующих признаков: усиление кашля, увеличение количества мокроты, фебрильная лихорадка, потеря массы тела, пропуск занятий в школе или работы, снижение физической активности, затрудненное дыхание, появление в легких аускультативных и рентгенологических изменений, снижение ОФВ₁, анемия [8].

РЕЗУЛЬТАТЫ

По возрасту пациенты распределялись следующим образом: 6–10 лет — 9 детей, 11–15 лет — 17, 16–20 лет — 7, старше 20 лет — 7 больных. Распределение выделенных штаммов *P. aeruginosa* в соответствии с мукоидным/немукоидным морфотипом составило 19/21. Ранее в лечении тобрамицин использовался у 21 больного.

Общая антибактериальная активность тобрамицина в отношении выделенных респираторных штаммов *P. aeruginosa* (n=40)

МПК₅₀ и МПК₉₀ составили соответственно 0,75 и 3,0 мг/мл (табл. 1). Согласно критериям MENSURA Group, 95% штаммов характеризовались как «чувствительные» к тобрамицину. В соответствии со значениями, принятыми Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2007), чувствительность к антибиотику была ниже — 92,5%.

Сравнительная антибактериальная активность тобрамицина в отношении выделенных респираторных штаммов *P. aeruginosa* в зависимости от их морфотипа и предшествующего применения тобрамицина

Определенная *in vitro* антибактериальная активность тобрамицина (МПК₅₀ и МПК₉₀) была выше в отношении немуюкоидных штаммов в сравнении с мукоидными. Активность также была выше в от-

ношении штаммов *P. aeruginosa* у пациентов, ранее не применявших тобрамицин (рис. 1, 2).

Связь между антибактериальной чувствительностью к тобрамицину и длительностью колонизации/инфекцирования *P. aeruginosa* у пациентов с муковисцидозом

Не установлено значимых различий в распределении МПК, МПК₅₀ и МПК₉₀ на тобрамицин у штаммов, выделенных у пациентов четырех возрастных групп (рис. 3). Штаммы *P. aeruginosa*, выделенные из мокроты у пациентов старше 20 лет, с длительной колонизацией характеризовались низкими МПК (ниже 3 мг/мл).

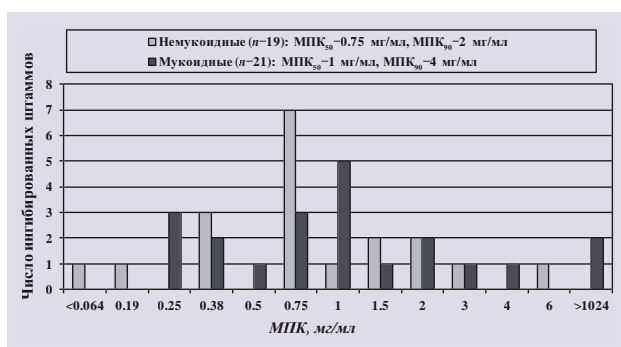


Рис. 1. Распределение МПК штаммов *P. aeruginosa* разных морфотипов.



Рис. 2. Распределение МПК штаммов *P. aeruginosa*, изолированных у пациентов с муковисцидозом, леченных с применением тобрамицина (Т) и без такового.

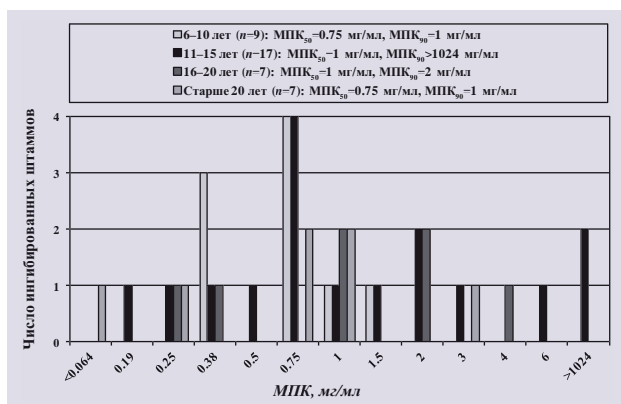


Рис. 3. Распределение МПК в зависимости от возраста пациентов.

ОБСУЖДЕНИЕ

E-test метод для определения МПК антимикробных лекарственных средств, основанный на концентрационном градиенте, дает четкие результаты и является легким для выполнения. Применение «high range tobramycin» стрипов при исследовании штаммов *P. aeruginosa* у пациентов с муковисцидозом гарантирует четкую оценку их чувствительности к стратегическим антибиотикам, так как нередко имеет место полирезистентность. Тестовые концентрации хорошо соотносятся с реальным уровнем антибиотика в бронхиальном секрете при ингаляционном применении тобрамицина [9].

Количество чувствительных к тобрамицину штаммов в настоящей работе (95%) идентично данным проведенного недавно исследования в Университетской больнице Мадрида (Испания) при применении критериев MENSURA Group [7]. Процент резистентности выделенных нами штаммов *P. aeruginosa* к тестируемому антибиотику в соответствии с CLSI-стандартами (МПК \geq 8 мг/мл) сходен с данными в отношении респираторных штаммов у пациентов с муковисцидозом, полученными из 17 больниц в Англии в 2000 г. (соответственно 5% и 10,1%) [10].

В литературе идет дискуссия, являются ли штаммы *P. aeruginosa* мукоидного фенотипа (продуцирующие слизь) более устойчивыми к антибактериальным средствам, по сравнению с немуккоидными. Большинство авторов считают, что резистентность мукоидных штаммов выше [11, 12]. Т. Mah и соавт. установили, что формируемый в респираторном тракте биофильм является проницаемым барьером для антимикробных средств, но, с другой стороны, существуют специфические генетические механизмы, которые обуславливают резистентность слизепродуцирующих (мукоидных) *P. aeruginosa*. Авторы открыли генетическую детерминанту (*ndvB* локус), кодирующую высокий уровень резистентности среди образующих биофильм штаммов. Локус *ndvB* ответствен за синтез периплазматических глюканов, которые препятствуют контакту тобрамицина с бактериальной стенкой. Недавно в *P. aeruginosa* идентифицирован новый эффлюкс-насос, участвующий в формировании биофильмспецифической резистентности к некоторым антибиотикам, включая тобрамицин [13].

Несмотря на то что мукоидные *P. aeruginosa* традиционно связывают с более высокой резистентностью к антибиотикам, опубликовано достаточное число научных сообщений, которые описывают большую чувствительность мукоидных *P. aeruginosa* у пациентов с муковисцидозом по сравнению с немуккоидными штаммами [14–16]. Более низкая антибактериальная активность тобрамицина в отношении штаммов *P. aeruginosa*, выделенных у пациентов с муковисцидозом, ранее леченных прерывистыми курсами тобрамицина (с циклом по 28 дней), не является неожиданной.

Такие же результаты получили J. Burns и соавт. [17]. В настоящем исследовании установлена трансформация немуконидных штаммов в мукоидные у 7 пациентов, леченных в течение 1–2 лет тобрамицином в ингаляциях. Недавно доказано, что субингибирующие концентрации аминогликозидов индуцируют образование биофильма у *P. aeruginosa* [18]; идентифицирован ген *ARR* (aminoglycoside response regulator), кодирующий биофильм-специфическую аминогликозидную резистентность. В отличие от низких МПК у наших пациентов старше 20 лет, 35,8% исследованных штаммов *P. aeruginosa*, выделенных у взрослых пациентов в Университетской больнице во Фрайбурге, оказались нечувствительными к тобрамицину (МПК > 4 мг/мл) по критериям CLSI [16]. Основная причина необычно высокой чувствительности к антибиотикам среди изолятов *P. aeruginosa* этой возрастной группы — антибактериальная политика в Болгарии (до 2008 г. больные с муковисцидозом старше 18 лет не получали тобрамицин).

ЛИТЕРАТУРА

1. *Спратева Т.* Pseudomonas aeruginosa — феномен на бактериална резистентност. Съвременна медицина 2007; 2: 25–40.
2. *Ratjen F., Döring G.* Cystic fibrosis (seminar). Lancet 2003; 361: 681–689.
3. *Henry R.L., Mellis C.M., Petrovic L.* Mucoid *Pseudomonas aeruginosa* is a marker of poor survival in cystic fibrosis. Pediatr Pulmonol 1992; 12: 158–161.
4. *Ramsey B.W., Pepe M.S., Quan J.M. et al.* Intermittent administration of inhaled tobramycin in patients with cystic fibrosis. N Engl J Med 1999; 340: 23–30.
5. *Cantón R., Cobos N., de Gracia J. et al.* Antimicrobial therapy for pulmonary pathogenic colonization and infection by *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis patients. Clin Microbiol Infect 2005; 11: 9: 690–703.
6. CLSI (2007). Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; 17th informational supplement. CLSI M100-S17. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne P. A. www.microbiolab-bg.com:CLSI.pdf
7. *Morosini M.I., García-Castillo M., Loza E. et al.* Breakpoints for predicting *Pseudomonas aeruginosa* susceptibility to inhaled tobramycin in cystic fibrosis patients: use of high-range Etest strips. J Clin Microbiol 2005; 43: 9: 4480–4485.
8. Cystic Fibrosis Foundation. 1994. Microbiology and infectious disease in cystic fibrosis. Consensus Conference: Concepts in Care. Vol. 5, section 1. Bethesda, MD: Cystic Fibrosis Foundation. www.cysticfibrosis.org.uk/
9. *Geller D.E., Pitlick W.H., Nardella P.A. et al.* Pharmacokinetics and bioavailability of aerosolized tobramycin in cystic fibrosis. Chest 2002; 122: 219–226.
10. *Pitt T.L., Sparrow M., Stefanidou M.* Survey of resistance of *Pseudomonas aeruginosa* from UK patients with cystic fibrosis to six commonly prescribed antimicrobial agents.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Тобрамицин показал *in vitro* высокую активность в отношении респираторных штаммов *P. Aeruginosa*, выделенных у пациентов с муковисцидозом. Антибактериальная активность тобрамицина зависела от морфотипа штамма и предшествующего лечения с применением тобрамицина. Не установлено связи между возрастом пациентов и чувствительностью выделенных штаммов *P. aeruginosa* к антибиотикам. При определении показаний к применению тобрамицина у больных с муковисцидозом «среднечувствительные или резистентные к тобрамицину по критериям CLSI» штаммы *P. aeruginosa* следует переоценить, исходя из критериев, предложенных MENSURA Groupe. Стандарты CLSI для определения антибактериальной чувствительности применимы только для внутривенно вводимого тобрамицина, применяемого при лечении нетяжелых инфекционных обострений у пациентов с муковисцидозом.

11. *Govan J.R., Deretic V.* Microbial pathogenesis in cystic fibrosis: mucoid *Pseudomonas aeruginosa* and *Burkholderia cepacia*. Microbiol Rev 1996; 60: 3: 539–574.
12. *Mah T.F., Pitts B., Pellock B. et al.* A genetic basis for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm antimicrobial resistance. Nature 2003; 426: 6964: 306–310.
13. *Zhang L., Mah T.F.* Involvement of a novel efflux system in biofilm-specific resistance to antibiotics. J Bacteriol 2008; 190: 13: 4447–4452.
14. *Ciofu O., Fussing V., Bagge N. et al.* Characterization of pared mucoid/non-mucoid *Pseudomonas aeruginosa* isolates from Danish cystic fibrosis patients: antibiotic resistance, β -lactamase activity and ribotyping. J Antimicrob Chemother 2001; 48: 3: 391–396.
15. *Shawar R.M., MacLeod D.L., Garber R.L. et al.* Activities of tobramycin and six other antibiotics against *Pseudomonas aeruginosa* isolates from patients with cystic fibrosis. Antimicrob Agents Chemother 1999; 43: 12: 2877–2880.
16. *Schülin T.* *In vitro* activity of the aerosolized agents colistin and tobramycin and five intravenous agents against *Pseudomonas aeruginosa* isolated from cystic fibrosis patients in southwestern Germany. J Antimicrob Chemother 2002; 49: 2: 403–406.
17. *Burns J.L., Van Dalen J.M., Shawar R.M. et al.* Effect of chronic intermittent administration of inhaled tobramycin on respiratory microbial flora in patients with cystic fibrosis. J Infect Dis 1999; 179: 5: 1190–1196.
18. *Hoffman L.R., D'Argenio D.A., MacCoss M.J. et al.* Aminoglycoside antibiotics induce bacterial biofilm formation. Nature 2005; 436: 7054: 1171–1175.

Поступила 06.04.14