

УДК 616-002.3-053.2-085.28

¹Давиденко В.Б., ¹Пащенко Ю.В., ¹Мишина М.М., ¹М'ясоєдов В.В., ¹Штикер С.Ю., ¹Давиденко Н.В.,
²Пащенко К.Ю.**Нова концепція підвищення ефективності протимікробної терапії гнійно-запальних захворювань у дітей**¹Харківський національний медичний університет, м. Харків, Україна²Обласна дитяча клінічна лікарня № 1, м. Харків, Україна

E-mail: davidenko47@mail.ua

Резюме. Гнійно-запальні захворювання є досить розповсюдженими серед усіх хірургічних захворювань у дітей. Етіологічною при лікуванні цих ускладнень є протимікробна терапія. Сучасні патогенні мікроорганізми володіють високим ступенем лікарської стійкості до протимікробних препаратів, що суттєво знижує ефективність лікування, сприяє розповсюдженню інфекції та розвитку гнійно-запальних ускладнень.

Мета дослідження: вивчити особливості продукції факторів патогенності *S.aureus* протягом доби та визначити на цій основі напрямки підвищення ефективності протимікробної терапії гнійно-запальних захворювань у дітей.

Матеріал і методи дослідження. Експериментальні мікробіологічні дослідження *in vitro* з вивчення добової динаміки факторів патогенності збудників гнійно-запальних захворювань у дітей. Матеріалом для дослідження служили: ранова тканина, гнійний ексудат, перев'язувальний та шовний матеріал, катетери й дренажні конструкції.

Результати та обговорення. Мікробіологічні дослідження показали, що лікарська стійкість патогенних мікроорганізмів створюється за рахунок продукції різноманітних факторів агресії мікроорганізмів, в тому числі утворення біоплівки. Проведені дослідження довели, що рівень продукції факторів патогенності та чутливість *S. aureus* до протимікробних препаратів не однакові протягом доби. Зафіксовані піки підвищення адгезивної активності, вмісту тейхоєвих кислот, продукції планктонних клітин й формування щільних біоплівок *S. aureus* залежать від часу введення протимікробних препаратів та максимальної концентрації препарату в організмі.

Висновки. Виявлена закономірність дозволила розробити нову концепцію підвищення ефективності лікування гнійно-запальних захворювань у дітей, а саме – зміну часу введення протимікробних засобів протягом доби з таким розрахунком, щоб період максимальної їх дії співпадав з періодами мінімальної лікарської стійкості патогенів. Це дозволяє суттєвим чином підвищити ефективність протимікробної терапії, не збільшуючи дозу препаратів, що вводять.

Ключові слова: гнійно-запальні захворювання, діти, біоплівки, біоритми.

Постановка проблеми і аналіз останніх досліджень.

Гнійно-запальні процеси (ГЗП), як ускладнення після хірургічного втручання, складають значний відсоток усіх хірургічних захворювань у дітей. Такі захворювання, як гострі перитоніти, деструктивні пневмонії, гострий гематогенний остеомієліт мають тяжкий перебіг, нерідко ускладнюються та можуть приводити до несприятливих наслідків [7].

Одним з основних чинників таких явищ є висока лікарська стійкість сучасних патогенних мікроорганізмів до протимікробних засобів, що значною мірою знижує ефективність терапії [8, 12].

Внаслідок цього, незважаючи на розробку сучасних препаратів та впровадження новітніх технологій для боротьби з патогенними мікроорганізмами, питання терапії гнійно-запальних захворювань залишається відкритим [1, 2, 11].

Експериментальні дані останніх десятиріч свідчать про складну організацію мікробних спільнот у природних умовах існування. Збудники утворюють навколо себе захисну біоплівку й успішно охороняють себе від дезінфектантів та протимікробних засобів [3, 5, 7, 10].

Формування біоплівки патогенними мікроорганізмами значно ускладнює лікування гнійно-запальних процесів, зумовлених ними [3, 4, 5]. Це є наслідком значного

підвищення стійкості мікроорганізмів до протимікробних препаратів, оскільки у формі біоплівки мікроорганізмами реалізуються процеси, які практично не відбуваються у вільних формах існування [9].

Великою проблемою є те, що біоплівки утворюються на поверхні виробів медичного призначення – катетерах, ендопротезах, ендотрахеальних трубках, імплантатах, хірургічних нитках та ін. Це стає загрозою тяжких ускладнень гнійно-запальних процесів, основою несприятливого перебігу післяопераційного періоду та формування хронічних осередків запалення [10].

Для сучасного етапу розвитку мікробіології цікавими є дослідження біологічних властивостей мікроорганізмів щодо виявлення їх коливань протягом доби. Дослідники припускають, що у бактерій існують біологічні ритми [4]. Вивчення біоритмічних властивостей мікроорганізмів відкриває нові можливості у вирішенні ряду як загальнобіологічних, так і медичних проблем, а саме – визначення механізмів адаптації, лікарської стійкості у мікроорганізмів та діагностики, лікування й профілактики гнійно-запальних захворювань у дітей.

У цьому сенсі вивчення продукції факторів патогенності клінічних штамів на прикладі основного патогену внутрішньолікарняних інфекцій – *S. aureus* протягом доби, дозволить по-новому підійти до оцінки біологічних властивостей збудника, сприяючи розробці раціональних підходів до мікробіологічної діагностики гнійно-запальних нозокоміальних інфекцій, створення передумов для подальших досліджень щодо здійснення ефективних протимікробних засобів і до більш повної характеристики механізмів, що сприяють розвитку інфекційної патології.

В цьому сенсі цікавим з наукової та практичної точки зору є вивчення основних факторів патогенності *S. aureus* протягом доби, як наслідок відповіді на дію протимікробних препаратів.

Мета дослідження – вивчити особливості продукції факторів патогенності *S. aureus* протягом доби та визначити на цій основі напрямки підвищення ефективності протимікробної терапії гнійно-запальних захворювань у дітей.

Матеріал і методи дослідження

Предметом мікробіологічного дослідження були: референтний штам *S.aureus* (ATCC 25923=NCDC 25923=F-49) й клінічні штам, виділені з венфлонів, дренажних конструкцій та катетерів (n=10) й з клінічного матеріалу від хворих дітей з гнійно-запальними процесами (n=10), які знаходились у КЗОЗ «Обласна дитяча клінічна лікарня № 1» м. Харкова. Матеріалом для дослідження служили: ранова тканина, гнійний ексудат, перев'язувальний та шовний матеріал, катетери й дренажні конструкції. Ферментативну ідентифікацію проводили за допомогою ідентифікаційних наборів МІКРО-ЛА-ТЕСТ. Чутливість ізолятів до протимікробних засобів з різним механізмом дії на мікробну клітину вивчали за допомогою мікротестсистеми з напівкількісною реєстрацією результатів «ТНКтестГр+». Утворення біоплівок вивчали на поверхні полістиролових планшетів [6]. Вимірювали оптичну щільність розчину бактерій на спектрофотометрі «Multiskan EX 355» при довжині хвилі 540 нм.

Результати та обговорення

Адгезія є початковим етапом будь-якого інфекційного процесу. Патогенетичні механізми гнійно-запальних процесів, зумовлених *S. aureus*, пов'язані з особливостями

збудника, який використовує декілька механізмів для подолання протимікробного захисту макроорганізму. Такими механізмами є адгезія, інвазія, продукція ферментів агресії. У *S. aureus* механізм адгезії реалізується за допомогою поверхневих структур й факторів адгезії: полісахариди, білок А, тейхоєві кислоти тощо. При визначенні адгезивної активності *S. aureus* було встановлено, що вона залежить від часу доби. Так, штами *S. aureus*, що були вилучені від хворих на ГЗП, проявляли найвищу активність о 12⁰⁰ (7,19±0,19 од.ощ.) й о 21⁰⁰ (7,42±0,48 од.ощ.) годині порівняно з активністю о 6⁰⁰ та о 18⁰⁰ (2,5±0,18 од.ощ. й 2,31±0,23 од.ощ. відповідно), коли спостерігалася тенденція до зниження індексу адгезивності *S. aureus*. Найбільш високоадгезивні штами були зареєстровані при виділенні *S. aureus* з венфлонів й дренажних конструкцій о 12⁰⁰ (7,69±0,14 од.ощ.) й 21⁰⁰ (7,84±0,15 од.ощ.) годині.

Дослідження добової динаміки вмісту тейхоєвих кислот *S. aureus* дозволили виявити (рис. 1) максимальне значення у клінічних штамів *S. aureus*, що були вилучені від хворих з ГЗП, зареєстровано о 12⁰⁰ (0,95±0,08 од.ощ.) й 21⁰⁰ (0,89±0,04 од.ощ.). Клінічні штами *S. aureus*, що вилучені з венфлонів, відрізнялися коливаннями до меншого вмісту тейхоєвих кислот о 6⁰⁰ (0,29±0,06 од.ощ.) й 18⁰⁰ (0,31±0,05 од.ощ.) та максимальним вмістом о 12⁰⁰ (0,94±0,06 од.ощ.) й 21⁰⁰ (0,98±0,06 од.ощ.), що дозволяє виявити інформативні критерії для оцінки найбільш ранніх змін показників фізіологічної активності збудників, а також визначити механізми адаптивних реакцій мікроорганізмів на дію протимікробних препаратів.

Дослідження добової динаміки утворення щільних біоплівки клінічними штамами *S. aureus* та продукції планктонних клітин із здатністю формувати нові біоплівки дозволили виявити (рис. 2), що максимальний показник утворення добових щільних біоплівок з продукцією планктонних клітин клінічних штамів *S. aureus* зареєстровано о 12⁰⁰ й 21⁰⁰. Спостерігається тенденція до

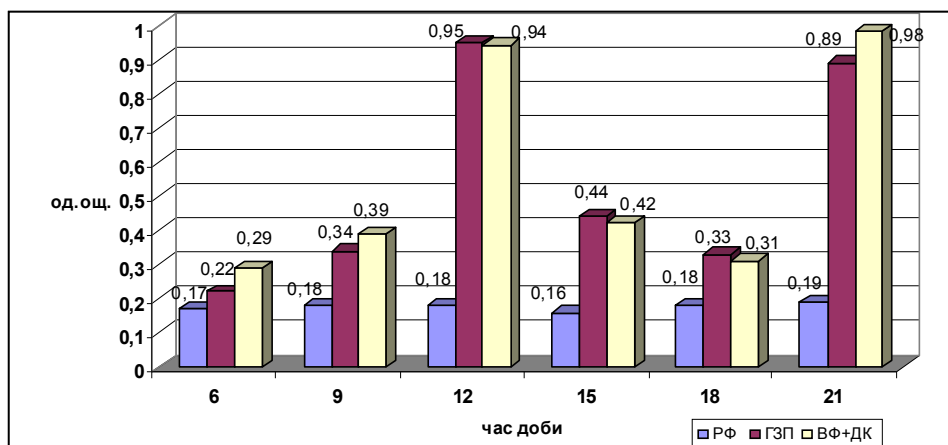


Рис. 1. Добова динаміка вмісту тейхоєвих кислот *S. aureus*

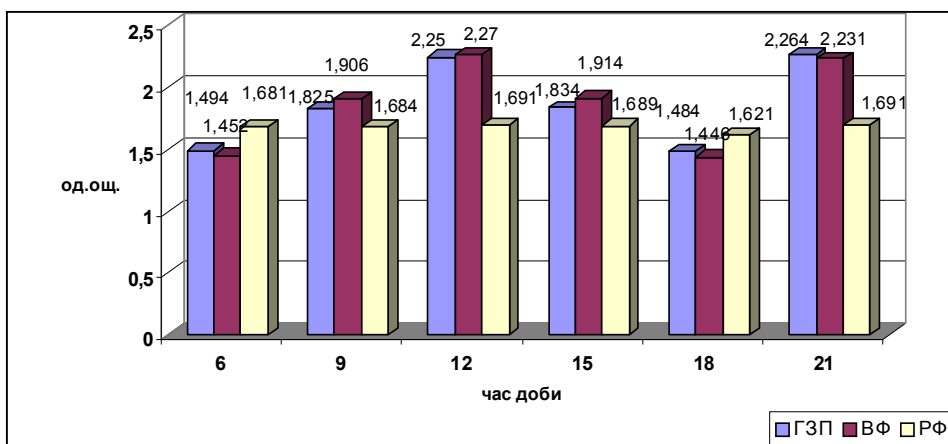


Рис. 2. Добова динаміка формування біоплівок клінічними штамами *S. aureus*

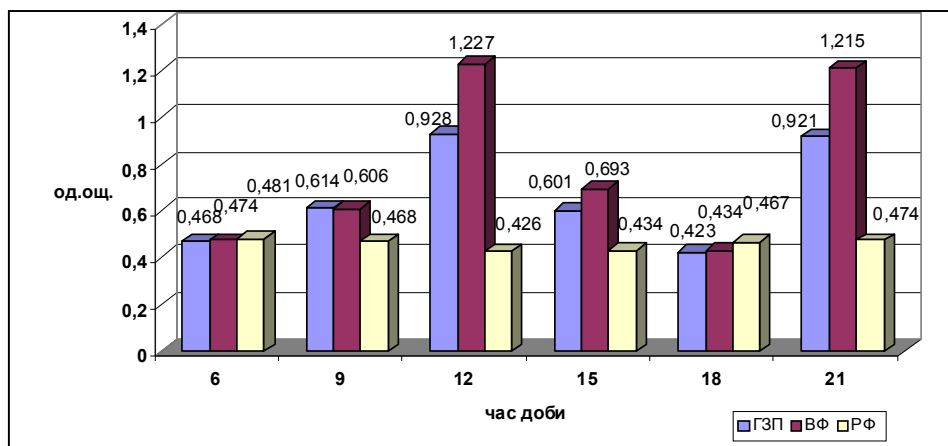


Рис. 3. Добова динаміка продукції планктонних клітин біоплівками клінічних штамів *S. aureus*

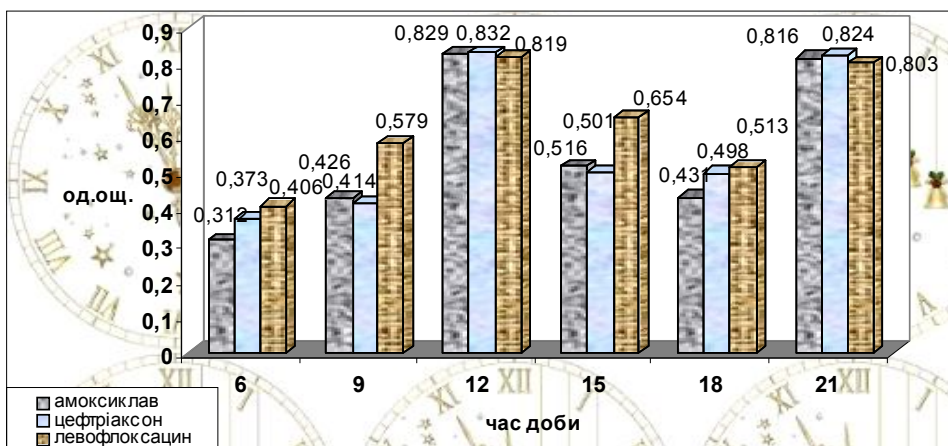


Рис. 4. Вплив протимікробних препаратів на планктонні клітини клінічних штамів *S. aureus* залежно від часу доби

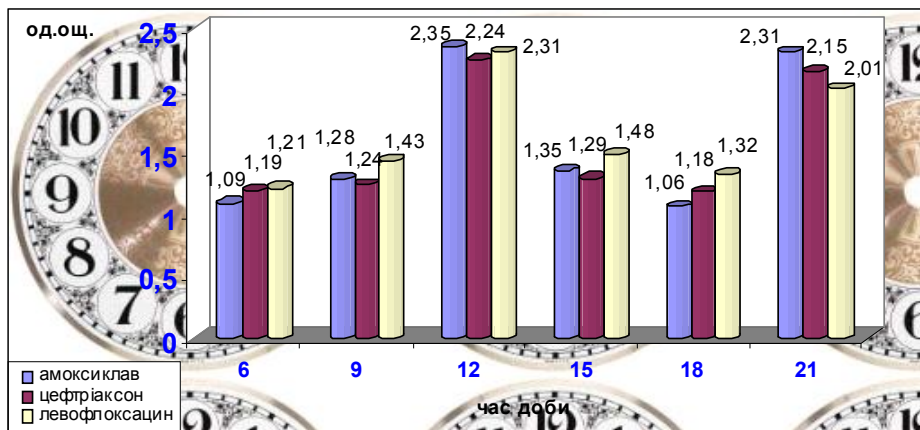


Рис. 5. Вплив протимікробних препаратів на добові біоплівки клінічних штамів *S. aureus* залежно від часу доби

меншої щільності утворення біоплівки зі зниженням активності продукції планктонних клітин о 6⁰⁰ й о 18⁰⁰ (рис. 3).

Отже, утворення біоплівки бактерій залежить від адгезивних властивостей патогену та вмісту тейхоевих кислот у *S. aureus* з кінцевою стадією розвитку, що полягає у дисперсії бактерій: в результаті репродукції бактеріальних клітин періодично від біоплівки відриваються окремі клітини, здатні через деякий час прикріпитися до поверхні слизових оболонок, медичного обладнання, катетерів тощо та утворювати нові колонії, а згодом й щільні біоплівки. Добова динаміка утворення щільних біоплівки з наступною продукцією планктонних клітин клінічними штамми *S. aureus* спостерігається о 12⁰⁰ й 21⁰⁰, що свідчить про адаптивну реакцію патогенів, яка пов'язана фенотипічною мінливістю й формуванням стійкості до антимікробних препаратів клінічними штамми у формі біоплівки. Зниження активності продукції планктонних клітин ізолятами зареєстровано о 6⁰⁰ й о 18⁰⁰, порівняно з утворенням біоплівки референтним штамом *S. aureus*, у якого коливання оптичної щільності біоплівки й продукції планктонних клітин достовірно не відрізняються протягом доби.

На сьогодні у клінічній практиці найчастіше використовуються протимікробні препарати з групи фторхінолонів – левофлоксацин та І-лактамі антибіотики – цефтріаксон й амоксицилін, які є препаратами широкого спектру дії й до яких тривалий час зберігається висока чутливість у багатьох мікроорганізмів. Завданням наступного дослідження було виділення ізолятів *S. aureus* з визначенням добової динаміки продукції планктонних клітин та утворення біоплівки під впливом протимікробних препаратів.

У результаті дослідження встановлено, що о 12⁰⁰ й о 21⁰⁰ годинах відзначалась висока стійкість клінічних штамів *S. aureus* як у планктонній формі (рис. 4), так й у формі біоплівки (рис. 5) до усіх антимікробних препаратів, що були взяті у дослід. Слід зазначити, що о 6⁰⁰ й о 18⁰⁰ спостерігається підвищення чутливості клінічних штамів до антимікробних препаратів, що можна пояснити тим, що у цей час доби зареєстровано зниження здатності формувати біоплівку ізолятами.

Отже, при визначенні дії протимікробних препаратів, які досить часто застосовуються у медичній практиці при терапії гнійно-запальних процесів, залежно від форми існування *S. aureus* та часу культивування протягом доби встановлено, що лікарська стійкість *S. aureus* пов'язана з підвищенням адгезивної активності, продукцією тейхоевих кислот та формуванням щільної біоплівки у певний час доби.

Таким чином, проведені дослідження біоритмічних властивостей патогенних мікроорганізмів на прикладі клінічних штамів *S. aureus* встановили, що під впливом протимікробної терапії патогенні мікроорганізми синхронно

з часами максимальної концентрації протимікробних препаратів в організмі, а саме о 12⁰⁰ та 21⁰⁰ годині підвищують продукцію факторів патогенності, тим самим суттєво посилюють свою лікарську стійкість, отже знижують ефективність протимікробної терапії.

В той же час, о 6⁰⁰ та о 18⁰⁰ годинах, коли концентрація протимікробних засобів в крові та тканинах знижується, зафіксовані піки зниження адгезивної активності та зменшення щільності біоплівки, що відображається на підвищенні чутливості клінічних штамів до протимікробних засобів.

Отже проведені дослідження показали, що патогенні мікроорганізми здійснюють свій захист від протимікробних засобів шляхом модифікаційної мінливості з активним біоплівкоутворенням.

Встановлено, що рівень продукції факторів патогенності змінюється протягом доби і залежить від часу введення протимікробних засобів.

Експериментально доведено, що на прикладах клінічних штамів *S. aureus*, виділених у дітей, хворих на гнійно-запальні захворювання, в певному клінічному стаціонарі з певним ритмом введення протимікробних засобів найнижчий рівень продукції факторів патогенності зафіксований о 6⁰⁰ та 18⁰⁰.

Таким чином, виявлені добові біоритми продукції факторів патогенності клінічними штамми мікроорганізмів, збудників гнійно-запальних захворювань у дітей вказують на необхідність розробки поряд з відомими методами боротьби з лікарською стійкістю патогенних мікроорганізмів таких, як періодична заміна антибіотиків певного напрямку нової стратегії лікування, а саме – періодичної зміни часу введення протимікробних засобів протягом доби з таким розрахунком, щоб максимальна концентрація препаратів у плазмі крові співпадала в часі з мінімальною продукцією факторів патогенності, коли проявляється максимальна чутливість мікроорганізмів до протимікробних засобів, що суттєво підвищує ефективність лікування при використанні звичайних терапевтичних доз антибактеріальних препаратів.

Висновки

1. Патогенні мікроорганізми проявляють свою лікарську стійкість шляхом продукції факторів патогенності та формування щільних біоплівки.
2. Продукція факторів патогенності нерівномірна протягом доби. Найвищий рівень зафіксований о 12⁰⁰ та 21⁰⁰. Зниження активності продукції факторів патогенності зареєстровано о 6⁰⁰ та 18⁰⁰.
3. Виявлена добова динаміка продукції факторів патогенності та лікарської стійкості патогенних мікроорганізмів вказує на необхідність зміни часу введення протимікробних засобів з таким розрахунком, щоб період максимальної дії препаратів (максимальна концентрація їх в організмі) співпадав з періодами мінімальної лікарської стійкості патогенів.

Література

1. Биоритмы антибиотикорезистентности микроорганизмов / О. В. Бухарин, Н. Б. Перунова, С. Б. Фадеев [и др.] // Журн. микробиол. эпидемиол. иммунобиол. – 2008. – № 5. – С. 35–38.
2. Вознесенский Н. А. Биопленки – терапевтическая мишень при хронических инфекциях / Н. А. Вознесенский // Пульмонология и аллергология. – 2008. – № 3. – С. 56–64.
3. Ильина Т. С. Биопленки как способ существования бактерий

в окружающей среде и организме хозяина: феномен, генетический контроль и системы регуляции их развития / Т. С. Ильина, Ю. М. Романова, А. Л. Гинцбург // Генетика. – 2004. – Т. 40, № 11. – С. 1445–1456.

4. Мавров И. И. Биопленки и Quorum sensing у микроорганизмов. Биопленки и проблема эффективности антибактериальной терапии / И. И. Мавров, В. Н. Васильченко, А. П. Белозеров // Дерматология та венерология. – 2007. – № 4(38). – С. 19–22.

5. Мошквич И. Р. Микробные биопленки при смешанных инфекциях: автореф. дис. на здобуття наук ступеня канд. мед. наук: спец. 03.00.07 «Мікробіологія» / И. Р. Мошквич. – СПб, 2007. – 20 с.

6. Пат. на корисну модель 47944, Україна, МПК G09B 23/00. Спосіб відтворення біоплівок мікроорганізмів in vitro / А. Я. Циганенко, М. М. Мішина, Р. А. Курбанов (UA); Харк. нац. мед. ун-т. – № у 2009 10353; Заявл. 12.10.2009; Опубл. 25.02.2010; Бюл. № 4.

7. Полиморфизм гнойной инфекции у детей и результаты ее постоянного мониторинга / С. Н. Гисак, Г. С. Большова, В. М. Гаглоев [и др.] // Современные технологии в педиатрии и детской хирургии: материалы VI Российского конгресса, 23–25 окт. 2007 г. – М., 2007. – С. 243–444.

8. Самарин Д. В. Антибіотикорезистентність у хірургії: механізми формування та підходи до визначення / Д. В. Самарин, О. О. Юхименко // Хірургія дитячого віку. – 2012. – № 2. – С. 79–83.

9. Bacterial communication («quorum sensing») via ligands and receptors: a novel pharmacologic target for design of antibiotic drugs / R. B. Raffa, J. R. Iannuzzo, D. R. Levine [et al.] // J. Pharmacol. Exp. Ther. – 2005. – Vol. 312, № 2. – P. 417–423.

10. Bauer W. D. Disruption of bacterial quorum sensing by other organisms / W. D. Bauer, J. B. Robinson // Curr. Opin. Biotechnol. – 2002. – Vol. 13. – P. 234–237.

11. Emergence of a new antibiotic resistance mechanism in India, Pakistan, and the UK: a molecular, biological, and epidemiological study / K. K. Kumarasamy, M. A. Toleman, T. R. Walsh [et al.] // Lancet Infect. Dis. – 2010. – Vol. 10, № 9. – P. 597–602.

12. The epidemic of antibiotic-resistant infections: a call to action for the medical community from the Infectious Disease Society of America / B. Spellberg, R. Guidos, D. Gilbert [et al.] // Clin. Infect. Dis. – 2008. – Vol. 46, № 2. – P. 155–164.

¹Давиденко В.Б., ¹Пащенко Ю.В., ¹Мишина М.М., ¹Мясоедов В.В., ¹Штыкер С.Ю., ¹Давиденко Н.В., ²Пащенко К.Ю.

Новая концепция повышения эффективности противомикробной терапии гнойно-воспалительных заболеваний у детей

¹Харьковский национальный медицинский университет, г. Харьков, Украина

²Областная детская клиническая больница № 1, г. Харьков, Украина

Резюме. Гнойно-воспалительные заболевания достаточно распространены среди всех хирургических заболеваний у детей. Этиологической при лечении этих заболеваний является противомикробная терапия. Современные патогенные микроорганизмы обладают высокой степенью лекарственной устойчивости к противомикробным препаратам, что существенно снижает эффективность лечения, способствует распространению инфекции и развитию гнойно-воспалительных осложнений.

Цель исследования: изучить особенности продукции факторов патогенности *S.aureus* в течение суток и определить на этой основе направления повышения эффективности противомикробной терапии гнойно-воспалительных заболеваний у детей.

Материал и методы исследования. Экспериментальные микробиологические исследования in vitro по изучению суточной динамики факторов патогенности возбудителей гнойно-воспалительных заболеваний у детей. Материалом для исследования служили: раневая ткань, гнойный экссудат, перевязочный и шовный материал, катетеры и дренажные конструкции.

Результаты исследования. Микробиологические исследования показали, что лекарственная устойчивость патогенных

микроорганизмов реализуется за счет продукции различных факторов агрессии, в том числе и образования биопленок. Проведенные нами исследования показали, что уровень продукции факторов патогенности и чувствительность *S. aureus* к противомикробным препаратам не одинаковы на протяжении суток. Зафиксированные пики повышения адгезивной активности, содержания тейхоевых кислот, продукции планктонных клеток и формирования плотных биопленок *S. aureus* зависят от времени введения противомикробных препаратов и максимальной концентрации препарата в организме.

Выводы. Обнаруженная закономерность позволила разработать новую концепцию повышения эффективности лечения гнойно-воспалительных заболеваний у детей. Суть ее заключается в изменении времени введения противомикробных средств на протяжении суток с таким расчетом, чтобы период максимального их действия совпадал с периодами минимальной лекарственной устойчивости патогенов. Это позволяет существенно повысить эффективность противомикробной терапии, не прибегая к увеличению доз вводимых препаратов.

Ключевые слова: гнойно-воспалительные заболевания, дети, биопленки, биоритмы.

V.B Davydenko¹, M.M. Mishyna¹, V.V. Myasoedov¹, Yu.V. Pashchenko¹, S.Yu. Shyker¹, N.V. Davydenko¹, K.Yu. Pashchenko²

A New Concept of Enhancing the Efficacy of Antimicrobial Therapy of Pyo-Inflammatory Diseases in Children

Kharkiv National Medical University, Kharkiv, Ukraine

Regional Children Clinical Hospital No 1, Kharkiv, Ukraine

E-mail: davidenko47@mail.ua

Abstract. Pyo-inflammatory diseases are quite common among various surgical diseases in children. Etiotropic antimicrobial therapy of these conditions is of primary importance. Modern pathogenic bacteria possess a high degree of drug resistance to antimicrobials, which significantly reduces the effectiveness of treatment and contributes to the spread of infection and the development of pyo-inflammatory complications.

The objective of the research was to study peculiar properties of production of virulence factors by *S. aureus* within 24 hours as well as to determine on this basis the directions of improving the efficiency of antimicrobial therapy of pyo-inflammatory diseases in children.

Materials and methods. There were conducted in vitro experimental microbiological studies concerning the study of the daily dynamics of virulence factors of causative agents of purulent-inflammatory diseases in children. The materials for the study were as follows: wound tissues, purulent exudate, dressings and suture material, catheters and drainage elements.

Results. Microbiological studies revealed that drug resistance of pathogenic microorganisms originates from the production of various factors of bacterial aggression including the formation of biofilms. The study showed that the level of production of virulence factors and the sensitivity of *S. aureus* to antimicrobial agents were not constant over the day. Recorded peaks of increasing adhesive activity, teichoic acids content, production of planktonic cells and formation of dense biofilms by *S. aureus* depended on the time of administration of antimicrobials and maximum concentration of the medication in an organism.

Conclusions. The regularity observed allowed us to develop a new concept to increase the efficiency of treatment of pyo-inflammatory diseases in children by means of change in the time for administration of antimicrobial agents during the day so that the period of maximum action would coincide with periods of minimal drug resistance of pathogens. This will allow us to significantly improve the effectiveness of antimicrobial therapy without increasing doses of medications that are administered.

Keywords: pyo-inflammatory diseases; children; biofilms; biorhythms.

Надійшла 28.07.2016 року.