

DOI: 10.31393/reports-vnmedical-2020-24(1)-21

УДК: 579:547.962.9:616-08

МІКРОБІОЛОГІЧНЕ ОБҐРУНТУВАННЯ АНТИМІКРОБНОГО ЛІКУВАННЯ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО ПСЕВДОМОНАДНОГО КЕРАТИТУ

Вовк І.М., Кривецька Н.В., Буркот В.М., Дудар А.О., Кулик А.В.

Вінницький національний медичний університет ім. М.І. Пирогова, (вул. Пирогова, 56, м. Вінниця, Україна, 21018)

Відповідальний за листування:
e-mail: vovk.in2017@gmail.com

Статтю отримано 02 грудня 2019 р.; прийнято до друку 03 січня 2020 р.

Анотація. Бактеріальні кератити посідають друге місце в структурі мікробних уражень рогівки після вірусних кератитів, характеризуються важким перебігом і нерідко призводять до ускладнень, які потребують оперативних втручань на апараті зору. *P. aeruginosa* є основним збудником кератиту, пов'язаним із використанням контактних лінз. Метою нашої роботи було мікробіологічно обґрунтувати можливості комбінованого застосування фторхінолонів, тобраміцину та антисептика декаметоксину для лікування експериментального псевдомонадного кератиту. Дослідження проводили на чутливих та резистентних до досліджуваних антимікробних сполук клінічних штамів *P. aeruginosa*. Статистичний аналіз отриманих результатів здійснювали за допомогою стандартних пакетів програм "STATISTICA+" та "Microsoft Excel 2010". Вираховували середнє арифметичне значення (\bar{X}), середнє квадратичне відхилення (σ). У результаті проведеного дослідження показане підвищення чутливості резистентних до фторхінолонів та аміноглікозидів клінічних штамів синьогнійної палички в 2-4 рази в присутності суббактеріостатичних концентрацій декаметоксину. В очних краплях офтаквікс, флоксімед та тобрекс антибіотики містяться в кількості, яка забезпечує вплив як на чутливі, так і на резистентні штами *P. aeruginosa* in vitro. Виявлений синергізм дії антибіотиків та антисептику дає підстави для подальшого дослідження впливу комбінованої етіотропної терапії на перебіг експериментального кератиту, викликаного *P. aeruginosa*.

Ключові слова: *Pseudomonas aeruginosa*, офтаквікс, флоксімед, тобрекс, офтальмодек, кератит.

Вступ

В Україні в структурі мікробних уражень рогівки бактеріальний кератит посідає друге місце [2]. Грампозитивні мікроорганізми (*S. aureus*, коагулазо-негативні стафілококи, *S. pneumoniae* та ін.) виділяються в 46,4-50% позитивних бактеріальних культур [2, 9], однак грам-негативні неферментуючі бактерії, лідером серед яких є *P. aeruginosa*, посідають друге місце і виділяються в 22-38,6% випадків [7]. Частота виділення *P. aeruginosa* зростає до 55-73,5% при бактеріальних ураженнях рогівки у носіїв контактних лінз [6, 10]. Застосування контактних лінз є одним із найпоширеніших сучасних методів корекції зору. Тільки в США контактні лінзи використовують більше 2 млн. осіб [10]. Основними антимікробними засобами для лікування псевдомонадних інфекцій ока є очні лікарські форми антибіотиків групи фторхінолонів (левофлоксацину, ципрофлоксацину, офлоксацину) та тобраміцину, які демонструють високу ефективність у боротьбі з *P. aeruginosa*, однак, незважаючи на лікування, виникають різноманітні ускладнення, які потребують оперативного лікування та пересадки рогівки [4]. Однак занепокоєння викликає явище формування резистентності у клінічних штамів збудника, яке набуває все більшого поширення в останні роки і зумовило внесення даного виду у список першочергової (критичної) пріоритетності щодо необхідності пошуку нових антибіотиків [8]. Виходячи з вище викладеного, наразі є актуальним вдосконалення існуючих методів лікування псевдомонадної інфекції ока на моделі експериментального псевдомонадного кератиту з метою подолання або попередження можливого розвитку резистентності збудника в процесі лікування. Комбіноване застосування антибіотиків

та антисептиків підвищує ефективність лікування бактеріальних захворювань та позбавлене небажаних побічних впливів на епітеліальні клітини ока [3]. Метою нашої роботи було мікробіологічно обґрунтувати переваги комбінованої терапії експериментального псевдомонадного кератиту з використанням лікарських форм фторхінолонів, тобраміцину та декаметоксину, що рекомендовані до застосування в офтальмологічній практиці, в порівнянні з антимікробним впливом на *P. aeruginosa* окремих препаратів антибіотиків та антисептиків.

Матеріали та методи

Вивчення антипсевдомонадної дії лікарських очних форм антибіотиків та антисептику декаметоксину проводили на референс-штамі *P. aeruginosa* ATCC 27853 та 10 клінічних штамів *P. aeruginosa*, виділених від хворих з гнійно-запальними процесами м'яких тканин та опікової поверхні, які зберігаються у музеї культур бактеріологічної лабораторії Вінницького національного медичного університету ім. М.І. Пирогова.

Для дослідження були обрані наступні очні форми антибіотиків:

- 1) Офтаквікс - краплі очні 0,5% (левофлоксацину 5мг/мл) у флаконі-крапельниці, виробник Сантен АО (Фінляндія)
- 2) Флоксімед - краплі очні/вушні 0,3% (ципрофлоксацину 3 мг/мл) у флаконі крапельниці, виробник World Medicine Ophthalmics Limited
- 3) Тобрекс - краплі очні 0,3% (тобраміцину 3 мг/мл), виробник Novartis Pharma
- 4) Офтальмодек - краплі очні 0,02% (декаметоксину 0,2 мг/мл), виробник ОЗ ГНЦЛС ТОВ Здоров'я.

Мікробіологічні дослідження проводили у бактеріологічній лабораторії ВНМУ ім. М.І. Пирогова. Дослідження проводили методом стандартних серійних розведень препарату в рідкому поживному середовищі (м'ясо-пептонний бульйон, МПБ) для визначення мінімальної пригнічуючої концентрації (МПК) антимікробної речовини з наступним висівом на щільне поживне середовище (м'ясо-пептонний агар, МПА) для визначення мінімальної бактерицидної концентрації (МЦК) антибіотика або антисептика згідно стандартної методики [1]. Із дослідних штамів готували суспензію в стерильному ізотонічному розчині, мутність якої відповідала стандарту мутності 0,5 одиниць за МакФарландом ($1,5 \times 10^8$ КУО/мл), з якої готували робочу суспензію $1,5 \times 10^6$ КУО/мл і вносили у кількості 0,2 мл у 2 мл розчину антибіотика різної концентрації у МПБ.

Результати. Обговорення

Клінічні штамів були розділені на дві групи згідно результатів попереднього визначення антибіотикочутливості диско-дифузійним методом. Перша група включала 5 штамів *P. aeruginosa*, які були помірно-чутливими до ципрофлоксацину, левофлоксацину та чутливими до тобраміцину, друга група складалась із 5 клінічних штамів, які були резистентними до вищезначених антибіотиків. Результати визначення антибіотикочутливості диско-дифузійним методом наведені в таблиці 1.

Розподіл штамів на групи здійснювався згідно критеріїв чутливості *P. aeruginosa* до антибіотиків наведених в рекомендаціях EUCAST щодо трактовки результатів

Таблиця 1. Антибіотикочутливість штамів *P. aeruginosa*, визначена диско-дифузійним методом.

Мікроорганізми	Діаметр зони затримки росту (мм, $\text{Хср} \pm \sigma$)		
	левофлоксацин	ципрофлоксацин	тобраміцин
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	26	28	20
<i>P. aeruginosa</i> (I група)	$26,8 \pm 1,85$	$27,6 \pm 1,2$	$19,2 \pm 0,8$
<i>P. aeruginosa</i> (II група)	$10,4 \pm 1,4$	$10,6 \pm 1,2$	$11,4 \pm 1,7$

антибіотикочутливості, визначених диско-дифузійним методом [4].

Результати вивчення чутливості музейного та клінічних штамів синьогнійної палички до активних компонентів очних крапель методом послідовних розведень наведені в таблиці 2.

Як демонструють наведені результати клінічні штамів синьогнійної палички, які були помірно-чутливими до левофлоксацину, пригнічували свій ріст у концентраціях антибіотика, яка була меншою за концентрацію фторхінолона в очних краплях майже в 31 000 разів, а резистентні до дії антибіотика, відповідно, в 116 разів. Мінімальні пригнічуючі концентрації ципрофлоксацину знаходились у межах 0,04 мкг/мл для чутливих штамів і 30,5 мкг/мл для резистентних штамів, що було менше за концентрацію антибіотика в лікарських формі в 75 000 та 98 разів, відповідно. Очні краплі, які містили тобраміцин, мали також досить високий резерв впливу на клінічні штамів *P. aeruginosa* обох груп - концентрація антибіотика в препараті перевищувала МПК в 120 тисяч та 200 разів для першої та другої груп клінічних штамів відповідно. Навіть резистентні до антибіотиків штамів гинули при концентраціях левофлоксацину, ципрофлоксацину та тобраміцину, які були менше за дозу антибіотика в лікарській формі 29, 35,5 та 40 разів відповідно. Мінімальна бактериостатична дія декаметоксину в очних краплях офтальмодек визначалась у концентрації близько 45-70 мкг/мл для клінічних штамів *P. aeruginosa*, що було в 4 та 2,9 разів менше за концентрацію антисептика в препараті. Бактерицидний ефект спостерігався при середній концентрації $70 \pm 12,3$ мкг/мл для першої групи клінічних штамів, а група резистентних до антибіотиків мікроорганізмів не знищувалась при концентраціях декаметоксину 100 мкг/мл. Для вивчення ефекту одночасного впливу антибіотиків та антисептиків на різні за чутливістю штамів синьогнійної палички нами було проведено дослідження антимікробної активності крапель у середовищі, яке містило суббактеріостатичну концентрацію декаметоксину у кількості 20 мкг/мл (доза визначена на підставі отриманих нами результатів). Антибіотикочутливість клінічних штамів *P. aeruginosa* наведена в таблиці 3.

Таблиця 2. Чутливість штамів *P. aeruginosa* до очних лікарських форм (концентрації наведені в мкг/мл, $\text{Хср} \pm \sigma$).

Мікроорганізм	Офтаквікс		Флоксимед		Тобрекс		Офтальмодек	
	МПК	МЦК	МПК	МЦК	МПК	МЦК	МПК	МЦК
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	0,039	0,075	0,045	0,09	0,012	0,023	25	50
<i>P. aeruginosa</i> (I група)	$0,162 \pm 0,04$	$0,32 \pm 0,09$	$0,04 \pm 0,02$	$0,08 \pm 0,03$	$0,025 \pm 0,008$	$0,06 \pm 0,02$	$45 \pm 6,12$	$70 \pm 12,3$
<i>P. aeruginosa</i> (II група)	$42,9 \pm 9,6$	$171,9 \pm 38,3$	$30,5 \pm 7,04$	$84,4 \pm 27,3$	$15,2 \pm 3,5$	$75,0 \pm 30,9$	$70 \pm 12,2$	>100

Таблиця 3. Чутливість клінічних штамів *P. aeruginosa* до антибіотиків, які входять до складу очних крапель в присутності суббактеріостатичної концентрації декаметоксину (20 мкг/мл).

Мікроорганізм	Офтаквікс		Флоксимед		Тобрекс	
	МПК	МЦК	МПК	МЦК	МПК	МЦК
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (I група)	$0,1 \pm 0,002$	$0,18 \pm 0,03$	$0,01 \pm 0,005$	$0,02 \pm 0,004$	$0,01 \pm 0,004$	$0,02 \pm 0,01$
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (II група)	$23,4 \pm 3,9$	$62,6 \pm 9,5$	$19,9 \pm 7,3$	$35,2 \pm 7,4$	$9,7 \pm 3,8$	$21,4 \pm 7,6$

Отримані результати демонструють помірне посилення чутливості клінічних штамів першої та другої групи до дії антибіотиків. Так, бактерицидні концентрації левофлоксацину, ципрофлоксацину та тобраміцину в середньому зменшувались в 1,7-4 разів. Отже, одночасне застосування очних форм фторхінолонів, тобраміцину та декаметоксину демонструє синергічну дію антимікробних сполук на клінічні штами синьогнійної палички та підвищує антибіотикочутливість резистентних клінічних штамів. Очні лікарські форми левоміцетину, ципрофлоксацину та тобраміцину містять високі концентрації антибіотиків, які значно перевищують бактерицидні концентрації зазначених антибіотиків навіть для резистентних штамів *P. aeruginosa*, що створює широкий діапазон покриття та ефективного впливу на високо резистентні штами збудників. Очні краплі офтальмодек містять 200 мкг/мл декаметоксину, тому частина резистентних до антисептику штамів синьогнійної палички не

буде відповідати на терапію цією лікарською формою, однак комбіноване застосування препаратів має позитивний антимікробний ефект *in vitro*.

Висновки та перспективи подальших розробок

1. Доведено, що антисептик декаметоксин помірно посилює антипсевдомонадну дію антибіотиків левофлоксацину, ципрофлоксацину та тобраміцину, лікарські форми яких використовують для лікування бактеріальних кератитів.

На підставі отриманих результатів нами планується провести експериментальне дослідження ефективності комбінованого впливу очних крапель офтаквікс, флоксімед, тобрекс та офтальмодек на перебіг експериментального псевдомонадного кератиту в порівнянні з монотерапією вище зазначеними препаратами.

Список посилань

1. Визначення чутливості мікроорганізмів до антибактеріальних препаратів: методичні вказівки. (2007). МВ 9.9.5-143. Київ.
2. Ефимова, Ю. В., & Витовская, О. П. (2015). Эффективность применения фторхинолонов в лечении кератитов. *Архив офтальмологии Украины*, 3 (2), 65-69.
3. Назарчук, О. А., Черешнюк, І. Л., Назарчук, Г. Г., & Палій, Д. В. (2010). Вивчення антимікробної активності сучасних антисептиків та їх токсичного впливу на епітелій роівки. *Офтальмологічний журнал*, 6, 26-31. <http://doi.org/10.31288/oftalmolzh201932631>.
4. Austin, A., Lietman, T., & Rose-Nussbaumer, J. (2017). Update on the Management of Infectious Keratitis. *Ophthalmology*, 124 (11), 1678-1689. doi: 10.1016/j.ophtha.2017.05.012.
5. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters Version 10.0 (2020). EUCAST-2020. https://www.eucast.org/clinical_breakpoints_and_dosing/about_clinical_breakpoints/.
6. Green, M., Apel, A., & Stapleton, F. (2008). Risk factors and causative organisms in microbial keratitis. *Cornea*, 27 (1), 22-27. doi: 10.1097/ICO.0b013e318156caf2.
7. Jin, H., Parker, W. T., Law, N. W., Clarke, C. L., Gissman, J. D., Pflugfelder, S. C., ... Al-Mohtaseb, Z. N. (2017). Evolving risk factors and antibiotic sensitivity patterns for microbial keratitis at a large county hospital. *The British Journal of Ophthalmology*, 101 (11), 1483-1487. DOI: 10.1136/bjophthalmol-2016-310026.
8. Tacconelli, E., Carrara, E., Savoldi, A., Kattula, D., & Burkert, F. (2017). Global priority list of antibiotic-resistant bacteria to guide research, discovery, and development of new antibiotics World Health Organization. Retrieved from https://www.who.int/medicines/publications/WHO-PPL-Short_Summary_25Feb-ET_NM_WHO.pdf.
9. Truong, D. T., Bui, M-T., Memon, P., & Dwight Cavanagh, H. (2015). Microbial Keratitis at an Urban Public Hospital: A 10-Year Update. *Journal of Clinical and Experimental Ophthalmology*, 6 (6), 498. doi: 10.4172/2155-9570.1000498.
10. Zimmerman, A. B., Nixon, A. D., & Rueff, E. M. (2016). Contact lens associated microbial keratitis: practical considerations for the optometrist. *Clinical Optometry*, 8, 1-12. doi: 10.2147/OPTO.S66424.
- [Detection of microbial susceptibility to antimicrobials: Guidelines]. МВ 9.9.5-143. Kyiv.
2. Efimova, Yu. V., & Vitovskaya, O. P. (2015). Effektivnost primeneniya fluorhinolonov v lechenii keratitov [Efficacy of quinolones for keratitis treatment]. *Arhiv oftalmologii Ukrainy - Archive of Ophthalmology Ukraine*, 3 (2), 65-69.
3. Nazarchuk, O. A., Cheresniuk, I. L., Nazarchuk, H. H., & Palii, D. V. (2010). Vyvchennia antymikrobnioi aktyvnosti suchasnykh antyseptykiv ta yikh toksychnoho vplyvu na epiteliu rohivky [Current antiseptics: a study on their antimicrobial activity and toxic effects on the corneal epithelium]. *Oftalmologichnyi zhurnal - Journal of Ophthalmology*, 6, 26-31. <http://doi.org/10.31288/oftalmolzh201932631>.
4. Austin, A., Lietman, T., & Rose-Nussbaumer, J. (2017). Update on the Management of Infectious Keratitis. *Ophthalmology*, 124 (11), 1678-1689. doi: 10.1016/j.ophtha.2017.05.012.
5. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters Version 10.0 (2020). EUCAST-2020. https://www.eucast.org/clinical_breakpoints_and_dosing/about_clinical_breakpoints/.
6. Green, M., Apel, A., & Stapleton, F. (2008). Risk factors and causative organisms in microbial keratitis. *Cornea*, 27 (1), 22-27. doi: 10.1097/ICO.0b013e318156caf2.
7. Jin, H., Parker, W. T., Law, N. W., Clarke, C. L., Gissman, J. D., Pflugfelder, S. C., ... Al-Mohtaseb, Z. N. (2017). Evolving risk factors and antibiotic sensitivity patterns for microbial keratitis at a large county hospital. *The British Journal of Ophthalmology*, 101 (11), 1483-1487. DOI: 10.1136/bjophthalmol-2016-310026.
8. Tacconelli, E., Carrara, E., Savoldi, A., Kattula, D., & Burkert, F. (2017). Global priority list of antibiotic-resistant bacteria to guide research, discovery, and development of new antibiotics World Health Organization. Retrieved from https://www.who.int/medicines/publications/WHO-PPL-Short_Summary_25Feb-ET_NM_WHO.pdf.
9. Truong, D. T., Bui, M-T., Memon, P., & Dwight Cavanagh, H. (2015). Microbial Keratitis at an Urban Public Hospital: A 10-Year Update. *Journal of Clinical and Experimental Ophthalmology*, 6 (6), 498. doi: 10.4172/2155-9570.1000498.
10. Zimmerman, A. B., Nixon, A. D., & Rueff, E. M. (2016). Contact lens associated microbial keratitis: practical considerations for the optometrist. *Clinical Optometry*, 8, 1-12. doi: 10.2147/OPTO.S66424.

References

1. Vyznachennia chutlyvosti mikroorhanizmv do antybakterialnykh preparativ: metodychni vkazivky (2007).

МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОЕ ОБОСНОВАНИЕ ЛЕЧЕНИЯ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО ПСЕВДОМОНАДНОГО КЕРАТИТА

Вовк І.Н., Кривецька Н.В., Буркот В.М., Дудар А.О., Кулик А.В.

Аннотация. Бактериальные кератиты занимают второе место в структуре микробных заболеваний роговицы после вирусных кератитов, характеризуются тяжелым течением, и нередко приводят к осложнениям, которые требуют хирургического лечения. *P. aeruginosa* является основным возбудителем кератита, ассоциированным с ношением контактных линз. Целью нашей работы было обосновать микробиологическими методами возможность комбинированного использования фторхинолонов, тобрамицина и антисептика декаметоксина для лечения экспериментального псевдомонадного кератита. Исследование проводили на чувствительных и устойчивых к тестируемым антимикробным соединениям клинических штаммах *P. aeruginosa*. Статистика Статистический анализ полученных результатов осуществляли с помощью стандартных пакетов программ "STATISTICA +" и "Microsoft Excel 2010". Вычисляли среднее арифметическое значение (\bar{X}), среднее квадратическое отклонение (σ). В результате проведенного исследования показано повышение чувствительности резистентных к фторхинолонам и аминогликозидам клинических штаммов синегнойной палочки в 2-4 раза в присутствии суббактериостатических концентраций декаметоксина. В глазных каплях офтаквикс, флоксимед и тобрекс содержание антибиотиков достаточно высокое для элиминации как чувствительных, так и резистентных штаммов *P. aeruginosa* *in vitro*. Обнаруженный синергизм антибиотиков и антисептика дает основания для дальнейшего исследования воздействия комбинированной этиотропной терапии на течение экспериментального кератита, вызванного *P. aeruginosa*.

Ключевые слова: *Pseudomonas aeruginosa*, офтаквикс, флоксимед, тобрекс, офтальмодек, кератит.

MICROBIOLOGICAL GROUNDS FOR ANTIMICROBIAL TREATMENT OF EXPERIMENTAL PSEUDOMONAL KERATITIS

Vovk I.M., Kryvetska N.V., Burkot V.M., Dudar A.O., Kulik A.V.

Annotation. In the structure of the corneal microbial diseases bacterial keratitis take second rate position after viral keratitis. They are characterized by a severe course and often leads to complications that require surgical treatment. *P. aeruginosa* is the main causative agent of keratitis associated with the contact lenses wearing. The aim of our work was to check up the combined action of fluoroquinolones, tobramycin and antiseptic decamethoxine on clinical strains of *P. aeruginosa* *in vitro* with microbiological methods. The studies were performed on clinical strains of *P. aeruginosa*, which were sensitive as well as resistant to the studied antimicrobial compounds. Statistical analysis of the results was performed using standard software packages "STATISTICA +" and "Microsoft Excel 2010". Calculated the arithmetic mean (\bar{X}), standard deviation (σ). The results of our investigation demonstrated 2-4 times antimicrobial susceptibility increasing for quinolone and tobramycin resistant clinical strains of *Pseudomonas aeruginosa* in the presence of subinhibitory concentrations of decamethoxine. Oftaquin, floximed and tobrex eye drops contain enough amount of antibiotics that is capable to affect both sensitive and resistant strains of *P. aeruginosa* *in vitro*. The revealed synergetic antipseudomonal action gives us grounds for further research of the combination etiotropic therapy effect on the course of the experimental keratitis caused by *P. aeruginosa*.

Keywords: *Pseudomonas aeruginosa*, oftquin, floximed, tobrex, oftalmodec, keratitis.