

**МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ
РЕСПУБЛИКИ КАЗАХСТАН**

**КАЗАХСКИЙ НАУЧНЫЙ ЦЕНТР КАРАНТИННЫХ
И ЗООНОЗНЫХ ИНФЕКЦИЙ имени М. АЙКИМБАЕВА**

А. Н. Кузнецов, М. С. Сыздыков, Т. К. Ерубает, А. Б. Шевцов,
А. М. Дмитриевский

**Патогенетическое обоснование этиотропной
терапии бруцеллёза
(монография)**



АЛМАТЫ, 2019 г.

УДК 616.9
ББК 55.146
П 20

Рецензенты:

доктор медицинских наук, профессор С. Т. Доскожаева;
доктор медицинских наук Л. Е. Некрасова.

П 20 Патогенетическое обоснование этиотропной терапии бруцеллёза
[Текст]: монография / А. Н. Кузнецов, М. С. Сыздыков, Т. К. Ерубаяев,
А. Б. Шевцов, А. М. Дмитриевский. – Алматы: КНЦКЗИ, 2019. – 98 стр.

ISBN 978-608-305-347-9

В данной монографии изложены материалы многолетних экспериментальных и клинических исследований по выработке оптимальных схем лечения бруцеллёза с учётом внутриклеточной локализации возбудителя. Аргументируется ведущая роль паразитирования *Brucella spp.* в фаголизосомах клеток иммунной системы хозяина в несостоятельности лечения бруцеллёза препаратами, к которым возбудитель чувствителен *in vitro*, и в возникновении большого числа рецидивов после проведённого лечения. В монографии описана характеристика изменения активности ряда противобруцеллёзных антибактериальных препаратов под влиянием pH, а также целесообразность и перспективное направление дальнейшего поиска и совершенствования новых антибиотиков, активных в отношении бруцелл.

Монография адресована сотрудникам научно-исследовательских учреждений и вузов, магистрам и докторантам, занимающимся проблемами лечения бруцеллёза человека.

УДК 616
ББК 55.146

Рекомендовано к печати решением Учёного Совета Казахского научного центра карантинных и зоонозных инфекций. Протокол №4 от 22.05.2019 г.

ISBN 978-608-305-347-9

© Казахский научный центр карантинных
и зоонозных инфекций, 2019

Список сокращений

CLSI	-	Clinical and Laboratory Standards Institute
pH	-	Pondus Hydrogenii (лат.), водородный показатель
ВОЗ	-	Всемирная организация здравоохранения
КОЕ	-	Колониеобразующие единицы
МИК	-	Минимальная ингибирующая концентрация
МКБ	-	Международная классификация болезней
ТМП/СМ	-	Триметоприм / сульфаметоксазол
ПЦР	-	Полимеразная цепная реакция
РЭС	-	Ретикуло-эндотелиальная система
УББ	-	Условия биологической безопасности
ФХ	-	Фторированные хинолоны

Оглавление

Введение.....	5
Глава 1. Распространение и клиническое течение бруцеллёза.....	8
Глава 2. Обзор подходов к проведению лечения бруцеллёза.....	11
Глава 3. Антибактериальные препараты с внутриклеточной активностью	17
Глава 4. Чувствительность к антибактериальным препаратам клинических изолятов бруцелл, выделенных в Южно-Казахстанской области	24
Глава 5. Чувствительность к антибактериальным препаратам клинических изолятов <i>Brucella melitensis</i> , выделенных в Казахстане в 2008-2014 гг.....	30
Глава 6. Изучение внутриклеточной активности ряда антибактериальных препаратов в отношении <i>Brucella melitensis</i> 1251 на модели инфицированных моноцитов человека Mono MAC 6	35
Глава 7. Влияние различных схем этиотропной терапии бруцеллёза на развитие рецидивов у больных	40
7.1. Клиническая характеристика бруцеллёза у обследованных больных...40	
7.2. Результаты клинического и лабораторного обследования здоровых лиц (контрольная группа)	49
7.3. Динамика лабораторных показателей у наблюдавшихся больных. Роль малонового диальдегида как предиктора неэффективности проводимой терапии	53
Глава 8. Изучение чувствительности <i>in vitro</i> к антибактериальным препаратам <i>Brucella melitensis</i> при различных значениях pH	62
Глава 9. Оценка значимости ципрофлоксацина как компонента этиотропной терапии острого бруцеллёза	66
Глава 10. Оценка значимости азитромицина как компонента этиотропной терапии острого бруцеллёза	72
Глава 11. Оценка эффективности схем этиотропного лечения бруцеллёза.....	76
Список использованных источников.....	86

Введение

Бруцеллёз — это системная инфекция, вызываемая факультативными внутриклеточными бактериями рода *Brucella*, протекающая без адекватного лечения по типу затяжного сепсиса. Это заболевание характеризуется поражением различных органов и тканей с развитием серьёзных осложнений со стороны двигательной и нервной систем, а также длительным, склонным к рецидивированию и хронизации, течением [1]. Будучи внутриклеточными патогенами, бруцеллы способны как пассивно (за счёт фагоцитоза), так и активно внедряться в макрофагальные клетки хозяина. Распространение и персистенция бруцелл в макроорганизме во многом обусловлено способностью этих бактерий к внутриклеточному существованию в клетках РЭС хозяев [1].

В этой связи, для успешной эрадикации возбудителя из организма хозяина противобруцеллёзные препараты должны быть способны проникать внутрь клеток в дозах, достаточных для действия на бруцеллы [1]. Тем не менее, лишь ограниченное число препаратов обладает такими свойствами.

В 1986 году ВОЗ выпустила рекомендации по лечению бруцеллёза у людей с использованием доксициклина в комбинации либо с рифампицином, либо со стрептомицином [2]. Хотя эти рекомендации всё ещё актуальны, и изоляты бруцелл в целом чувствительны к вышеупомянутым препаратам, имеются отдельные сообщения об антибиотикорезистентности бруцелл [3, 4]. До 2006 года не существовало стандартизованного метода оценки антибиотикочувствительности бруцелл; более того, проведение этого исследования не рекомендовалось в связи с высоким риском заражения лабораторных сотрудников. Тем не менее, как свидетельствуют данные литературы, чувствительность к антибактериальным препаратам бруцелл может варьировать в различные периоды времени и в различных регионах [5, 6].

В настоящее время наиболее широко используемыми антибактериальными препаратами для этиотропного лечения бруцеллёза являются тетрациклины, триметоприм и сульфаметоксазол, аминогликозиды, рифампицин и фторхинолоны [7, 8]. Эти препараты могут использоваться как сами по себе, так и в комбинациях друг с другом. Однако в связи с частыми рецидивами бруцеллёза, наблюдаемыми при монотерапии, ВОЗ рекомендует именно комбинированное лечение данной инфекции [9]. В настоящее время комбинациями препаратов, рекомендуемыми ВОЗ, являются доксициклин плюс рифампицин и доксициклин плюс стрептомицин. Хотя с помощью этих режимов достигнуты хорошие результаты, частота рецидивов при лечении больных бруцеллёзом комбинациями указанных препаратов достигает 14,4% [10]. Наиболее эффективная комбинация препаратов для этиотропной терапии бруцеллёза с минимальной токсичностью всё ещё не определена.

Способность бруцелл выживать в кислой среде фагосом макрофагов и

микрофагов мононуклеарной системы, обуславливает длительное волнообразное течение заболевания и склонность к рецидивам, обусловленным «прорывом» возбудителя в кровь из клеточного депо [11-13]. Известно, что очень трудно достичь эрадикации бруцелл даже в случае применения антибактериальных препаратов, к которым у возбудителя имеется чувствительность *in vitro* [14-16]. Все используемые для этиотропного лечения бруцеллёза антибактериальные препараты не предотвращают рецидивов заболевания; очевидно, что лишь синергидные комбинации препаратов с внутриклеточной активностью способны достичь хороших клинических результатов [17-20].

Тем не менее, факторы, определяющие, почему в одних случаях возникают рецидивы, а в других нет, недостаточно определены. На сегодняшний день неясно, обусловлены ли клинические исходы развитием устойчивости бруцелл к антибактериальным препаратам во время лечения или же начальными различиями в восприимчивости к ним у возбудителя инфекции.

Высокая частота побочных эффектов от использования традиционных схем лечения бруцеллёза и значительная частота рецидивов после проведённой этиотропной терапии побуждают к поиску новых подходов к лечению данной инфекции. Фторхинолоны, как препараты, проникающие внутрь клеток, могут служить хорошей альтернативой традиционно применяющимся антибиотикам [21, 22]. В последнее время появляются публикации о возможности использования фторхинолонов, в частности цiproфлоксацина, для лечения бруцеллёза [23]. По сравнению с традиционно применяющимися препаратами цiproфлоксацин привлекает внимание меньшей токсичностью.

Общеизвестно влияние лекарственной резистентности бактерий на клинические проявления вызываемых ими инфекций, однако до настоящего времени в отношении бруцеллёза систематических исследований по данному направлению не проводилось. Известно несовпадение эффективности антибактериальных препаратов в отношении бруцелл *in vitro* и *in vivo* (макролиды, фторированные хинолоны и пр.); эти данные нуждаются в дальнейшей оценке и обобщении.

Внутриклеточный паразитизм бруцелл обуславливает определённые требования к подбору этиотропных агентов для лечения вызываемой ими инфекции. Противобруцеллёзные препараты должны хорошо проникать в ткани, в том числе и воспалительно изменённые, а также в цитоплазму клеток. Эмпирически используемые для лечения бруцеллёза комбинации доксициклина с рифампицином либо аминогликозидами или фторхинолонами обычно эффективны, однако требуют длительного курса применения (не менее 6 недель) и не предотвращают частых рецидивов, что свидетельствует о неполной эрадикации бруцелл [24]. Последняя не достигается даже при назначении препаратов, хорошо проникающих внутрь клетки. Фторхинолоны и макролиды нового поколения, обладающие высокой

внутриклеточной активностью, высоко эффективны по отношению к бруцеллам *in vitro*, но это не совпадает с их относительно низким клиническим эффектом, выражающимся в высоком числе рецидивов у пролеченных больных [24-26]. Ранее высказывавшиеся надежды на возможность использования фторхинолонов в виде монотерапии коротким курсом для лечения больных бруцеллёзом в Казахстане [27, 28], к сожалению, не оправдались. Это обусловлено существованием бруцелл в фаголизосомах макрофагальных клеток, что делает микроорганизмы мало доступными для внешних биологических и химических воздействий [29]. Кроме того, кислотность в фаголизосомах, составляющая 5,0 и ниже, нарушает противомикробную активность фторхинолонов и макролидов [13].

В этой связи очевидна необходимость совершенствования патогенетически оправданной этиотропной терапии бруцеллёза, учитывающей особенности персистирования возбудителя в макроорганизме, для эффективной борьбы с данной инфекцией.

В данной монографии изложены материалы многолетних исследований по изучению причин, обуславливающих эффективность этиотропной терапии бруцеллёза человека, для выработки рекомендаций по выбору препаратов.

Основной целью проведённых исследований являлось оценка противобруцеллёзной активности ряда препаратов во вне- и внутриклеточной среде и при различных условиях pH для оптимизации этиотропного лечения больных бруцеллёзом.

В число поставленных задач входили:

1. Определить чувствительность к антибактериальным препаратам типичных клинических изолятов бруцелл, циркулирующих в эндемичном по бруцеллёзу регионе Казахстана — Южно-Казахстанской области.
2. Оценить внутриклеточную активность в отношении бруцелл ряда антибактериальных препаратов, наиболее часто используемых в клинической практике для лечения бруцеллёза (рифампицин, цiproфлоксацин, тетрациклин, доксициклин, гентамицин и стрептомицин), на модели человеческих моноцитов Mono Mac 6.
3. Оценить эффективность основных противобруцеллёзных препаратов в отношении клинических штаммов *B. melitensis* в условиях нейтральной (7,0) и кислой (5,0) pH среды по результатам Е-теста.
4. Провести сравнительную оценку эффективности и безопасности режимов антибактериальной терапии бруцеллёза «доксициклин плюс рифампицин» и «ципрофлоксацин плюс рифампицин».
5. Выявить возможную взаимосвязь между чувствительностью бруцелл к антибактериальным препаратам и клиническими исходами у пациентов с бруцеллёзом.

Глава 1. Распространение и клиническое течение бруцеллёза

Бруцеллёз, являясь одним из наиболее часто встречающихся зоонозов, остаётся одной из актуальных проблем практического здравоохранения. Для данной инфекции характерны частое развитие хронических форм заболевания и длительная потеря трудоспособности. Всё это определяет высокую медико-социальную и экономическую значимость проблемы бруцеллёза [30-35].

Бруцеллёз остаётся одним из наиболее актуальных зоонозов в регионах с развитым животноводством. Неуклонный рост как общих показателей заболеваемости бруцеллёзом, так и числа вновь регистрируемых случаев, частое развитие органных поражений при хронических формах бруцеллёза, приводящих к инвалидизации лиц трудоспособного возраста, недостаточная эффективность существующих методов диагностики и дифференциальной диагностики этого заболевания, его лечения и профилактики – всё это ставит бруцеллёз в ряд актуальных проблем инфекционной патологии [36-38].

Бруцеллёз является одной из наиболее часто встречающихся в республиках Содружества Независимых Государств, включая Казахстан, зоонозных инфекций. Её высокая медико-социальная и экономическая значимость определяется особенностями клинического течения с развитием возвратных и хронических форм заболевания, длительной потерей трудоспособности, высоким уровнем инвалидизации, обусловленной, прежде всего, стойким анкилозом крупных суставов, а также основной группой риска – трудоспособным населением в возрасте от 20 до 60 лет, что связано с вовлечением лиц данной возрастной категории в уход за скотом и обработку сельскохозяйственной продукции животного происхождения [39-41]. Несмотря на большое количество работ, посвящённых эпидемиологии, семиологии и лечению бруцеллёза, целый ряд вопросов, касающихся особенностей клинического течения данной инфекции, её патогенеза, диагностики и терапии на современном этапе, остаются открытыми.

Отличительной особенностью бруцеллёза является полиморфизм клинических проявлений острой и хронической форм заболевания, малая информативность интерпретации результатов рутинного лабораторного общеклинического и биохимического обследования, что нередко приводит к диагностическим ошибкам на догоспитальном этапе. Следует также отметить ограниченные возможности традиционно используемых методов серологической диагностики, особенно в эндемичных регионах [1, 42-44].

В то же время, большинством специалистов [45-47] отмечается, что по своему распространению и социально-экономической значимости это заболевание занимает одно из лидирующих мест среди зоонозов.

Так, бруцеллёз проявляет убиквитарность, характеризуясь массовым распространением в мире, преимущественно в Центральной Азии, Балканах и странах Средиземноморского бассейна, а также в Южной Америке. По

приблизительным оценкам официальные статистические данные, публикуемые ВОЗ, ниже истинных уровней заболеваемости приблизительно в 5 раз в связи с несовершенством лабораторной диагностики, ориентированной преимущественно на выявление S-форм бруцеллёза [45, 48-50].

Широкое распространение бруцеллёза в странах СНГ в современных социально-экономических условиях связано с развивающимся частным животноводством и переходом скота в индивидуальное владение, что сопровождается совместным содержанием и выпасом на общинных пастбищах сельскохозяйственных животных различных видов. Низкий уровень учёта скота в Республике и странах СНГ из-за неконтролируемого перемещения, низкая культура ведения животноводства, отсутствие санитарных объектов и дезинфицирующих средств, стойкая эпизоотия при общем слабом финансировании противобруцеллёзных санитарно-ветеринарных и хозяйственных программ – вот далеко неполный перечень причин тяжелой эпидемиологической обстановки по данной инфекции. Выраженная тенденция к росту заболеваемости данной инфекции в Казахстане, возможность неблагоприятных исходов, приводящих к длительной потере трудоспособности, а также максимальный уровень инвалидизации по сравнению с другими зоонозами определяют социально-экономическую значимость и актуальность разработки подходов к профилактике и лечению бруцеллёза [51, 52].

В целом в Казахстане в учреждениях государственного санитарно-эпидемиологического надзора лабораториями отделов особо опасных инфекций типирование выделенных клинических и “полевых” штаммов бруцелл не проводится, что препятствует планированию и эффективному проведению профилактических и противоэпидемических мероприятий, осуществлению мониторинга за циркуляцией возбудителя на территории Республики. Всё это не позволяет проводить необходимое этиотропное лечение больных бруцеллёзом людей, что приводит к хроническому течению заболевания и к последующей инвалидности [53].

В формировании патологического процесса как при остром, так и хроническом бруцеллёзе (ХБ) большое значение придаётся эндотоксикозу и системному воспалению; при этом вовлекаются практически все органы и системы: костно-суставная, сердечно-сосудистая, мочеполовая, нервная, эндокринная [52, 54-59]. У больных ХБ выявлены значительные изменения церебральной гемодинамики с увеличением тонуса крупных и мелких сосудов, снижение кровоснабжения дистальных отделов верхних и нижних конечностей (при этом регионарные гемодинамические сдвиги более выражены у больных неактивными формами ХБ), а также поражение периферических нервов смешанного аксонально-демиелинизирующего характера [60, 61]. При ХБ описаны случаи тромбоцитопенической пурпуры, узловой эритемы, тромбоцитарной микроангиопатии, которые сопровождаются соответствующими морфологическими изменениями [62, 63].

Бруцеллёзная инфекция является актуальной проблемой как для медицинской науки, так практического здравоохранения, так как на современном этапе в Республике Казахстан ежегодно регистрируется около 2000 больных с впервые диагностированным бруцеллёзом. Как упоминалось выше, для данного зооноза характерно хроническое течение с вовлечением в патологический процесс многих органов и систем [64]. Нарушения со стороны соматической и парасимпатического отдела вегетативной нервной системы как при остром, так и хроническом бруцеллёзе встречаются довольно часто; при этом выявляется патология как центральной нервной системы, проявляющаяся в виде синдрома серозного менингоэнцефалита, реже миелита и арахноидита, так и периферического отдела в виде изолированных невритов, а также полинейропатий, и т.п. [65-68].

Бруцеллёз является одним из наиболее распространённых в Казахстане заболеваний, и проблема этой краевой патологии в животноводческих районах остаётся актуальной и в нашей Республике. В последние годы эпизоотолого-эпидемиологическая ситуация ещё более обострилась, приблизившись к показателям в 50-е годы, когда они были наиболее высокими [69-71].

Новые формы хозяйствования в животноводстве, рост поголовья скота в личных подворьях привели к увеличению заболеваемости молодых лиц, занятых на сезонных животноводческих работах, а также владельцев скота, включая детей и подростков [72-76].

В настоящее время всё чаще встречаются семейные случаи заражения бруцеллёзом [77-79].

Заболеваемость детей бруцеллёзом находится в прямой зависимости от профессии и условий жизни родителей. Бруцеллёзом болеют дети всех возрастов, что доказано описанием Н. И. Дьяконовой, Н. К. Талызиной (1962), Г. Н. Нуралиновой [76, 80-82]. Однако они отмечают относительную редкость заболевания бруцеллёзом детей до 6 месяцев. Это обусловлено, по мнению этих авторов, условиями жизни и характером вскармливания.

Клиника бруцеллёза полиморфна. Наряду с латентными наблюдаются острая, подострая и хроническая формы заболевания [77, 80, 83, 84]. По мнению авторов, это в значительной степени обусловлено неодинаковой реактивностью организма.

За последние годы клиническое течение бруцеллёза, по мнению большинства авторов [78, 85-87], значительно изменилось, появилось большое количество лёгких и стёртых форм, представляющих значительные трудности для своевременной и правильной диагностики. К особенностям современного бруцеллёза относятся ранняя и выраженная алергизация [88-93].

Глава 2. Обзор подходов к проведению лечения бруцеллёза

Несмотря на большое количество работ, посвящённых лечению бруцеллёза, которые были опубликованы за последнее время в отечественной и зарубежной литературе, проблему адекватной терапии данного заболевания нельзя считать решённой. Это обусловлено тем, что ни одна из существующих схем не гарантирует полного излечения не предотвращает перехода в хроническую форму. По данным разных авторов, хронизация наступает у больных острым и подострым бруцеллёзом в 40-60% случаев [69, 94-98].

В настоящее время по общему признанию наиболее эффективным в лечении бруцеллёза является антибиотикотерапия [23, 24, 27, 99, 100]. Однако антибактериальные препараты сами по себе, и особенно при длительном их применении, что является необходимым условием для антибактериальной терапии при бруцеллёзе, оказывают иммуносупрессивное действие [101, 102]. В последние годы появились сообщения об успешном использовании при бруцеллёзе иммуномодулирующих препаратов: синтетических пептидов [103, 104], лейкинферона [105], рекомбинантного интерлейкина-2 [106] и т.д. До настоящего времени в клинической практике нет объективных и достоверных методов, позволяющих определить необходимость проведения, выбрать программу и оценить терапевтическую эффективность иммунокорректирующих средств [107, 108].

Тем не менее, можно выделить ряд направлений в лечении бруцеллёза, основывающихся на основных звеньях патогенеза данного заболевания, которые, при комплексном их применении, должны свести к минимуму риск неблагоприятных исходов (рецидивы, хронизация, гнойные и инфекционно-аллергические осложнения).

Дуйсеновым К.Д. (1984) данные направления сформулированы следующим образом:

- Антибиотикотерапия (этиотропное лечение).
- Антигенотерапия (иммуностимулирующее лечение).
- Противовоспалительное лечение.
- Симптоматическая терапия.
- Общеукрепляющая и десенсибилизирующая терапия.
- Физиотерапевтическое лечение и др. [109, 110].

Традиционно в комплексном лечении больных бруцеллёзом ведущее место занимает антибиотикотерапия. Назначение химиопрепаратов считается необходимым при лечении больных острым и подострым бруцеллёзом и активном течении хронического (особенно в случаях супер- и реинфекции). Имеются лишь разногласия относительно доз и длительности курса, конкретных показаний при различных клинических формах бруцеллёза [27, 69, 109, 111-113].

Подобные разногласия обусловлены несоответствием результатов

чувствительности бруцелл к химиопрепаратам *in vitro* и эффективностью антибиотикотерапии *in vivo*, что обусловлено важной особенностью паразита – способностью длительно персистировать в системе мононуклеарных фагоцитов, где они недоступны влиянию как факторов защиты, так и назначаемых препаратов [114]. Это обуславливает известный парадокс: несмотря на то, что бруцеллы чувствительны к большому числу антибактериальных препаратов (цефалоспорины, макролиды, тетрациклины, аминогликозиды, рифампицины, левомецетин, ампициллин, бисептол), оптимальный препарат или комбинация препаратов для лечения обусловливаемой ими инфекции до сих пор не был определён [113, 115]. Существуют рекомендации экспертов ВОЗ [116, 117], в которых описываются схемы лечения бруцеллёза, представленные комбинацией стрептомицина в суточной дозе 1,0 г с тетрациклинами (2,0 г) в течение 3-6 недель или сочетанием рифампицина 0,6-0,9 г ежедневно с доксициклином 0,2 г в течение 6 недель, которые хотя и признаются рядом авторов в качестве эффективных [113, 117] с предложением в ряде случаев заменить стрептомицин менее токсичным гентамицином [113, 118], они во многом не соответствуют современным критериям эффективности и безопасности. Отметим, что, как установлено испанскими авторами [118], в связи с активацией рифампицином процессов ацетилирования в печени он уменьшает уровень доксициклина в плазме, что по мнению авторов, и приводит к несостоятельности лечения и рецидивам.

Результаты изучения эффективности лечения стрептомицином в комбинации с тетрациклином в дозе 0,8 г в сутки свидетельствовали о неполной санации организма от возбудителя, так как у 15-70% отмечались рецидивы [119]. Низкую терапевтическую эффективность этих антибиотиков авторы связывали с отсутствием синергизма в действии антибактериальных препаратов и недостаточностью иммунитета.

Зарубежные исследователи при лечении больных острым бруцеллёзом стрептомицином в комбинации с тетрациклином в течение длительного времени (6-8 недель) отмечали рецидивы болезни только в 16,6% случаев и ни в одном случае при повторном курсе лечения рифампицином в сочетании с тетрациклином. Следует отметить также, что вышеупомянутые препараты весьма токсичны и не могут быть рекомендованы для применения в детской практике, особенно с учётом продолжительности лечения [19, 120, 121].

Лучшую эффективность лечения клиницисты отмечали при использовании антибиотиков второго и третьего ряда, хотя и здесь не получено однозначных результатов. Применялся рифампицин или доксициклин, рифаметоприм в виде монотерапии и комбинация доксициклина и рифампицина перорально, доксициклин внутривенно в комбинации с рифампицином перорально, рифампицин с моноциклином [112, 121-123]. Многие отечественные и зарубежные авторы отдают предпочтение комбинациям рифампицина и бисептола, которые проникают внутрь клетки [112, 113, 124]. Результаты лечения были при этом более

эффективными, чем при использовании традиционного лечения (стрептомицин в комбинации с тетрациклином), тем не менее, хронизация в большинстве сообщений была в пределах 30-40%. М.Ш. Нурманова (1994) указывает на более низкий процент хронизации (18,5%), однако, следует учесть, что лечение проводилось лицам молодого возраста (средний возраст анализируемых случаев составляет 27 лет) [125].

В 6 различных медицинских центрах трёх стран (Франция, Греция, Испания) методом рандомизации было изучена эффективность антибактериальной терапии у 143 пациентов острым бруцеллёзом по 3 схемам:

1. Рифампицин по 300 мг в комбинации с доксициклином перорально по 0,2 г в течение 45 дней.
2. Доксициклин по 0,2 г 45 дней в комбинации со стрептомицином по 0,1 г в сутки в/мышечно 14 дней.
3. Тетрациклин по 2,0 г 21 день в комбинации со стрептомицином по 0,1 г в сутки 14 дней.

При этом выздоровление наступило в первой группе в 95% случаев, во второй группе – в 96% случаев, в третьей группе – в 59% [98].

Развитие рецидивов с выделением возбудителя из крови у больных бруцеллёзом после проведения длительных курсов антибактериальной терапии привело к некоторой недооценке этого раздела терапии некоторыми авторами, которые справедливо отметили, что химиопрепараты, элиминируя возбудителя из кровотока, не влияют на бактерии, расположенные внутриклеточно. Так, антибиотикотерапия при хронических формах признавалась бесперспективной [109].

Тем не менее, De Mello Victa (1984) лечил больных острым и хроническим бруцеллёзом доксициклином и в комбинации с рифампицином в течение 3 месяцев. При катamnестическом наблюдении в течение 2 лет полное излечение наступило у 94% больных.

Как мы указывали выше, несмотря на взаимный антагонизм данных препаратов при их совместном применении, они показывают достаточно высокую терапевтическую активность, что, на наш взгляд, обусловлено их способностью проникать внутрь клеток РЭС [126]. Очевидно, что использование препаратов с внутриклеточной активностью (старые – тетрациклины, рифампицин; новые – макролиды II поколения) является перспективным направлением в лечении бруцеллёза. Однако утрата некоторыми из перспективных химиотерапевтических агентов части своей активности при поступлении в фаголизосомы [127, 128] требует тщательного изучения этих препаратов как в эксперименте, так и по результатам применения в клинике [13].

Препараты группы фторхинолонов (ФХ) характеризуются широкой противомикробной активностью, бактерицидным действием без усиления эндотоксикоза (поскольку гибель бактерий под их влиянием обусловлена не разрушением клеточной стенки, а ингибированием ДНК-гиразы), высокой

биодоступностью с проникновением внутрь клеток и хорошей переносимостью. Это обусловило широкое применение ФХ у различных категорий больных при бактериальных заболеваниях самой разнообразной локализации, вызванных как палочковидными, так и кокковыми возбудителями, в том числе при тяжёлых генерализованных формах инфекций. Фторированные хинолоны рассматриваются в ряду наиболее важных антибактериальных этиотропных агентов [129-132]. Фторхинолоны быстро и хорошо всасываются в ЖКТ, мало связываясь с белками плазмы, и сравнительно легко проникают во все органы и ткани, в том числе в воспалительно изменённые (так называемый «грануляционный вал»), обеспечивая терапевтические концентрации в крови, органах, тканях и во внутриклеточной среде. Это обуславливает и широту показаний к использованию ФХ.

Начиная с 1980-х годов, лабораторными специалистами и врачами-клиницистами предпринимались попытки разработать режимы этиотропного лечения бруцеллёза с включением фторхинолонов и оценить их эффективность. Активность в отношении внутриклеточных бактерий, сниженный риск нефротоксичности, хорошие фармакокинетические характеристики (биодоступность, высокие уровни препаратов в крови и тканях) давали надежду на высокую эффективность фторхинолонов. Поиск новых режимов со сниженным числом рецидивов после проведённого этиотропного лечения также заставлял исследователей изучать противобруцеллёзную активность фторхинолонов [129-132].

ФХ показывают высокую противобруцеллёзную активность *in vitro* при нейтральных и щелочных значениях pH среды. Среди изученных фторированных хинолонов наиболее высокой активностью в отношении *Brucella melitensis* обладают ситафлоксацин, клинафлоксацин, левофлоксацин и моксифлоксацин. Вместе с тем на экспериментальной модели бруцеллёза мелитензис у белых мышей при назначении ФХ моксифлоксацина и гатифлоксацина не удалось получить выраженный химиотерапевтический эффект по сравнению с назначением доксициклина. Основываясь на имеющемся опыте лечения бруцеллёза у человека, необходимо учитывать несоответствие противобруцеллёзной активности ФХ *in vitro* и *in vivo*. На основании данных *in vitro*, нельзя предсказать эффективность препарата при лечении бруцеллёза у людей и животных, даже при высокой активности такового в пробирке. Поэтому, судя по доступным публикациям, лечение ФХ должно быть, во-первых, длительным (не менее 6 недель), а во-вторых, комбинированным. Поскольку имеющийся клинический опыт по применению фторированных хинолонов (ципрофлоксацина, офлоксацина, левофлоксацина, пефлоксацина, флероксацина) при бруцеллёзе является противоречивым, необходимо проведение дальнейших исследований по противобруцеллёзной активности данной группы препаратов [27, 133-140].

Ряд авторов связывают недостаточную эффективность ФХ *in vivo* при лечении бруцеллёза в монотерапии с возможным снижением активности

препаратов в отношении внутриклеточного возбудителя в фаголизосомах при кислых значениях pH. Отмечена высокая доля рецидивов инфекции после монотерапии ФХ, что обуславливает необходимость их комбинации с другими противобруцеллёзными препаратами [13].

Препаратами первой линии в лечении бруцеллёза, как упоминалось выше, являются доксициклин и рифампицин, а ФХ являются противомикробными агентами второй линии; вместе с тем, представляет интерес оценка существующих и вновь появляющихся ФХ при комбинированной этиотропной терапии бруцеллёза у больных, включая сравнительную оценку эффективности различных препаратов этой группы при сочетании их с антибиотиками и сульфаниламидами.

Перспективным, но ещё далёким от внедрения в клиническую практику, направлением является направленный транспорт антибиотиков в клетку с помощью векторов-липосом и синтетических наночастиц [114, 141].

Важное, и часто не учитываемое, влияние на эффективность проводимой терапии бруцеллёза оказывают неантибиотические эффекты назначаемых химиопрепаратов, в частности, их иммунотропное влияние. Так, известно, что антибиотики, особенно при длительном применении, вызывают иммуносупрессивный эффект (А.А. Наварсаян, 1980). По данным авторов, тетрациклины нарушают синтез белка, хемотаксис фагоцитов нейтрофилов в опытах *in vitro* и *in vivo*, антителообразование и подавление плазмоклеточной реакции селезёнки. Аминогликозиды оказывают тормозящее действие на хемотаксис гранулоцитов. Хлорамфеникол значительно тормозит трансформацию лимфоцитов *in vitro*, может тормозить пролиферацию костного мозга [142].

При бруцеллёзе иммунодепрессивное действие антибиотиков наблюдали К.П. Кошкин, З.О. Караев (1979), Л.Е. Цирельсон (1982). После курса лечения стрептомицином в комбинации с тетрациклином определялось угнетение бласттрансформации лимфоцитов [цит. по 143].

В связи с появлением макролидов нового поколения вновь пробуждается интерес к данной группе препаратов как потенциальным противобруцеллёзным агентам [144, 145]. Имеются данные, что некоторые препараты, в частности, фторхинолоны, макролиды [13, 22, 26, 121, 146-148] оказывают и иммуномодулирующее влияние, хотя этот вопрос считается совершенно неизученным.

Персистенция бруцелл в клетках РЭС само по себе способствует развитию вторичной иммунопатологической недостаточности с образованием хронического воспалительного процесса, морфологическим проявлением которого являются бруцеллёзные гранулемы, формирующиеся в различных органах и тканях [89, 149-153].

Поражение периферической нервной системы воспалительного характера, инфекционно-аллергические проявления, напоминающие ревматические, и другие выдвигают противовоспалительную терапию в число патогенетически обоснованных и эффективных методов лечения.

Основным показателем для проведения противовоспалительного лечения является наличие воспалительного процесса со стороны органов опоры и движения, периферической нервной системы.

В практике лечения бруцеллёзных больных широко применяются нестероидные противовоспалительные средства: производные салициловой кислоты (аспирин), индолуксусной (индометацин), алкановых кислот (бруфен, нотроксен, вольтарен), производные пирозолона (анальгин, бутадиион, реопирин).

Кроме обезболивающего, жаропонижающего эффекта, эти препараты уменьшают проницаемость сосудов, стабилизируют лизосомальные мембраны, ограничивая деструкции соединительной ткани и др.

Кортикостероидные препараты рекомендуются только ограниченному контингенту больных с тяжёлым течением острого и хронического бруцеллёза [89, 151, 154]. Несостоятельность иммунных реакций при бруцеллёзе не служит основанием для отказа от проведения иммуномодулирующей терапии.

В этой связи большой интерес у инфекционистов вызывает метод неспецифической антигенотерапии с назначением разнообразных иммуномодуляторов (пирогенал, продигиозан, зимозан, спленин и др.). Как указывалось выше, в качестве антигенов-иммуномодуляторов могут выступать и некоторые этиотропные агенты, как макролиды второго поколения, что обуславливает интерес к их изучению.

Суммируя вышеизложенное, следует отметить, что, несмотря на значительные успехи, достигнутые современной медициной в разработке методов лечения бруцеллёзной инфекции, знания в этой области ещё далеко не полны, что и определяет наш интерес к данной проблеме.

Глава 3. Антибактериальные препараты с внутриклеточной активностью

Лечение инфекций с внутриклеточной локализацией возбудителей составляет одну из трудных задач современной антибиотикотерапии. Внутриклеточные бактерии в той или иной мере защищены от действия антибиотиков и нередко сохраняют жизнеспособность после контакта с несомненно летальными для внеклеточных форм концентрациями препаратов [155].

Очевидно, что оптимальный препарат для лечения инфекций с внутриклеточным расположением возбудителей должен обладать способностью поступать внутрь фагоцитов, распределяться во внутриклеточной среде, сохраняя активность, и концентрироваться в субклеточных компонентах, содержащих микроорганизмы-мишени [114]. Следовательно, система выбора антибиотиков должна учитывать в достаточной степени комплекс факторов, относящихся к области клеточной фармакокинетики. Однако на сегодняшний день подбор препаратов идёт в основном эмпирически [114]. Наиболее распространённым способом выбора антибиотиков по чувствительности микрофлоры являются методы диффузии в агар (дисков, Е-тест) или серийных разведений, где исследуется взаимодействие культуры бактерий, выделенной от больного, с противомикробными препаратами в противомикробной, естественно бесклеточной, среде. В случае локализации бактерий внутри клеток организма этот метод может давать ложноположительные результаты.

Одной из попыток подбора оптимального препарата следует считать работу Е.В.Анисимовой и соавт. (1997) (Карагандинский Государственный Медицинский Институт, Институт биотехнологии АО «Биотехнология», Москва) [114]. Авторы в течение 5 лет наблюдали больных сепсисом различной этиологии, госпитализированных в реанимационные отделения больниц г. Караганды (42 ребёнка и 15 взрослых). Во всех случаях была диагностирована бактериемия с внутриклеточной локализацией возбудителя, а в 9 случаях из плазмы крови высеять бактерии не удалось, весь пул локализовался внутриклеточно. Внутриклеточное паразитирование было обнаружено для следующих микроорганизмов: *Staphylococcus aureus*, *S.epidermidis*, *Escherichia coli*, *Streptococcus* группы В, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* spp. Ранее многие из перечисленных микроорганизмов рассматривались как внеклеточные [156].

С использованием оригинальной методики [114] была определена чувствительность внутриклеточно расположенных бактерий к ряду антибактериальных препаратов, в том числе ассоциированных с коллоидными носителями (липосомы, наночастицы поли-н-бутилцианоакрилата), способствующими проникновению лекарств внутрь

клеток. Проведённые исследования позволили констатировать следующее: круг антибиотиков, эффективно действующих на возбудитель в обычной (бесклеточной) тестовой системе, резко снижается (в 2-3 раза) при определении чувствительности к ним бактерий, расположенных внутри лейкоцитов. При внутриклеточной локализации возбудителей наибольшей активностью обладали препараты фторхинолонов, рифампицина, доксициклина. Все эти лекарственные средства хорошо проникают внутрь клеток, однако чувствительность внутриклеточно расположенных бактерий к антибиотику, как известно, определяется не только самим фактом попадания его в клетку хозяина, но и распределением в субструктурах последней (цитоплазма, фагосомы), а также изменение свойств лекарственных веществ при взаимодействии с клеточными образованиями. Так, по данным M. Akova et al. (1999) азитромицин и офлоксацин, которые, как известно, создают высокие внутриклеточные концентрации [24, 25, 157], в первичной (нейтральной, pH = 7,0) фагосоме были активны против *Brucella melitensis*, но в фаголизосоме (pH = 5,0) эту активность утрачивали [13]. В то же время бруцелла способна выживать в фаголизосомах при pH=5,0 [29]. Однако те же авторы подчёркивают, что *in vivo* эти препараты могут достигать высочайшей антибруцеллёзной активности, обходя антагонизм, наблюдаемый *in vitro*, за счёт взаимодействия с факторами организма хозяина [13].

Существующие препараты, способные влиять на внутриклеточно расположенные микроорганизмы, можно разделить на 2 группы: липофильные, способные накапливаться в субклеточных структурах, и липофобные, которые могут быть транспортированы в клетку за счёт образования временных связей со специальными коллоидными носителями (липосомами, ниосомами, микроэмульсиями и наночастицами) [158, 159].

Под термином «наночастицы» обычно понимают коллоидные частицы размером от 10 до 1000 нм, состоящие из макромолекулярного материала, в который активно внедрено (растворено, связано, инкапсулировано) или на котором адсорбировано лекарственное вещество. Наночастицы выделяются из ряда носителей, прежде всего, большей стабильностью [159], что определяет большой интерес исследователей к их изучению [159, 160]. К сожалению, эти работы ещё не вышли за пределы лабораторий и будут иметь значение для практического здравоохранения в весьма отдалённом будущем.

В то же время другие коллоидные носители, липосомы, уже используются в клинике, в том числе и для направленного транспорта противомикробных препаратов. Так, использование липосомальных комплексов с амфотерицином В для лечения лёгочного аспергиллёза у пациентов с глубокой нейтропенией позволило снизить токсичность препарата и улучшить его терапевтическую эффективность [161]. Хорошие результаты получены и при использовании липосомальных форм нистатина [162]. Однако низкая устойчивость липосомальных форм препаратов и их высокая стоимость в значительной мере ограничивают их клиническое применение.

В этой связи представляется перспективным изучение в клинике уже применяющихся препаратов, обладающих способностью проникать внутрь клеток; особенно важно выявление особенностей их воздействия на организм больного, не связанных с антимикробным действием. Как подчёркивалось выше, именно взаимодействие антибиотиков с факторами защиты макроорганизма может оказать решающее влияние на исход лечения, в то время как клиницистами оно практически не учитывается.

Рассмотрим известные группы антибактериальных препаратов, обладающих способностью воздействовать на внутриклеточно расположенные возбудители.

Тетрациклины (тетрациклин, окситетрациклин, морфоциклин, метациклин/рондомицин, доксициклин). У детей до 14 лет тетрациклины могут вызывать долговременное изменение цвета зубов, гипоплазию эмали, замедление роста костей скелета, коричневую пигментацию кожи. Имеются сообщения о выбухании родничка у маленьких детей, получавших полные терапевтические дозы тетрациклинов. Обладают тетрациклины и токсическим действием на печень (способны вызывать её жировую инфильтрацию), могут индуцировать волчанку и другие аутоиммунные заболевания с тяжёлым поражением печени [163, 326]. Препараты этой группы не рекомендуются для лечения бруцеллёза у детей младше 8 лет и беременных женщин.

Препараты группы левомицетина (левомицетин / хлорамфеникол и его производные). Левомицетин – антибиотик широкого спектра действия; вопреки существовавшему ранее мнению, оказывает на возбудителей менингита у детей (*Haemophilus influenzae* тип b, *Neisseria meningitidis*, *Streptococcus pneumoniae*) не бактериостатическое, а бактерицидное действие [165]. Способность его легко проникать в различные ткани (мозга, миокарда, лёгких, глаза, почек, печени, селезёнки) и жидкости (ликвор, внутриглазную, плевральную, асцитическую) делает данный препарат незаменимым для лечения системных инфекций, особенно сопровождающихся поражением мозга и мозговых оболочек. Так, левомицетин-сукцинат до сих пор остаётся препаратом выбора для лечения тяжёлых инфекций [165], в частности менингококковой инфекции [163], абсцессов мозга у детей [166], что в частности, свидетельствует о его хорошей способности преодолевать воспалительный барьер. Однако высокая клиническая эффективность препарата нивелируется его выраженной токсичностью: левомицетин способен вызывать дозозависимое угнетение функции костного мозга (угнетение эритропоэза, тромбоцитопения, лейкопения), неврит зрительного нерва, поражение печени. У детей эти нарушения встречаются чаще, чем у взрослых [166, 167].

Наиболее опасным осложнением, отмечаемым преимущественно у новорождённых детей, особенно у недоношенных, является серый коллапс. Это осложнение – следствие отравления неметаболизированным левомицетином. Начинается оно на 3-4 день после начала применения

левомицетина в высоких дозах. У ребёнка отмечают вздутие живота, рвоту, дыхательные расстройства, (дистресс), сопровождаемые тяжёлым, с трудом устраняемым, метаболическим ацидозом. В течение 12 часов появляются серая окраска кожи, сердечно-сосудистый коллапс, гипотензия. Летальный исход при этом синдроме развивается в течение 2-3 суток у 40-60% детей.

Также при приёме левомицетина могут возникать сыпи на коже, лихорадка, анафилактические реакции, выпадение волос, замедление заживления ран, гемолиз, возникновение псевдомембранозного колита, гепатита, атрофия слизистой оболочки кишечника [166-168].

Антибиотики-макролиды действуют преимущественно на грамположительные микроорганизмы, приближаясь по спектру действия к пенициллинам. Опыт борьбы с заболеваниями, вызванными антибиотикоустойчивыми формами возбудителей убедительно показал необходимость наличия такого рода антибиотиков, которые применяются в случаях, когда лечение обычными антибиотическими препаратами неэффективно [163]. В качестве одного из первых антибиотиков резерва стал применяться эритромицин, в последующем олеандомицин. В дальнейшем были синтезированы другие препараты (азитромицин, мидекамицин, спирамицин, дицитромицин и др.); в настоящее время известно более 14 препаратов [169] – так называемые «новые макролиды». По сравнению со своими предшественниками, эритромицином и олеандомицином, они характеризуются высокой эффективностью, обусловленной их способностью воздействовать на внутриклеточные возбудители, такие как хламидии, микоплазмы, легионеллы, листерии, пневмококк, другие стрептококки, гемофильную палочку и др. [170-172]. Так, концентрация рокситромицина (рулида) в нейтрофилах превышает его концентрацию в крови в 2-3 раза, в моноцитах – в 6-8 раз, а в макрофагах – в 16 более раз [170]. Высокая внутриклеточная активность характерна и для спирамицина (ровамицина), который признан золотым стандартом педиатрии в качестве препарата для лечения инфекций респираторного тракта в амбулаторных условиях [169].

Применительно к макролидам классический постулат химиотерапии о необходимости достижения концентраций антибиотика в крови, значительно превышающих значения его минимальной подавляющей концентрации (МПК), нуждается в современной интерпретации. В частности, выраженный клинический эффект макролидов отмечается на фоне концентрации ниже значения МПК в крови, тканях и органах, что обусловлено не прямым антимикробным действием, а влиянием их на различные факторы вирулентности микроба и иммунитета макроорганизма, препятствующие способности патогена реализовать развитие инфекции.

На различных тест-микроорганизмах было показано, что кларитромицин, эритромицин, азитромицин, спирамицин и тилозин снижают адгезирующую способность клеток за счёт действия на адгезию, образование пилей и фимбрий [173].

Макролиды влияют на подвижность бактерий: при действии

эритромицина и азитромицина снижается подвижность жгутиков бактерий, нарушается их образование [173]. Электронно-микроскопически установлено, что макролиды поражают нормальную структуру клеток микроорганизмов; изменения структуры белков и липополисахаридов бактериальной клетки повышают её чувствительность к факторам сыворотки крови, в частности, комплемента [173].

Кроме того, макролиды чрезвычайно малотоксичны. Побочные эффекты встречаются исключительно редко и выражены слабо [167, 174]. Так, в эксперименте не было зарегистрировано тератогенного действия макролидов при введении препаратов в дозах (в пересчёте на 1 мг/м²), в 4 раза превышающих суточную дозу человека. Нет никаких специфических педиатрических ограничений для применения макролидов у детей [167]. Более того, различные авторы подчеркивают их высокую эффективность и безопасность при применении именно в детской практике [169, 171, 175, 176].

Способствуют макролиды и регенерации тканей (пробиотическое действие): так, по данным И.Л.Гусарской и Г.А.Тимофеевой (1979), если левомицетин задерживал репарацию слизистой кишечника у 48,1% детей с дизентерией и задерживал нормализацию стула, то при назначении эритромицина с фуразолидоном не отмечалось существенных различий в сроках нормализации стула, хотя в отношении возбудителя они оказывали слабое saniрующее действие [177].

Рифампицин хорошо проникает во все ткани, жидкости (в том числе и ликвор) и клетки организма. Применяют у детей для лечения туберкулёза, лепры, бруцеллёза, инфекций, вызванных стафилококком, стрептококками, гемофильной палочкой, клостридиями, протеем и др. К сожалению, к рифампицину быстро развивается устойчивость микроорганизма, поэтому его относят к антибиотикам резерва [126]. Существовавшее ранее мнение о большой гепатотоксичности препарата в настоящее время пересмотрено: нежелательные эффекты от применения рифампицина наблюдают от чрезмерных его доз или у больных с патологией печени [126]. Соответствующие исследования, проведённые до настоящего времени, не выявили специфических педиатрических проблем, которые ограничивали бы применение рифампицина у детей [167].

Фторхинолоны в настоящее время рассматриваются как наиболее перспективная группа химиопрепаратов для лечения тяжёлых инфекций, в том числе вызванных полирезистентной госпитальной флорой [178, 179]. По-видимому, фторхинолоны можно считать препаратами выбора для лечения генерализованных инфекций (сепсиса) [180-183]: эти лекарственные средства обладают широким спектром антимикробного действия с бактерицидным влиянием на возбудителей, длительным постантибиотическим эффектом в сочетании с уникальной фармакинетикой, позволяющей этим (в отличие от вышеописанных) гидрофильным веществам активно проникать внутрь клеток и тканей и быть эффективными у пациентов в критических

состояниях даже при пероральном применении [179-186].

Следует подчеркнуть, что хотя фторхинолоны в настоящее время достаточно широко применяются для лечения сепсиса, вызванного грамотрицательными бактериями, достоверных случаев эндотоксического шока, связанного с применением этих препаратов, не описано [163].

Фторхинолоны, применяющиеся в клинике, являются относительно малотоксичными препаратами и, как правило, хорошо переносятся больными, в том числе и при длительных курсах лечения. Препараты не проявляют гепато-, нефро- и ототоксического действия [179]. В опытах на животных (мыши, крысы, кролики) фторхинолоны не оказывали токсического действия на организм беременной самки, эмбриона и не давали тератогенных эффектов [167].

Тем не менее, иногда при использовании фторхинолонов отмечаются побочные эффекты, среди которых следует выделить следующие:

- возможность развития фотодерматоза при ультрафиолетовом облучении [179]; в том числе описан случай развития фотодерматоза у 12-летней девочки, получавшей ципрофлоксацин [187];
- потенциальная возможность артротоксических эффектов и нарушений нормального развития хрящевой ткани, определившие возрастные ограничения к применению фторхинолонов: до 1987-1988 гг. фторхинолоны применялись только у взрослых больных [179]. Заметим, что эта побочная реакция была выявлена только в эксперименте, причём различные виды животных обнаружили различный уровень переносимости хинолонов. Наиболее чувствительными к артротоксическому действию хинолонов оказались неполовозрелые собаки, у которых развивались необратимые повреждения суставных хрящей в опорных суставах даже при применении в эксперименте доз препаратов, близких к терапевтическим у человека (30 мг/кг). После обнаружения артропатического эффекта у неполовозрелых животных контролируемые исследования фторхинолонов у детей не проводились; тем не менее данные препараты, исходя из их высокой терапевтической эффективности, были применены за последние 12 лет у детей в широком возрастном диапазоне, включая новорождённых. Несмотря на это, в клинике до сих пор нет документально подтверждённого случая необратимого повреждения хряща при терапии фторхинолонами, что заставляет педиатров пересмотреть свои взгляды на возможность использования препаратов данной группы в детской практике. Так, в Японии один из первых фторхинолонов, применённых у детей, норфлоксацин, разрешён для клинического использования в педиатрии [179, 180].
- реакции со стороны ЦНС, связанные с ингибированием рецепторов ГАМК, и возможные судорожные реакции. Интересно, что при применении фторхинолонов для лечения менингитов, когда

существенно может повышаться концентрация препаратов в ликворе, не отмечалось побочных реакций со стороны ЦНС [179]. Заслуживает внимания сообщение словацких авторов (V.Krcmery et al., 1999) о терапии нозокомиальных менингитов у 12 новорождённых и грудных детей внутривенным введением ципрофлоксацина в дозах от 10 до 60 мг/кг/сут. В 10 случаях наступило выздоровление, в 2 – переходящая гидроцефалия. При врачебном наблюдении за реконвалесцентами (продолжительностью от 27 месяцев до 10 лет) не было выявлено серьёзных неврологических нарушений [188].

По сообщению M.Khaneja et al. (1999), Department of pediatrics, State University of New York – Health Science Center, Brooklyn, USA, ципрофлоксацин был успешно применён для лечения сепсиса с менингитом, вызванным полиантибиотикорезистентным штаммом *Klebsiella pneumoniae*, у новорождённого с чрезвычайно низким весом без развития каких-либо побочных реакций [189].

Таким образом, очевидно, что препараты групп тетрациклинов, фторхинолонов и рифампицин представляют большой интерес для практики лечения бруцеллёза и заслуживают дальнейшего изучения.

Глава 4. Чувствительность к антибактериальным препаратам клинических изолятов бруцелл, выделенных в Южно-Казахстанской области

В настоящем исследовании мы провели изучение активности *in vitro* в отношении клинических изолятов бруцелл, традиционно применяемых для лечения бруцеллёза в Казахстане антибиотиков (доксидиклин, рифампицин, гентамицин) и сульфаниламидов (ТМП/СМ), а также фторхинолона, введённого в схему этиотропной терапии данной инфекции в последнее время — ципрофлоксацина и перспективного макролида II поколения, азитромицина.

Помимо изучения базовой антибиотикорезистентности клинических изолятов бруцелл, мы планировали установить, изменяется ли она у изолятов, выделенных из клинического материала, полученного от пациентов с рецидивами.

Бактериальные штаммы: 126 штаммов *Brucella melitensis*, выделенных от больных острым бруцеллёзом на территории Южно-Казахстанской области из различных клинических источников (кровь, ликвор, синовиальная жидкость) в период с 2004 по 2010 годы. В качестве контрольных для биотипирования и оценки антибиотикочувствительности использовались референтные штаммы *Brucella melitensis* 16М, *Brucella melitensis* Rev-1, *Brucella abortus* 2308, *Escherichia coli* 25922, *Staphylococcus aureus* 25923 из коллекции Казахского научного центра карантинных и зоонозных инфекций.

Идентификация выделенных культур осуществлялась общепринятыми методами (потребность в углекислом газе, способность к продукции сероводорода, редукция основных красителей и лизабельность фагом Тб). Все исследования проводились в шкафу биологической безопасности II типа.

Изучение чувствительности к антибактериальным препаратам

Изучение антибиотикочувствительности в Е-тесте выделенных клинических изолятов бруцелл проводилось в лаборатории бруцеллёза Казахского научного центра карантинных и зоонозных инфекций, куда культуры поступали из Южно-Казахстанской области для передачи на криохраниение. Там же проводилась верифицирующая идентификация бруцелл.

Определялась минимальная ингибирующая концентрация (МИК) доксициклина, рифампицина, гентамицина, ципрофлоксацина, азитромицина и комбинации триметоприм-сульфаметоксазол (ТМП/СМ) с помощью Е-теста (Biometrieux, Швеция) на бруцелл-агаре (Hi-media, Индия) с добавлением 5% овечьей сыворотки с оценкой результатов через 48 часов инкубации на воздухе (вне CO₂-инкубатора) при температуре 37°C.

Для оценки чувствительности нами был выбран Е-тест как технически более простой метод, нежели метод разведения в бульоне, но одновременно с

этим более безопасный для лабораторных работников и более стандартизованный по сравнению с методами разведения в бульоне и простым методом диффузии в агар.

Е-тест является надежным, воспроизводимым, легко выполняемым методом, дающим результаты, аналогичные получаемым с использованием обычных методов определения антибиотикочувствительности бруцелл. На чашки с агаром Мюллера-Хинтона с добавлением 5%-ой овечьей сыворотки, инокулированные бактериальными суспензией культуры бруцелл, откалиброванной до 0,5 мутности стандарта Макфарленда, были нанесены полоски Е-теста, содержащие градиент концентраций антибиотика от максимальной к минимальной. Чашки были помещены в термостат на 48 часов, и получившийся газон был исследован на МИК согласно рекомендациям Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI - ранее NCCLS). Поскольку пороговые значения для бруцелл CLSI в отношении изучавшихся антибактериальных препаратов не были официально установлены, использовались рекомендации для медленно растущих бактерий. В месте пересечения эллипсовидной зоны подавления роста с полоской Е-теста получали значение МИК.

МИК50 и МИК90 определялись как наименьшая концентрация изучаемого антибактериального препарата, при которой происходило подавление роста, соответственно, 50 и 90% изолята.

Результаты

Мы идентифицировали до вида 126 штаммов *Brucella melitensis*, выделенных от больных острым бруцеллёзом на территории Южно-Казахстанской области из различных клинических источников (кровь, ликвор, синовиальная жидкость) в период с 2004 по 2010 годы. Кроме того, параллельно была изучена антибиотикорезистентность у 12 клинических изолятов *Brucella melitensis*, выделенных у тех же больных, находящихся под проспективным наблюдением, при повторном обследовании в связи с рецидивом инфекции.

Значения МИК после аппликации полосок Е-теста на чашку Петри с газоном изучаемой культуры бруцелл измеряли спустя 48 часов инкубации.

В качестве контроля качества постановки использовали следующие референтные штаммы из коллекции Казахского научного центра карантинных и зоонозных инфекций: *Brucella melitensis* 16M, *Brucella melitensis* Rev-1, *Brucella abortus* 2308, *Escherichia coli* 25922, *Staphylococcus aureus* 25923.

Интерпретация МИК осуществлялась нами в соответствии с рекомендациями Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) для медленно растущих бактерий [190].

Значения МИК для изучавшихся антибактериальных препаратов представлены в таблице 1 и на рисунке 1.

В целом все изучавшиеся штаммы бруцелл оказались чувствительными к исследуемым антибактериальным препаратам. Один из изучаемых изолятов оказался резистентным к рифампицину (МИК₉₀ — 1,0 мг/л), а два — к

ТМП/СМ (МИК₉₀ — 0,62 и 0,74 мг/л).

Таблица 1 — Минимальные ингибирующие концентрации антибактериальных препаратов по отношению к клиническим изолятам бруцелл, выделенных на территории Южно-Казахстанской области

<i>Препарат</i>	<i>МИК (мг/л)</i>	<i>МИК₅₀</i>	<i>МИК₉₀</i>	<i>Пороговые значения чувствительности согласно CLSI</i>
Доксициклин	0,025 — 0,125	0,05	0,07	≤ 2,0
Рифампицин	0,5 — 2,0	1,5	2,0	≤ 1,0
Гентамицин	0,064 — 1,5	1,0	1,5	Не определено
Ципрофлоксацин	0,034 — 0,25	0,064	0,098	≤ 1,0
ТМП/СМ	0,064 — 0,25	0,082	0,125	≤ 0,5
Азитромицин	0,064 — 0,5	0,25	0,5	≤ 4,0

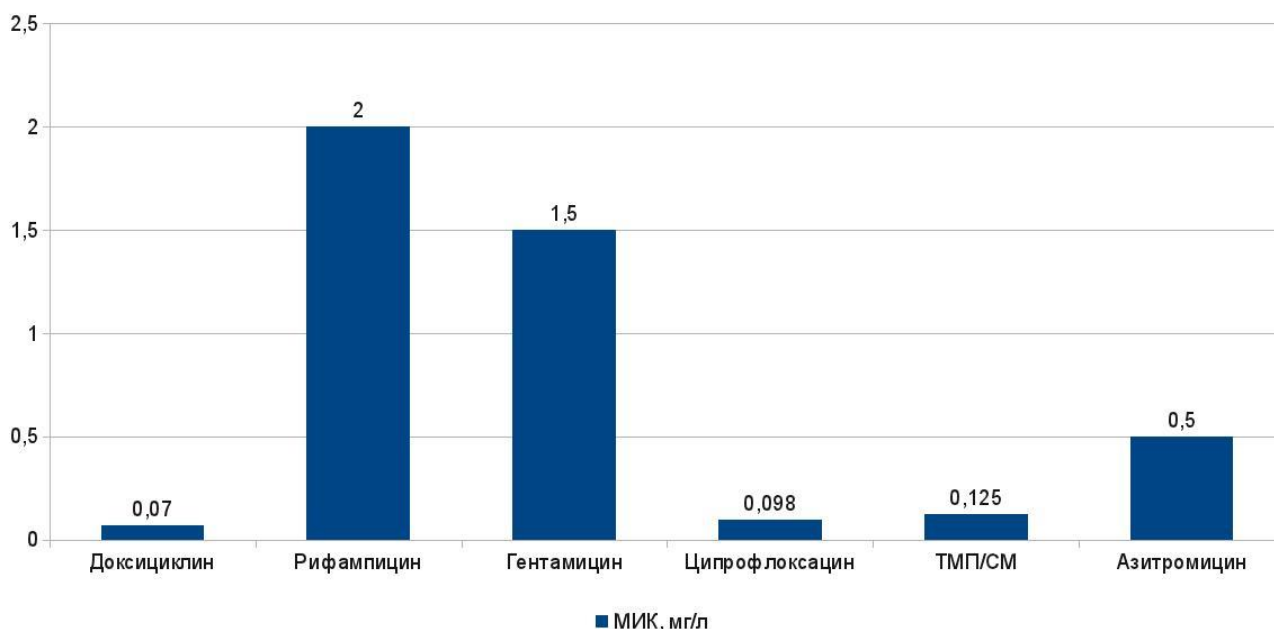


Рисунок 1 — Минимальные ингибирующие концентрации антибактериальных препаратов по отношению к клиническим изолятам бруцелл, выделенных на территории Южно-Казахстанской области

В соответствии с МИК₉₀ наиболее эффективным *in vitro* в отношении бруцелл препаратом оказался доксициклин (0,07 мг/мл). Второе место по эффективности занял цiproфлоксацин (0,098 мг/мл). Несмотря на то, что рифампицин *in vitro* оказался эффективен в отношении клинических изолятов бруцелл, настораживают его относительно высокие МИК, необходимые для подавления бактериального роста. Это можно связать с тем, что на территории Южно-Казахстанской области помимо бруцеллёза также широко распространён и туберкулёз, для лечения которого широко применяется данный препарат. Это может приводить к селекции устойчивых штаммов бруцелл, например, при микст-инфекции.

Несмотря на появление новых противобруцеллёзных препаратов, производные тетрациклина всё ещё остаются наиболее часто назначаемыми антибиотиками для лечения бруцеллёза в Казахстане в связи с их отличными фармакокинетическими характеристиками. Оправданность такого подхода подтверждают и наши исследования. Доксициклин как по МИК₅₀, так и МИК₉₀ оказался наиболее эффективен в отношении клинических изолятов бруцелл *in vitro*.

Другим препаратом выбора для лечения бруцеллёза, согласно схеме ВОЗ 1986 года, является рифампицин. В нашем исследовании этот антибиотик, хотя и оказался эффективен в отношении клинических изолятов бруцелл, потребовал относительно более высоких концентраций по сравнению с другими препаратами. Это может свидетельствовать о нарастании антибиотикорезистентности по отношению к рифампицину в регионе южного Казахстана. Тем не менее, необходимо учитывать возрастание активности антибиотика в кислой среде (например, в фаголизосомах) [11], поэтому рифампицин остаётся препаратом выбора для лечения тяжёлых форм бруцеллёза.

Гентамицин показал относительно низкую эффективность в отношении бруцелл. В этой связи и в связи с его известной ототоксичностью следует пересмотреть практику частого включения данного антибиотика в схему лечения бруцеллёза у детей.

ТМП/СМ показал достаточно высокую эффективность в отношении бруцелл. Его низкая стоимость и простота применения (перорально) делает его перспективным для лечения неосложнённых форм бруцеллёза.

Наше исследование, проведённое в отношении цiproфлоксацина, показало, что этот фторхинолон более эффективен в отношении бруцелл, нежели другие препараты, хотя и уступает доксициклину. В этой связи случаи клинической неэффективности цiproфлоксацина (*in vitro*) нуждаются в дополнительном изучении.

МИК изолятов, полученных от пациентов с рецидивами, сравнивались с МИК исходных культур, полученных от тех же больных. Каких-либо статистически значимых различий в антибиотикограмме исходных и повторно выделенных штаммов бруцелл у пациентов с рецидивами инфекции выявлено не было.

Среди изученных изолятов, выделенных от больных с рецидивами бруцеллёза, не было выявлено превышения пороговых значений чувствительности CLSI ни к одному из антибактериальных препаратов, взятых в разработку (таблица 2).

Таблица 2 — Минимальные ингибирующие концентрации антибактериальных препаратов по отношению к клиническим изолятам бруцелл, выделенных на территории Южно-Казахстанской области от больных с рецидивами бруцеллёза

Препарат	МИК (мг/л)	МИК₅₀	МИК₉₀	Пороговые значения чувствительности согласно CLSI
Доксициклин	0,095 — 0,25	0,18	0,25	≤ 2,0
Рифампицин	0,5 — 2,0	1,5	2,0	≤ 1,0
Гентамицин	0,19 — 1,5	1,0	1,5	Не определено
Ципрофлоксацин	0,094 — 0,25	0,094	0,125	≤ 1,0
ТМП/СМ	0,064 — 0,25	0,085	0,25	≤ 0,5
Азитромицин	0,064 — 0,5	0,25	0,5	≤ 4,0

Клинические изоляты *B. melitensis*, циркулирующие на территории Южно-Казахстанской области, восприимчивы к широкому спектру антибактериальных препаратов, включая сульфаниламиды, фторированные хинолоны и макролиды, без тенденции к нарастанию резистентности в течение инфекционного процесса. Экстраполяция этих результатов, однако, лимитирована ограниченной территорией наблюдения, а также небольшим числом наблюдавшихся изолятов, полученных от больных с рецидивами.

Мониторинг антибиотикочувствительности бруцелл затруднён в связи с отсутствием рекомендаций CLSI, ориентированных на бруцеллёзную инфекцию, а также необходимостью соблюдения требований 3 уровня биобезопасности при выполнении исследований в связи с высокой опасностью возбудителя для персонала лаборатории.

Периодическое тестирование чувствительности ограниченной выборки бруцелл к антибактериальным препаратам на дозорных территориях в референтных лабораториях с использованием Е-теста может быть более приемлемым для выработки рекомендаций для проведения эмпирической этиотропной терапии бруцеллёза.

Заключение

Нами проведена оценка антибиотикочувствительности клинических изолятов бруцелл, циркулирующих на территории Южно-Казахстанской области. Наиболее эффективным *in vitro* в отношении бруцелл препаратом оказался доксициклин (0,07 мг/мл). Второе место по эффективности занял ципрофлоксацин (0,098 мг/мл). Отмечается тенденция к нарастанию резистентности по отношению к рифампицину у клинических изолятов бруцелл, выделенных в Южно-Казахстанской области.

Глава 5. Чувствительность к антибактериальным препаратам клинических изолятов *Brucella melitensis*, выделенных в Казахстане в 2008-2014 гг.

За последние 35 лет в Казахстане ежегодный уровень заболеваемости впервые диагностированным бруцеллёзом людей варьировал от 8,5 до 24 случаев на 100 тыс. населения (этот показатель является устреднённым по всей стране), хотя в некоторых эндемичных районах показатели заболеваемости значительно превышают эти цифры. Наиболее распространённым видом в Казахстане, выделяемым от людей, является *B. melitensis* [191]. Антибиотики играют важную роль в стратегии лечения заболевания и преимущественно определяют эффективность терапии. Широко используемыми антибиотиками для этиотропного лечения бруцеллёза являются тетрациклины, триметоприм / сульфаметоксазол, аминогликозиды, рифампицин и фторхинолоны [7, 8]. Низкая эффективность и частые рецидивы после монотерапии привели к переходу на комбинированную схему лечения в 1986 году [9]. Тем не менее, комбинированные схемы также имеют успех ниже 100% из-за развития устойчивости к антибиотикам [10].

В Казахстане рекомендуемая терапевтическая схема основывается на рекомендациях ВОЗ для взрослого населения, хотя режимы для детей и беременных женщины могут отличаться, в случае, если препараты являются токсичными. Несмотря на высокую частоту рецидивов, имеется мало информации о резистентности к антибиотикам штаммов бруцелл, циркулирующих в Казахстане.

Высокий уровень биологической опасности, которую представляют живые бруцеллы требует соблюдения стандартов УББЗ, которые делает исследование устойчивости к антибиотикам сложным, дорогим или даже невозможным. Тем не менее, данные об устойчивости к антибиотикам важны, потому что антибиотикорезистентные изоляты бруцелл могут распространяться в широких пределах [5, 6, 192].

В этой главе мы опишем результаты определения чувствительности к антибиотикам у 329 *Brucella melitensis* к пяти обычно используемым для лечения бруцеллёза антибиотикам.

Клинические изоляты *B. melitensis* и их характеристика

В течение 2008-2014 годов изоляты бруцелл были выделены от пациентов, положительно реагировали на бруцеллёз в реакции агглютинации (с титрами 1: 200 и выше).

Образцы крови были отобраны у пациентов с симптомами, не исключаяющими бруцеллёз. Кровь для выделения бруцелл была собрана в соответствии со стандартной операционной процедурой по выделению культур бруцелл. Гемокультуры были получены с использованием метода роста на бифазной среде, предложенной Кастанеда [193, 194]. Первичный

посев на транспортную среду проводился у постели больного в местных лечебных учреждениях в 11 областях Казахстана.

Для идентификации все образцы были в дальнейшем переданы в лабораторию бруцеллёза Казахского научного центра карантинных и зоонозных инфекций (КНЦКЗИ). Всего было собрано 329 изолятов. Изоляты были идентифицированы с использованием стандартных лабораторных тестов: потребность в CO_2 , продукция H_2S , редукция анилиновых красителей (тионин и основной фуксин в конечных концентрациях 20-40 мкг / мл), агглютинация специфической антисывороткой к антигенам А и М, лизабельность фагами Tb и Weybridge. Идентификация видов подтверждалась посредством мультиплексной ПЦР «Bruce-ladder» [195].

Определение минимальной ингибирующей концентрации (МИК)

МИК тетрациклина, гентамицина, доксициклина, стрептомицина и рифампицина определяли с помощью градиентные полосок Е-теста (Biomerieux, Швеция). Суспензии бактерий в титрах 10^5 - 10^6 КОЕ / мл засеивали на поверхность чашек с Brucella-агаром с геминном и витамином К (HiMedia Laboratories, Индия) и 5% овечьей сывороткой (Sigma-Aldrich). МИК определялись после 48 часов инкубации в атмосферном воздухе при 37°C после помещения полосок Е-теста на поверхность агара. Для контроля теста были использованы эталонные штаммы *E. coli* ATCC 25922 и *B. melitensis* 16 М.

Пороговые значения МИК для тетрациклина, гентамицина, доксициклина и стрептомицина были определены с использованием руководящих принципов CLSI [196]. Поскольку эти рекомендации не предоставляют классификационную категорию для «промежуточной» устойчивости, все изоляты, которые имели значение МИК выше порогового были классифицированы как устойчивые. Поскольку пороговое значение для рифампицина не было определено для бруцелл, мы использовали рекомендации для медленно растущих бактерий (*H. influenzae*) [197]. Изоляты со значением МИК к рифампицину в 1,5 мкг/мл не были классифицированы ни как чувствительные, ни как устойчивые, потому что в руководстве CLSI это значение находится между упомянутыми категориями.

Были определены такие показатели эффективности антибиотиков в отношении бруцелл, как МИК50 и МИК90, представляющие собой концентрации препаратов, ингибирующие рост тестируемых изолятов на 50% и 90%, соответственно.

Результаты

По результатам бактериологических исследований и мультиплексной ПЦР было установлено, что все 329 изолятов принадлежат к одному виду, *B. melitensis*.

Определённые диапазоны МИК, МИК50 и МИК90 были соотнесены с классификационными категориями на восприимчивость / устойчивость к антибиотикам и приведены в таблицах 3 и 4.

Все 329 штаммов были чувствительны к стрептомицину, тетрациклину и

доксациклину; упомянутые антибиотики проявляли высокую антимикробную активность. Также 97,3% изолятов были чувствительны к гентамицину, и только 2,7% были устойчивы к гентамицину.

Таблица 3 — Диапазоны МИК, МИК50, МИК90

Препарат	Диапазон МИК (мкг / мл)	Пороговые значения чувствительности		
		S	I	R
Рифампицин	0,38-16	≤ 1	2	≥ 4
Гентамицин	0,5-8	≤ 4	-	-
Стрептомицин	0,25-4	≤ 8	-	-
Тетрациклин	0,032-0,5	≤ 1	-	-
Доксициклин	0,023-0,19	≤ 1	-	-

S – чувствительные, I – с промежуточной чувствительностью, R – устойчивые

Таблица 4 – Устойчивость к антибиотикам изолятов *B. melitensis*

Препарат	МИК50		МИК90		Классификация изолятов, число (%)		
	Значение	Число изолятов	Значение	Число изолятов	S	I	R
Рифампицин	1,5	170	8	326	123 (37,4)	72 (21,9)	87 (26,4)
Гентамицин	1	188	3	318	320 (97,3)	-	9 (2,7)
Стрептомицин	0,75	191	3	327	329 (100)	-	-
Тетрациклин	0,094	165	0,25	324	329 (100)	-	-
Доксициклин	0,047	212	0,094	319	329 (100)	-	-

Высокий уровень устойчивости исследованных изолятов наблюдается к рифампицину. Только 37,4% изолятов были чувствительны к антибиотику, 21,9% показали промежуточную чувствительность, а 26,4% были резистентны. Также 14,3% изолятов, МИК которых был равен 1,5 мкг / мл не были отнесены ни к одной категории, потому что руководящие принципы CLSI не позволяют однозначно назначить категорию.

Из девяти изолятов, устойчивых к гентамицину, восемь также были устойчивы к рифампицину. Значения МИК90 для тетрациклина и доксициклина были ниже соответствующих порогов CLSI (25% и 9,4% пороговых значений, соответственно). Для стрептомицина МИК90 был 37,5%, а для гентамицина МИК90 составлял 75% пороговых значений. В то же время для рифампицина даже МИК50 превысила порог, указывающий на

низкую чувствительность к рифампицину среди циркулирующих изолятов бруцелл.

Частоты резистентных изолятов различались в образцах из разных регионов Казахстана. Все девять изолятов, устойчивых к гентамицину, были собраны на юге Казахстана. В то же время, изоляты, устойчивые к рифампицину, наблюдались практически повсеместно во всех регионах страны: в 7 из 11 областей Казахстана были выделены устойчивые к рифампицину изоляты. В определённых областях резистентность к рифампицину была особенно высока: 73,3% изолятов – в Кызылординской области, 57,1% – в Жамбылской, 52,9% – в Атырауской и 50% – в Карагандинской области. Те же области также имеют наибольшую распространенность штаммов с промежуточной чувствительностью и устойчивостью к рифампицину (таблица 5).

Таблица 5 – Территориальное распределение устойчивости к гентамицину в Казахстане

Область	Число изолятов	S (абс.)	S (%)	R (абс.)	R (%)
Акмолинская	1	1	100	0	0
Актюбинская	7	7	100	0	0
Алматинская	91	91	100	0	0
Атырауская	17	17	100	0	0
ВКО	26	26	100	0	0
Жамбылская	49	41	83,7	8	16,3
ЗКО	26	26	100	0	0
Карагандинская	16	16	100	0	0
Кызылординская	30	30	100	0	0
СКО	2	2	100	0	0
ЮКО	64	63	98,4	1	1,6

Заключение

В нашем исследовании мы продемонстрировали, что изоляты *Brucella melitensis* в Казахстане чувствительны к стрептомицину, доксициклину и тетрациклину, а абсолютное большинство изолятов также чувствительны к гентамицину. Были обнаружены разные уровни чувствительности к рифампицину: промежуточная чувствительность и полная устойчивость к рифампицину была обнаружена в 21,9% и 26,4% случаев, соответственно. Это важное наблюдение, потому что рифампицин используется в качестве препарата первой очереди в клиническом протоколе лечения бруцеллёза, принятом в Казахстане. Кроме того, из девяти изолятов, устойчивых к

гентамицину, восемь изолятов были также устойчивы к рифампицину.

Глава 6. Изучение внутриклеточной активности ряда антибактериальных препаратов в отношении *Brucella melitensis* 1251 на модели инфицированных моноцитов человека Mono MAC 6

Как упоминалось ранее, бруцеллы являются факультативными внутриклеточными паразитами, персистирование которых в организме хозяина обусловлено способностью выживать и даже размножаться в фаголизосомах РЭС [1]. В этой связи представляла интерес способность противобруцеллёзных препаратов воздействовать на внутриклеточно расположенные бактерии.

Человеческие моноциты были использованы как наиболее полно соответствующие по своим характеристикам макрофагам больного человека. В качестве модельной культуры был использован типовой штамм *Brucella melitensis* 1251, поскольку в Казахстане преобладает бруцеллёз козе-овечьего типа.

Культура *B. melitensis* 1251 выращивалась пересевом музейных штаммов на чашки с Бруцелла-агаром производства Hi-media (India) и инкубировалась в течение 48 часов при температуре 37°C. Эти первичные чашки использовались для моделирования внутриклеточной бруцеллёзной инфекции.

Клеточная линия фагоцитов сохранялась в среде RPMI 1640 (Sigma Chemical Co., St Louis, MO, USA). До инокуляции бруцелл клеточная линия тестировалась на инфицированность микоплазмами.

Как предварительная часть исследования нами было выполнено определение минимальной ингибирующей концентрации в отношении бруцелл каждого из изучавшихся препаратов (рифампицин, ципрофлоксацин, тетрациклин, доксициклин, гентамицин, стрептомицин и азитромицин) посредством Е-теста, а также методом серийных разведений в печёночном бульоне (контроль).

Инфицированная культура клеток была пролечена 8, 4, 1 и 0,25 × минимальными подавляющими концентрациями (МИК) каждого из препаратов.

В качестве контрольной группы служила неинфицированная линия клеток, пролеченная теми же препаратами в тех же дозах.

Инкубация осуществлялась в течение 2 часов, после чего клеточный пул собирался посредством центрифугирования при 200 × g в течение 6 минут. Среда, содержащая антибактериальный препарат, удалялась посредством отсасывания. Клетки дважды отмывались фосфатным буфером для удаления остатка антибактериального препарата. После этого к клеткам добавляли 0,1% Triton X-100 (Sigma-Aldrich) для провокации их лизиса и высвобождения внутриклеточного возбудителя. Об уровне эрадикации внутриклеточных бруцелл судили по числу КОЕ после посева клеточного

лизата на твёрдую питательную среду.

Результаты

Была изучена чувствительность штаммов *B. melitensis* 1251 по отношению к ряду антибактериальных агентов: рифампицин, ципрофлоксацин, тетрациклин, доксициклин, гентамицин, стрептомицин и азитромицин (таблица 6).

Таблица 6 — Чувствительность к антибактериальным препаратам *B. melitensis* 1251 (мг/л)

<i>Препарат</i>	<i>МИК</i>	<i>Диапазон</i>
Рифампицин	1,2	0,5 — 1,5
Ципрофлоксацин	0,05	0,03 — 0,25
Тетрациклин	0,25	0,19 — 0,5
Доксициклин	0,05	0,039 — 0,125
Гентамицин	0,084	0,064 — 1,5
Стрептомицин	2,7	2,0 — 4,0
Азитромицин	0,35	0,1 — 1,0

Как видно из таблицы, наибольшую активность в отношении внеклеточно расположенных бруцелл *in vitro* проявили доксициклин, ципрофлоксацин и гентамицин. Активность азитромицина в отношении бруцелл была умеренной.

Влияние различных антибактериальных препаратов на внутриклеточный рост бруцелл оценивалось по методике, описанной выше.

На протяжении всего периода наблюдения не было выявлено каких-либо токсических эффектов от применённых антибактериальных препаратов в отношении не инфицированной клеточной линии.

Число жизнеспособных КОЕ бруцелл в клеточной культуре моноцитов Моно Мас 6, инфицированных *B. melitensis* 1251 в интактной среде и после инкубации с антибактериальными препаратами оценивалось по логарифмической шкале $\log_{10}$. Число КОЕ бруцелл в интактной среде составило $1e+65$.

Результаты измерений КОЕ после инкубации с различными препаратами представлены в таблице 7 и на рисунке 2.

Таблица 7 — Влияние антибиотиков на внутриклеточно расположенные бруцеллы (по жизнеспособным КОЕ бруцелл после деструкции инфицированных моноцитов)

<i>Препарат</i>	<i>8МИК</i>	<i>4МИК</i>	<i>МИК</i>	<i>0,25 МИК</i>
Рифампицин	1e+19	1e+21	1e+26	1e+38
Ципрофлоксацин	1e+19	1e+22	1e+46	1e+48
Тетрациклин	1e+16	1e+18	1e+31	1e+35
Доксициклин	1e+16	1e+16	1e+21	1e+29
Гентамицин	1e+26	1e+48	1e+56	1e+58
Стрептомицин	1e+28	1e+50	1e+58	1e+58
Азитромицин	1e+24	1e+26	1e+38	1e+43

Внутриклеточной эрадикации бруцелл удалось достичь лишь при использовании 8 МИК гентамицина и стрептомицина, поскольку эти антибиотики практически не проникали внутрь клеток.

Рифампицин и тетрациклины успешно снижали число внутриклеточных бактерий уже при 0,25 МИК, а ципрофлоксацин – при 1 МИК. Это можно объяснить высокой биодоступностью препаратов, в том числе хорошим проникновением внутрь клеток.

Меньшая эффективность ципрофлоксацина в отношении фагоцитированных бруцелл может быть объяснена падением его активности в кислой среде фаголизосом [13].

Азитромицин показал умеренную активность в отношении внутриклеточно расположенных бруцелл. В целом, как и другие антибактериальные препараты, азитромицин показал дозозависимый эффект: при повышении концентрации антибиотика во внеклеточной среде, повышалось его влияние в отношении внутриклеточных бруцелл.

Таким образом, стрептомицин и гентамицин, входящие в рекомендуемые ВОЗ схемы этиотропного лечения бруцеллёза, не позволяют достичь эффективной эрадикации внутриклеточного возбудителя.

Наибольшую эффективность в отношении внутриклеточных бруцелл показали тетрациклины и рифампицин.

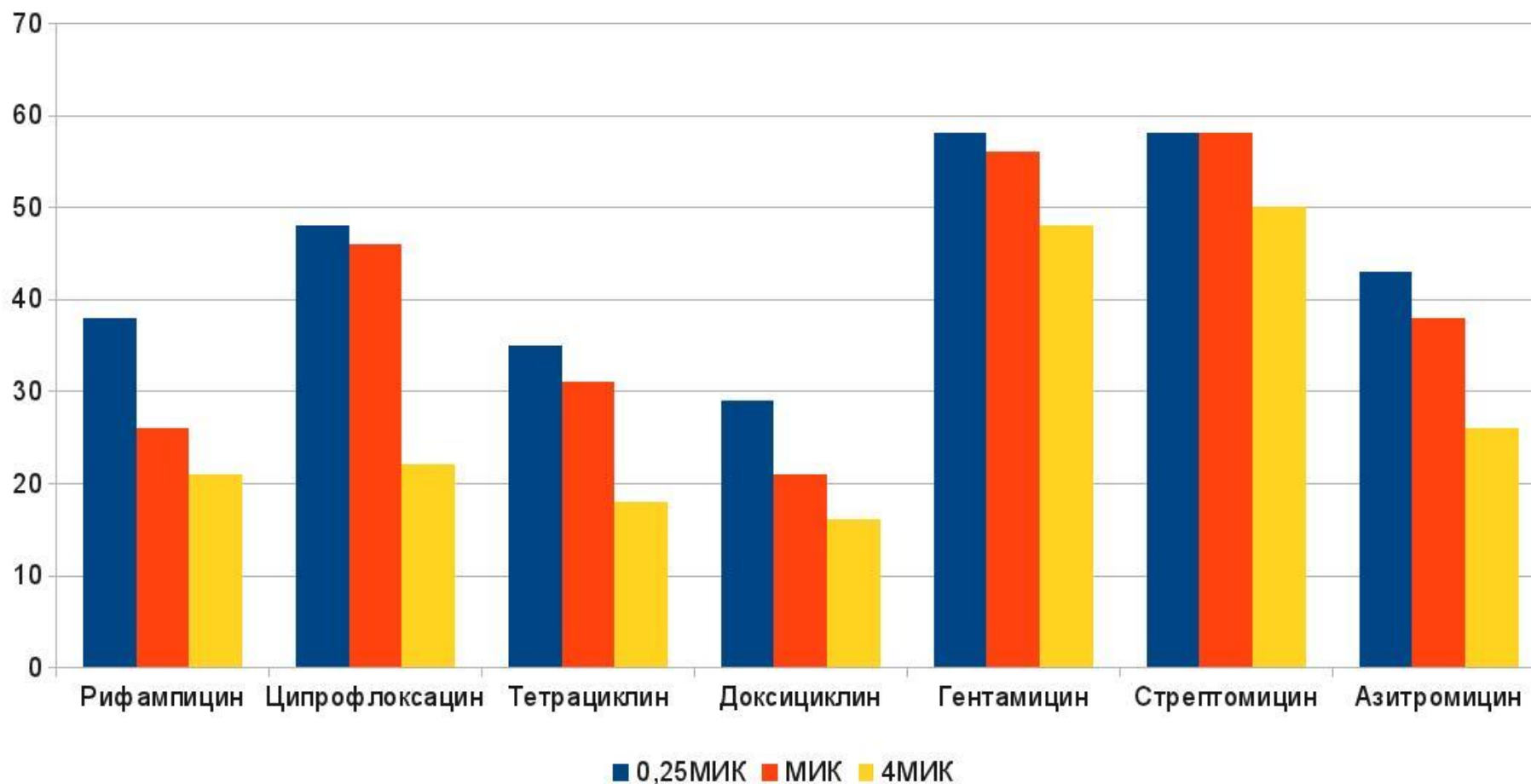


Рисунок 2 — Динамика числа жизнеспособных бруцелл, выделенных из лизированных моноцитов ($\log_{10}$ КОЕ), после инкубации с антибактериальными препаратами

Основная цель лечения бруцеллёза — это освобождение макроорганизма от возбудителя, что достигается эрадикацией внутриклеточно расположенных бруцелл, которые не только способны выживать в кислой среде фаголизосом, но и размножаться [13]. Уничтожение возбудителя в крови посредством назначения противобруцеллёзных препаратов, активных *in vitro*, но не способных проникать внутрь клеток РЭС, приводит к сохранению бруцелл во внутриклеточных депо селезёнки, костного мозга и периферических лимфатических узлов с последующим высвобождением инфекционного агента при воздействии на макроорганизм неблагоприятных факторов различного генеза.

Клеточная линия моноцитов Mono Mac 6 успешно моделирует миелоидные клетки, в которых паразитируют бруцеллы [156]. Наше исследование показало, что модель может быть использована для изучения внутриклеточной активности антибактериальных препаратов в отношении бруцелл.

Добавление препаратов, характеризующихся хорошим проникновением внутрь клеток (тетрациклины, рифампицин) в концентрациях, близких к МИК, позволяет, судя по числу КОЕ после лизиса моноцитов, резко уменьшить число жизнеспособных клеток бруцелл, в то время как препараты, не проникающие внутрь клеток (стрептомицин и гентамицин) не оказали выраженного эффекта в отношении внутриклеточно расположенных бруцелл даже при повышении концентрации антибиотиков во внеклеточной среде.

Недостаточная эффективность ципрофлоксацина в отношении внутриклеточно расположенных бруцелл не может быть объяснена лишь биодоступностью препарата (ципрофлоксацин хорошо проникает внутрь клеток [21, 135]) и нуждается в дальнейших исследованиях.

Как показало наше исследование, азитромицин в принципе способен оказывать влияние на фагоцитированные бруцеллы, но для достижения лучшего эффекта необходимо повышение его концентрации во внеклеточной среде (не менее 4 МИК).

Заключение

Доказано, что стрептомицин и гентамицин, входящие в рекомендуемые ВОЗ схемы этиотропного лечения бруцеллёза, не позволяют достичь эффективной эрадикации внутриклеточного возбудителя. Наибольшую эффективность в отношении внутриклеточных бруцелл показали тетрациклины и рифампицин.

Глава 7. Влияние различных схем этиотропной терапии бруцеллёза на развитие рецидивов у больных

7.1. Клиническая характеристика бруцеллёза у обследованных больных

Данный фрагмент исследования был проведён с целью изучения региональных особенностей клинического течения острого и подострого бруцеллёза (подтверждённые случаи), а также влияния различных факторов риска, включая биохимические и бактериологические показатели, на развитие рецидива инфекции после проведённого этиотропного лечения.

Особое внимание уделялось персистированию возбудителя, об эрадикации которого вследствие антибактериальной терапии судили по динамике роста в гемокультуре и выявлению бактериальной ДНК бруцелл в венозной крови пациентов до и после проведённого лечения.

Всего бактериологическое подтверждение диагноза было получено в 141 случае (57,09%). Все выделенные культуры относились к виду *Brucella melitensis*. Тем самым, все больные, составившие основную группу (247 случаев), были с диагнозом А23.0 согласно МКБ 10.

Средний возраст наблюдавшихся больных составил 37,28 лет с разбросом от 15 до 80 лет (стандартное отклонение 13,64).

Распределение больных по возрасту представлено в таблице 8.

Анализ распределения по возрасту наблюдавшегося контингента выявил преобладание среди больных бруцеллёзом лиц трудоспособного возраста, от 31 до 40 лет (27,13%), что связано с более частым контактом данной возрастной категории со скотом, положительно реагирующим на бруцеллёз, в индивидуальных хозяйствах.

Таблица 8 — Распределение больных по возрасту

<i>Возрастная группа, лет</i>	<i>Абсолютное число</i>	<i>Доля, %</i>
15-20	34	13,77
21-30	50	20,24
31-40	67	27,13
41-50	51	20,65
51-60	39	15,79
61 и старше	6	2,43
Всего	247	100

Демографические данные наблюдавшихся случаев представлены в

таблице 9.

Почти все больные (242 случая, 97,98%), заболевшие бруцеллёзом, были из сельских местностей, неблагоприятных по бруцеллёзу сельскохозяйственных животных (преимущественно мелкому рогатому скоту).

Таблица 9 – Демографические данные наблюдавшихся больных

<i>Показатель</i>	<i>Число случаев</i>	<i>Доля, %</i>
Пол:		
Мужской	155	62,75
Женский	92	37,25
Национальность:		
Казах	202	81,78
Узбек	28	11,34
Русский	11	4,45
Азербайджанец	5	2,02
Другая	1	0,40
Место жительства:		
Город	5	2,02
Село	242	97,98

Среди общего числа больных бруцеллёзом преобладали пациенты казахской национальности (202 случая, 81,78%), что объясняется традиционной занятостью в животноводстве преимущественно коренного населения Республики Казахстан (рисунок 3).

Также профессиональной вовлечённостью в сельском хозяйстве и животноводческой промышленности можно объяснить преобладание мужчин в общей структуре заболевших (рисунок 4).

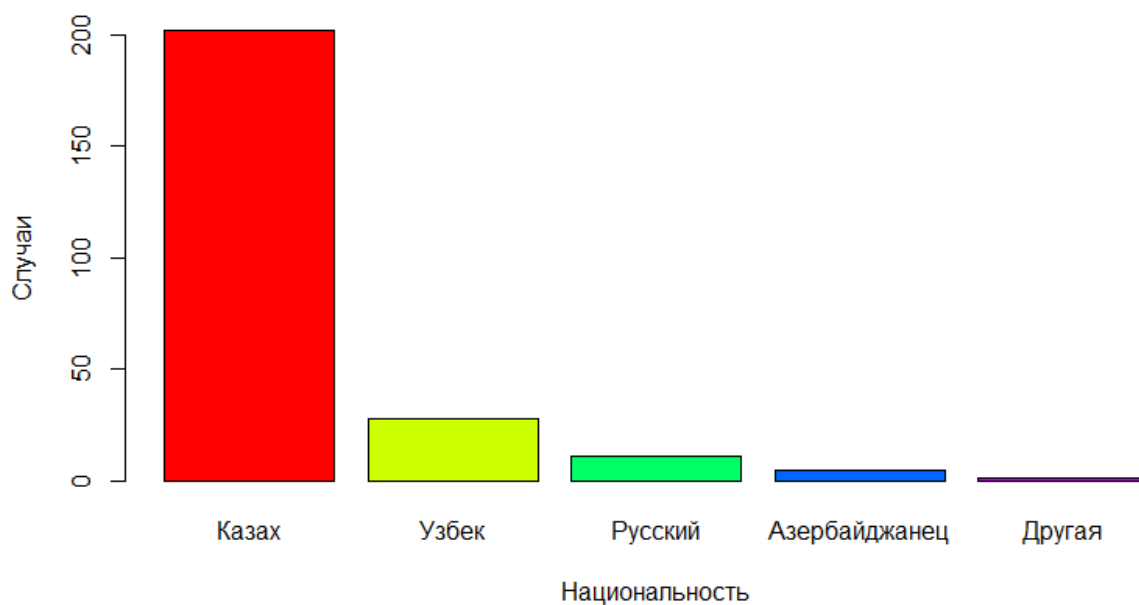


Рисунок 3 – Национальная структура больных бруцеллёзом

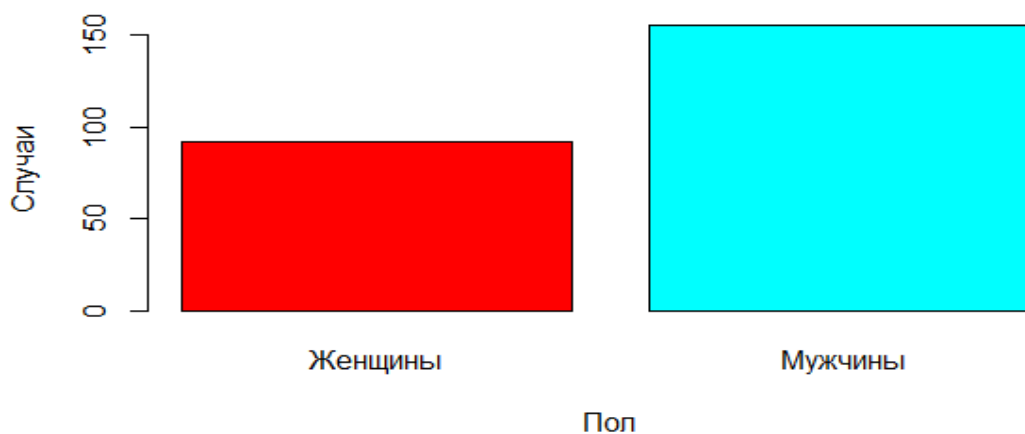


Рисунок 4 – Половая структура больных бруцеллёзом

В общей структуре заболевших преобладали сельские жители (97,98%), что также является отражением профессионального характера бруцеллёзной инфекцией у взрослых (рисунок 5).

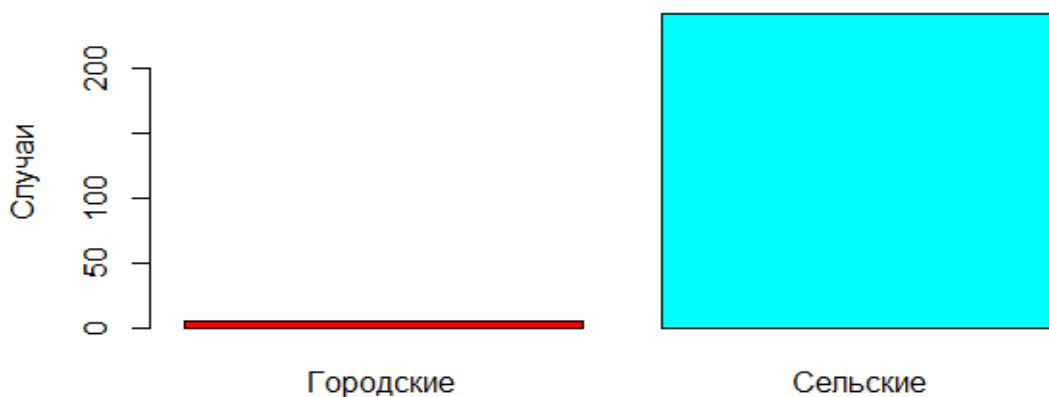


Рисунок 5 – Распределение больных бруцеллёзом по месту жительства

У пациентов, взятых в разработку, мы чаще наблюдали острый бруцеллёз (196 случаев, 79,35%), затем подострый (51 случай, 20,65%, рисунок 6).

Нами не было выявлено статистически значимых различий в клинических проявлениях в группах острого и подострого бруцеллёза, поэтому в дальнейшем приводится общий анализ этих двух групп.

Среди обследованных больных бруцеллёзом преобладали случаи лёгкого и среднетяжёлого течения заболевания (таблица 10, рисунок 7).

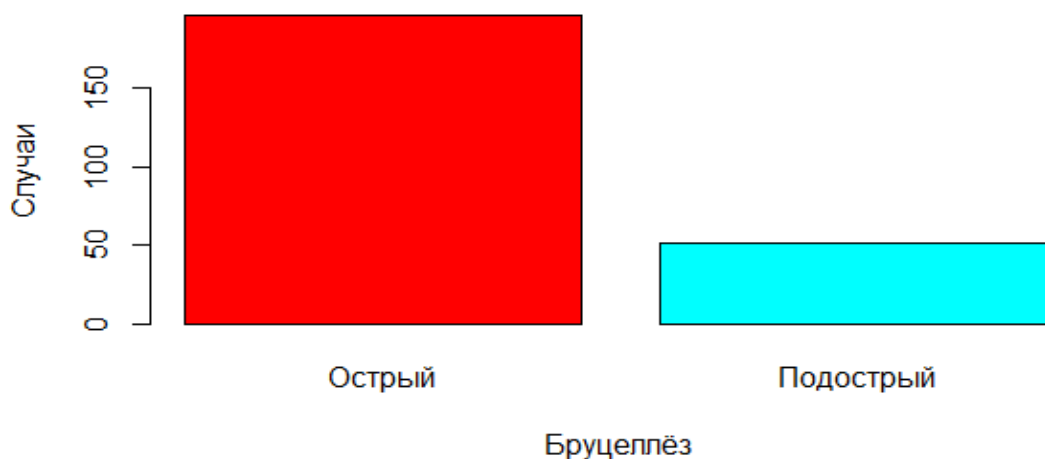


Рисунок 6 – Распределения случаев бруцеллёза у обследованных больных по формам

Таблица 10 – Частотная таблица распределения случаев бруцеллёза по степени тяжести

<i>Течение заболевания (абсолютное число, доля в %)</i>		
<i>Лёгкое</i>	<i>Среднетяжёлое</i>	<i>Тяжёлое</i>
99 (40,08)	107 (43,32)	41 (16,60)

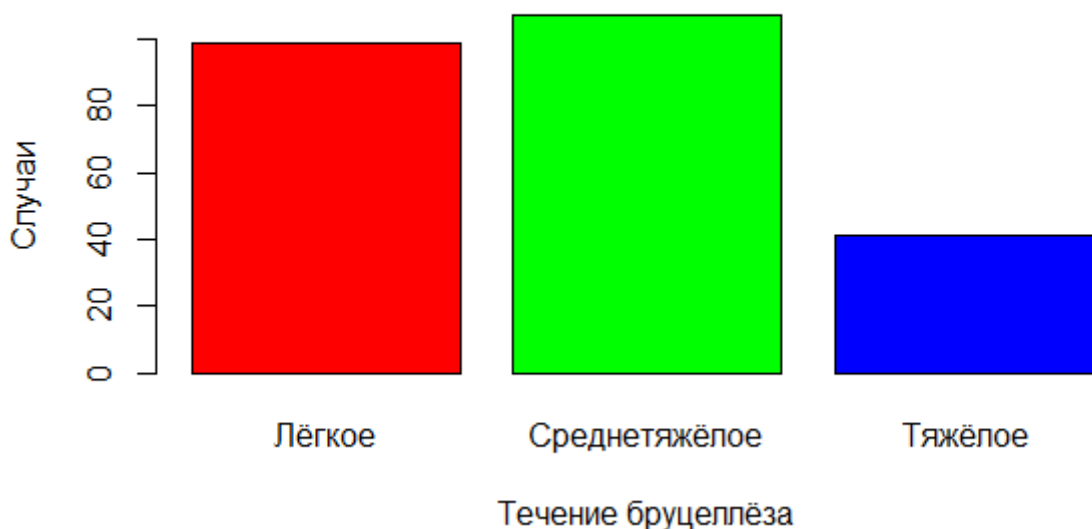


Рисунок 7 — Распределение наблюдавшихся больных по тяжести течения заболевания

Нами не выявлено статистически значимой связи между возрастом, полом, национальностью и местом жительства наблюдавшихся больных и тяжестью течения бруцеллёза (таблица 11).

Фоновая патология у наблюдавшихся больных, представленная в таблице 12, наблюдалась более чем в половине случаев (52,23%).

Таблица 11 – Корреляционные связи между демографическими данными и тяжестью течения заболевания у наблюдавшихся больных

<i>Показатель</i>	<i>Коэффициент полисерийной / полихорической корреляции</i>	<i>Значение p</i>	<i>Критерий χ^2 Пирсона</i>	<i>Значение p</i>
Возраст	0,02642 $\pm$ 0,07172	0,129	-	-
Пол	-0,06148 $\pm$ 0,09117	0,7022	0,5966	0,7421
Национальность	-0,1182 $\pm$ 0,09493	0,4367	7,5147	0,4823
Место жительства:	0,03282 $\pm$ 0,2092	0,05947	2,9455	0,2293

Таблица 12 — Сопутствующие заболевания у наблюдавшихся больных

<i>Заболевание</i>	<i>Число случаев</i>	<i>Частота, %</i>
Гипохромная анемия	23	9,31
Хронический тонзиллит	57	23,08
Бронхит	7	2,83
Хронический гастрит	12	4,86
Дискинезия жёлчевыводящих путей	22	8,91
Холецистит	3	1,21
Хронический гепатит	5	2,02

Неблагоприятный преморбидный фон у обследованных больных характеризовался наличием гипохромной анемии (9,31%), а также сопутствующих заболеваний со стороны желудочно-кишечного тракта (хронический гастрит — 2,02%, дискинезия жёлчевыводящих путей — 8,91%, холецистит — 1,21% и со стороны органов дыхания (хронический тонзиллит — 23,08%, бронхит — 2,83%). В 5 случаях (2,02%) наблюдался хронический гепатит с выявлением HB_sAg и anti-core Ag, а также длительным сохранением высоких показателей активности аминотрансфераз.

Нами не было установлено статистически значимой связи между наличием фоновой патологии и тяжестью течения бруцеллёза (критерий χ^2

Пирсона = 0,0543, значение $p = 0,9732$, см. рисунок 8).

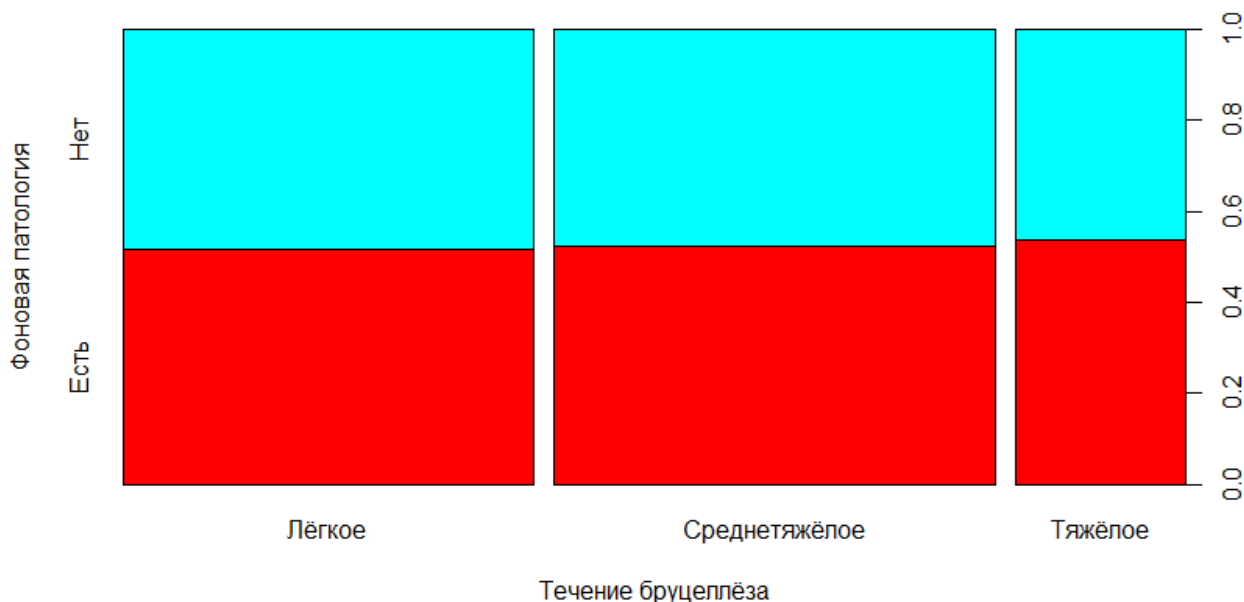


Рисунок 8 — Диаграмма сопряжённости тяжести течения бруцеллёза и преморбидного фона

Острое начало болезни регистрировалось у 143 (57,89%) больных, при этом заболевание началось с подъёма температуры тела до высоких цифр (38-39°C) с ознобами и потливостью.

У 42,11% больных заболевание начиналось постепенно, с субфебрилитета в течение недели с дальнейшим подъёмом температуры до 39°C и выше.

Лихорадка, общая слабость, артралгии и миалгии были наиболее частыми симптомами продолжительностью 7 дней и менее (таблица 13).

Таблица 13 — Частота клинических симптомов наблюдавшихся больных при поступлении

<i>Симптом</i>	<i>Число случаев</i>	<i>Частота, %</i>
Лихорадка	214	86,64
Озноб	71	28,74
Потливость	241	97,57
Дистальный гипергидроз	156	63,16
Бледность кожи	232	93,93

<i>Симптом</i>	<i>Число случаев</i>	<i>Частота, %</i>
Слабость + недомогание	145	58,70
Нарушение сна	53	21,46
Нарушение аппетита	165	66,80
Головная боль	82	33,20
Увеличение лимфатических узлов	211	85,43
Гепатомегалия	70	28,34
Спленомегалия	111	44,94
Боль в животе	33	13,36
Тошнота	184	74,49
Боли в суставах:	195	78,95
коленных	80	32,39
тазобедренных	17	6,88
голеностопных	53	21,46
лучезапястные	5	2,02
плечевые	6	2,43
полиартралгия	34	13,77
Боль в спине	94	38,06
Артрит	21	12,43
грудинно-ключичного сочленения	4	1,62
плечевого сустава	7	2,83
запястья	3	1,21
сакроилеит	10	4,05
гонит	22	8,91
спондилит	5	2,02
Миалгия	22	8,91
Бурсит	2	0,81
Орхит	14	5,67
Оофорит	18	7,29

Наиболее частыми проявлениями бруцеллёза у наблюдавшихся больных были лихорадка, увеличение периферических лимфатических узлов в двух — трёх группах до II-III ст., артралгии и поты (таблица 13).

Повышение температуры тела было типичным симптомом бруцеллёзной

инфекции (214, 86,64%). Температурная кривая имела неправильный характер.

Субфебрильная температура на всём протяжении болезни наблюдалась в 35 случаях (14,17%).

Продолжительность лихорадки составила от 12 до 21 дня. Лихорадка часто сочеталась с ознобом (71 случай; 28,74%) и потливостью (209 случаев; 84,62%). Продолжительность лихорадки составила от 15 до 25 дней. Несмотря на выраженную лихорадку, общее состояние больных оставалось относительно удовлетворительным. Поэтому в качестве критерия тяжести течения бруцеллёза служила степень поражения отдельных органов и систем.

Помимо лихорадки, из симптомов интоксикации регистрировались головная боль, беспокойство, нарушение сна и аппетита, а также боли в суставах (таблица 7).

У подавляющего большинства пациентов (211 случаев; 85,43%) отмечалось увеличение периферических лимфатических узлов – подчелюстных, шейных, подмышечных, паховых. При пальпации последние были подвижны, безболезненны, кожа над ними не изменена.

У 56,28% больных (139 случаев) была выявлена гепато- и / или спленомегалия. Печень выступала из-под края рёберной дуги на 3-5 см, селезёнка – на 1-3 см. Печень была плотно-эластической консистенции, слегка чувствительной при пальпации.

Со стороны сердечно-сосудистой системы отмечались: тахикардия, приглушенность сердечных тонов, в 18 случаях (7,29%) – систолический шум.

Наиболее яркими и частыми проявлениями острого и подострого бруцеллёза у находившихся под наблюдением пациентов были симптомы поражения опорно-двигательного аппарата.

Ведущим при данных формах бруцеллёза у наблюдавшихся больных явился болевой синдром со стороны локомоторной системы. Боли в суставах наблюдались нами у 78,95% пациентов. Боли в суставах носили летучий характер и имели различную продолжительность и интенсивность, нередко сопровождалась кратковременной припухлостью коленных, голеностопных, лучезапястных суставов и редко — мелких суставов кистей. Длительность артралгии варьировала от 1 до 3 недель.

Пациенты предъявляли жалобы на боли в тазобедренных (6,88%) и коленных суставах (32,39%), в голеностопных суставах (21,46%). У 13,77% больных отмечались полиартралгии (рисунок 7). Боли в суставах верхних конечностей возникали редко и обычно сочетались с поражением суставов нижних конечностей. Боли в суставах были кратковременными и достаточно выраженными.

Артрит наблюдался у 51 (20,65%) пациента. Во всех случаях он развивался в течение первой недели от момента поступления в лечебное

учреждение. У пациентов с суставными осложнениями острый артрит был ведущим клиническим синдромом.

Как и при артралгии, преимущественно поражались суставы нижних конечностей, чаще всего коленных (22 случая, 43,14%). Структура суставных поражений представлена в таблице 6 и на рисунке 7.

Рентгенологическое исследование поражённых суставов не выявляло выраженных изменений.

Таким образом, клиническое течение острого и подострого бруцеллёза у наблюдавшихся больных было типичным и не отличалось от такового, описанного в литературе различными авторами. Не было выявлено статистически значимой связи между возрастом, полом, национальностью и местом жительства наблюдавшихся больных и тяжестью течения бруцеллёза.

7.2. Результаты клинического и лабораторного обследования здоровых лиц (контрольная группа)

Для сравнения клинических и лабораторных показателей нами была сформирована контрольная группа (всего 80 наблюдений).

Группа была набрана при диспансерном наблюдении здоровых лиц, давших письменное информированное согласие на участие в исследовании.

Её составили практически здоровые лица с неотягощённым анамнезом в возрасте от 15 до 60 ($38,18 \pm 10,33$) лет. Основная и контрольная группы не имели статистически значимых различий в возрастной структуре (t-тест = -0,62; $p = 0,873$; 95% ДИ: -3,75 1,96) и в распределении по полу (t-тест = 0,16; $p = 0,536$; 95% ДИ: -0,11 0,36).

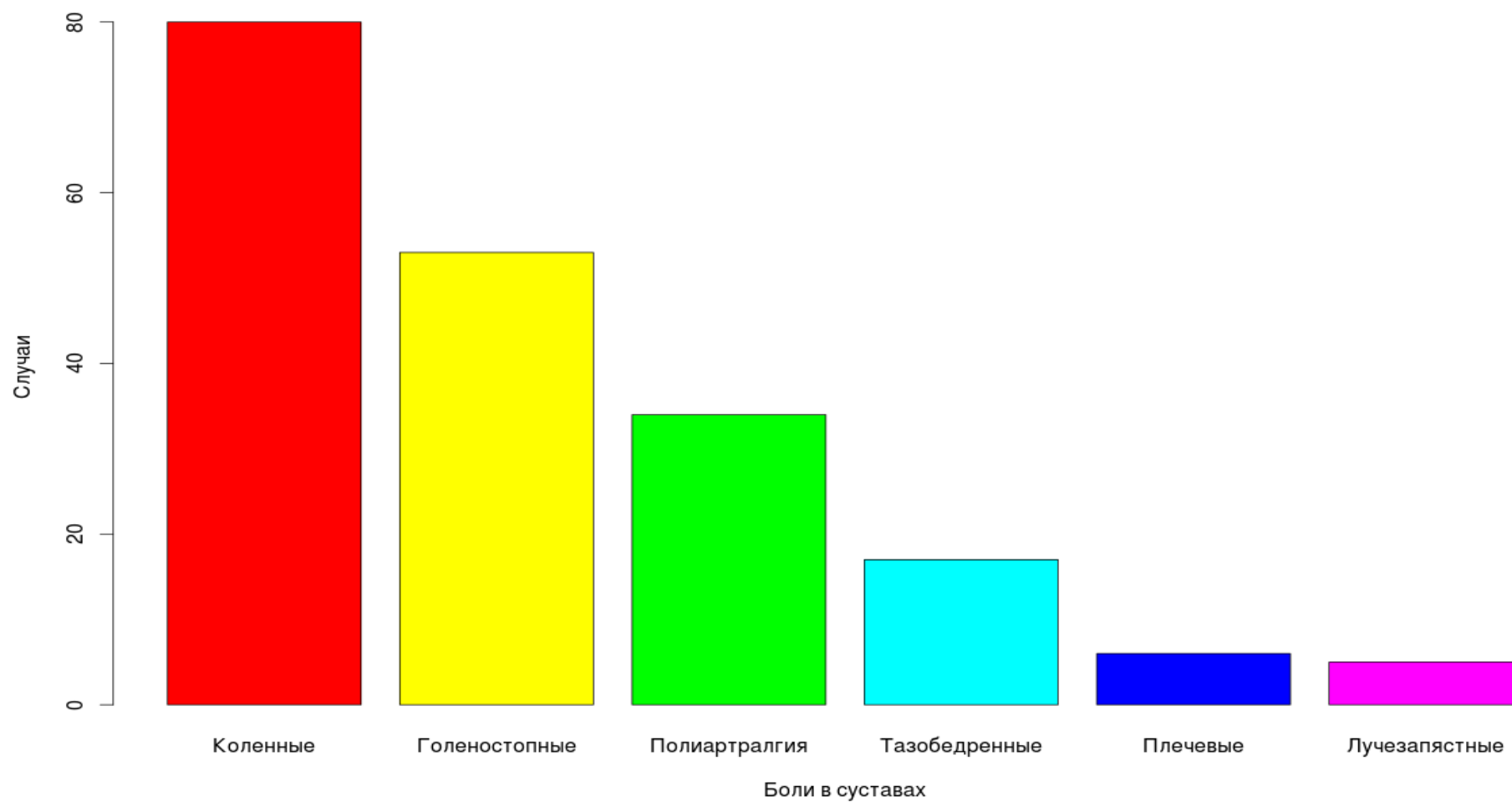


Рисунок 9 — Топика болей в суставах у наблюдавшихся больных

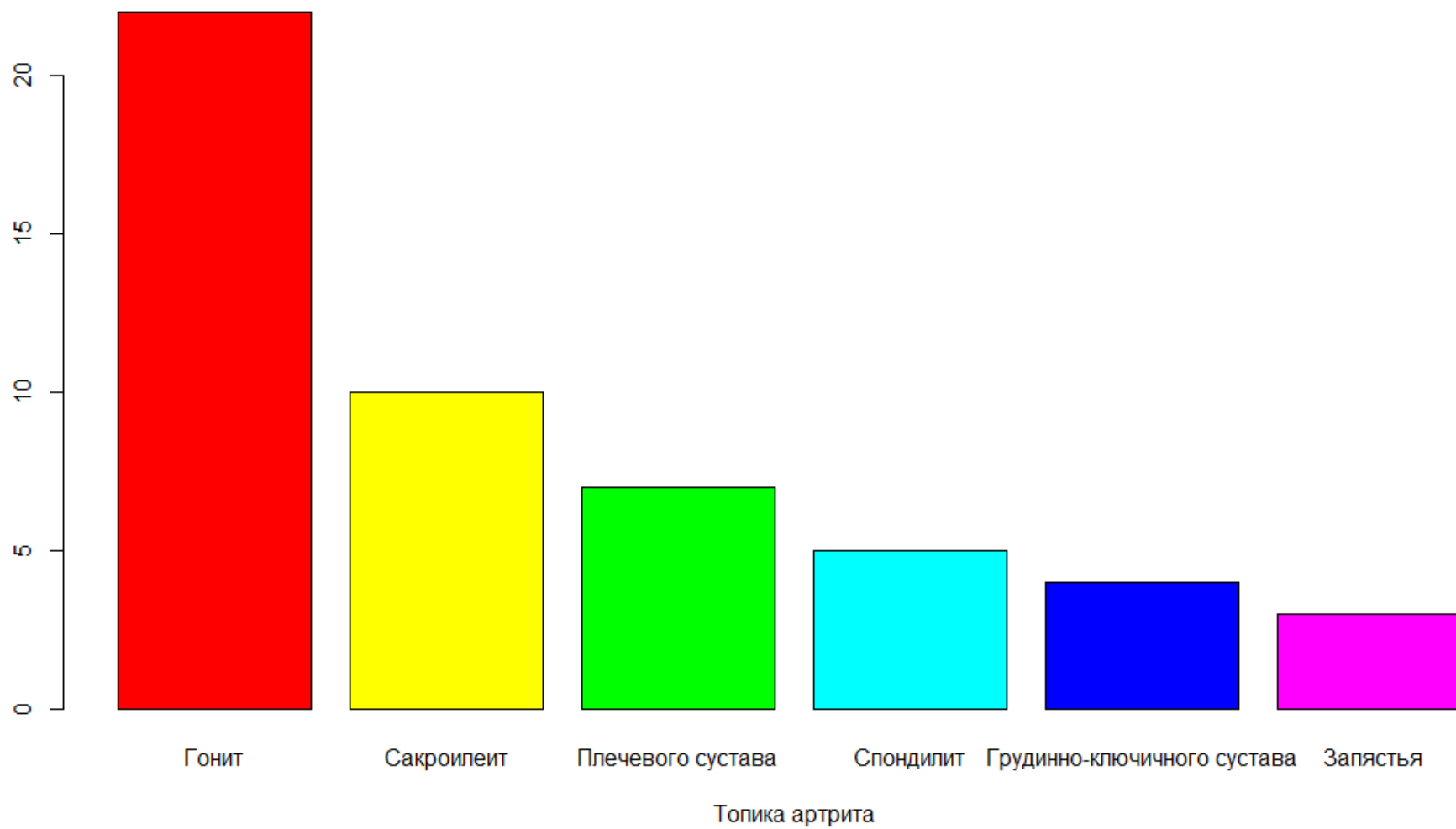


Рисунок 10 — Топика суставного синдрома у наблюдавшихся больных

Распределение по национальности в основной и контрольной группах представлено на рисунке 11.

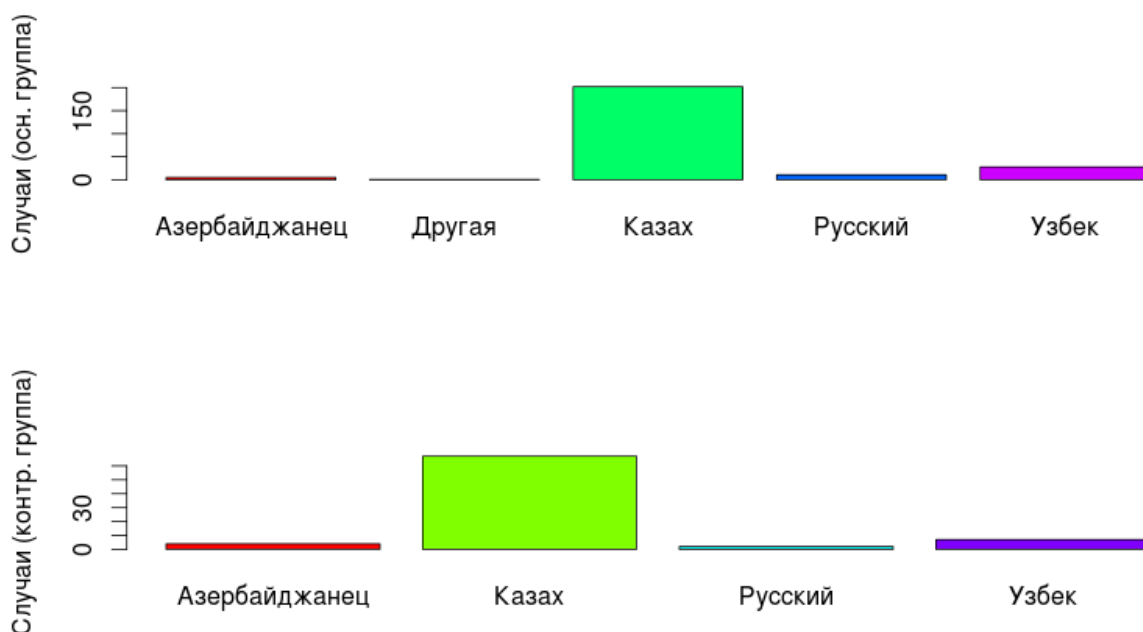


Рисунок 11 — Распределение по национальности в основной и контрольной группах

Как и основная группа, контроли были представлены преимущественно жителями сельской местности (77 случаев, 96,25%).

Средняя аксиллярная температура в контрольной группе на момент включения в исследование составила $36,5 \pm 0,28^{\circ}\text{C}$. Во всех случаях были получены отрицательные результаты Роз-Бенгал пробы, реакций Хеддльсона и Райта, а также исследования венозной крови в Real Time PCR. Это позволило исключить в контрольной группе специфического воспалительного процесса. Также принципиально важным при включении в исследование было отсутствие приёма антибактериальных препаратов за две недели до его начала.

Для определения региональной нормы колебания лабораторных показателей мы провели комплексное лабораторное исследование лиц, включённых в контрольную группу, в том числе показателей перекисного окисления липидов (малоновый диальдегид в плазме) и эндогенной итоксикации (средние молекулы в эритроцитах). Результаты лабораторного исследования группы контроля представлены в таблице 14.

Таблица 14 — Ряд лабораторных показателей, измеренных в группе контроля

<i>Исследуемый параметр</i>	<i>$M \pm s^*$</i>	<i>Пределы колебаний</i>
Лейкоциты (10^9 / л)	$5,07 \pm 0,38$	4,30 — 6,19
СОЭ (мм / ч)	$4,90 \pm 1,22$	2,23 — 7,94
СРБ (мг / л)	$1,71 \pm 0,31$	1,02 — 2,54
МДА в плазме (нмоль / мл)	$1,43 \pm 0,07$	1,26 — 1,59
СМ в эритроцитах (усл. ед.)	$0,13 \pm 0,03$	0,06 — 0,20

Примечания:

* М — среднее значение показателя, s — стандартное отклонение

Таким образом, нами были определены пределы колебаний ряда лабораторных показателей практически здоровых лиц в группе, соответствующей опытной по возрастной и половой структуре, а также по национальному составу, что позволило нам использовать данные показатели для сравнения таковыми в группе больных бруцеллёзом.

7.3. Динамика лабораторных показателей у наблюдавшихся больных. Роль малонового диальдегида как предиктора неэффективности проводимой терапии

Кровь больных бруцеллёзом при поступлении тестировались в реакции агглютинации в пробирках (Райта). У 202 из 247 пациентов (81,78%) титры превышали 1:400 (таблица 15, рисунок 12).

У всех наблюдавшихся больных отмечалось нарастание титров динамике наблюдения.

Таблица 15 — Титры РА при поступлении у наблюдавшихся больных

<i>Титр</i>	<i>Число наблюдений</i>	<i>Доля, %</i>
1:50	3	1,21
1:100	10	4,05
1:200	32	12,96
1:400	112	45,34
1:800	58	23,48

<i>Титр</i>	<i>Число наблюдений</i>	<i>Доля, %</i>
1:1600	32	12,96

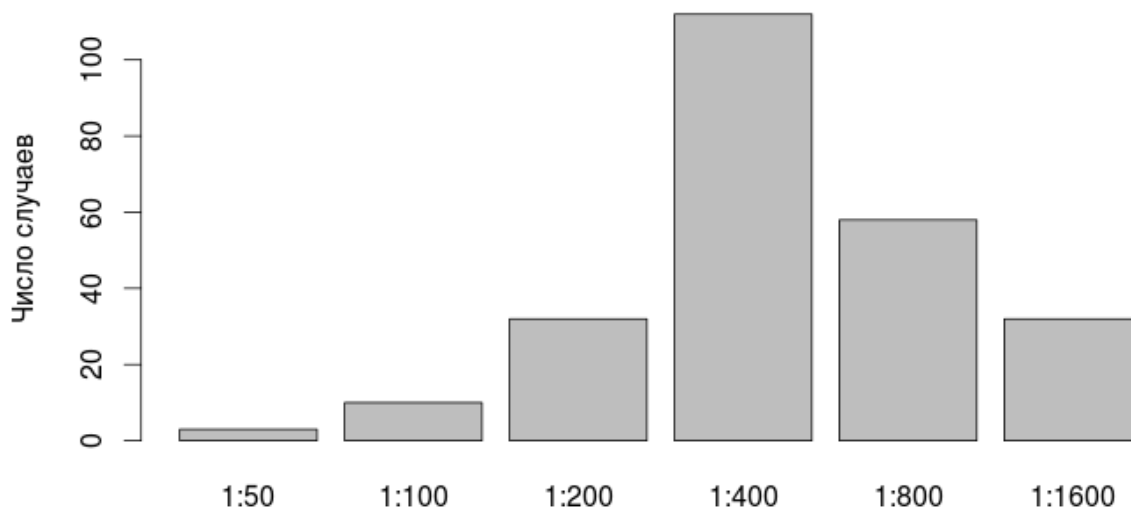


Рисунок 12 — Титры РА при поступлении у наблюдавшихся больных

У больных бруцеллёзом с развитием рецидива заболевания после проведённого этиотропного лечения при поступлении были статистически значимо более высокие титры РА по сравнению с больными без рецидивов (показатель двухвыборочного теста Уэлча $t = 2,19$; $p = 0,03403$; 95% ДИ: 15,63 380,96, см. рисунок 13).

После проведённого лечения у 88 пациентов (35,63%) выявлялась бактериальная ДНК бруцелл, причём в 37 (14,98%) случаев это сопровождалось развитием рецидива бруцеллёза.

В целом можно заключить, что выявление ДНК бруцелл в крови пациента после окончания курса этиотропного лечения является показателем несостоятельности эрадикации бруцелл из внутренней среды макроорганизма и статистически значимым предиктором развития рецидива заболевания (критерий χ^2 с поправкой Йейтса = 75,63, $p = 2,2 \times 10^{-16}$). Во всех случаях развития рецидива у пролеченных больных в крови выявлялась бактериальная ДНК бруцелл (рисунок 14).

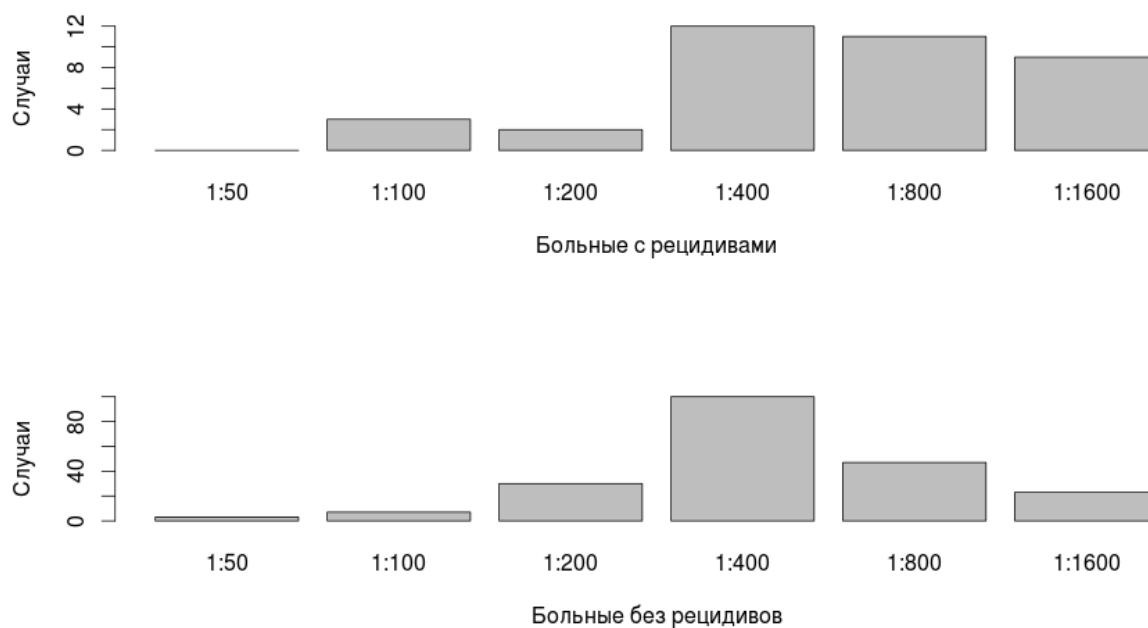


Рисунок 13 — Титры РА при поступлении у наблюдавшихся больных, развивших и не развивших рецидив после этиотропного лечения



Рисунок 14 — Диаграмма сопряженности обнаружения ДНК в крови и развития рецидива у больных бруцеллёзом, получивших курс этиотропного лечения

Положительный результат гемокультуры наблюдался в 141 (57,09%) случаях. Была выявлена связь между выделением культуры бруцелл и нарастанием титров в РА (критерий $\chi^2 = 49,83$, $p = 1,502 \times 10^{-9}$). Негативные

результаты гемокультуры были ассоциированы с серологическими титрами выше 1:800 и органным бруцеллёзом, т. е. с поражением одной системы (таблица 16, рисунок 15).

Таблица 16 — Таблица сопряжённости выделения *B. melitensis* из крови больных и регистрации титров РА

Культура	1:50	1:100	1:200	1:400	1:800	1:1600	Всего
Положит.	2 (0,008)	8 (0,032)	21 (0,085)	72 (0,291)	38 (0,154)	0 (0,000)	141 (0,571)
Отрицат.	1 (0,004)	2 (0,008)	11 (0,045)	40 (0,162)	20 (0,081)	32 (0,130)	106 (0,429)
Всего	3 (0,012)	10 (0,040)	32 (0,130)	112 (0,453)	58 (0,235)	32 (0,130)	247 (1,000)

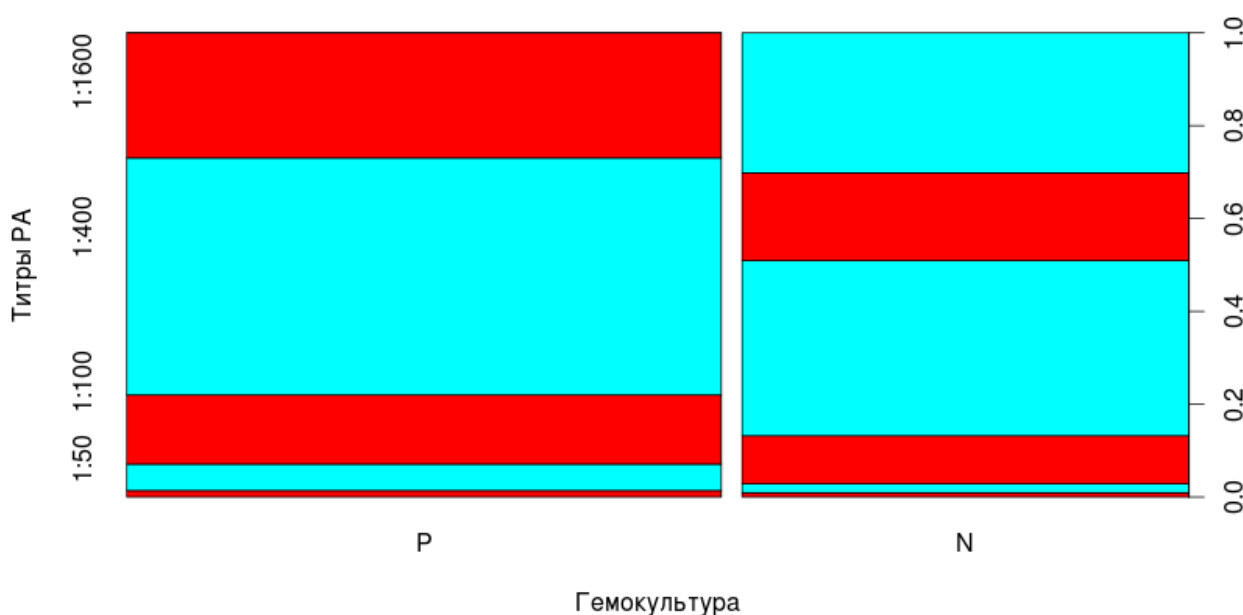


Рисунок 15 — Диаграмма сопряжённости выделения *B. melitensis* из крови больных и регистрации титров РА

У больных бруцеллёза с развившимся рецидивом заболевания гемокультура была положительна в 17 (45,95%) случаев. Не было выявлено статистически значимой связи между выделением гемокультуры при посеве крови до начала этиотропного лечения и развитием рецидива заболевания после его окончанием (критерий χ^2 с поправкой Йейтса = 1,70, $p = 0,1921$; рисунок 16).

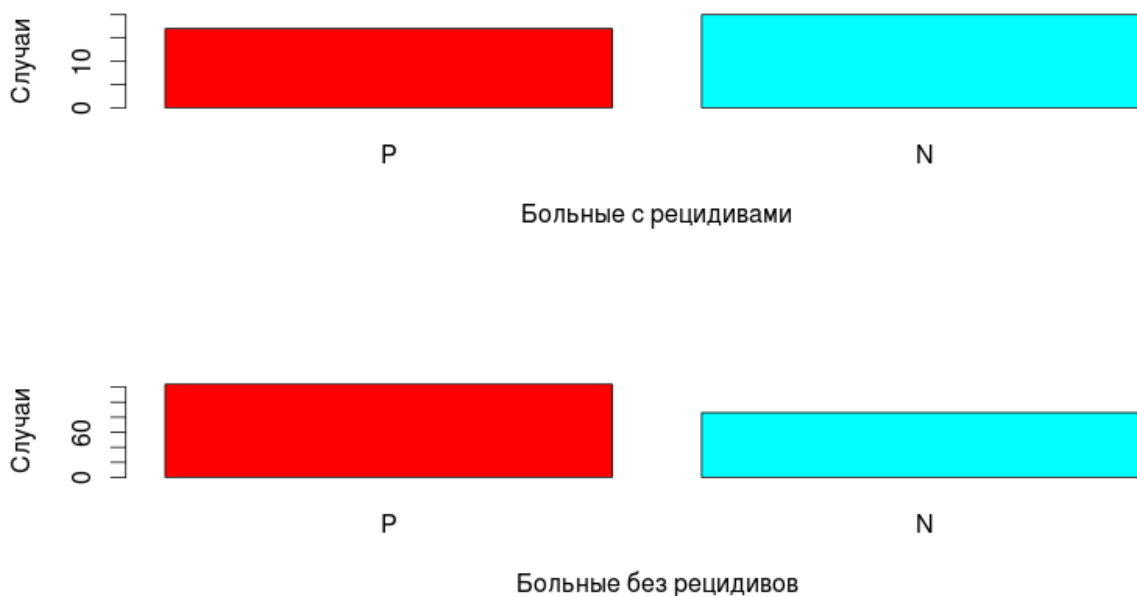


Рисунок 16 — Гемокультура бруцелл у больных с развитием и без развития рецидива бруцеллёза

Значения лабораторных показателей у наблюдавшихся больных, измеренные до начала этиотропного лечения, приведены в таблице 17.

Со стороны периферической крови изменения были типичными для бруцеллёза. Как мы упоминали выше, гипохромная анемия отмечалась у 23 (9,31%) наблюдавшихся больных.

Лейкоцитоз с лимфоцитозом отмечен в 24 случаях (9,72%), а лейкопения — также в 24 случаях (9,72%).

Не было выявлено статистически значимой связи между числом лейкоцитов в периферической крови и развитием бруцеллёза у наблюдавшихся больных (критерий χ^2 Пирсона = 247, значение $p = 0,4522$, см. рисунок 17).

Таблица 17 — Ряд лабораторных показателей, измеренных в группе больных бруцеллёзом

<i>Исследуемый параметр</i>	<i>$M \pm s^*$</i>	<i>Пределы колебаний</i>	<i>Различие с контролем в t-тесте</i>
Лейкоциты ($10^9 / л$)	$6,71 \pm 1,85$	2,09 — 11,38	13,016; $p = 2,2 \times 10^{-16}$
СОЭ (мм / ч)	$19,98 \pm 9,21$	1,43 — 45,57	25,0407; $p = 2,2 \times 10^{-16}$
СРБ (мг / л)	$33,76 \pm 3,58$	25,20 — 46,38	139,2624; $p = 2,2 \times 10^{-16}$
МДА в плазме (нмоль / мл)	$9,92 \pm 0,37$	9,12 — 10,99	340,2535; $p = 2,2 \times 10^{-16}$
СМ в эритроцитах (усл. ед.)	$0,30 \pm 0,07$	0,16 — 0,55	29,189; $p = 2,2 \times 10^{-16}$

Примечания:

* М — среднее значение показателя, s — стандартное отклонение

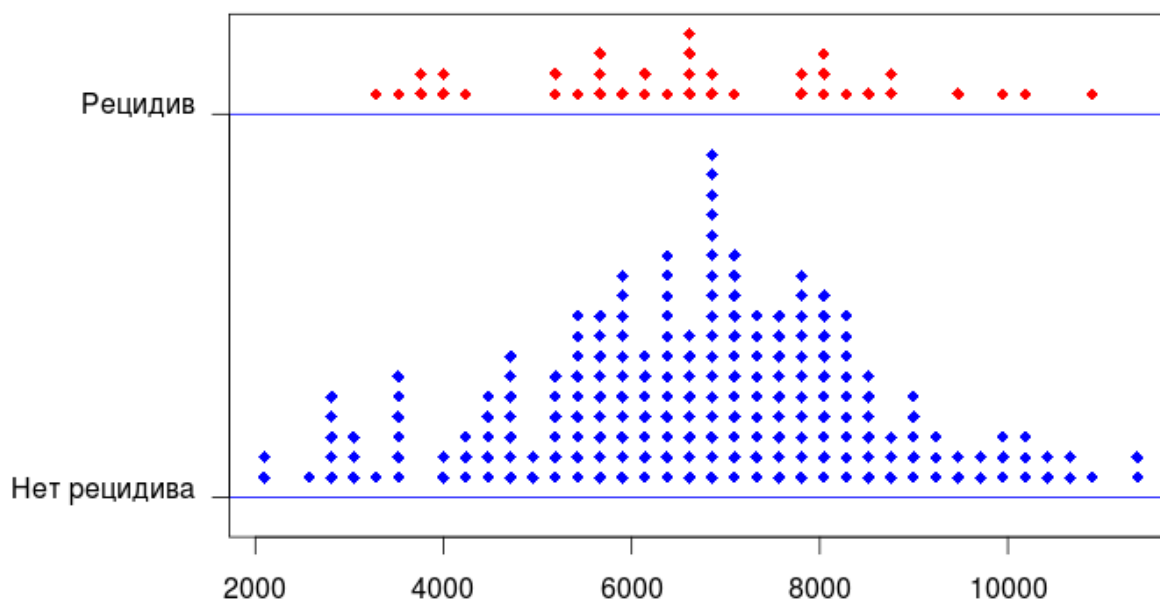


Рисунок 17 — Распределение числа лейкоцитов у наблюдавшихся больных по признаку развития рецидива бруцеллёза

Повышение СОЭ наблюдалось у 209 пациентов (84,62%). Не было выявлено статистически значимых корреляций между повышением СОЭ и развитием рецидивов у наблюдавшихся больных (коэффициент полисерийной корреляции = 0,04575; $p = 0,9144$).

Колебания СОЭ не были связаны с уровнем лихорадки (коэффициент полисерийной корреляции = 0,04939; $p = 0,9002$) и нарастанием титров в реакции Райта (0,05474; $p = 0,2997$).

Нарастание титров в реакции Райта в динамике заболевания не ассоциировалось с увеличением числа лейкоцитов в периферической крови (коэффициент полисерийной корреляции = -0,1521; $p = 0,8739$).

Тем не менее, из таблицы 11 видно, что значительную роль в инфекционном процессе бруцеллёза играет провоспалительный синдром (эндотоксикоз), проявляющийся в лейкоцитозе, повышении СОЭ, а также С реактивного белка, малонового диальдегида в плазме и средних молекул в эритроцитах.

Мы изучили влияние провоспалительных лабораторных показателей на развитие рецидивов у наблюдавшихся больных в прогнозной модели, построенной в свободной среде статистической обработки данных R.

Имеющийся набор данных был построен по принципу «опрятных данных» (tidy data), не содержал пропущенных значений и не требовал трансформации.

Имеющийся набор данных был разбит на обучающую и тестовую выборки с использованием функции createDataPartition пакета «caret» среды R (70 и 30% наблюдений).

Прогнозная модель была построена с использованием функции randomForest пакета «randomForest» среды R. В качестве зависимой переменной было выбрано число рецидивов, а в качестве независимых (объясняющих) переменных – уровни малонового диальдегида в плазме и средних молекул после окончания лечения. Модель «случайного леса» (random forest) включала в себя 500 деревьев распознавания. Матрица несоответствий компьютерной модели приведена в таблице 18.

Таблица 18 – Матрица несоответствий прогнозной модели развития рецидивов у больных бруцеллёзом

	<i>Да</i>	<i>Нет</i>	<i>Ошибка классификации</i>
<i>Да</i>	19	18	0,48648649
<i>Нет</i>	10	200	0,04761905

Показатель данных, не вошедших в набор (out-of-bag data, OOB) построенной модели составил 11,34%, что достаточно для признания

прогнозной модели достоверной. Аккуратность модели близка к 100%, что позволяет признать её устойчивой и достаточной для предсказания новых данных. Р-значение [Аккуратность > Частота отсутствия информации] составило $1,99 \times 10^6$.

Основываясь на построенной прогнозной модели, можно утверждать, что динамика показателей перекисного окисления липидов и эндотоксикоза, и в частности, высокий уровень малонового диальдегида в плазме больного бруцеллёзом после окончания этиотропного лечения служат показателем неэффективности лечения, связанного с персистированием возбудителя во внутренней среде больного.

Помимо выявленной в прогнозной модели связи между уровнем малонового альдегида в плазме и числом рецидивов у пролеченных больных, имеется связь между выявлением бактериальной ДНК бруцелл в крови больного во втором измерении (после лечения) и уровнем малонового альдегида. Эта связь является прямой и составляет 0,031, что соответствует умеренной силе связи по шкале Чеддока (рисунок 18).

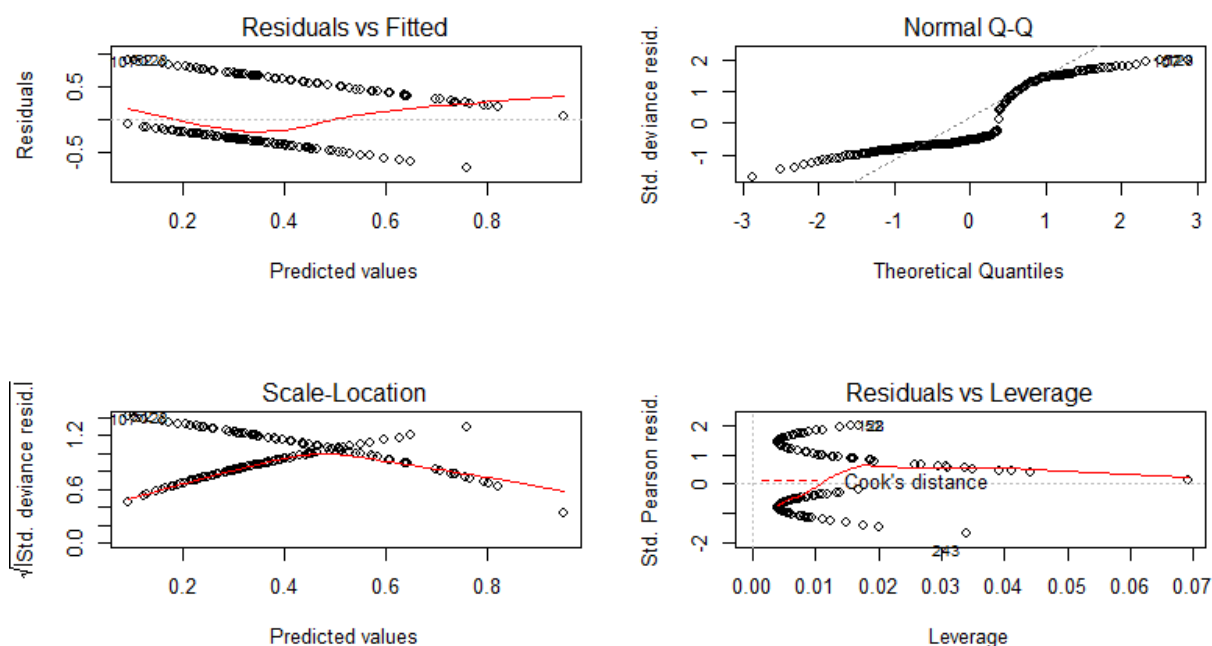


Рисунок 18 – Регрессионная модель зависимости выявления бактериальной ДНК бруцелл в крови пациентов и уровня малонового диальдегида после проведённого этиотропного лечения

Таким образом, в проведённом исследовании показано, что высокий уровень малонового диальдегида после проведения этиотропного лечения бруцеллёза является статистически значимым предиктором развития рецидива.

Наряду с персистированием бактериальной ДНК бруцелл в венозной

крови он может служить показателем эффективности проводимого лечения бруцеллёза.

Заключение

Нами показано, что наибольшая частота рецидивов отмечена в группе больных, получавших комбинацию доксициклин плюс гентамицин, что находит объяснение в отсутствии внутриклеточной активности у гентамицина.

Глава 8. Изучение чувствительности *in vitro* к антибактериальным препаратам *Brucella melitensis* при различных значениях pH

Известно, что некоторые антибактериальные препараты обладают оптимальной активностью лишь при нейтральной или слабощелочной pH среды, а при её кислых значениях снижают противомикробный эффект [Sacks L. E. and Pence J. W. The Influence of pH on the Antibacterial Action of Subtilin A // J. gen. Microbiol. - 1958. - V. 19. - P. 542-550. Bartek I. L., Reichlen M. J., Honaker R. W. et al. Antibiotic Bactericidal Activity Is Countered by Maintaining pH Homeostasis in *Mycobacterium smegmatis* // mSphere. - 2016. - V. 1, №4. - P. e00176-16.].

Бруцеллы, как известно, не только выживают, но и размножаются в кислой среде фаголизосом (pH около 5,0), будучи защищёнными от влияния гуморальных факторов иммунитета и антибиотиков с преимущественно внеклеточной концентрацией. Как показали турецкие исследователи (M. Akova et al, 1999) азитромицин, стрептомицин и фторхинолоны были активны против *Brucella melitensis* при pH 7,0, но не при pH 5,0; рифампин и доксициклин сохраняли активность при pH 5,0 [Akova M., Gür D., Livermore D.M. et al. In vitro activities of antibiotics alone and in combination against *Brucella melitensis* at neutral and acidic pHs // Antimicrob. Agents Chemother. - 1999. - V. 43. - P. 1298-1300.]. В этой связи для выработки обоснованных рекомендаций по проведению эмпирической этиотропной терапии бруцеллёза представляло интерес изучение противобруцеллезной активности ряда препаратов в отношении *B. melitensis*.

Бактериальные штаммы: 126 штаммов *Brucella melitensis*, использованные для изучения чувствительности к антибактериальным препаратам в Е-тесте.

Оборудование

Измерение pH растворов и сред проводили с помощью pH метра pH-150М (РУП «Гомельский завод измерительных приборов», г. Гомель) в соответствии с инструкцией к прибору.

Изучение чувствительности к антибактериальным препаратам при различных значениях pH среды: определялась минимальная ингибирующая концентрация (МИК) доксициклина, рифампицина, гентамицина и ципрофлоксацина и офлоксацина с помощью Е-теста (Biometrieux, Швеция) на бруцелл-агаре (Hi-media, Индия) с добавлением 5% овечьей сыворотки с оценкой результатов через 48 часов инкубации на воздухе (вне CO₂-инкубатора) при температуре 37°C. Исследование МИК в Е-тесте проводилось в парах сред, кислотность которых доводилась до значений pH 5,0 и 7,0.

Для инокуляции использовалась взвесь бруцелл 10⁵-10⁶ КОЕ на чашку.

Результаты

Все взятые в работу антибактериальные препараты показали достаточную активность в отношении большинства клинических изолятов бруцелл при pH 7,0 с МИК, при которой 90% штаммов подавлялись (МИК₉₀) согласно пороговым значениям Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) США [155].

Полученные значения МИК для индивидуальных противобруцеллёзных препаратов приведены в таблице 19 и на рисунке 4.

Как видно из таблицы, все взятые в изучение антибактериальные препараты, за исключением азитромицина, сохраняли достаточную активность в отношении *B. melitensis*, как при кислой, так и нейтральной реакции среды.

Несмотря на то, что при кислой реакции среды (pH = 5,0) активность ряда антибактериальных препаратов в отношении снижалась (гентамицин, ципрофлоксацин, офлоксацин), МИК₅₀ были ниже пороговых значений CLSI (таблица 9).

Только доксициклин и рифампицин сохраняли активность в отношении бруцелл в кислой среде; более того, их МИК₅₀ были даже ниже таковых при pH = 7,0.

Фторхинолоны (ципрофлоксацин и офлоксацин) были достаточно эффективны при pH = 7,0, но в условиях кислой среды снижали активность в 4 раза.

Гентамицин также терял активность в отношении бруцелл при pH = 5,0.

Таблица 19 — Активность *in vitro* антибактериальных препаратов в отношении изолятов *B. melitensis* (n = 126), связанная с различной кислотностью среды (мг/л)

<i>Препарат</i>	<i>Ранги</i>		<i>МИК₅₀</i>		<i>МИК₉₀</i>		<i>Пороговые значения чувствительности согласно CLSI</i>
	<i>pH 7</i>	<i>pH 5</i>	<i>pH 7</i>	<i>pH 5</i>	<i>pH 7</i>	<i>pH 5</i>	
Доксициклин	0,032 — 0,5	0,032 — 0,5	0,038	0,025	0,064	0,064	≤ 2,0
Рифампицин	0,38 – 1,0	0,31 – 1,0	0,5	0,25	0,75	0,72	≤ 1,0
Гентамицин	0,064 – 0,25	0,125 – 0,5	0,125	0,25	0,25	0,52	Не определено

Препарат	Ранги		МИК₅₀		МИК₉₀		Пороговые значения чувствительности согласно CLSI
Ципрофлоксацин	0,094 – 0,5	0,38 – 1,0	0,125	0,5	0,25	1,2	≤ 1,0
Офлоксацин	0,064 – 0,25	0,256 – 1,0	0,125	0,5	0,21	1,0	≤ 1,0
Азитромицин	0,1 – 1,0	4,0 – 32,0	0,5	16,0	1,0	32,0	≤ 4,0

Азитромицин показал хорошую активность в отношении *B. melitensis* при нейтральной реакции среды, но при pH = 5,0 его МИК₅₀ и МИК₉₀ значительно превышали пороговые значения CLSI.

Как известно, бруцеллы размножаются в фаголизосомах макрофагов, где pH = 5,0 [29]. Лишь те антибактериальные препараты, которые проникают в эти органеллы и действуют на возбудителя в кислых условиях среды, можно признать достаточно эффективными для использования в этиотропном лечении бруцеллёза.

Лишь доксициклин и рифампицин удовлетворяют этим критериям.

К сожалению, фторхинолоны и азитромицин эффективны в отношении бруцелл лишь при pH = 7,0, но при pH = 5,0, а значит, не способны к эрадикации внутриклеточно расположенных бруцелл, несмотря на высокую биодоступность и способность проникать внутрь фагоцитирующих клеток.

Наше утверждение подтверждается изучением эффективности этих препаратов в отношении экспериментального бруцеллёза.

Так, азитромицин был менее эффективен нежели доксициклен (изолированно и в комбинации со стрептомицином) при экспериментальном бруцеллёзе у мышей [128].

Al-Sibai et al. сообщают о 25% рецидивов при пероральном назначении ципрофлоксацина для лечения бруцеллёза в течение 6-8 недель.

Фторхинолоны и макролиды, тем не менее, остаются значимыми компонентами комбинированной этиотропной терапии бруцеллёза (в сочетании с доксициклином или рифампицином), поскольку они показали достаточную активность в отношении *B. melitensis* при pH = 7,0, т. е. в условиях сыворотки.

Гентамицин также теряет активность при кислых значениях pH, но практического значения это не имеет, поскольку препарат не проникает внутрь клеток. В целом возможно его применение в составе обычных схем в сочетании с доксициклином.

Заключение

Таким образом, показано, что гентамицин и фторхинолоны снижают активность при рН 5,0, в то время как доксициклин и рифампицин её сохраняют. Полученные результаты не позволяют отказаться от традиционно используемой комбинации доксициклин плюс рифампицин в лечении бруцеллёза.

Глава 9. Оценка значимости ципрофлоксацина как компонента этиотропной терапии острого бруцеллёза

Объём выборки на данном этапе исследования определялся числом больных с подтверждённым серологически и / или бактериологически диагнозом «бруцеллёз», поступившими в лечебные учреждения Южно-Казахстанской области в период проведения исследования. Больные случайным образом были отнесены к одной из групп («доксидиклин плюс рифампицин» или «ципрофлоксацин плюс рифампицин») в соотношении 1 : 1.

Из наблюдения исключались больные с приступами ишемической болезни сердца, беременностью, а также лица в возрасте младше 15 лет.

Всего под наблюдением находилось 49 больных (34 — мужчины и 15 — женщины). Все, кроме одного, наблюдавшиеся пациенты завершили исследование в период наблюдения. 2 пациентов были исключены из группы «ципрофлоксацин плюс рифампицин»: 1 больной в связи с убытием за пределы области, а 1 пациентка досрочно прекратила лечение в связи с хорошим самочувствием.

В момент начала лечения состояние больных оценивалось физикально и в лабораторных тестах; эта же оценка проводилась на 2-й, 4-й и 6-й неделе лечения. Кроме того, проводилось дополнительное обследование в случае, если отмечалась повторная клиническая манифестация заболевания.

В обеих группах больных длительность лечения составила 42 дня (согласно рекомендациям ВОЗ).

В течение 3 месяцев после окончания лечения осуществлялись исследование крови на бруцеллы, реакция Райта и общеклиническое обследование наблюдавшихся больных.

Оценка эффективности проводимого лечения осуществлялась, прежде всего, по наличию или отсутствию рецидивов заболевания. Рецидив был определён нами как повторное появление симптомов заболевания с нарастанием титров в реакции Райта, сопровождавшееся или нет выделением гемокультуры бруцелл в период 3-месячного наблюдения после окончания этиотропной терапии [7, 23].

Вторым оценочным признаком явилась длительность лихорадки после начала этиотропной терапии. Температура у пациентов, взятых под наблюдение, измерялась в подмышечной впадине каждый час до тех пор, пока измеряемые значения не достигали 37°C. После этого температура измерялась дважды в день, утром и вечером.

Результаты

Сравнительная характеристика групп «доксидиклин плюс рифампицин» и «ципрофлоксацин плюс рифампицин» представлена в таблице 20. За пациентами обеих групп осуществлялось медицинское наблюдение в течение

3 месяцев после окончания этиотропного лечения даже в случае полной клинико-лабораторной ремиссии.

Лечение способствовало уменьшению выраженности клинических проявлений бруцеллёза у больных всех групп. В 1-й группе наиболее выраженной была позитивная динамика артралгий и астеновегетативного синдрома (отсутствие улучшений отмечено только у 16% и 22,72% больных соответственно). Оба этих синдрома до лечения выявлялись с той или иной степенью выраженности практически у всех больных.

После проведения этиотропной терапии у 36% больных полиартралгии исчезли, а в 48% становились менее интенсивными.

Таблица 20 — Сравнительная клиническая характеристика групп «доксциклин плюс рифампицин» и «ципрофлоксацин плюс рифампицин»

<i>Признак</i>	<i>Группа «доксциклин плюс рифампицин» (n = 25)</i>	<i>Группа «ципрофлоксацин плюс рифампицин» (n = 22)</i>
Возраст (средний и диапазон)	27 (18-61)	30 (18-62)
Пол (мужчин / женщин)	19 / 6	17 / 5
Лихорадка	23	21
Гепатомегалия	15	13
Спленомегалия	5	4
Артралгия	13	11
Головная боль	6	7
Потливость	24	22
Положительная культура	11	9
Положительная агглютинация	25	22
Побочные реакции: - диарея - тошнота и рвота	2 7	1 3
Осложнения заболевания	1 сакроилеит, 1 орхит	1 сакроилеит, 2 орхита
Рецидив заболевания	3	3
Продолжительность лихорадки после начала заболевания (часы)	104 ± 24	86 ± 21

Астено-вегетативный синдром был в результате лечения купирован у 44%. Выраженность его уменьшилась у 64%. Если же рассматривать отдельные проявления астено-вегетативного синдрома, то надо отметить, что в 1-й группе к концу лечения на 44% меньше (с 100 до 53%) стало больных, предъявляющих жалобы на повышенную утомляемость, на 34% (73 до 38%) - на головные боли, на 34% (с 100 до 68%) - на повышенную потливость и 31,8% (с 48 до 16%) - на нарушение сна.

Миалгии сохранялись к концу лечения у 24% больных. Позитивная динамика выразилась в исчезновении миалгии у 58% и в их уменьшении, у 16%. У 28% больных не удалось достичь уменьшения болей в различных отделах позвоночника. При этом полное купирование болевого синдрома со стороны позвоночника наблюдалось у 34% больных, а снижение его выраженности - у 38%.

Примером успешного применения схемы «доксциклин плюс рифампицин» при остром бруцеллёзе может служить следующая история болезни. *История болезни больного К., ист. №5174, 23 лет, находился на стационарном лечении с 09.08.09 г. по 25.09.09 г. с диагнозом: Острый бруцеллёз, тяжёлое течение.*

При поступлении предъявлял жалобы на боли в правом плечевом и левом тазобедренном суставах, пояснично-крестцовом сочленении, слабость, потливость. Заболевание началось 02.08.09 остро с головной боли с приступами головокружения, слабости, недомогания, озноба, профузной потливости. Температуру тела не измерял. Лечился амбулаторно с диагнозом «ОРВИ. Бронхит»; получал парацетамол, витаминотерапию. В связи с появлением болей в суставах направлен на стационарное лечение с диагнозом «Пояснично-крестцовый радикулит». В приёмном покое взята кровь для постановки Роз-Бенгал пробы (положительна).

В анамнезе частые ангины, хронический гайморит.

Из эпидемиологического анамнеза: С 25.03.09 по 29.04.09 участвовал в сакмане.

При осмотре: аксиллярная температура 40,2 °С, профузное потоотделение. Общее состояние расценено как тяжёлое. Самочувствие удовлетворительное. Больной нормостенического телосложения, пониженного питания. Отмечена умеренная бледность кожных покровов, выражен гипергидроз, полиаденит (паховые и подмышечные лимфатические узлы увеличены до II ст.). Суставы визуально не изменены, умеренные ограничения движений в правом плечевом и левом тазобедренном суставах из-за их болезненности. Со стороны органов дыхания изменений не выявлено. Тоны сердца приглушены, ритм правильный, артериальное давление 90/60 мм. рт. ст. Язык суховат, обложен беловатым налётом. Живот мягкий, болезненный в правом и левом подреберье. Печень выступает из-под

края реберной дуги на 2,5 см, при пальпации умеренно болезненна, селезёнка выступает на 1 см, мягко-эластичной консистенции.

При лабораторном обследовании выявлены положительные серологические реакции: реакция Райта 1 : 400, реакция Хеддльсона резко положительна, Роз-Бенгал положительна. Выделена гемокультура – *Brucella melitensis*.

В общем анализе крови: Нб – 79 г/л, лейкоциты – $4,5 \times 10^9$ /л, эозинофилы – 4%, сегментоядерные нейтрофилы – 44%, лимфоциты – 48%, моноциты – 1%, СОЭ – 16 мм/ч.

В биохимическом анализе крови: Общий белок 82,5 г/л, билирубин 8,2 мкмоль/л, холестерин 7,1 ммоль/л, креатинин 72,7 мкмоль/л, АСТ 0,42 мкмоль/л, АЛТ 0,64 мкмоль/л, щелочная фосфатаза 140,3 ед.л, сахар 4,7 ммоль/л, азот 11,8 ммоль/л, мочевины 3,8 ммоль/л.

В моче следы белка, единичные лейкоциты.

В стационаре все дни температура была нормальной (снизилась до нормы в первые сутки от начала этиотропной терапии). Боли в суставах исчезли через 14 дней от начала лечения. К моменту выписки из стационара нормализовались размеры селезёнки, печень выступала на 0,5 см из-под края рёберной дуги, безболезненная.

Проведённое лечение: антибактериальная терапия по непрерывному методу (по схеме «доксциклин плюс рифампицин»). Противовоспалительная терапия проводилась бутадионом 15 дней. Кроме того, больной получал десенсибилизирующую, стимулирующую терапию, витамины.

При проспективном наблюдении рецидивы не выявлены.

Как видно из таблицы, у 3 (12,0%) пациентов из группы «доксциклин плюс рифампицин» и у 3 (13,6%) пациентов из группы «ципрофлоксацин плюс рифампицин» наблюдался рецидив заболевания в течение периода наблюдения. При посеве крови на селективную транспортную среду с последующим пересевом на бифазную среду по Кастанеде роста культуры бруцелл выявлено не было. Нами не выявлено статистически значимых различий в частоте рецидивов среди пациентов двух групп.

После начала лечения лихорадка купировалась в среднем через 104 ± 24 часов в группе больных, получавших доксициклин в сочетании с рифампицином и через 86 ± 21 часов в группе больных, получавших комбинацию ципрофлоксацин плюс рифампицин ($p > 0,05$; различие статистически незначимо).

Побочные эффекты были ожидаемо ниже в группе «ципрофлоксацин плюс рифампицин», поскольку неблагоприятное влияние доксициклина на желудочно-кишечный тракт хорошо известно [1, 4], хотя число наблюдений недостаточно для проверки статистической значимости различий.

Примером неуспешного применения схемы «ципрофлоксацин плюс рифампицин» (развитие рецидива) при подостром бруцеллёзе может служить следующая история болезни. *История болезни больного И., ист. №592, 47 лет, находился на стационарном лечении с 12.02.09 г. по 02.04.09 г. с диагнозом: Подострый бруцеллёз, полиартралгия. Реактивный гепатит.*

При поступлении предъявлял жалобы на боли в левом плечевом суставе, лучезапястных суставах обеих кистей, плюсне-фаланговых и голеностопных суставах обеих ног, локтевых суставах с двух сторон, слабость, потливость. Больным себя считает в течение двух месяцев, когда у больного появился озноб. Не лечился, не обследовался. В декабре 2008 г. в связи с появлением болей в поясничной области на фоне лихорадки лечился стационарно (диагноз больной не знает, выписки из истории болезни на руках нет), получал инъекции пенициллина. До февраля 2009 г. чувствовал себя неплохо, в начале месяца появились головная боль, боли в левой половине шеи, при обращении в поликлинику по месту жительства обследован на туберкулёз, диагноз исключён, получал симптоматическое лечение, без видимого эффекта (больной чувствовал себя плохо). В связи с появлением боли и отёчности в правом локтевом суставе и суставах обеих голеней обследован на бруцеллёз: реакция Райта — 1 : 400, реакция Хеддльсона — положительна.

Анамнез жизни не отягощён, аллергические реакции отрицает.

Из эпидемиологического анамнеза: держит личное хозяйство (овцы, козы); со слов больного скот проверен, инфекционных абортосов не было. Больной из населённого пункта, неблагополучного по бруцеллёзу овец.

При осмотре: аксиллярная температура 36,5 °С. Общее состояние расценено как среднетяжёлое. Самочувствие удовлетворительное. Больной нормостенического телосложения, пониженного питания, тургор кожи снижен. Отмечена умеренная бледность кожных покровов, кожа влажная на ощупь, полиаденит (подчелюстные и заднешейные лимфатические узлы увеличены до I ст.). Суставы визуально не изменены, активные и пассивные движения в полном объёме, отмечается болезненность при пальпации. Со стороны органов дыхания изменений не выявлено. Тоны сердца ясные, ритм правильный, артериальное давление 100/60 мм. рт. ст. Язык влажный, обложен беловатым налётом. Живот мягкий, болезненный в правом подреберье. Печень выступает из-под края реберной дуги на 3,5 см, при пальпации умеренно болезненна, селезёнка не увеличена.

При лабораторном обследовании выявлены положительные серологические реакции: реакция Райта 1 : 800, реакция Хеддльсона положительна, Роз-Бенгал положительна. Выделена гемокультура – *Brucella melitensis*.

В общем анализе крови: Hb – 110 г/л, лейкоциты – $6,5 \times 10^9$ /л, эозинофилы – 5%, сегментоядерные нейтрофилы – 31%, лимфоциты – 64%,

моноциты – 0%, СОЭ – 8 мм/ч.

В биохимическом анализе крови: Общий белок 77,0 г/л, билирубин 8,2 мкмоль/л, холестерин 6,8 ммоль/л, креатинин 74,2 мкмоль/л, АСТ 0,42 мкмоль/л, АЛТ 0,59 мкмоль/л, щелочная фосфатаза 3,0 мккат/л, сахар 15,5 ммоль/л, азот 5,5 ммоль/л.

В моче следы белка, единичные лейкоциты.

УЗИ: признаки умеренного диффузного поражения печени, холестаза.

В стационаре весь период наблюдения температура была нормальной. Боли в суставах исчезли через 31 день от начала лечения. К моменту выписки из стационара нормализовались размеры печени, безболезненная.

Проведённое лечение: антибактериальная терапия по непрерывному методу (по схеме «ципрофлоксацин плюс рифампицин»). Противовоспалительная терапия проводилась бутадионом 15 дней. Кроме того, больной получал десенсибилизирующую, стимулирующую терапию, витамины.

При проспективном наблюдении у больного развился рецидив инфекции с положительной реакцией Райта (1 : 400) и выделением культуры *B. melitensis*. Повторные обследования на бруцеллёз животных из личного подворья (включая дворовых собак), объектов внешней среды (смывы со стен кошары, навоз, солома) положительных находок не дали. Члены семьи больного здоровы, реакции Райта и Роз-Бенгал — отрицательные.

Все больные, у которых наблюдался рецидив, получили дополнительно комплексное лечение комбинацией доксициклина per os (6 недель) и гентамицина внутримышечно (3 недели) с хорошим клиническим эффектом. Повторные рецидивы нами не наблюдались.

Заключение

Таким образом, комбинация «ципрофлоксацин плюс рифампицин» по результатам наших наблюдений оказалась столь же эффективной, как и традиционно используемый режим «доксициклин плюс рифампицин». Хотя первая схема лечения и вызывает в среднем более быстрое купирование лихорадки, нежели при использовании второго режима лечения, высокая частота рецидивов (13,6%) не позволяет рекомендовать эту схему при лечении бруцеллёза как терапию выбора.

Глава 10. Оценка значимости азитромицина как компонента этиотропной терапии острого бруцеллёза

Отбор пациентов и диагностические критерии при проведении данного фрагмента исследования соответствовали вышеописанным. Всего под наблюдением находилось 36 больных с острым бруцеллёзом, подтверждённым бактериологически или серологически. Больные случайным образом были отнесены к одной из групп («доксикалин плюс рифампицин» или «азитромицин плюс рифампицин») в соотношении 1 : 1.

Диагностические критерии включали наличие титра 1 : 200 и выше в реакции агглютинации Райта и / или выделение культур бруцелл из крови или иного биологического материала пациента.

Критерии исключения пациента из исследования соответствовали вышеописанным и включали в себя известную или выявленную гиперчувствительность больного к азитромицину либо противопоказания к его назначению, а также эффективную антибактериальную терапию в течение 7 дней до включения пациента в исследование. Кроме того, в исследование не должны были включаться лица с вовлечением в патологический процесс ЦНС, спондилитом или эндокардитом.

Пациентам основной группы азитромицин назначался в комбинации с рифампицином. Группа сравнения получала комбинацию «доксикалин + рифампицин».

Азитромицин назначался в дозе 500 мг 1 раз в сутки перорально за 1 час до или спустя 2 часа после еды в течение 21 дня.

Рифампицин назначался по схеме, рекомендованной ВОЗ (900 мг в сутки в 3 приёма) в течение 42 дней.

Клинический мониторинг терапевтической эффективности препаратов и признаков токсического действия назначаемых комбинаций осуществлялся посредством анализа данных, полученных в результате физикального обследования пациентов; учитывалась динамика лейкоцитарной формулы с подсчётом тромбоцитов и оценкой СОЭ, уровень креатинина, АСТ и АЛТ, билирубин и фракции, электролиты, динамика титров в реакции Райта, а также повторное выделение гемокультуры и наличие рецидивов заболевания (см. раздел 2.4.2 настоящей работы).

Так же, как и в случае с изучением терапевтической ценности ципрофлоксацина физикальное и лабораторное обследование наблюдавшихся больных осуществлялось на 2-й, 4-й и 6-й неделе лечения. Пациенты опрашивались, не было ли пропусков в приёме препаратов.

Оценка эффективности проводимого лечения осуществлялась, прежде всего, по наличию или отсутствию рецидивов заболевания. В течение 3 месяцев после проведённого лечения осуществлялся опрос о повторном возникновении симптомов заболевания, а также проводилось

бактериологическое и серологическое (реакция Райта макрометодом) обследование.

Была разработана клиническая классификация реакции на лечение комбинацией «азитромицин + рифампицин»:

- Отсутствие видимой положительной реакции на изучаемую комбинацию или ухудшение симптоматики в течение 7 дней от начала лечения расценивалось как «неудача в лечении».
- Повторное появление симптомов заболевания с нарастанием титров в реакции Райта, сопровождавшееся или нет выделением гемокультуры бруцелл в период 3-месячного наблюдения после окончания этиотропной терапии расценивалось как «рецидив».
- Полное исчезновение всех признаков инфекции и отсутствие рецидива в течение всего периода наблюдения расценивалось как «выздоровление».

Безопасность исследования базировалась на учёте всех опубликованных в доступной литературе побочных реакциях на азитромицин и данных лабораторных тестов. Клинические проявления, расценивавшиеся как побочные эффекты, фиксировались в карте больного и сопоставлялись с данными о динамике симптомов инфекции, тяжестью заболевания и результатами лабораторных исследований для принятия решения о замене препарата.

Результаты

Основные характеристики и клинические реакции на лечение пациентов обеих групп обобщены в таблице 21.

Из 18 пациентов с острым бруцеллёзом, которые получали схему лечения «азитромицин + рифампицин», все завершили 21-дневный курс лечения данным препаратом. Ни у одного пациента мы не наблюдали возможных побочных эффектов от приёма препарата.

Несмотря на проводимое лечение, у 2 пациентов сохранялись признаки патологического процесса: в 1 случае — боль в спине, а в 1 — развились признаки правостороннего гонита. У этого же больного на фоне лечения сохранялась субфебрильное повышение температуры тела, в результате чего он был исключён из исследования. Назначение комбинации доксициклина перорально в сочетании с гентамицином внутримышечно в обычных дозировках привело к купированию патологической симптоматики у этого больного.

По окончании терапии на 2 неделе от момента лечения у 2 больных отмечался рецидив инфекции. У 1 пациента наблюдался субфебрилитет, а также нарастание титра противобруцеллёзных антител в парных сыворотках, у 2-го - отмечались явления артрита левого локтевого сустава, а также

выделение *Brucella melitensis* из крови.

У остальных наблюдавшихся больных лечение комбинацией «азитромицин + рифампицин» расценено как успешное.

Таблица 21 — Сравнительная клиническая характеристика групп «доксциклин плюс рифампицин» и «азитромицин плюс рифампицин»

<i>Признак</i>	<i>Группа «азитромицин + рифампицин» (n = 18)</i>	<i>Группа «доксциклин плюс рифампицин» (n = 18)</i>
Возраст (средний и диапазон)	35 (18-61)	32 (18-61)
Пол (мужчин / женщин)	18 / 6	18 / 6
Лихорадка	16	17
Гепатомегалия	6	4
Спленомегалия	3	3
Артралгия	6	9
Головная боль	4	4
Потливость	18	18
Положительная культура	4	5
Положительная агглютинация	18	18
Побочные реакции: - диарея - тошнота и рвота	0 0	1 2
Осложнения заболевания	1 сакроилеит	1 сакроилеит
Рецидив заболевания	2	0
Продолжительность лихорадки после начала заболевания (часы)	104 ± 21	84 ± 19

Примером успешного применения схемы «азитромицин плюс рифампицин» при остром бруцеллёзе может служить следующая история болезни. История болезни больного С., ист. №4844, 54 лет, находился на

стационарном лечении с 26.08.08 г. по 22.09.08 г. с диагнозом: Острый бруцеллёз. Артрит правого тазобедренного сустава.

При поступлении предъявлял жалобы на боли в локтевом, голеностопном и тазобедренном суставах справа, слабость, потливость. Похудел на 11 кг. Заболел остро 19.06.08, заболевание началось остро с лихорадки около 40 °С, которая продолжалась 12 дней, сопровождалась ознобом, профузной потливостью, принимал жаропонижающие препараты. За медицинской помощью обратился 28.06.08 в связи с присоединением болей в коленных суставах и пяточных областях; при обследовании на бруцеллёз серологические реакции положительны (реакция Райта — 1 : 400, Реакция Хеддльсона — положительна).

В анамнезе аллергические реакции на левомецетин, тетрациклин, стрептомицин, гентамицин, витамины группы В.

Из эпидемиологического анамнеза: работает водителем в крестьянском хозяйстве, перевозит животных. Употребляет в пищу некипячёное коровье молоко. Личного подворья не держит.

При осмотре: аксилярная температура 37,0 °С. Общее состояние и самочувствие удовлетворительное. Больной нормостенического телосложения, пониженного питания. Кожные покровы обычной окраски, кожа влажная на ощупь, полиаденит (подчелюстные и заднешейные лимфатические узлы увеличены до I ст.). Суставы визуально не изменены, отмечается болезненность при пальпации *musculus sternocleidomastoideus* справа, обоих коленных суставах, ахилловом сухожилии и пяточной области справа. Отмечаются боли в правом тазобедренном суставе, объём активных и пассивных движений в суставе снижен из-за болезненности. Со стороны органов дыхания изменений не выявлено. Тоны сердца ясные, ритм правильный, артериальное давление 120/70 мм. рт. ст. Язык влажный, обложен беловатым налётом. Живот мягкий, болезненный в правом подреберье. Печень выступает из-под края реберной дуги на 3,5 см, при пальпации умеренно болезненна, селезёнка не увеличена.

При лабораторном обследовании выявлены положительные серологические реакции: реакция Райта 1 : 800, реакция Хеддльсона положительна, Роз-Бенгал положительна. Выделена гемокультура – *Brucella melitensis*.

В общем анализе крови: Hb – 120 г/л, лейкоциты – $3,2 \times 10^9$ /л, эозинофилы – 2%, палочкоядерные нейтрофилы — 6%, сегментоядерные нейтрофилы – 52%, лимфоциты – 37%, моноциты – 3%, СОЭ – 10 мм/ч.

В биохимическом анализе крови: Общий белок 86,1 г/л, билирубин 6,4 мкмоль/л, холестерин 9,7 ммоль/л, креатинин 82,7 мкмоль/л, АСТ 0,52 мкмоль/л, АЛТ 0,12 мкмоль/л, сахар 15,5 ммоль/л, азот 5,5 ммоль/л.

В моче следы белка, единичные лейкоциты.

В стационаре весь период наблюдения температура была субфебрильной

(6 дней) и нормальной. Боли в суставах исчезли через 24 дня от начала лечения. К моменту выписки из стационара нормализовались размеры печени, безболезненная.

Проведённое лечение: антибактериальная терапия по непрерывному методу (по схеме «азитромицин плюс рифампицин»). Противовоспалительная терапия проводилась бутадионом 15 дней. Кроме того, больной получал десенсибилизирующую, стимулирующую терапию.

При проспективном наблюдении рецидивы не выявлены.

Заключение

Таким образом, азитромицин показал достаточную противобруцеллёзную активность в клиническом наблюдении. Данный препарат можно рекомендовать как антибиотик второй очереди при лечении бруцеллёза.

Глава 11. Оценка эффективности схем этиотропного лечения бруцеллёза

Бруцеллёз человека — это системная инфекция, вовлекающая в патологический процесс многие органы и ткани (Pappas G., Papadimitriou P., Akritidis N. et al., 2006; Baykam N., Esener H., Ergonul O. et al., 2004). Внутриклеточная локализация возбудителя затрудняет его эрадикацию, в связи с чем оптимальный режим этиотропного лечения бруцеллёза всё ещё не определён (Lopez-Merino A., Contreras-Rodriguez A., Migranas-Ortiz R. et al., 2004). В течение длительного времени в качестве стандартного режима терапии данной инфекции использовалась комбинация стрептомицина и тетрациклинов. Различными авторами сообщалось о наступлении рецидивов при применении данного режима в 5,3 — 14,5% случаев (Kinsara A., Al-Mowallad A., Osoba O.A., 1999; Saltoglu N., Tasova Y., Inal S.A. et al., 2002). Кроме того, назначение стрептомицина затруднялось ототоксичностью, нефротоксичностью, а также реакциями гиперчувствительности по отношению к данному препарату (Geyik F.M., Gur A., Nas K. et al., 2002).

В 1986 году Всемирная организация здравоохранения рекомендовала использовать 6-недельный курс доксициклина в комбинации с рифампицином для лечения бруцеллёза человека (Corbel M.J., 2006). Ряд исследователей сообщает о частоте рецидивов для данного режима в 14-17% (Kinsara A., Al-Mowallad A., Osoba O.A., 1999; Saltoglu N., Tasova Y., Inal S.A. et al., 2002; Ariza J., Gudiol F., Pallares R. et al., 1992). Назначение монотерапии с использованием таких препаратов как котримоксазол, доксициклин, рифампицин и ципрофлоксацин было запрещено в связи с высоким уровнем рецидивов; было рекомендовано использование исключительно комбинаций противобруцеллёзных агентов (Spink W.W., 1952; Spink W.W., 1964).

Использование режима «доксициклин плюс рифампицин» более коротким, нежели 6 недель, курсом привело к возрастанию частоты

рецидивов бруцеллёза до 30% (Lopez-Merino A., Contreras-Rodriguez A., Migranas-Ortiz R. et al., 2004; Kinsara A., Al-Mowallad A., Osoba O.A., 1999). Надежды на успешное использование препаратов с внутриклеточной активностью, фторхинолонов, для этиотропного лечения бруцеллёза не оправдались. Частота рецидивов при использовании режима «ципрофлоксацин плюс рифампицин» составила 15% (Akova M., Gür D., Livermore D.M. et al., 1999). Оценка эффективности других рекомендованных режимов оральной терапии бруцеллёза не получила достаточного отражения в доступной литературе.

В этой связи целью данного фрагмента исследования явилась оценка сравнительной эффективности пяти стандартных режимов этиотропной терапии острого бруцеллёза у людей.

С января 2006 по декабрь 2013 года нами проводился отбор с последующим проспективным наблюдением больных острым бруцеллёзом, поступающих на лечение в учреждения амбулаторного и стационарного типов Южно-Казахстанской области.

Критериями исключения пациентов из исследования явились: возраст моложе 15 лет, беременность, наличие осложнений (эндокардит, спондилит и т. п.), нейробруцеллёз, эпизод ранее перенесённого бруцеллёза в анамнезе, а также антибактериальная терапия в сроке 7 дней и ранее до включения в исследование.

Критериями включения явились таковые для подтверждённого бруцеллёза согласно стандартным определениям случая для данной инфекции, принятой в Казахстане. Для всех случаев, помимо стандартных подтверждающих бактериологических (посев крови по Кастанеда) и серологических (Роз-Бенгал тест, реакция агглютинации на стекле Хеддльсона и в пробирках Райта) тестов.

Кроме того, использовался Real Time PCR для мониторинга наличия бактериальной ДНК бруцелл в венозной крови пациентов на различных этапах ведения (на момент начала обследования и после окончания этиотропного лечения). У всех больных, включённых в исследование, на момент начала наблюдения и после окончания терапии регистрировалось наличие бактериальной ДНК бруцелл и определялся уровень малонового диальдегида в венозной крови.

После завершения комплектования групп всего под нашим проспективным наблюдением находилось 247 больных с острым и подострым бруцеллёзом (подтверждённые случаи), получавшие лечение согласно одной из общепринятых схем (4 – рекомендованные ВОЗ и 1 – внесённая в стандарт ведения больного бруцеллёзом в Республике Казахстан). В настоящее исследование были включены только те случаи, когда больные принимали предписанные препараты корректно и полностью завершили курс лечения.

Регистрируемые признаки вносились в таблицу среды статистической обработки данных R, в результате чего был сформирован набор данных, включавший 42 переменные и 247 наблюдений.

Анализ данных набора ставил целью дать ответы на следующие вопросы:

1. Является ли схема этиотропного лечения, выключённая в стандарт ведения больного бруцеллёзом Республики Казахстан, достаточно эффективной по сравнению со схемами, рекомендованными ВОЗ?
2. Дать количественную оценку эффективности имеющихся схем этиотропного лечения бруцеллёза.

Критериями эффективности лечения были приняты следующие: частота регистрации рецидивов после окончания курса этиотропной терапии, динамика показателей эндогенной интоксикации (малоновый диальдегид и молекулы средней массы в плазме), а также динамика персистенции бактериальной ДНК бруцелл у пролеченных пациентов.

Кроме того, учитывалась динамика других лабораторных признаков воспалительного процесса: СОЭ, число лейкоцитов в периферической крови, С-реактивный белок в плазме.

В последующем пациенты были случайным образом (с использованием функции `sample` свободной среды обработки данных R) разбиты на 5 групп (рисунок 18), получавшие различные режимы антибактериальной терапии:

- Группа 1 (42 пациента): доксициклин + рифампицин;
- Группа 2 (54 пациента): рифампицин + бисептол;
- Группа 3 (48 пациентов): доксициклин + гентамицин;
- Группа 4 (55 пациентов): доксициклин + цiproфлоксацин;
- Группа 5 (48 пациентов): пefлоксацин в виде монотерапии.

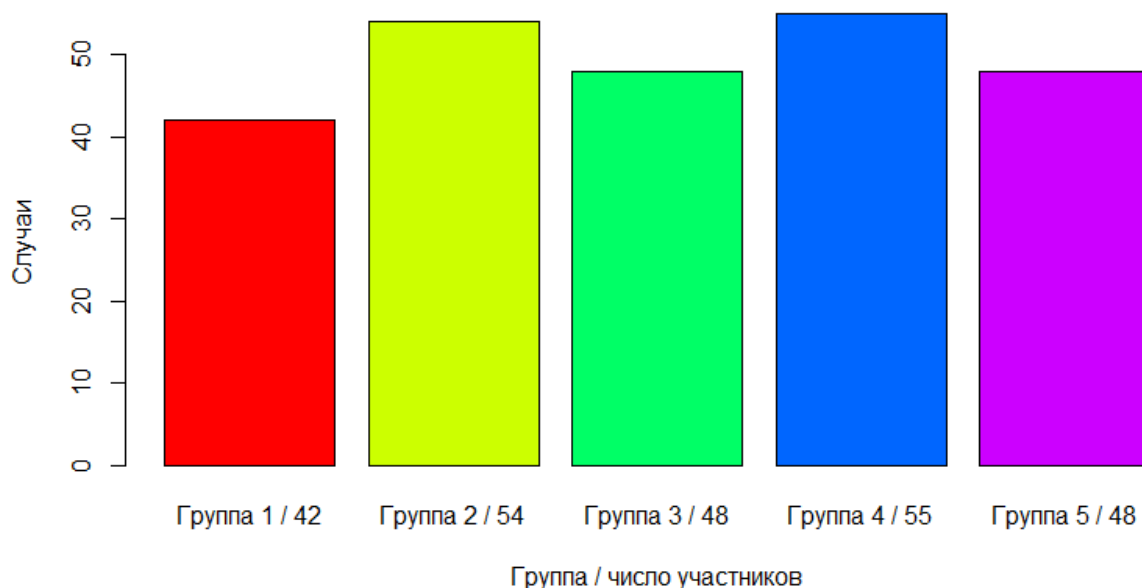


Рисунок 18 – Число участников в терапевтических группах наблюдавшихся больных

При подборе групп придерживались принципа равенства половозрастной структуры и тяжести заболевания.

Наличие симптомов основного заболевания у больного после проведения курса этиотропного лечения расценивалось как несостоятельность терапии.

Начальный период этиотропного лечения у всех наблюдавшихся больных протекал благоприятно и сопровождался угасанием симптомов общей интоксикации: аксилярная температура снижалась до нормальных цифр на 1-3 сутки от начала заболевания, снижалась или исчезала слабость, головная боль, общее недомогание.

Клиническая характеристика и лабораторные показатели в различных терапевтических группах представлены в таблице 22.

После проведённого этиотропного лечения среди наблюдавшихся больных (без учёта отнесения к той или иной терапевтической группе) рецидив был диагностирован в 37 (14,98%) случаях, что соответствует данным литературы (см. выше). В целом выраженность клинической симптоматики в период рецидива была мягче, нежели до начала лечения. Повторное выделение гемокультуры после проведённой этиотропной терапии у больных рецидивами было зарегистрировано в 17 (45,35%) случаях. Это составило 6,88% от общего числа пролеченных больных ($n = 247$).

Таблица 22 – Клиническая характеристика и лабораторные показатели у пациентов в различных терапевтических группах

Симптом	Группа 1 (n = 42)	Группа 2 (n = 54)	Группа 3 (n = 48)	Группа 4 (n = 55)	Группа 5 (n = 48)
Возраст	37,62 ± 14,07	36,91 ± 14,61	35,08 ± 15,88	38,85 ± 12,04	37,79 ± 11,57
Пол (муж. / жен.)	23 / 19	37 / 17	29 / 19	36 / 19	30 / 18
Наличие фоновых заболеваний	22 (52,38%)	28 (51,85%)	27 (56,25%)	27 (49,09%)	25 (52,08%)
Лихорадка	36 (85,71%)	47 (87,04%)	40 (83,33%)	50 (90,91%)	41 (85,42%)
Потливость	42 (100%)	54 (100%)	48 (100%)	53 (96,36%)	44 (91,67%)
Артралгия	31 (73,81%)	45 (83,33%)	32 (66,67%)	46 (83,64%)	41 (85,42%)
Миалгия	3 (7,14%)	4 (7,41%)	4 (8,33%)	7 (12,73%)	4 (8,33%)
Спленомегалия	15 (35,71%)	24 (44,44%)	22 (45,83%)	29 (52,73%)	21 (43,75%)
СОЭ, мм / ч	19,79 ± 9,37	18,88 ± 9,9	21,42 ± 7,95	20,40 ± 8,3	19,45 ± 10,52
С-реактивный белок, мг / л	33,73 ± 3,82	33,64 ± 3,4	34,38 ± 4,14	33,71 ± 3,4	33,44 ± 3,22

Проведённый регрессионный анализ показал, что на частоту рецидивов при лечении острого бруцеллёза в наблюдаемых группах, не оказывают ни пол, ни возраст, ни наличие сопутствующих заболеваний (таблица 23).

Влияние на частоту развития рецидивов как фактор риска оказывал режим проводимой терапии (статистически значимые различия выявлены в группах 3 и 5, т. е. при назначении режимов доксициклин + гентамицин и пефлоксацин в виде монотерапии).

Таблица 23 — Регрессионный анализ влияния факторов риска на развитие рецидивов у больных бруцеллёзом

Фактор риска	Значение z	Стандартная ошибка	Значение p
Возраст	0,140	0,013	0,888956
Пол	-1,544	0,3592	0,123
Наличие фонового заболевания	-0,472	0,3568	0,637
Группа 1	-4,135	0,7245	$3,55 \times 10^{-5}$
Группа 2	1,521	0,8195	0,12826
Группа 3	1,880	0,8134	0,06008

Фактор риска	Значение z	Стандартная ошибка	Значение p
Группа 4	0,505	0,8914	0,61351
Группа 5	2,665	0,7911	0,00769

Отнесение пациентов к терапевтической группе №1, получавшей доксициклин + рифампицин, статистически значимо снижало число рецидивов после окончания курса лечения.

Число рецидивов в наблюдавшихся группах больных было следующим: 2 (4,76%), 8 (14,81%), 9 (18,75%), 4 (7,27%), 14 (29,17%).

Режимы «доксициклин + рифампицин» и «доксициклин + цiproфлоксацин» показали себя лучшими терапевтическими схемами в плане предотвращения развития рецидивов у пролеченных больных по сравнению с другими комбинациями антибактериальных препаратов (рисунок 19). Это можно объяснить тем, что ни гентамицин, ни бисептол не обладают активностью в отношении внутриклеточно расположенных бруцелл.

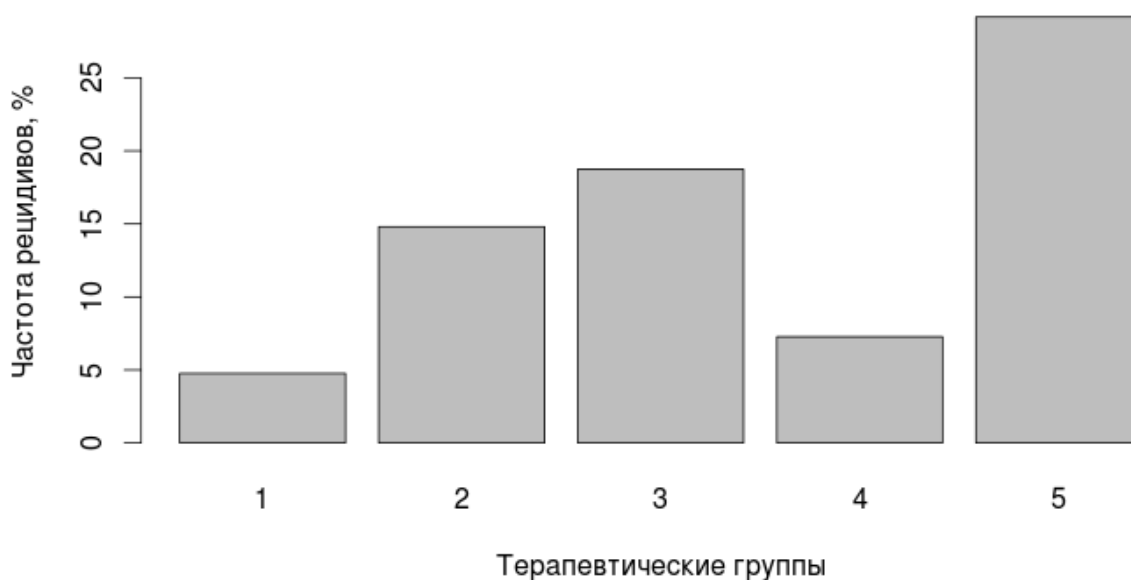


Рисунок 19 — Сравнительная эффективность различных комбинаций антибактериальных препаратов при лечении острого бруцеллёза

Несмотря на то, что пefлоксацин обладает внутриклеточной активностью, монотерапия с использованием этого препарата оказывается недостаточно эффективной для эрадикации внутриклеточно расположенных

бруцелл (рисунок 19).

Кроме того, влияние схем этиотропного лечения на развитие рецидивов бруцеллёза у наблюдавшихся больных оценивалось с помощью функции CrossTable пакета «gmodels» среды R.

Установлено, что развитие рецидива бруцеллёза статистически значимо зависит от режима этиотропной терапии (критерий хи-квадрат Пирсона = 14,13; р-значение 0,00689). Таблица сопряжённости рецидивов бруцеллёза и применённых режимов этиотропного лечения приведена ниже (таблица 24).

Таблица 24 — Таблица сопряжённости рецидивов бруцеллёза и применённых режимов этиотропного лечения

<i>Рецидив</i>	<i>Группа 1</i>	<i>Группа 2</i>	<i>Группа 3</i>	<i>Группа 4</i>	<i>Группа 5</i>	<i>Всего</i>
Есть	2 (0,8%)	8 (3,2%)	9 (3,6%)	4 (1,6%)	14 (5,7%)	37
Нет	40 (16,5%)	46 (18,6%)	39 (15,8%)	51 (20,6%)	34 (13,8%)	210
Всего	42	54	48	55	48	247

Чаще всего рецидив наблюдался в группе 5, а реже всего – в группах 1 и 4 (рисунок 19).

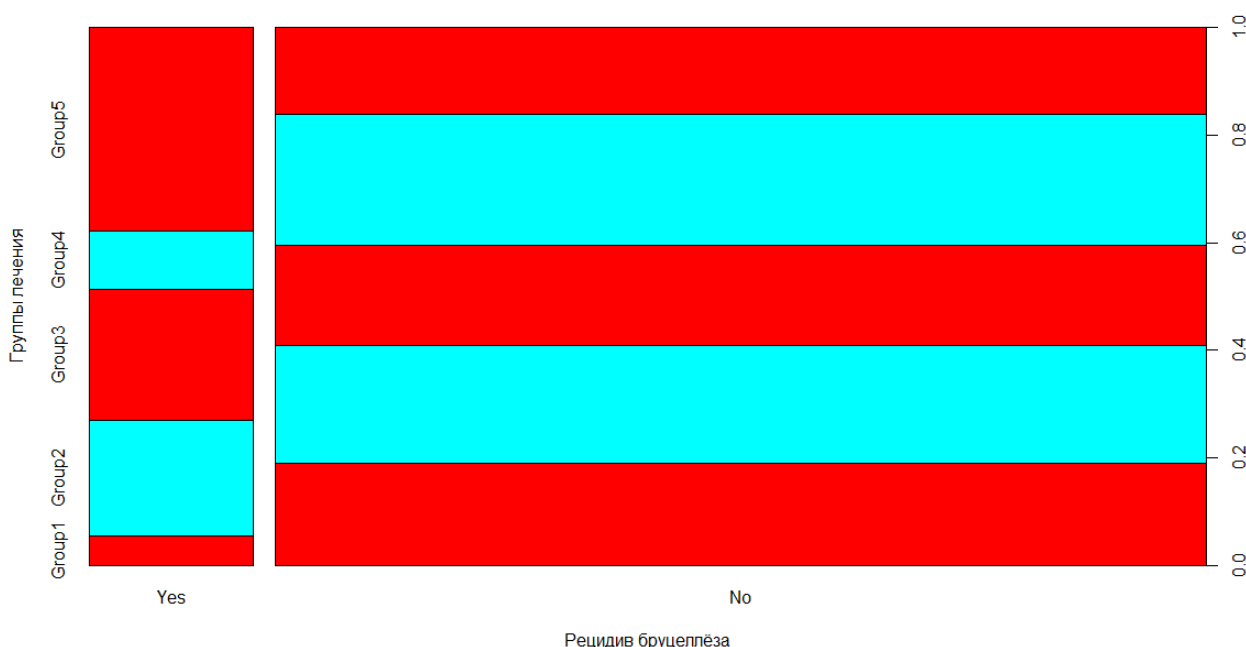


Рисунок 19 – Распределение частоты рецидивов по терапевтическим группам

После проведённого лечения у 88 пациентов (35,63%) выявлялась бактериальная ДНК бруцелл, причём в 37 (14,98%) случаев это

сопровождалось развитием рецидива бруцеллёза.

В целом можно заключить, что выявление ДНК бруцелл в крови пациента после окончания курса этиотропного лечения является показателем несостоятельности эрадикации бруцелл из внутренней среды макроорганизма и статистически значимым предиктором развития рецидива заболевания (критерий χ^2 с поправкой Йейтса = 75,63, $p = 2,2 \times 10^{-16}$). Во всех случаях развития рецидива у пролеченных больных в крови выявлялась бактериальная ДНК бруцелл (рисунок 20).



Рисунок 20 — Диаграмма сопряжённости обнаружения ДНК в крови и развития рецидива у больных бруцеллёзом, получивших курс этиотропного лечения

Кроме того, у всех больных бруцеллёзом с развившимся рецидивом (100%) уровень малонового диальдегида в венозной крови на момент прекращения этиотропного лечения превышал региональную норму (был выше 15,9 нмоль / мл).

Это подтверждает ранее полученные данные разработанной нами прогнозной модели о роли выявления бактериальной ДНК бруцелл и повышенного уровня малонового диальдегида в венозной крови у больных бруцеллёзом после проведения курса этиотропного лечения как предикторов развития рецидива инфекции.

После проведённого этиотропного лечения ожидаемо снижался интегральный показатель провоспалительного синдрома (эндотоксикоза), средние молекулы в эритроцитах (показатель t-теста Уэлча = 5,12; $p = 0,0005021$; 95% ДИ: 0,03 0,07, рисунок).

Несмотря на выявленную значительную роль провоспалительного синдрома в инфекционном процессе бруцеллёза, СМ оказывали очень слабое обратное влияние на развитие рецидива как при измерении до начала этиотропного лечения (коэффициент полисерийной корреляции = -0,1695, значение $p = 0,01869$), так и после (коэффициент полисерийной корреляции = -0,2189, значение $p = 2,494 \times 10^{-11}$, см. рисунок 21).

Динамика лабораторных показателей перекисного окисления липидов, эндотоксикоза, а также эрадикации бруцелл (оцениваемой по уровню бактериальной ДНК) в различных терапевтических группах представлена в таблице 25.

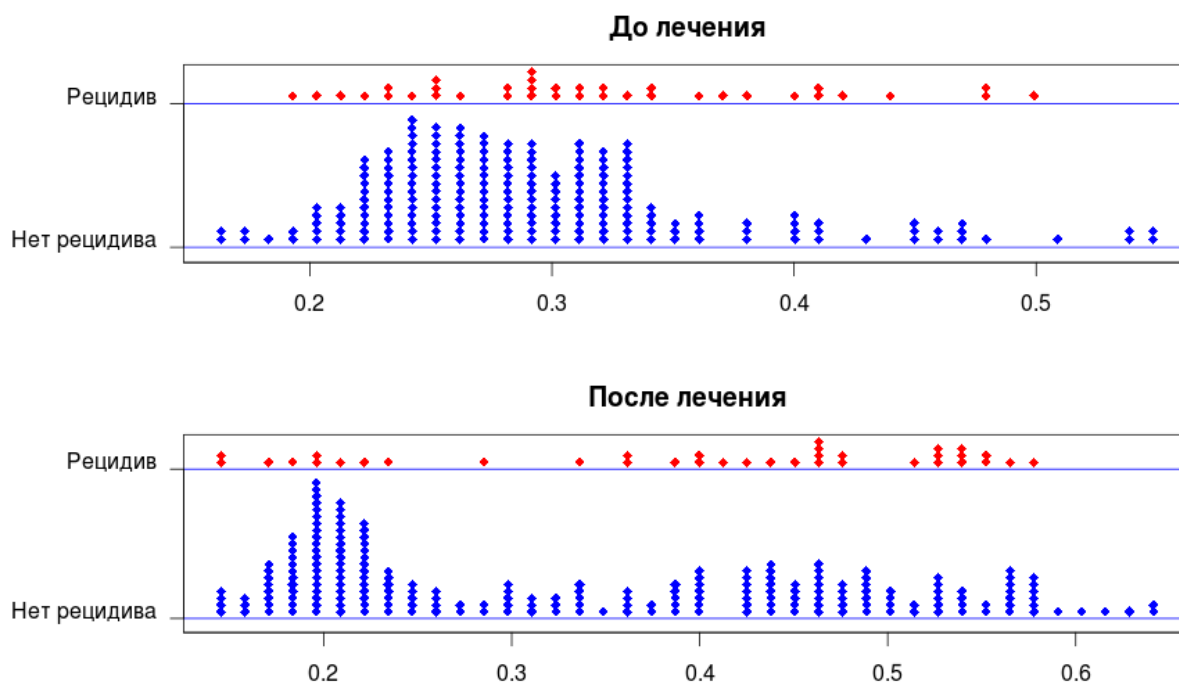


Рисунок 21 – Динамика уровня СМ (усл. ед.) в процессе лечения бруцеллёза

Таблица 25 — Динамика ряда лабораторных показателей при различных режимах этиотропной терапии бруцеллёза

Показатель	Группа 1	Группа 2	Группа 3	Группа 4	Группа 5
МДА*	$4,18 \pm 1,15$ / $2,2 \times 10^{-16}$	$4,36 \pm 1,15$ / $2,2 \times 10^{-16}$	$4,57 \pm 1,02$ / $2,2 \times 10^{-16}$	$4,23 \pm 1,01$ / $2,2 \times 10^{-16}$	$4,61 \pm 1,43$ / $2,2 \times 10^{-16}$
СМ*	$0,35 \pm 0,14$ / 0,01993	$0,33 \pm 0,14$ / 0,146	$0,38 \pm 0,15$ / 0,004235	$0,36 \pm 0,13$ / 0,02619	$0,33 \pm 0,13$ / 0,01543
Эрадикация**	88,10 / 6, 0,01431	66,67 / 6, 0,01431	66,67 / 5,33,	70,91 / 9,62,	31,25 / 6,75,

<i>Показатель</i>	<i>Группа 1</i>	<i>Группа 2</i>	<i>Группа 3</i>	<i>Группа 4</i>	<i>Группа 5</i>
			0,02092	0,001927	0,009375

Примечание:

* среднее значение показателя после проведённого лечения $\pm$ стандартное отклонение / статистическая значимость различия с показателем, измеренным до начала лечения

** доля случаев успешной эрадикации, % / критерий χ^2 Пирсона, статистическая значимость различия с показателем, измеренным до начала лечения

Таким образом, как было установлено ранее нами *in vitro*, доксициклин показывает себя оптимальным препаратом для эрадикации внутриклеточных бруцелл. Он показал свою высокую эффективность и в клинических исследованиях. Поскольку различия МИК доксициклина во всех терапевтических группах были статистически незначимы, различия в числе рецидивов и эрадикаций позволяют определить наиболее эффективную комбинацию антибактериальных препаратов. Этой комбинацией является схема доксициклин плюс рифампицин, несмотря на известный антагонизм этих препаратов.

Данная схема рекомендуется и ВОЗ в качестве терапевтического режима бруцеллёза первой очереди.

Список использованных источников

- 1 Pappas G., Papadimitriou P., Akritidis N. et al. The new global map of human brucellosis // *Lancet Infect. Dis.* - 2006. - V. 6. - P. 91-99.
- 2 Joint Food and Agriculture Organization / World Health Organization. FAO-WHO Expert Committee on Brucellosis (sixth report). WHO technical report series №740. - Geneva: WHO, 1986. - P. 56-57.
- 3 Baykam N., Esener H., Ergonul O. et al. In vitro antimicrobial susceptibility of *Brucella* species // *Intern. J. Antimicrob. Agents.* - 2004. - V. 23. - P. 405-407.
- 4 Lopez-Merino A., Contreras-Rodriguez A., Migranas-Ortiz R. et al. Susceptibility of Mexican brucella isolates to moxifloxacin, ciprofloxacin and other antimicrobials used in the treatment of human brucellosis // *Scand. J. Infect. Dis.* - 2004. - V. 36. - P. 636-638.
- 5 De Rautlin de la Roy Y.M., Grignon B., Grollier G., Coindreau MFBecq-Giraudon B. Rifampicin resistance in a strain of *Brucella melitensis* after treatment with doxycycline and rifampicin // *J. Antimicrob. Chemother.* - 1986. - V. 18. - P. 648-649.
- 6 Kinsara A., Al-Mowallad A., Osoba O.A. Increasing resistance of *Brucellae* to co-trimoxazole // *Antimicrob. Agents Chemother.* - 1999. - V. 43. - P. 1531.
- 7 Saltoglu N., Tasova Y., Inal S.A. et al. Efficacy of rifampicin plus doxycycline versus rifampicin plus quinolone in the treatment of brucellosis // *Saudi Med. J.* - 2002. - V. 23. - P. 921-924.
- 8 Geyik F.M., Gur A., Nas K. et al. Musculoskeletal involvement in brucellosis in different age groups: a study of 195 cases // *Swiss Med. Wkly.* - 2002. - V. 132. - P. 98-105.
- 9 Corbel M.J. Brucellosis in humans and animals / UN FAO; World Organisation for Animal Health; WHO, 2006. - 89 p.
- 10 Ariza J., Gudiol F., Pallares R. et al. Treatment of human brucellosis with doxycycline plus rifampicin or doxycycline plus streptomycin // *Annals of Internal Medicine.* - 1992. - V. 117. - P. 25-30
- 11 Spink W.W. Some biologic and clinical problems related to intracellular parasitism in brucellosis // *N. Engl. J. Med.* - 1952. - V. 247. - P. 603-610.
- 12 Spink W.W. Host-parasite relationship in brucellosis // *Lancet V. II.* - 1964. - P. 161-164.
- 13 Akova M., Gür D., Livermore D.M. et al. In vitro activities of antibiotics alone and in combination against *Brucella melitensis* at neutral and acidic pHs // *Antimicrob. Agents Chemother.* - 1999. - V. 43. - P. 1298-1300.
- 14 Magoffin R.L., Spink W.W. The protection of intracellular brucella against streptomycin alone and in combination with other antibiotics // *J. Lab. Clin. Med.* - 1951. - V. 37. - P. 924-930.
- 15 Shaffer J.M., Kucera C.J., Spink W.W. The protection of intracellular brucella against therapeutic agents and the bactericidal action of serum // *J. Exp. Med.* -

1953. - V. 97. - P. 77-89.
- 16Spink W.W., Bradley G.M. Persistent parasitism in experimental brucellosis: attempts to eliminate brucella with long-term tetracycline therapy // J. Lab. Clin. Med. - 1960. - V. 55. - P. 535-547.
- 17Ariza J., Gudiol F., Pallares R. et al. Comparative trial of rifampin doxycycline: versus tetracycline-streptomycin in the therapy of human brucellosis // Antimicrob. Agents Chemother. - 1985. - V. 2. - P. 548-551.
- 18Ariza J., Gudiol F., Pallares R. et al. Comparative trial of cotrimoxazol versus tetracycline-streptomycin in treating human brucellosis // J. Infect. Dis. - 1985. - 1985. - V. 152. - P. 1358-1359.
- 19Bertrand A., Roux J., Janbon F. et al. Traitement de la brucellose par la rifampicine // Nouv. Presse Med. - 1979. - V. 8. - P. 3635-3639.
- 20Buchanan T.M., Faber L.C., Feldman R.A. Brucellosis in the United States 1960-1972. An abattoir-associated disease. Part I. Clinical features and therapy // Medicine (Baltimore). - 1974. - V. 53. - P. 403-413.
- 21Kilic S., Dizbay M., Cabadak H. In vitro activity of tigecycline, tetracycline and fluoroquinolones against *Brucella melitensis*. J. Chemother. - 2008. - V. 20. - P. 33-37.
- 22Garcia-Rodriguez J.A., Garcia-Sanchez J.E., Trujillano I. Lack of effective bactericidal activity of new quinolones against *Brucella* spp. // Antimicrob Agents Chemother. - 1991. - V. 35. - P. 756-759.
- 23Agalar C., Usulutun S., Turkyilmaz R. Ciprofloxacin and Rifampicin Versus Doxycycline and Rifampicin in the Treatment of Brucellosis // Eur. Journal of Clin. Microbiol. & Infect. Dis. - 1999. - V. 18. - P. 535-538.
- 24Lang R., Rubinstein E. Quinolones for the treatment of brucellosis // J. Antimicrob. Chemother. - 1992. - V. 29. - P. 357-363.
- 25Akalin H., Ünal S., Gür D., Baykal M. Ofloxacin in the treatment of brucellosis (Special issue: Proceedings of the Third International Symposium on Quinolones, Vancouver, Canada, 1990) // Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. - 1990. - V. 1990. - P. 326-328.
- 26Quadri S.M., Halim M.A., Ueno Y. et al. Antibacterial activity of azithromycin against *Brucella melitensis* // Chemotherapy (Basel). - 1995. - V. 41. - P. 253-256.
- 27Курманова К.Б. Этиотропная терапия бруцеллёза // Антибиотики и химиотер. - 1998. - № 43 (3). — С. 37-42.
- 28Дуйсенова А.К., Курманова К.Б., Курманова Г.М. Опыт применения ципрофлоксацина для лечения больных бруцеллёзом // Антибиотики и химиотерапия. - 2002. - Т. 47, № 10. - С. 3-7.
- 29Kornfeld S., Mellman I. The biogenesis of lysosomes // Annu. Rev. Cell Biol. - 1989. - V. 5. - P. 483-525.
- 30Шульдяков А.А., Ляпина Е.П., Соболева Л.А. и др. Особенности формирования органопатологии при хроническом бруцеллёзе // Инфекционные болезни. - 2011.- №3.- С.49-52.

- 31 Смагина А.Н., Линькова Ю.Н., Шульдяков А.А., Ляпина Е.П. Применение циклоферона в комплексной терапии хронического бруцеллёза // Антибиотики и химиотерапия. - 2010. - №7. - С.42-45.
- 32 Demirtürk N., Demirdal T., Erben N. et al. Brucellosis: a retrospective evaluation of 99 cases and review of brucellosis treatment // Trop. Doct. - 2008. - V. 38. - P. 59-62.
- 33 Demirdal T., Demirturk N. Laboratory-acquired brucellosis // Ann. Acad. Med. Singapore. - 2008. - V. 37. - P. 86-87.
- 34 Mantur B.G., Amarnath S.K. Brucellosis in India - a review // J. Biosci. - 2008. - V. 33. - P. 539-547.
- 35 Seow C.J., Barkham T., Wong P.M. et al. Brucellosis in a Singaporean with prolonged fever // Singapore Med. J. 2009. - V. 50. - P. e312-e314.
- 36 Покровский В.И., Буганов А.А., Шаханина И.Л. и др. Эпидемиологическая ситуация в Ямало-Ненецком автономном округе // Эпидемиология и инфекционные болезни. - 1998. - №3. - С.8-11.
- 37 Dean A.S., Crump L., Greter H. et al. Global burden of human brucellosis: a systematic review of disease frequency // PLoS Negl. Trop. Dis. - 2012. - V. 6. - e1865.
- 38 Ariza J., Bosilkovski M., Cascio A. et al. Prospectives for the Treatment of Brucellosis in the 21st Century: The Ioannina Recommendations // PLoS Medicine. - V. 4. - e317.
- 39 De Massis F., Di Girolamo A., Petrini A. et al. Correlation between animal and human brucellosis in Italy during the period 1997-2002 // Clin. Microbiol. Infect. - 2005. - V. 11. - P. 632-636.
- 40 Godfroid J., Cloeckaert A., Liautard J.P. et al. From the discovery of the Malta fever's agent to the discovery of a marine mammal reservoir, brucellosis has continuously been a re-emerging zoonosis // Vet. Res. - 2005. - V. 36. - P. 313-326.
- 41 Kizilkilic O., Turunc T., Yildirim T. et al. Successful medical treatment of intracranial abscess caused by Brucella spp // J. Infect. - 2005. - V. 51. - P. 77-80.
- 42 Perry B.R. Animal disease impact on the poor: study results // Investing in Animal Research to Alleviate Poverty / International Livestock Research Institute: Nairobi, 2002. - P. 67-78.
- 43 Araj G.F., Lulu A.R., Mustafa M.Y., Khateeb M.L. Evaluation of ELISA in the diagnosis of acute and chronic brucellosis in human beings // J. Hyg. (Lond). - 1986. - V. 97. - P. 457-469.
- 44 Gotuzzo E., Carillo C., Guerra J., Llosa L. An evaluation of diagnostic methods of brucellosis — the value of bone marrow culture // J. Infect. Dis. - 1986. - V. 153. - P. 122-125.
- 45 Sauret J.M., Vilissova N. Human brucellosis // J. Am. Board Fam. Pract. - 2002. - V. 15. - P. 401-406.
- 46 Alballa S.R. Epidemiology of human brucellosis in southern Saudi Arabia. - J. Trop. Med. Hyg. - 1995. - V. 98. - P. 185-189.

- 47Brown G. The history of the brucellosis eradication program in the United States // Ann Sclavo. - 1977. - V. 19. - P. 20–34.
- 48Mishal J., Ben-Israel N., Levin Y. et al. Brucellosis outbreak: analysis of risk factors and serologic screening // Int. J. Mol. Med. - 1999. - V. 4. - P. 655-658.
- 49Boschiroli M.L., Foulongne V., O'Callaghan D. Brucellosis: a worldwide zoonosis // Curr. Opin. Microbiol. - 2001. - V. 4. - P. 58-64.
- 50Godfroid J., Saegerman C., Wellemans V. et al. How to substantiate eradication of bovine brucellosis when aspecific serological reactions occur in the course of brucellosis testing // Vet. Microbiol. - 2002. - V. 90. - P. 461-77.
- 51Черкасский Б.Л. Лаборатория зоонозных инфекций: прошлое и настоящее // Эпидемиология и вакцинопрофилактика. - 2003.- №5.- С.43-47.
- 52Ющук Н.Д., Васюк Ю.А., Магомедова С.А., Ахмедова М.Д. Клинико-инструментальная и лабораторная оценка поражения миокарда у больных острым бруцеллёзом // Эпидемиология и инфекционные болезни. - 2010.- №1.- С.45-48.
- 53Онищенко Г.Г. Информационный бюллетень о ситуации по бруцеллёзу в Российской Федерации в 2011 г. от 23.07.2012 № 01/8183-12-32 // Дезинфекционное дело. - 2012.- №3.- С. 57-59.
- 54Ющук Н.Д., Васюк Ю.А., Ахмедова М.Д. Диагностическое значение тиолдисульфидного звена антиоксидантной системы при бруцеллёзе // Клиническая лабораторная диагностика. - 2009.- №7.- С.10-12.
- 55Гаджикулиева М.М., Магомедова С.А., Ахмедова М.Д., Тагирбекова А.Р. Эндокардит у больного бруцеллёзом // Клиническая медицина. - 2009.- №1.- С.65-67.
- 56Хасаев А.Ш., Ющук Н.Д., Васюк Ю.А., Ахмедова М.Д. Состояние сердечно-сосудистой, антиоксидантной и иммунной систем у больных бруцеллёзом // Инфекционные болезни. - 2008.- №3.- С.38-43.
- 57Ахмедова М.Д., Магомедов С.А., Тагирбекова А.Р. Полиорганное поражение у больных бруцеллёзом // Эпидемиология и инфекционные болезни. - 2008.- №2.- С.54-55.
- 58Palanduz A., Telhan L., Yildirmak Y. et al. Brucellar arthritis of knee in a child // J. Paediatr. Child Health. - 2005. - V. 41. - P. 76-77.
- 59Turunç T., Demiroğlu Y.Z., Alişkan H. et al. Brucellosis in cases of end-stage renal disease // Nephrol. Dial. Transplant. - 2008. - V. 23. - P. 2344-2349.
- 60Шульдяков А.А., Коршунова Г.А., Ляпина Е.П. и др. Хронический бруцеллёз: функциональные особенности периферической сосудистой и нервной систем // Вестник Санкт-Петербургской государственной медицинской академии. - 2007.- №3.- С.139-143.
- 61Haji-Abdolbagi M., Rasooli-Nejad M., Jafari S. et al. Clinical and laboratory findings in neurobrucellosis: review of 31 cases // Arch. Iran. Med. - 2008. - V. 11. - P. 21-25.
- 62Sari I., Altuntas F., Hacıoglu S. et al. A multicenter retrospective study defining

- the clinical and hematological manifestations of brucellosis and pancytopenia in a large series: Hematological malignancies, the unusual cause of pancytopenia in patients with brucellosis // Am. J. Hematol. - 2008. - V. 83. - P. 334-339.
- 63Hermida Lazcano I., Sáez Méndez L., Solera Santos J. Mixed cryoglobulinemia with renal failure, cutaneous vasculitis and peritonitis due to *Brucella melitensis* // J. Infect. - 2005. - V. 51. - P. e257-e259.
- 64Таран И.Ф., Дальвадянц В.Г., Лямкин Г.И. и др. Состояние и перспективы лабораторной диагностики бруцеллёза // Клиническая лабораторная диагностика. - 2002.- №12. - С.46-49.
- 65Bucher A., Gaustad P., Pape E. Chronic neurobrucellosis due to *Brucella melitensis* // Scand. J. Infect. Dis. - 1990. - V. 22. - P. 223-226.
- 66Goktepe A.S., Alaca R., Mohur H., Coskun U. Neurobrucellosis and a demonstration of its involvement in spinal roots via magnetic resonance imaging // Spinal Cord. - 2003. - V. 41. - P. 574-576.
- 67Koussa S., Tohmé A., Ghayad E. et al. Neurobrucellosis: clinical features and therapeutic responses in 15 patients // Rev. Neurol. (Paris). - 2003. - V. 159. - P. 1148-1155.
- 68Akbulut H.H., Celik I., Akbulut A. et al. Serum neopterin levels in patients with brucellosis // J. Infect. - 2005. - V. 51. - P. 281-286.
- 69Джубангалиев М.У., Сыздыков М.С., Бекетов Б.И. Материалы эпизоотолого-эпидемиологического и клинко-иммунологического обследования в некоторых районах Казахстана, эндемичных по бруцеллёзу // Сборник материалов научно–практической конференции, посвящённой 70-летию образования института. – Алматы, 1995. – С. 22-25.
- 70Клинко-эпидемиологическая характеристика бруцеллёза у подростков с выделением различных биоваров бруцелл / М.С.Сыздыков, Л.Е.Цирельсон, С.А.Амиреев и др. // Деп. в КазГосИНТИ, 15.07.96, №7130 – Ка 96 - С. 1-9.
- 71Бисмилдин Ф.П. О санитарно-эпидемиологической ситуации в республике и деятельности органов санэпиднадзора в 1996 г. // Официальный бюллетень госэпидслужбы РК «Окружающая среда и здоровье населения». – Алматы, 1997. – С. 33-41.
- 72Совершенствование эпидемиологического надзора за бруцеллёзом на современном этапе / С.А.Амиреев, Б.В.Каральник, М.С.Сыздыков и др. // Сборник материалов научно–практической конференции, посвящённой 70-летию образования института. – Алматы, 1995. – С.11.
- 73Сыздыков М.С. Эпидемиология и клиника бруцеллёза у подростков в эпидемиологически неблагополучном регионе: Автореф. ... докт. мед. наук.– М., 1997.– 36 с.
- 74Баташев В.В., Уралева В.С., Кучин В.В. Эпидемиологическая характеристика бруцеллёза в современных условиях // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. – 1998. – № 3. – С. 23-26.
- 75Ременцова М.М. Бруцеллёз у детей и меры его профилактики:

- Методические рекомендации. – Алма-Ата, 1981. – 18 с.
- 76 Саттаров А.И. Актуальные вопросы эпидемиологии и профилактики бруцеллёза у детей: Автореф. ... канд. мед. наук. – Алма-Ата, 1984. – 29 с.
- 77 Джалилов К.Д., Имомолиев У.Н. Бруцеллёз у детей. – Ташкент: Медицина, 1990. – 100 с.
- 78 Джалилов К.Д. Возрастные особенности клинического течения острого бруцеллёза // Медицинский журнал Узбекистана. – 1991. – №7. – С. 13-15.
- 79 Вершилова П.А. Бруцеллёз. М.: Медицина, 1968. – 240 с.
- 80 Нуралинова Г.Н. Клинико–иммунологическая характеристика бруцеллёза у детей: Автореф. ... канд. мед. наук. – 1983. – 35 с.
- 81 Дьяконова И.Н. Клиника бруцеллёза у детей. – Ташкент: Медицина, 1964. – 156 с.
- 82 Беклемишев Н.Д. Бруцеллёз в Казахстане. – Алма-Ата: Наука, 1965. – 207 с.
- 83 Дьяконова И.Н. Клиника бруцеллёза у детей и особенности его течения в различные возрастные периоды. Автореф. ... канд. мед. наук. – Ташкент. – 1959. – 18 с.
- 84 Саттаров А.И. Бруцеллёз у детей и меры его профилактики: Методические рекомендации. – Алма-Ата: Каз. НИИ эпидемиологии, микробиологии и инфекционных болезней, 1981. – 18 с.
- 85 Бисярина В.П. Эволюция и современные особенности клинической картины и лечения бруцеллёза у детей // Педиатрия. – 1991. – № 8. – С. 80-85.
- 86 Касаткина И.Л. Клиническая характеристика современного бруцеллёза в Казахстане / Бруцеллёз в Казахстане. – Алма-Ата, 1965. – С. 109-121.
- 87 Маджидов В.М. Бруцеллёз (Клиника, течение, продолжительность). Автореф. ... докт. мед. наук. – Л., 1963. – 31 с.
- 88 Саттаров А.М. Клиника бруцеллёза у детей и диспансерное наблюдение за переболевшими // Здравоохранение Казахстана. – 1980. – № 5. – С. 61-64.
- 89 Беклемишев Н.Д. Хронический и латентный бруцеллёз. – Алма-Ата: Наука, 1965. – 328 с.
- 90 Жуманбаев К.А., Джангалиев Т.Т., Срымбетов М.С. Бруцеллёз. Учебно-методические рекомендации для студентов, субординаторов, интернов. – Караганда, 1989. – 44 с.
- 91 Курманова К.Б., Цирельсон Л.Е., Нурманова М.Ш. Особенности клиники бруцеллёза у заразившихся через молоко // Актуальные проблемы инфекционной патологии. – Алматы, 1995. – С. 63-66.
- 92 Сыздыков М.С., Белозеров Е.С. и др. Патогенез, классификация, клиника и диагностика бруцеллёза: Методические рекомендации. – Алматы, 1995. – 11 с.
- 93 Цирельсон Л.Е., Сыздыков М.С., Салов В.Д. Особенности клинического течения бруцеллёза у больных с различным эпидемиологическим анамнезом // Республиканский сборник «Актуальные вопросы военной медицины». –

Алматы, 1994. – Ч. 2. – С. 88-91.

94 Курманова К.Б., Курманова М.Ш. Этиопатогенетическая терапия больных бруцеллёзом: Методические рекомендации. – Алма-Ата, 1994. – 12 с.

95 Бигимбетова Ш.Ш., Мусабеков А.А., Курмангазин М.С., Изимбергенова Т.Т. Немедикаментозные методы лечения в реабилитации больных бруцеллёзом // Сборник «Актуальные проблемы медицины и образования». – Актюбинск, 1992. – С. 22-23.

96 Сыздыков М.С., Курмангазин М.С. Магнитотерапия бруцеллёза // Сборник «Немедикаментозные методы лечения внутренних болезней». – Алматы, 1994. – С. 52-58.

97 Жуманбаев К.А. Клиника и лечение острого бруцеллёза в возрастном аспекте // Вопросы геронтологии и гериатрии. – Караганда, 1978. – С. 78-91.

98 Comparison of three different regimens in the treatment of acute brucellosis: a multicenter multinational study / G.Acoccella, A.Bertrand, J.Beytout et al. // J. Antimicrob. Chemother. – 1989. – Vol.3. – P. 433 – 439.

99 al-Sibai M.B., Halim M.A., el-Shaker M.M. et al. Efficacy of ciprofloxacin for treatment of *Brucella melitensis* infections // Antimicrob. Agents Chemother. - 1992. - V. 36. - P. 150-152.

100 Solera J., Martínez-Alfaro E., Espinosa A. Recognition and optimum treatment of brucellosis // Drugs. - 1997. - V. 53. - P. 245-56.

101 Zhang J. A study on the role of immunosuppression in the pathogenesis of brucellosis // Zhongguo Yi Xue Ke Xue Yuan Xue Bao. - 1992. - V. 14. - P. 168-172.

102 Meneses A., Epaulard O., Maurin M. et al. *Brucella* bacteremia reactivation 70 years after the primary infection // Med. Mal. Infect. - 2010. - V. 40. - P. 238-240.

103 Лебедев В.В., Тутьельян А.В. Имунофан - регуляторный пептид иммунной системы // Медицинский бизнес. - 2001.- №10.- С. 12-13.

104 Tutel'yan A.V., Klebanov G.I., Il'ina S.E., Lyubitskii O.B. Comparative study of antioxidant properties of immunoregulatory peptides // Bull. Exp. Biol. Med. - 2003 Aug. - V. 136. - P. 155-158.

105 Шаймарданов Н.К. Иммунопатогенез и терапия хронического бруцеллёза: Дисс. ... д.м.н. - 1993. - 298 с.

106 Жанкин А.А., Курманова Г.М., Курманова К.Б. Эффективность комплексной терапии хронического бруцеллёза с применением Ронколейкина // Материалы VI Российского съезда врачей-инфекционистов. - СПб, 2003. - С. 129.

107 Yingst S., Hoover D.L. T cell immunity to brucellosis // Crit. Rev. Microbiol. - 2003. - V. 29. - P. 313-331.

108 Serre A., Bascoul S., Vendrell J.P., Cannat A. Human immune response to *Brucella* infection // Ann. Inst. Pasteur Microbiol. - 1987. - V. 138. - P. 113-117.

109 Дуйсенов К.Д. Бруцеллёз: Методические рекомендации. – 1984. – 35 с.

- 110 Сыздыков М.С., Белозеров Е.С., Цирельсон Л.Е., Курманова К.Б., Амиреев С.А., Дуйсенов К.Д., Курмангазин М.С. Лечение, диспансеризация и оформление профессиональной заболеваемости бруцеллёза: Методические рекомендации. – Алматы, 1995. – 19 с.
- 111 Нурманова М.Ш. Клиническая эффективность доксициклина гидрохлорида и рифампицина при бруцеллёзе // Матер. V объединённого съезда гигиенистов, эпидемиологов, микробиологов, паразитологов и инфекционистов Казахстана. – Алма-Ата, 1991. – Т. 7. – 173 с.
- 112 Курманова К.Б., Сенсахит К., Мусабаева М.Б. Фтористые хинолоны в комплексном лечении больных бруцеллёзом // Центральное-Азиатский медицинский журнал. – 1996. – № 2-3. – С. 47-49.
- 113 Bertrand A. Antibiotic treatment of brucellosis // Presse Med. – 1994. – Vol.23, № 24. – P. 1128 – 1131.
- 114 Система выбора антибиотиков при инфекции с внутриклеточной локализацией возбудителей / Е.В. Анисимов, А.Е. Гуляев, М.В. Карлинский, Г.Я. Кивман и др. // Химико-фармацевтический журнал. – 1997. – №1. – С. 11-13.
- 115 Efficacy of ciprofloxacin for treatment of Brucella melitensis infections / M.B. Al-Sibai, M.A. Halim, M.M El-Shaker et al. // Antimicrobial Agents and Chemotherapy. – 1992. – Vol. 36, № 1. – P. 150-152.
- 116 Alton G.G., Plommet M. Brucellose: Le sommet de Geneve. Chron. ONS. – 1986. – Vol. 40, № 1. – P. 20-22.
- 117 Open randomized therapeutic trial of six antimicrobial regimens in the treatment of human brucellosis / J.M. Montego, I.Alberola, P.Glez-Zarate et al. // Clin. Infect. Dis. – 1993. – Vol. 16, № 5. – P. 671-676.
- 118 Treatment of human Brucellosis with doxycycline and gentamicin / I.Solera, A.Espinosa, E.Martinez-Alfaro et al. // Antimicrobial Agents and Chemotherapy. – 1997. – Vol. 41, № 1. – P. 80 – 84.
- 119 Муковозова Л.Е. Иммунологические факторы в патогенезе бруцеллёза // Матер.V объединённого съезда гигиенистов, эпидемиологов, микробиологов, паразитологов и инфекционистов Казахстана. – Алма-Ата, 1991. – С. 170.
- 120 Montanari M.G., Torse D.T. La terapia della brucellosi: esperienza clinica con associazione Rifampicine-Doxyciclina // Minerva Med. – 1985. – Vol. 76, № 30/31. – P. 1407-1410.
- 121 Quinolones in treatment of human Brucellosis: Comparative trial ofloxacin – rifampin versus doxycycline – rifampin / M.Akova, U.Uzum, M.E.Akalin et al. // Antimicrobial Agents and Chemotherapy. – 1993. – Vol. 29. – P. 357-363.
- 122 Нурманова М.Ш. Клиническая оценка эффективности доксициклина рифамеоприма при бруцеллёзе: Автореф. ... канд. мед. наук. – 1994. – 21 с.
- 123 Grasso E., Conversa P., Mondino P. et al. 295 cases of brucellosis treated with minocycline // Minerva Med. - 1987. - V. 78. - P. 1443-1447.

- 124 Клинико-эпидемиологические особенности бруцеллёза у подростков. Сообщение 3. Сравнительное изучение клиники в связи с выделением из молока разных биоваров бруцелл / Бекетов Б.И., Сыздыков М.С. и др. // Матер. научной конференции «Экологические аспекты эпизоотологии и эпидемиологии чумы и других особо опасных инфекций». – Алматы, 1996. – С. 9-10.
- 125 Нурманова М.Ш. Клиническая оценка эффективности доксициклина и рифаметоприма при бруцеллезе.: Дис. ... канд. мед. наук.- Алма-Ата, 1994.- 156 с.
- 126 Гусель В.А. Клиническая фармакология в педиатрии. – М.: Медицина, 1989. – 251 с.
- 127 Vashida T., Koboyaki K. Lymphokines, pharmacology modulation of their production and action // *Ret. Syst. Comp. Treat.* – 1985. – Vol. 8. – P. 97-114.
- 128 Comparative activity of azithromycin and doxycycline against brucella spp. infection in mice / S. Domingo, I. Gastearena, A.I. Vitas et al. // *I. Antimicrob. Chemother.* – 1995. - Vol. 36. – P. 647-656.
- 129 Fàbrega A., Madurga S., Giralt E., Vila J. Mechanism of action of and resistance to quinolones // *Microb. Biotechnol.* - 2009. - V. 2. - P. 40-61.
- 130 Tenover F.C. Mechanisms of antimicrobial resistance in bacteria // *Am. J. Infect. Control.* - 2006. - V. 34 (Suppl 1). - P. S3-S10.
- 131 Dalhoff A. Immunomodulatory activities of fluoroquinolones // *Infection.* - 2005. - V. 33 (Suppl. 2). - P. 55-70.
- 132 Schmitz F.J., Higgins P.G., Mayer S. et al. Activity of quinolones against gram-positive cocci: mechanisms of drug action and bacterial resistance // *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* - 2002. - V. 21. - P. 647-659.
- 133 Heo E.J., Kang S.I., Kim J.W. et al. In vitro activities of antimicrobials against *Brucella abortus* isolates from cattle in Korea during 1998-2006 // *J. Microbiol. Biotechnol.* - 2012. - V. 22. - P. 567-70.
- 134 Maves R.C., Castillo R., Guillen A. et al. Antimicrobial susceptibility of *Brucella melitensis* isolates in Peru // *Antimicrob. Agents Chemother.* - 2011. - V. 55. - P. 1279-1281.
- 135 Valdezate S., Navarro A., Medina-Pascual M.J., Carrasco G., Saéz-Nieto J.A. Molecular screening for rifampicin and fluoroquinolone resistance in a clinical population of *Brucella melitensis* // *J Antimicrob Chemother.* - 2010. - V. 65. - P. 51-53.
- 136 Brouillard J.E., Terriff C.M., Tofan A., Garrison M.W. Antibiotic selection and resistance issues with fluoroquinolones and doxycycline against bioterrorism agents // *Pharmacotherapy.* - 2006. - V. 26. - P. 3-14.
- 137 Ersoy Y., Sonmez E., Tefvik M..R, But A.D. Comparison of three different combination therapies in the treatment of human brucellosis // *Trop. Doct.* - 2005. - V. 35. - P. 210-212.
- 138 Karabay O., Sencan I., Kayas D., Sahin I. Ofloxacin plus rifampicin versus

- doxycycline plus rifampicin in the treatment of brucellosis: a randomized clinical trial [ISRCTN11871179] // BMC Infect. Dis. - 2004. - V. 4. - P. 18.
- 139 Akova M., Uzun O., Akalin H.E. et al. Quinolones in treatment of human brucellosis: comparative trial of ofloxacin-rifampin versus doxycycline-rifampin // Antimicrob. Agents Chemother. - 1993. - V. 37. - P. 1831-1834.
- 140 Курманова К.Б., Кхамфыанг С., Юдин С.М. Эффективность пefлоксацина при бруцеллёзе // Антибиотики и химиотерапия. - 1995. - Т. 40, №7. - С. 39-42.
- 141 Гуляев А.Е., Кивман Г.Я. Клеточная фармакокинетика: состояние, перспективы, прикладные значения (на примере химиотерапевтических препаратов) // Лекарственные средства: обзор. – М., 1990. – 38 с.
- 142 Наварсаян А.А., Шакарян Г.А. Влияние антибиотиков на иммунитет // Журн. эксперим. и клинич. медицины. - 1980. - Т. 255, №39.- С. 402-418.
- 143 Цирельсон Л.Е. Реакции клеточного иммунитета в оценке специфической реактивности больных бруцеллёзом: автореферат дис. ... канд. мед. наук. - М., 1982. - 23 с.
- 144 Qadri S.M., Halim M.A., Ueno Y. et al. Antibacterial activity of azithromycin against *Brucella melitensis* // Chemotherapy. - 1995. - V. 41. - P. 253-256.
- 145 Kilic S., Dizbay M., Hizel K., Arman D. In vitro synergistic activity of antibiotic combinations against *Brucella melitensis* using E-test methodology // Braz. J. Mic. - 2008. - V. 39. - P. 1-7
- 146 Zang R., Rubinstein E. Quinolones for the treatment of brucellosis. // I. Antimicrob. Chemother. –1992. –Vol. 29. – P. 357 – 363.
- 147 Ешонов О.Ш., Давронов Н.Д. Новый подход к лечению острого бруцеллёза // Материалы съезда врачей-инфекционистов. – Суздаль, М: Киров. – 1992. – С. 208-211.
- 148 Young E.J. An overview of human brucellosis // Clin. Infect. Dis. – 1995. – Vol. 21. – P. 283 – 290.
- 149 Жуманбаев К.А. Применение зимозана в комплексном лечении больных бруцеллёзом: Методические рекомендации. – Караганда, 1979. – 10 с.
- 150 Жуманбаев К.А. Пирогенал в комплексном лечении бруцеллёза: Методические рекомендации. – Караганда, 1981. – 8 с.
- 151 Касаткина И.Л. Лечение бруцеллёза // Здоровоохранение Казахстана. – 1982. – № 11. – С. 65.
- 152 Курманова К.Б. Лечение больных бруцеллёзом: Методические рекомендации. – Алма-Ата, 1985. – 26 с.
- 153 Касаткина И.Л., Беклемишев Н.Д. Патогенез поражений суставов при бруцеллёзе. – Алма-Ата: Наука, 1976. -231 с.
- 154 Вартазарян Н.Д., Кирегян М.Г. Циркулирующие антитела к тканям головного, спинного и седалищного нерва у больных бруцеллёзом // Журнал экспериментальной и клинической медицины. – 1981. – Т.21, № 4. – С. 440-

447.

155 Mandell G.L. Interaction of intraleukocytic bacteria and antibiotics // J. Clin. Invest. – 1973. – V. 52. – P. 1673-1679.

156 Кашкин К.П., Караев З.О. Иммунная реактивность организма и антибиотическая терапия. – Л.: Медицина, 1984. – 200 с.

157 Antibacterial activity of azithromycin against *Brucella melitensis* / S.M. Quadri, M.A. Halim, Y. Ueno et al. // Chemotherapy (Basel). – 1995. – V. 41. P. 253-256.

158 Kreuter J. Colloidal Drug Delivery Systems. – New York: Marcel Dekker, Inc., 1994. – 352 p.

159 Наночастицы как вектор направленного транспорта антибиотиков (обзор) / А.Е. Гуляев, Б.А. Ермекбаев, Г.Я. Кивман и др. // Химико-фармацевтический журнал. – 1998. – Т. 32, №3. – С. 3-6.

160 Кинетика и химиотерапевтическая активность некоторых антибиотиков, ассоциированных с наночастицами / С.А. Абдрахманов, С.Т. Байсагатов, А.Ю. Шерстов и др. // Астана медициналык журналы. – 1999. - №4. – С. 84-88.

161 Hiemenz J.W., Walsh T.J. Lipid formulations of amphotericin B: recent progress and future directions // Clinical Infectious Diseases. – 1996. –V. 22, Suppl. 2. – P. S133-S144.

162 Liposomal nystatin against experimental pulmonary aspergillosis in persistently neutrogenic rabbits: efficacy, safety, and non-compartmental pharmacokinetics / A.H. Groll. C.E. Gonzalez, N. Giri et al. // J. Antimicrob. Chemother. – 1999. – V. 43. – P. 95-103.

163 Грачёва Н.М., Щетинина И.Н. Клиническая химиотерапия инфекционных болезней. – 3-е издание, перераб. и доп. – Л.: Медицина, 1991. – 256 с.

164 Tetracycline group in children: Second Meeting of the Subcommittee of the Expert Committee on the Selection and Use of Essential Medicines Geneva, 29 September to 3 October 2008. - WHO, Geneva. - 8 p.

165 Chloramphenicol treatment for vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* bacteremia / J.C. Ricaurte, H.W. Boucher, G.S. Turett et al. // Clin. Microbiol. Infect. – 2001. – V. 7. - №1. – P. 17-21.

166 Гусель В.А., Маркова И.В. Справочник педиатра по клинической фармакологии. – Л.: Медицина, 1989. – 320 с.

167 Рахимов К.Д., Нургожин Т.С., Жаугашева С.К. Актуальные вопросы применения лекарств во врачебной практике. – Алматы, 1999. – 224 с.

168 Либов А.Л. Ошибки и опасности при лечении инфекционных болезней у детей. – Л.: Медицина, 1966. – 156 с.

169 Применение спирамицина при лечении воспалительных заболеваний дыхательных путей у детей в амбулаторных условиях / Е.Н. Оциянс, М.Ф.Рзянкина, В.Г.Дьяченко и др. // Антибиотики и химиотерапия. – 1998. –

Т. 43, №11. – С. 34-37.

170 Increased sheep lung vascular permeability caused by *Pseudomonas* bacteremia / K.L. Brigham, W.C. Woolverton, L.A. Blake et al. // J. Clin. Invest. – 1974. – V. 54. – P. 792-804.

171 Bouvier d'Yvoire M.J., Dresco I.A., Tulkens P.M. Computer-aided prediction of macrolide antibiotic concentrations in human circulating polymorphonuclear leukocytes // J. Antimicrob. Chemother. – 1998. – V. 41, Suppl. B. – P. 63-68.

172 Charles L., Segreti J. Choosing the right macrolide antibiotic. A guide to selection // Drugs. – 1997. – V. 53, №3. – P. 349-357.

173 Навашин С.М. макро- и микроорганизм – взаимодействие в инфекционном процессе при антибактериальной терапии // Антибиотики и химиотерапия. – 1998. – Т. 43, №11. – С. 3-5.

174 Dietz A., Hubner C., Andrassy K. macrolide antibiotic-induced vasculities (Churg-Strauss syndrome) // Laryngorhinootologie. – 1998. – Bd. 72, №2. – S. 111-114.

175 Meguro H., Terashima I. Clinical evaluation of a new macrolide antibiotic, azythromycin, in the pediatric field // Jpn. J. Antibiot. – 1997. – V. 50, №3. – P. 265-271.

176 Clinical study of a macrolide antibiotic, azythromycin, in pediatric patients / Y. Kobayashi, M. Kino, H. Higashino et al. // Jpn. J. Antibiot. – 1996. – V. 49, №11. – P. 1004-1012.

177 Гусарская И.Л., Тимофеева Г.А. Клиника и лечение дизентерии у детей. – Л.: Медицина, 1979. – 208 с.

178 Talan D.A. Clinical perspectives on New Antimicrobials: Focus on Fluoroquinolones // Clin. Infect. Dis. – 2001. – V. 32, Suppl. 1. – P. S64-S71.

179 Падейская Е.Н. Фторхинолоны: значение, развитие исследований, новые препараты, дискуссионные вопросы // Антибиотики и химиотерапия. – 1998. – Т. 43, №11. – С. 38-44.

180 Белобородова Н.В., Падейская Е.Н., Бирюков А.В. Фторхинолоны в педиатрии – за и против // Педиатрия. – 1996. - №2. – С. 76-83.

181 Modai J. High-dose intravenous fluoroquinolones in the treatment of severe infections // J. Chemother. – 1999. – V. 11, №6. – P. 478-485.

182 Levofloxacin in the empirical treatment of patients with suspected bacteraemia/sepsis: comparison with imipenem/cilastatin in an open, randomized trial // J. Antimicrob. Chemother. – 1999. – V. 44, №6. – P. 799-810.

183 Pharmacokinetics and absolute bioavailability of ciprofloxacin administered through a nasogastric tube with continuous enteral feeding to critically ill patients / O. Mimoz, V. Binter, A. Jacolot et al. // Intensive Care Medicine. – 1998. – V. 24, №10. – P. 1047-1050.

184 Quinolone accumulation by *Pseudomonas aeruginosa*, *staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* // J. Antimicrob. Chemother. – 1999. – V. 43, №1. – P.

61-70.

185 Levofloxacin penetrates human monocytes and enhances intracellular killing of staphylococcus aureus and Pseudomonas aeruginosa / R.P. Smith, A.L. Baltch, M.A. Franke et al. // J. Antimicrob. Chemother. – 2000. – V. 45, №4. – P. 483-488.

186 Comparative antimycobacterial activities of ofloxacin, ciprofloxacin and grepafloxacin / S. Vacher, J.L. Pellegrin, F. Leblanc et al. // J. Antimicrob. Chemother. – 1999. – V. 44, №5. – P. 647-652.

187 Jaffe A., Bush A. If you can't stand the rush, get out of the kitchen: an unusual adverse reaction of ciprofloxacin // Pediatr. Pulmonol. – 1999. – V. 28, №6. – P. 449-450.

188 Fluoroquinolones in treatment of nosocomial meningitis in neonates and in infants: report of 12 cases and review / V. Krcmery Jr, J. Filka, J. Uher et al. // Diagn. Microbiol. Infect. Dis. – 1999. – V. 35, №1. – P. 75-80.

189 Successful treatment of late-onset infection due to resistant Klebsiella pneumoniae in an extremely low birth weight infant using ciprofloxacin / M. Khaneja, J. Naprawa, A. Kumar, S. Piecuch // J. Perinatol. – 1999. – V. 19, №4. – P. 311-314.

190 Clinical and Laboratory Standards Institute. M100-S19-MIC. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. - Wayne, PA, 2009. - V. 29 (19th international supplement).

191 Shevtsova E., Shevtsov A., Mukanov K. et al. Epidemiology of brucellosis and genetic diversity of Brucella abortus in Kazakhstan // PLoS One. - 2016. - V. 11, №12. - e0167496.

192 Bayram Y., Korkoca H., Aypak C. et al. Antimicrobial susceptibilities of Brucella isolates from various clinical specimens // Int J Med Sci. - 2011. - V. 8, №3. - P. 198–202.

193 Castaneda M. R. A practical method for routine blood cultures in brucellosis // Proc Soc Exp Biol Med. - 1947. - V. 64, №1. - P. 114.

194 Yagupsky P. Detection of Brucellae in blood cultures // J Clin Microbiol. - 1999. - V. 37, №11. - P. 3437–3442.

195 Lopez-Goni I., Garcia-Yoldi D., Marin C.M. et al. Evaluation of a multiplex PCR assay (Bruce-ladder) for molecular typing of all Brucella species, including the vaccine strains // J Clin Microbiol. - 2008. - V. 46, №10. - P. 3484-3487.

196 Jorgensen J.H., Hindler J.A., Bernard K. Methods of antimicrobial dilution and disk susceptibility testing of infrequently isolated or fastidious bacteria // Approved guidelines - second edition, vol. 30. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standard Institute; 2010.

197 CLSI. Performance standard for antimicrobial susceptibility testing: twentyfourth informational supplement. CLSI document M100-S24, vol. 34. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standard Institute; 2014.