

Дравица Л.В., Тапальский Д.В., Бойцова Н.Ю., Бiryukov Ф.И., Самохвалова Н.М.
Гомельский государственный медицинский университет, Гомель, Беларусь

Dravitsa L., Tapalski D., Baitsova N., Biryukov F., Samokhvalova N.
Gomel State Medical University, Gomel, Belarus

Антибактериальная активность фторхинолонов II–III поколений, применяемых в офтальмологии

Antibacterial activity of second- and third-generation
fluoroquinolones used in ophthalmology

Резюме

Цель исследования: определение выраженности и скорости наступления бактерицидного эффекта офтальмологических фторхинолонов II–III поколений.

Материалы и методы: в исследование были включены офтальмологические фторхинолоны II–III поколений различных производителей: Ципрофлоксацин 0,3%; Левофлоксацин 0,5% (оба – Белмедпрепараты, Республика Беларусь); Левофлоксацин 0,5% (Офтаквикс; Santen, Финляндия); Офлоксацин 0,3% (Флоксал; Др. Герхард Манн, Германия). Для определения минимальных ингибирующих концентраций (МИК) в качестве тест-культур использовали суточные культуры *S. aureus* штаммов ATCC 25923, 775 и ATCC 35559 и *P. aeruginosa* ATCC 27853, выращенные на плотной питательной среде.

Результаты: МИК исследованных препаратов в отношении тест-культур находились в диапазоне 0,125–1,0 мкг/мл. Для тест-культур из коллекции ATCC значения МИК исследованных препаратов, полученные в эксперименте, соответствовали значениям МИК соответствующих фторхинолонов, приведенным в паспортах этих культур. Гибель бактерий, как результат воздействия фторхинолонов, напрямую зависела от концентрации препарата.

Выводы: с учетом наибольшей микробиологической активности, а также с учетом того, что офтальмологические препараты фторхинолонов III поколения (левофлоксацин) выпускаются с большей концентрацией активного вещества (5 мг/мл), их применение для лечения инфекций наружного отдела глаза, вызванных стафилококками, может быть более целесообразным.

Ключевые слова: фторхинолоны, ципрофлоксацин, офлоксацин, левофлоксацин, антибактериальная активность.

Resume

Aim: To assess the intensity and speed of bactericidal action of ophthalmic second- and third-generation fluoroquinolones.

Materials and methods: Ophthalmic second- and third-generation fluoroquinolones by different manufacturers ciprofloxacin 0.3%, Levofloxacin 0.5% (both – Belmedpreparaty, Belarus),

Levofloxacin 0.5% (Oftraquix; Santen, Finland), and Ofloxacin 0.3% (Floxal; Dr. Gerhard Mann, Germany) were included in present study. Minimum inhibitory concentrations (MICs) were determined by using *S. aureus* ATCC 25923, 775, ATCC 35559, and *P. aeruginosa* ATCC 27853 test strains on solid media.

Results: MICs of investigated ophthalmic fluoroquinolones against test strains ranged from 0.125 to 1.0 µg/ml. For ATCC test strains, determined MICs of investigated ophthalmic fluoroquinolones corresponded to those indicated in the passports of respective strains. Speed of bactericidal action was directly correlated with the fluoroquinolone concentration.

Conclusions: Taking into account the greatest antibacterial activity and the biggest concentration of active ingredient in ophthalmic solution, usage of third-generation fluoroquinolones (levofloxacin 5 mg/ml) for the treatment of external eye infections caused by staphylococci might be more advisable.

Keywords: fluoroquinolones, ciprofloxacin, ofloxacin, levofloxacin, antibacterial activity.

■ ВВЕДЕНИЕ

Бактериальные конъюнктивиты считаются одной из самых распространенных форм глазных инфекционных заболеваний во всем мире (среди общего числа больных с воспалительными заболеваниями глаз 66,7% составляют больные с конъюнктивитами) [4]. Частая встречаемость конъюнктивитов инфекционного происхождения объясняется обилием бактериальной флоры в конъюнктивальной полости. При тщательном бактериологическом исследовании клинически здоровой конъюнктивы человека из конъюнктивальной полости может быть выделено более 60 микробных форм. Наиболее часто выявляется палочка ксероза, реже – стафилококки, значительно реже – пневмококки. Большинство микроорганизмов, содержащихся в норме в конъюнктивальном мешке, являются непатогенными. Однако на конъюнктиве встречаются и патогенные виды микроорганизмов [3].

Наиболее частыми возбудителями бактериальных конъюнктивитов являются грамположительные бактерии: коагулазонегативные стафилококки (*S. epidermidis* и др.), *S. aureus*, *S. pneumoniae*, а также грамотрицательные *H. influenzae* и *Ps. aeruginosa*. Они же выступают и в качестве наиболее частых возбудителей послеоперационных эндофтальмитов [2].

Для лечения инфекционных заболеваний конъюнктивы, век и слезных органов применяют антибактериальные препараты широкого спектра действия. Наиболее эффективными в лечении данной патологии в настоящее время признаны препараты фторхинолонового ряда. Фторхинолоны – антибактериальные препараты, известные в офтальмологии с начала 1990-х гг., доказав свою эффективность в лечении и профилактике глазных инфекций, постоянно совершенствуются. К хинолонам второго поколения относятся: цiproфлоксацин, офлоксацин, норфлоксацин, омаксин и др. В результате различных модификаций были разработаны препараты широкого спектра действия, эффективные как против грамотрицательных, так и против грамположительных бактерий.

Из препаратов третьего поколения в офтальмологии широко известен и используется левофлоксацин (Офтаквикс; Santen). В настоящее время фторхинолоны применяют для лечения инфекционных заболеваний конъюнктивы, век и слезных органов [1].

Мишенью фторхинолонов являются бактериальные ферменты ДНК-гираза – тетрамер, состоящий из двух А и двух В полипептидных субъединиц, и топоизомераза IV – тетрамер, состоящий из двух С и двух Е субъединиц. Эти ферменты отвечают за репликацию, генетическую рекомбинацию и восстановление ДНК. Фторхинолоны блокируют данные ферменты и таким образом нарушают воспроизводство бактериальной ДНК [6,10]. У грамотрицательных бактерий, таких как *Ps. aeruginosa*, *E. coli* и *N. gonorrhoeae* первой мишенью является ДНК-гираза, второй – топоизомераза IV, а у грамположительных, таких как *S. aureus* и *S. pneumoniae* – первой мишенью является топоизомераза IV, второй – ДНК-гираза [11].

Фторхинолоны, предшествующие левофлоксацину, имеют низкое сродство к топоизомеразе IV. Возможно, этим объясняется недостаточная активность цiproфлоксацина и офлоксацина в отношении стафилококков и стрептококков и относительно быстрый рост резистентности к ним [2, 7, 8, 11].

Бактерицидная активность фторхинолонов второго поколения, цiproфлоксацина и офлоксацина, в отношении грамотрицательных бактерий сравнима с таковой у левофлоксацина. Однако, согласно данным литературы, левофлоксацин оказывается более эффективным против атипичных возбудителей бактериальных инфекций глаза и некоторых грамположительных бактерий [5, 7, 9].

Левофлоксацин обладает очень высокой растворимостью в воде при нейтральном уровне pH (в 10 раз большей, чем офлоксацин и в 400 раз большей, чем цiproфлоксацин) [12] и, следовательно, может изготавливаться в офтальмологических лекарственных формах в более высоких концентрациях, чем другие фторхинолоны.

Длительное применение фторхинолонов (как и всех антимикробных препаратов) может приводить к росту количества резистентных микроорганизмов. Резистентность бактерий к фторхинолонам развивается относительно медленно. После прекращения применения препарата мутировавшие и ставшие антибиотикоустойчивыми бактерии через определенное время могут вновь приобрести чувствительность к нему.

■ ЦЕЛЬ ИССЛЕДОВАНИЯ

Определить выраженность и скорость наступления бактерицидного эффекта офтальмологических препаратов фторхинолонов II–III поколений.

■ МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В исследование были включены офтальмологические препараты фторхинолонов II–III поколений различных производителей: Цiproфлоксацин 0,3% (Белмедпрепараты); Левофлоксацин 0,5% (Белмедпрепараты); Левофлоксацин 0,5% (Офтаквикс; Santen, Финляндия); Офлоксацин 0,3% (Флоксал; Др. Герхард Манн, Германия).

Согласно литературным данным при сравнении офтальмологических антибактериальных препаратов самый низкий уровень устойчивости микроорганизмов обнаруживается по отношению к левофлоксацину, за которым следует офлоксацин, а затем цiproфлоксацин [2, 8].

Для определения минимальных ингибирующих концентраций (МИК) фторхинолонов в качестве тест-культур использовали суточные культуры *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 (антибиотикочувствительный, из Американской коллекции типовых культур микроорганизмов), *S. aureus* 775 (антибиотикочувствительный, клинический изолят), *S. aureus* ATCC 35559 (метициллин-резистентный – MRSA, из Американской коллекции типовых культур микроорганизмов), *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 (антибиотикочувствительный, из Американской коллекции типовых культур микроорганизмов), выращенные на плотной питательной среде.

Из указанных выше препаратов готовили двукратные серийные разведения в бульоне Mueller Hinton (BBL, США) в диапазоне концентраций от 0,064 мкг/мл до 64 мкг/мл. Тестирование проводили в объеме 2 мл в лунках 24-луночных полистироловых планшетов (Sarstedt, Германия). В качестве контроля использовали бульон Mueller Hinton без антибиотика. Готовили суспензии тест-культур в стерильном изотоническом растворе хлорида натрия с оптической плотностью 0,5 МакФарланд ($1,5 \times 10^8$ клеток/мл). В контрольные и опытные пробирки вносили бактериальную суспензию до конечной концентрации 10^5 клеток/мл. Планшеты инкубировали во влажной камере при температуре 37 °С в течение 18 ч. После инкубации проводили визуальный учет результатов с определением МИК.

При определении дозозависимой бактерицидной активности фторхинолонов в качестве тест-культуры использовали штамм *P. aeruginosa* ATCC 27853 (антибиотикочувствительный, из Американской коллекции типовых культур микроорганизмов). Из суточной культуры готовили суспензию с оптической плотностью 0,5 МакФарланд ($1,5 \times 10^8$ клеток/мл). В стеклянных пробирках в 10 мл бульона Mueller Hinton готовили разведения антибактериальных препаратов в 4 концентрациях: 0,5 мкг/мл, 2 мкг/мл, 8 мкг/мл и 32 мкг/мл, после чего вносили бактериальную суспензию *P. aeruginosa* ATCC 27853 до конечной концентрации 10^6 клеток/мл. Инкубацию проводили с постоянным низкоамплитудным встряхиванием в шейкере-инкубаторе при температуре 37 °С в течение 5 ч. После каждого часа инкубации (контрольные точки 1 ч, 2 ч, 3 ч, 4 ч и 5 ч) для определения концентрации жизнеспособных микроорганизмов из пробирок забирали по 0,1 мл раствора и готовили 10-кратные серийные разведения в бульоне Mueller Hinton от 10^{-1} до 10^{-8} в ячейках 96-луночных плоскодонных полистироловых планшетов. Планшеты инкубировали во влажной камере при температуре 37 °С в течение 24 ч, после чего по наличию или отсутствию роста в отдельных ячейках рассчитывали исходную концентрацию жизнеспособных бактерий в пробирках и строили кинетические кривые роста/отмирания.

■ РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

МИК исследуемых препаратов в отношении тест-культур находились в диапазоне 0,125–1,0 мкг/мл. Среди включенных в исследование тест-культур отсутствовали микроорганизмы, обладающие устойчивостью к фторированным хинолонам. Результаты определения МИК представлены в таблице.

Минимальные ингибирующие концентрации офтальмологических препаратов фторированных хинолонов

Исследуемые микроорганизмы	Ципрофлоксацин (Белмедпрепараты)	Офлоксацин (Флоксал; Др. Герхард Мани, Германия)	Левифлоксацин (Белмедпрепараты)	Левифлоксацин (Офтавикс; Santen, Финляндия)
	МИК, мкг/мл			
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	0,5	0,5	0,5	0,25
<i>S. aureus</i> 775 (ДАРМИС)	1	1	0,5	0,5
<i>S. aureus</i> ATCC 35559	0,25	0,5	0,25	0,25
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	0,125	1	0,5	0,5

Для референсных тест-культур из коллекции ATCC значения МИК исследовавшихся фторхинолонов, полученные в эксперименте, соответствовали значениям МИК ципрофлоксацина, офлоксацина и левофлоксацина, приведенным в паспортах культур. Таким образом, косвенно можно сделать заключение о соответствии имеющихся концентраций антибактериальных препаратов в готовых лекарственных формах концентрациям заявленным производителями.

Минимальное значение МИК (0,125 мкг/мл) было выявлено для ципрофлоксацина в отношении *P. aeruginosa* ATCC 27853, что полностью соответствует литературным данным о спектре и активности фторированных хинолонов в отношении грамотрицательных неферментирующих бактерий [4]. В отношении тест-культур стафилококков наибольшую активность проявляли препараты фторхинолонов III поколения (левофлоксацин (Белмедпрепараты) и Офтавикс (Santen)). С учетом этого обстоятельства, а также с учетом того, что данные препараты выпускаются с большей концентрацией активного вещества (0,5%), их применение для лечения инфекций наружного отдела глаза, вызванных стафилококками, может быть более целесообразным.

Влияние фторхинолонов на скорость роста – отмирания *Pseudomonas aeruginosa*

Тест-культура *P. aeruginosa* является удобной моделью для изучения дозозависимой бактерицидности антибактериальных препаратов, так как характеризуется высокой скоростью размножения при неэффективности антибиотика либо высокой скоростью гибели в присутствии антибактериальных препаратов, действующих бактерицидно.

Кривые роста – отмирания *P. aeruginosa* в присутствии исследовавшихся фторхинолонов в четырех различных концентрациях представлены на рис. 1–4.

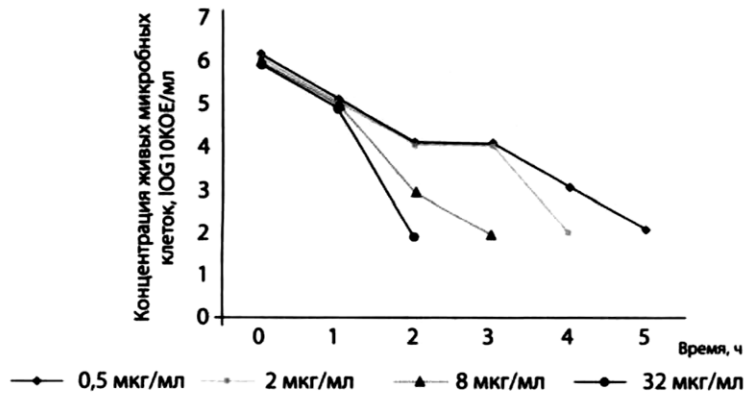


Рис. 1. Кривые роста – отмирания *P. aeruginosa* в присутствии Ципрофлоксацина 0,3% (Белмедпрепараты)

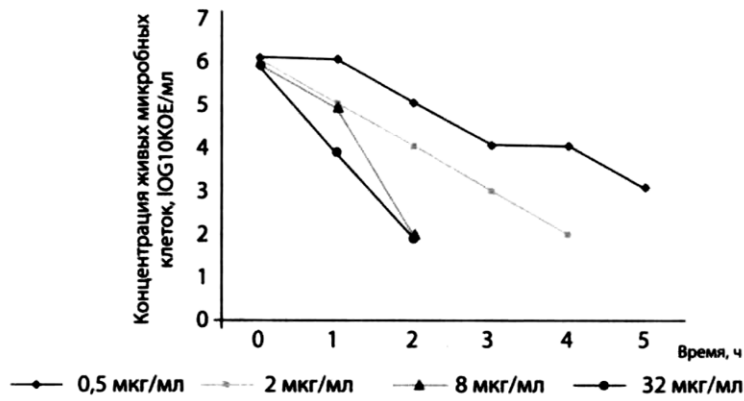


Рис. 2. Кривые роста – отмирания *P. aeruginosa* в присутствии Левофлоксацина 0,5% (Белмедпрепараты)

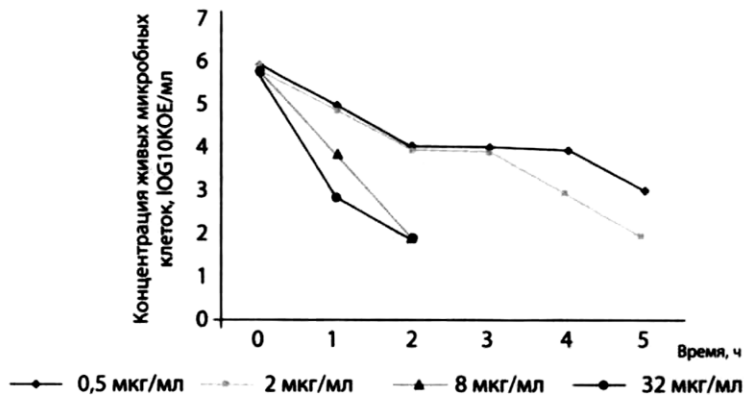


Рис. 3. Кривые роста – отмирания *P. aeruginosa* в присутствии Левофлоксацина 0,5% (Офтаквикс; Santen)

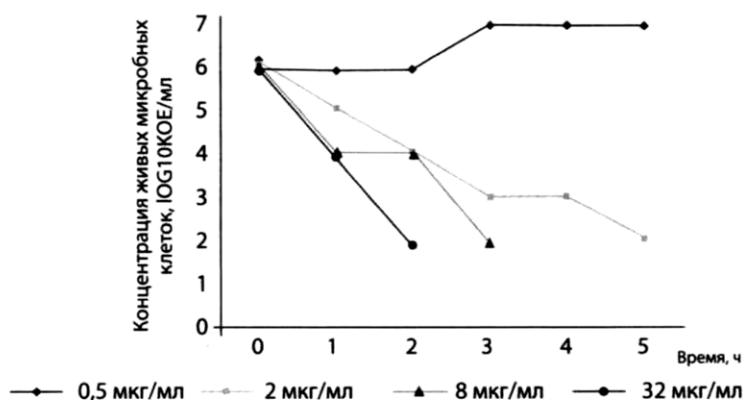


Рис. 4. Кривые роста – отмирания *P. aeruginosa* в присутствии Офлоксацина 0,3% (Флоксал; Др. Герхард Манн)

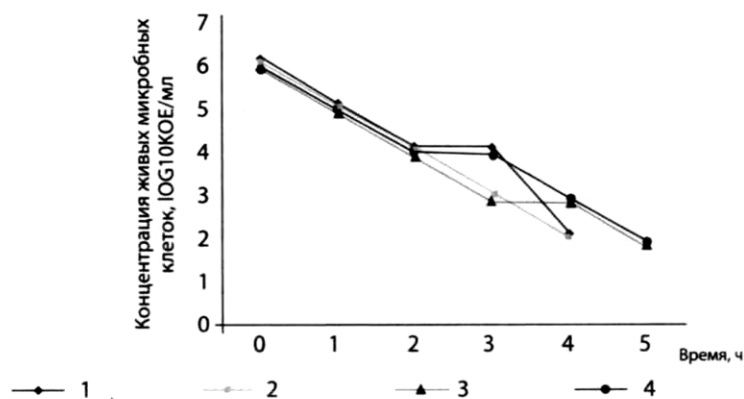


Рис. 5. Кривые роста – отмирания *P. aeruginosa* в присутствии исследуемых фторхинолонов в концентрации 4xМИК: 1 – Ципрофлоксацин 0,3% (Белмедпрепараты), 2 – Офлоксацин 0,3% (Флоксал; Др. Герхард Манн), 3 – Левофлоксацин 0,5% (Белмедпрепараты), 4 – Левофлоксацин 0,5% (Офтаквикс; Santen)

Для всех сравниваемых препаратов было выявлено, что выраженность бактерицидного эффекта и скорость отмирания микроорганизмов находится в прямой зависимости от концентрации антибактериального препарата в растворе. Концентрации фторхинолонов 8 мкг/мл и 32 мкг/мл приводили к сокращению количества колониеобразующих единиц тест-культуры *in vitro* ниже определяемого уровня (10^2 КОЕ/мл) в течение 2–3 ч. Таким образом, можно предположить, что имеющиеся в составе исследовавшихся лекарственных форм концентрации фторхинолонов (3000 мкг/мл или 5000 мкг/мл) позволят достичь бактерицидного эффекта в отношении чувствительных к фторхинолонам штаммов *P. aeruginosa* и других грамотрицательных микроорганизмов даже при их кратковременном местном применении.

На рис. 5 объединены данные по скорости отмирания тест-культуры *P. aeruginosa* ATCC 27853 в присутствии исследуемых фторхинолонов в концентрации, в 4 раза превышающей МИК (4×МИК).

Из приведенного на рис. 5 графика следует, что при стандартизации концентраций различных препаратов относительно их минимальных ингибирующих концентраций определяются близкие кинетические профили, что может свидетельствовать об однотипности механизма действия фторированных хинолонов различных поколений.

■ ЗАКЛЮЧЕНИЕ

1. Минимальные ингибирующие концентрации исследованных препаратов в отношении тест-культур находились в диапазоне 0,125–1,0 мкг/мл. Для тест-культур из коллекции ATCC значения МИК исследованных фторхинолонов, полученные в эксперименте, соответствовали значениям МИК ципрофлоксацина, офлоксацина и левофлоксацина, приведенным в паспортах этих культур. Таким образом, можно сделать заключение о соответствии концентраций исследованных антибактериальных препаратов в готовых лекарственных формах концентрациям, заявленным производителями.
2. Гибель бактерий, как результат воздействия фторхинолонов, напрямую зависит от концентрации препарата. Чем выше концентрация – тем быстрее гибнут микроорганизмы. С учетом наибольшей микробиологической активности, а также с учетом того, что офтальмологические препараты фторхинолонов III поколения (левофлоксацин) выпускаются с большей концентрацией активного вещества (0,5%), их применение для лечения глазных инфекций, в частности, инфекций наружного отдела глаза, вызванных стафилококками, может быть более целесообразным.
3. При стандартизации концентраций различных препаратов относительно их минимальных ингибирующих концентраций определялись близкие кинетические профили, что может свидетельствовать об однотипности механизма действия фторированных хинолонов различных поколений.
4. Несмотря на важность микробиологических исследований и целесообразность определения чувствительности микрофлоры к антибиотикам, подавляющему большинству больных с конъюнктивитами лечение в виде местных антибактериальных препаратов назначается эмпирически. При бактериальных конъюнктивитах можно рекомендовать начинать лечение именно с применения фторхинолонов, которые обладают широким спектром действия и, как правило, хорошо переносятся больными.

■ ЛИТЕРАТУРА

1. Астахов, С.Ю., Вохмяков, А.В. Офтальмологические фторхинолоны в лечении и профилактике глазных инфекций (Обзор литературы) // Клиническая офтальмология. – 2008. – Т. 9, № 1. – С. 28–30.

2. Околов, И.Н., Гурченко, П.А., Вохмяков, А.В. Резистентность коагулазонегативных стафилококков, выделенных у больных с конъюнктивитами и послеоперационными эндофтальмитами к антибактериальным препаратам // Рецепт. VII Съезд офтальмологов Республики Беларусь. – Минск, 23–24 ноября 2007. – С. 452–457.
3. Офтальмология: учебник / Т.А. Бирич, Л.Н. Марченко, А.Ю. Чекина. – Мн. : Выш. шк., 2007. – С. 207–208.
4. Практическое руководство по антимикробной химиотерапии / Под ред. Л.С. Страчунского, Ю.Б. Белоусова, С.Н. Козлова. – 266 с.
5. Davis, R., Bryson, H.M. Levofloxacin: a review of its antibacterial activity, Pharmacokinetics and therapeutic efficacy // *Drugs*. – 1994. – Vol. 47. – P. 677–700.
6. Drlica, K. Mechanism of fluoroquinolone action // *Curr. Opin. Microbiol.* – 1999. – Vol. 2. – P. 504–508.
7. Graves, A., Henry, M., O'Brien et al. In vitro susceptibilities of bacterial ocular isolates to fluoroquinolones // *Cornea*. – 2001. – Vol. 20, № 3. – P. 301–305.
8. Goldstein, M.H., Kowalski, R.P., Gordon, Y.J. Emerging fluoroquinolone resistance in bacterial keratitis: a 5-year review // *Ophthalmology*. – 1999. – Vol. 106, № 7. – P. 1313–1318.
9. North, D.S., Fish, D.N., Redington, J.J. Levofloxacin, a second-generation fluoroquinolone // *Pharmacotherapy*. – 1998. – Vol. 18. – P. 915–935.
10. Ogawa, G.S., Hyndiuk, R.A. The fluoroquinolones: New antibiotics in ophthalmology // *Int. Ophthalmol. Clin.* – 1993. – Vol. 33. – P. 59–68.
11. Pan, X.S., Fisher, L.M. Cloning and characterization of the parC and parE genes of *Streptococcus pneumoniae* encoding DNA topoisomerase IV: role in fluoroquinolone resistance // *J. Bacteriol.* – 1996. – Vol. 178. – P. 4060–4069.
12. Ross, D.L., Riley, C.M. Aqueous solubilities of some quinolone antimicrobials // *Int. J. Pharmacol.* – 1990. – Vol. 63. – P. 237–250.

Поступила в редакцию 29.10.2014
Контакты: Dravitsa_LV@mail.ru