

Микробиологическая оценка фторхинолонов II и III поколений для профилактики и лечения инфекционных осложнений хирургических операций

А.О.Зуева, В.И.Чувилкин, М.С.Подпорин, А.А.Лабазанов, А.М.Панин, В.Н.Царёв

ФГБОУ ВО «Московский государственный медико-стоматологический университет имени А.И.Евдокимова», Москва, Российская Федерация

Исследовали влияние различных концентраций фторхинолонов на представителей анаэробной микрофлоры. Для этой цели был выбран приоритетный патоген *Prevotella intermedia*. Антибактериальную активность фторхинолонов (ципрофлоксацин и левофлоксацин) оценивали в образцах крови через 1 и 3 ч культивирования в биореакторе. Установлено, что кривая роста на средах с добавленной сывороткой крови в присутствии ципрофлоксацина за 3 ч была примерно в 2 раза ниже, чем через 1 ч (OD 2,0–2,5), хотя полного торможения роста бактериальной популяции не наблюдалось. В случае применения левофлоксацина через 3 ч отмечено полное отсутствие роста бактерий (такое же, как через 1 ч), то есть имел место бактерицидный эффект.

Вывод. Результаты автоматического контроля роста бактериальной популяции в биореакторах показали, что левофлоксацин обладает бактерицидным эффектом после 1 и 3 ч культивирования. Ципрофлоксацин имел бактериостатический эффект в те же периоды времени наблюдения. Экспериментальные результаты подтверждают высокую бактерицидную активность и быстрое достижение минимальной подавляющей концентрации (МПК) левофлоксацина уже через 1 ч после введения.

Ключевые слова: фторхинолоны, автоматическое культивирование, биореактор, *Prevotella intermedia*

Для цитирования: Зуева А.О., Чувилкин В.И., Подпорин М.С., Лабазанов А.А., Панин А.М., Царёв В.Н. Микробиологическая оценка фторхинолонов II и III поколений для профилактики и лечения инфекционных осложнений хирургических операций. Бактериология. 2017; 2(4): 50–54. DOI: 10.20953/2500-1027-2017-4-50-54

Microbiological evaluation of II and III generation quinolones in prevention and treatment of inflammatory complication in oral surgery

A.O.Zueva, V.I.Chuvilkin, M.S.Podporin, A.A.Labazanov, A.M.Panin, V.N.Tsarev

Moscow State University of Medicine and Dentistry named A.I.Yevdokimov, Moscow, Russian Federation

The effect of various concentrations of fluoroquinolones on representatives of anaerobic microbiota has been studied. Prioritized pathogen *Prevotella intermedia* was chosen for this purpose. Antibacterial activity of fluoroquinolones (ciprofloxacin and levofloxacin) was evaluated in blood samples after 1 and 3 hours of cultivation in a bioreactor. It was found that the growth curve on media with added serum in the presence of ciprofloxacin after 3 hours was approximately 2 times lower than after 1 hour cultivation (OD 2.0–2.5), although no complete inhibition of growth of the bacterial population was observed. In the presence of levofloxacin after 3 hours cultivation, there was a complete absence of bacterial growth (same as after 1 h), there was a bactericidal effect.

Conclusion. The results of automatic control of bacterial population growth in bioreactors showed that levofloxacin has a bactericidal effect after 1 and 3 hours of cultivation. Ciprofloxacin had a bacteriostatic effect at the same time of observation. The experimental results confirm the high bactericidal activity and the rapid achievement of the minimum inhibitory concentration (MIC) of levofloxacin already after 1 h after administration.

Keywords: fluoroquinolones, automatic cultivation, bioreactor, *Prevotella intermedia*

For citation: Zueva A.O., Chuvilkin V.I., Podporin M.S., Labazanov A.A., Panin A.M., Tsarev V.N. Microbiological evaluation of II and III generation quinolones in prevention and treatment of inflammatory complication in oral surgery. Bacteriology. 2017; 2(4): 50–54. (In Russian). DOI:10.20953/2500-1027-2017-4-50-54

Для корреспонденции:

Царёв Виктор Николаевич, доктор медицинских наук, профессор, директор Научно-исследовательского медико-стоматологического института, заведующий кафедрой микробиологии, вирусологии, иммунологии ФГБОУ ВО «Московский государственный медико-стоматологический университет имени А.И.Евдокимова»

Адрес: 123425, Москва, ул. Деlegatesкая, 20/1
E-mail: nikola777@rambler.ru

Статья поступила 05.11.2017 г., принята к печати 22.12.2017 г.

For correspondence:

Viktor N. Tsarev, MD, PhD, DSc, professor, director of Research Institute of Medicine and Dentistry, head of department by microbiology, virology and immunology of Moscow State University of Medicine and Dentistry named A.I.Yevdokimov

Address: 20/1, Delegateskaya str., Moscow, 123425, Russian Federation
E-mail: nikola777@rambler.ru

The article was received 05.11.2017, accepted for publication 22.12.2017

Для уменьшения риска развития инфекционных осложнений после хирургических операций в челюстно-лицевой хирургии и хирургической стоматологии используют различные методы, включая применение антибактериальных препаратов, антисептиков, физических воздействий (фотодинамическую терапию, лазер, ультразвук, медицинский озон и др.) [1–4]. В современной литературе данные об особенностях антибиотикотерапии и антибиотикопрфилактики у пациентов при проведении амбулаторных хирургических операций в стоматологии малочисленны и ограничены, как правило, использованием бета-лактамов препаратов [5–8].

Учитывая нередкие случаи аллергических реакций, явлений индивидуальной непереносимости препарата, развития дисбактериоза при использовании традиционных бета-лактамов препаратов, а также увеличение числа резистентных штаммов бактерий, актуальной задачей по-прежнему остается поиск новых эффективных антибактериальных средств для лечения и профилактики инфекционно-воспалительных процессов при проведении хирургических вмешательств [1, 3, 8, 9].

С другой стороны, актуальным является изучение свойств отдельных представителей приоритетных патогенов с оценкой их чувствительности к антибактериальным препаратам. К патогенам – наиболее вероятным возбудителям инфекционно-воспалительных процессов в стоматологической практике относят целый ряд микроорганизмов, прежде всего, анаэробной группы: *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *Tannerella forsythia* и ряд других видов. Большой интерес представляет вид *Prevotella intermedia*. Данный вид представлен неподвижными грамотрицательными облигатно анаэробными палочками. *Prevotella intermedia* обладает набором факторов вирулентности, таких как поверхностные адгезины, протеазы, гемолизины, липополисахариды клеточной мембраны. В экспериментах *in vitro* данный вид вызывает развитие абсцесса при подкожном введении взвеси бактерий экспериментальным животным, что свидетельствует о его очевидной патогенности [9]. Некоторые штаммы данного вида обладают способностью к инвазии эпителиоцитов и внутриклеточному паразитированию в них [6].

Данный вид считается истинным пародонтопатогеном, вызывая, наряду с другими пародонтопатогенными бактериями, поражение тканей пародонта и являясь этиологическим фактором развития пародонтита [3, 6, 9]. Обладая рядом факторов вирулентности, способен поражать ткани пародонта, наряду с другими бактериями. Данный микроорганизм часто обнаруживают при ряде одонтогенных инфекционно-воспалительных заболеваний, таких как инфекция тканей, окружающих имплантат, перикоронорит при ретенции 3-го моляра, флегмоны и абсцессы челюстно-лицевой области, медиастинит [6–8].

В связи с этим целью исследования были изучение чувствительности клинических изолятов *Prevotella intermedia* и других потенциальных возбудителей инфекционно-воспалительных осложнений к антибактериальным препаратам группы фторхинолонов *in vitro*, а также проведение сравнительной оценки активности антибактериальных препаратов группы фторхинолонов в сыворотке крови при ав-

томатизированном контроле роста бактериальной популяции приоритетного патогена *Prevotella intermedia* в реальном времени.

Материалы и методы

Первичный посев для выделения облигатных и факультативных анаэробов осуществляли на питательную среду M144 (Himedia, In.) с добавлением крови (для культивирования грамотрицательных анаэробных и грамположительных микроаэрофильных бактерий) и M1297A (Himedia, In.). Посевы помещали в термостат при 37°C на 48 ч (для анаэробных культур – в анаэроостат на 7 сут).

После получения и идентификации чистых культур в экспериментальной части использовали биореактор «Реверс-Спиннер RTS-1» (BioSan, Латвия). Данная система предназначена для культивирования микроорганизмов и оценки их роста в режиме реального времени. Интерпретацию результатов проводили по изменению оптической плотности OD при длине волны $\lambda = 850$ нм [4]. Для культивирования микроорганизмов в биореакторе использовались жидкие питательные среды производства HiMedia Laboratories Pvt. Limited (In.): Wilkins Chalgren Anaerobic Broth (M863) – для культивирования *Prevotella intermedia*. Для получения воспроизводимых результатов для биореактора использовали пробирки для анаэробов на 50 мл типа Falcon с крышкой без мембраны (BioSan, Латвия).

Для каждого эксперимента отдельно в стерильных пробирках типа Eppendorf готовили бактериальную взвесь в объеме 5 мл. Далее в каждую пробирку добавляли 18 мл питательной среды и вносили заранее подготовленную бактериальную взвесь в количестве 0,5 мл из заранее подготовленной пробирки, а затем сыворотку крови пациентов, принимавших левофлоксацин или ципрофлоксацин соответственно, – 1,5 мл. Общий объем в каждой пробирке довели до 20 мл. Соответственно концентрация взвеси до начала эксперимента составляла 10^2 КОЕ/мл, что соответствовало оптической плотности OD 0,2 McF.

Для культивирования *Prevotella intermedia* использовали следующий режим биореактора: Temperature: 37°C; RPM: 1200 min⁻¹; Measurement freq.: 3 h⁻¹; Rev. Spin period: 1 sec; Volume: 20 ml λ : 850 nm.

Результаты и обсуждение

Для оценки активности антибактериальных препаратов группы фторхинолонов в сыворотке крови использовали биореактор при автоматизированном контроле роста бактериальной популяции приоритетного патогена *Prevotella intermedia* в реальном времени. Исследование динамики роста микроорганизмов проводили в четырех параллелях, что отражалось на графиках кривых роста бактериальных популяций контрольного образца. Оценка контроля роста исследуемого вида бактерий *Prevotella intermedia* отражалась в изменении параметров оптической плотности, на основании которых была построена кривая. Все основные фазы роста микроорганизмов (адаптивная, экспоненциального или логарифмического роста, стационарная), а также скорость прироста бактериальных популяций были индивиду-

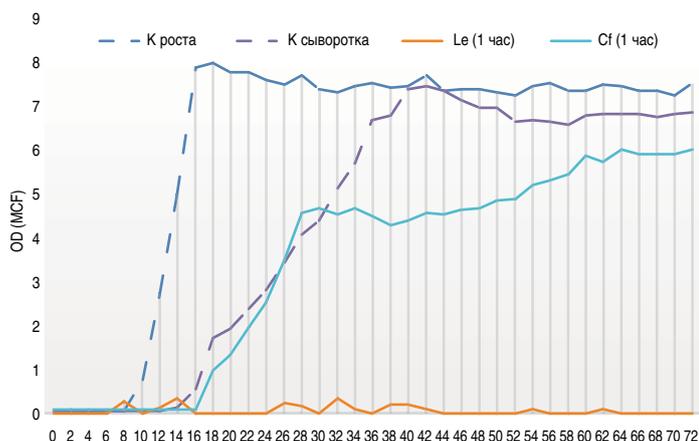


Рис. 1. Сравнительная характеристика кривых роста бактериальной популяции *Prevotella intermedia* при приеме ципрофлоксацина и левофлоксацина (через 1 ч после приема рекомендуемых доз).

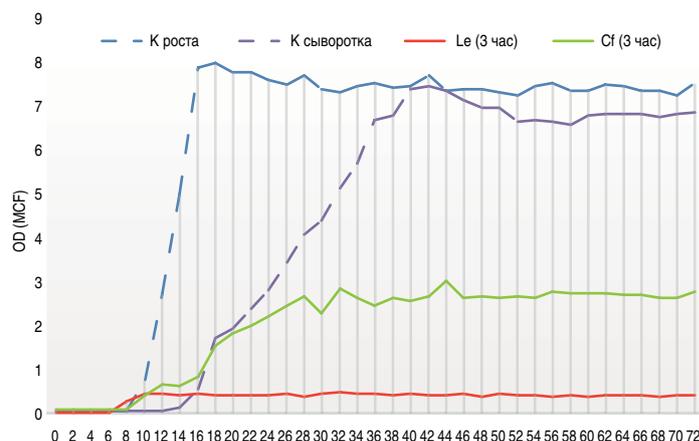


Рис. 2. Сравнительная характеристика кривых роста бактериальной популяции *Prevotella intermedia* при приеме ципрофлоксацина и левофлоксацина (через 3 ч после приема рекомендуемых доз).

дуальны и отражены для исследуемого штамма микроорганизма. Общее время культивирования для всех образцов составило 72 ч.

При оценке кривых роста бактериальных популяций клинического изолята *Prevotella intermedia* в зависимости от используемых антибактериальных препаратов и времени, прошедшего после однократного приема рекомендуемой дозы, получены следующие данные (рис. 1–3).

В пробе I (контроль) наблюдали типичный рост бактериальной популяции *Prevotella intermedia* (рис. 1). Начальная фаза, или фаза адаптации, составляла 8 ч, после чего ускоренный рост переходил в экспоненциальную фазу и кривая стремительно достигала максимума к 16-му часу, после чего наблюдалась длительная фаза стационарного роста на уровне 7,5 OD.

В пробе II (с добавлением донорской сыворотки) наблюдалось удлинение начальной фазы до 15 ч, после чего, с явным отставанием от контроля, численность бактериальной популяции постепенно нарастала, и фаза экспоненциального роста продолжалась до 40 ч, то есть скорость прироста бактериальной популяции под действием бактерицидных фак-

торов сыворотки снизилась. Однако стационарная фаза с максимумом биомассы бактериальной популяции далее находилась на том же уровне, что и в контроле (7,5–7,0 OD) вплоть до 72 ч культивирования.

В пробе III с добавлением сыворотки крови, взятой через 1 ч у пациента, принявшего ципрофлоксацин (500 мг), начальная фаза также была затяжной с крайне малым приростом бактериальной популяции, а фаза экспоненциального роста продолжалась до 28-го часа и достигала максимума 4,5 OD, что было достоверно ниже, чем в предыдущих пробах. Стационарная фаза также отличалась более низкой амплитудой с максимумом 5,0–6,0 OD, что указывает на бактериостатический эффект данной концентрации ципрофлоксацина (той, которая создавалась в сыворотке крови через 1 ч после приема препарата в дозе 200 мг), так как полной гибели бактериальной популяции не происходило.

В пробе IV с добавлением сыворотки крови, взятой через 1 ч у пациента, принявшего левофлоксацин (750 мг), начальная фаза и все последующие фазы кривой роста достоверно не отличались от нулевой линии, то есть рост бактери-

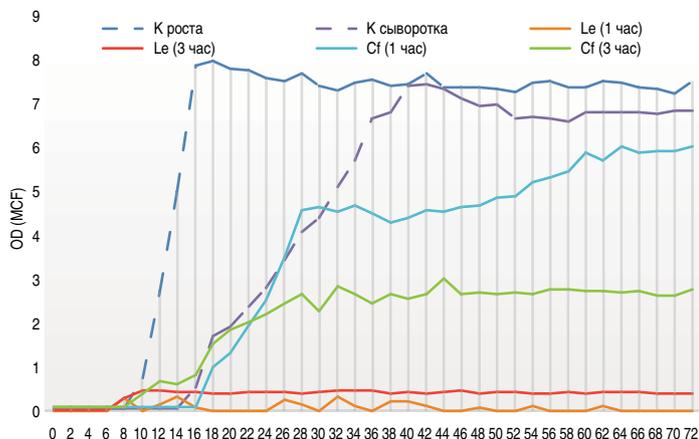


Рис. 3. Сравнительная характеристика кривых роста бактериальной популяции *Prevotella intermedia* при приеме ципрофлоксацина и левофлоксацина (через 1 и 3 ч после приема рекомендуемых доз).

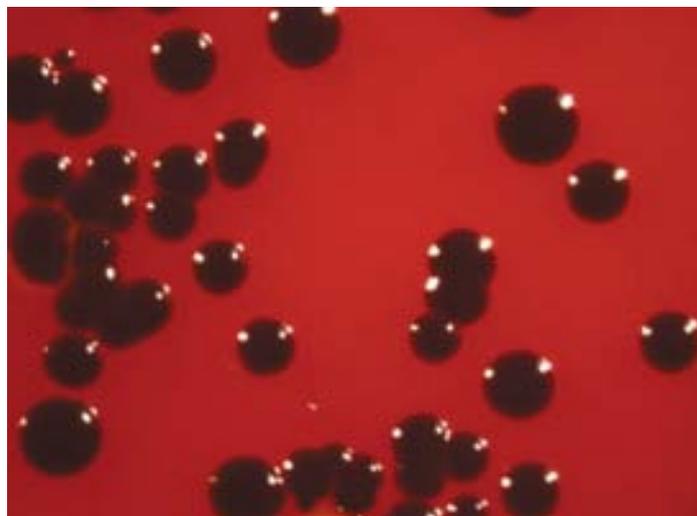


Рис. 4. Колонии *Prevotella intermedia*. 5% кровяной гемин-агар.

Таблица. Результаты количественного учета жизнеспособных клеток штамма *Prevotella intermedia* в разных пробах, взятых после культивирования в биореакторе (КОЕ/мл)

Время с момента приема до взятия сыворотки крови	Пробы в биореакторе			
	контроль среды 10 ⁸ (±10 ²)	контроль сыворотки 10 ⁷ (±10 ²) P ₃₂ > 0,05	после приема препаратов	
			ципрофлоксацин	левофлоксацин
1 ч	–	–	10 ⁶ (±10 ²) P ₄₂ < 0,05	0
3 ч	–	–	10 ³ (±10 ²) P ₄₂ < 0,05	0

альной популяции отсутствовал на протяжении всего периода наблюдения – 72 ч.

Следовательно, через 1 ч после приема левофлоксацина в дозе 750 мг в сыворотке создавалась концентрация, обеспечивающая бактерицидный эффект.

На рис. 2 отображены кривые роста контрольных проб (пробирки I и II), которые соответствуют описанным выше, и кривые роста, полученные при добавлении сыворотки, взятой через 3 ч у пациентов после приема исследуемых химиопрепаратов (пробирки V и VI).

Очевидно, что амплитуда кривой роста при использовании ципрофлоксацина через 3 ч была примерно в 2 раза ниже, чем при использовании через 1 ч (OD 2,0–2,5), хотя полной гибели бактериальной популяции не наблюдалось. То есть ципрофлоксацин и в этом случае давал бактериостатический эффект.

Что касается пробы с левофлоксацином через 3 ч, то, как и в предыдущей пробе (через 1 ч), мы наблюдали отсутствие роста бактериальной популяции – бактерицидный эффект.

На рис. 3 отчетливо видны различия антибактериальной активности сравниваемых химиопрепаратов, которые подтверждают высокую бактерицидную активность и быстрое накопление МПК левофлоксацина уже через 1 ч после приема пациентом.

При высевах из проб в биореакторе на 5% кровяной гемин-агар с последующим культивированием в анаэробной среде с бескислородной газовой смесью (80% азота, 10% углекислого газа, 10% водорода) для выявления жизнеспособных бактерий *Prevotella intermedia* получен типичный рост колоний данного вида – пигментированные, выпуклые, блестящие, округлые, 0,5–2 мм в диаметре, S-формы (рис. 4). Содержание бактерий в посевах питательной среды в контроле составило 10⁸ (±10²) КОЕ/мл, при добавлении сыворотки крови несколько ниже – 10⁷ (±10²) КОЕ/мл, однако различия по критерию Манна-Уитни были не достоверны.

При использовании сыворотки крови, взятой у добровольцев через 1 ч после однократного приема ципрофлоксацина (таблетированная форма 400 мг), наблюдали достоверное снижение количества бактерий по сравнению с контролем – 10⁶ (±10²) КОЕ/мл. При использовании сыворотки крови, взятой у тех же добровольцев через 3 ч после однократного приема препарата, наблюдали дальнейшее снижение количества колоний по сравнению с контролем – 10³ (±10²) КОЕ/мл. В случае выполнения аналогичного исследования с образцами, в которые добавляли сыворотку крови, взятую у добровольцев через 1 и 3 ч после приема левофлоксацина (таблетированная форма 750 мг), ни

в одном случае роста колоний возбудителя не было выявлено (таблица).

Заключение

Результаты изучения чувствительности клинического изолята облигатно-анаэробных бактерий *Prevotella intermedia* свидетельствуют, что препарат левофлоксацин эффективно подавляет рост бактериальных видов потенциальных возбудителей инфекционно-воспалительных процессов, возникающих в клинике хирургической стоматологии. При проведении автоматизированного контроля роста бактериальной популяции в реальном времени с добавлением сыворотки крови пациентов-добровольцев после приема антибактериальных препаратов группы фторхинолонов установлены достоверные различия антибактериальной активности препаратов фторхинолонового ряда в отношении приоритетного патогена – *Prevotella intermedia*; левофлоксацин оказывал бактерицидное действие через 1 ч и 3 ч после перорального приема, ципрофлоксацин – только бактериостатическое, которое было более выражено через 3 ч после приема препарата. Данное обстоятельство позволяет обосновать использование препарата левофлоксацин в дозировке 750 мг не только в терапии инфекционно-воспалительных процессов полости рта, но при назначении за 1 ч до оперативного вмешательства в качестве антибактериальной профилактики.

Литература

- Ипполитов ЕВ, Царев ВН. Хинолоны и фторхинолоны. В кн.: Под ред. Ющука НД, Балмасовой ИП, Царева ВН. Антибиотики и противоинфекционный иммунитет. М.: Практическая медицина, 2012, с. 208-221.
- Лепилин АВ, Райгородский ЮМ, Григорьева ДА, Ерокина НЛ, Касьян ИА, Абрашитова ФБ. Сравнительное исследование бактерицидных свойств лазерного и светодиодного излучения фиолетовой области (405 нм) спектра на бактерии полости рта. Физиотерапия, бальнеология и реабилитация. 2016;15(4):202-6.
- Панин АМ, Царев ВН, Чувилкин ВИ, Зуева АО. Профилактика воспалительных осложнений при костнопластических операциях. Российский вестник дентальной имплантологии. 2013;1(27):50-3.
- Царёв ВН, Подпорин МС, Ипполитов ЕВ. Оценка эффективности эндодонтической дезинфекции корневых каналов зуба с применением сканирующей электронной микроскопии микробной биопленки. Бактериология. 2017;1(2):6-13.
- Chuvilkina E, Zueva A, Chuvilkin V, Panin A, Tsarev V. Do fluoroquinolones prevent sinusitis in maxillary antroplasty for implant surgery? International Dental Journal. 2017;1(67):20-1.
- Brian R. Dorn, K.-P. Leung, and Ann Progulsk-Fox* Editor: J. R. McGhee. Invasion of Human Oral Epithelial Cells by *Prevotella intermedia*. Infection and immunity. 1998; 66(12): 6054-7.
- Hupp JR, Ferneini EM. Head, neck, and orofacial infections. An interdisciplinary approach. Netherlands: Elsevier; 2016: 482 p.
- Kuriyama T, Karasawa T, Nakagawa K, Saiki Y, Yamamoto E, Nakamura S. Bacteriologic features and antimicrobial susceptibility in isolates from orofacial odontogenic infections. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 2000;90(5):600-8. DOI: 10.1067/moe.2000.109639
- Chow AW, Roser SM, Brady FA. Orofacial odontogenic infections. Ann Intern Med. 1978 Mar;88(3):392-402.

References

1. Ippolitov EV, Tsarev VN. Khinolony i ftorkhinolony. In: Editet by Yushchuk ND, Balmasovoy IP, Tsareva VN. Antibiotics and anti-infectious immunity. Moscow: "Practical medicine" Publ., 2012, pp. 208-221. (In Russian).
2. Lepilin AV, Raigorodsky YuM, Grigor'eva DA, Erokina NL, Kas'yan IA, Abdrashitova AS. The comparative study of the bactericidal properties of laser and photodiode radiation in the violet region of the spectrum (405 nm) on the bacteria of the mouth cavity. *Fizioterapiya, Bal'neologiya i Reabilitatsiya*. 2016;15(4):202-6. (In Russian).
3. Panin AM, Tsarev VN, Chuvilkin VI, Zueva AO. Prevention of inflammatory complications in osteoplastic operations. *Russian Herald of Dental Implantology*. 2013;1(27):50-3. (In Russian).
4. Tsarev VN, Podporin MS, Ippolitov EV. Evaluating the effectiveness of endodontic disinfection root channels by using scanning electron microscopy of microbial biofilms. *Bacteriology*. 2017;1(2):6-13. (In Russian).
5. Chuvilkina E, Zueva A, Chuvilkin V, Panin A, Tsarev V. Do fluoroquinolones prevent sinusitis in maxillary antroplasty for implant surgery? *International Dental Journal*. 2017;1(67):20-1.
6. Brian R. Dorn, K.-P. Leung, and Ann Progulsk-Fox* Editor: J. R. McGhee. Invasion of Human Oral Epithelial Cells by *Prevotella intermedia*. *Infection and immunity*. 1998; 66(12): 6054-7.
7. Hupp JR, Ferneini EM. Head, neck, and orofacial infections. An interdisciplinary approach. Netherlands: Elsevier; 2016: 482 p.
8. Kuriyama T, Karasawa T, Nakagawa K, Saiki Y, Yamamoto E, Nakamura S. Bacteriologic features and antimicrobial susceptibility in isolates from orofacial odontogenic infections. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2000;90(5):600-8. DOI: 10.1067/moe.2000.109639
9. Chow AW, Roser SM, Brady FA. Orofacial odontogenic infections. *Ann Intern Med*. 1978 Mar;88(3):392-402.

Информация об авторах:

Зуева Анна Олеговна, кандидат медицинских наук, ассистент кафедры хирургической стоматологии ГБОУ ВПО «Московский государственный медико-стоматологический университет им. А.И.Евдокимова»
 Адрес: 123425, Москва, ул. Делегатская, 20/1
 E-mail: zuevazueva2012@mail.ru

Чувилкин Владимир Иванович, доктор медицинских наук, профессор кафедры хирургической стоматологии ГБОУ ВПО «Московский государственный медико-стоматологический университет им. А.И.Евдокимова»
 Адрес: 123425, Москва, ул. Делегатская, 20/1
 E-mail: microbiology@mail.ru

Подпорин Михаил Сергеевич, младший научный сотрудник лаборатории молекулярно-биологических исследований Научно-исследовательского медико-стоматологического института ГБОУ ВПО «Московский государственный медико-стоматологический университет им. А.И.Евдокимова»
 Адрес: 123425, Москва, ул. Делегатская, 20/1
 E-mail: podporin.mikhail@yandex.ru

Панин Андрей Михайлович, доктор медицинских наук, профессор, заведующий кафедрой хирургической стоматологии ГБОУ ВПО «Московский государственный медико-стоматологический университет им. А.И.Евдокимова»
 Адрес: 123425, Москва, ул. Делегатская, 20/1
 E-mail: andreypanin@yandex.ru

Information about co-authors:

Anna O. Zueva, MD, PhD, assistant professor, department of oral surgery, Moscow State University of Medicine and Dentistry named A.I.Yevdokimov
 Address: 20/1 Delegatskaya Str., Moscow, 123425, Russian Federation
 E-mail: zuevazueva2012@mail.ru

Vladimir I. Chuvilkin, MD, PhD, DSc, professor, department of oral surgery, Moscow State University of Medicine and Dentistry named A.I.Yevdokimov
 Address: 20/1 Delegatskaya Str., Moscow, 123425, Russian Federation
 E-mail: microbiology@mail.ru

Mikhail S. Podporin, junior reserch associate, laboratory of Molecular biology investigation, Research Institute of Medicine and Dentistry of Moscow State University of Medicine and Dentistry named A.I.Yevdokimov
 Address: 20/1, ul. Delegatskaya, Moscow, 123425, Russian Federation
 E-mail: podporin.mikhail@yandex.ru

Andrey M. Panin, MD, PhD, DSc, professor, head of department of oral surgery, Moscow State University of Medicine and Dentistry named A.I.Yevdokimov
 Address: 20/1, ul. Delegatskaya, Moscow, 123425, Russian Federation
 E-mail: andreypanin@yandex.ru