

ПЕДИАТРИЯ

УДК 616-08-039.73

*М. В. Эрман, О. В. Рыбальченко, О. Г. Орлова,
Т. М. Первунина, Л. В. Кирюхина*

КЛИНИЧЕСКИЙ ЭФФЕКТ АНТИМИКРОБНОЙ ТЕРАПИИ МОЧЕВОЙ ИНФЕКЦИИ У ДЕТЕЙ

Инфекционный процесс мочевой системы (ИПМС) является одной из наиболее распространенных патологий детского возраста и занимает по частоте второе место после заболеваний респираторного тракта. Показатель ИПМС у детей Санкт-Петербурга в 2010 г. составил 7,1 на 1000 детей [1]. Аналогичные цифры заболеваемости приводит Р. Н. Conwayetal — 8,1 на 1000 детей [2]. В последние десятилетия отмечают неуклонный рост ИПМС у детей, причем среднегодовой темп прироста составляет 6,1% [3]. Наиболее значительный рост ИПМС отмечается у детей первого года жизни — за последние 5 лет он увеличился на 23% [4]. При проведении независимой экспертизы качества медицинской помощи при острых инфекциях мочевыводящих путей в поликлиниках Санкт-Петербурга в 92% случаев ведение пациентов было признано ненадлежащим [5, 6]. Анализ качества лечения инфекции мочевой системы у 780 детей первого года жизни штата Вашингтон (США) (всего родились за изучаемый период 38985 детей) показал, что только у 51% пациентов была проведена адекватная антибактериальная терапия [7]. От 5 до 25% случаев ИПМС осложняются рубцовыми изменениями в почках [8]. Отмечена коррелятивная связь между назначением пролонгированной бесконтрольной антибактериальной терапии и развитием нефросклероза [9]. Однако раннее начало антибактериальной терапии (в первые семь дней дебюта заболевания) позволило уменьшить микробное

Эрман Михаил Владимирович — доктор медицинских наук, профессор, заведующий кафедрой педиатрии медицинского факультета, Санкт-Петербургский государственный университет, главный детский нефролог СПб; e-mail: erman_mv@hotmail.ru

Рыбальченко Оксана Владимировна — доктор биологических наук, профессор, руководитель курса микробиологии, вирусологии и иммунологии, Санкт-Петербургский государственный университет; e-mail: ovr@inbox.ru

Орлова О. Г. — кандидат биологических наук, старший преподаватель, Санкт-Петербургский государственный университет; e-mail: oorlova18@mail.ru

Первунина Т. М. — кандидат медицинских наук, доцент, Санкт-Петербургский государственный университет; e-mail: pervunina_tm@hotmail.ru

Кирюхина Л. В. — кандидат медицинских наук, ассистент, Санкт-Петербургский государственный университет; e-mail: kiryukhina_lv@inbox.ru

© М. В. Эрман, О. В. Рыбальченко, О. Г. Орлова, Т. М. Первунина, Л. В. Кирюхина, 2013

поражение интерстиция и предотвратить развитие нефросклероза: 21% — пациенты с рефлюкс-нефропатией, получавшие нерегулярную антибактериальную терапию, и только 1% — получавшие своевременную и адекватную терапию [10]. Показано, что даже сам по себе ИПМС может являться одним из факторов задержки роста почки [11]. В то же время назначение антимикробных препаратов в детском возрасте существенно отличается от проведения терапии взрослых пациентов. До достижения 15-летнего возраста не назначают фторхинолоны, активно используемые терапевтами [12]. Назначение некоторых этиотропных препаратов ограничено из-за развития у возбудителей заболеваний резистентности, например, к ко-тримоксозолу [13]. В Санкт-Петербурге разработан и внедрен в медицинскую практику «Формуляр антибактериальных препаратов для лечения осложненной и неосложненной инфекции мочевой системы у детей» [14]. Препаратами выбора являются полусинтетические ингибитор-защищенные аминопенициллины, цефалоспорины II-го поколения, фурамаг и препарат из растительного сырья — канефрон. Рекомендации об использовании вышеперечисленных препаратов при лечении ИПМС приведены в ряде руководств [15–17].

Сложности в лечении ИПМС связаны еще и с тем, что при развитии инфекционного процесса бактериальные возбудители образуют так называемые биопленки на поверхности слизистых оболочек мочевыводящей системы [18].

Такие биопленки характеризуются большей плотностью популяции, высокой физиологической активностью составляющих ее особей и высокой колонизационной резистентностью по отношению к факторам иммунной защиты, неблагоприятным воздействиям и действию этиотропных препаратов [19, 20].

Цель исследования — изучение эффективности использования 2-х защищенных ингибиторами бета-лактамазэтиотропных препаратов: флемоклав солютаб и аугментин в терапии инфекции мочевой системы у детей.

Материалы и методы. В исследованиях использовали защищенные ингибиторами бета-лактамаз синтетические аминопенициллины: флемоклав солютаб и аугментин. Флемоклав солютаб представляет собой препарат в инновационной лекарственной форме (амоксициллин / клавулановая кислота), аугментин является аналогом, также содержащим амоксициллин / клавулановую кислоту.

Защищенными клавулановой кислотой аминопенициллинами проведено лечение 50 детей с ИПМС, рандомизированных на две группы: 25 детей — флемоклав солютаб (1-я группа) и 25 детей — аугментин (2-я группа), находившихся на лечении в нефрологическом отделении ГУЗ детской городской больницы № 2 святой Марии Магдалины (университетская клиника СПбГУ). Возраст детей составлял от 4 месяцев до 17 лет, причем 13 детей были в возрасте до 1 года; средний возраст — $7,72 \pm 2,03$ года. Среди пациентов преобладали девочки (соотношение девочек и мальчиков 4,5:1). В работе проводили разделение ИПМС на: неосложненную инфекцию мочевой системы (анатомически и функционально нормальный мочевой тракт) и осложненную инфекцию мочевой системы (анатомически и функционально измененный мочевой тракт — везико-ренальный рефлюкс; пороки развития; хронический цистит и др.) [21]. Неосложненная инфекция мочевой системы была у 9 детей, осложненная инфекция — у 41 ребенка.

Отбор детей в группы наблюдения осуществляли методом случайной выборки. Критерии назначения ингибитор-защищенных аминопенициллинов: верифициро-

ванная инфекция мочевой системы с клиническими и лабораторными показателями активности; отсутствие назначений полусинтетических защищенных пенициллинов в течение последнего года. Длительность лечения — 7 суток. Другие антибактериальные препараты-уросептики не назначали.

Всех больных подвергали тщательному клиническому и лабораторному обследованию перед началом и после окончания курса лечения. Оценивали: клиническую симптоматику, клинический анализ мочи в динамике (до назначения, на 4-й, 8-й и 15-й день после назначения); посев мочи в динамике (до назначения, 8-й день после назначения); клинический анализ крови. Выявление и оценку возможных нежелательных лекарственных реакций проводили по историям болезни и опросу матерей.

In vitro воздействие антимикробных препаратов на рост бактериальных биопленок изучали на примере грамотрицательных (*Escherichia coli* 132) и грамположительных (*Staphylococcus aureus* 234) микроорганизмов из коллекции штаммов, выделенных от пациентов с ИПМС. Электронно-микроскопическое исследование влияния антимикробных препаратов проводили на модели биопленок, разработанной при выращивании бактерий на мясо-пептонном агаре [22]. Ультраструктурные изменения в клетках и в архитектонике бактериальных биопленок, подвергнутых воздействию аугментина, исследовали двумя различными методами трансмиссионной электронной микроскопии (ТЭМ): методом позитивного окрашивания 0,1%-ным водным раствором уранилацетата и методом ультратонких срезов. Препараты просматривали в трансмиссионном электронном микроскопе JEM 100C (JEOL, Япония) при ускоряющем напряжении 100 кВ [22, 23].

Статистическую обработку полученных результатов осуществляли на персональном компьютере Intel Pentium III и проводили с применением стандартных пакетов программ прикладного статистического анализа (Microsoft Excel, Statistica for Windows v.7.0). Проверку количественных признаков на нормальность распределения осуществляли с использованием критерия Шапиро—Уилка. Проверку гипотезы о равенстве дисперсий проводили с помощью критерия Левена. Сравнение количественных признаков, удовлетворяющих условиям нормального распределения и равенству дисперсий, проводили с помощью *t*-критерия Стьюдента. Для сравнения количественных признаков, не удовлетворяющих условиям нормального распределения или равенству дисперсий, использовали критерий Вилкоксона—Манна—Уитни. Сравнительный анализ качественных переменных проводили с помощью критерия Хи-квадрат и точного двустороннего критерия Фишера. Различия в показателях и исходах считали достоверными при значении $p < 0,05$.

Результаты. Бактериурия. До начала терапии 52% пациентов 1-й группы и 56% 2-й группы имели диагностически значимую бактериурию ($>10^6$ КОЕ в 1 мл мочи), полученные результаты соответствовали данным исследований других авторов [15]. Микробный спектр при ИПМС, в основном, был представлен: *Escherichia coli* — 61%, *Staphylococcus aureus* — 15%, *Enterococcus* — 12%, *Klebsiella pneumoniae* — 8%, *Morganella morganii* — 4%. При высевах клинического материала часто обнаруживали бактериальную микст инфекцию.

Отчетливое клиническое улучшение течения мочевой инфекции в ходе терапии ингибитор-защищенными пенициллинами обеих групп отмечено у всех пациентов. К 3-им суткам нормализовалась температура у всех 8-ми пациентов, которые имели

гипертермию выше 37,8°C до начала терапии. После завершения терапии (8-е сут) ни у одного пациента не было жалоб и экстраренальных симптомов. Мочевой синдром до лечения был представлен: лейкоцитурией различной степени у всех пациентов; протеинурией от следовой до 0,7 г/л (1 группа — 48%; 2 группа — 40%); диагностически значимой бактериурией (1 группа — 52%; 2 группа — 56%).

Лейкоцитурия. Через 3 дня анализы нормализовались у 7 детей 1-й группы и 10 детей 2-й группы ($p < 0,01$). На 8-й день анализ мочи нормализовался у 17 детей 1-й группы; у 3 больных количество лейкоцитов в поле зрения не превышало 20, а у 5 — 10 лейкоцитов ($p < 0,001$). У всех детей, получавших аугментин, лейкоцитурия к 8-му дню не определялась ($p < 0,001$). После завершения терапии эффект лечения не только сохранялся, но и проявлялся в виде дальнейшего затихания воспалительных изменений. Через неделю после отмены флемоклав солютаба нормальный анализ мочи имели уже 23 пациента (92%), а у 2-х детей отмечали только микролейкоцитурию — 7–10 лейкоцитов в поле зрения ($p < 0,0001$). После отмены аугментина нормальный анализ мочи сохранялся у всех пациентов ($p < 0,0001$).

Протеинурия. При исследовании мочи перед началом терапии протеинурию различной степени выявляли у 22-х детей 1-й группы (следовую — у 10 и различной степени — у 12 (0,112±0,044 г/л)) и у 20-ти детей 2-й группы (следовую — у 9 и различной степени — у 11 (0,121±0,039 г/л)). Через 4 дня в 1-й группе протеинурию определяли у 15 детей: следовую — у 5 и различной степени — у 10 (0,049±0,021 г/л), а 40% порций мочи были свободными от белка. Во 2-й группе протеинурия сохранялась у 11 детей: следовая — у 6-ти и различной степени — у 5-ти (0,054±0,018 г/л), а 56% порций мочи были свободными от белка ($p < 0,01$). По завершении терапии протеинурия выявлена у 10 детей 1-й группы (следовая — 9 и у 1 пациента — 0,066 г/л) и 5 детей 2-й группы (следовая — 4 и у 1 пациента — 0,099 г/л). Протеинурия при неосложненной инфекции может иметь экстраренальный характер, а при осложненной инфекции обусловлена тубулярными нарушениями. При дальнейшем прогрессировании заболевания протеинурию связывают с развитием фокально-сегментарного гломерулосклероза. В указанном выше наблюдении характер протеинурии имел экстраренальный и тубулярный характер.

Бактериурия. Все контрольные посевы мочи пациентов, имевших бактериурию до назначения препарата, после завершения лечения флемоклав солютабом и аугментином либо не содержали бактерий, либо имели их в титре значительно ниже диагностического ($p < 0,001$).

Полученные результаты определили интерес к проведению электронно-микроскопического исследования антимикробного воздействия аугментина на бактериальные биопленки, образованные клетками клинических уропатогенных штаммов *Escherichia coli* 132 и *Staphylococcus aureus* 234.

Подавление биопленкообразования грамотрицательных бактерий клинического штамма *E. coli* 132. Действие аугментина на биопленки, сформированные клетками *E. coli*, сопровождалось выраженными деструктивными изменениями практически всех клеток исследуемых микробных популяций (рис. 1). Ультраструктурные нарушения, вызванные воздействием аугментина, достаточно четко различимы при сравнении с интактными биопленками кишечной палочки (рис. 2). На электронограммах биопленок после обработки аугментином выявлен практически полный лизис всех клеток кишечных палочек, а также образующиеся в результате

этого воздействия фрагменты цитоплазматических мембран и клеточных стенок с агрегатами белково-рибосомального комплекса. Необходимо подчеркнуть, что при полной деструкции клеток в биопленках целостность поверхностных пленок на них сохранялась неизменной (рис. 1).

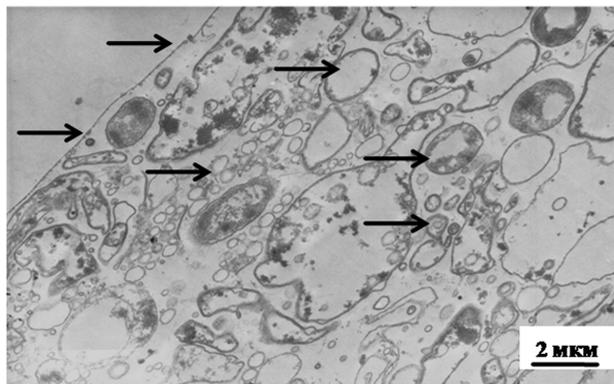


Рис. 1. ТЕМ. Ультратонкий срез биопленки *E. coli* 132 при воздействии аугментина.

Стрелками указаны агрегаты деструктурированного матрикса, лизированные клетки и поверхностная пленка. Ув. $\times 10000$.

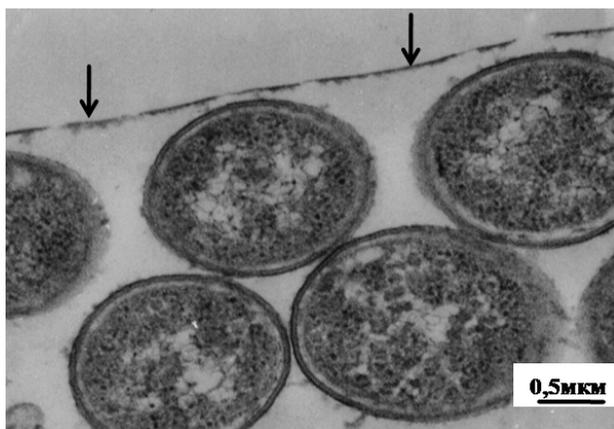


Рис. 2. ТЕМ. Ультратонкий срез интактной биопленки *E. coli* 132, контроль.

Стрелками указана поверхностная пленка. Ув. $\times 80000$.

Подавление биопленкообразования грамположительных бактерий клинического штамма *S. aureus* 234. Архитектоника и характер деструктивных изменений в биопленках, образованных клетками стафилококков в присутствии аугментина, были практически идентичны таковой кишечных палочек, выращенных в аналогичных условиях (рис. 3).

Однако ультраструктурные изменения в клетках грамположительных стафилококков, вследствие особенности строения их клеточных стенок, отличались от де-

структивных нарушений в грамотрицательных клетках эшерихий. При сравнении на ультратонком уровне с интактными биопленками *S. aureus* (рис. 4) видно, что в толще биопленок, обработанных аугментином, лизированные клетки стафилококков представлены в виде электронно-плотных фрагментов пептидогликановых слоев клеточных стенок и ламеллярно-везикулярных включений цитоплазматических мембран различной конфигурации.

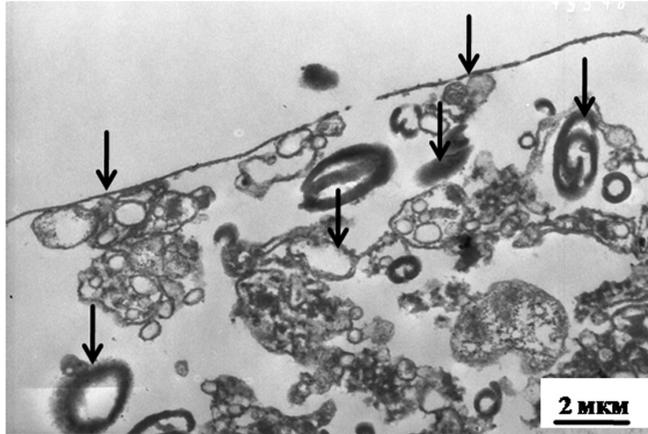


Рис. 3. ТЕМ. Ультратонкий срез биопленки *S. aureus* 234 при воздействии аугментина.

Стрелками указаны электронно-плотные фрагменты пептидогликановых слоев клеточных стенок, мембран и поверхностная пленка. Ув. $\times 10000$.

На ультратонких срезах интактных биопленок *S. aureus* видны целые клетки без каких-либо деструктивных изменений (рис. 4).

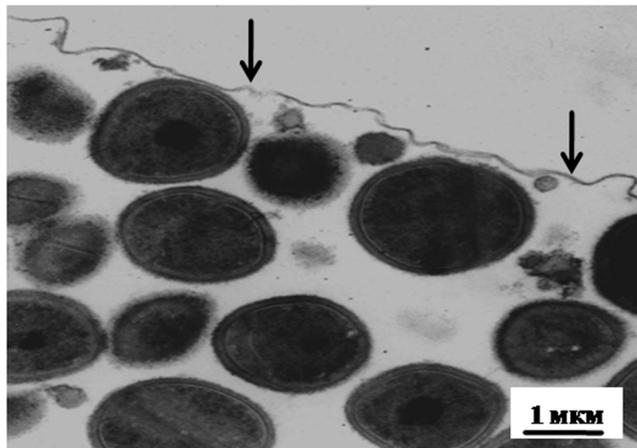


Рис. 4. ТЕМ. Ультратонкий срез интактной биопленки *S. aureus* 234, контроль.

Стрелками указана поверхностная пленка. Ув. $\times 40000$.

Таким образом, сравнительный электронно-микроскопический анализ интактных и подвергнутых воздействию аугментина биопленок *E. coli* 132 и *S. aureus* 234 выявил значительные деструктивные изменения в клетках как грамотрицательных, так и грамположительных бактерий при действии ингибитор-защищенного аминопенициллина.

Обсуждение. Исследования последних лет подтверждают доминирование кишечной палочки при инфекции мочевыводящей системы у пациентов как в Санкт-Петербурге, так и в различных регионах РФ [24]. По официальным данным, уропатогенные *E. coli* вызывают 80–90% внебольничных и 26% нозокомиальных поражений. Особенно часто они вызывают заболевания у детей (более 90% случаев).

Уропатогенные кишечные палочки характеризуются пониженной ферментацией некоторых сахаров (лактозонегативностью), особым свойством связывать конго-красный, наличием большого числа факторов патогенности, узким спектром колициночувствительности, полиантибиотикорезистентностью, объясняемой, в том числе, и повышенной способностью к биопленкообразованию [25].

Серьезной проблемой клинической практики является широкое распространение устойчивых форм микроорганизмов, снижающее эффективность применения антибактериальных препаратов. В связи с этим особое внимание исследователей привлечено к изучению феномена биопленкообразования. Защитные структуры биопленок делают клетки бактерий в ее составе устойчивыми не только при атаке эффекторов иммунной системы, но и увеличивают резистентность микроорганизмов к антимикробным препаратам. Бактерии в составе биопленок способны выживать при воздействии антимикробных препаратов в таких высоких концентрациях, которые не могут быть достигнуты в организме человека при стандартных терапевтических дозировках [19]. Еще одна негативная характеристика биопленок заключается в их способности к полирезистентности к антимикробным препаратам разных групп [26]. В клинических условиях столь высокая выживаемость микроорганизмов в составе биопленок может привести к хронизации инфекционного процесса [27].

В связи с этим возникает необходимость в разработке новых подходов в исследовании антибиотикорезистентности микробных популяций в составе биопленок.

Выраженный клинический эффект терапии инфекционного процесса мочевыводящих путей синтетическими пенициллинами указывает на то, что подавляющее большинство выделенных возбудителей проявляли чувствительность к применяемым препаратам. При электронно-микроскопическом исследовании биопленок *E. coli* 132 и *S. aureus* 234 были выявлены выраженные деструктивные изменения в клетках обеих культур при воздействии стандартных доз аугментина. Характер разрушения клеток *E. coli* 132 и *S. aureus* 234 в биопленках при воздействии аугментина существенно отличался от автолитических изменений в этих же клетках в ходе естественного отмирания, наблюдаемого в конце стационарной фазы роста планктонных культур. На данной стадии развития популяции значительная часть клеток, как правило, еще способна сохранять интактную форму, а гибель единичных особей происходит в результате фокальной деструкции клеточных стенок, при этом можно наблюдать целостность «клеточных теней». В случае воздействия аугментина на клетки стафилококков целостность клеточных стенок нарушается одновременно в нескольких местах и на ультратонких срезах видны лишь фрагменты клеточных стенок.

Результаты электронно-микроскопического анализа объясняют столь высокую эффективность результатов клинических исследований, полученных при использовании защищенных ингибиторами бета-лактамаз синтетических аминопенициллинов, что подтверждает целесообразность их назначения при терапии инфекции мочевой системы у детей.

Работа поддержана грантом СПбГУ № 0.37.123.2011.

Литература

1. Эрман М. В. Инфекция мочевой системы // Детская медицина Северо-Запада. 2011. Т. 2, № 1. С. 61–68.
2. Conway P. H., Snaan A., Zaoutis T. et al. Recurrent urinary tract infections in children: Risk factors and association with prophylactic antimicrobials // JAMA. 2007. Vol. 298(2). P. 179–186.
3. Лукьянов А. В. Инфекции мочевой системы у детей (этиология, механизмы развития, диспансеризация): автореф. дис. ... д-ра мед. наук. Омск, 2005. 45 с.
4. Письмо МЗ и СР РФ от 26 января 2007 года № 567-ВС «Об организации медицинской помощи детям с инфекцией мочевыводящих путей».
5. Замятин С. А. Амбулаторная помощь больным с инфекцией мочевой системы // Медицина Петербурга. 2009. № 39. С. 289.
6. Захарова И. Н. Инфекции мочевой системы у детей: современные представления об этиологии // Нефрология и диализ. 2001. Т. 5, № 1. С. 20–24.
7. Brians S., Alper M. D., Sarah H., Curry M. D. Urinary tract infections in children // Am. Fam. Physician. 2005. Vol. 72. P. 2483–2488.
8. Deshpande P. V., Verrier J. K. An audit of RCP guidelines on DMSA scanning after urinary tract infection // Arch. Dis. Child. 2001. Vol. 84. P. 324–327.
9. Montini G., Tullus K., Hewitt I. K. Febrile Urinary tract infections in children // N. Engl. J. Med. 2011. Vol. 365. P. 239–250.
10. Goldraich N., Barrat T. Vesicoureteral reflux and renal scarring // Ped. Nephrology. 2-ed / ed. by M. Holliday. Baltimore. 1987. P. 647–668.
11. Эрман М. В. Лечение инфекции мочевой системы у детей (клиническая лекция) // Клиническая нефрология. 2011. № 3. С. 16–19.
12. Колбин А. С., Шабалов Н. П., Карпов О. И. Эффективность и безопасность использования фторхинолонов в педиатрии // Педиатрия. 2005. № 5. С. 70–74.
13. Страчунский Л. С., Шевелев А. Н. Антибактериальная терапия инфекций мочевыводящих путей у детей // Детский доктор. 2001. № 8. С. 12–13.
14. Эрман М. В. Нефрология детского возраста. СПб.: СпецЛит, 2010. 683 с.
15. Steven L., Chang M. D., Linda D., Shortliffe M. D. T. Pediatric urinary tract infections // Pediatr. Clin. N. Am. 2006. N 53. P. 379–400.
16. Urinary tract infection in children: diagnosis, treatment and long-term management. National Collaborating Centre for Women's and Children's Health // Clinical Guideline. London. 2007. 178 p.
17. WHO Model Formular for Children. World Health Organization. 2010. URL: http://www.who.int/childgrowth/standards/weight_for_age/en/index.html.
18. Бондаренко В. М. Факторы патогенности бактерий и их роль в развитии инфекционного процесса // Микробиол. 1999. № 5. С. 34–39.
19. Donlan R. M., Costerton J. W. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms // Clin. Microbiol. Rev. 2002. № 15. С. 93–167.
20. Бондаренко В. М. Роль условно-патогенных бактерий при хронических воспалительных процессах различной локализации. Тверь: ООО «Изд-во «Триада», 2011. 88 с.
21. Лопаткин Н. А., Деревянко И. И. Неосложненные и осложненные инфекции мочеполовых путей. Принципы антибактериальной терапии // Рус. мед. журн. 1997. Т. 24. С. 1579–1589.
22. Рыбальченко О. В., Бондаренко В. М., Гуслева О. Р. и др. Дезорганизация биопленок клинических штаммов стафилококков метаболитами лактобацилл // Журн. микробиол. 2010. № 6. С. 66–70.
23. Рыбальченко О. В., Бондаренко В. М., Добрица В. П. Атлас ультраструктуры микробиоты кишечника человека. СПб.: Изд. ИИЦ ВМА, 2008. 112 с.
24. Цыгин А. Н., Комарова О. В., Сергеева Т. В. и др. Инфекция мочевыводящих путей // Клинические рекомендации. Педиатрия / под ред. А. А. Баранова. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2005. С. 81–96.

25. Честнова Т. В., Серегина Н. В. Особенности существования бактерий в составе биопленок на примере уропатогенных кишечных палочек // Вестник новых медицинских технологий. 2010. Т. XVII, № 4. С. 28–30.

26. Weigel L. M., Donlan R. M., Shin D. H. High-level vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates associated with a polymicrobial biofilms // Antimicrob. Agents. Chemother. 2007. № 51. P. 231–238.

27. Чеботарь И. В., Маянский А. Н., Кончакова Е. Д. и др. Антибиотикорезистентность биопленочных бактерий // Клин. микробиол. антимикроб. химиотер. 2012. Т. 14, № 1. С. 51–59.

Статья поступила в редакцию 15 августа 2013 г.