

УДК 615.28:579.842.14:579.61

**Б.І. Гушилик**

*ДУ «Інститут мікробіології та імунології ім. І.І. Мечникова  
НАМН України», м. Харків*

## **ФОРМУВАННЯ РЕЗИСТЕНТНОСТІ У *SALMONELLA ENTERITIDIS* ЩОДО НОВИХ ПРОТИМІКРОБНИХ КОМПОЗИЦІЙ ДЛЯ ЛІКУВАННЯ ЗАХВОРЮВАНЬ ШЛУНКОВО- КИШКОВОГО ТРАКТУ БАКТЕРІАЛЬНОГО ГЕНЕЗУ**

Наведені результати досліджень швидкості формування резистентності *Salmonella enteritidis* до нових протимікробних композицій. Доведено, що формування резистентності сальмонел до розроблених протимікробних композицій № 1 та 3 відбувається більш повільно, ніж окремо до їх активних компонентів. Застосування протимікробних засобів з різним механізмом дії у комбінаціях дозволяє уповільнити процес формування резистентності мікроорганізмів до лікарських препаратів і є перспективним напрямком наукових досліджень.

**Ключові слова:** *Salmonella enteritidis*, резистентність, протимікробні композиції.

Однією з найбільш важливих проблем сучасної антибактеріальної терапії є формування стійкості патогенних бактерій до протимікробних препаратів, що виникає через широке і нерациональне застосування останніх і зростає з кожним роком. Наслідком цього є поступове зменшення кількості ефективних антибактеріальних препаратів і глобальне розповсюдження резистентних штамів мікроорганізмів [1–3].

Безконтрольне і необгрунтоване застосування антибіотиків, за даними ВООЗ, досягає 50 % у стаціонарах, 70 % у поліклініках та є причиною порушення в організмі людини сформованої в результаті еволюції рівноваги між ендосимбіонтними бактеріями, що необхідні для нормальної життєдіяльності [4]. В результаті радикально змінюється нормальна мікрофлора людини, все частіше зустрічаються мікоплазми, хламідії, віруси та L-форми бактерій.

Поява й широке розповсюдження резистентних штамів мікроорганізмів у лікарнях призводить до спалахів нозокоміальних інфекцій, збільшення термінів госпіталізації, зростання летальних випадків і економічних збитків. У той же час зниження ефективності терапії інфекцій внаслідок поширення резистентних штамів обумовлює необхідність застосування резервних антибіотиків останнього покоління [5, 6].

© Б.І. Гушилик, 2016

В 2001 р. ВООЗ розробила «Глобальну стратегію ВООЗ щодо стримування стійкості до протимікробних препаратів», у якій рекомендовано розглядати вказану проблему в якості одного з пріоритетів національної системи охорони здоров'я [7]. В 2007 р. у підсумковій заяві з охорони здоров'я країн-учасниць саміту «великої вісімки» антибіотикорезистентність збудників інфекційних захворювань було визнано як глобальну загрозу безпеки [8].

Процес формування стійкості культур до антибактеріальних препаратів супроводжується змінами морфологічних, культуральних та біохімічних властивостей збудників [9–11]. Результатом зростаючої уваги до появи резистентності клінічно-значущих патогенів до антибіотиків стало створення ряду програм епідеміологічного нагляду і бактеріологічного моніторингу за цим явищем у багатьох країнах світу [12]. Визначення та прогноз тенденцій розвитку резистентності, розкриття її механізмів та розробка ефективної стратегії вирішення цієї проблеми є одними з найважливіших цілей програми, оскільки патогенні мікроорганізми можуть циркулювати між лікарнями, країнами та континентами, створюючи загрозу здоров'ю всього людства.

На сьогодні є два основних напрями виходу зі складної ситуації, спричиненої глобальним розповсюдженням резистентних

штамів мікроорганізмів: 1) інтенсифікація розробки і впровадження принципово нових антимікробних препаратів; 2) дослідження можливостей ефективного застосування комбінацій існуючих антибіотиків. Доцільним також є пошук методів контролю розповсюдження резистентності патогенів до існуючих препаратів, які широко застосовуються у медичній практиці [13]. Перший варіант є довготривалим і потребує значних економічних затрат. Другий варіант є не менш складним, але він дозволяє вже зараз приймати заходи. Сучасна стратегія вирішення проблеми протидії зростанню резистентності збудників повинна одночасно поєднувати обидва зазначені напрямки [14].

У зв'язку з цим розробка нових протимікробних препаратів і дослідження швидкості формування у патогенної мікрофлори резистентності до їх активних компонентів вже на перших стадіях апробації лікарських засобів є необхідними для попередження подальшого розповсюдження резистентних штамів мікроорганізмів і підвищення ефективності антибактеріальної терапії.

Метою досліджень було вивчення динаміки формування резистентності *Salmonella enteritidis* до нових протимікробних композицій, № 1, 2, 3, що містять в якості основних активних компонентів ампіцилін, цефалексин, норфлораксацин відповідно та ряд допоміжних речовин.

**Матеріал і методи.** В якості моделі для вивчення формування резистентності у збудників захворювань шлунково-кишкового тракту щодо нових протимікробних композицій було обрано штам *Salmonella enteritidis* ГИСК 2640, який отримано із музею мікро-

організмів Інституту мікробіології та імунології ім. І.І. Мечникова.

Швидкість формування резистентності *S. enteritidis* було визначено по відношенню до трьох композицій (№ 1–3), склад яких наведений в табл. 1. В якості речовин порівняння було окремо протестовано активні складові субстанції протимікробних композицій: ампіцилін, цефалексин, норфлораксацин, декаметоксин та нітазол.

Експериментальне вивчення швидкості розвитку стійкості мікроорганізмів проводилося *in vitro* шляхом послідовних багаторазових пасажів тест-культури на поживних середовищах – м'ясо-пептонному бульйоні та м'ясо-пептонному агарі в присутності суббактеріостатичних концентрацій досліджуваних речовин. Визначення мінімальної інгібуючої концентрації досліджених речовин проводили по загальноприйнятій методиці серійних розведень з коефіцієнтом зниження їх концентрації у два рази в м'ясо-пептонному бульйоні. Для цього готували початкове розведення досліджуваних антимікробних речовин з вихідною концентрацією 1 мг/мл середовища, після чого проводили послідовне їх двократне розведення до концентрації 500, 250, 125, 62,5, 31,25, 15,6, 7,8, 3,9 мкг/мл. Потім у м'ясо-пептонному бульйоні з антибактеріальними речовинами додавали 0,1 мл культури *S. enteritidis* з концентрацією мікроорганізмів  $1,5 \times 10^8$  КУО/мл, що відповідало стандарту мутності 0,5 за McFarland.

Найменша концентрація речовини, при якій було зареєстровано ріст мікроорганізмів на м'ясо-пептонному агарі після висіву з м'ясо-пептонного бульйону без ознак видимого росту в останньому, визначалась як бакте-

Таблиця 1. Склад експериментальних композицій № 1–3, г

Антибіотик і допоміжна речовина	Композиції №		
	1	2	3
Ампіцилін	1,25	–	–
Цефалексин	–	0,525	–
Норфлораксацин	–	–	1,0
Крохмаль	0,75	0,75	2,0
Пектин		По 0,75	
Нітазол		По 0,05	
Декаметоксин		По 0,001	
Кислота сорбінова		По 0,04	
Натрію хлорид		По 0,09	
Гліцирам		По 0,01	
МКЦ		По 1,00	
Цукор		По 10,00	

ріостатична концентрація або мінімальна інгібуюча концентрація. Суббактеріостатична концентрація дорівнювалася 1/2 мінімальної інгібуючої концентрації. Матеріалом для кожного наступного пасажу була культура, що давала ріст на середовищі в присутності суббактеріостатичної концентрації досліджуваної речовини. Визначення резистентності *S. enteritidis* щодо протимікробних композицій та окремо до їх активних компонентів проводили за допомогою «методу колодязів» на м'ясо-пептонному агарі [15].

Критерієм оцінки в досліді була кількість пасажів, необхідних для формування резистентності культури *S. enteritidis* до терапевтичної дози протимікробних композицій і речовин порівняння [16, 17]. Досліди було проведено у п'яти повторях.

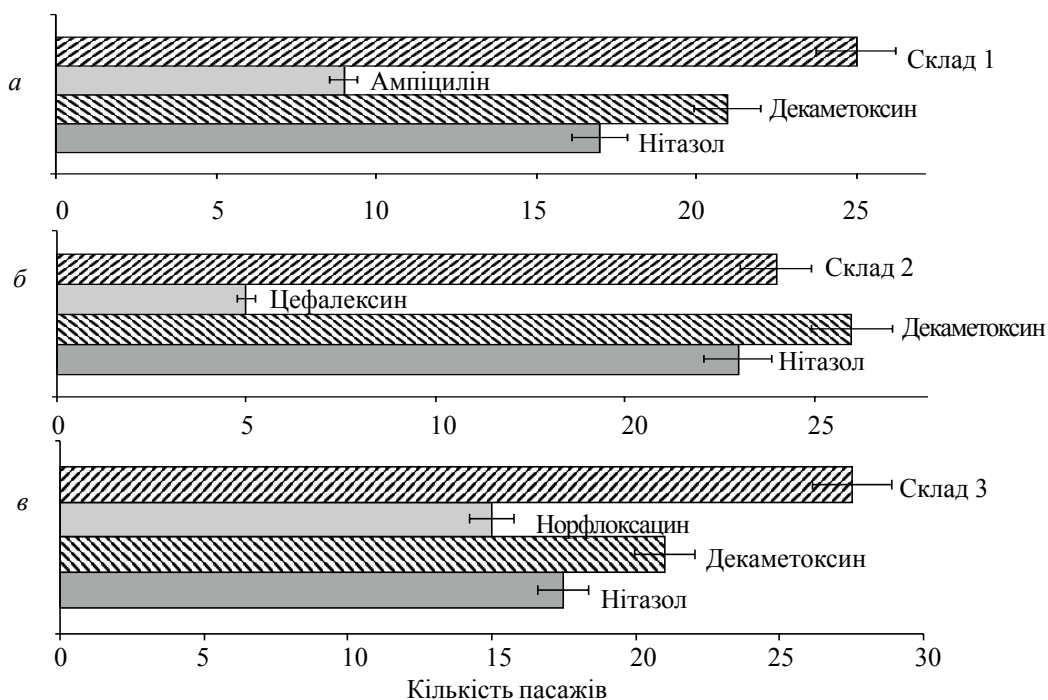
Статистичну обробку результатів досліджень із порівнянням числових значень у вибірках діаметра зони затримки росту *S. enteritidis* здійснювали непараметричним методом за допомогою U-критерію Манна-Уїтні [18].

**Результати.** Мінімальна інгібуюча концентрація і суббактеріостатичні концентрації протимікробних композицій та їх активних компонентів, які було визначено на першому пасажі культури з використанням методу серійних розведень, представлені в табл. 2.

Результати визначення швидкості формування резистентності *S. enteritidis* до нових протимікробних композицій № 1–3, призначених для лікування захворювань шлунково-кишкового тракту бактеріального генезу, та їх активних компонентів відображено на рисунку.

Таблиця 2. Мінімальна інгібуюча концентрація (МІК) і суббактеріостатична концентрація досліджуваних протимікробних композицій та їх активних речовин по відношенню до *Salmonella enteritidis*, мкг/мл

Речовина	МІК	Суббактеріостатична концентрація
Композиція № 1	31,2	15,6
Ампіцилін	3,9	1,9
Композиція № 2	62,5	31,2
Цефалексин	125,0	62,5
Композиція № 3	15,6	7,8
Норфлуксацин	0,9	0,5
Декаметоксин	62,5	31,2
Нітазол	62,5	31,2



Кількість пасажів, необхідних для формування резистентності *Salmonella enteritidis* до композиції № 1 (а), № 2 (б) та № 3 (в) і його активних компонентів

Як видно з рисунку, *a*, формування резистентності *S. enteritidis* до композиції № 1 реєстрували на 25-му пасажі. Резистентність мікроорганізмів до окремих активних компонентів композиції, а саме до ампіциліну, декаметоксину та нітазолу формувалась вірогідно швидше ( $p < 0,05$ ) та спостерігалась на 9, 21 та 18-му пасажі відповідно.

Резистентність культури *S. enteritidis* до композиції № 2 (рисунок, *b*) виникала на 19-му пасажі. Швидкість формування резистентності сальмонел до цефалексину у порівнянні з усіма речовинами досліджу була вірогідно вищою та реєструвалась на 5-му пасажі. Аналіз отриманих даних свідчить про відсутність вірогідної різниці у швидкості формування резистентності сальмонел відносно композиції № 2 у порівнянні з показниками до екаметоксину і нітазолу ( $p \geq 0,05$ ).

Найбільш тривалою протимікробною активністю характеризувалась композиція № 3 (рисунок, *в*), резистентність сальмонел до якої формувалась на 28-му пасажі та була вірогідно повільною, ніж резистентність до окремих активних речовин. Повільне формування

резистентності сальмонел до композиції № 3 пов'язане з наявністю в ньому норфлоксацину, окремо до якого резистентність була зареєстрована на 15-му пасажі.

#### Висновки

1. Експериментальним шляхом встановлено повільне формування резистентності *S. enteritidis* до трьох розроблених композицій. Резистентність *S. enteritidis* до композицій № 1 та 3 формувалась більш повільно, ніж до їх окремих компонентів, що свідчить про синергійну дію антибіотиків, декаметоксину та нітазолу. Ефект, що спостерігається, обумовлений поєднанням різних механізмів дії активних компонентів на мікробну клітину.

2. Формування резистентності *S. enteritidis* до цефалексину, який входив до композиції № 2, спостерігалось доволі швидко, що доводить безперспективність його застосування в розробці нових протимікробних засобів.

3. У подальших дослідженнях доцільно визначати швидкість формування резистентності до розроблених протимікробних композицій у найбільш значущих збудників захворювань шлунково-кишкового тракту.

#### Список літератури

1. Фундаментальная проблема: антибиотики и резистентность // Фармацевт практик : научно-популярный та станова-побутовий журнал. – 2007. – № 7/8. – С. 24.
2. Щербак И.Б. Резистентность микроорганизмов: эра антибиотиков уходит в Лету? / И.Б. Щербак // Український медичний часопис. – 2012. – № 3. – С. 16–17.
3. Изучение молекулярных механизмов резистентности к аминогликозидным антибиотикам возбудителей сальмонеллеза / А.В. Зубрицкий, Е.Н. Ильина, С.А. Стрельченко и др. // Антибиотики и химиотерапия. – 2011. – Т. 56, № 9/10. – С. 7–12.
4. Циммерман Я.С. Нерешенные и спорные проблемы современной гастроэнтерологии / Я.С. Циммерман. – М.: МЕДпресс-информ, 2013. – 224 с.
5. Крючко Т.О. Шляхи подолання антибіотикорезистентності в педіатрії / Т.О. Крючко, О.Я. Ткаченко // Педіатрія, акушерство та гінекологія. – 2011. – Т. 73, № 1. – С. 48–51.
6. Чернявский В.И. Неферментирующие грамотрицательные бактерии в этиологии нозокомиальных инфекций и проблемы антибиотикорезистентности / В.И. Чернявский, С.В. Бирюкова, Е.И. Гришина // Annals of Mechnikov Institute. – 2010. – № 4 – С. 5–13. – Режим доступа до журн.: [www.imiamn.org.ua/journal.htm](http://www.imiamn.org.ua/journal.htm)
7. World Health Organization. WHO Global Strategy for Containment of Antimicrobial Resistance. – Geneva, 2001. WHO/CDS/CSR/DRS/2001.2.
8. Марієвський В.Ф. Проблема внутрішньолікарняних інфекцій та резистентності їх збудників до антимікробних препаратів / В.Ф. Марієвський, А.Г. Салманов // Внутрішньолікарняні інфекції та механізми резистентності їх збудників до антимікробних препаратів : матер. міжнар. наук.-практ. конф., м. Київ, 29–30 вересня 2011 р. – К., 2011. – С. 4–6.
9. Davies J. Origins and evolution of antibiotic resistance / J. Davies, D. Davies // Microbiol. Mol. Biol. Rev. – 2010. – Sept. Vol. 74, № 3. – P. 417–433. PMID:20805405
10. Изучение молекулярных механизмов резистентности к аминогликозидным антибиотикам возбудителей сальмонеллеза / А.В. Зубрицкий, Е.Н. Ильина, С.А. Стрельченко и др. // Антибиотики и химиотерапия. – 2011. – Т. 56, № 9/10. – С. 7–12.

11. Генетические маркеры патогенности *S. enteritidis*, антибиотикорезистентность культур и клинические особенности заболевания / А.Р. Мавзютов, Р.Т. Мурзабаева, Р.Г. Назмутдинова и др. // Клиническая лабораторная диагностика. – 2012. – № 3. – С. 40–42.
12. *Салманов А.Г.* Проблема антибиотикорезистентності та шляхи їх вирішення в Україні / А.Г. Салманов, В.Ф. Марієвський // Внутрішньолікарняні інфекції та механізми резистентності їх збудників до антимікробних препаратів : матер. міжнар. наук.-практ. конф., м. Київ, 29–30 вересня 2011 р. – К., 2011. – С. 7–11.
13. *Фещенко Ю.І.* Антибиотикорезистентність мікроорганізмів. Стан проблеми та шляхи її вирішення / Ю.І. Фещенко, М.І. Гуменюк, О.С. Денисов // Український хіміотерапевтичний журнал. – 2010. – № 1–2 (23). – С. 4–10.
14. *Фещенко Ю.І.* Рациональная антибиотикотерапия больных с инфекциями нижних дыхательных путей / Ю.И. Фещенко, А.Я. Дзюблик // Украинский пульмонологический журнал. – 2009. – № 4. – С. 5–8.
15. Методы общей бактериологии / под ред. Ф. Герхарда. – М. : Мир, 1983. – 263 с.
16. Вивчення специфічної активності протимікробних лікарських засобів : метод. рекомендації / Ю.Л. Волянський, І.С. Гриценко, В.П. Широбоков та ін. – К.: ДФЦ МОЗ України, 2004. – 38 с.
17. Дослідження чутливості та швидкості формування резистентності штамів *Yersinia Enterocolitica* до похідних 4Н-піридо [4',3':5,6] пірано [2,3-d] піримідинів / Н. М. Поліщук, І. Ю. Кучма, В. В. Казмірчук, О. М. Щербак // Вісник проблем біології і медицини. – 2010. – № 3. – С. 227–230.
18. *Лакин Г.Ф.* Биометрия: Учеб. пособие для биол. спец. вузов / Г.Ф. Лакин. – 4-е изд., перераб. доп. – М. : Высш. шк., 1990. – 352 с.

**Б.И. Гушилик**

**ФОРМИРОВАНИЕ РЕЗИСТЕНТОСТИ У SALMONELLA ENTERITIDIS К НОВЫМ ПРОТИВО-МИКРОБНЫМ КОМПОЗИЦИЯМ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ ЗАБОЛЕВАНИЙ ЖЕЛУДОЧНО-КИШЕЧНОГО ТРАКТА БАКТЕРИАЛЬНОГО ГЕНЕЗА**

Проанализированы результаты исследований скорости формирования резистентности *Salmonella enteritidis* к новым противомикробным композициям. Экспериментальные данные свидетельствуют, что формирование резистентности сальмонелл к разработанным противомикробным композициям № 1 и 3 происходит медленнее, чем отдельно к их активным компонентам. Применение антимикробных средств с различным механизмом действия в комбинациях позволяет замедлить процесс формирования резистентности микроорганизмов к лекарственным препаратам и является перспективным направлением научных исследований.

**Ключевые слова:** *Salmonella enteritidis*, резистентность, противомикробные композиции.

**B.I. Gushilik**

**FORMATION OF RESISTANCE IN SALMONELLA ENTERITIDIS TO NEW ANTIMICROBIAL COMPOSITIONS FOR TREATMENT OF GASTROINTESTINAL DISEASES BACTERIAL ORIGIN**

The article analyzes the results of research rate of formation *Salmonella enteritidis* resistant to new antimicrobial compositions. Experimental evidence suggests that the formation of *Salmonella enteritidis* resistant to antimicrobial compositions № 1 and 3 developed slower than their separate active components. The use of antimicrobial agents with different mechanisms of action in the combinations can slow the formation of microbial drug resistance, and is a perspective direction of research.

**Key words:** *Salmonella enteritidis*, resistance, antimicrobial composition.

Поступила 25.08.16