

## ИЗУЧЕНИЕ АДДИТИВНОГО ЭФФЕКТА ПАР АНТИБИОТИК-ПРОБИОТИК В ОТНОШЕНИИ ТЕСТ-ОРГАНИЗМА *SALMONELLA ENTERITIDIS* В УСЛОВИЯХ *IN VITRO*

В результате экспериментов была определена антибиотикорезистентность и антагонистическая активность неспорообразующих штаммов, входящих в пробиотические препараты, в отношении тест-организма *Salmonella enteritidis* и возможности их совместного действия с антибиотиками. Эксперимент поставлен в условиях *in vitro*.

На фоне антибиотикотерапии при лечении различных инфекций развиваются микробиологические нарушения кишечника, такие как дисбиозы. Для лечения последствий наиболее изученным направлением в настоящее время является применение пробиотиков – биологических препаратов на основе представителей нормальной микрофлоры человека. Целесообразность одновременного применения пробиотиков с большинством используемых в клинической практике антибиотиков в настоящий момент является предметом дискуссии, поскольку пробиотические микроорганизмы чувствительны ко многим антимикробным препаратам. Данная проблема обрисовала круг задач, стоящих перед нами, в связи с чем были проведены следующие исследования по подбору, изучению и обоснованию эффективности совместного применения пробиотических препаратов на основе неспорообразующих бактерий с антибиотическими препаратами при лечении экспериментальной сальмонеллезной инфекции в условиях *in vitro*.

Ключевые слова: микрофлора, пробиотики, антибиотики, тест-организм *Salmonella enteritidis*, антибиотикопродуктивность, антибиотикорезистентность, антагонизм, синергизм, аддитивный эффект.

Различные факторы внешней и внутренней среды могут существенно влиять на состав кишечной микрофлоры человеческого организма, что может не только нарушать нормальное течение физиологических процессов, но даже приводить к тяжелым патологическим состояниям. Одним из таких факторов является сальмонеллез.

Сальмонеллез – кишечная инфекция, передающаяся, в основном, с пищей. Ежегодно регистрируется более 2 миллионов случаев сальмонеллеза, поэтому его смело можно назвать одним из самых распространенных инфекционных заболеваний в современном мире, имеющих тенденцию к росту. Вызывается бактериями рода сальмонелла – грамтрицательными палочками, подвижными факультативными анаэробами, способными продуцировать экзотоксины и энтеротоксины, усиливающие секрецию жидкости и солей в просвет кишечника, и цитотоксин, нарушающий белково-синтетические процессы в клетках слизистой оболочки кишечника и воздействующий на цитомембраны [1]–[4].

В настоящее время одной из наиболее широко применяемых групп препаратов в химиотерапии инфекционных заболеваний являются антибактериальные средства – антибиотики [5],

[6]. Основной проблемой последних лет является широкое распространение резистентных форм патогенных микроорганизмов и снижение эффективности целого ряда антибиотиков. Также антибиотики могут отрицательно влиять на микрофлору здорового кишечника, вызывая тем самым дисбактериоз. Антибиотик должен применяться на второй фазе заболевания, когда симптомы выражены, а возбудитель уже выявлен. Поэтому при лечении антибиотиками и другими противомикробными препаратами рациональным считается назначение пробиотиков [7].

Пробиотики – это живые микроорганизмы и вещества микробного происхождения, которые при попадании в желудочно-кишечный тракт человека в достаточном количестве сохраняют свою активность, жизнеспособность и оказывают положительное влияние на здоровье человека. При этом должны выполняться следующие условия: пробиотик должен быть устойчив к антибиотику; обладать способностью продуцировать антибиотикоподобные вещества; пробиотик и антибиотик должны работать совместно, т. е. должен наблюдаться аддитивный эффект [8].

В этой связи, цель наших исследований заключалась в изучении возможности комплекс-

ного применения антибиотиков и пробиотиков на основе неспорообразующих бактерий при лечении сальмонеллеза в условиях *in vitro*.

Для решения этой цели необходимо решить задачи:

1. Определить антибиотикорезистентность и антагонистическую активность исследуемых микроорганизмов в отношении тест-организма *Salmonella enteritidis*;

2. Изучить возможность комплексного применения отобранных наиболее эффективных пробиотиков и антибиотиков на инфекцию, вызванную тест-организмом.

В качестве объектов исследования использовались чистые культуры микроорганизмов: *E. coli* M-17 (из препарата «Колибактерин»), *Lactobacillus acidophilus* (из препарата «Аципол»), *Lactobacillus plantarum* 8P-A3, *L. plantarum* 38, *L. fermentum* 90T-C4, *L. fermentum* 39 (из препарата «Лактобактерин»), и *Lactobacillus acidophilus* NK-1 (из препарата «Эуфлорин L»). Для выделения чистых культур использован метод непосредственного посева.

Чувствительность штаммов бактерий нормофлоры, входящих в пробиотики, неодинакова. Например, все лактобациллы фактически не чувствительны к антибиотикам – аминогликозидам. Лактобациллы, содержащиеся в лактобактерине, не чувствительны к метронидазолу, пенициллину, цефалоспорином, слабо чувствительны к макролидам и ванкомицину. Как правило, пробиотические штаммы лактобацилл устойчивы к двум и более антимикробным препаратам.

Антибиотики, которые применялись в нашем исследовании, среди показаний имеют

кишечные инфекции, в т. ч. сальмонеллезную. Так, из пенициллинового ряда были применены: пенициллин и ампициллин; из цефалоспоринов: цефуроксим, цефотаксим, цефоперазон; из аминогликозидов: гентамицин и канамицин.

Методами исследования в нашей работе были: 1) методы определения антагонистической активности исследуемых штаммов, входящих в пробиотики; 2) методы определения антибиотикорезистентности.

Первоначальным этапом нашего исследования было определение антибиотикорезистентности пробиотических препаратов («Колибактерин», «Аципол», «Лактобактерин» и «Эуфлорин L») на основе *Escherichia coli* M-17, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus plantarum* с применением диско-диффузионного метода и метода последовательных разведений. Критерием отбора антибиотиков, к которым исследуемые штаммы микроорганизмов проверялись на резистентность, послужили литературные данные о применении антибиотиков различных химических групп при лечении сальмонеллезной инфекции. Исходя из проведенных предварительных исследований, нами были отобраны те антибиотики, к которым бактерии пробиотических препаратов оказались устойчивыми, а *S. enteritidis* умеренно чувствительна. Это необходимо нам для того, чтобы в дальнейшем применять сочетано антибиотики и пробиотики для лечения экспериментально созданной сальмонеллезной инфекции. Данные представлены в таблице 1.

Как видно из таблицы, все штаммы пробиотических микроорганизмов были резистентны к антибиотикам пенициллинового ряда

Таблица 1. Сравнительная таблица по антибиотикорезистентности бактерий, входящих в состав пробиотиков, и тест-организма с применением ДДМ

В миллиметрах

Антибиотики	Исследуемые тест-организмы пробиотических препаратов				
	Коли-бактерин	Аципол	Лакто-бактерин	Эуфлорин L	S. enteritidis
1	2	3	4	5	6
Пенициллин	R	R	R	R	R
Ампициллин	R	R	R	R	26,2±0,67
Цефуроксим	23,3±0,88	R	R	R	22,7±0,33
Цефотаксим	33,0±0,57	R	R	R	20,7±0,33
Цефоперазон	30,7±0,33	18,3±0,2	17,9±0,33	18,7±0,33	R
Гентамицин	21,3±0,88	R	R	R	23,7±0,33
Канамицин	20,33±0,33	17,8±0,6	20,3±0,33	19,8±0,58	23,0±0,58
R – устойчивость к антибиотикам					

(пенициллин, ампициллин), лактобактерии – к цефалоспорином (цефуроксим, цефотаксим) и аминогликозидам (гентамицин и канамицин), а *Salmonella enteritidis* – к пенициллину и цефоперазону.

Наибольший интерес для дальнейших исследований представили следующие антибиотики: ампициллин (группа пенициллинов) для сочетанного применения с «Колибактерином» и «Лактобактерином»; и цефотаксим (группа цефалоспоринов) с «Ациполом» и «Эуфлорином L».

Для проведения дальнейших исследований нам необходимо было определить минимально подавляющие концентрации (МПК) изучаемых антибиотиков на рост исследуемых микроорганизмов. Для определения МПК использовали метод последовательных разведений. Анализ ряда разведений растворов антибиотиков позволил определить концентрации, которые оказывают бактерицидное и бактериостатическое действие на исследуемые микроорганизмы, а также концентрации, которые не оказывают влияния на рост. Данные представлены в таблице 2.

Данные исследований по изучению антагонистической активности исследуемых микроорганизмов относительно тест-организма *S. enteritidis* представлены в таблице 3.

Как видно из таблицы, наибольшую площадь подавления продемонстрировал пробиотик «Колибактерин», за ним – «Лактобактерин», и наименьший результат показал «Аципол».

Для совместного применения антибиотиков и пробиотиков при лечении инфекции необходимо, чтобы штаммы, входящие в состав пробиотика, были антибиотикоустойчивые.

Для каждой группы антибиотиков характерна своя мишень действия. Совместное применение с антибиотиком пробиотика может не только предотвратить развитие дисбактериоза, но и усилить эффект подавления патогенной и условно-патогенной микрофлоры, путем выработки пробиотиком антибиотикоподобных веществ, которые оказывают влияние на другую мишень действия.

В этом случае можно установить явление синергизма (или аддитивности), когда происходит суммация антагонистического действия антибиотиков и пробиотиков, что имеет боль-

Таблица 2. Определение МПК антибиотиков методом последовательных разведений

*В микрограммах*

Антибиотики	Пенициллин	Ампициллин	Цефуроксим	Цефотаксим	Гентамицин	Канамицин
Колибактерин	23,87±3,7 Ед.	5003± 4,6	358±13	520±13	203±13,2	602±18
Аципол	13,02±0,2 Ед.	4883±17	484±15	488±27	651±4,6	651±20
Лактобактерин	15,6±0,45 Ед.	5034±0,8	488±3,6	579±13	721±5,6	547±13
Эуфлорин L	14,8±0,21 Ед.	5036±28	498±16	535±18	689±8	624±19
<i>S. enteritidis</i>	2,27±0,86 Ед.	2051±13	310±35	348±25	354±4,2	413±8

Таблица 3. Сравнительная таблица по антибиотикопродуктивности методом наложения дисков

*В миллиметрах*

Тест-организм	Колибактерин	Аципол	Лактобактерин	Эуфлорин L
<i>S. enteritidis</i>	1,7±0,002	0,3±0,001	0,9±0,05	0,56±0,001

Таблица 4. Результаты по комплексному применению антибиотиков и пробиотиков на тест-организм в условиях *in vitro*

*В миллиметрах*

Антибиотик	Колибактерин	Аципол	Лактобактерин	Эуфлорин L
Пенициллин	-	-	-	-
Ампициллин	28,2±0,69	25,1±0,3	26,3±0,75	24,8±0,33
Цефуроксим	-	20,7±0,05	23,2±0,06	19,2±0,03
Цефотаксим	-	19,8±0,33	21,3±0,34	20,3±0,5
Цефоперазон	-	-	-	-
Гентамицин	-	20,3±0,5	21,2±0,45	15,8±0,6
Канамицин	-	-	-	-

шую практическую значимость. Также можно зарегистрировать либо негативный эффект (антагонизм), когда антибиотикоподобные вещества, вырабатываемые бактериями, могут блокировать мишени действия антибиотиков, либо отсутствие какого-либо эффекта.

В связи с этим, учитывая результаты определения антибиотикорезистентности исследуемых микроорганизмов к антибиотикам, нами был проведен опыт по определению эффективности совместного действия антибиотиков и пробиотиков на условно-патогенные микроорганизмы. Результаты эксперимента представлены в таблице 4.

Как видно из таблицы, в эксперименте наблюдались явления синергизма и антагонизма. В частности, яркий синергизм наблюдался в паре «Колибактерин» и ампициллин – зона подавления роста тест-организма *S. enteritidis* выросла на 2 мм. Антагонизм проявился в паре «Эуфлорин L» и гентамицин – в результате зона подавления уменьшилась с 23,7 мм до 15,8 мм.

В результате были отобраны наиболее активные в отношении подавления сальмонеллы (т. е. обладающие аддитивным эффектом) пары: «Колибактерин» и ампициллин, «Лактобактерин» и ампициллин.

10.09.2015

**Список литературы:**

- 1 Белоусова, Т. А. Бактериальные инфекции кожи: проблема выбора оптимального антибиотика / Т. А. Белоусова, М. В. Горячина // РМЖ. – 2005. – Т. 13. – №. 16. – С. 1086.
- 2 Бондаренко, В. М. Дисбактериоз кишечника как клиничко-лабораторный синдром: современное состояние проблемы / В.М. Бондаренко, Т. В. Мацулевич // Москва. – ГЭОТАР. – «Медиа», 2007. – с. 304.
- 3 Воробьев, А. А. Бактерии нормальной микрофлоры: биологические свойства и защитные функции / А. А. Воробьев, Е.А. Лыкова // Ж. микробиол., эпидемиол., иммунол. – 1999. – №6. – С.102-105.
- 4 Neill, M. A., Failure of ciprofloxacin to eradicate convalescent fecal excretion after acute salmonellosis: experience during and outbreak in health care workers / M.A. Neill, S. M. Opal, J. Heelan // Ann. Intern. Med. – 1991. – V. 114. – P. 195-199.
- 5 Антибиотики и антимикробная терапия [Электронный ресурс] – Режим доступа: <http://www.ahtibiotic.ru>. – 13.09.2014
- 6 Салливан, А. Место пробиотиков в терапии инфекций желудочно-кишечного тракта у человека / А. Салливан, К. Норд // Клинич. микробиол. и антимикробная химиотерапии. – 2003. – №3. – Т.5. – С.275-284.
- 7 Шувалова, Е. П. Инфекционные болезни / Е. П. Шувалова, Т. В. Беляева, Т. В. Антонова // Москва: Медицина, 2001. – Т. 684. – 695 с.
- 8 Ныс, П. С. Беталактамы соединения. Взаимосвязь структуры и биологической активности / П. С. Ныс, В. Б. Курочкина, А. В. Складенко, Г. А. Вейнберг // Антибиотики и химиотерапия. – 2000. – №11. – С.36-42.

**Сведения об авторах:**

**Дроздова Елена Александровна**, доцент кафедры микробиологии химико-биологического факультета Оренбургского государственного университета, кандидат биологических наук  
460018, Оренбург, пр-т Победы, 13, тел.: (3532) 37-24-81, e-mail: drozdova15@mail.ru

**Алешина Елена Сергеевна**, доцент кафедры микробиологии химико-биологического факультета Оренбургского государственного университета, кандидат биологических наук, 03.02.03 Микробиология  
460018, Оренбург, пр-т Победы, 13, тел.: (3532) 37-24-81, e-mail: esaleshina@mail.ru