

УДК 615.28

## ИССЛЕДОВАНИЕ ДЕЙСТВИЯ НОВЫХ КОМБИНИРОВАННЫХ АНТИМИКРОБНЫХ РЕЦЕПТУР НА МИКРООРГАНИЗМЫ IN VITRO

**Абдалкин М.Е.**

*НОУ СМИ «РЕАВИЗ», Самара, Россия, e-mail: mail@reaviz.ru*

*Исследована эффективность нового способа преодоления лекарственной устойчивости условно-патогенных микроорганизмов к противомикробным химиопрепаратам, основанного на комбинированном применении анилиновых красителей в субингибирующих концентрациях и антимикробных химиопрепаратов в среднетерапевтических дозах. В статье отражены испытание его эффективности в отношении условно-патогенных бактерий in vitro.*

*Ключевые слова: лекарственная устойчивость, противомикробные препараты.*

## STUDY OF THE NEW COMBINED MIXTURE OF MICROORGANISMS ANTIMICROBIAL IN VITRO

**Abdalkin M.E.**

*Samara medical Institute "REAVIZ", Samara, Russia, e-mail: mail@reaviz.ru*

The effectiveness of new ways to overcome drug resistance in opportunistic pathogens to antimicrobial chemotherapy drugs, based on the combined use of aniline dyes in subingibiruyuschih concentrations and antimicrobial chemotherapy in srednetераpevticheskikh doses. The article reflects test its effectiveness against opportunistic bacteria in vitro.

*Keywords: drug resistance, antimicrobial agents.*

Важнейшей проблемой современной медицины стало массовое распространение лекарственной устойчивости у условно-патогенных бактерий и грибов. Одним из направлений ее преодоления явилось комбинированное применение антибиотиков с другими веществами. По данным разных авторов установлено следующее: флавоны в субингибирующих концентрациях повышают чувствительность MRSA к бета-лактамам антибиотикам [10], комбинации сульфаниламидов с солями серебра преодолевают резистентность бактерий [1], метаноловый экстракт граната и антибиотик (левомецетин, гентамицин, тетрациклин, ампициллин и оксациллин) подавляют MRSA-штаммы in vitro [9], тетрациклин и этаноловый экстракт листьев, плодов и других частей десяти индийских лекарственных растений преодолевают устойчивость полирезистентных стафилококков [7], алкалоиды некоторых растений способны подавлять системы эффлюкса, отвечающие за множественную лекарственную устойчивость бактерий [8]. «Способ преодоления лекарственной устойчивости бактерий и грибов» [2], основанный на синергизме анилиновых красителей (в субингибирующих концентрациях), не обладающих антимикробными свойствами, и химиотерапевтических лекарственных средств, неэффективных вследствие

лекарственной устойчивости микробов (в средних терапевтических дозах), является одним из них.

### **ЦЕЛЬ ИССЛЕДОВАНИЯ**

Изучить действие комбинированных антимикробных рецептур на полирезистентные бактерии и грибы *in vitro*.

### **МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ**

В исследованиях использовали коллекцию полирезистентных клинических изолятов, хранившихся в лаборатории кафедры общей и военной эпидемиологии ГОУ ВПО «Самарский военно-медицинский институт МО РФ». Оценка размеров зон подавления роста различных условно-патогенных бактерий и грибов комбинированными антимикробными рецептурами определялась диско-диффузионным методом, руководствуясь общепринятыми методиками [3; 4], инструкциями производителей бумажных дисков. В качестве основы питательной среды применяли МПА, в состав которого вводили 0,00125% бриллиантового зеленого, либо 0,0025% метиленового синего (фуксина основного). После инокуляции поверхности агара на него накладывали бумажные диски, содержащие по 20 мг различных антимикробных препаратов (антибиотиков, фурагина и ципрофлоксацина). В контроле (с тем же инокулятом) питательная среда не содержала анилинового красителя. Культивирование проводили в течение одних суток. Статистическая обработка результатов исследований проводилась по методике В.И. Юнкерова [6].

### **РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ**

При испытании способа преодоления лекарственной устойчивости в отношении коринебактерий (таблица 1) установлено, что зоны подавления роста комбинациями антимикробных препаратов с анилиновыми красителями многократно превышали таковые в контроле. Отличия в долях подавляемых штаммов одним и тем же химиопрепаратом при сочетании с разными анилиновыми красителями оказались статистически недостоверными ( $p > 0,05$ ). Та же закономерность выявлена при сравнении долей штаммов коринебактерий, рост которых ингибировался сочетанием одного и того же красителя с различными химиопрепаратами. Это свидетельствует об универсальности разработанного способа преодоления лекарственной устойчивости микробов. Несмотря на отсутствие статистически значимых отличий, наиболее эффективными оказались комбинации антимикробных препаратов с метиленовым синим (подавлялся рост 70–100% резистентных штаммов); в меньшей степени – с фуксином (подавлялся рост только 60–83% из них). У антибиотиков комбинирование эритромицина с метиленовым синим и бриллиантовым зеленым приводило к подавлению роста 100% исследованных штаммов коринебактерий, с гентамицином – 90%, а с доксициклином и ципрофлоксацином – всего 70 и 77–85% соответственно.

Таблица 1 – Активность комбинаций антимикробных препаратов с анилиновыми красителями в отношении *Corynebacterium* spp.

| Антимикробный препарат   | n  | Результаты               |                           |                            |                            |
|--|----|--------------------------|---------------------------|----------------------------|----------------------------|
|  |    | контроль (без красителя) | фуксин                    | бриллиантовый зеленый      | метиленовый синий          |
| Левомецетин  | 12 | 7,4±3,0                  | $\frac{23,2 \pm 2,9}{83}$ | $\frac{24,0 \pm 2,2}{92}$  | $\frac{20,9 \pm 2,7}{75}$  |
| Эритромицин  | 10 | 1,5±2,3                  | $\frac{23,7 \pm 5,0}{80}$ | $\frac{29,4 \pm 5,7}{100}$ | $\frac{24,0 \pm 4,2}{100}$ |
| Доксициклин  | 10 | 2,3±3,5                  | $\frac{18,7 \pm 7,1}{60}$ | $\frac{21,3 \pm 5,3}{70}$  | $\frac{21,5 \pm 5,0}{70}$  |
| Гентамицин   | 10 | 7,7±3,8                  | $\frac{22,0 \pm 7,8}{80}$ | $\frac{24,0 \pm 4,5}{90}$  | $\frac{21,2 \pm 3,2}{90}$  |
| Ципрофлоксацин   | 13 | 4,4±3,8                  | $\frac{21,3 \pm 6,3}{62}$ | $\frac{29,6 \pm 6,0}{85}$  | $\frac{24,1 \pm 3,3}{77}$  |
| Фурагин  | 14 | 6,1±3,8                  | $\frac{31,4 \pm 7,7}{70}$ | $\frac{27,5 \pm 4,4}{86}$  | $\frac{27,0 \pm 5,0}{87}$  |
| <p>Примечания.</p> <p>1 n – количество исследованных штаммов.</p> <p>2 В поле таблицы в числителе указаны диаметры зон подавления роста штаммов, проявивших чувствительность к действию антимикробного препарата и красителя (среднее арифметическое в мм и доверительный интервал для P = 95), в знаменателе – доля штаммов (в процентах), в отношении которых проявлялся синергизм действия антимикробного препарата и красителя.</p> <p>3 Визуальных признаков ингибирования роста анилиновыми красителями (в применявшихся концентрациях) не установлено в отношении всех исследованных штаммов.</p> |    |                          |                           |                            |                            |

Подобные данные получены при сравнительном анализе подавления роста золотистого и эпидермального стафилококков (таблицы 2 и 3).

Таблица 2 – Активность комбинаций антимикробных препаратов с анилиновыми красителями в отношении *Staphylococcus aureus*

| Антимикробный препарат | n  | Результаты               |                            |                           |                           |
|------------------------|----|--------------------------|----------------------------|---------------------------|---------------------------|
|                        |    | контроль (без красителя) | фуксин                     | бриллиантовый зеленый     | метиленовый синий         |
| Эритромицин            | 13 | 2,1±2,5                  | $\frac{33,8 \pm 8,6}{67}$  | $\frac{25,9 \pm 2,9}{92}$ | $\frac{22,2 \pm 1,5}{92}$ |
| Доксициклин            | 14 | 3,0±2,9                  | $\frac{37,3 \pm 16,3}{57}$ | $\frac{25,5 \pm 3,6}{86}$ | $\frac{19,5 \pm 2,1}{86}$ |
| Гентамицин             | 14 | 4,2±3,0                  | $\frac{28,1 \pm 6,2}{67}$  | $\frac{24,3 \pm 2,2}{93}$ | $\frac{21,4 \pm 1,6}{93}$ |
| Цефазолин              | 8  | 8,4±6,0                  | $\frac{28,0 \pm 4,6}{88}$  | $\frac{24,6 \pm 2,8}{88}$ | $\frac{21,1 \pm 2,7}{88}$ |
| Ципрофлоксацин         | 13 | 5,0±3,5                  | $\frac{30,2 \pm 8,3}{62}$  | $\frac{29,0 \pm 4,4}{85}$ | $\frac{22,3 \pm 2,2}{69}$ |
| Фурагин                | 11 | 7,2±3,8                  | $\frac{25,9 \pm 6,3}{64}$  | $\frac{24,4 \pm 2,6}{82}$ | $\frac{22,2 \pm 1,7}{82}$ |

Примечания.

1 n – количество исследованных штаммов.

2 В поле таблицы в числителе указаны диаметры зон подавления роста штаммов, проявивших чувствительность к действию антимикробного препарата и красителя (среднее арифметическое в мм и доверительный интервал для P = 95), в знаменателе – доля штаммов (в процентах), в отношении которых проявлялся синергизм действия антимикробного препарата и красителя.

3 Визуальных признаков ингибирования роста анилиновыми красителями (в применявшихся концентрациях) не установлено в отношении всех исследованных штаммов.

Таблица 3 – Активность комбинаций антимикробных препаратов с анилиновыми красителями в отношении *Staphylococcus epidermidis*

| Антимикробный препарат | n  | Результаты               |                            |                            |                           |
|------------------------|----|--------------------------|----------------------------|----------------------------|---------------------------|
|                        |    | контроль (без красителя) | фуксин                     | бриллиантовый зеленый      | метиленовый синий         |
| Левомецетин            | 10 | 5,6±4,4                  | $\frac{20,5 \pm 5,4}{60}$  | $\frac{24,1 \pm 4,7}{90}$  | $\frac{22,9 \pm 3,2}{80}$ |
| Эритромицин            | 12 | 4,5±3,6                  | $\frac{29,6 \pm 10,3}{67}$ | $\frac{31,8 \pm 9,9}{67}$  | $\frac{26,5 \pm 5,9}{67}$ |
| Доксициклин            | 11 | 4,3±4,0                  | $\frac{20,8 \pm 6,3}{55}$  | $\frac{33,6 \pm 11,1}{73}$ | $\frac{25,0 \pm 6,2}{73}$ |
| Гентамицин             | 10 | 3,9±3,7                  | $\frac{17,5 \pm 3,3}{40}$  | $\frac{24,1 \pm 4,8}{70}$  | $\frac{26,5 \pm 5,9}{70}$ |
| Цефазолин              | 10 | 6,7±4,2                  | $\frac{26,6 \pm 4,8}{70}$  | $\frac{30,9 \pm 8,9}{70}$  | $\frac{21,3 \pm 3,0}{70}$ |
| Ципрофлоксацин         | 12 | 5,3±3,6                  | $\frac{28,4 \pm 5,3}{67}$  | $\frac{28,3 \pm 6,4}{83}$  | $\frac{27,6 \pm 3,9}{92}$ |
| Фурагин                | 11 | 5,0±3,9                  | $\frac{20,7 \pm 3,2}{82}$  | $\frac{32,8 \pm 6,7}{73}$  | $\frac{28,3 \pm 3,6}{73}$ |

Примечания.

1 n – количество исследованных штаммов.

2 В поле таблицы в числителе указаны диаметры зон подавления роста штаммов, проявивших чувствительность к действию антимикробного препарата и красителя (среднее арифметическое в мм и доверительный интервал для P = 95), в знаменателе – доля штаммов (в процентах), в отношении которых проявлялся синергизм действия антимикробного препарата и красителя.

3 Визуальных признаков ингибирования роста анилиновыми красителями (в применявшихся концентрациях) не установлено в отношении всех исследованных штаммов.

Оценка эффективности способа преодоления лекарственной устойчивости применительно к энтеробактериям (клебсиелле, энтеробактерам) каких-либо закономерностей и тенденций при сравнении активности различных красителей установить не позволила (таблицы 4 и 5).

Таблица 4 – Активность комбинаций антимикробных препаратов с анилиновыми красителями в отношении *Klebsiella pneumoniae*

| Антимикробный | n | Результаты |
|---------------|---|------------|
|---------------|---|------------|

| препарат       |    | контроль<br>(без<br>красителя) | фуксин                    | бриллианто-<br>вый зеленый | метилено-<br>вый синий    |
|----------------|----|--------------------------------|---------------------------|----------------------------|---------------------------|
| Доксициклин    | 10 | 3,8±3,5                        | $\frac{21,8 \pm 5,1}{50}$ | $\frac{22,0 \pm 3,6}{60}$  | $\frac{22,3 \pm 3,6}{60}$ |
| Цефазолин      | 10 | 5,4±4,1                        | $\frac{16,7 \pm 3,8}{30}$ | $\frac{32,2 \pm 15,3}{60}$ | $\frac{22,0 \pm 4,3}{40}$ |
| Ципрофлоксацин | 8  | 5,5±5,0                        | $\frac{16,7 \pm 5,2}{25}$ | $\frac{24,0 \pm 5,0}{62}$  | $\frac{21,0 \pm 6,6}{50}$ |
| Фурагин        | 9  | 6,6±4,8                        | $\frac{20,0 \pm 4,5}{44}$ | $\frac{22,6 \pm 6,0}{56}$  | $\frac{22,0 \pm 5,2}{56}$ |

Примечания.

1 n – количество исследованных штаммов.

2 В поле таблицы в числителе указаны диаметры зон подавления роста штаммов, проявивших чувствительность к действию антимикробного препарата и красителя (среднее арифметическое в мм и доверительный интервал для P = 95), в знаменателе – доля штаммов (в процентах), в отношении которых проявлялся синергизм действия антимикробного препарата и красителя.

3 Визуальных признаков ингибирования роста анилиновыми красителями (в применявшихся концентрациях) не установлено в отношении всех исследованных штаммов.

Таблица 5 – Результаты оценки активности комбинаций антимикробных препаратов с анилиновыми красителями в отношении *Enterobacter spp.*

| Антимикробный<br>препарат | n  | Результаты                     |                           |                            |                           |
|---------------------------|----|--------------------------------|---------------------------|----------------------------|---------------------------|
|                           |    | контроль<br>(без<br>красителя) | фуксин                    | бриллианто-<br>вый зеленый | метилено-<br>вый синий    |
| Доксициклин               | 10 | 3,6±3,4                        | $\frac{22,0 \pm 4,6}{50}$ | $\frac{25,8 \pm 3,2}{50}$  | $\frac{19,0 \pm 3,9}{50}$ |
| Гентамицин                | 8  | 6,3±4,5                        | $\frac{23, 24}{25}$       | $\frac{21,0 \pm 4,3}{50}$  | $\frac{19,8 \pm 3,5}{50}$ |
| Фурагин                   | 10 | 6,8±4,3                        | $\frac{19, 24}{20}$       | $\frac{22,8 \pm 2,7}{40}$  | $\frac{22,0 \pm 4,7}{40}$ |

Примечания.

1 n – количество исследованных штаммов.

2 В поле таблицы в числителе указаны диаметры зон подавления роста штаммов, проявивших чувствительность к действию антимикробного препарата и красителя (среднее арифметическое в мм и доверительный интервал для P = 95), в знаменателе – доля штаммов (в процентах), в отношении которых проявлялся синергизм действия антимикробного препарата и красителя.

3 Визуальных признаков ингибирования роста анилиновыми красителями (в применявшихся концентрациях) не установлено в отношении всех исследованных штаммов.

Наиболее высокая эффективность достигнута в преодолении лекарственной устойчивости к доксициклину (50–60%), ципрофлоксацину (50–62%) с метиленовым синим и бриллиантовым зеленым.

При анализе результатов проведенных исследований обращала на себя внимание значительно более низкая эффективность преодоления лекарственной устойчивости грамотрицательных бактерий по сравнению с грамположительными. Эффективность

преодоления резистентности к химиопрепаратам у грамположительных бактерий (коринебактерий и стафилококков) достоверно превышала таковую у грамотрицательных (клебсиеллы и энтеробактеров). Полученные нами данные соответствуют сведениям И.М. Романенко с соавт. [5] о том, что анилиновые красители действуют преимущественно на грамположительные микроорганизмы.

Применение метиленового синего и бриллиантового зеленого позволяло преодолеть резистентность к итраконазолу, кетоконазолу и флуконазолу у всех устойчивых к ним клинических изолятов *Candida albicans*, хранившихся в нашей коллекции (таблица 6).

Таблица 6 – Активность комбинаций антимикробных препаратов с анилиновыми красителями в отношении грибов *Candida albicans*

| Антимикробный препарат | n  | Результаты               |                            |                            |
|------------------------|----|--------------------------|----------------------------|----------------------------|
|                        |    | контроль (без красителя) | метиленовый синий          | бриллиантовый зеленый      |
| Итраконазол            | 6  | 7,7±6,4                  | $\frac{21,3 \pm 5,0}{100}$ | $\frac{22,3 \pm 2,9}{100}$ |
| Флуконазол             | 11 | 4,9±3,8                  | $\frac{21,5 \pm 2,6}{100}$ | $\frac{22,2 \pm 2,2}{100}$ |
| Кетоконазол            | 7  | 6,7±5,8                  | $\frac{21,7 \pm 4,6}{100}$ | $\frac{21,7 \pm 3,6}{100}$ |

Примечания.  
1 n – количество исследованных штаммов.  
2 В поле таблицы в числителе указаны диаметры зон подавления роста штаммов, проявивших чувствительность к действию антимикробного препарата и красителя (среднее арифметическое в мм и доверительный интервал для P = 95), в знаменателе – доля штаммов (в процентах), в отношении которых проявлялся синергизм действия антимикробного препарата и красителя.  
3 Визуальных признаков ингибирования роста анилиновыми красителями (в применявшихся концентрациях) не установлено в отношении всех исследованных штаммов.

## ВЫВОДЫ

Таким образом, получаемые результаты показали универсальность предлагаемого способа преодоления лекарственной устойчивости: эффективность комбинированных препаратов существенным образом не зависит от используемого антимикробного средства и красителя. Эффективность разработанного способа преодоления лекарственной устойчивости микробов для комбинаций антимикробных препаратов с бриллиантовым зеленым и метиленовым синим в отношении стафилококков и коринебактерий составила 67–100%, энтеробактерий – 40–62%, грибов *Candida albicans* – 100%.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Активность сульфадиазина серебра в отношении штаммов *Acinetobacter baumannii*, выделенных в ожоговых стационарах. / А.П. Соломенный [и др.] // Антибиотики и химиотерапия. – 2005. – Т. 50. – № 7. – С. 37–40.

2. Билёв А.Е., Жестков А.В., Абдалкин М.Е., Меринов А.В. Способ преодоления лекарственной устойчивости бактерий и грибов. Патент РФ № 2363470/ 10.08.2009 г.
3. Методические указания по изучению противомикробной активности фармакологических веществ. – М.: МЗ РФ, 1999. – 19 с.
4. Методические указания 4.2.1890-04 «Определение чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препаратам». – М.: МЗ РФ, 2004. – 34 с.
5. Романенко И.М., Кулага В.В., Афонин С.Л. Лечение кожных и венерических болезней: руководство для врачей. – М.: Медицинское информационное агентство, 2006. – Т. 1. – 904 с.
6. Юнкеров В.И., Григорьев С.Г. Математико-статистическая обработка данных медицинских исследований. – СПб.: ВМедА, 2002. – 266 с.
7. Effect of certain bioactive plant extracts on clinical isolates of beta-lactamase producing methicillin resistant *Staphylococcus aureus* / F. Aqil [et al] // J. Basic. Microbiol. – 2005. – Vol. 45. – № 2. – P. 106–114.
8. Piddock L.J. Clinically relevant chromosomally encoded multidrug resistance efflux pumps in bacteria / L.J. Piddock // Clin. Microbiol. Rev. – 2006. – Vol. 19. – № 2. – P. 382–402.
9. Synergic interaction between pomegranate extract and antibiotics against *Staphylococcus aureus* / L.C. Braga [et al] // Can. J. Microbiol. – 2005. – Vol. 51. – № 7. – P. 541–547.
10. Variation in synergistic activity of flavone and its related compounds on the increased susceptibility of various strains of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*  $\beta$ -lactam antibiotics / Y. Sato [et al] // Intern. J. Antimicrob. Agents. – 2004. – Vol. 24. – P. 226–233.

#### **Рецензенты:**

Кулагин О.Л., д.м.н., профессор, профессор кафедры фармакологии ГОУ ВПО «Самарский государственный медицинский университет Минздрава», г. Самара.

Жестков А.В., д.м.н., профессор, зав. кафедрой микробиологии ГОУ ВПО «Самарский государственный медицинский университет Минздрава», г. Самара.

**Работа получена 15.08.2011**