

**ФГУН «Ростовский научно-исследовательский институт
микробиологии и паразитологии» Роспотребнадзора**

«УТВЕРЖДАЮ»



Директор ФГУН «РостовНИИМП»
Роспотребнадзора,
доктор медицинских наук

Яговкин Э.А.
Яговкин Э.А.

« 27 » января 2009 г.

**ИЗУЧЕНИЕ ВОЗМОЖНОСТИ ФОРМИРОВАНИЯ УСТОЙЧИВОСТИ
МИКРООРГАНИЗМОВ К СТЕЛЛАНИНУ (1,3 – диэтилбензимидазолия
трийодид)**

Отчёт

Ростов - на - Дону

2009 год

Актуальность проблемы.

Одной из причин неполной эффективности использования антибиотиков и химиотерапевтических препаратов является способность микроорганизмов приобретать резистентность к этим лекарственным препаратам. Широкое распространение антибиотикорезистентных культур создает необходимость в разработке и внедрении в лечебную практику новых лечебных препаратов, способных оказывать выраженное антимикробное действие и не вызывать развитие устойчивости к ним микроорганизмов.

В доступной литературе мы не обнаружили сообщений о способности йодсодержащих антисептических средств вызывать появление к ним резистентных форм микробов. Имеющиеся экспериментальные данные об антибактериальной и противогрибковой активности оригинального препарата, содержащего активный йод – 1,3 диэтилбензимидазолия трийодида (стелланина) являются предпосылкой для изучения возможности развития к нему резистентных форм микроорганизмов.

Цель работы.

Исследование возможности развития у микроорганизмов устойчивости к стелланину (1,3 диэтилбензимидазолия трийодиду).

Материалы и методы.

В качестве объекта исследования использована жидкая форма стелланина (капли для местного применения и приема внутрь 4%, серия 010907, со сроком годности до 09.2009 г.).

В исследовании использованы следующие штаммы микроорганизмов, полученные из ГИСК им. Л.А. Тарасевича:

- *E. coli* 3912/41
- *Pseudomonas aeruginosa* 190/91
- *Staphylococcus aureus* 209 P
- *Bifidobacterium bifidum*-1
- *Clostridium perfringens* (из коллекции лаборатории микробиологии РНИИМП).

Все взятые в исследование культуры имели типичные для своего вида морфологические, тинкториальные, культуральные и биохимические свойства.

Из смывов суточных агаровых культур *E. coli*, *Ps. aeruginosa*, *Staph. aureus* готовили суспензии микроорганизмов в стерильном изотоническом растворе натрия хлорида с концентрацией 10^8 КоЕ/мл.

В качестве питательных сред для выращивания культур *E. coli*, *Ps. aeruginosa*, *Staph. aureus* использовали мясо-пептонный агар.

Культуры анаэробных микроорганизмов *Bifidobacterium bifidum* и *Clostridium perfringens* выращивали на специальных питательных средах: *Bif. bifidum* на авторской среде ГТ-1 (патент № 2080346 РР 1997г.), *Cl. perfringens* на тиогликолевой среде. Для исследований использовали культуры с содержанием микроорганизмов 10^8 КоЕ/мл.

Жидкую форму стелланина (4% капли) методом серийных разведений разводили стерильным физиологическим раствором до концентрации 0,025 %. Для обеспечения условий роста микроорганизмов параллельно жидкую форму стелланина разводили мясо-пептонным бульоном (МПБ), средой ГТ-1 и тиогликолевой средой (ТГС).

Контролем роста микроорганизмов служили пробирки с питательными средами (МПБ, ГТ-1 и ТГС) без добавления стелланина.

Учет роста микроорганизмов после инкубации с разными концентрациями стелланина осуществляли путем высева на соответствующие жидкие (МПБ, ГТ-1, ТГС) и плотные питательные среды (МПА). Инкубацию микроорганизмов с разными концентрациями стелланина проводили при 37°C в течение 18 часов.

При наличии роста микробов результаты оценивали по четырех крестовой системе, сравнивая степень роста с контрольными посевами. При этом обозначали:

(-) отсутствие роста

(+) наличие роста (легкая муть или до 20 колоний на чашке)

(++) наличие роста (степень помутнения слабая или до 50 колоний на чашке)

(+++) средняя степень помутнения (свыше 100 колоний на чашке)

(++++) степень мутности соответствовала степени мутности в контрольной пробирке.

При оценке роста анаэробных микроорганизмов сосчитывали число колоний в среде выращивания, считая:

(+) до 5 колоний в пробирке

(++) до 10 колоний в пробирке

(+++) свыше 10 колоний в пробирке

(++++) рост соответствовал росту в контрольной пробирке.

Для возможного получения резистентных культур использовали метод адаптации микроорганизмов в возрастающих концентрациях стелланина. Все опыты повторяли трижды.

Результаты.

Сравнительные опыты по оценке роста микроорганизмов факультативных анаэробов в сериях стелланина, разведенных физиологическим раствором и питательными средами, выявили снижение концентрации активного вещества препарата белковыми субстанциями питательных сред, поэтому все дальнейшие исследования для получения сопоставимых результатов проводили только при разведении стелланина соответствующей питательной средой.

Результаты определения минимальных концентраций стелланина для микроорганизмов факультативно-анаэробных видов приведены в таблице 1.

Таблица 1

Рост тест-штаммов факультативно-анаэробных микробов на средах с разным содержанием стелланина

Культуры микробов	Концентрация стелланина					Контроль
	0,4 %	0,2 %	0,1 %	0,05 %	0,025 %	
Staph.aureus	-	-	++	++	++++	++++
E. coli	-	-	++	++	++++	++++
Ps.aeruginosa	-	-	+	++	++++	++++

В таблице 2 представлены данные количественного содержания жизнеспособных клеток тест-микробов при разном содержании стелланина.

Таблица 2

Количество жизнеспособных клеток тест-штаммов при разном содержании стелланина в питательной среде

Культуры микробов <i>количество клеток</i>	Концентрация стелланина			Контроль
	0,1 %	0,05 %	0,025 %	
Staph.aureus	74	116	сплошной рост	сплошной рост
E. coli	62	102	сплошной рост	сплошной рост
Ps.aeruginosa	48	94	сплошной рост	сплошной рост

Приведенные данные свидетельствуют о том, что в низких концентрациях стелланина выживают некоторые особи тест-штаммов.

Из пробирок с концентрацией 0,1 % и 0,05 % сделаны высевы на питательные среды с теми же концентрациями стелланина (1 пассаж). Посевы выдержаны в термостате при 37° С 18 часов. Данные результатов 1 пассажа приведены в таблице 3.

Таблица 3

Данные количественного учета жизнеспособных особей тест-штаммов 1 пассажа

Культуры микробов <i>количество клеток</i>	Концентрация стелланина		Контроль
	0,1 %	0,05 %	
Staph.aureus	70 ± 2	104 ± 2	сплошной рост
E. coli	19 ± 5	96 ± 2	сплошной рост
Ps.aeruginosa	23 ± 3	31 ± 2	сплошной рост

В результате повторного выращивания тест-культур содержание жизнеспособных особей в пробирках с концентрацией стелланина 0,1 % кишечных палочек и псевдомонад уменьшилась, только стафилококки

сохранили численность популяции на прежнем уровне. Поэтому пересевы (пассирование) тест-культур продолжены в тех же концентрациях.

Результаты учета количества жизнеспособных особей тест-штаммов после пяти пассажей приведены в таблице 4.

Таблица 4

Культуры микробов	Концентрация стелланина		Контроль
	0,1 %	0,05 %	
Staph.aureus	19 ± 4	92 ± 2	сплошной рост
E. coli	4 ± 2	27 ± 3	сплошной рост
Ps.aerogenes	3 ± 1	16 ± 2	сплошной рост

При пятикратном пассировании в обеих концентрациях стелланина отмечается значительное снижение жизнеспособных клеток, особенно эшерихий и псевдомонад. Несколько в меньшей степени снижается выживаемость стафилококков. Пересев на среду с концентрацией стелланина 0,2 % не обнаружил роста тест-культур, что свидетельствовало об отсутствии адаптации тест-штаммов к стелланину.

Пассирование тест-штаммов факультативно-анаэробных микроорганизмов было продолжено до 20 пассажей (длительность опыта). Было выявлено, что с 9 пассажа рост эшерихий и псевдомонад на средах с концентрацией стелланина 0,1 % полностью отсутствовал, стафилококки продолжали вегетировать при концентрации стелланина до 17 пассажа, в дальнейшем рост единичных колоний отмечался только при концентрации стелланина 0,05 %. Однако повышение содержания стелланина в среде культивирования до 0,2 % приводило к полному прекращению роста.

Проведенное пассирование культур факультативно-анаэробных тест микробов (Staph. aureus, E. coli и Ps. aeruginosa) позволяют говорить, что в результате длительного пассирования этих культур (20 пассажей) адаптировать микроорганизмы к низким концентрациям стелланина не

удалось, что может указывать на отсутствие у них резистентности к данному препарату.

В таблице 5 приведены результаты учета роста тест-штаммов микрооб-
анаэробов (*Bif. bifidum* и *Cl. perfringens*) на средах с разными
концентрациями стелланина.

Таблица 5

Культуры микрооб- анаэробов	Концентрация стелланина					Контроль	Морфология клеток
	0,4%	0,2%	0,1%	0,05%	0,025%		
<i>Cl.perfringens</i>	-	-	-	2×10^5	2×10^6	4×10^8	Грам (+) палочки средних размеров
<i>Bif.bifidum</i>	-	-	-	2×10^5	9×10^6	32×10^9	Атипичные формы

Учет результатов обнаружил, что даже при незначительных
концентрациях стелланина (0,05 %) происходит выраженное снижение
численности микробной популяции бифидобактерий и клостридий,
значительное изменение морфологии бифидобактерий.

Пассирование выживших особей клостридий и бифидобактерий на
питательных средах с концентрацией стелланина 0,05 % уже на втором
пассаже не обнаруживало признаков роста, что свидетельствует об
отсутствии адаптации этих культур даже к низким концентрациям
стелланина.

Полученные результаты свидетельствуют о том, что стелланин в
избранных концентрациях не вызывает у микроорганизмов, взятых в
качестве тест-культур, развитие резистентности.

Исполнители:

Доктор медицинских наук

Кандидат биологических наук



Терновская Л.Н.

Гапон М.Н.