

ISSN 2225-6016

ВЕСТНИК

*Смоленской государственной
медицинской академии*

Том 14, №4

2015



ПРОФИЛАКТИЧЕСКАЯ МЕДИЦИНА

ОРИГИНАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

УДК 616.353-002.4

СРАВНИТЕЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ АНТИБАКТЕРИАЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ КОММЕРЧЕСКИХ ПРЕПАРАТОВ МЁДА И НАТИВНОГО МЁДА В ОТНОШЕНИИ ШТАММОВ С ЭКСТРЕМАЛЬНЫМИ ФЕНОТИПАМИ УСТОЙЧИВОСТИ К АНТИМИКРОБНЫМ ПРЕПАРАТАМ

© Привольнев В.В., Плешков В.Г., Эйдельштейн М.В., Сухорукова М.В.

Смоленский государственный медицинский университет, Россия, 214019, Смоленск, ул. Крупской, 28

Резюме: В клинической практике ряда стран широко используются местные препараты на основе мёда для лечения хирургических инфекций. В условиях растущей антибиотикорезистентности поиск новых антибактериальных средств является актуальной задачей. С целью сравнения антимикробной активности зарубежных местных препаратов для лечения ран и раневой инфекции на основе мёда и отечественного нативного мёда проведено исследование *in vitro*. В публикации представлены результаты данного исследования с детализацией фенотипов резистентности возбудителей из коллекции 92 актуальных мультирезистентных штаммов полученных от пациентов с хирургическими инфекциями из 40 регионов России. Продемонстрировано преимущество нативного мёда из г. Смоленска над образцами из Великобритании и Новой Зеландии, и получены данные о его высокой активности по отношению к экстремально резистентным штаммам. Мёд из Смоленска может быть использован для создания новых высокоактивных местных антимикробных препаратов.

Ключевые слова: мёд, мультирезистентность, полирезистентные штаммы, хирургическая инфекция

COMPARATIVE STUDY OF ANTIBACTERIAL ACTIVITY OF COMMERCIAL PREPARATIONS OF HONEY AND NATIVE HONEY AGAINST STRAINS WITH EXTREME PHENOTYPES ANTIMICROBIAL RESISTANCE

Privolnev V.V., Pleshkov V.G., Eidestein M.V., Sukhorukova M.V.

Smolensk State Medical University, Russia, 214019, Smolensk, Krupskaya St., 28

Summary: There are many local ointments and gels on the basis of local honey (manuka) for the treatment of surgical infections in the clinical practice of western countries a number. In the conditions of increasing antibiotic resistance we urgently need new antibacterial drugs especially to cure local surgical infections. The aim of the investigation was to compare the antimicrobial activity of foreign topical preparations for the treatment of wounds and wound infections based on honey and honey domestic native studied *in vitro*. The publication presents the results of this study with details of phenotypes of resistant pathogens from the collection of 92 strains obtained from patients with surgical infections from 40 regions of Russia. It demonstrates the benefits of native honey from Smolensk on samples from the UK and New Zealand, and obtained data on its high activity in relation to the extremely resistant strains. Smolensk honey can be used to create new high-level local antimicrobial agents.

Key words: honey, multiresistance, multiresistant strains, surgical infection

Введение

В последнее десятилетие возрос интерес к применению мёда и препаратов на его основе для лечения различных инфекций. Ряд исследований подтверждает не только положительное действие мёда на раневой процесс, подавление инфекции, но и то, что действие мёда не зависит от типа раны и наличия устойчивости у возбудителя инфекции к антимикробным препаратам [2].

Антимикробная активность мёда длительное время объяснялось сочетанием таких свойств как $pH < 4$, высокая осмолярность, наличие перекиси водорода и метилглиоксаля. При этом большее внимание получил мёд из Австралии и Новой Зеландии manuka в отношении которого проведено множество клинических и экспериментальных работ [3]. Последний всплеск интереса к мёду связан с его мощным антибактериальным действием в отношении полирезистентной патогенной флоры. В частности, подавления роста MRSA, VSE, VRE выделенных из ран пациентов. Эти данные уже привели к разработке и внедрению медицинских продуктов на основе мёда: гелей,

мазей, повязок для ран. Часть из них содержат 100% мёд, другие сочетание мёда и альгинатов. Изучение и применение нативного мёда и его препаратов в лечении инфицированных ран подробно изложено в нашей предыдущей публикации [1].

Однако, как стало очевидно относительно недавно антимикробная активность мёда в наибольшей степени обусловлена антимикробными пептидами. Так, значительно продвинулись в изучении апидацина, который выделяет медоносная пчела. Модифицированный апидацин ранее уже показал эффективность *in vitro* против *K. pneumonia* и *P. aeruginosa* [4, 5].

Нам не удалось обнаружить в литературе современных данных об антибактериальной активности нативного российского мёда по отношению к актуальным полирезистентным штаммам, также как и работ сравнивающих антибактериальную активность готовых местных антибактериальных препаратов мёда и нативного мёда.

Целью исследования явился сравнительный анализ антибактериальной активности препаратов мёда и нативного мёда в отношении штаммов с экстремальными фенотипами устойчивости к антимикробным препаратам (АМП).

Методика

В исследования были использованы 6 различных образцов мёда (табл. 1).

Таблица 1. Образцы меда, использованные в исследовании

№ образца	Продукт	Источник
1	Мед натуральный	Демидовский район Смоленской области
2	Manuka	New Zeland Honey (Новая Зеландия)
3	Activon Tube	Medical Grade Manuka Honey (Великобритания)
4	Мед натуральный	Ростов-на-Дону
5	Мед натуральный	Гагаринский район Смоленской области
6	Мед натуральный	Монастырщинский район Смоленской области

Образцы 1, 5 и 6 являлись образцами мёда лета 2014 г. из различных районов Смоленской области удалённых друг от друга на расстоянии от 130 км до 300 км. Образец 2 производства Новой Зеландии из мёда манука и образец 3 производства Великобритании из мёда манука Новой Зеландии были приобретены в аптеке г. Лондон за £70. На момент исследования у препаратов не истёк срок годности и оба они рекомендованы в ряде стран Европы, а также в Австралии и Новой Зеландии как препараты для местного лечения различных видов ран и раневой инфекции. Образец 4 – мёд из г. Ростов-на-Дону. На момент исследования мёду образцов 1, 5 и 6 было не менее 5 мес.

Для исследования выбраны изоляты бактерий с известным профилем чувствительности к АМП и установленными генетическими детерминантами устойчивости для экстремально резистентных изолятов (табл. 2, 3).

Таблица 2. Характеристика исследуемых изолятов бактерий с известным профилем чувствительности к антимикробным препаратам

Вид микроорганизма	n	Чувствительные к карбапенемам	Нечувствительные к карбапенемам, не продуцирующие карбапенемазы	Нечувствительные к карбапенемам, продуцирующие карбапенемазы
<i>Acinetobacte baumannii</i>	22	2	-	20
<i>Enterobacter cloacae</i>	2	-	2	-
<i>Escherichia coli</i>	4	1	2	1
<i>Klebsiella oxytoca</i>	1	1	-	-
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	13	3	-	10
<i>Serratia marcescens</i>	3	-	1	2
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	24	5	1	18
<i>Staphylococcus aureus</i> – MRSA	18	0	нп*	нп*
<i>Staphylococcus aureus</i> – MSSA	5	5	нп*	нп*

Примечание: *нп – не применимо

Таблица 3. Список тестируемых изолятов бактерий с известным профилем чувствительности к антимикробным препаратам

Вид	Основной механизм устойчивости	Число штаммов
<i>P. aeruginosa</i>	VIM-2 ¹	13
<i>P. aeruginosa</i>	Carb-S ²	5
<i>P. aeruginosa</i>	Carb-R, CP-neg ³	3
<i>P. aeruginosa</i>	GES-5 ⁴	1
<i>P. aeruginosa</i>	IMP-1 ⁵	1
<i>A. baumannii</i>	OXA-40-like ⁶	10
<i>A. baumannii</i>	OXA-23-like ⁷	3
<i>A. baumannii</i>	OXA-58-like ⁸	7
<i>A. baumannii</i>	Carb-S	1
<i>K. oxytoca</i>	Carb-S	1
<i>E. coli</i>	Carb-S	1
<i>K. pneumoniae</i>	Carb-S	3
<i>K. pneumoniae</i>	OXA-48-like ⁹	7
<i>E. cloacae</i>	Carb-R, CP-neg	2
<i>E. coli</i>	Carb-R, CP-neg	1
<i>S. marcescens</i>	Carb-R, CP-neg	1
<i>E. coli</i>	Carb-R, CP-neg	1
<i>E. coli</i>	OXA-48-like	1
<i>S. marcescens</i>	OXA-48-like	2
<i>K. pneumoniae</i>	NDM-1 ¹⁰	4
<i>Staphylococcus aureus</i>	MRSA ¹¹	18
<i>Staphylococcus aureus</i>	MSSA ¹²	5

Примечание:

¹ карбапенемаза группы VIM-2 (метало-β-лактамаза)² Carb-S – изолят, чувствительный к карбапенемам³ Carb-R, CP-neg – изолят, нечувствительный к карбапенемам не продуцирующий карбапенемазы⁴ GES-5 – карбапенемаза GES-5⁵ IMP-1 – карбапенемаза группы IMP-1 (метало-β-лактамаза)⁶ OXA-40-like – карбапенемаза группы OXA-40⁷ OXA-23-like – карбапенемаза группы OXA-23⁸ OXA-58-like – карбапенемаза группы OXA-58⁹ OXA-48-like – карбапенемаза группы OXA-48¹⁰ NDM-1 – карбапенемаза группы NDM-1 (метало-β-лактамаза)¹¹ MRSA – метициллинорезистентный *S. aureus*¹² MSSA – метициллиночувствительный *S. aureus*

Определение чувствительности проводилось методом разведений в бульоне с определением минимальных подавляющих концентраций (МПК) меда в отношении исследуемых микроорганизмов. Процедура определения чувствительности проводилась по протоколу. По протоколу исследования требовалось: приготовить раствор мёда с концентрацией 30% (масса/объем) в бульоне Мюллера-Хинтон (МХБ), для этого к навеске мёда постепенно добавлять необходимое количество МХБ (меньше, чем конечный требуемый объем), тщательно перемешивая до полного растворения. Полученный раствор мёда перенести в мерный цилиндр достаточного объема. Довести объем раствора до требуемого конечного объема. Полученный раствор стерилизовать фильтрованием через мембранный фильтр 0,22 микрона. Из полученного раствора мёда (с концентрацией 30%) приготовить ряд последовательных разведений в МХБ (табл. 4). Приготовленные растворы мёда внести в лунки микротитровальных 96-луночных планшетов; объем раствора в каждой лунке – 100 мкл. Суспензии каждого исследуемого изолята в стерильном 0,85% растворе хлорида натрия плотностью 0,5 по Мак Фарланду внести в планшеты при помощи автоматического многоточечного инокулятора Mast UriDot (Великобритания). Планшеты инкубировать в условиях обычной атмосферы при 35°C в течении 18-24 ч. Для контроля качества определения чувствительности параллельно с тестируемыми штаммами определяли МПК в отношении международных контрольных штаммов *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853. Минимальная концентрация, при которой не было выявлено признаков роста микроорганизма, расценивалась как МПК мёда в отношении данного изолята. МПК мёда выражена в процентах, так как препарат, сам являясь раствором, разводили начиная от 30% и ниже.

Результаты исследования и их обсуждение

Все образцы мёда продемонстрировали антибактериальные свойства. Начальный 30% раствор оказался эффективным антибактериальным средством в отношении всех изолятов всех образцов за исключением *Enterobacteriaceae* для образца 4 (мёд из Ростова-на-Дону). Коммерческие препараты, содержащие мёд из Новой Зеландии (манука) продемонстрировали сходные между собой параметры. Мёд из Смоленской области также показал близкие результаты при сравнении 3 образцов. Отличные и худшие результаты в исследовании были получены для препарата 4. Это может быть связано с особенностями местности, где был собран мёд или с нарушениями производства, хранения и транспортировки мёда из Ростова-на-Дону, о чём исследователям достоверно неизвестно. Мы также не можем исключить, что данный образец мог оказаться более старым, чем образцы из Смоленска. Результаты исследования представлены в табл. 4.

Таблица 4. Активность мёда из разных источников в отношении исследуемых штаммов

Образец	Микроорганизм	n	Значение МПК для исследуемых штаммов, %						
			3,75%	5%	7,5%	10%	15%	20%	30%
Мёд из Демидовского района Смоленской области	<i>P. aeruginosa</i>	24	-	-	58,3	41,7	-	-	-
	<i>A. baumannii</i>	22	-	22,7	77,3	-	-	-	-
	<i>Enterobacteriaceae</i>	23	-	-	30,4	69,6	-	-	-
	MRSA	18	94,4	5,6	-	-	-	-	-
	MSSA	5	80	20	-	-	-	-	-
Мёд из препарата «Manuka» (New Zeland)	<i>P. aeruginosa</i>	24	-	-	-	-	100	-	-
	<i>A. baumannii</i>	22	-	-	18,2	81,8	-	-	-
	<i>Enterobacteriaceae</i>	23	-	-	17,4	43,5	26,1	13	-
	MRSA	18	-	100	-	-	-	-	-
	MSSA	5	-	80	20	-	-	-	-
Мёд из препарата «Activon Tube» (Medical Grade Manuka Honey)	<i>P. aeruginosa</i>	24	-	-	-	-	-	100	-
	<i>A. baumannii</i>	22	-	-	-	-	100	-	-
	<i>Enterobacteriaceae</i>	23	-	-	-	-	17,4	39,1	43,5
	MRSA	18	-	5,6	-	88,9	5,6	-	-
	MSSA	5	-	-	-	80	20	-	-
Мёд из Ростова-на-Дону	<i>P. aeruginosa</i>	24	-	-	-	-	29,2	70,8	-
	<i>A. baumannii</i>	22	-	-	-	-	4,6	90,9	4,6
	<i>Enterobacteriaceae</i>	23	-	-	-	-	-	-	100
	MRSA	18	-	-	11,1	5,6	83,3	-	-
	MSSA	5	-	-	-	-	100	-	-
Мёд из Гагаринского района Смоленской области	<i>P. aeruginosa</i>	24	-	-	16,7	79,2	4,2	-	-
	<i>A. baumannii</i>	22	-	-	72,7	27,3	-	-	-
	<i>Enterobacteriaceae</i>	23	-	-	-	43,5	56,5	-	-
	MRSA	18	5,6	-	-	72,2	22,2	-	-
	MSSA	5	-	-	-	60	40	-	-
Мёд из Монастырщинского района Смоленской области	<i>P. aeruginosa</i>	24	-	-	-	100	-	-	-
	<i>A. baumannii</i>	22	-	-	-	81,8	18,2	-	-
	<i>Enterobacteriaceae</i>	23	-	-	-	-	91,3	8,7	-
	MRSA	18	27,8	5,6	-	-	-	-	-
	MSSA	5	20	80	-	-	-	-	-

Зарубежные и отечественные образцы показали лучшую активность в отношении грамположительной флоры, чем против грамотрицательной. Это косвенно подтверждает, что основу антибактериального действия мёда составляют антимикробные пептиды (апидацин), механизм действия которых подразумевает большую активность против грамположительной флоры. Некоторые штаммы MRSA и MSSA погибли уже при 1,88% МПК, большинство при 3,75% и 7,5% для образцов 1, 5, 6 и при 5%-7,5% МПК для образцов 2 и 3. В отношении грамотрицательной флоры образцы манука были эффективны при МПК от 7,5% до 30%, преимущественно в диапазоне 10-20%. Образцы мёда из Смоленской области подавляли рост грамотрицательной флоры при МПК от 5% до 30%, большинство штаммов при 10%. В предыдущих зарубежных исследованиях манука показал МПК по отношению к MRSA 2-8% [6], VRE 5-20% [7], *Pseudomonas* 5,5-9% [6, 7]. Таким образом, не смотря на меньшую активность для

грамотрицательной флоры, наши результаты оказались сопоставимы или лучше, чем было продемонстрировано ранее.

Все образцы показали эффективность *in vitro* для экстремально резистентной коллекции штаммов собранной со всей России от пациентов с госпитальными инфекциями. Концентрации для подавления грамположительной флоры требовались в 2-4 раза ниже, чем для грамотрицательной. При этом антибактериальные свойства мёда не зависели от механизма резистентности, а зависели от препарата меда. Это очень важное положение и выгодно отличает возможные будущие антимикробные препараты на основе мёда от антибиотиков, для которых механизм резистентности определяет нишу для клинического применения. Препарат 4 (Ростов-на-Дону) вероятно не был удачным выбором, так как исследователи не могли достоверно отследить сбор и путь препарата в Смоленск. Препараты 2 и 3 (Новая Зеландия) показали худшие характеристики, чем мёд из Смоленска. Вероятно, это связано с тем, что коммерческий препарат кроме фильтрации прошёл стерилизацию гамма-облучением. Образцы из Смоленска прошли стерилизацию только с помощью нанофильтров. Гамма-лучи могли разрушить часть молекул антимикробных пептидов и тем самым уменьшить антибактериальные свойства препаратов. Однако, коммерческие препараты, прошедшие клинические исследования и получившие рекомендации всё же оказались достаточно эффективными и могут рассматриваться как средства борьбы с госпитальной раневой инфекцией при местном применении.

Заключение

Таким образом, необходимость оптимизировать, а, на деле, сократить и ограничить курсы системной антибиотикотерапии, заставляет искать новые возможности для лечения целого ряда хирургических инфекций. Местные антибактериальные средства имеют несравнимо меньшую доказательную базу и не такие конкретные рекомендации по клиническому применению, как антибиотики для системного применения. Токсичность ряда антисептиков, сложность фармакокинетики и многокомпонентность современных мазей для лечения хирургических инфекций не позволяет рекомендовать большинство из них для рутинного применения. Кроме того, местные инфекции в хирургических стационарах также чаще всего обусловлены полирезистентной флорой в отношении которой большая часть существующих местных препаратов не эффективна.

Антибактериальные свойства мёда известны, но не продемонстрированы с позиций доказательной медицины. Коммерческие зарубежные препараты на основе мёда не представлены в России. Данных об их активности по сравнению с российским мёдом до сих пор не было. Перед созданием какого-либо нового местного антибактериального средства на его основе необходимы исследования *in vitro*. Настоящая работа показала, что отечественный мёд содержит ряд факторов позволяющих считать его потенциально подходящим для создания местного антимикробного агента.

Препараты мёда из Смоленской области продемонстрировали лучшие результаты по отношению ко всем штаммам из уникальной коллекции НИИ антимикробной химиотерапии. Данный мёд может быть рассмотрен как ресурс для создания новых эффективных местных препаратов для лечения раневой инфекции вызванной полирезистентной флорой. Для лучшего понимания механизмов антибактериального действия меда необходимо продолжить работу в направлении выделения из него антимикробных пептидов с возможным созданием нового класса антибактериальных препаратов. Следующим шагом в работе может быть выделение пептидов, их биосинтез и исследование активности этого компонента *in vitro*.

Литература

1. Привольнев В.В., Даниленков Н.В. Мёд в лечении инфицированных ран // Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. – 2014. – №3. – С. 219-228.
2. Blair S.E. The unusual antibacterial activity of medical-grade *Leptospermum* honey: antibacterial spectrum, resistance and transcriptome analysis // European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases. – 2009. – N28. – P. 199-208.
3. Molan P.C. The evidence and the rationale for the use of honey as a wound dressing // Wound Practice and Research. – 2011. – N19. – P. 204-220.
4. Berthold N., Hoffmann R. Cellular uptake of apidaecin 1b and related analogs in Gram-negative bacteria reveals novel antibacterial mechanism for proline-rich antimicrobial peptides // Protein and Peptide Letters. - 2014. – N21. – P. 391-398.

5. Czihal P., Knappe D., Fritsche S. et al. Api88 is a novel antibacterial designer peptide to treat systemic infections with multidrug-resistant Gram-negative pathogens // American Chemical Society Chemical Biology. – 2012. – N20. – P. 1281-1291.
6. Cooper R.A., Molan P.C., Harding K.G. Antibacterial activity of honey against strains of Staphylococcus aureus from infected wounds // Journal of the Royal Society of Medicine. – 1999. – N6. – P. 283-285.
7. Cooper R.A., Molan P.C. The use of honey as an antiseptic in managing Pseudomonas infection // Journal of Wound Care – 1999. – N8. – P. 161-164.

Информация об авторах

Привольнев Владислав Владимирович – кандидат медицинских наук, доцент кафедры общей хирургии с курсом хирургии ФДПО ГБОУ ВПО «Смоленский государственный медицинский университет» Минздрава России. E-mail: vladislav.privolnev@gmail.com

Плешков Владимир Григорьевич – доктор медицинских наук, профессор, заведующий кафедрой общей хирургии с курсом хирургии ФДПО ГБОУ ВПО «Смоленский государственный медицинский университет» Минздрава России. E-mail: maral77@mail.ru

Эйдельштейн Михаил Владимирович – кандидат медицинских наук, заведующий лабораторией молекулярной биологии НИИ антимикробной химиотерапии ГБОУ ВПО «Смоленский государственный медицинский университет» Минздрава России. E-mail: eidelelstein@antibiotic.ru

Сухорукова Марина Витальевна – кандидат медицинских наук, старший научный сотрудник НИИ антимикробной химиотерапии ГБОУ ВПО «Смоленский государственный медицинский университет» Минздрава России. E-mail: marina.sukhorukova@antibiotic.ru