

УДК 615.28:615.453.42

ИЗУЧЕНИЕ АНТИМИКРОБНОГО ДЕЙСТВИЯ КОМБИНИРОВАННОЙ ЛЕКАРСТВЕННОЙ КОМПОЗИЦИИ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ КИШЕЧНЫХ ИНФЕКЦИЙ

Фарес Р., Бобрицкая Л. А., Осолодченко Т. П.*,
Гриценко В. И.

Национальный фармацевтический университет
МЗ Украины

*Государственное учреждение «Институт
микробиологии и иммунологии им. И.И.
Мечникова НАМН Украины»

Кишечные инфекции (КИ) различной этиологии относятся к наиболее распространенным заболеваниям в мире, частота которых составляет свыше 2,5 млрд случаев в год, где 42 % приходится на детей в возрасте до 10 лет. Причиной возникновения такой ситуации является изменчивость возбудителей бактериальной диареи и их факторов патогенности. Колебания видовых и внутривидовых характеристик возбудителей, изменение их биологических свойств, требует постоянного исследования и мониторинга [1-3].

КИ представляют собой большую группу инфекционных заболеваний с энтеральным механизмом заражения, вызываемых в большинстве случаев вирусами, а также патогенной (шигеллы, сальмонеллы и др.) и условно-патогенной (протей, клебсиеллы, клостридии и др.) бактериальной флорой.

Патогенез КИ обусловлен способностью возбудителя преодолевать противомикробную защиту организма хозяина, используя различные механизмы: адгезию, инвазию, продукцию энтеро- и цитотоксинов и при попадании возбудителя в слизистую оболочку кишечника приводит к развитию воспалительной реакции, морфологическим результатом которой может быть гибель клеток эпителия, а клиническими проявлениями – лихорадка, спастические сокращения кишечника, боли в животе и диарея [1].

Схема лечения КИ бактериальной этиологии предусматривает подавление патогенной и условно-патогенной с восстановлением нормальной кишечной микрофлоры. Для эффективной антибактериальной фармакотерапии КИ широко применяются лекарственные комбинации с включением нифуроксазида, как эффективного средства при лечении кишечных инфекций. Нифуроксазид характеризуется широким спектром антибактериального действия в отношении широкого спектра микроорганизмов: *Staphylococcus spp*, *Clostridium spp*, *E. coli*, *Salmonella spp*, *Shigella spp*, *Proteus spp*, *Klebsiella spp*, *Enterobacter spp*, *V. cholerae*, *H. pylori*, *Yersinia spp*, а также отсутствием влияния на нормальную кишечную флору, высоким профилем безопасности и может являться препаратом эмпирического выбора при лечении кишечных

инфекций у детей. Препарат не вызывает резистентности и перекрестной устойчивости бактерий к действию других противомикробных средств, что дает возможность назначать его в комплексной терапии с системными лекарственными средствами. В последнее время для лечения КИ нифуроксазид часто комбинируют с пре- и пробиотиками для комплексной коррекции нарушений микрофлоры кишечника [2,3].

Препарат плантаглюцид, полученный из подорожника большого, обладает спазмолитической, противомикробной и противовоспалительной активностью, нормализует перистальтику кишечника, при этом снижает тонус гладких мышц желудка и кишечника, уменьшает отечность складок слизистой оболочки желудка, а содержащиеся в нем полисахариды в виде пектинов обладают свойствами пребиотика и имеют иммуностимулирующее действие [4,5].

Для комплексной терапии кишечных инфекций нами разработан оригинальный комбинированный лекарственный препарат в форме капсул «Диаплант», содержащий в качестве действующих веществ нифуроксазид (200 мг) в комбинации с растительной субстанцией плантаглюцида (200 мг).

Цель работы – изучить антибактериальное действие комбинированного препарата «Диаплант», содержащего нифуроксазид и плантаглюцид в отношении тест-штаммов и клинических штаммов микроорганизмов, выделенных от больных с бактериальной диареей.

Материалы и методы

Объектом исследования был комбинированный препарат «Диаплант». В качестве контроля использовали препарат «Энтерофурил®» производства «Bosnalijek», (Босния и Герцеговина).

Изучение антибактериального действия данных препаратов проводили методом серийных разведений в бульоне [8]. Для оценки активности образцов препаратов использовали следующие тест-штаммы: *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Proteus vulgaris* ATCC 4636, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Candida albicans* ATCC 885/653. Выделение и идентификацию культур микроорганизмов проводили в соответствии с нормативными документами [6-9].

Для исследований использовали агар Мюллера-Хинтона. Для *Candida albicans* использовали агар Сабуро-декстрозный.

Клинический материал поступал из Центра медико-экологических исследований в бактериологическую лабораторию. Всего было обследовано 85 детей в возрасте от 1 до 10 лет с диагнозом бактериальная диарея. Выделено и идентифицировано 109 штаммов микроорганизмов, которые предоставили нам в работу согласно договору о научном сотрудничестве (табл. 1).

Таблица 1. Состав микрофлоры кишечника при бактериальной диарее у детей

Штаммы микроорганизмов	Количество микроорганизмов	
	абсолютное	относительное, %
<i>S. aureus</i>	14	12,8
<i>S. epidermidis</i>	17	15,5
<i>E. faecalis</i>	11	10,1
<i>E. coli</i> (с гемолитическими свойствами)	2	1,8
<i>E. coli</i> (лактозонегативная)	5	4,5
<i>K. pneumoniae</i>	8	7,4
<i>K. mobilis</i>	7	6,5
<i>E. cloacea</i>	9	8,2
<i>C. freundii</i>	6	5,6
<i>P. mirabilis</i>	5	4,5
<i>P. vulgaris</i>	6	5,6
<i>P. aeruginosa</i>	3	2,7
<i>Clostridium spp</i>	6	5,6
<i>C. albicans</i>	10	9,1
Всего	109	100

Приготовление микробной суспензии микроорганизмов проводили с использованием прибора Densi-La-Meter (производство PLIVA-Lachema, Чехия; длина волны 540 нм). Синхронизацию культур проводили с использованием низкой температуры (4 °С). Микробная нагрузка составляла 10⁸ микробных клеток на 1 мл среды и устанавливалась по стандарту McFarland. В работу брали 18-24 часовую культуру микроорганизмов [8]. Исследуемые образцы препаратов растворяли в боратном буферном растворе с pH 9,5±0,5 до полного растворения. После подводили pH до 7,2 и готовили

следующие разведения: 60 мг/л, 30 мг/л, 15 мг/л, 7,5 мг/л, 3,75 мг/л.

Результаты и их обсуждение

Результаты антимикробной активности разработанного комбинированного препарата «Диоплант» (нифуросазид 200 мг и плантаглюцид 200 мг) и референтного препарата «Энтерофурил®» (нифуросазид 200 мг) производства («Bosnalijek», Босния и Герцеговина) в отношении тест-штаммов и клинических штаммов микроорганизмов представлены в табл. 2.

Таблица 2. Антимикробные свойства препаратов в отношении тест-штаммов и клинических изолятов

Штаммы микроорганизмов	МИК, мг/л	
	Комбинированный препарат «Диоплант»	Референтный препарат «Энтерофурил®»
тест-штаммы		
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	15,0	30,0
<i>E. coli</i> ATCC 25922	7,5	15,0
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	100,0	> 100,0
<i>P. vulgaris</i> ATCC 4636	100,0	> 100,0
<i>B. subtilis</i> ATCC 6633	30,0	60,0
<i>C. albicans</i> ATCC 653/885	15,0	30,0
клинические штаммы		
<i>S. aureus</i>	15,0	30,0
<i>S. epidermidis</i>	7,5	15,0
<i>E. faecalis</i>	15,0	30,0
<i>E. coli</i> (с гемолитическими свойствами)	7,5	15,0
<i>E. coli</i> (лактозонегативная)	7,5	15,0
<i>K. pneumoniae</i>	15,0	30,0

<i>K. mobilis</i>	30,0	60,0
<i>E. cloacea</i>	30,0	60,0
<i>C. freundii</i>	15,0	30,0
<i>P. mirabilis</i>	30,0	60,0
<i>P. vulgaris</i>	30,0	60,0
<i>P. aeruginosa</i>	100,0	> 100,0
<i>Clostridium spp</i>	7,25	15,0
<i>C. albicans</i>	15,0	30,0

Проведенные исследования показали, что МИК комбинированного препарата «Диаплант» в отношении тест-штаммов и клинических штаммов микроорганизмов, выделенных от больных с бактериальной диареей, отличается от значений, представленных в литературе [10].

Для клинических и тест-штаммов *S. aureus* показатели МИК комбинированного препарата «Диаплант» составляли 15,0 мг/л, тогда как МИК для контрольного препарата «Энтерофурил®» МИК равнялась 30,0 мг/л. Для лактозонегативной и с гемолитическими свойствами *E. coli* - МИК комбинированного препарата «Диаплант» составляла 7,5 мг/л, для «Энтерофурила®» - 15,0 мг/л. МИК комбинированного препарата «Диаплант» в отношении различных видов клинических штаммов энтеробактерий колебалась от 15,0 мг/мл до 30,0 мг/л в сравнении с «Энтерофурилом®», где МИК была 60 мг/л – 100 мг/л. Для дрожжеподобных грибов *C. albicans* МИК комбинированного препарата «Диаплант» составляли 15,0 мг/л, тогда как для контрольного препарата «Энтерофурил®» МИК

равнялась 30,0 мг/л. Данные значения МИК были характерны для тест-штаммов *C. albicans* ATCC 653/885, так и для клинических изолятов. В отношении тест-штаммов *P. aeruginosa* ATCC 27853, *P. vulgaris* ATCC 4636 МИК препарата «Диаплант» составляла 100,0 мг/л, тогда как для контрольного препарата «Энтерофурил®» МИК была выше > 100,0 мг/л. Для клинических штаммов *P. mirabilis* и *P. vulgaris* МИК «Диаплант» составляла 30,0 мг/л, тогда как МИК «Энтерофурил®» равнялась 60,0 мг/л. Для клинических штаммов *P. aeruginosa* МИК «Диаплант» составляла 100,0 мг/л, тогда как для контрольного препарата «Энтерофурил®» МИК была выше > 100,0 мг/л.

Все клинические штаммы микроорганизмов, которые были обнаружены и идентифицированы от больных с КИ, прошли исследования на чувствительность по отношению к разработанному комбинированному препарату «Диаплант» (нифуросазид 200 мг и плантаглюцид 200 мг). Полученные результаты представлены в таблице 3.

Таблица 3. Оценка чувствительности клинических штаммов к препарату «Диаплант»

Штаммы микроорганизмов (количество штаммов)	Процент чувствительных штаммов, %
<i>S. aureus</i> (14)	92,8
<i>S. epidermidis</i> (17)	100,0
<i>E. faecalis</i> (11)	81,8
<i>E. coli</i> (с гемолитическими свойствами) (2)	50,0
<i>E. coli</i> (лактозонегативная) (5)	100,0
<i>K. pneumoniae</i> (8)	87,5
<i>K. mobilis</i> (7)	85,7
<i>E. cloacae</i> (9)	77,4
<i>C. freundii</i> (6)	66,8
<i>P. mirabilis</i> (5)	80,0
<i>P. vulgaris</i> (6)	83,3
<i>P. aeruginosa</i> (3)	33,3
<i>Clostridium spp</i> (6)	66,7
<i>C. albicans</i> (10)	80,0

Данные табл. 3 наглядно демонстрируют, что 80-95 % клинических штаммов микроорганизмов проявили чувствительность в отношении комбинированного препарата «Диаплант». Наиболее высокий показатель чувствительности имеют штаммы: *S. aureus* – 92,8 % штаммов (13), *S. epidermidis* – 100 % (17) штаммов, *E. coli* (лактозонегативная) - 100 % штаммов, *K. pneumoniae* и *K. mobilis* 85-87 % штаммов (6-7). Слабая чувствительность к препарату

наблюдалась у *P. aeruginosa* – 33,3 %, у *E. coli* (с гемолитическими свойствами) - 50 %.

Выводы

1. В результате проведенного исследования установлено, что комбинированный препарат «Диаплант», содержащий в качестве действующих веществ нифуросазид в комбинации с растительной субстанцией плантаглюцида, обладает антибактериальным действием в отношении тест-

штаммов и клинических штаммов микроорганизмов, возбудителей бактериальной диареи.

2. Входящая в состав капсул субстанция плантаглюцида усиливает антимикробный эффект нифуроксазида за счет собственных антибактериальных свойств фенольных соединений, полисахаридов и возможного их синергизма.

References

1. Gudkova, G. A. Nifuroxazide LF: The research of antimicrobial activity [Text] / E.I. Gudkova, G.A. Skorohod, I.N. Slabko, L.I. Pokachailo // Receipt. – 2013. - № 4 (90). – P. 83-88.
2. Ursova, N. I. Tactics complex correction of intestinal dysbiosis in children: the best place Enterofuril [Text] / N.I. Ursova // Farmateka. - 2008. - № 1. - C.33-37.
3. Grigoriev, P.Y. Irritable bowel syndrome associated with dysbiosis [Text] / P.Y. Grigoriev, E.P. Yakovenko // Russian Medical University and the Federal Gastroenterological Center. - [Electronic resource]. <http://www.nedug.ru/lib/lit/therap/01oct/therap179/therap.htm>.
4. Nemerishina, O. N. The study of BAS and the antimicrobial activity of plantain leaves [Text] / O. N. Nemerishina, N.F. Gusev, T.L. Malkova // Bashkir chemical journal. – 2014. – Т. 21, № 4. – 133-143.
5. Olennikov, D.N. Plantain (PLANTAGO MAJOR L). The chemical composition and application [Text] / D.N. Olennikov, A.V. Samuelsen, L.M. Tanhaeva // "Himija rastitel'nogo syr'ja" ("Chemistry of plant raw material"). – 2007. - № 2. – C. 37-50.
6. The Order of USSR Ministry of Health, 22.04.1985 About unification of microbiological (bacteriological) research methods that are used in clinical diagnostic laboratories of medical institutions [Electronic resource]. : zakon.law7.ru/legal2/se4/pravo4231/page12.htm
7. Bobritskaya, L. A Antibacterial properties of pharmaceutical compositions with ornidazole and flaminil [Electronic resource] [Text] / L. A. Bobritskaya, H. A. Ruban, T. P. Osolodchenko, O. N. Shcherbak, D. I. Dmitrievskiy // Annals of Mechnikov Institute. - 2013. - № 1. - P. 27 - 31. – Access mode: http://nbuv.gov.ua/j-pdf/ami_2013_1_6.pdf www.imiamn.org.ua/journal.htm.
8. Standardization of microbial suspension / Yu. L. Volyansky, L. G. Myronenko, S.V. Kalinichenko [et al.] // Information letter about innovation in health care system, № 163. – 2006, Ministry of Health Ukraine ; Ukrainian center of scientific-medical information, patent and license works (Ukrmedpatentinform).
9. Biryukova, S.V. The laboratory diagnostics of pyoinflammatory diseases caused by asporogenic anaerobic microorganisms : guideline / S.V. Biryukova, Yu. L. Volyansky, I.Yu. Kuchma. - Kharkiv, 2000. - 38 p.
10. Instruction for medical use of the drug "Ersefuril" (Sanofi-Aventis, France): № 567 from 23.07.15. the order the Ministry of Health and Social Development of the Republic of Kazakhstan [Electronic resource]. - www.sanofi.kz/products/ru/Ersefuril_RU.pdf

UDC 615.28:615.453.42

STUDY OF ANTIMICROBIAL ACTION OF COMBINED DOSAGE FORM FOR THE TREATMENT OF INTESTINAL INFECTIONS Fares R., Bobritskaya L.A., Osolodchenko T.P.*, Grytsenko V.I.

Intestinal infection (II) of various etiologies is among the most widespread diseases in the world. The treatment regimen bacterial etiology involves the suppression of pathogenic and conditionally pathogenic with the restoration of the normal intestinal microflora. For effective antibiotic pharmacotherapy of intestinal infections are widely used drug combinations with the addition of nifuroxazide, as well as enzymatic and normalizing bowel motility broad-spectrum drugs. Intestinal antiseptics nifuroxazide characterized by broad spectrum of antibacterial action against *Staphylococcus spp*, *Clostridium spp*, *E. coli*, *Salmonella spp*, *Shigellaspp*, *Proteus spp*, *Klebsiellaspp*, *Enterobacter spp*, *V. cholerae*, *H. pylori*, *Yersinia spp*, and also the lack of effect on the normal intestinal flora, high safety profile. Recently, for the treatment of intestinal infections nifuroxazide often combined with pre- and probiotics for complex correction of the intestinal microflora disorders. For complex therapy of intestinal infections, we have developed an original combined medicine "Diaplant", in the form of capsules, comprising as active ingredients nifuroxazide (200 mg) in combination with plant substance plantaglucide (200 mg). Plantaglucide drug obtained from *Plantago major* has spasmolytic, antimicrobial and anti-inflammatory activity, normalizes bowel peristalsis, while reducing the tone of smooth muscles of the stomach and intestines, reduces swelling folds of the gastric mucosa, and contained therein polysaccharides in the form of pectins have properties of prebiotic and have immunostimulatory effects. **Aim of the work** – study of antibacterial action of combined drug "Diaplant" containing nifuroxazide and plantaglucide in regard to test strains and clinical strains of microorganisms allocated from patients with bacterial diarrhea. **Materials and methods.** Estimation of antimicrobial activity was performed under conditions *in vitro* by method of serial dilutions. The object of research is a combined drug "Diaplant", a reference drug "Enterofuril®" manufacture of ("Bosnalijek" Bosnia and Herzegovina). For the evaluation of drugs samples activity used the following test strains: *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Proteus vulgaris* ATCC 4636, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Candida albicans* ATCC 885/653. Clinical material comes from the Center of medical and environmental research to the bacteriological laboratory. Was allocated and identified 109 strains of conditionally pathogenic microorganisms. **Results and its discussion.** For clinical and test strains *S. aureus* MIC indicators for combined drug «Diaplant» were 15.0 mg / l, whereas the reference drug "Enterofuril®" MIC equaled 30.0 mg / l. For *E. coli* - MIC indicators for combined drug «Diaplant» was 7.5 mg / l, for an "Enterofuril®" - 15.0 - 30 mg \ l. MIC for combined drug "Diaplant" against different clinical strains

of *Enterobacteriaceae* species ranged from 15.0 mg / l to 30.0 mg / l in comparison with "Enterofurilom®", where the MIC was 30mg / l - 60mg / l. For yeasts and clinical strains *C.albicans* MIC combination drug "Diaplant" product is 15.0 mg / l, whereas equal to 30.0 mg / l for the control drug "Enterofuril®" MIC. For test strains, such as *P. aeruginosa* ATCC 27853, *P. vulgaris* ATCC 4636, MIC "Diaplant" drug was 100.0 mg / l, whereas control drug "Enterofuril®" MIC was above > 100.0 mg / l. For clinical strains of *P. mirabilis* and *P. vulgaris* MIC "Diaplant" was 30.0 mg / l, whereas the MIC "Enterofuril®" equal to 60.0 mg / l. For clinical *P. aeruginosa* strains MIC "Diaplant" was 100.0 mg / l, whereas control drug "Enterofuril®" MIC was above > 100.0 mg / l. It has been established that 80-95% of clinical microbial strains showed sensitivity to combined preparation "Diaplant". The highest index of sensitivity has next strains: *S. aureus* - 92,8% of strains, *S. epidermidis* - 100% of the strains, *E. coli* (lactose-negative) - 100% of the strains, *K. pneumoniae*, and *K. mobilis* 85-87% of the strains. **Conclusions.** 1. As a result of the conducted research was found, that the combined drug "Diaplant", containing as active ingredients nifuroxazide in combination with herbal substances plantaglucide, has a pronounced antibacterial activity against the reference strains and clinical strains of microorganisms, the main pathogens of bacterial diarrhea. 2. Plantaglucide substance which is part of the capsules is enhances the antimicrobial effect nifuroxazide at the expense of its own antibacterial properties of phenolic compounds, polysaccharides and their possible synergies. **Keywords:** intestinal infection, nifuroxazide, plantaglucide, capsules.