

**МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
ХЕРСОНСЬКИЙ ДЕРЖАВНИЙ УНІВЕРСИТЕТ**

Факультет біології географії і екології

Кафедра біології людини та імунології

**РОЗВИТОК РЕЗИСТЕНТНОСТІ ДО АНТИБІОТИКІВ У
МІКРООРГАНІЗМІВ**

Кваліфікаційна робота (проект)

на здобуття ступеня вищої освіти “бакалавр”

Виконав: студент(ка) 411 групи

Спеціальності 091 Біологія

Освітньо-професійної (наукової)
програми Лабораторна діагностика
біологічних систем

Шульга Валерія Сергіївна

Керівник проф. Зав’ялов Володимир
Петрович

Рецензент к. геогр. н., проф. Давидов
Олексій Віталійович

ЗМІСТ

ВСТУП	3
РОЗДІЛ 1 Теоретичні передумови дослідження розвитку резистентності до антибіотиків у мікроорганізмів	5
1.1 Фактори резистентності до антибіотиків.....	5
1.2 Фенотипічна та генотипна мінливість мікроорганізмів.....	8
1.3 Механізми дії антибіотиків.....	11
1.4 Механізми подолання антибіотикорезистентності.....	13
1.5 Антагонізм мікробів та антибіотики.....	17
РОЗДІЛ 2 Об'єкти та методи дослідження резистентності до антибіотиків	21
2.1 Об'єкти дослідження.....	21
2.2 Диско – дифузійний метод (ДДМ) дослідження резистентності...23	
РОЗДІЛ 3 Дослідження розвитку резистентності до антибіотиків при їх довготривалому впливі на мікроорганізми	29
3.1 Дослідження із вирощування антибіотикорезистентних культур <i>E. Coli</i>	29
3.2 Динаміка виділення <i>E. Coli</i> у м. Херсоні за 2017 – 2019 роки.....	33
3.3 Дослідження резистентності до антимікробних препаратів <i>E. Coli</i>	35
ВИСНОВКИ	38
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ	39

ВСТУП

Актуальність теми: Сьогодення лікування від інфекційних хвороб, збудником яких є бактерії цілком залежить від чутливості бактерії до антибіотика. Основний критерій чутливості бактерії до антибіотика – це мінімальна концентрація антибіотика, яка інгібує її ріст за стандартних умов. Стійкість до антибіотика (резистентність) починає розвиватися тоді, коли мікроорганізм еволюціонує під впливом різноманітних факторів для підвищення вже існуючої чи створення повної стійкості. На даний момент існує велика проблема лікування захворювань, що викликані стійкими мікроорганізмами, є необхідність використання або більш високих доз препаратів, або альтернативних медикаментів, що може бути більш токсичним для організму [13].

Стійкість бактерій до антибіотиків (резистентність) може бути обумовлена декількома факторами: багатоступневими мутаціями, наявністю R-фактора, зниженою проникністю цитоплазматичної мембрани та клітинної стінки, здатністю резистентних бактерій нейтралізувати лікарські засоби, утвореннями у клітинах з'єднань, що руйнують антибіотики [11].

Питання резистентності не вивчене досконало, тому дослідження цієї теми є актуальним. А також у наш час наявна проблема резистентності, у зв'язку з тим, що мікроорганізми виробляють фактори резистентності при безконтрольному використанні антибіотиків.

Мета роботи - Дослідити резистентність антибіотиків у мікроорганізмах.

Об'єкт дослідження – розвиток резистентності до антибіотиків

Предмет дослідження - резистентність мікроорганізмів

Завдання дослідження:

1. Проаналізувати літературні джерела, щодо механізму дії антибіотиків на клітину бактерії

2. Вивчаючи літературні джерела, розглянути фактори резистентності до антибіотиків
3. З'ясувати методи, що дозволяють вивчити розвиток резистентності у мікроорганізмів до лікарських речовин
4. Дослідити виникнення антибіотикорезистентності у E.coli.

Методи дослідження: Аналіз наукової літератури з тематики дослідження, аналіз методів дослідження резистентності до антибіотиків, дослідження зі створення антибіотикорезистентних штамів E. Coli.

Практичне значення результатів: Результати дослідження можуть застосовуватись для вирішення проблеми виникнення резистентності при лікуванні антибактеріальними засобами. Прогнозування можливих наслідків безконтрольного використання антибіотичних препаратів.

РОЗДІЛ 1

Теоретичні передумови дослідження розвитку резистентності до антибіотиків у мікроорганізмів

1.1 Фактори резистентності до антибіотиків

У лабораторних дослідженнях основними критеріями чутливості мікроорганізму до певного антибіотика є мінімальна концентрація антибіотика, яка інгібує ріст патогенного збудника за стандартних умов. Резистентність починає розвиватися тоді, коли мікроорганізм еволюціонує під впливом різноманітних факторів для підвищення або створення повної стійкості. На даний момент існує велика проблема лікування захворювань, що викликані стійкими мікроорганізмами, є необхідність використання або більш високих доз препаратів, або альтернативних медикаментів, що може бути більш токсичним для організму [8].

Резистентність бактерій до лікарських препаратів може бути обумовлена багатоступеневими мутаціями, наявністю R-фактора, зниженою проникністю цитоплазматичної мембрани та клітинної стінки, здатністю резистентних бактерій нейтралізувати лікарські засоби, утвореннями у клітинах з'єднань, що руйнують антибіотики. Можливо R-фактор містить детермінанти, відповідальні за синтез конститутивних ферментів, що інактивують антибіотики.

Мікроорганізми розвивають стійкість декількома шляхами:

Модифікація мішені дії.

Інактивація антибіотика.

Активне виведення антибіотика з мікробної клітини (Еффлюкс).

Порушення проникності зовнішніх структур мікробної клітини.

Формування метаболічного "шунта" [1].

Резистентність може розвиватися двома шляхами: природним та штучним

Природний шлях – результат природного добору через випадкові мутації, запрограмована еволюція – SOS – відповідь полімераз з низьким рівнем точності. Справжня природна стійкість характеризується відсутністю у мікроорганізмів мішені дії антибіотика або недоступності мішені внаслідок первинно низької проникності або ферментативної інактивації. При наявності у бактерій природної стійкості антибіотики клінічно неефективні. Природна резистентність є постійним видовою ознакою мікроорганізмів і легко прогнозується [2].

Штучний шлях – процедура генетичної трансформації, тобто внесення штучних генів у геном мікроорганізму. Під набутою стійкістю розуміють властивість окремих штамів бактерій зберігати життєздатність при тих концентраціях антибіотиків, які пригнічують основну частину мікробної популяції. Можливі ситуації, коли більша частина мікробної популяції проявляє придбану стійкість. Поява у бактерій придбаної резистентності не обов'язково супроводжується зниженням клінічної ефективності антибіотика. Формування резистентності у всіх випадках зумовлено генетично: придбанням нової генетичної інформації або зміною рівня експресії власних генів. [12].

Госпітальні штами отримали специфічні характеристики (відмінні від «дикого» штаму), які дозволяють існувати в умовах стаціонару.

Основними характеристиками пристосування мікроорганізмів до антибіотиків є:

1. Резистентність до одного або декількох антибіотиків широкого спектру дії.
2. Стійкість до умов стаціонару.
3. Зниження чутливості антисептичних препаратів.

Госпітальні штами є індивідуальними і різняться у різних лікарнях та навіть відділеннях однієї лікарні.

У формуванні резистентності антибактеріальний імунітет відіграє важливу роль. При активному проявленні захисних сил організму типової клінічної картини хвороби не спостерігають, зараження не призводить до захворювання людини. У крові і ретикуло – ендотеліальній системі мікроби піддаються дії на них клітинних гуморальних факторів. Під стерильним імунітетом йдеться про стан несприймання, при якому організм повністю звільнився від збудника.

При бруцельозі, туберкульозі, лепрі, сифілісі та інших хвороб, що протікають тривалий час відносна несприйнятливність співпадає з певним проміжком часу, коли збудник інфекційної хвороби знаходиться в організмі. Такий імунітет називають нестерильним. При хронічних захворюваннях тривалий час вдається одночасно виділяти збудників інфекції та відносний імунітет до повторного зараження або до загострення наявної інфекції.

Одночасно з розвитком інфекційного процесу виникають і формуються специфічні захисні реакції. Таким чином, через стадію нестерильного імунітету різної тривалості проходить розвиток усіх без виключення захисних реакцій, що завершуються створенням стерильного імунітету. З цього виходить, що спочатку з'являється інфекційний імунітет, а після пост інфекційний імунітет, фаза нестерильного імунітету змінюється фазою стерильного імунітету. Ця загальна закономірність властива і тим інфекційним захворюванням, які протікають дуже тривалий час[5].

При захворюваннях, які продукують екзотоксини, вибірково вражаються певні тканини та органи. У процесі еволюції захисних реакцій організм зміг створити здатність знешкоджувати не тільки мікроби, а їх токсини. Знешкодження токсинів проходить шляхом нейтралізації їх анатоксинами.

У практиці імунізація проти деяких захворювань проводять шляхом введення анатоксинів, а специфічне лікування проводять відповідними

анатоксичними сироватками. Наприклад: дифтерія, газова анаеробна інфекція, ботулізм.

Однак анатоксичний імунітет не можна зводити тільки до реакції нейтралізації. При зараженні токсигенними мікробами організм відповідає виробленням захисних механізмів, спрямованих як проти токсина, так і проти збудника.

Відповідь організму на збудник за певних умов може слугувати каталізатором вироблення стійкості мікроорганізму до антибактеріальних препаратів, що приймаються у період лікування.

Також менш значний вплив може надавати формування колективного імунітету. Такого роду несприйнятливості організму створюється у результаті перенесення явних чи скритих захворювань, а також під впливом того, що людина може бути носієм у певних очагах епідемічних спалахів.

Здебільшого колективний імунітет являє собою постінфекційний імунітет. У місцях з високою захворюваністю епідемічним гепатитом і поліомієлітом відмічається формування колективного імунітету.

Колективний імунітет створюється у результаті не тільки епідемічних спалахів, але й під час імунізації населення.

1.2 Фенотипічна та генотипна мінливість мікроорганізмів

Модифікація мікроорганізмів виникає як відповідь клітини на несприятливі умови її існування. Це адаптивна реакція на зовнішні подразники. Модифікація не супроводжується зміною генотипу, у зв'язку з чим виникли в клітині зміни у спадок не передаються. При відновленні оптимальних умов виникли зміни втрачаються. Модифікація властивостей може морфологічних, культуральних, біохімічних та ін [33].

Морфологічна модифікація виражається в змінах форми і величини бактерій. Наприклад, при додаванні пеніциліну деяких бактерій подовжуються. Недолік в середовищі солей кальцію викликає у палички сибірської виразки підвищене спороутворення. При підвищеній

концентрації солей кальцію здатність утворювати спори втрачається і т. Д. При тривалому зростанні бактерій в одній і тій же середовищі виникає поліморфізм, обумовлений впливом накопичених в ній продуктів їх життєдіяльності.

Культуральна модифікація полягає в зміні культуральних властивостей бактерій при зміні складу живильного середовища. Наприклад, при нестачі кисню у стафілокока втрачається здатність утворювати пігмент. Кишкова паличка при кімнатній температурі може утворює яскраво-червоний пігмент, але при 37 ° С здатність утворювати цей пігмент втрачається.

Біохімічна (ферментативна) модифікація. Кожен вид бактерій має певний набір ферментів, завдяки яким вони засвоюють поживні речовини. Ці ферменти виробляються на визначених поживних субстратах і зумовлені фенотипом.

У процесі життєдіяльності бактерій зазвичай функціонує не всі гени, відповідальні за синтез відповідних ферментів. У геномі бактерій завжди є запасні можливості, тобто гени, що визначають виправлення адаптивних ферментів. Наприклад, кишкова паличка, що росте на середовищі, що не містить вуглевод лактозу, не виробляє фермент лактази, але якщо пересіяти її на середу з лактозою, то вона починає виробляти цей фермент. Адаптивні ферменти дозволяють пристосовуватися до певних умов існування.

Таким чином, модифікація – це спосіб пристосування мікроорганізмів до зовнішнього середовища, що забезпечує їм можливість рости та розвиватися в змінених умовах.

Генотипна мінливість може виникати в результаті мутацій і генетичних рекомбінацій. Мутації -це у спадок структурні зміни генів, що передаються у спадок. Великі мутації (геномні перебудови) супроводжуються випаданням або зміною щодо великих ділянок геному такі мутації, як правило, необоротні. Дрібні (точкові) мутації пов'язані з випаданням або додаванням окремих підстав ДНК. При цьому змінюється лише невелике число ознак. Такі змінені бактерії можуть повністю повертатися в початковий стан .

Бактерії зі зміненими ознаками називаються му- ТАНТА. Чинники, що викликають утворення мутантів, носять назву мутагенів. Бактеріальні мутації ділять на спонтанні та індуковані. Спонтанні (мимовільні) мутації виникають під впливом неконтрольованих чинників. Т. е. без втручання експериментатора. Індуковані (спрямовані) мутації з'являються в результатах обробки мікроорганізмів спеціальними мутагенами хімічними речовинами, випромінюванням, температурою). Внаслідок бактеріальних мутацій можуть відмічати: а) зміна морфологічних властивостей; б) зміна властивостей: в) виникнення у мікроорганізмів стійкості до лікарських препаратів; г) втрата здатності синтезувати амінокислоти, утилізувати вуглеводи та інші поживні речовини; д) ослаблення хвороботворних властивостей і т. д.

Якщо мутація призводить до того, що мутагенні клітини знаходять у порівнянні з іншими клітинами популяції переваги, то формуються популяція з мутант-них клітин і всі придбані властивості передаються про спадщину. Якщо ж мутація не дає клітині переваг, то мутантні клітини, як правило, гинуть, Генетичні рекомбінації. Трансформація клітини, які здатні сприйняти ДНК іншої клітини процесі трансформації, називаються компетентним і. Стан компетентності часто збігається з логарифмічною фазою зростання. Трансдукція- це перенесення генетичної інформації цієї (ДНК) від бактерії донора до бактерії реципієнту за участю бактеріофага.[14] Трансдукуючими властивостями володіють в основному фаги. Розмножуючись в бактеріальній клітці, фаги включають до складу своєї ДНК частина бактеріальної ДНК і передають її реципієнту. Розрізняють три типи трансдукції: загальну, специфічну і абортівні. 1. Загальна трансдукція-це передача різних генів, локалізованих на різних ділянках бактеріальної хромосоми. При цьому бактерії донори можуть передати реципієнту здатність утворювати нові ферменти, стійкість до лікарських препаратів і т. Д. 2. Специфічна трансдукція це передача фагом тільки деяких специфічних генів, локалізованих на спеціальних ділянках бактеріальної хромосоми. В

цьому випадку передаються тільки певні ознаки і властивості. 3. Abortивна трансдукція-перенісши фагом ка когось одного фрагмента хромосоми донора. Зазвичай цей фрагмент НЕ включається в хромосому клітини реципієнта, а циркулює в цитоплазмі. При розподілі клітини реципієнта цей фрагмент передається тільки однієї з двох дочірніх клітин, а другий клітині дістається незмінена хромосома реципієнта. різноманітні ознаки властивості-й За допомогою трансдукуючих фагів можна передати від однієї клітини іншої цілий ряд властивостей, таких як здатність утворювати токсин, суперечки, джгутики, продукції царювати додаткові ферменти, стійкість до лікарськими препаратів і т. д. Кон'югація-це передача генетичного матеріала від однієї бактерії до іншої при безпосередньому контакті клітин. Клітини, що передають генетичний мате-ріал, називаються донорами, що сприймають його-реципієнтами. Цей процес носить односторонній характер від клітини донора до клітини реципієнта.

1.3 Механізми дії антибіотиків

За механізмами протибактеріальної дії антибіотики поділяються на бактерицидну та бактеріостатичну.

Бактерицидна дія проявляється через те, що клітини гинуть, в наслідок порушення синтезу клітинної оболонки, порушення проникності мембрани мікробної клітини і як наслідок порушення транспорту речовин до клітини і з неї.

Бактеріостатична дія проявляється порушенням синтезу білка і затримки росту та розвитку клітини [24].

За спектром дії розрізняють:

Антибіотики вузького спектру дії:

Бензилпеніцилін, цефалоспарин, поліміксини, лінкоміцин.

Антибіотики широкого спектру дії:

Цефалоспорини, тетрацикліни, левоміцетини, аміноглікозиди.

Загибель мікроорганізмів відбувається поступово, гинуть не всі мікроорганізми, їхні спори зберігають життєдіяльність у присутності антибіотиків, але знижується інтенсивність розмноження та повністю зупиняється ділення. Через сповільнення розмноження мікроорганізми поступово вироджуються. Але даний процес не завжди закінчується вимиранням через виникнення резистентності [23].

За механізмом дії антибактеріальні препарати поділяють на:

1. Антибіотики, що порушують функцію стінки мікробної клітини: вони порушують біохімічні реакції у клітинних стінках.
2. Антибіотики, які порушують синтез ДНК, РНК або білків бактеріальної клітини. Антибіотики широкого спектру дії можуть негативно впливати на організм людини. Вони можуть порушувати нормальну мікрофлору кишківника, спричиняючи розлади шлунково – кишкового тракту, а також викликати вторинні інфекції. (рис. 1.1)

Антибіотики не можуть застосовуватися як засоби загальної дезінфекції.

Антимікробні препарати слугують причиною утворення багаточисельних варіантів мікробів зі слабковираженою патогенністю, які призводять до формування латентних форм інфекцій, що протікають з рецидивами і загостреннями. Вони важко піддаються діагностиці, терапії та профілактики.

Антибактеріальні речовини можуть викликати порушення генетичного апарату клітин макроорганізмів, обумовлювати хромосомні аберації, а деякі з них володіють тератогенною дією, яка призводить до виникнення каліцтв плода при застосуванні їх жінками у перші дні вагітності [4].

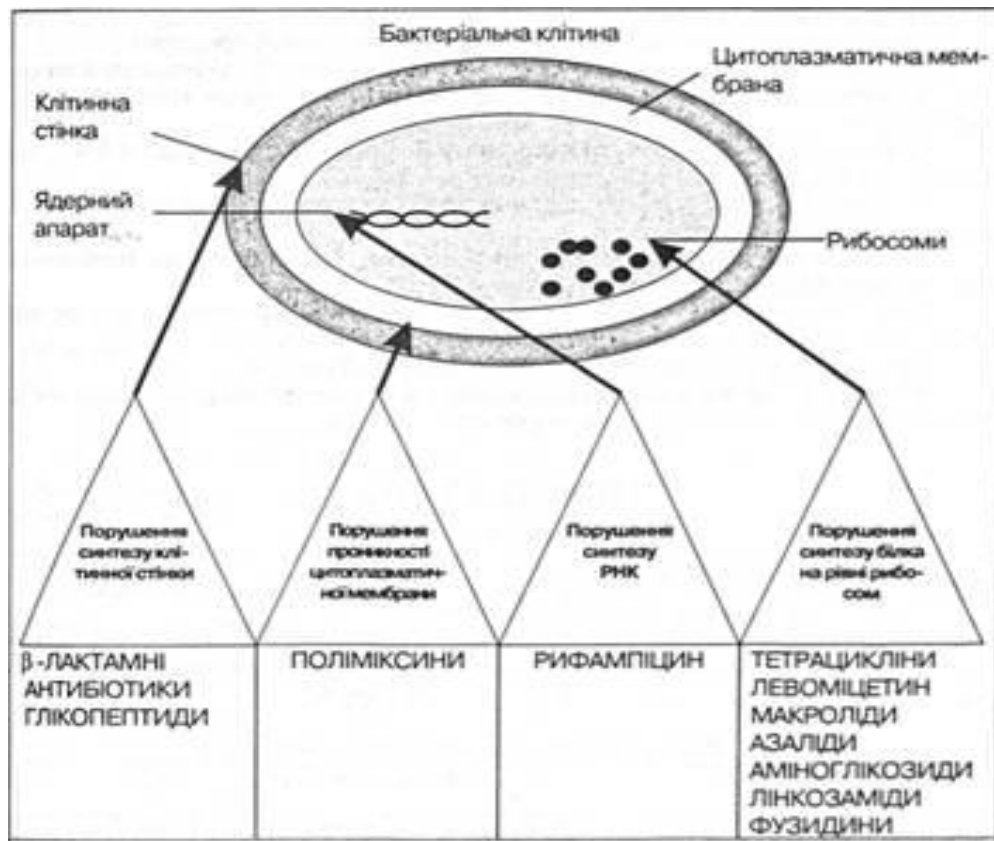


Рис. 1.1 – Механізми дії антибактеріальних препаратів

1.4 Механізм подолання антибіотикорезистентності

Еволюцію антибіотикорезистентності наочно демонструє процес формування стійкості *S.aureus* до основних класів антибактеріальних препаратів. У 1943 р. в клінічну практику було впроваджено пеніциліни, проте вже через рік їх активного застосування з'явилися перші повідомлення про резистентні штами стафілококів. У 1960-х роках було створено метицилін, а вже в 1970-х з'явилися метицилінрезистентні стафілококи. Поява ванкоміцину дозволила вирішити цю проблему, проте в 1997 р. було відмічено перші випадки помірної стійкості до препарату, а в 2002 р. з'явилися повністю ванкоміцинрезистентні штами. Таким чином, проблема резистентності мікроорганізмів до антибактеріальних препаратів є основним стимулом для створення нових антимікробних агентів [5].

На сьогоднішній день найбільш прийнятним виходом для подолання антибіотикорезистентності є раціональне, контрольоване використання

антибактеріальних препаратів. Введення контролю використання АБ препаратів дозволить стримувати розвиток резистентності, а також більш ефективно лікувати інфекційні захворювання. Професор факультету генетики і мікробіології Женевського університету Жан Клод Печер у своїх роботах писав: « Бактерії правлять світом, вони є домінуючою формою життя. Давайте пам'ятати про основний урок легенди про Давида і Голіафа. Щоб успішно боротися з бактеріями, потрібно навчитися поводити себе так, як вони. А бактерії завжди живуть і взаємодіють у популяції, для них характерні глобальні і скоординовані дії [37].

Традиційний підхід у лікуванні інфекційних захворювань в усіх медичних закладах базується на протоколах лікування, що мають обов'язкові умови. Починають емпіричне лікування з більш «простих» препаратів, «сильніші» препарати є резервом, який застосовують для лікування пацієнтів, стан яких є нестабільним та погіршується, внаслідок спричинення захворювання резистентними штамми мікроорганізмів.

Відповідна антибіотикотерапія (та, що забезпечує клінічне одужання) має особливі умови:

- Спектр дії відповідного антибіотику відповідає певному збуднику
- Антибіотик має бути здатним подолати механізм резистентності патогенного збудника
- Відповідний правильно підібраний режим дозування має забезпечувати у вогнищі запалення відповідної концентрації для загибелі збудника

Для досягання раціонального балансу між оптимальним ефектом та надмірним використанням препаратів використовують підходи для уніфікації. Основним методом є ступінчаста антибактеріальна терапія. Ступінчаста терапія актуальна при тяжкому перебігу захворювання і полягає в тому, що лікування повинне починатися з парентерального введення ефективного антибіотику, а при поліпшенні клінічного стану пацієнта необхідно в максимально короткі строки перейти на пероральний шлях прийому цього ж препарату [6].

Також важливими аспектами у антибіотикотерапії є:

- Врахування особливостей взаємодії препаратів. Якщо не враховувати особливості, це може збільшити ризики розвитку побічних реакцій або зменшити ефективність лікування.

- Дотримання рекомендацій відносно тривалості курсу лікування антибактеріальними препаратами. Часто термін призначений лікарями перевищує рекомендований. Основним завданням антибіотиків є знищення патогену, а не загальний вплив на патологічний процес розвитку запалення.

- Вибір антибіотиків повинен ґрунтуватися на знанні їх природної активності щодо передбачуваних або встановлених збудників захворювання, а також на локальних і регіональних даних про резистентність мікроорганізмів. [7]

- Призначатися мають препарати з доведеною клінічною ефективністю

- Ефективність лікування буде вищою при своєчасному початку антибактеріальної терапії.

- Дозування та тривалість курсу мають бути оптимальними та адекватними, а також важливим є своєчасна оцінка ефективності антибіотика (48 – 72 години від початку лікування)

- Врахування особливостей людини (перебіг захворювання, імунодефіцитні стани, супутні захворювання, поведінкові стеріотими) при виборі антибіотику і проведення терапії. [1]

З метою подолання труднощів, що виникають при терапії інфекційних захворювань, останнім часом почали робити спроби застосовувати антиферментні сироватки, які нейтралізують ферменти, що згубно діють на антибіотики.

У доповіді ВООЗ наголошується, що ключові засоби, що дозволяють протидіяти стійкості до антибіотиків, такі як базові системи відстеження та контролю за цією проблемою, характеризуються певними недоліками або просто не існують в багатьох країнах. Хоча деякі країни зробили важливі

кроки щодо вирішення цієї проблеми, проте кожна країна і кожна людина повинні робити більше.

Інші важливі заходи включають профілактику інфекцій на самому початковому етапі - за рахунок кращої гігієни, доступу до чистої води, боротьбі з інфекціями в медико-санітарних установах і вакцинації з метою зниження потреби в антибіотиках. ВООЗ також звертає увагу на необхідність розробки нових засобів діагностики антибіотиків та інших засобів, які дозволяють б фахівцям громадської охорони здоров'я бути готовими до виникнення лікарської стійкості.

Ця доповідь є початковий етап, який повинен активізувати глобальні зусилля під керівництвом ВООЗ щодо вирішення проблеми лікарської стійкості. Це передбачає розробку відповідних коштів і стандартів і підвищення ефективності співробітництва у всьому світі з метою відстеження лікарської стійкості, вимірювання її впливу на здоров'я людей і економіку і розробки цілеспрямованих рішень.

Державні заходи для боротьби з антибіотикорезистентністю

6 березня Кабінет Міністрів України затвердив Національний План дій боротьби зі стійкістю до протимікробних препаратів. Його розробкою займались МОЗ України та Центр громадського здоров'я.

Для комплексної боротьби із проблемою до розробки низки нормативно-правових актів МОЗ України залучило інші міністерства.

Для забезпечення раціонального використання антибіотиків у медицині, ветеринарній медицині та харчовій промисловості МОЗ України зосередило свою увагу на розробці чітких інструкцій медикам і ветеринарам, що допоможуть мінімізувати ризики невиправданого використання протимікробних препаратів.

Посилення контролю за рецептурним відпуском антибіотиків в аптеках.

Обмеження застосування протимікробних препаратів у якості стимуляторів росту у тваринництві, птахівництві та рослинництві.

Впровадження дієвої системи епідеміологічного нагляду за антимікробною резистентністю.

Синхронізація методів дослідження та діагностики для визначення стійкості до протимікробних препаратів зі стандартами Європейського Союзу дозволить Україні ефективно боротися з цією проблемою.

У ВООЗ наголошують, що навіть якщо винайдуть нові покоління ефективних ліків, загроза антибіотикорезистентності залишиться, якщо не зміниться поведінка кожного з нас [10].

1.5 Антагонізм мікробів та антибіотики

Явище мікробного антагонізму можна спостерігати при вирощуванні у поживному середовищі мікробів двох різних видів, якщо один з них проявляє здатність пригнічувати ріст та розмноження іншого.

Найбільш поширений метод виявлення антагонізму на щільному живильному середовищі. За цим методом 2% агар на бульйоні Хоттингера або інший живильному середовищі, яка застосовується в даній лабораторії, розливають в чашки Петрі по 15-20 мл. На поверхні застиглому агару засівають радіальними штрихами передбачувані штами-антагоністи (до чашки Петрі поміщають в термостат при 28 ° С на 48 год (середовище а умови вирощування можуть змінюватися в залежності від властивостей досліджуваного мікроба). Після закінчення цього терміну між вирости смужками штаму-антагоніста засівають переривчастим кругом культури тих мікробів, по відношенню до яких очікується прояв антагоністичної дії (тест-мікроб). Напівкруглі смужки ніде не повинні стикатися з радіальними, вони повинні бути відсутніми на 1-2 мм. Чашки знову ставлять в термостат на добу, після чого враховують результати досвіду. Якщо серед досліджуваних різних штамів наявний штаму-антагоніст, зростання тест-мікроба а штаму є ділянки його зростання відсутній.

Якщо випробування на антагоністичні властивості піддають тільки один штам, а тест-мікробів кілька, то досліджуваний штам засівають смужкою по діаметру чашки Петрі, а перпендикулярно до неї, також на відстані 1-2 мм, засівають смужками тест-штамів. Величина зон затримки росту тест-культур може бути різною і при вираженій антагоністичній дії досягати 20 мм і більше.

Рідке живильне середовище після вирощування в ній мікробе-антагоніста, як правило, набуває антагоністичні властивості, характерні для випробуваного штаму, і може служити для виділення ступеня його антагоністичної активності. З цією метою культуральну рідину, звільнену фільтруванням від досліджуваного мікроба, змішують в рівних кількостях з поживним агаром в пробірках, Агар скошують і на його застиглу поверхню засівають тест-мікроб. Пробірки ставлять в термостат і через добу враховують результат. Відсутність зростання на поверхні агара свідчить про наявність антагоністичної дії. У цьому випадку доцільно повторити випробування, додаючи до агару ряд послідовних дворазових розведень культуральної рідин дистильованою водою. Остання пробірка з відсутністю росту тест-мікроба визначатиме силу антагоністичного дії випробуваного штаму. Контролем в цих дослідках повинна стати засіяна тест-мікробом пробірка, в якій агар змішаний у рівних обсягах з дистильованою водою. Результати дослідів бути враховані за умови наявності в контролі нормального росту тест-мікроба. Більш простим і досить демонстративним методом визначення антагонізму є нашарування культуральної рідини випробуваного мікроба на поверхню напіврідкого (0,5%) поживного агару, засіяного тест-мікробом, Після витримання пробірки протягом доби в термостаті в напіврідкому агарі можна відзначити наявність світлої зони, де зростання тест-мікроба пригнічений дифундуючими з поверхні в нижні шар речовинами, що мають антагоністичну дію.

Визначення активності антибіотиків. Явище антагонізму мікробів знайшло широке застосування в практиці виробництва антибіотиків.

Антибіотики-природні сполуки, утворені переважно рослинними мікроорганізмами. Висока виборча біологічна активність відносінні хвороботворних мікробів дозволила використовувати їх для знищення збудників хвороби або хоча б помітного придушення їх життєдіяльності. Більшу частину застосовуваних в даний час антибіотиків утворюють актиноміцети (променисті грибки), проте перший і дуже широко досі застосовується антибіотик пеніцилін утворюється цвілевим грибом. В процесі виробництва препарати антибіотиків піддаються складній хімічній очистці.

Багато з цих препаратів в настоюванні брешемо я є властивості яких досконально вивчені. У лікувальну мережу речовина відомої хімічної природи, і антибіотиків надходять тільки після контролю активності, нешкідливості, стерильності і інших показників. Завданням практичних бактеріологічних лабораторій є НЕ перевірка одержуваних препаратів антибіотиків, а визначення концентрацій антибіотиків в крові, сечі інших рідинах організму (іноді в тканинах), а також визначення чутливості до антибіотиків виділених від хворого.

Існують хімічні і біологічні методи кількісного визначення вмісту антибіотиків. З огляду на те, що хімічні методи нерідко виявляють не тільки біологічно активні антибіотики, а й утворені в організмі продукти їх розпаду, іноді позбавлені антимікробних властивостей, виділення концентрацій антибіотиків в рідинах і тканинах організму проводять зазвичай біологічним методом, заснованим на вимірюванні інтенсивності прямого впливу антибіотика на живу клітку. Найбільш точні результати дає метод, заснований на здатності мікробом, пригнічувати ріст останнього. тест-мікроба залежить від концентрації антибіотика в досліджуваному субстраті (кров, сеча і т. п.). Діаметри отриманих зон порівнюють величинами зон, що утворюються при нанесенні кількостей стандартного препарату.

Антибактеріальна активність антибіотиків виражається одиницях дії. Для більшої частини антибіотиків (стрептоміцин, тетрациклін, неоміцин,

канаміцин, гентаміцин, еритроміцин, рифампіцин та ін.) 1 ОД відповідає мкг, а 1000 ОД- 1 мг хімічно чистого препарату. Для деяких антибіотиків (пеніцилін, поліміксин, ністатин) одиниці дії мають інше. Визначення концентрацій антибіотиків в біологічних субстратах проводять в чашках Петрі однакового діаметра з рівним і плоским дном. У чашки, встановлені на горизонтальному стовесовое вираз. лику, відрегульована по рівню, наливають необхідну ко (найчастіше 15 мл) розплавленої живильного середовища певного складу, зараженої тест-культурою. У деяких випадках (наприклад, при визначенні змісту пеніциліну) в чашки Петрі спочатку наливають 10 мл голодного незараженої агару і тільки після застигання цього шару агару на нього вносять 5-10 мл живильного середовища, зараженої відповідної тесть культурою. Якщо культура є суспензію вегетативних клітин, температура розплавленої середовища в момент засіву не повинна перевищувати 48-50 ° С, при використанні суспензії спор 65-70 ° С. Для кожної нової партії живильного середовища кожної нової серії ліофільно-висушеної культури підбирають оптимальні умови проведення досвіду: товщину шару агару і кількість мікробної суспензії, необхідне для отримання зростання культури

РОЗДІЛ 2

Об'єкти та методи дослідження резистентності до антибіотиків

2.1 Об'єкти дослідження

Під час роботи над кваліфікаційним проектом при проводили дослідження. Об'єктом нашого дослідження є розвиток у мікроорганізмів резистентності до антибіотиків. Для цього ми використовували музейний штам *E. Coli*, на який ми впливали різними концентраціями стрептоміцину та бензилпеніциліну.

Для дослідження нами було обрано *E. Coli* з огляду на те, що дана бактерія є найбільш використовуваною у лабораторних дослідженнях і використовується як модельний об'єкт для вивчення бактерій загалом.

Бактерії групи *Escherichia coli* мають складну будову антигену. У своєму складі вони мають три антигени: соматичний, джгутиковий і капсульний. У цій групі бактерій зустрічаються різні серотипи (патогенні, умовно патогенні, непатогенні - ті, що несуть користь організму людини). Серологічна типізація по соматичному антигену дозволяє відрізнити патогенні штами від непатогенних. *E. Coli* здатні чинити антагоністичну дію на сибіроязвові та дизентерійні палички. Кишкова паличка відрізняється поліморфізмом, існують рухливі та нерухливі типи. Умовно патогенні штами містять гліюцидо – ліпідний – протеїновий комплекс, з яким пов'язана токсичність, антигенність та імуногенність. Ряд штамів володіє гомолітичними властивостями. Окрім ендотоксинів у патогенних культур існують термо – лабільні нейротропні екзотоксини. Вони накопичуються в бульйонних культурах на 2 – 4 день росту, у той час, коли ендотоксини з'являються після 20 – денного культивування. Із патогенних штамів було виділено гемотоксини і пірогенні речовини, протеїнази, дезоксирибонуклеази, уреаза, фосфатаза, гіалуронідаза, декарбоксилази амінокислот. Через здатність кишкової палички знаходитися поза організмом невеликий проміжок часу,

вона є індикатором фекальних забруднень у середовищі, але на даному етапі існують певні екологічно стійкі штами, що можуть існувати більш тривалий проміжок часу. Виявлення кишкової палички відіграє важливу роль у виявленні санітарного показника фекального забруднення води, продуктів, ґрунту, напоїв предметів, змивів з рук.

Для дослідження ми обрали антибіотики різних груп. Бензилпеніцилін є представником пеніцилінів. Механізм дії полягає у пригніченні біосинтезу клітинної стінки. При внутрішньом'язовому введенні максимальна концентрація у крові спостерігається через 30 – 60 хвилин, через 3 – 4 години у крові спостерігається сліди препарату. Бензилпеніцилін повільно всмоктується і надає пролонговану дію. Після одноразової ін'єкції у вигляді суспензії терапевтична концентрація бензилпеніциліну в крові зберігається до 12 год. Зв'язування з білками крові становить 60%. Добре проникає в органи, тканини і біологічні рідини, за винятком ліквору.

Стрептоміцин – представник аміноглікозидів. Його бактерицидна дія заснована на зв'язуванні з 30S-субодиницею бактеріальної рибосоми, що каталізує пригнічення синтезу білка. Стрептоміцин застосовують з метою впливу на кишкову флору. Вводять внутрішньом'язово. Проникає у клітини за рахунок активного транспорту та пасивної дифузії, яка посилюється засобами, що порушують синтез клітинної мембрани (наприклад пеніцилінами). Необоротно зв'язується зі специфічними білками-рецепторами на 30S субодиниці рибосом. Порушується утворення ініціюючого комплексу між матричної РНК і 30S субодиницею рибосоми. В результаті виникають дефекти при зчитуванні інформації з матричної (інформаційної) РНК, синтезуються неповноцінні білки. Полірібосоми розпадаються і втрачають здатність синтезувати білок, пошкоджуються цитоплазматичні мембрани і клітина гине.

2.2 Диско – дифузійний метод (ДДМ) дослідження резистентності

За наказом Міністерства охорони здоров'я України існує декілька методів: Метод серійних розведень у бульйоні; метод серійних розведень у агарі та диско – дифузійний метод. Найбільш використовуваним є диско – дифузійний метод, тому що він є економним та дає менший відсоток похибки.

Диско-дифузійний метод (далі — ДДМ). Метод оснований на здатності АБП дифундувати з просочених ними паперових дисків в поживне середовище і пригнічувати ріст мікроорганізмів, посіяних на поверхні агару.

Для визначення чутливості ДДМ використовують поживні середовища такі ж, як і для методу розведень в агарі, а тому використовуються і ті ж методи контролю їх якості. Щільне поживне середовище готують відповідно до інструкції виробника, розливають у чашки Петрі шаром товщиною $4,0 \pm 0,5$ мм, попередньо виставивши їх на горизонтальну поверхню (вивірену рівнем, без западин і опуклостей).

Це вкрай важливо, оскільки розмір і форма зони пригнічення росту залежать від глибини і рівномірності агарового шару. Чашки залишають при кімнатній температурі для застигання. Зберігати чашки можна запаєними в поліетиленові пакети при 4–8 °С протягом 5 діб. Перед інокуляцією чашки підсушують у термостаті при 35 °С з привідкритою кришкою протягом 10–20 хв. Конденсату рідини на внутрішній поверхні кришок не повинно бути.

Диски з антибіотиками. Для визначення чутливості ДДМ використовують тільки стандартизовані якісні диски. Виготовлення дисків з АБП для визначення чутливості диско-дифузійним методом в лабораторних умовах не допускається [21].

Достовірність результатів дослідження залежить також від умов зберігання готових комерційних дисків, оскільки вміст в них антибіотиків може знизитися нижче допустимого рівня до закінчення терміну придатності.

Зберігати диски з АБП тривалий термін слід в герметичній упаковці в морозильній камері при температурі $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ і нижче.

Невеликі партії дисків, що використовуються в повсякденній роботі, можна тримати в холодильнику при температурі $4\text{--}8\text{ }^{\circ}\text{C}$, щільно закупореними, щоб гарантувати неможливість попадання у флакон вологи, крім того, для додаткового захисту від вологи флакони (картриджі) з дисками комерційного виготовлення містять спеціальний вологопоглинач (силікагель). Флакони (картриджі) з дисками слід витримувати перед використанням герметично закритими до досягнення ними кімнатної температури протягом 1 години, що запобігає утворенню конденсату на дисках після відкриття флаконів[21].

Приготування бактерійної суспензії і інокуляція. При визначенні чутливості ДДМ використовують стандартний інокулюм, що відповідає 0,5 за стандартом Мак-Фарланда, тобто містить приблизно $1,5 \cdot 10^8$ КУО/см³. Інокулюм слід використовувати протягом 15 хвилин з моменту приготування. Для інокуляції чашок з агаром можна використовувати два способи.

1. Стерильний ватний тампон (комерційного виготовлення) занурюють у підготовлену суспензію мікроорганізму, надлишок інокулюма відтискають об стінки пробірки. Інокуляцію проводять штриховими рухами у трьох напрямках, повертаючи чашку Петрі на 60° .

2. Стандартний інокулюм наносять піпеткою на поверхню чашки Петрі з поживним середовищем в об'ємі 1–2 см³, рівномірно розподіляють по поверхні похитуванням, надлишок інокулюма видаляють піпеткою. Привідкриті чашки підсушують при кімнатній температурі протягом 10–15 хв.

На поверхню ПС наносять диски з АБП. Аплікацію дисків проводять за допомогою стерильного пінцета або автоматичного диспенсора. Відстань

від диска до краю чашки і між дисками повинна бути 15–20 мм, тобто на одну чашку діаметром 100 мм слід поміщати не більше 6 дисків з АБП.

Диски повинні рівномірно контактувати з поверхнею агару, для чого їх слід акуратно притиснути пінцетом.

Відразу після аплікації дисків чашки Петрі поміщають в термостат догори дном і інкубують при температурі 35 °С протягом 18–24 год (в залежності від виду досліджуваного мікроорганізму). Збільшення інтервалу часу між нанесенням дисків на поверхню середовища і початком інкубації, а отже і початком росту досліджуваної культури, приводить до «переддифузії АБП» в агар і до збільшення діаметра зони пригнічення росту.

Облік результатів. Після інкубації чашки поміщають догори дном на темну матову поверхню так, щоб світло падало на них під кутом 45° (облік у відбитому світлі). Діаметр зон затримки росту виміряють з точністю до 1 мм (бажано користуватися штангенциркулем або кронциркулем).

При вимірюванні зон затримки росту орієнтуються на зону повного пригнічення видимого росту. Не слід звертати увагу на дуже дрібні колонії, які виявляються в межах зони затримки росту тільки за особливих умов освітлення або збільшення, і ледь помітний наліт біля краю зони. Винятком є результати визначення чутливості стафілококів до оксациліну, коли необхідно враховувати і найдрібніші колонії, виявлені в межах чіткої зони пригнічення росту.

Крупні колонії в межах чіткої зони пригнічення росту свідчать про наявність сторонньої мікрофлори або про гетерорезистентність популяції мікроорганізмів, в цьому випадку необхідно повторити ідентифікацію мікроорганізму, що формує цю колонію, і визначення чутливості цього штаму.

При визначенні чутливості ДДМ штамів протейів, що рояться, зона пригнічення росту може бути зтягнутою тонкою вуалеподібною плівкою, яка не заважає встановленню межі зони і не враховується при реєстрації результатів [21].

При визначенні чутливості до сульфаніламідів і їх комбінації з триметопримом межу зони пригнічення росту враховують на рівні

пригнічення росту на 80 %. Це пов'язано з тим, що під дією цих препаратів перед повним пригніченням росту можливо завершення 1–2 циклів проліферації мікроорганізму.

Для ідентифікації і тестування чутливості мікроорганізмів до антибіотиків можна використовувати мікробіологічні аналізатори, зареєстровані і дозволені до використання в Україні.

Метод серійних розведень в агарі дозволяє одночасно визначити МІК партії штамів (до 30 клінічних штамів). Для дослідження висівають штами мікроорганізму на чашки Петрі з агаром, що містить послідовні подвійні розведення антибіотика. Паралельно тестують відповідні контрольні штами, а також контролюють ріст мікроорганізмів на чашках без АБП і чистоту культури.

Для приготування серійних розведень АБП з основного розчину досліджуваного препарату готують робочий розчин в концентрації, яка в 10 разів перевищує використану максимальну для конкретного дослідження. Потім готують серію двократних розведень робочого розчину. Для приготування серії розведень використовуються стерильні хімічно інертні лабораторні ємності з кришками об'ємом не менше 10 см³ (для зручності розмішування).

Поживне середовище готують відповідно до інструкції виробника. Після автоклавування колби з ПС поміщають на водяну баню при 48–50 °С, де витримують до досягнення вказаної температури, після чого в них асептично вносять 1 частину робочого розчину АБП на 9 частин розплавленого агару і, при необхідності, термолабільні поживні добавки. Середовище ретельно перемішують і розливають у чашки Петрі.

Можна готувати чашки Петрі з агаром, що містить розведення АБП, змішуючи ПС і розчин препарату безпосередньо в чашці Петрі. Для цього чашки заздалегідь маркують, вказавши препарат і його концентрацію. У стандартні пластикові чашки діаметром 90 мм вносять 2 см³ розчину АБП і додають 18 см³ нагрітого до 50 °С рідкого агару. Ретельно перемішують агар

плавними різноспрямованими круговими рухами чашки. Після приготування чашок агар повинен затвердіти в горизонтальному положенні. Не можна різко пересувати, переносити чашки до повного застигання агару. Паралельно з чашками Петрі, що містять розчини антибіотиків, для контролю росту готують чашки Петрі без антибіотиків. Чашки залишають при кімнатній температурі для застигання і підсушування на 10–12 год.

Приготовані таким чином чашки Петрі слід використовувати негайно, проте допускається зберігання в запаяних поліетиленових пакетах при 4–8 °С до 5 діб (крім чашок, що містять бета-лактамі антибіотики).

Стандартну мікробну суспензію, яка відповідає стандарту 0,5 за Мак-Фарландом розводять у 10 разів. Отриману суспензію необхідно інокулювати на поверхню агару протягом 15 хв з моменту приготування, при цьому утворюється пляма діаметром 5–8 мм. Для контролю якості приготування суспензій періодично проводять підрахунок реальних КУО шляхом висіву зразка приготованого інокулюма на неселективні поживні середовища.

Після інокуляції чашки залишають при кімнатній температурі для підсихання, перевертають їх і інкубують при температурі 35 °С протягом 18–24 год (в залежності від виду досліджуваного мікроорганізму).

Облік результатів проводять, помістивши чашку на темну поверхню, що не відбиває світло. Концентрація, що викликала повну інгібіцію видимого росту, є МІК [21].

Для диференціювання ніжного росту від нальоту, що залишився після інокулята, доцільно використовувати стереомікроскоп. Наявність однієї колонії на чашці з концентрацією на 1 розведення вище, ніж явна МІК, можна не враховувати.

При постановці методів серійних розведень в агарі обов'язково проводять контроль росту культури на чашці Петрі з поживним середовищем, яке не містить АБП і чистоти культури. Кожне тестування штамів супроводжується внутрішнім контролем якості дослідження з використанням відповідних контрольних (референсних) штамів.

Методи серійних розведень є найточнішими і найінформативнішими, проте їх постановка в практичних лабораторіях пов'язана зі значними методичним труднощами: необхідність використання субстанцій антибіотиків з відомим рівнем активності, суворого дотримання режимів зберігання, ретельного виконання контролю якості поживних середовищ, трудомісткості приготування робочих розчинів антибіотиків.

Використання тест-систем на основі методу мікророзведень дозволяє уникати трудомістких процедур стандартизації підготовчих етапів і при цьому забезпечує отримання достовірних кількісних результатів щодо рівня антибіотикорезистентності [21].

РОЗДІЛ 3

Дослідження розвитку резистентності до антибіотиків при їх довготривалому впливі на мікроорганізми

3.1 Дослідження із вирощування антибіотикорезистентних культур E. Coli

При постановці досліду слід використовувати чисту культуру мікроорганізмів. Зважаючи на те, що умови постановки досліду активно впливають на ступінь чутливості мікроорганізмів, то для того, щоб отримати достовірні результати необхідно чітко дотримуватися правил постановки досліду: витримувати температурні норми, не допускати контамінації поживного середовища.

Для проведення дослідження нам необхідно:

2 флакони бензилпеніциліну

2 флакони стрептоміцину

20 мл шприц

6 інсулінових шприців

10 чашок Петрі

Розчин натрію хлорид (фізіологічний розчин)

Чиста культура E. Coli

Поживне середовище Ендо, склад: агар поживний сухий, вітамінний препарат «ЕКД», лужний фуксин, цукор молочний, динатрію фосфат, сульфат натрію безводний, натрій вуглекислий.

Алгоритм проведення досліду:

- приготувати поживне середовище.
- Підготувати 10 чашок Петрі: миємо та стерилізуємо.
- У дві чашки Петрі наливаємо поживне середовище – контрольні чашки без антибіотиків.
- Підготвуємо чашки Петрі з бензилпеніциліном.

- До поживного середовища додаємо бензинпеніцилін з концентрацією 500 000 Од.
- Наливаємо готове поживне середовище у чашку Петрі, підписуємо її.
- За допомогою фізичного розчину розбавляємо бензинпеніцилін до концентрації 50 000 Од, додаємо його до поживного середовища.
- Наливаємо готове поживне середовище у чашку Петрі, підписуємо її.
- За допомогою фізичного розчину розбавляємо бензинпеніцилін до концентрації 5000 Од, додаємо його до поживного середовища.
- Наливаємо готове поживне середовище у чашку Петрі, підписуємо її.
- За допомогою фізичного розчину розбавляємо бензинпеніцилін до концентрації 500 Од, додаємо його до поживного середовища.
- Наливаємо готове поживне середовище у чашку Петрі, підписуємо її.
- За допомогою фізичного розчину розбавляємо бензинпеніцилін до концентрації 50 Од, додаємо його до поживного середовища.
- Наливаємо готове поживне середовище у чашку Петрі, підписуємо її.
- Підготовуємо поживне середовище зі стретоміцином
- До поживного середовища додаємо бензилпеніцилін концентрацією 1000 мг/ мл
- За допомогою фізичного розчину розбавляємо стрептоміцин до концентрації 100 мг/мл, додаємо його до поживного середовища.
- Наливаємо готове поживне середовище у чашку Петрі, підписуємо її.
- За допомогою фізичного розчину розбавляємо стрептоміцин до концентрації 10 мг/мл, додаємо його до поживного середовища.
- Наливаємо готове поживне середовище у чашку Петрі, підписуємо її.
- Необхідно поставити чашки з відкритою кришкою на 30 хвилин для того, щоб вони висохли, потім накрити кришкою.
- Після підготовки робимо посів на контрольні чашки, та на чашки з найменшою концентрацією антибіотику(стрептоміцин – 10 мг/мл, бензилпеніцилін – 50 Од).
- Підготувати культуру до посіву.

- Проводимо посів: бактеріологічну петлю прокалюємо над полум'ям спиртівки, в іншій руці тримаємо чашку Петрі, петлю необхідно охолодити об стінку чашки, забираємо матеріал, вилучений матеріал водимо в чашку Петрі з чистим поживним середовищем та з середовищем з мінімальною концентрацією антибіотика, після цього накриваємо чашку кришкою, щоб запобігти контамінації культури з іншими мікроорганізмами, потім прокалюємо петлю, щоб видалити залишки культури [13].

- Після посіву відправляємо чашки Петрі до термостату.

- На 4 день дістаємо чашки з термостату і робимо мазок.

- Приготування мазка:

- На чисте знежирене скло необхідно нанести краплю води.

- Бактеріологічну петлю прокалюємо над спиртівкою, з чашки беремо невелику кількість мікробної та вносимо у краплю води.

- Краплю розмазуємо петлею по скельцю.

- Просушуємо мазок.

- Препарат необхідно зафіксувати над полум'ям.

- Забарвлюємо препарат.

- Поміщаємо препарат на препаратотримач, наносимо барвник на декілька хвилин, після чого промиваємо, висушуємо.

- Мікроскопуємо препарат.

На чашках Пері з найменшою концентрацією спостерігався достатньо активний ріст бактерій.

- Після чого, пересіваємо культури на чашки з більш високою концентрацією антибіотиків. (стрептоміцин – 100 мг/мл, бензилпеніцилін – 500 Од)

- Після посіву відправляємо чашки Петрі до термостату.

- На 4 день дістаємо чашки з термостату і робимо мазок.

- Приготування мазка:

- На чисте знежирене скло необхідно нанести краплю води.

- Бактеріологічну петлю прокалюємо над спиртівкою, з чашки беремо невелику кількість мікробної та вносимо у краплю води.

- Краплю розмазуємо петлею по скельцю.

- Просушуємо мазок.

- Препарат необхідно зафіксувати над полум'ям.

- Забарвлюємо препарат.

- Поміщаємо препарат на препаратотримач, наносимо барвник на декілька хвилин, після чого промиваємо, висушуємо.

- Мікроскопуємо препарат.

На чашках Петрі зі стрептоміцином спостерігається зниження росту культури, але ріст присутній, На чашках Петрі з бензилпеніциліном спостерігається активний ріст.

- Після чого, пересіваємо культури на чашки з більш високою концентрацією антибіотиків. (стрептоміцин – 1000 мг/мл, бензилпеніцилін – 50000Од)

- Після посіву відправляємо чашки Петрі до термостату.

- На 4 день дістаємо чашки з термостату і робимо мазок.

- Приготування мазка:

- На чисте знежирене скло необхідно нанести краплю води.

- Бактеріологічну петлю прокалюємо над спиртівкою, з чашки беремо невелику кількість мікробної та вносимо у краплю води.

- Краплю розмазуємо петлею по скельцю.

- Просушуємо мазок.

- Препарат необхідно зафіксувати над полум'ям.

- Забарвлюємо препарат.

- Поміщаємо препарат на препаратотримач, наносимо барвник на декілька хвилин, після чого промиваємо, висушуємо.

- Мікроскопуємо препарат.

На чашках Петрі зі стрептоміцином майже відсутній ріст бактерій. На чашках з бензилпеніциліном спостерігається досить активний ріст.

Бензилпеніцилін більш активно впливає на *E. Coli* у великих концентраціях, тому створення резистентної культури при впливі малих концентрацій є більш вірогідним.

Цей дослід показує можливість природного створення мікроорганізмів, що будуть стійкими до різних типів антибіотиків.

Він свідчить про те, що ця серйозна небезпека вже не є лише прогноз на майбутнє, оскільки вона вже проявляється прямо зараз в кожному регіоні світу і може негативно позначитися на кожному, незалежно від віку, в кожній країні. Стійкість до антибіотиків - явище, коли бактерії змінюються настільки, що антибіотики більше не мають жодного впливу на організм людей, які потребують їх для боротьби з інфекцією, і це зараз одна з найсерйозніших загроз для здоров'я людей.

У 10 країнах (Австралія, Австрія, Канада, Франція, Японія, Норвегія, Словенія, Південна Африка, Швеція та Сполучене Королівство Великої Британії та Північної Ірландії) вже зафіксовані випадки неефективного лікування гонореї препаратами “останньої надії” (III покоління антибіотиків цефалоспоринів) [11].

3.2 Динаміка виділення *E. Coli* у м. Херсоні за 2017 – 2019 роки

Дослідження проводилося на базі мікробіологічної лабораторії херсонського міськрайонного відділу ДУ «Херсонський обласний лабораторний центр МОЗ України»

Нами було проведено дослідження з обробки статистичних даних виділення *E. Coli* з сечі та ран.

У таблиці Виділення *E. Coli* в стаціонарах м. Херсона показана кількість виділених проб за 2016 – 2018 роки.

Таблиця 3.1

Виділення E. Coli в стаціонарах м. Херсона

Роки	Всього з ран	В т. г. полі резистентності	Всього з сечі	В т. г. полірезистентності
2017	6	1	184	20
2018	4	1	169	12
2019	6	1	181	14

За три роки кількість виділених культур відрізняються не суттєво. У відсотковому співвідношенні кількість виділених культур, у тому числі і резистентних культур виділених із сечі становить 8,9 %, а з ран близько 0,09 %.

Стійкість до препаратів для лікування, використовуваним як крайній захід в разі інфекцій, що загрожують життю людей, які викликаються звичайними кишковими бактеріями *Klebsiella pneumonia* (антибіотики групи карбапенеми), набуває поширення в усіх регіонах світу. *K. pneumonia*- одна з найважливіших причин лікарняних інфекцій, таких як пневмонія, інфекції крові, інфекції серед новонароджених і хворих, які перебувають у відділеннях реанімації. У деяких країнах антибіотики групи карбапенеми не роблять ніякого впливу через стійкості на більш ніж половину людей, які піддаються лікуванню від інфекцій *K. pneumoniae*[3].

Стійкість до одного з найбільш широко поширених протибактерійних засобів (фторхинолонам), використовуваних для лікування інфекцій сечовивідних шляхів, причиною яких є *E. coli*, також отримала широке поширення. У 1980-х роках, коли ці лікарські засоби були вперше введені в практику, стійкість практично дорівнювала нулю. Сьогодні є країни в багатьох частинах світу, в яких це лікування зараз неефективно для більш половини пацієнтів.

Випадки відсутності ефекту лікування гонореї засобами, призначеними як «крайній захід» (цефалоспорини третього покоління), підтверджені в Австралії, Австрії, Канаді, Норвегії, Словенії, Об'єднаному Королівстві, Швеції, Франції, Південній Африці і Японії. Гонореєю інфікується щодня в нашому світі більше одного мільйона чоловік [27].

Стійкість до антибіотиків призводить до того, що люди хворіють протягом більш тривалого часу, і вірогідність смертельного результату підвищується. Наприклад, за оцінками, ймовірність смерті людей, інфікованих MRSA (метицилін-стійкі бактерії *Staphylococcus aureus*) на 64% вище в порівнянні з людьми з лікарсько-нестійкою формою інфекції. Стійкість також призводить до збільшення витрат на медичну допомогу в результаті більш тривалого перебування в стаціонарах і передбачає необхідність більш інтенсивного лікування.

3.3 Дослідження резистентності до антимікробних препаратів *E. Coli*

Дослідження проводилося на базі мікробіологічної лабораторії херсонського міськрайонного відділу ДУ «Херсонський обласний лабораторний центр МОЗ України».

Таблиця 3.2

Резистентність до антимікробних препаратів *E. Coli*

Антибак- теріальні препарати	2017 рік		2018 рік		2019 рік	
	Кіл- сть ізоляті в	З них резистентни х	Кіл- сть ізоляті в	З них резистентни х	Кіл- сть ізоляті в	З них резистентни х
Амоксицилін	80	13	175	41	185	71
Ампіцилін/ Сульбактам	26	8	175	124	81	34

Амоксицилін/ Клавуланат	54	12	-	-	94	44
Меропенем	7	3	15	1	12	4
Іміпенем	5	2	-	-	-	-
Цефуроксим	12	7	15	4	12	1
Цефоперазон	12	5	-	-	-	-
Цефотаксим	57	7	144	26	75	19
Цефтриаксон	23	5	61	21	100	24
Цефиксим	80	13	175	36	185	58
Цефепім	12	8	15	2	12	7
Гентаміцин	80	11	175	21	185	20
Амікацин	12	8	15	3	12	2
Ципрофлоксаци н	11	7	-	-	10	1
Офлоксацин	37	12	94	14	61	9
Норфлоксацин	32	18	81	18	67	9
Фосфоміцин	10	-	-	-	-	-
Фурадонін	3	1	15	3	12	2
Усього	461	121	1155	314	1103	305

Для дослідження ми обрали 18 антибактеріальних препаратів (Амоксицилін, Ампіцилін/Сульбактам, Амоксицилін/ Клавуланат, Меропенем, Іміпенем, Цефуроксим, Цефоперазон, Цефотаксим, Цефтриаксон, Цефиксим, Цефепім, Гентаміцин, Амікацин, Ципрофлоксацин, Офлоксацин, Норфлоксацин, Фосфоміцин, Фурадонін), які використовуються для лікування захворювань викликаних патогенними штамми кишкової палички.

За обробленою статистикою висока резистентність визначена до амоксициліну, ампіциліну, цефтриаксону, цефиксиму. Дані дослідження наведені у таблиці Резистентність до антимікробних препаратів E. Coli

Дані дослідження санітарно – епідеміологічної служби України, яке проводилося протягом 2008 -2010 років . Найбільш активними до штамів E.coli були імпенем, меропенем, лінезолід, нетилміцин, амікацин та гатіфлоксацин. Висока резистентність спостерігалася до пеніциліну (69,1%), ампіциліну (51,0%), лінкоміцину (47,5%), кліндаміцину (43,2%), доксицикліну (38,8%), амоксициліну (38,7%)[8].

З огляду на те, що данні досліджень відрізняються не суттєво, ми робимо висновок, що необхідно здійснювати контроль та моніторинг за резистентністю. На цю тему в Україні проведено достатньо невелика кількість робіт, а їхні результати мають суттєві відмінності, і це набагато ускладнює проведення адекватної антимікробної та профілактичної антибіотикотерапії.

ВИСНОВКИ

1. У процесі роботи ми встановили, що резистентність на даному етапі розвитку сучасної медицини становить дуже велику проблему при лікуванні антибактеріальними препаратами, через некоректне призначення та безконтрольне використання, а також через те, що мікроорганізми постійно пристосовуються до нових видів антибактеріальних препаратів.

2. Виявили, що за механізмом дії на молекулярному рівні виділяють антибіотики, що пригнічують синтез пептидоглікана - опорного полімеру клітинної стінки бактерій (пеніциліни, циклосерин і ін.); антибіотики, що порушують молекулярну структуру клітинної мембрани (заповнені, новобиоцин); інгібітори синтезу білка і функцій рибосом (тетрациклін, макролідні антибіотики та ін.), інгібітори метаболізму РНК (в тому числі акт і номіціни, антрацикліни) і ДНК (мітоміцин С, стрептонігрін).

3. З'ясовано, що за 2017-2019 рр. кількість виділених культур *E. Coli* в стаціонарах м. Херсона сягала 550, кількість полірезистентних - 50 з них та визначили основні препарати до яких у *E. Coli* найслабша резистентність (Амікоцин, мерепенем, фурадонін, цефепім)

4. Провели дослідження із вирощування із вирощування антибіоикорезистентних культур *E. Coli*. Результати показали, що мікроорганізми розвивають резистентність достатньо швидко, що в подальшому можна використовувати для прогнозування та вирішення проблем, пов'язаних з безконтрольним використанням антибіотичних препаратів.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Альберт А. Избирательная токсичность. Физико – химические основы терапии. В двух томах / А. Альберт. В Филатов, М.: Медицина, 1989. – 163 с.
2. Андрух В.С. Про раціональне використання антибіотиків у сучасному світі: фокус на педіатрію / В.С. Андрух, В.Н. Андрух // Современная педиатрия. – 2017. – № 3 (83). – С. 10-15.
3. Brock T. D. Biology of Microorganism / T. D. Brock. – New York : Harper and Row, 1979. – 452 с.
4. Борисов Л.Б. Медицинская микробиология, вирусология и иммунология / Л. Б. Борисов. – М.: ООО “Медицинское информационное агентство”, 2002. – 736 с.
5. Білько Н. Методи експериментальної гематології / Н. Білько. – К. : Києво – Могилянська академія, 2006. – 70 с.
6. Davis B. D. Microbiology / B. D. Davis, R. Dulbecco, H. N. Eisen. – New York: Harper and Row, 1973. – 501 с.
7. Борисов Л. Б. Руководство к практическим занятиям по микробиологии./ Л. Б. Борисов. — Москва: Медицина 1984. – 49 с.
8. Гладка І.В. Ефективність хімічних та біологічних методів превенції розвитку бактеріозів плодів *carpsicum apium* / Гладка І.В., Шкуропат А.В. // Природничий альманах. Біологічні науки, випуск 23. Збірник наукових праць. – Херсон: Вид-во ПП Вишемирський В. С., 2016. – С. 13 – 20.
9. Громова О. Экспертный анализ данных в молекулярной фармакологии/ Ольга Громова. – М.: МЦНМО, 2012. – 688 с.
10. Де Кюри П. Охотники за микробами / Поль де Кюри. – М. : Эксклюзивная классика, 2016. – 480 с.

11. Дмитриева Н.В. Превентивное применение антибиотиков в терапевтической клинике. // Антибиотики и химиотерапия.- 2000. - т.45.- № 9.-С. 20-25.
12. Елинов Н. П. Химическая микробиология / Н. П. Елинов, М.: Медицина, 1989. – 181с.
13. Келина Н.Ю. Токсикология в таблицах и схемах / Н.Ю.Келина, Н.В. Безручко. — Ростов-на-Дону: Феникс, 2006. — 144 с.
14. Кузнецова Л. В. Імунологія: підручник / Л.В. Кузнецова, В.Д. Бабаджан, Н.В. Харченко та ін.; за ред. Л.В.Кузнецова, В.Д.Бабаджан, Н.В.Харченко. – Вінниця: Меркьюрі Поділля, 2013. – 565 с.
15. Крамаренко В. Ф. Токсикологічна хімія / В. Ф. Крамаренко, - К.: Вища школа, 1995. – 423 с.
16. Крю Ж. Биохимия. Медицинские и биологические аспекты. /Пер. С франц. – М.: Медицина, 1979. – 510 с.
17. Лабинская А. С. Общая и санитарная микробиология с техникой микробиологических исследований. / А. С. Лабинская, Л. П. Блинкова, А. С. Ещина. – М.: Лань, 2016. – 288 с.
18. Линг Л. Секреты токсикологии / Л. Линг, Р. Кларк. М.-СПб.: БИНОМ, 2006. -376 с.
19. Люта В. А. Основи мікробіології, вірусології та імунології. / В. А. Люта, Г. І. Заговора. – К: Здоров'я, 2001. – 280 с.
20. Мурадова О. Микробиология / О. Мурадова, Ксения Ткаченко. – М.: Эксмо, 2009. – 336 с.
21. Пономаренко А. М. Міністерство охорони здоров'я України. Державна санітарно- епідеміологічна служба. Визначення чутливості мікроорганізмів до антибактеріальних препаратів/ А. М. Пономаренко, С. А. Омельчук. – К: Полімед, 2007. -79 с.
22. Пиневиц А. В. Микробиология. Биология прокариотов / А. В. Пиневиц. – С. Петербург, СПбГУ, 2006, - 352 с.

23. Пяткин К. Д. Микробиология с вирусологией и иммунологией. / К. Д. Пяткин, - Москва Медицина, 1971. – 351 с.
24. Тетиор А. Н. Городская экология: Учебное пособие для вузов. – М.: Academia, 2007. –331 с.
25. Руководство к практическим занятиям по медицинской микробиологии, вирусологии и иммунологии / Под ред. акад. РАМН О.В. Бухарина. М.: Медицина; УрО РАН, 2002. - 342 с
26. Руководство по медицинской микробиологии. Общая и санитарная микробиология. Книга 1 / Колл. Авторы // Под редакцией Лабинской А.С., Воиной Е.Г. – М.: Издательство БИНОМ, 2008. – 1080 с.
27. Саламанов А. Г. Динаміка поширення резистентних нозокоміальних штамів *E. Coli* в стаціонарних відділеннях хірургічного профілю./ А.Г.Салманов, В.В.Бойко та ін.
- 28.Симонов С.С. Антибиотикорезистентность основных возбудителей внебольничной пневмонии: глобальные и региональные тенденции (По материалам IV съезда фтизиатров и пульмонологов Украины) // Здоров'я України. — 2008. — 22 (1). — 34-35.
- 29.Сологуб Л.І., Великий М.М. Екологічна біохімія. Метаболізм ксенобіотиків у людини і тварин: Навч. посібник. – К.: Вид-во Київського нац. авіаційного ун-ту, 1994. – 188 с.
- 30.Стейвиер Р.Мир микробов / Р. Стейвер, Э. Эдеаьберг, Дж. Ингрэм М., Мир, 1979.- 567 с.
- 31.Thimann K. V. The life of Bacteria. Their Growth, Methabolism, and Relationship / K. V. Thimann. – New York: MacMillan, 1955. – 471 с.
32. Циммер К. Микрокосм. *E. coli* и новая наука о жизни / Карл Циммер. – К.: Альпіна Паблішер, 2019 – 466 с.
33. Частная медицинская микробиология с техникой микробиологических исследований: Учебное пособие / Под ред. А.С. Лабинской, Л.П. Блинковой, А.С. Ещиной. – М.: ОАО “Издательство “Медицина”, 2005. – 600 с.

34. Черкес Ф. К. Микробиология : навч. Пос. Для студ медичних училищ / Ф. К. Черкес, Л. Б. Богоявленська, Н. А. Бельская. – Москва: Медицина 1987. – 511 с.

35. Широбоков В. П. Медична мікробіологія, вірусологія та імунологія : підручник для студ. вищ. мед. навч. заклад / За редакцією В.П. Широбокова / Видання 2-е. – Вінниця : Нова Книга, 2011. – 470 с.

36. Шлегель Г. Общая микробиология/ Г. Шлегель. - Москва: Мир, - 1987. – 566 с.

37. Water Pollution Microbiology / Mitchell, G.D. (ed.). – Washington, D.C.: John Wiley, 1977. – 482 p.