

Сравнительная активность препаратов мёда и нативного мёда в отношении штаммов с экстремальными фенотипами устойчивости к антимикробным препаратам

В.В. Привольнев, М.В. Эйдельштейн, М.В. Сухорукова, А.В. Тимохова, А.В. Дехнич
ГБОУ ВПО «Смоленский государственный медицинский университет» Минздрава России, Смоленск

Представлены результаты исследования антибактериальной активности нативного мёда в отношении штаммов бактерий с экстремальными фенотипами резистентности. Также проведено сравнение антибактериальной активности зарубежных препаратов мёда, одобренных для местного лечения инфекций, и нативного мёда.

Продемонстрировано преимущество нативного мёда и получены данные о его высокой активности в отношении экстремально резистентных штаммов.

Ключевые слова: мёд, антимикробная активность, антибиотикорезистентность.

Comparative *In Vitro* Activity of Native Honey and Commercially Available Honey Preparations Against Bacterial Isolates with Extreme Antimicrobial Resistance Phenotypes

V.V. Privolnev, M.V. Edelstein, M.V. Sukhorukova, A.V. Timokhova, A.V. Dekhlich

Smolensk State Medical University, Smolensk, Russia

This paper presents data on *in vitro* activity of native honey against bacterial isolates with extreme resistance phenotypes. Comparison of antimicrobial activity of foreign honey preparations approved for the local treatment of infections with that of native honey was also per-

formed. A native honey was demonstrated to be superior to foreign honey preparations and highly active against extremely drug-resistant isolates.

Key words: honey, antimicrobial activity, resistance.

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 [1].

Антимикробная активность мёда длительное время объяснялась сочетанием таких свойств, как $pH < 4$, высокая осмолярность, наличие перекиси водорода и метилглиоксаля. При этом большее внимание получил мёд из Австралии и Новой Зеландии «манука», с которым проведено множество клинических и экспериментальных работ [2, 3]. Последний всплеск интереса к мёду связан с его мощным антибактериальным действием в отношении полирезистентных штаммов бактерий. Эти

Контактный адрес:
Владислав Владимирович Привольнев
Эл. почта: vladislav.privolnev@gmail.com

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 [4].

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 активность *in vitro* против *Klebsiella pneumoniae* и *Pseudomonas aeruginosa* [5, 6].

Нам не удалось обнаружить в литературе современных данных об антибактериальной активности нативного российского мёда в отношении актуальных полирезистентных штаммов, так же как и работ, сравнивающих антибактериальную активность готовых местных антибактериальных препаратов мёда и нативного мёда.

Цель исследования — сравнить *in vitro* антибактериальную активность коммерчески доступных препаратов мёда и нативного мёда в отношении штаммов с экстремальными фенотипами устойчивости к антимикробным препаратам.

Материал и методы

Для исследования выбраны изоляты бактерий с известным профилем чувствительности к клинически используемым антимикробным препаратам и установленными генетическими детерминантами устойчивости для экстремально резистентных изолятов (табл. 1, 2).

В данном исследовании использовались 6 различных образцов мёда (табл. 3). Образец № 2 произ-

водства Новой Зеландии из мёда манука и образец № 3 производства Великобритании из мёда манука Новой Зеландии были приобретены в аптеке г. Лондона. 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. Образцы № 1, 5 и 6 являлись образцами мёда лета 2014 года из различных районов Смоленской области, удалённых друг от друга на расстоянии от 130 до 300 км. Образец № 4 — мёд из Ростовской области. На момент исследования мёду образцов № 1, 5 и 6 было не менее 5 месяцев.

Определение чувствительности проводилось методом разведений в бульоне с определением *минимальных подавляющих концентраций* (МПК) мёда в отношении исследуемых микроорганизмов.

Готовился раствор мёда с концентрацией 30% (масса/объем) в *бульоне Мюллера-Хинтона* (МХБ). Для этого к навеске мёда постепенно добавляли необходимое количество МХБ (меньшее, чем конечный требуемый объем), тщательно перемешивая до полного растворения. Полученный раствор мёда переносили в мерный цилиндр достаточного объема. Далее объем раствора доводился до требуемого конечного объема. Полученный раствор стерилизовался фильтрованием через мембранный фильтр (0,22 микрона). Из полученного раствора мёда (с концентрацией 30%) готовили ряд последовательных разведений в МХБ. Приготовленные растворы мёда вносили 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 вносили в планшеты при помощи автоматиче-

Таблица 1. Характеристика исследуемых изолятов

| Микроорганизм | Всего | Чувствительные к карбапенемам | Нечувствительные к карбапенемам, не продуцирующие карбапенемазы | Нечувствительные к карбапенемам, продуцирующие карбапенемазы |
|-------------------------------------|-------|-------------------------------|---|--|
| <i>Acinetobacter 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 2. Набор тестируемых изолятов

| Микроорганизм | 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 (металло-β-лактамаза)

² Carb-S — изолят, чувствительный к карбапенемам

³ Carb-R, CP-neg — изолят, нечувствительный к карбапенемам и не продуцирующий карбапенемазы

⁴ GES-5 — карбапенемаза GES-5

⁵ IMP-1 — карбапенемаза группы IMP-1 (металло-β-лактамаза)

⁶ OXA-40-like — карбапенемаза группы OXA-40

⁷ OXA-23-like — карбапенемаза группы OXA-23

⁸ OXA-58-like — карбапенемаза группы OXA-58

⁹ OXA-48-like — карбапенемаза группы OXA-48

¹⁰ NDM-1 — карбапенемаза группы NDM-1 (металло-β-лактамаза)

¹¹ MRSA — метициллинорезистентный *S. aureus*

¹² MSSA — метициллиночувствительный *S. aureus*

ского многоточечного инокулятора Mast UriDot (Великобритания). Планшеты инкубировались в условиях обычной атмосферы при 35 °С в течение 18–24 часов. Для контроля качества определения чувствительности параллельно с тестируемыми штаммами определяли МПК в отношении международных контрольных штаммов *Staphylococcus aureus* ATCC29213, *Escherichia coli* ATCC25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC27853. Минимальная концентрация, при которой не было выявлено признаков роста микроорганизма, расценивалась как МПК мёда в отношении данного изолята. МПК мёда выражали в процентах, так как препарат, сам являясь раствором, разводился начиная от 30% и ниже.

Результаты и обсуждение

Результаты исследования представлены в табл. 4–13: в табл. 4–9 — активность каждого образцов мёда в отношении исследованных штаммов; в табл. 10–13 — активность исследованных образцов мёда в отношении каждой группы исследованных микроорганизмов (*P. aeruginosa*, *A. baumannii*, *Enterobacteriaceae*, *S. aureus*).

Все образцы мёда продемонстрировали наличие антибактериальных свойств. Начальный 30% раствор оказался эффективным антибактериальным средством в отношении всех изолятов всех образцов, за исключением *Enterobacteriaceae* — для образца № 4 (мед из Ростова-на-Дону). Коммерческие препараты, содержащие мёд из Новой Зеландии

Таблица 3. Образцы меда, использованные в исследовании

| № образца | Продукт | Источник получения образца |
|-----------|-----------------|--|
| 1 | Мед натуральный | Демидовский район Смоленской области |
| 2 | «Manuka» | New Zeland Honey |
| 3 | «Activon Tube» | Medical Grade Manuka Honey |
| 4 | Мед натуральный | Ростов-на-Дону |
| 5 | Мед натуральный | Гагаринский район Смоленской области |
| 6 | Мед натуральный | Монастырщинский район Смоленской области |

Таблица 4. Активность меда из Демидовского района Смоленской области в отношении исследуемых штаммов

| Микроорганизм | Число штаммов | Значения МПК, % | | | | |
|---------------------------|---------------|-----------------|------|------|------|----|
| | | 3,75 | 5 | 7,5 | 10 | 15 |
| % изолятов | | | | | | |
| <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 | – | – | – |

Таблица 5. Активность меда из препарата «Manuka» (New Zeland Honey) в отношении исследуемых штаммов

| Микроорганизм | Число штаммов | Значения МПК, % | | | | |
|---------------------------|---------------|-----------------|------|------|------|----|
| | | 5 | 7,5 | 10 | 15 | 20 |
| % изолятов | | | | | | |
| <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 | – | – | – |

Таблица 6. Активность меда из препарата «Activon Tube» (Medical Grade Manuka Honey) в отношении исследуемых штаммов

| Микроорганизм | Число штаммов | Значения МПК, % | | | | | |
|---------------------------|---------------|-----------------|-----|------|------|------|------|
| | | 5 | 7,5 | 10 | 15 | 20 | 30 |
| % изолятов | | | | | | | |
| <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 | – | – |

(манука), продемонстрировали сходные между собой параметры. Мёд из Смоленской области также показал близкие результаты при сравнении трех образцов. Наиболее низкая активность была

отмечена для образца № 4. Это может быть связано как с особенностями местности, где был собран мёд, так и, вероятнее всего, с условиями хранения при транспортировке данного образца из Ростовской

Таблица 7. Активность меда из Ростова-на-Дону в отношении исследуемых штаммов

| Микроорганизм | Число штаммов | Значения МПК, % | | | | | |
|----------------------|---------------|-----------------|-----|------|------|------|-----|
| | | 7,5 | 10 | 15 | 20 | 30 | >30 |
| % изолятов | | | | | | | |
| <i>P. aeruginosa</i> | 24 | – | – | 29,2 | 70,8 | – | – |
| <i>A. baumannii</i> | 22 | – | – | 4,6 | 90,9 | 4,6 | – |
| Enterobacteriaceae | 23 | – | – | – | – | 95,7 | 4,3 |
| MRSA | 18 | 11,1 | 5,6 | 83,3 | – | – | – |
| MSSA | 5 | – | – | 100 | – | – | – |

Таблица 8. Активность меда из Гагаринского района Смоленской области в отношении исследуемых штаммов

| Микроорганизм | Число штаммов | Значения МПК, % | | | | | |
|----------------------|---------------|-----------------|------|---|------|------|------|
| | | 1,88 | 3,75 | 5 | 7,5 | 10 | 15 |
| % изолятов | | | | | | | |
| <i>P. aeruginosa</i> | 24 | – | – | – | 16,7 | 79,2 | 4,2 |
| <i>A. baumannii</i> | 22 | – | – | – | 72,7 | 27,3 | – |
| Enterobacteriaceae | 23 | – | – | – | – | 43,5 | 56,5 |
| MRSA | 18 | 5,6 | – | – | – | 72,2 | 22,2 |
| MSSA | 5 | – | – | – | – | 60 | 40 |

Таблица 9. Активность меда из Монастырщинского района Смоленской области в отношении исследуемых штаммов

| Микроорганизм | Число штаммов | Значения МПК, % | | | | | | |
|----------------------|---------------|-----------------|------|-----|----|------|------|-----|
| | | 3,75 | 5 | 7,5 | 10 | 15 | 20 | 30 |
| % изолятов | | | | | | | | |
| <i>P. aeruginosa</i> | 24 | – | – | – | – | 100 | – | – |
| <i>A. baumannii</i> | 22 | – | – | – | – | 81,8 | 18,2 | – |
| Enterobacteriaceae | 23 | – | – | – | – | – | 91,3 | 8,7 |
| MRSA | 18 | 27,8 | 66,7 | 5,6 | – | – | – | – |
| MSSA | 5 | 20 | 80 | – | – | – | – | – |

области, а также в целом его более длительным хранением от момента забора до постановки эксперимента.

Все образцы показали более высокую активность в отношении грамположительной флоры, чем в отношении грамотрицательной. Некоторые штаммы MRSA и MSSA погибали при разведении до 1,88%, большинство при 3,75 и 7,5% для образцов № 1, 5, 6 и при 5–7,5% — для образцов № 2 и 3. В отношении грамотрицательной флоры образцы манука были эффективны при разведении от 7,5 до 30%, преимущественно в диапазоне 10–20%. Образцы мёда из Смоленской области подавляли рост грамотрицательной флоры при разведении от 5 до 30% (большинство штаммов — при 10%).

В предыдущих зарубежных исследованиях мануки его МПК в отношении MRSA составляла 2–8% [7], VRE — 5–20% [8], *Pseudomonas* — 5,5–9% [9].

Все образцы показали активность *in vitro* в отношении коллекции экстремально резистентных штаммов, собранных со всей России от пациентов с госпитальными инфекциями. Концентрации для подавления роста грамположительной флоры требовались в среднем в 2–4 раза ниже, чем для грамотрицательной. При этом антибактериальные свойства мёда не зависели от профиля антибиотикорезистентности штамма, а зависели от препарата меда. Препарат № 4 (Ростов-на-Дону), вероятно, не был удачным выбором, так как исследователи не могли достоверно отследить сбор и путь препа-

Таблица 10. Активность исследуемых образцов мёда в отношении *P. aeruginosa* (n=24)

| Источник | Значения МПК, % | | | | | | |
|---|-----------------|---|------|------|------|------|----|
| | 3,75 | 5 | 7,5 | 10 | 15 | 20 | 30 |
| | % изолятов | | | | | | |
| Демидовский район Смоленской области | – | – | 58,3 | 41,7 | – | – | – |
| New Zeland Honey | – | – | – | – | 100 | – | – |
| Medical Grade Manuka Honey | – | – | – | – | – | 20 | – |
| Ростов-на-Дону | – | – | – | – | 29,2 | 70,8 | – |
| Гагаринский район Смоленской области | – | – | 16,7 | 79,2 | 4,2 | – | – |
| Монастырщинский район Смоленской области | – | – | – | – | 100 | – | – |

Таблица 11. Активность исследуемых образцов мёда в отношении *A. baumannii* (n=22)

| Источник | Значения МПК, % | | | | | | |
|---|-----------------|------|------|------|------|------|-----|
| | 3,75 | 5 | 7,5 | 10 | 15 | 20 | 30 |
| | % изолятов | | | | | | |
| Демидовский район Смоленской области | – | 22,7 | 77,3 | – | – | – | – |
| New Zeland Honey | – | – | 18,2 | 81,8 | – | – | – |
| Medical Grade Manuka Honey | – | – | – | – | 100 | – | – |
| Ростов-на-Дону | – | – | – | – | 4,6 | 90,9 | 4,6 |
| Гагаринский район Смоленской области | – | – | – | – | 72,7 | 27,3 | – |
| Монастырщинский район Смоленской области | – | – | – | – | 81,8 | 18,2 | – |

Таблица 12. Активность исследуемых образцов мёда в отношении представителей семейства *Enterobacteriaceae* (n=23)

| Источник | Значения МПК, % | | | | | | |
|---|-----------------|------|------|------|------|------|-----|
| | 5 | 7,5 | 10 | 15 | 20 | 30 | >30 |
| | % изолятов | | | | | | |
| Демидовский район Смоленской области | – | 30,4 | 69,6 | – | – | – | – |
| New Zeland Honey | – | 17,4 | 43,5 | 26,1 | 13 | – | – |
| Medical Grade Manuka Honey | – | – | – | 17,4 | 39,1 | 43,5 | – |
| Ростов-на-Дону | – | – | – | – | – | 95,7 | 4,3 |
| Гагаринский район Смоленской области | – | – | 43,5 | 56,5 | – | – | – |
| Монастырщинский район Смоленской области | – | – | – | – | 91,3 | 8,7 | – |

рата в Смоленск. Препараты мёда из Смоленской области продемонстрировали лучшие результаты в отношении всех изолятов в данном исследовании. Препараты № 2 и 3 (Новая Зеландия) показа-

ли худшие характеристики, чем мёд из Смоленска. Вероятно, это связано с тем, что коммерческий препарат, помимо фильтрации, прошёл стерилизацию гамма-облучением, а также хранился дольше, чем

Таблица 13. Активность исследуемых образцов меда в отношении *S. aureus* (n=23)

| Источник | Значения МПК, % | | | | | | | |
|---|-----------------|------|------|------|------|------|-----|----|
| | 1,88 | 3,75 | 5 | 7,5 | 10 | 15 | 20 | 30 |
| | % ИЗОЛЯТОВ | | | | | | | |
| Демидовский район Смоленской области | – | 91,3 | 8,7 | – | – | – | – | – |
| New Zeland Honey | – | – | 95,7 | 26,1 | – | – | – | – |
| Medical Grade Manuka Honey | – | – | 4,3 | – | 87 | 8,7 | – | – |
| Ростов-на-Дону | – | – | – | – | – | 95,7 | 4,3 | – |
| Гагаринский район Смоленской области | 4,3 | – | – | – | 69,7 | 26 | – | – |
| Монастырщинский район Смоленской области | – | 26 | 69,7 | 4,3 | – | – | – | – |

образцы нативного меда, использованные в данном исследовании (эти факторы могли привести к снижению концентрации активных антимикробных пептидов). Однако коммерческие препараты всё же обладали достаточной *in vitro* активностью, чтобы рассматриваться как потенциальные средства борьбы с нозокомиальной раневой инфекцией при местном применении.

Таким образом, мёд может быть рассмотрен как ресурс для создания новых эффективных местных препаратов при лечении раневой инфекции, вызванной полирезистентной флорой. Более того, антимикробные пептиды, содержащиеся в пчелином меде, могут послужить источником разработки новой группы антибактериальных препаратов не только для местного, но и для системного применения.

Литература

- Jull A. B., Rodgers A., Walker N. Honey as a topical treatment for wounds. Cochrane Database of Systematic Reviews, 2008; ID CD005083.
- Blair S.E. The unusual antibacterial activity of medical-grade Leptospermum honey: antibacterial spectrum, resistance and transcriptome analysis. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 2009; 28(10):1199-208.
- Molan P.C. The evidence and the rationale for the use of honey as a wound dressing. Wound Practice and Research 2011; 19(4):204-20.
- Привольнев В.В., Даниленков Н.В. Мёд в лечении инфицированных ран. Клин микробиол антимикроб химиотер 2014; 16:219-28.
- 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 Pept Lett 2014; 21:391-8.
- 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. ACS Chem Biol 2012; 20(7):1281-91.
- Cooper R.A., Molan P.C., Harding K.G. Antibacterial activity of honey against strains of *Staphylococcus aureus* from infected wounds. J R Soc Med 1999; 92(6):283-5.
- Cooper R.A., Molan P.C. The use of honey as an antiseptic in managing *Pseudomonas* infection. J Wound Care 1999; 8(4):161-4.
- Allen K.L., Hutchinson G., Molan P.C. The potential for using honey to treat wounds infected with MRSA and VRE. First World Wound Healing Congress, 2000; Melbourne, Australia.