

**ՄԱՐԻՆԵ ԲԱԼԱՅԱՆ, ՍՈՒՍԱՆՆԱ ՄԻՐԶԱԲԵԿՅԱՆ,
ԱՆԱՀԻՏ ՄԱՆՎԵԼՅԱՆ**

*Հայաստանի ազգային ագրարային համալսարանի
Սննդի անվտանգության և կենսաբեխնոլոգիայի բաժնի ավագ գիտաշխատող,
կենսաքանակական գիտությունների թեկնածու*

ՄԱՐԻԱՆՆԱ ԻՍԱԶԱՆՅԱՆ

*Հայկական պետական մանկավարժական համալսարան, գիտաշխատող
ՎԱՐԴԱՆ ԾԱՏՈՒՐՅԱՆ*

*Մարդու և կենդանիների առողջության բարելավման միջազգային ասոցիացիա,
բժշկական գիտությունների թեկնածու*

ԼԱՌԻԱ ՀԱԿՈՒՅԱՆ

*Մարդու և կենդանիների առողջության բարելավման միջազգային ասոցիացիա,
առաջարար գիտաշխատող, կենսաքանակական գիտությունների դոկտոր*

ԱՍՏՂԻԿ ՓԵՓՈՅԱՆ

*Հայաստանի ազգային ագրարային համալսարանի
Սննդի անվտանգության և կենսաբեխնոլոգիայի բաժնի վարիչ, առաջարար գիտաշխատող,
կենսաքանակական գիտությունների դոկտոր*

**ԲԱԿՏԵՐԻԱԼ ՀԱԿԱԲԻՈՏԻԿԱԿԱՅՈՒՆՈՒԹՅԱՆ ԽՆԴԻՐԸ
ՊԱՐԲԵՐԱԿԱՆ ՀԻՎԱՆԴՈՒԹՅԱՄԲ ՀԻՎԱՆԴՆԵՐԻ ՄՈՏ**

Ներկա հետազոտությունները վերաբերում են Պարբերական հիվանդությանը հիվանդների աղիքային կոմենսալ «*Escherichia coli*» բակտերիաների հակաբիոտիկակայությունության ուսումնասիրությանը:

Ցույց է տրվել, որ պրոբիոտիկների ընդունումը հիվանդների կողմից բերում է հիվանդների աղիքներում հակաբիոտիկակայություն մանրէների քանակական փոփոխությունների:

Հանգուցային բառեր և արտահայտություններ՝ կոմենսալ «*Escherichia coli*», պրոբիոտիկ, Պարբերական հիվանդություն, հակաբիոտիկակայություն:

Հակաբիոտիկների ներդրումը բժշկության մեջ հանդիսանում էր ժամանակի ամենամեծ ձեռքբերումը: Սակայն հակաբիոտիկների անսահմանափակ և չհիմնավորված օգտագործումը նպաստել է տարբեր էկոհամակարգերում, ինչպես

նաև մարդու աղիքային միկրոֆլորայում հակաբիոտիկակայություն ախտածին և կոմենսալ բակտերիաների տարածմանը [1, 10, 19, 20, 21]:

Մյուս կողմից՝ ուսումնասիրությունները ցույց են տվել պրոբիոտիկների դերն ու նշանակությունը տարբեր հիվանդությունների բուժման, կանխարգելման, ինչպես նաև աղիքային միկրոֆլորայում հակաբիոտիկակայություն բակտերիալ շտամների քանակական կազմի նվազեցման գործում [2, 3, 4, 18, 24, 25, 27]:

Համեմատական ուսումնասիրությունները, որոնք ուղղված էին պարզաբանելու տարբեր հիվանդություններով հիվանդ (ՊՀ, խրոնիկ կոլիտ, գաստրիտ, խոցային հիվանդություններ) և առողջ մարդկանց աղիքային միկրոֆլորայում հակաբիոտիկակայություն բակտերիալ անջատուկների տարածվածությունը, ցույց են տվել, որ հիվանդների մոտ պայմանական ախտածին բակտերիաների և

հակաբիոտիկակայուն «*E. coli*» անջատուկների քանակությունը բարձր է համեմատած առողջ մարդկանց հետ [5, 6, 9, 11, 12, 13, 16, 17, 23]:

Հաշվի առնելով վերոնշյալը և Հայաստանում Պարբերական հիվանդության ուսումնասիրության կարևորությունը, ինչպես նաև ՊՀ հիվանդների միկրոֆլորայում կոլիսիցինոթերապիայի հետ կապված տարբեր աստիճանի դիսբիոտիկ փոփոխությունները՝ ներկա աշխատանքի նպատակն է ուսումնասիրել «*Lactobacillus acidophilus* INMIA 9602 Er-2 շտամ 317/402» և «*Escherichia coli* M17» պրոբիոտիկային բակտերիաների ազդեցությունը ՊՀ հիվանդների աղիքային «*E. coli*» բակտերիաների քանակական կազմի և հակաբիոտիկակայունության պրոֆիլի վրա:

ՆՅՈՒԹԵՐ ԵՎ ՄԵԹՈԴՆԵՐ

Ուսումնասիրություններում ընդգրկվել են 45 ՊՀ հիվանդներ (15 կին և 30 տղամարդ, միջին տարիքը՝ 30.5 ± 12.6 տարեկան): Հետազոտությունից առաջ հիվանդները չեն ընդունել հակաբիոտիկներ, պրոբիոտիկներ և քիմիոթերապևտիկ դեղամիջոցներ, իսկ հետազոտության ընթացքում շարունակել են ընդունել նշանակված չափաբաժիններով կոլիսիցին:

Հետազոտության ընթացքում հիվանդները բաժանվել են խմբերի, յուրաքանչյուր խմբում՝ 15 մարդ: Հիվանդների առաջին խմբին նշանակվել է պրոբիոտիկ- 1՝ «*L. acidophilus* INMIA 9602 Er-2 ԽՏԱՄՄ 317/402» (Նարինե, Vitamax-E), երկրորդ խմբին՝ պրոբիոտիկ-2՝ «*E. coli* M17» (Կոլիբակտերոն, Vitamax-E), երրորդ խմբին՝ պլացեբո: Հետազոտվողները ընդունել են մեկական դեղապատիժ օրը երկու անգամ՝ 30 օր:

Կղանքային նմուշները հավաքվել են 2 անգամ՝ մինչ պրոբիոտիկոթերապիան և պրոբիոտիկոթերապիայից հետո: Ֆեկալ նմուշը հավաքվել է պլաստիկ սրվակների մեջ և սառեցված պայման-

ներում տեղափոխվել լաբորատորիա: 1 գրամ կղանքային զանգվածը լուծվել է 9 մլ ֆիզիոլոգիական լուծույթում (0,9 % NaCl) և 2-3 րոպե պահվել սենյակային ջերմաստճանում: Նստվածքը հեռացվել է ցածր արագացմամբ ցենտրիֆուգացիայի միջոցով (700 g): Տարբեր խմբի միկրոօրգանիզմների աճեցման և նախնական տարբերակման համար կատարվել է ցանքս սննդային և տարբերակիչ միջավայրերի վրա, իսկ բակտերիաների հետագա տարբերակումն իրականացվել է նրանց ֆիզիոլոգիական և կենսաքիմիական առանաձնահատկությունների հիման վրա՝ օգտագործելով համապատասխան կենսաքիմիական թեստ-միջավայրեր [15]: Կղանքային նմուշները պահվել են սառնարանում -80°C պայմաններում՝ ԴՆԹ-ի անջատման համար:

Հակաբիոտիկների նկատմամբ բակտերիաների զգայունությունը որոշվել է սկավառակային մեթոդով և հակաբիոտիկների համապատասխանաբար կոնցենտրացիաների միջավայրում բակտերիաների աճի գնահատման միջոցով: Բակտերիաների զգայունության որոշման համար օգտագործվել են հետևյալ հակաբիոտիկները՝ տետրացիկլին և դոքսիցիկլին (15 մկգ/մլ), ամոքսիցիլին (25 մկգ/մլ), քլորամֆենիկոլ (30 մկգ/մլ), ցեֆազոլին (15 մկգ/մլ), ցիպրոֆլոքսացին (5 մկգ/մլ):

Ֆեկալ ԴՆԹ-ի անջատման համար օգտագործվել է «ZR Fecal DNA Mini Prep» (ZYMO RESEARCH CORP.) և «Ultra Clean Fecal DNA Isolation Kit» (MOBIO Laboratories, Inc.): ԴՆԹ-ն պահվել է սառնարանում -20°C պայմաններում:

Աղիքային բակտերիալ կազմը ուսումնասիրվել է ԴՆԹ-միկրոչիպերով (PhyloChipTM). որպես ստուգիչ օգտագործվել է «*E. coli* ATCC 25922» և «ATCC 35218, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212»:

Աշխատանքի փորձարարական դիտարկումների օրինաչափությունները գնահատվել են համակարգչային

«Excel» (Student T test) և «Multibase 2013» ծրագրերի միջոցով ($P < 0.05$):

ԱՐԴՅՈՒՆՔՆԵՐ ԵՎ ՔՆՆԱՐԿՈՒՄ Պրոբիոտիկ 2-ի բուժիչ ազդեցությունը պայմանավորված է «*E. coli* M-17» անտագոնիստիկ ակտիվությամբ, իսկ Պրոբիոտիկ 1-ը պարունակում է «*L. acidophilus* Er-2 317/402», որը կարգավորում է աղիքային միկրոֆլորան, նպաստում է աղիքներում վիտամինների ներծծմանը և իջեցնում է խոլեստերինի մակարդակը արյան մեջ [8, 14]:

«*E. coli*»-ն այն շտամն է, որը հաճախակի է օգտագործվում հակաբիոտիկակայունության մոտիտորինգի համար, որովհետև այն լայն տարածված է տարբեր էկոհամակարգներում և հեշտությամբ է ձեռքբերում և փոխանակում կայունության գեները ուրիշ մանրէների հետ [7, 22].

Մեր հետազոտությունների արդյունքում տարբերակվեցին «*Escherichia*» ցեղին պատկանող 157 ՕՏՄ:

Նախնական տվյալները ցույց տվեցին, որ Պրոբիոտիկ 1 ընդունելուց հետո պարբերական հիվանդությամբ հիվանդների մոտ նկատվում է «*Escherichia*» ցեղին պատկանող ՕՏՄ-ների քանակական ցուցանիշների նվազում (նկար 1):

Ընհանուր առմամբ ստուգվել է 749 «*E. coli*» անջատուկների զգայունությունը մի շարք հակաբիոտիկների նկատմամբ (աղյուսակ 1, նկար 2):

Ամենատարածված ֆենոտիպն էր հին սերնդի հակաբիոտիկների նկատմամբ կայուն շտամները: Կայունությունը տետրացիկլինների նկատմամբ տատանվում էր տարբեր խմբերում 64% -ից 88% (մինչև Պրոբիոտիկների և պլացեբոի ընդունումը):

Ցույց է տրվել բարձր կայունություն β -լակտամային հակաբիոտիկների նկատմամբ (38–72%): Նվազագույն կայունությունը գրանցվեց քլորամֆենիկոլների համար:

Պրոբիոտիկներ և պլացեբո ընդունելուց մեկ ամիս անց ամենատարածված

«*E. coli*» շտամների հակաբիոտիկակայության հատկությունները փոփոխվեցին ($P=0.01332$), ինչը վկայում է աղիքներում բակտերիալ շտամների ակտիվ փոփոխումների մասին (աղ. 1): Գրանցվել է նաև β -լակտամային և տետրացիկլինների խմբերի հակաբիոտիկների նկատմամբ կայուն շտամների քանակի նվազում:

Նշենք նաև, որ հիվանդների մոտ, 49–54% բակտերիալ անջատուկները ցուցաբերում էին կայունություն 2 և ավել հակաբիոտիկների խմբերի նկատմամբ:

Պրոբիոտիկների ընդունումից հետո բազմակայուն շտամների քանակը նվազում էր բոլոր խբերում (նկար 2):

Պրոբիոտիկ 2-ի ազդեցությունը հակաբիոտիկակայուն «*E. coli*»-ների վրա, հավանաբար, պայմանավորված է կոանքով հակաբիոտիկազգայուն «*E. coli* M-17» շտամի արտազատմամբ:

Իսկ Պրոբիոտիկ 1-ի ընդունելուց հետո ցույց տված փոփոխությունները դեռ պահանջում են լրացուցիչ հետազոտություններ:

Այսպիսով՝ հետազոտությունների արդյունքները ցույց են տվել, որ ՊՀ հիվանդների մոտ նկատվել են պրոբիոտիկներ ընդունելուց հետո աղիքային կոմենսալ «*E. coli*»-ների հակաբիոտիկակայունության հատկությունների փոփոխումներ:

Ներկայացված աշխատանքը կարող է հիմք հանդիսանալ պրոբիոտիկաթերապիայի կիրառմանը՝ հակաբիոտիկակայուն մանրէների տարածման դեմ պայքարելու համար:

Հետազոտությունները կատարվել են «ՄԳՏԿ A – 1980» ծրագրի շրջանակներում:

Հոդվածի ներկայացման տարեթիվը՝ 12.02.2015

34. Arias C. A. and Murray B. E. Antibiotic-resistant bugs in the 21st century—a clinical super-challenge // *N Engl J Med.*, 2009, V. 360, P. 439–443.
35. Balayan M., Mirzabekyan S., Isajanyan M., Pepoyan Z., Trchounian A., Pepoyan A., Bujdakova H. Some Peculiarities of Growth and Functional Activity of «*Escherichia coli*» Strain from Probiotic formula “ASAP” // *International Journal of Biological and Medical Sciences* // 2010, V. 68, P. 670–675.
36. Boirivant M., Strober W. The Mechanism of Action of Probiotics // *Curr Opin Gastroenterol.*, 2007, V. 23(6), P. 679–692.
37. Carlet J. // *Antimicrobial Resistance and Infection Control*, 2012, v. 1(39), P. 36–38.
38. Gasparyan G., Balayan M., Grigoryan A., Akopyan A., Manvelyan A., Mirzabekyan S., Trchounian A., Pepoyan A. Growth peculiarities of commensal «*Escherichia coli*» isolates from the gut microflora in Crohns disease patients // *Biophysica*, 2013, V. 58(4), P. 690–696
39. Harutyunyan N.A., Pepoyan E.S., Manvelyan A.M., Malxhasyan L.M., Pepoyan A.Z., Hakopyan G.S., Horie H. Quantitative and qualitative changes of commensal Enterobacteriaceae in gut microflora of patients with Familiar Mediterranean Fever disease // *Electronic Journal of Natural Sciences*, 2007, V. 1(8), P. 41–44.
40. Johnson J.R., Sannes M.R., Croy C. et al. Antimicrobial Drug-Resistant «*Escherichia coli*» from Humans and Poultry Products, Minnesota and Wisconsin, 2002–2004 // *Emerg Infect Dis.*, 2007, V. 13, P. 838–846.
41. Kato T., Kairis, A., Uno J. Momose Y. // *Pharmacometrics*, 2004, V. 66(3/4), P. 127–132.
42. Khachatryan Z.A., Ktsoyan Z.A., Manukyan G.P., Kelly D., Ghazaryan K.A., and Aminov R.I. Predominant role of host genetics in controlling the composition of gut microbiota. // *PLoS ONE*, 2008, V. 3(8), Article ID e3064.
43. Levy S.B, Marshall B. Antibacterial resistance worldwide: causes, challenges and responses. // *Nature Medicine* 2004, V. 10, p. 122 – 129.
44. Manukyan G.P. Ghazaryan K.A., Ktsoyan Z.A. et al. Elevated systemic antibodies towards commensal gut microbiota in autoinflammatory condition // *PLoS ONE*. 2008, V. 3(9), Article ID e3172.
45. Minasbekyan L, Abovyan M, Balayan M, Manvelyan A, Gasparyan G, Grigoryan A, Tsaturyan V, Pepoyan A. DNA methylation levels in commensal *E. coli* isolates from gut microflora of Crohns disease patients // *Annals of Agrarian Science*, 2012, V. 10(4), P. 109–113.
46. Mirzoyan N., Pepoyan A., Trchounian A. Modification of the biophysical characteristics of membranes incommensal «*Escherichia coli*» strains from breast cancer patients// *FEMS Microbiology Letters*, 2006, V. 254(1), P. 81–86.
47. Mkrtchyan H., Gibbons S., Heidelberger S., Zloh M., Limaki H. Purification, characterisation and identification of acidocin LCHV, an antimicrobial peptide produced by *Lactobacillus acidophilus* n.v. Er 317/402 strain Narine // *Int J Antimicrob Agents*, 2010, V. 35(3), P. 255–60.
48. Murray P.R., Baron E.J., Pfaller M.A., Tenover P.C., Tenover R.H. *Manual of Clinical Microbiology* // eds. 1995. 6th ed. Washington, DC: ASM Press.
49. Papadopoulos V.P, Giaglis S, Mitroulis I, Ritis K. The Population Genetics of Familial Mediterranean Fever: A Meta_Analysis Study// *Annals of human genetics*, 2008, V. 72(6), P. 752–761.
50. Pepoyan A., Mirzabekyan S., Aminov R. Antibiotic Resistance in Commensal «*Escherichia coli*» in Armenia. // *Electronic Journal of Natural Sciences*, 2005, P. 28–31.
51. Plummer S.F, Garaiova I, Sarvotham T, Cottrell S.L, Le Scouiller S, Weaver M.A, Tang J, Dee P, Hunter J. Effects of probiotics on the composition of the intestinal microbiota following antibiotic therapy // *Int J Antimicrob Agents*, 2005, V. 26(1), P. 69–74.
52. Salyers A.A., Gupta A., Wang Y. Human intestinal bacteria as reservoirs for antibiotic resistance genes // *TRENDS in Microbiology*, 2004, V. 12(9), P. 412–416.
53. Schjørring S., Krogfelt K. A. Assessment of Bacterial Antibiotic Resistance Transfer in the Gut // *International Journal of Microbiology*, 2011, V. 2011, Article ID 312956, 10 pages, doi:10.1155/2011/312956.
54. Sommer, O.A. Morten, et al. Functional Characterization of the Antibiotic Resistance Reservoir in the Human Microflora // *Science*. 2009, V. 325(5944), P. 1128–1131.
55. Tadesse D. A., Zhao S. et al. Antimicrobial Drug Resistance in «*Escherichia coli*» From Humans and Food Animals // *Emerg Infect Dis.*, 2012, V. 18(5), P. 741–749.
56. Touitou I, Sarkisian T, et al. Country as the primary risk factor for renal amyloidosis in FMF // *Arthritis Rheum.*, 2007, V. 56(5), P. 1706–12.

57. Vyas U., Ranganathan N. Probiotics, Prebiotics, and Synbiotics: Gut and Beyond // Gastroenterology Research and Practice, 2012, V. 2012, Article ID 872716, 16 pages, doi:10.1155/2012/872716.
58. Wilson M. Microbial inhabitants of humans. Their ecology and role in health and disease. / Cambridge University Press. Cambridge. United Kingdom. 2005.
59. Бондаренко В. М. Дисбиозы и препараты спробиотической функцией // В. М. Бондаренко, А. А. Воробьев // Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунол., 2004, Т № 1, С. 84–92.
60. Степанян К., Балаян М., Василян А., Пепоян А., Трчунян А. Некоторые особенности мембран пробиотических штаммов «Escherichia coli» // Биол. мембраны. 2007. Т. 24, № 5, С. 389–394.

ПРОБЛЕМА БАКТЕРИАЛЬНОЙ АНТИБИОТИКОРЕЗИСТЕНТНОСТИ У БОЛЬНЫХ ПЕРИОДИЧЕСКОЙ БОЛЕЗНЬЮ

МАРИНЕ БАЛАЯН, СУСАННА МИРЗАБЕКЯН, АНАИТ МАНВЕЛЯН

*Национальный аграрный университет РА, отдел безопасности питания и биотехнологии,
старший научный сотрудник, кандидат биологических наук*

МАРИАННА ИСАДЖАНЫН

Армянский государственный педагогический университет, научный сотрудник

ВАРДАН ЦАТУРЯН

Международная ассоциация по оздоровлению человека и животных, кандидат медицинских наук

ЛАУРА АКОПЯН

*Международная ассоциация по оздоровлению человека и животных, ведущий научный сотрудник,
доктор биологических наук*

АСТГИК ПЕПОЯН

*Национальный аграрный университет РА, отдел безопасности питания и биотехнологии, ведущий
научный сотрудник, доктор биологических наук*

Работа посвящена изучению антибиотикорезистентности кишечных комменсальных бактерий вида «*Escherichia coli*» больных периодической болезнью.

Показано, что употребление пробиотиков больными приводит к количественным изменениям в пуле антибиотикорезистентных кишечных бактерий.

Дата представления статьи: 12.02.2015

THE PROBLEM OF BACTERIAL ANTIBIOTIC RESISTANCE IN PATIENTS WITH THE PERIODIC DISEASE

ANAHIT MANVELYAN, MARINE BALAYAN, MIRZABEKYAN SUSANNA,

*Armenian National Agrarian University
Department of Biotechnology and Food Safety
Senior Research Assistant, Candidate of Biological Sciences*

MARIANNA ISAJANYAN

Armenian State Pedagogical University after Khachatur Abovyan, Research assistant

VARDAN TSATURYAN

*International Association for Human and Animals Health Improvement, RA
Candidate of Medical Sciences*

LAURA HAKOBYAN

*International Association for Human and Animals Health Improvement, RA
Leading Research Assistant, Doctor of Biological Sciences*

ASTGHIK PEPOYAN

*Armenian National Agrarian University
Head of the Department of Biotechnology and Food Safety
Leading Research Assistant, Doctor of Biological Sciences*

This work is devoted to the study of antibiotic-resistance of intestinal commensal «*Escherichia coli*» in patients with Periodic Disease.

It is shown that the use of probiotics by the patients leads to quantitative changes in the pool of antibiotic resistant intestinal.

Article submission date> 12.02.2015

ՀԱՎԵԼՎԱԾ

Աղյուսակ 1. ՊՀ հիվանդների մոտ կոմենսալ «E. coli»-ների հակաբիոտիկակայունությունը

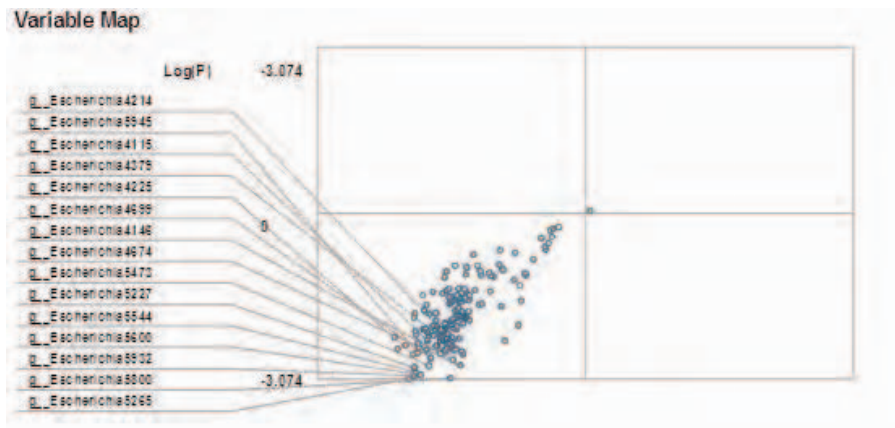
	Կայուն անջատուկներ, %							
	Պլացեբո խումբ		Պրոբիոտիկների խմբեր		Պրոբիոտիկ 1 խումբ		Պրոբիոտիկ 2 խումբ	
	Մինչև N ¹ =15 n ² =99	Հետո N=13 n=78	Մինչև N=30 n=148	Հետո N=24 n=138	Մինչև N=15 n=87	հետո N=10 n=53	Մինչև N=13 n=61	հետո N=14 n=85
Տետրացիկլիններ Tc, Dc	88	55	78	60	87	64	64	59
β-լակտամներ Ac, Cp, Cf	54	27	52	37	38	25	72	45
Քլորամֆենիկոլ	12	12	3	13	0	13	8	13
Ջգայուն	11	40	13	31	13	34	13	29
Բազմակայուն*	54	22	43	31	38	23	49	36
Կայուն	35	38	45	38	56	42	30	36

* - Կայուն ամենաքիչը երկու խմբի հակաբիոտիկների նկատմամբ

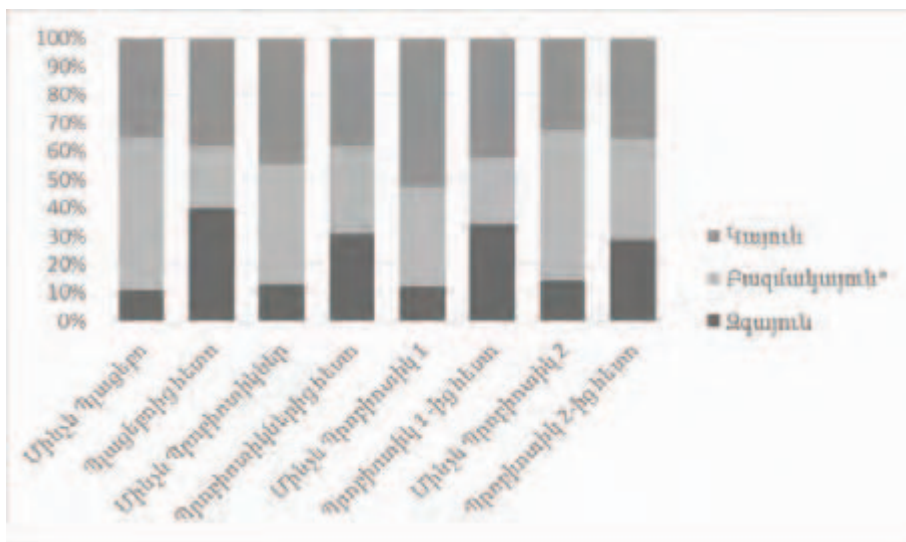
1- կամավորների քանակը

2 - անջատուկների քանակը

Tc – տետրացիկլին, Dc – դոկսիցիկլին, Ac – ամոքսիցիլին, Cp – ցիպրոֆլոքսացին, Cf – գեֆազոլին



Նկար 1. Աղիքային «Escherichia» -ների (157 OSU) քանակական տարբերությունները Պրոբիոտիկ 1 ընդունելուց հետո: Մթնոլորտի T-թեստի արդյունքները: Մտուզիչ խումբ - ՊՀ հիվանդներ մինչև պրոբիոտիկ 1 ընդունելը: Մտուզվող խումբ - նայն հիվանդները պրոբիոտիկի ընդունումից մեկ ամիս հետո:



* - Կայուն ամենաքիչը երկու խմբի հակաբիոտիկների նկատմամբ

Նկար 2. Պրոբիոտիկների ազդեցությունը ՊՀ հիվանդների հակաբիոտիկակայուն կոմենսալ «E. coli» -ների քանակական բաղադրության վրա: