

## ВЛИЯНИЕ АМЛОДИПИНА НА УСТОЙЧИВОСТЬ К ЭНРОФЛОКСАЦИНУ У *SALMONELLA ENTERICA*\*

**Н.В. ДАВЫДОВА**<sup>1</sup>, кандидат ветеринарных наук, старший научный сотрудник,  
**В.Н. АФОНЮШКИН**<sup>1,2</sup>, кандидат биологических наук, заведующий сектором,  
**Ю.В. КОЗЛОВА**<sup>2</sup>, кандидат биологических наук, младший научный сотрудник,  
**М.Л. ФИЛИПЕНКО**<sup>2</sup>, кандидат биологических наук, заведующий лабораторией,  
**Д.В. ВОЛКОВ**<sup>1</sup>, младший научный сотрудник

<sup>1</sup>Сибирский федеральный научный центр агробиотехнологий РАН  
630501, Россия, Новосибирская область, р.п. Краснообск  
e-mail: lisocim@mail.ru

<sup>2</sup>Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН  
630090, Россия, Новосибирск, пр. Лаврентьева, 8,  
e-mail: mfilipenko@gmail.com

Отмечен рост в последние годы числа штаммов сальмонелл, устойчивых к антибиотикам фторхинолонового ряда. Оценена встречаемость сальмонелл, устойчивых к энрофлоксацину, на птицефабриках Российской Федерации в 2007 и 2017 гг. Исследована чувствительность к энрофлоксацину у 23 культур сальмонелл, выделенных в 2007 г., и 15 – изолированных из сельскохозяйственной птицы в 2017 г. Антибиотикорезистентность определяли дискодиффузионным методом в соответствии с общепринятыми требованиями. С 2007 по 2017 г. частота выделения сальмонелл, устойчивых к энрофлоксацину, возросла от 0 до 23,08%. Оценку наличия эффлюкса (активного выведения бактериальной клеткой антимикробных веществ) проводили с использованием классического исследования с бромистым этидием. Установлено, что наличие эффлюкса у культур сальмонелл ассоциировалось с незначимым повышением устойчивости к энрофлоксацину, триметоприму с сульфаметоксазолом и триметоприму с сульфадимезином. Исследовано влияние амлодипина на чувствительность сальмонелл к энрофлоксацину путем культивирования сальмонелл в присутствии различных концентраций амлодипина. Установлено, что удельная доля штаммов сальмонелл, повысивших чувствительность к энрофлоксацину, возроста при одновременном увеличении концентрации амлодипина (корреляция по Пирсону,  $r = 0,9$ ). Введение амлодипина в концентрации 250 мкг/мл в культуры *Salmonella enterica* в присутствии субингибирующих концентраций энрофлоксацина повышало чувствительность к данному антибиотику в 87,5% случаев.

**Ключевые слова:** антибиотикорезистентность, эффлюкс, флюорохинолоны, сальмонелла, бройлеры, амлодипин.

Обеспечение безопасности продуктов питания человека и здоровья животных требует противодействия патогенным микроорганизмам. Без применения антибиотиков это невозможно даже на фоне проблемы устойчивости к ним патогенных бактерий. Необходимость борьбы с антибиотико-резистентными формами бактерий очевидна.

Антибиотико-устойчивые штаммы сальмонелл часто обнаруживаются в пищевых продуктах животного происхождения [1, 2]. Это достаточно серьезная проблема особенно на фоне роста в последние годы числа штаммов сальмонелл, устойчивых к фтор-

хинолонам и цефалоспорином [3–5]. Согласно сообщению NARMS от 2010 г., возросла частота выделения полирезистентных штаммов сальмонелл, например серовара *Typhimurium*, устойчивого к ампициллину, хлорамфениколу, стрептомицину, сульфаметоксазолу/сульфисоксазолу и тетрациклину (ACSSuT), а также сальмонелл серовара *Enteritidis*, устойчивых к налидиксовой кислоте. Серовары *Newport*, *Heidelberg*, *Dublin* также часто характеризуются устойчивостью к антибиотикам различных групп. Среди полирезистентных сальмонелл (более чем к пяти антибиотикам) наиболее часто встречаются

\* Данная работа частично поддержана интеграционным проектом КП ФНИ СО РАН «Микробиом человека и сельскохозяйственных животных. Изучение возможностей коррекции» (задание № 778-2018-0112 и № 0309-2018-011).

сальмонеллы эпидемически значимых сероваров *Typhimurium*, *Heidelberg*, *Dublin*, *Paratyphi B* [6]. Хотя *S. enteritidis* широко распространена у населения, штаммы ее считаются менее резистентными в сравнении с другими сероварами. Механизмы устойчивости сальмонелл к антибиотикам включают ферменты, деградирующие антибиотики (бет-лактамазы), эффлюкс-помпы (системы, обеспечивающие выведение широкого спектра антибиотиков из бактериальной клетки) [7, 8].

По данным исследований [9], некоторые медицинские препараты, являющиеся блокаторами ионных каналов (кальцийзависимых), способны влиять на микроорганизмы путем блокирования эффлюкс-помп, что может повысить чувствительность к некоторым антибиотикам. Амлодипин - 3-Ethyl-5-methyl-2-[(2-aminoethoxy)methyl]-4-(2-chlorophenyl)-1,4-dihydro-6-methyl-3,5-pyridinedicarboxylate – блокатор ионных каналов (кальцийзависимых) – широко используется в кардиологии [10].

Цель исследования – изучить активность амлодипина в отношении моделирования устойчивости сальмонелл к энрофлоксацину.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Сальмонелл выделяли из проб печени и кишечника у цыплят-бройлеров по общепринятым методам изоляции. Использовали следующие питательные среды: XLT4, RVS-бульон, висмут-сульфит агар. Идентификацию до вида проводили с применением биохимических тестов (ПБДЭ – пластина для биохимической дифференциации энтеробактерий ООО «Диагностические системы», Нижний Новгород). Также сальмонелл тестировали методом ПЦР в режиме реального времени с использованием видоспецифичных праймеров и Taqman-зонда [11].

Антибиотикорезистентность определяли дискодиффузионным методом в соответствии с общепринятыми требованиями [12].

Антибиотикочувствительность сальмонелл к энрофлоксацину изучали методом серийных разведений. Интерпретацию результатов определения чувствительности к антибиотикам проводили с использованием

критериев Европейского комитета по оценке антибиотикочувствительности (EUCAST) 2012 г. [13].

Тестировали 15 культур сальмонелл (два изолята *S. typhimurium*, остальные относились к серотипу *Enteritidis*), изолированных из сельскохозяйственной птицы в 2017 г. Оценку наличия эффлюкса проводили с использованием классического теста с бромистым этидием [14, 15]. Сущность метода заключалась в посеве культур сальмонелл в виде штрихов на Eugonic-агар с бромистым этидием (1 мг/л). Через 16, 24 и 48 ч культивирования культуры просматривали с помощью трансиллюминатора. При отсутствии эффлюкса бромистый этидий попадал в бактериальную клетку и его комплекс с ДНК светился в ультрафиолетовых лучах. При наличии эффлюкса флюоресценция культур отсутствовала.

Тестирование на наличие эффлюкса путем выявления ингибирующего эффекта в присутствии амлодипина проводили следующим образом.

Культуры сальмонелл предварительно тестировали на чувствительность к энрофлоксацину методом серийных разведений. Энрофлоксацин разводили в LB бульоне в субингибирующих концентрациях – ниже минимальной ингибирующей концентрации в 2 раза. Далее в среде разводили амлодипин в концентрациях от 250 до 2 мкг/мл (с шагом 1 : 2). Затем проводили посев сальмонелл, включая контроль стерильности и отсутствия токсического эффекта амлодипина. Оценивали удельную долю культур, выросших в присутствии субингибирующих концентраций энрофлоксацина.

Выборка сальмонелл, выделенных в 2007 г., состояла из 23 культур, полученных из сельскохозяйственной птицы на девяти птицефабриках Сибирского региона. В 2017 г. сальмонеллы выделяли от птицы 10 птицефабрик Белгородской, Тюменской, Кемеровской, Новосибирской областей. Выборка включала 20 культур.

Статистическую достоверность различий определяли по Манну – Уитни, уровень статистической значимости рассчитывали согласно Sheskin [16].

### РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

По нашим данным, в 2015–2017 гг. резко возросло количество полирезистентных штаммов сальмонелл. Устойчивость наблюдали к антибиотикам лактамного ряда, фторхинолонам (табл. 1), доксициклину – наиболее активно применяемым в птицеводстве антибиотикам. Как следует из табл. 1, частота изоляции устойчивых к энрофлоксацину культур сальмонелл на птицефабриках РФ увеличилась от 0 до 23,08%. Изолятов с промежуточной чувствительностью выделено в 2017 г. в 2,6 раза больше, чем в 2007 г.

Как правило, полирезистентность сальмонелл и кишечной палочки фиксировали одновременно на одних и тех же птицефабриках. Чаще всего такие культуры начинали выделять на фоне попыток полного отказа от антибиотикопрофилактики (например, на родительских стадах кур). Также обращало на себя внимание наличие индуцибельности такой полирезистентности – восстановление антибиотикочувствительности культур после серии пассажей. Была выдвинута гипотеза о широком распространении штаммов сальмонелл с активированными системами эффлюкса.

Таблица 1. Встречаемость штаммов сальмонелл, устойчивых к энрофлоксацину, в 2007 и 2017 гг, %

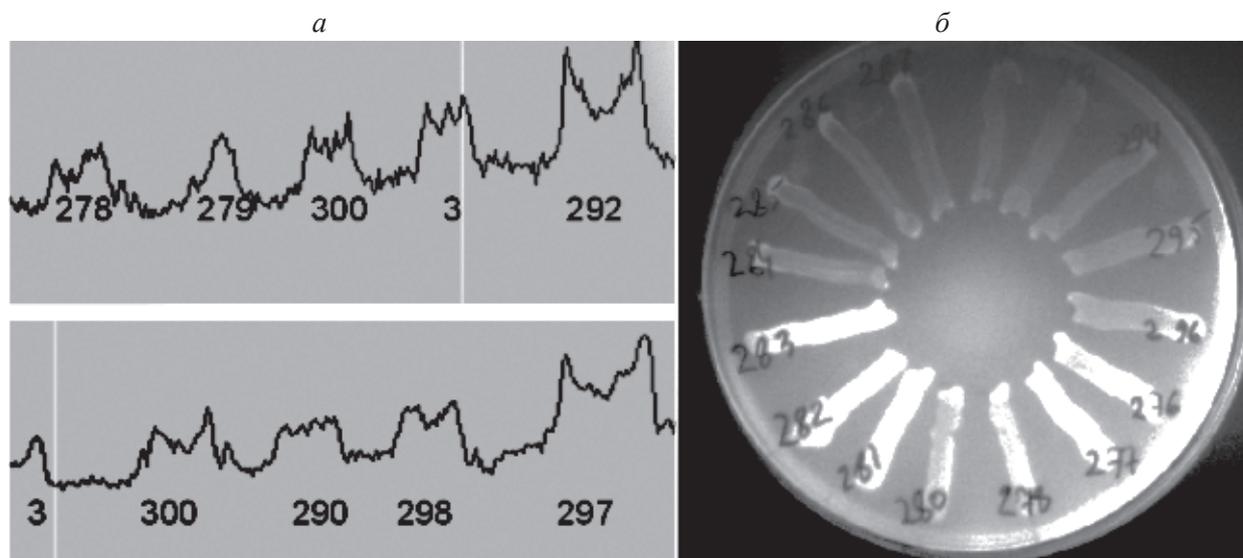
Table 1. Occurrence of salmonella strains resistant to enrofloxacin in 2007 and in 2017, %

Год	Число выделенных изолятов	Устойчивые	С промежуточной чувствительностью	Чувствительные
2017	13	23,08	30,8	46,2
2007	23	0	80	20

В исследовании эффлюкса с бромистым этидием установлено наличие эффлюкса у 53,3% протестированных изолятов. У 33,3% изолятов сальмонелл эффлюкс отсутствовал, 13,3% культур охарактеризованы как сомнительные (см. рисунок).

Наличие эффлюкса сопровождалось статистически значимым уменьшением размеров зон задержки роста в присутствии сульфаниламидов и статистически незначимым снижением чувствительности к энрофлоксацину (табл. 2).

Стандартный тест для выявления эффлюкса с бромистым этидием характеризовался низкой воспроизводимостью (в трех случаях из 20 результаты не воспроизвелись). Это может быть обусловлено как не-



Оценка эффлюкса у культур сальмонелл в тесте с бромистым этидием:

- a* – результаты денситометрии культур в присутствии бромистого этидия;
- б* – флюоресценция культур сальмонелл в присутствии бромистого этидия

Evaluation of the efflux of salmonella cultures in the test with ethidium bromide:

- a* – densitometry results of cultures in the presence of ethidium bromide
- b* – fluorescence of salmonella cultures in the presence of ethidium bromide

Таблица 2. Антибиотикочувствительность сальмонелл с эффлюксом и без эффлюкса (зоны задержки роста) ( $n = 20$ ), мм

Table 2. *Salmonella* sensitivity to antibiotics with efflux and without efflux (growth inhibition zones) ( $n = 20$ ), mm

Антибиотик	Наличие эффлюкса		Отсутствие эффлюкса	
	$M \pm m$	$Cv, \%$	$M \pm m$	$Cv, \%$
Триметоприм/ Сульфаметоксазол	$16,36 \pm 2,59^*$	35,46	$21,6 \pm 0,74$	7,74
Фуразолидон	$19,55 \pm 2,81$	32,2	$18,8 \pm 2,24$	26,7
Энрофлоксацин	$16,15 \pm 6,0$	84,45	$24,8 \pm 1,02$	9,19
Триметоприм/ сульфадимезин	$4,2 \pm 4,59^{**}$	244,7	$22,4 \pm 2,31$	23,11

\* $p < 0,05$ .  
\*\* $p < 0,01$ .

регулярной активацией эффлюкса у культур сальмонелл, так и субъективностью оценки результатов.

Для определения наиболее оптимальной концентрации амлодипина мы предварительно протестировали коллекцию штаммов сальмонелл на устойчивость к энрофлоксацину методом серийных разведений. Определив минимальные ингибирующие дозы энрофлоксацина для каждой культуры, посеяли эти культуры на среды, содержащие энрофлоксацин в субингибирующей концентрации.

Удельная доля штаммов сальмонелл, повысивших чувствительность к энрофлоксацину, повышалась при увеличении концентрации амлодипина (корреляция по Пирсону,  $r = 0,9$ ) (табл. 3). Однако наблюдалась нелинейная зависимость в диапазоне концентраций амлодипина 7,8–2,0 мкг/мл. Из 16 культур сальмонелл при всех его концентрациях две росли, три – нет (в присутствии субингибирующих концентраций энрофлоксацина). Таким образом, 87,5% культур сальмонелл повышали чувствительность к энрофлоксацину в присутствии ингибитора эффлюкса амлодипина.

Для тестирования эффлюкса следует использовать концентрации амлодипина 250 мкг/мл.

Несмотря на широкое клиническое использование фторхинолонов, резистентность к ним у сальмонелл встречается реже, чем к другим антибиотикам [17–19]. В геноме *S. typhimurium* найдено пять эффлюкс-

сных систем, повышенная экспрессия которых способствует эффективному выведению фторхинолонов [20]. Все более распространенной в последние годы становится плазмидоопосредованная резистентность к хинолонам [21]. Лучше всего описаны плазмидные Qnp белки, которые непосредственно взаимодействуют с комплексом ДНК и ДНК-гиразы или ДНК и топоизомеразы IV, препятствуя их связыванию с фторхинолонами [22, 23]. Другой ген, встречающийся в плаزمиде –  $aac(6')-Ib-cr$ , кодирует вариант фермента аминогликозид-ацетилтрансферазы, который способен инактивировать

Таблица 3. Рост культур *Salmonella enterica* на среде с субингибирующими концентрациями энрофлоксацина в присутствии различных концентраций амлодипина ( $n = 16$ )

Table 3. The growth of cultures *Salmonella enterica* in the medium with subinhibitory concentrations of enrofloxacin in the presence of different concentrations of amlodipine ( $n = 16$ )

Концентрация амлодипина, мкг/мл	Количество штаммов сальмонелл, выросших в присутствии субингибирующих доз энрофлоксацина, %
250,0	12,5
125,0	31,3
62,5	37,5
31,3	50
15,6	62,5
7,8	75
3,9	62,5
2,0	43,8

ципрофлоксацин посредством его ацетилирования. Кроме того, описанные ранее как хромосомные гены систем эффлюкса OqxAB и QerA, также найдены на плазмидах [21]. Перечисленные выше механизмы обеспечивают небольшое повышение МПК хинолонов, но могут дополнять мутации гена-мишени, что позволяет достичь высокого уровня резистентности [21]. Данные, полученные нами, не противоречат результатам в других странах и позволяют утверждать, что эффлюкс – один из наиболее распространенных механизмов устойчивости сальмонелл, выделяемых у кур в РФ, к фторхинолонам.

Немецкими исследователями обнаружен эффект сочетанного повышения МИС хлорамфеникола и фторхинолонов в процессе селекции генномодифицированных сальмонелл, содержащих клоны с соответствующими генами эффлюкс-помп и их регуляторами, под воздействием фторхинолонов [24, 25].

Таким образом, с 2007 по 2017 г. частота выделения сальмонелл, устойчивых к энрофлоксацину, возросла от 0 до 23,08%. При этом обращает на себя внимание наличие такого фактора мультирезистентности, как эффлюкс, у 53,3% протестированных штаммов в тесте с бромистым этидием и 87,5% культур в тесте с амлодипином. Расхождение результатов в этих двух тестах может быть обусловлено большей чувствительностью теста с амлодипином. При ингибировании эффлюкс-помпы в присутствии антибиотика можно с большей уверенностью интерпретировать, что факт гибели бактериальных клеток произошел под действием антибактериального агента. Следовательно, можно сделать вывод, что причина повышения чувствительности бактерий к антибиотикам – эффлюкс.

Тест с бромистым этидием не подразумевает использования антибиотика и соответственно индукции работы эффлюкс-помпы. Очевидно, что выведение бромистого этидия из бактериальной клетки в данном тесте возможно при условии наличия конституциональной экспрессии генов эффлюкс-помпы. В тесте с амлодипином мы исполь-

зовали субингибирующие концентрации энрофлоксацина, индивидуально подобранные для каждой культуры. В связи с изложенным выше активность эффлюкс-систем в тесте с бромистым этидием выявляется при наличии конституционально активной эффлюкс-помпы, а в тесте с амлодипином введение энрофлоксацина в культуру должно обеспечивать индукцию механизмов антибиотикорезистентности. Также больший процент культур, рост которых подавлялся в присутствии амлодипина и субингибирующих концентраций энрофлоксацина, позволяет утверждать об активности эффлюкс-систем у 87,5% культур, но их разной эффективности в отношении устойчивости к энрофлоксацину.

Введение амлодипина в концентрации 250 мкг/мл в культуры *Salmonella enterica* в присутствии субингибирующих концентраций энрофлоксацина повышало чувствительность к энрофлоксацину в 87,5% случаев.

## ВЫВОДЫ

1. Выявлена низкая воспроизводимость эффлюкса, исследованного с помощью стандартного теста с бромистым этидием, что может свидетельствовать о нерегулярной или периодической активации эффлюкса у культур сальмонелл.

2. Введение ингибитора эффлюкса амлодипина в культуры *Salmonella enterica* в присутствии субингибирующих концентраций энрофлоксацина повышало чувствительность к антибиотикам в 87,5% случаев.

3. У сальмонелл, у которых обнаружен эффлюкс, наблюдали достоверно низкую чувствительность к триметоприму с сульфаметоксазолом или сульфадимезином и недостоверно меньшую чувствительность к энрофлоксацину в сравнении с изолятами, не имеющими эффлюкс-систем.

4. Наличие эффлюкса у 69,6% изолятов *Salmonella enterica*, выявленного в опытах с амлодипином, может быть вызвано нарастающим в последние годы снижением чувствительности к антимикробным препаратам.

## БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. **Афонюшкин В.Н., Дударева Е.В., Малахеева Л.И., Фролова О.В., Шкред О.В., Филиппенко М.Л.** Современные методы контроля сальмонеллеза // Птицеводство – 2008. – № 9. – С. 43–44.
2. **Swartz M.N.** Human diseases caused by foodborne pathogens of animal origin. // Clinical Infectious Diseases. – 2002. – Vol. 34, N 3. – S. 111–122. doi: 10.1086/340248.
3. **Su L.-H., Chiu C.-H., Chu C., Ou J.T.** Antimicrobial resistance in nontyphoid *Salmonella* serotypes: a global challenge // Clinical Infectious Diseases. – 2004. – Vol. 39, N 4. S. 546–551. DOI: 10.1086/422726.
4. **Rajashekara G., Haverly E., Halvorson D.A., Ferris K.E., Lauer D.C., Nagaraja K.V.** Multidrug-resistant *Salmonella* typhimurium DT104 in poultry // J. of Food Protection. – 2000. – Vol. 63, N 2. – S. 155–161.
5. **Davis M.A., Hancock D.D., Besser T.E.** Multiresistant clones of *Salmonella enterica*: the importance of dissemination // The J/ of Laboratory and Clinical Medicine. – 2002. – Vol. 140, N 3. – S. 135–141. DOI: 10.1067/mlc.2002.126411.
6. **Martin L. J., Fyfe M., Dorÿ K. et al.** Increased burden of illness associated with antimicrobial-resistant *Salmonella enterica* serotype Typhimurium infections // The J. of Infectious Diseases. – 2004. – Vol. 189, N 3. – S. 377–384. DOI: 10.1086/381270.
7. **Jensen A.N., Hoorfar J.** Immediate differentiation of *Salmonella*-resembling colonies on brilliant green agar // J. of Rapid Methods and Automation in Microbiology. – 2000. – Vol. 8, N 3. – S. 219–225. DOI: 10.1111/j.1745-4581.2000.tb00219.x.
8. **Sefton A.M.** Mechanisms of antimicrobial resistance // Drugs. – 2002. – Vol. 62, N 4. – P. 557–566. DOI: 10.2165/00003495-200262040-00001.
9. **Foley S.L., Lynne A.M.** Food animal-associated *Salmonella* challenges: pathogenicity and antimicrobial resistance // J. of Animal Science. – 2008. – Vol. 86(14). – P. 173–187.
10. **Hamilton G., Theyer G., Baumgartner G.** Calcium antagonists as modulators of multidrug resistant tumor cells // Wien Med Wochenschr. – 1993. – Vol. 143. – N 19–20. – S. 526–532.
11. **Machado D., Pires J., Perdigo I., Couto I., Portugal M., Martins L., Amaral E., Anes and M.** Viveiros Ion Channel Blockers as Antimicrobial Agents, Efflux Inhibitors, and Enhancers of Macrophage Killing Activity against Drug Resistant Mycobacterium tuberculosis // PLoS One. – 2016. – Vol. 11, N 2. CLSI Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; 21st informational supplement. – 2011. – N 31. – 165 s.
13. **EUCAST** Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 2.0. – 2012. – S. 1–73.
14. **Martins M., Santos B., Martins A.** An instrument-free method for the demonstration of efflux pump activity of bacteria // In Vivo. – 2006. – Vol. 20, S. 657–664.
15. **Martins M., Viveiros M., Couto I.** Identification of efflux pump-mediated multidrug-resistant bacteria by the ethidium bromide-agar cartwheel method // In Vivo. – 2011. – Vol. 25. – S. 171–178.
16. **Sheskin D.J.** Handbook of parametric and nonparametric statistical procedures. /3<sup>rd</sup> ed. Boca Raton: Chapman & Hall // CRC. – 2004. – P. 542.
17. **Bouchrif B., Paglietti B., Murgia M. et al.** Prevalence and antibiotic-resistance of *Salmonella* isolated from food in Morocco // J. Infect Dev Ctries. – 2009. – Vol. 3, N 1. – S. 35–40.
18. **Herikstad H., Hayes P., Mokhtar M., Fracaro M.L., Threlfall E.J., Angulo F.J.** Emerging quinolone-resistant *Salmonella* in the United States // Emerg Infect Dis. – 1997. – Vol. 3, N 3. – S. 371–372.
19. **Medalla F., Sjolund-Karlsson M., Shin S. et al.** Ciprofloxacin-resistant *Salmonella enterica* serotype Typhi, United States, 1999–2008 // Emerg Infect Dis. – 2011. – Vol. 17. – N 6. – S. 1095–1098.
20. **Nishino K., Latifi T., Groisman E.A.** Virulence and drug resistance roles of multidrug efflux systems of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium // Mol Microbiol. – 2006. – Vol. 59, N 1. – S. 126–141.
21. **Strahilevitz J., Jacoby G.A., Hooper D.C., Robicsek A.** Plasmid-mediated quinolone resistance: a multifaceted threat // Clin Microbiol Rev. – 2009. – Vol. 22, N 4. – S. 664–689.
22. **Martinez-Martinez L., Eliecer Cano M., Manuel Rodriguez-Martinez J., Calvo J., Pascual A.** Plasmidmediated quinolone resistance // Expert Rev Anti Infect Ther. – 2008. – Vol. 6, N 5. – S. 685–711.

23. **Martinez-Martinez L., Pascual A., Jacoby G.A.** Quinolone resistance from a transferable plasmid // *Lancet*. – 1998. – Vol. 351, N 9. – S. 797–799.
24. **Schmidt S., Heisig P.** Development of multidrug efflux mediated fluoroquinolone resistance in *Salmonella* Hadar: Poster. 17<sup>th</sup> European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases. – München, 2007.
25. **Schmidt S., Heisig P.** Potential of fluoroquinolones to induce the expression of the *acrAB* efflux pump and the global regulator *marA* in *Salmonella* Hadar.: Vortrag. 16<sup>th</sup> European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases. – Nizza, Frankreich, 2006.
- Vol. 8, N 3. – S. 219–225. doi: 10.1111/j.1745-4581.2000.tb00219.x.
8. **Sefton A.M.** Mechanisms of antimicrobial resistance // *Drugs*. – 2002. – Vol. 62. – N 4. – P. 557–566. doi: 10.2165/00003495-200262040-00001.
9. **Foley S.L., Lynne A.M.** Food animal-associated *Salmonella* challenges: pathogenicity and antimicrobial resistance // *J. of Animal Science*. – 2008. – Vol. 86(14). – P. 173–187.
10. **Hamilton G., Theyer G., Baumgartner G.** Calcium antagonists as modulators of multidrug resistant tumor cells // *Wien Med Wochenschr*. – 1993. – Vol. 143, N 19–20. – S. 526–532.
11. **Machado D., Pires J., Perdigo I., Couto I., Portugal M., Martins L., Amaral E., Anes and M.** Viveiros Ion Channel Blockers as Antimicrobial Agents, Efflux Inhibitors, and Enhancers of Macrophage Killing Activity against Drug Resistant *Mycobacterium tuberculosis* // *PLoS One*. – 2016. – Vol. 11. – N 2.
12. **CLSI** Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; 21st informational supplement. – 2011. – N 31. – 165 s.
13. **EUCAST** Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 2.0. – 2012. – S. 1–73.
14. **Martins M., Santos B., Martins A.** An instrument-free method for the demonstration of efflux pump activity of bacteria // *In Vivo*. – 2006. – Vol. 20. – S. 657–664.
15. **Martins M., Viveiros M., Couto I.** Identification of efflux pump-mediated multidrug-resistant bacteria by the ethidium bromide-agar cartwheel method // *In Vivo*. – 2011. – Vol. 25. – S. 171–178.
16. **Sheskin D.J.** Handbook of parametric and nonparametric statistical procedures. 3<sup>rd</sup> ed. Boca Raton: Chapman & Hall // CRC. – 2004. – P. 542.
17. **Bouchrif B., Paglietti B., Murgia M. et al.** Prevalence and antibiotic-resistance of *Salmonella* isolated from food in Morocco // *J. Infect Dev Ctries*. – 2009. – Vol. 3, N 1. – S. 35–40.
18. **Herikstad H., Hayes P., Mokhtar M., Fracaro M.L., Threlfall E.J., Angulo F.J.** Emerging quinolone-resistant *Salmonella* in the United States // *Emerg Infect Dis*. – 1997. – Vol. 3, N 3. – S. 371–372.
19. **Medalla F., Sjolund-Karlsson M., Shin S. et al.** Ciprofloxacin-resistant *Salmonella en-*

#### REFERENCES

1. **Afonyushkin V.N., Dudareva E.V., Malakheeva L.I., Frolova O.V., Shkred O.V., Filippenko M.L.** Sovremennye metody kontrolya sal'monelleza // *Ptitsevodstvo* – 2008. – № 9. – S. 43–44.
2. **Swartz M.N.** Human diseases caused by foodborne pathogens of animal origin. *Clinical Infectious Diseases*. – 2002. – Vol. 34, N 3. – S. 111–122. doi: 10.1086/340248.
3. **Su L.-H., Chiu C.-H., Chu C., Ou J.T.** Antimicrobial resistance in nontyphoid *Salmonella* serotypes: a global challenge // *Clinical Infectious Diseases*. – 2004. – Vol. 39, N 4. S. 546–551. doi: 10.1086/422726.
4. **Rajashékara G., Haverly E., Halvorson D.A., Ferris K.E., Lauer D.C., Nagaraja K.V.** Multidrug-resistant *Salmonella* typhimurium DT104 in poultry // *J. of Food Protection*. – 2000. – Vol. 63, N 2. – S. 155–161.
5. **Davis M.A., Hancock D.D., Besser T.E.** Multiresistant clones of *Salmonella enterica*: the importance of dissemination // *The J/ of Laboratory and Clinical Medicine*. – 2002 – Vol. 140, N 3. – S. 135–141. doi: 10.1067/mlc.2002.126411.
6. **Martin L. J., Fyfe M., Dorÿ K. et al.** Increased burden of illness associated with antimicrobial-resistant *Salmonella enterica* serotype Typhimurium infections // *The J. of Infectious Diseases*. – 2004. – Vol. 189, N 3. – S. 377–384. doi: 10.1086/381270.
7. **Jensen A.N., Hoorfar J.** Immediate differentiation of *Salmonella*-resembling colonies on brilliant green agar // *J. of Rapid Methods and Automation in Microbiology*. – 2000. –

- terica* serotype Typhi, United States, 1999–2008 // *Emerg Infect Dis.* – 2011. – Vol. 17, N 6. – S. 1095–1098.
20. **Nishino K., Latifi T., Groisman E.A.** Virulence and drug resistance roles of multidrug efflux systems of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium // *Mol Microbiol.* – 2006. – Vol. 59, N 1. – S. 126–141.
  21. **Strahilevitz J., Jacoby G.A., Hooper D.C., Robicsek A.** Plasmid-mediated quinolone resistance: a multifaceted threat // *Clin Microbiol Rev.* – 2009. – Vol. 22, N 4. – S. 664–689.
  22. **Martinez-Martinez L., Eliecer Cano M., Manuel Rodriguez-Martinez J., Calvo J., Pascual A.** Plasmidmediated quinolone resistance // *Expert Rev Anti Infect Ther.* – 2008. – Vol. 6, N. 5. – S. 685–711.
  23. **Martinez-Martinez L., Pascual A., Jacoby G.A.** Quinolone resistance from a transferable plasmid // *Lancet.* – 1998. – Vol. 351, N 9. – S. 797–799.
  24. **Schmidt S., Heisig P.** Development of multidrug efflux mediated fluoroquinolone resistance in *Salmonella* Hadar: Poster. 17<sup>th</sup> European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases. – Мюнхен, 2007.
  25. **Schmidt S., Heisig P.** Potential of fluoroquinolones to induce the expression of the *acrAB* efflux pump and the global regulator *marA* in *Salmonella* Hadar.: Vortrag. 16<sup>th</sup> European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases. – Nizza, Frankreich, 2006.

## INFLUENCE OF AMLODIPINE ON RESISTANCE TO ENROFLOXACINE IN *SALMONELLA ENTERICA*

**N.V. DAVYDOVA**<sup>1</sup>, Candidate of Veterinary Sciences, Senior Researcher,  
**V.N. AFONYUSHKIN**<sup>1,2</sup>, Candidate of Biological Sciences, Head of the Sector,  
**Yu.V. KOZLOVA**<sup>2</sup>, Candidate of Biological Sciences, Junior Researcher,  
**M.L. FILIPENKO**<sup>2</sup>, Candidate of Biological Sciences, Head of Laboratory,  
**VOLKOV D.V.**<sup>1</sup>, Junior Researcher

<sup>1</sup> *Siberian Federal Scientific Center of Agro-Biotechnologies, RAS,  
Krasnoobsk, Novosibirsk region, 630501, Russia  
e-mail: lisocim@mail.ru*

<sup>2</sup> *Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine  
of the Siberian Branch RAS,  
8 Lavrentieva ave, Novosibirsk, 630090, Russia,  
e-mail: mfilipenko@gmail.com*

In recent years, there has been an increase in the number of strains of salmonellae resistant to antibiotics of fluoroquinolone series. The occurrence of *Salmonella* resistant to enrofloxacin was assessed at poultry farms of the Russian Federation in 2007 and 2017. In 2007 sensitivity of 23 salmonella cultures to enrofloxacin was studied and in 2017 the same study was done with 15 salmonella cultures isolated from agricultural birds. Antibiotic resistance was determined by the disc-diffusion method in compliance with the generally accepted requirements. From 2007 to 2017 the frequency of salmonella isolation resistant to enrofloxacin increased from 0 to 23.08%. Evaluation of the efflux (active removal of antimicrobial substances by a bacterial cell) was carried out using a classical test with ethidium bromide. It was established that the presence of efflux in *Salmonella* cultures was associated with an insignificant increase in resistance to enrofloxacin, trimethoprim with sulfamethoxazole and trimethoprim with sulfadimezine. The effect of amlodipine on the sensitivity of salmonella to enrofloxacin was evaluated by cultivation of *Salmonella* in the presence of various concentrations of amlodipine. It was revealed that the specific proportion of strains of salmonella with higher sensitivity to enrofloxacin increased with the simultaneous rise in concentrations of amlodipine (Pearson correlation,  $r = 0.9$ ). Administration of amlodipine in concentration of 250 µg/ml to *Salmonella enterica* cultures, in the presence of subinhibitory concentrations of enrofloxacin, increased their sensitivity to enrofloxacin in 87.5% of cases.

**Keywords:** antibiotic resistance, efflux, fluoroquinolones, salmonella, broilers, amlodipine

*Поступила в редакцию 04.02.2018*