

Л.Л. Сіда, О.С. Воронкова, О.А. Сірокваша, Т.М. Шевченко,
А.І. Вінніков

Дніпропетровський національний університет імені Олеся Гончара,
просп. Гагаріна, 72, Дніпропетровськ, 49050, Україна,
e-mail: voronkova_olga@inbox.ru

ВПЛИВ АНТИСЕПТИКІВ І ДЕЗІНФЕКЦІЙНИХ ПРЕПАРАТІВ НА ПЛІВКОУТВОРЮВАЛЬНІ БАКТЕРІЇ

Мета. Вивчити ефективність дії неспецифічних антибактеріальних препаратів на біоплівки, утворені бактеріями, що виділені з поверхонь приміщень, відпрацьованих медичних матеріалів та шкіри рук. **Методи.** Бактерії для дослідження ізолювали з поверхонь службових приміщень, відпрацьованого інструментарію, а також зі шкіри рук 11 осіб-добровільців. Здатність до плівкоутворення виділених ізолятів та їх стійкість до різних неспецифічних антибактеріальних препаратів вивчали в пластикових планшетах за умов інкубації біоплівок з антисептиками та дезінфектантами. **Результати.** Виділено 179 штамів бактерій, які було ідентифіковано як *Bacillus* spp. – 53,6%, *S. epidermidis* – 17,3%, *S. aureus* – 3,4%, *E. coli* – 12,3%, *Acinetobacter* spp. – 8,4%, *Klebsiella* spp., *P. aeruginosa* та *Pseudomonas* spp. – по 1,1%, *Enterobacteriaceae* – 3,4%. 62% зразків отримано з поверхонь приміщень, 12,3% – з рук, 25,7% – з використаного медичного інструментарію. Показано, що 93,5% штамів *S. epidermidis* володіли здатністю до утворення біоплівки, що було одним з найвищих показників серед досліджених штамів. Після інкубації 3-добової біоплівки цих штамів з різними антибактеріальними препаратами для понад 60% культур встановлено відсутність росту, а для інших – кількість бактерій, що виростили з гомогенату не перевищувала 10^3 КУО/мл. Максимальний ефект пригнічення плівкового росту виявлено при застосуванні дезінфектанту дезактив-хлор. При використанні антисептика хлоргексидину у концентрації 5% чутливими у плівковому стані виявилися 84,6% штамів. **Висновки.** При використанні антибактеріальних препаратів проти 3-добових біоплівок виживання бактерій при 2-годинній інкубації з досліджуваними препаратами не перевищувала 40%, що вказує на можливість ефективного застосування досліджуваних неспецифічних антибактеріальних препаратів для боротьби з поширенням біоплівкоутворювальних штамів.

Ключові слова: біоплівка, бактерії, чутливість, антибактеріальні препарати.

Сьогодні вважається, що переважна більшість ускладнень при інфекційних захворюваннях асоційована зі здатністю збудників формувати біоплівку [8, 12, 15], у стані якої мікроорганізми стають більш стійкими до дії факторів довкілля, що частково сприяє їх поширенню [5, 17]. Вивчення факторів, що впливають на розвиток біоплівки, дозволяє розробити профілактичні заходи



зادля упередження початку розвитку біоплівки, що особливої актуальності набуває при дезінфекції приміщень, відпрацьованого медичного інструментарію та рук персоналу лікувальних закладів, які є потенційними джерелами поширення плівкоутворювальних штамів.

Сучасні дезінфекційні засоби, представлені широким спектром хімічних сполук різних класів, поєднані загальною здатністю до знищення мікроорганізмів навіть у невисоких концентраціях. Однак, ці засоби застосовні лише для обробки поверхонь об'єктів, а не шкіри людини, хоча персонал, що пересувається лікарняним закладом вважається одним з джерел поширення госпітальних штамів. Крім того, застосування більшості з дезінфекційних протимікробних засобів розраховане для неплівкових культур мікроорганізмів [1, 2]. Для обробки шкіри існує низка засобів, але питання про їх ефективність стосовно біоплівки також потребує вивчення.

Відомо [10, 16, 18], що плівкоутворювальні штами бактерій у біоплівці проявляють посилену стійкість до антибіотиків, що значно ускладнює лікування.

Метою роботи було вивчити ефективність дії неспецифічних антибактеріальних препаратів на біоплівки, утворені бактеріями, що виділені з поверхонь приміщень, відпрацьованих медичних матеріалів та шкіри рук.

Матеріали і методи

У роботі вивчали ефективність впливу неспецифічних антибактеріальних засобів на біоплівки штамів бактерій, які були виділені з поверхні медичного інструментарію (відпрацьовані уретральні катетери), з рук 11 осіб-добровільців (2 – молодший медичний персонал лікарні, 5 – працівники комунального закладу «Профдезінфекція», 4 – добровільці з числа осіб, що не працюють у вказаних організаціях) та поверхонь (підлога, стіни, підвіконня) службових приміщень комунального закладу «Профдезінфекція».

Виділення та ідентифікацію мікроорганізмів здійснювали відповідно до ознак, наведених у визначнику бактерій Берджі [9]. Всього було отримано 153 зразки матеріалу, з яких виділено 179 штамів.

Здатність до плівкоутворення визначали на пластикових планшетах, у лунки яких вносили 0,5 мл поживного середовища (м'ясо-пептонний бульйон) та 50 мкл суспензії добової культури клітин виділених штамів, що містили 1×10^5 КУО/мл. Планшети інкубували протягом 3–5 діб, після чого шприцем відбирали середовище. При зависанні на стінках або дні планшета помітної плівки штаму вважали плівкоутворювальним [6, 11].

Для визначення ефективності впливу на біоплівкоутворювальні штами антибактеріальних засобів використовували чисті культури виділених бактерій. Для досліджень використовували добові агарові культури мікроорганізмів.

Оскільки переважну більшість дезінфектантів застосовують у вигляді водних розчинів, функціональні властивості яких визначаються концентрацією присутньої у їх складі активної діючої речовини, об'єктивною характеристикою чутливості до препарату служить концентрація дезінфектанту, що викликає загибель 100% внесених бактерій у фіксований час [1, 3, 7].



Для досліджень використовували антибактеріальні препарати: 4%-й розчин лізетолу, 10%-й розчин «Гігасепту», 5%-й розчин «Гексакварт форте», 1-, 2- та 5%-ві розчини хлоргексидину, 0,11%-й розчин «Дезактив-хлору», що дозволені до використання в Україні згідно Державного реєстру дезінфікувальних засобів на 2014 рік [4]. Для вивчення впливу перелічених засобів проводили дослідження наявності росту після їх внесення у вказаній концентрації. До лунки планшета з 3-добовою плівкою (вирощували в одному мл МПБ) вносили вносили 1 мл препарату у робочій дозі. Після інкубації протягом 2-х годин плівку відбирали з лунки, переносили у скляний гомогенізатор для подрібнення та стандартизували до концентрації 10^5 КУО/мл. Гомогенат клітин висівали на щільне поживне середовище.

Вплив різних концентрацій хлоргексидину вивчали на 3-добовій біоплівці штамів *S. epidermidis*. При цьому визначали зміну кількості бактерій, що росли в гомогенаті біоплівки після 2 год інкубації за умов впливу різних концентрацій дезінфектанта – 0,5; 1,0; 2,0 та 5,0%.

Результати та їх обговорення

Вивчення 179 виділених штамів дозволило ідентифікувати їх як: *S. epidermidis* – 31 (17,3%), *S. aureus* – 6 (3,4%), *Bacillus spp.* – 96 (53,6%), *E. coli* – 22 (12,3%), *Acinetobacter spp.* – 15 (8,4%), *Klebsiella spp.*, *P. aeruginosa* та *Pseudomonas spp.* – по 2 (1,1%). Три штами (3,4%) ідентифіковані лише до родини *Enterobacteriaceae* (рис. 1).

Для виділених штамів вивчали здатність до утворення біоплівки. З отриманих даних можна побачити (рис. 2), що найбільша частка здатних до плівкоутворення штамів була виявлена серед псевдомонад (100%) та стафілококів (епідермальний стафілокок – 93,5% та золотистий стафілокок – 66,7% штамів). Серед інших штамів здатність до плівкоутворення траплялася рідше.

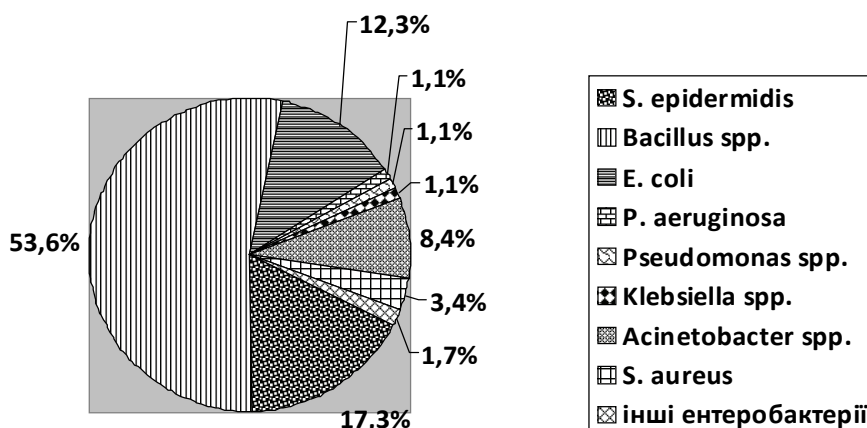


Рис. 1. Спектр бактерій, виділених з поверхонь приміщень, інструментарію та рук осіб-добровольців

Fig. 1. The spectrum of bacteria isolated from the surfaces of rooms, instrumentals and skin of volunteers

Для подальших досліджень з вивчення дії неспецифічних антибактеріальних засобів на біоплівку використовували лише штами епідермального стафілококу (26 штамів), що були виділені з використаного медичного інструментарію (катетери). Цю групу штамів обрано з огляду на те, що за існуючими даними [13, 14] стафілококи є одними з найбільш відомих, здатних до утворення біоплівки мікроорганізмів.

Для обраних штамів стафілококів проведено аналіз кількості бактерій у 3-добовій біоплівці після її інкубації з досліджуваними препаратами протягом 2 год (рис. 3). Результати представлено у порівнянні з контролем – 3-догова плівка тієї ж культури, але без додавання препаратів.

Відповідно до отриманих результатів можна побачити, що в усіх контрольних зразках мав місце ріст від 10^7 до 10^{10} КУО/мл (найбільше культур – 20 (76,9%) – давали ріст у межах 10^9 КУО/мл), у той час як у жодному з дослідних зразків кількісний показник росту не перевищував 10^3 КУО/мл (єдина культура). Для більшості дослідних культур (понад 60%) після інкубації з антибактеріальними препаратами протягом 2 год зафіксовано відсутність росту при використанні будь-якого з них.

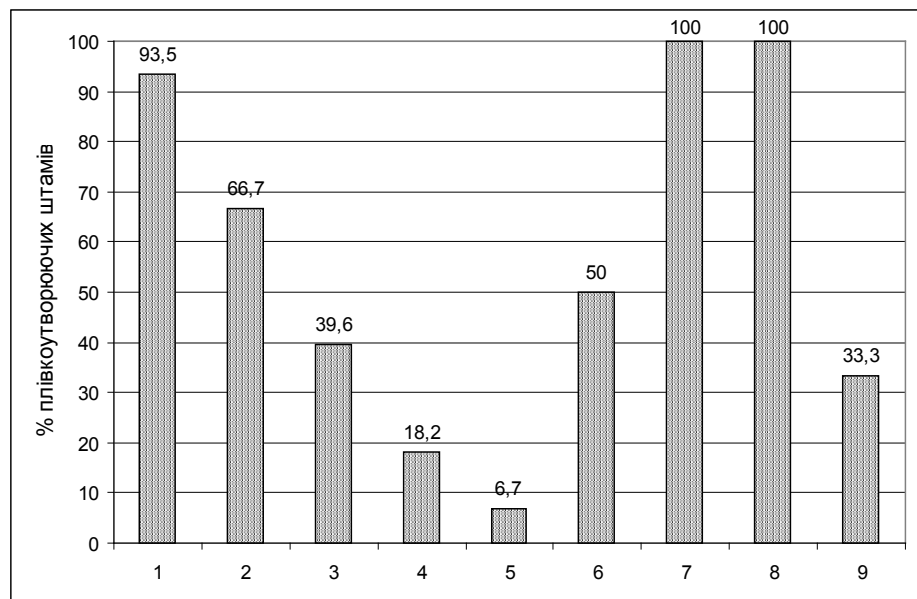


Рис. 2. Частота виявлення здатності до плівкоутворення серед досліджуваних штамів бактерій:

1 – *S. epidermidis*, 2 – *S. aureus*, 3 – *Bacillus spp.*, 4 – *E. coli*,
5 – *Acinetobacter spp.*, 6 – *Klebsiella spp.*, 7 – *P. aeruginosa*, 8 – *Pseudomonas spp.*,
9 – інші ентеробактерії

Fig. 2. The frequency of determination of filmforming ability among isolated strains of bacteria:

1 – *S. epidermidis*, 2 – *S. aureus*, 3 – *Bacillus spp.*, 4 – *E. coli*,
5 – *Acinetobacter spp.*, 6 – *Klebsiella spp.*, 7 – *P. aeruginosa*, 8 – *Pseudomonas spp.*,
9 – another enterobacteria



Найбільшу ефективність виявлено при використанні препарату Дезактив-хлор, що містить активні сполуки хлору: відмічено 100% пригнічення плівкового росту, що свідчить на найкращі перспективи використання цього препарату для дезінфекційної обробки приміщень.

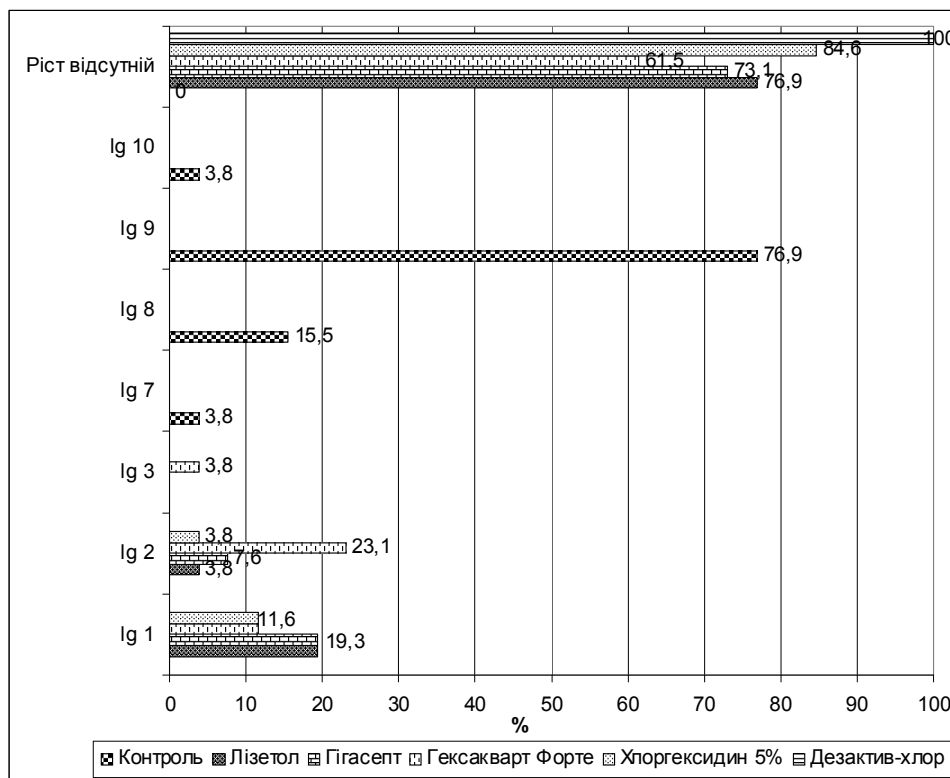


Рис. 3. Частка культур з різною інтенсивністю росту при використанні різних неспецифічних антибактеріальних препаратів

Fig. 3. The percent of the cultures with different intensity of growth under use of different non-specific antibacterial preparates

Другим за ефективністю виявився хлоргексидин, чутливими до дії якого у концентрації 5% виявилися 84,6% штамів, а решта давала ріст поодиноких колоній. Використана концентрація препарату не є рекомендованою для обробки біологічних тканин. Зазвичай для обробки уражених тканин використовують концентрацію 0,1–0,2%. Натомість, зважаючи на підвищену стійкість бактерій у складі біоплівки до факторів довкілля, доцільним було дослідити і вплив більших концентрацій. Тому у наступній експериментальній серії вивчали вплив концентрацій від 0,5 до 5%. Після 2-годинної інкубації 3-добових біоплівки з антисептиком у різних концентраціях визначали зниження кількості клітин, що вижили. Встановлено, що зі зростанням концентрації відбувалося зниження кількості культур, що давали ріст. Максимальне значення було отримано для

концентрації 5%, що було показано вище. Ефективність менших концентрацій практично була близькою до ефекту максимальної з застосованих. Так, при застосуванні 0,5%-вого розчину хлоргексидину найбільший кількісний показник росту становив 10^3 КУО/мл для 2 культур (7,6%), 10^2 КУО/мл – для 3 культур (11,5%), 10^1 КУО/мл – для 6 культур (23,1%), для 15 (57,7%) – росту не визначено взагалі. При застосуванні 1%-вого розчину хлоргексидину 10^2 КУО/мл мали 4 культури (15,4%), 10^1 КУО/мл – 3 культури (11,5%), 19 (73,1%) – не давали росту. При використанні 2%-вого розчину хлоргексидину кількість колоній сягала від 10 та 10^2 КУО/мл для 2 (разом 15,2%) культур, для 22 (84,6%) культур росту виявлено не було. Тобто ефект концентрації у 2% цілком порівняний із дією 5%-вого розчину хлоргексидину. Отримані результати вказують на потребу у проведенні подальших досліджень із визначення ефекту дії антисептиків, що використовуються як профілактичні та лікувальні препарати, на біоплівкоутворення у мікроорганізмів.

У результаті досліджень встановлено, що зі 179 ідентифікованих штамів найвищий відсоток здатних до плівкоутворення був серед штамів *S. epidermidis* – 93,5%.

При обробці культур плівкоутворювальних штамів *S. epidermidis* робочими розчинами показано, що для понад 60% культур після інкубації з антибактеріальним засобом протягом 2 год зафіксовано відсутність росту.

Найбільшу ефективність серед дезінфекційних препаратів виявлено при використанні препарату Дезактив-хлор: відмічено 100% загибелі плівкового росту. При використанні антисептиків найбільш ефективним було застосування хлоргексидину у концентрації 5%, чутливими до дії якого виявилися 84,6% штамів. Практично такий самий ефект давала концентрація розчину хлоргексидину 2%.

Л.Л. Седая, О.С. Воронкова, Е.А. Сірокваша, Т.Н. Шевченко,
А.И. Винников

Днепропетровский национальный университет имени Олеся Гончара,
просп. Гагарина, 72, Днепропетровск, 49050, Украина,
e-mail: voronkova_olga@inbox.ru

ВЛИЯНИЕ АНТИСЕПТИКОВ И ДЕЗИНФЕКЦИОННЫХ ПРЕПАРАТОВ НА ПЛЕНКООБРАЗУЮЩИЕ БАКТЕРИИ

Реферат

Цель. Изучить эффективность действия неспецифических антибактериальных препаратов на биопленки, образованные бактериями, выделенными с поверхностей помещений, отработанных медицинских материалов и кожи рук.

Методы. Бактерии для исследования изолировали с поверхностей служебных помещений, отработанного инструментария, а также с кожи рук 11 лиц-добровольцев. Способность к пленкообразованию выделенных изолятов и их устойчивость к разным неспецифическим антибактериальным препаратам



изучали в пластиковых планшетах при условии инкубации биопленок с антисептиками и дезинфектантами. **Результаты.** Выделено 179 штаммов бактерий, которые были идентифицированы как: *Bacillus spp.* – 53,6%, *S. epidermidis* – 17,3%, *S. aureus* – 3,4%, *E. coli* – 12,3%, *Acinetobacter spp.* – 8,4%, *Klebsiella spp.*, *P. aeruginosa* и *Pseudomonas spp.* – по 1,1%, *Enterobacteriaceae* – 3,4%. 62% образцов получены с поверхностей помещений, 12,3% – с рук, 25,7% – с использованного медицинского инструментария. Показано, 93,5% штаммов *S. epidermidis* обладали способностью к образованию биопленки, что было одним из наиболее высоких показателей среди изученных штаммов. После инкубации 3-х суточной биопленки этих штаммов с различными антибактериальными препаратами для более чем 60% культур выявлено отсутствие роста, а для других – количество выросших из гомогената клеток не превышало 10^3 КОЕ/мл. Максимальный эффект угнетения пленочного роста выявлен при использовании дезинфектанта дезактив-хлор. При использовании антисептика хлоргексидина в концентрации 5% чувствительными к нему в пленочном состоянии оказались 84,6% штаммов. **Выводы.** При использовании антибактериальных препаратов против 3-хсуточных бактериальных биопленок выживаемость бактерий при 2-хчасовой инкубации биопленки с исследуемыми препаратми не превышала 40%, что указывает на возможность эффективного применения изученных неспецифических антибактериальных препаратов для борьбы с распространением пленкообразующих штаммов бактерий.

Ключевые слова: биопленка, бактерии, чувствительность, антибактериальные препараты.

L.L. Sedaya, O.S. Voronkova, E.A. Sirokvasha, T.N. Shevcheno, A.I. Vinnikov

Oles Honchar Dnipropetrovsk National University,
72, Gagarin av., Dnipropetrovsk, 49050, Ukraine,
e-mail: voronkova_olga@inbox.ru

INFLUENCE OF ANTISEPTIC AND DESINFECTIVE PREPARATES ON FILMFORMING BACTERIA

Summary

Aim. Study the efficacy of action of non-specific antibacterial agents on biofilm, formed by bacteria, isolated from the surface facilities, waste materials and the skin. **Methods.** Bacteria for research were isolated from the surfaces of stuff rooms, used instruments and also from the skin of 11 volunteers-patients hands. The ability to biofilmformation of isolated strains and their resistance to different antibacterial preparates under incubation with antiseptics and disinfectants were studied on plastic plates. **Results.** 179 strains were isolated and identified as: *Bacillus spp.* – 53.6%, *S. epidermidis* – 17.3%, *S. aureus* – 3.4%, *E. coli* – 12.3%, *Acinetobacter spp.* – 8.4%, *Klebsiella spp.*, *P. aeruginosa* and *Pseudomonas spp.* – 1.1%, *Enterobacteriaceae* – 3,4%. 62% of isolates were received from the surfaces of stuffrooms, 12.3% – from the skin, 25.7% – from used instruments. It was shown, that 93.5% of *S. epidermidis* strains can form biofilm, that was one of the highest range between studied strains. After incubation of 72 h. biofilms of these strains with different antibacterial preparates for more than 60% of cultures shown absence of growth, for another – number of cells, that grew from homogenates, were no high as 10^3 CFU/ml. Maximal effect on inhibition of film growth was shown under use of disinfectant desactive-chlor. Under using of antiseptic



chlorhexidin in concentration 5% sensitive to them in film were 84.6% of the strains.

Conclusion. *Under using of antibacterial preparates against 72 h. bacterial biofilm survivance of cells after 2 h. incubation of films with studied preparates was not more than 40%, that indicated on possibility of effective use of studied non-specific antibacterial agents against the spread of filmforming strains.*

Key words: biofilm, bacteria, sensitivity, antibacterial preparates.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. *Афиногенова Г.Е.* Чашечный метод оценки эффективности дезинфектантов и антисептиков: методическое пособие. – СПб; 2000. – 98 с.
2. *Галынкин В.А., Заикина Н.А., Потехина Т.С.* Дезинфекция и антисептика в промышленности и медицине. – СПб, 2004. – 96 с.
3. *Горбунов В.А., Гудкова Е.И.* Микробиологические основы противомикробных мероприятий: учеб.-метод. пособие. – Минск: БГМУ, 2006. – 38 с.
4. *Державний реєстр дезінфекційних засобів (07.03.2014 р.).* Режим доступу: <http://www.dsesu.gov.ua/ua/normativna-pravova-baza/bazi-ta-reestri/reiestr-dezinfektsiinykh-zasobiv/item/539-derzhavnyi-reiestr-dezinfektsiinykh-zasobiv-2014-rik/539-derzhavnyi-reiestr-dezinfektsiinykh-zasobiv-2014-rik>.
5. *Заславская Н.В., Артеменко Н.К., Чижевская М.М., Тец В.В.* Особенности выживаемости бактерий в микробных сообществах // Клинич. микробиология и антимикробная химиотерапия. – 2000. – № 2. – С. 19–20.
6. *Лямин А.В., Боткин Е.А., Жестков А.В.* Методы выявления биопленок в медицине: возможности и перспективы // Клини. микробиол. антимикроб. химиотер. – 2012. – Т. 14, № 1. – С. 17–22.
7. *Морозова Н.С., Мариевский В.Ф.* Основы дезинфектологии. Дезинфекция и стерилизация. – К.: «Ателье «Полиграфический комплекс», 2009. – 144 с.
8. *Мясникова А.В., Потатуркина-Нестерова Н.И., Немова И.С., Нагорнов Ю.С.* Морфологический состав биопленки биотопа влагалища при воспалительных заболеваниях репродуктивного тракта женщин // Вестник новых медицинских технологий. – 2011. – № 4. – С. 21–24.
9. *Определитель бактерий Берджи:* Пер. с англ. / Под ред. Хоулта Дж., Криля Н., Синта П. и др. в 2-х тт. – М: Мир, 1997. – Т. 1 – 430 с.; Т. 2 – 368 с.
10. *Тец В.В., Заславская Н.В.* Эффективность действия антибиотиков на бактерии в биопленках // ЖМЭИ. – 2005. – № 5. – 24–26 с.
11. *Чеботарь И.В., Гурьев Е.Л.* Лабораторная диагностика клинически значимых биоплёночных процессов // Вопр. диагностики в педиатрии. – 2012. – № 4. – С. 15–20.
12. *Costerton J.W., Stewart P.S., Greenberg E.P.* Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections // Science. – 1999. – Vol. 284. – P. 1318–1322.
13. *Donlan R.M., Costerton J.W.* Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms // Clin. Microbiol. Rev. – 2002. – Vol. 15. – P. 167–193.



14. *Gotz F.* Staphylococcus and biofilms // *Mol. Microb.* – 2002. – Vol. 43 (6). – P. 1367–1378.

15. *Hall S.L., Costerton J.W., Stoodley P.* Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases // *Nat. Rev. Microb.* – 2004. – Vol. 2. – № 2. – P. 95–108.

16. *Hoiby N., Bjarnsholt T., Givskov M., Molin S., Ciofu O.* Antibiotic resistance of bacterial biofilms // *Int. J. of Antimic. Agents.* – 2010. – Vol. 35 (4). – P. 322–332.

17. *Lewis K.* Riddle of Biofilm Resistance // *J. Antimicrob. Chemother.* – 2001. – Vol. 45. – № 4. – P. 999–1007.

18. *Olson M.E., Ceri H., Morck D.W., Buret A.G., Read R.R.* Biofilm bacteria: formation and comparative susceptibility of antibiotics // *Can. J. Vet. Res.* – 2002. – Vol. 66 (2). – P. 86–92.

Стаття надійшла до редакції 11.02.2015 р.

