

В. Ф. Марієвський, В. О. Бубало, Н. М. Кролевецька, Н. М. Рубан, О.П. Дяченко, Г. В. Матошко

ДО ПИТАННЯ ПРО ЧУТЛИВІСТЬ: СТІЙКІСТЬ БІОПЛІВОК САЛЬМОНЕЛ ДО ДІЇ ДЕЗІНФЕКТАНТІВ

ДУ «Інститут епідеміології та інфекційних хвороб ім. Л.В. Громашевського НАМН України», м. Київ

Ключові слова: дезінфектанти, біоплівка, сальмонели, стійкість до дезінфікуючих засобів.

Досліджено чутливість бактеріальних біоплівок, сформованих штамми роду сальмонел, до дії дезінфекційних засобів. Показано, що біоплівки сальмонел, сформовані на апаратних носіях при інкубуванні протягом 24 годин, потребували 32-разового збільшення найменшої бактерицидної концентрації дезінфекційного засобу з вмістом четвертинно-амонієвих сполук.

К вопросу о чувствительности: устойчивость биопленок сальмонелл к действию дезинфектантов

В. Ф. Мариевский, В. А. Бубало, Н. М. Кролевецкая, Н. М. Рубан, О.А. Дяченко, Г. В. Матошко

Исследовали чувствительность бактериальных биопленок, сформированных штаммами рода сальмонелл, к действию дезинфицирующих средств. Показано, что биопленки сальмонелл, сформированные на аппаратных носителях при инкубации 24 часа, требовали 32-кратного увеличения минимальной бактерицидной концентрации дезинфицирующего средства, содержащего четвертинно-аммониевые соединения.

Ключевые слова: дезинфектанты, биопленка, сальмонеллы, устойчивость к дезинфицирующим средствам.

About sensitivity: salmonella biofilms' resistance to disinfectants action

V. F. Marievsky, V. O. Bubalo, N. M. Krolevetskaya, N. M. Ruban, O. P. Diachenko, G. V. Matoshko

Salmonella biofilms' resistance to the action of the disinfectants was studied. It was founded that Salmonella biofilms, which were formed on the hard carriers during 24 hours of incubation, demanded 32-fold increase of the minimal bactericide concentration of the disinfectant with quaternary ammonium compound.

Key words: disinfectants, biofilm, Salmonella, resistance.

Дезінфекційні заходи визнані одними з найвпливовіших у системі переривання шляхів передачі збудників інфекційних хвороб в епідемічному процесі. Завданням дезінфекційних заходів є максимальне зниження персистентного потенціалу патогенів у навколишньому середовищі. Останніми роками все більше уваги приділяють питанням зміни біологічних властивостей патогенів, вивченню природних механізмів їхнього самозахисту від різних факторів, у тому числі від дії дезінфікуючих засобів.

Привертає увагу факт, що в Україні кількість дезінфекційних засобів (ДЗ) щороку зростає і сьогодні нараховує кілька сотень. На жаль, відсутня пропорційна ефективність ДЗ при використанні, тобто механізм самозахисту мікроорганізмів доволі потужний. У першу чергу, це формування резистентності до дії протимікробних препаратів.

У лабораторії дезінфектології Інституту епідеміології та інфекційних хвороб ім. Л.В. Громашевського НАМН України цій проблемі приділяємо значну увагу. Результати роботи опубліковані в низці наукових праць [1,2].

Наприкінці ХХ століття сформувалось уявлення про особливу форму організації мікроорганізмів. Виявилось, що більшість бактерій знаходяться в замкнутих матрицях-біоплівках, прикріплених до поверхні будь-яких екосистем.

Розвиток мікроскопії та поява однофокусного скануючого лазерного мікроскопа дозволили довести, що мікроорганізми в біоплівках існують і поведуть себе не так, як у культуральному середовищі. Доведено, що в біоплівках, порівнюючи з чистими культурами, численні фізіологічні процеси перебігають по-іншому, це стосується і продукції метаболітів і біологічно активних речовин. Сукупність організму єдиною генетичною системою у вигляді плазмід – кільцевих ДНК, які несуть код поведінки для членів біоплівки, визна-

чають їхні трофічні, енергетичні та інші зв'язки між собою та зовнішнім середовищем. Реакція мікроорганізмів на зміну умов і факторів навколишнього середовища в біоплівці суттєво відрізняється від реакції кожного окремого виду мікроорганізму в монокультурі. Така організація забезпечує її фізіологічну та функціональну стабільність і, безперечно, є запорукою конкурентного виживання в екологічній ніші.

Важливо, що перевага колективного реагування мікроорганізмів призводить до суттєвих труднощів в ефективному впливові й управлінні сукупністю ззовні.

Сьогодні особливу увагу дослідники приділяють вивченню ролі бактеріальних біоплівок у навколишньому середовищі та їхньому впливові на організм людини. Аналізоване поняття має численні визначення, але оптимальним вважаємо таке: біоплівка – це безперервний мультишар бактеріальних клітин, які прикріплені до поверхні розділу фаз, один до одного і які включені у біомолекулярний матрикс [3].

Біоплівка є своєрідною формою захисту мікроорганізмів від впливу факторів зовнішнього середовища і способом персистенції мікроорганізмів в організмі хворого та на об'єктах навколишнього середовища.

Формування біоплівки в організмі хворого або на медичній діагностичній апаратурі часто викликане збудниками внутрішньолікарняних інфекцій, у тому числі і мікроорганізмами роду *Salmonella*. Саме формування біоплівки зумовлює виникнення проблем у лікуванні хронічних інфекційних хвороб, особливо при тривалому використанні апаратури (ендоскопів, катетерів, протезів тощо). Мікроорганізми в біоплівці захищені від дії хімічних агентів, антибіотиків і виявляють більшу стійкість до цих агентів [4–6].

Ступінь стійкості мікроорганізмів до антибіотиків у біо-



плівках у 100–1000 разів вища від планктонних форм. Для того, щоб створити у глибинних шарах біоплівки ефективну концентрацію антибіотика, потрібна в десятки і сотні разів більша доза [7,12].

Щодо впливу на біоплівки дезінфекційних засобів кількість наукових праць дуже обмежена.

Визначення чутливості збудників інфекційних хвороб до ДЗ у біоплівках, які нерідко є причиною виникнення хронічних захворювань, у сучасних умовах є одним із необхідних заходів, що дає основу для детальнішого вивчення можливостей і ефективності застосування дезінфекційних засобів [11].

Оскільки у спеціалізованій літературі відомості про дію дезінфектантів на патогени в бактеріальних біоплівках дуже обмежені, вважаємо за необхідне дослідити чутливість до дії дезінфекційних засобів одного з видів збудників внутрішньолікарняних інфекцій – сальмонел – у сформованих ними біоплівках. Тобто необхідно науково обґрунтувати механізм дії ДЗ на збудники, що знаходяться в біоплівках, та розробку нових підходів до визначення антимікробної активності ДЗ.

МЕТА РОБОТИ

Визначити чутливість патогенів у біоплівках, які сформовані збудниками внутрішньолікарняних інфекцій (мікроорганізмами роду сальмонела), до дії дезінфектантів групи четвертинно-амонієвих сполук.

МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

Об'єктом дослідження були бактеріальні біоплівки, сформовані штамми сальмонел, котрі виділені від хворих у лікувально-профілактичних закладах, музейні штами, розчини ДЗ.

Досліджували ДЗ з активними компонентами із групи четвертинно-амонієвих солей, що зареєстровані в Україні:

- ДЗ №1 належить до групи четвертинно-амонієвих сполук і використовується для дезінфекції;
- ДЗ №2 – комплексний засіб, який містить четвертинно-амонієву сполуку та перекис водню.

Дослідження виконали на музейних тест-штамах сальмонел (*Salmonella typhimurium* 1122) і свіжовиділених від хворих у лікувально-профілактичних закладах штаммах *S. derby* 1117, *S. jena* 1108, *S. java* 1106, отриманих із музею патогенних для людини мікроорганізмів ДУ «Інститут епідеміології та інфекційних хвороб ім. Л.В. Громашевського НАМН України».

Бактеріальні культури вирощували на твердих і рідких поживних середовищах: м'ясо-пептонному бульйоні й агарі, триптон-соевому бульйоні виробництва BioMerieux (Франція), вісмут-сульфитному агарі.

Експериментальні бактеріальні плівки вирощували в імунологічних плоскодонних планшетах за методом Романової [10] та на фрагментах апаратурних носіїв, що використовуються у клініці.

Добові бульйонні культури досліджуваних штамів розводили свіжим поживним середовищем 1:100, отримані суспензії стерильно вносили по 150 мкл у лунку планшета, по 4 лунки для кожного штаму. Планшет інкубували при 28°C 24 години.

Ступінь формування біоплівки визначали на спектрофотометрі при довжині хвилі 630 нм за показником оптичної

густини в порівнянні з контролем. Визначення показника оптичної густини біоплівки для кожного штаму виконали у 6 повтореннях, після чого визначали середні значення і достовірність різниці показників із показниками контролю.

Визначення чутливості сальмонел у біоплівках до дії дезінфектантів здійснювали у плоскодонних імунологічних планшетах. У лунках планшета вирощували біоплівку досліджуваного штаму, не фарбуючи її кристалвіолетом.

Кількість лунок із плівкою визначали за кількістю розведень досліджуваного дезінфектанту. Готували дворазові розведення дезінфектанту на стерильній водопровідній воді. На кожне розведення відводили по 3 лунки, після відбору їх вмісту в кожну лунку вносили 200 мкл дезінфектанту. Витримували необхідну експозицію, котра передбачена регламентом щодо ДЗ. Після закінчення експозиції з кожної лунки з дезінфектантом 50 мкл вмісту переносили в окрему лунку з нейтралізатором (1000 мкл), що відповідав природі досліджуваного дезінфектанту. Після перемішування 50,0 мкл вміст засівали на чашки Петрі із твердим поживним середовищем.

Посіви інкубували в термостаті (37°C) протягом 24, 48, 72 годин. Після цього виконували облік росту посівів.

Контроль досліджень:

- контроль наявності росту в лунках;
- контроль дії нейтралізатора на мікроорганізми біоплівки;
- контроль росту тест-штаму на поживному середовищі.

При цьому визначали найменшу бактерицидну концентрацію (НБК) дезінфектанту для досліджуваного штаму мікроорганізмів.

Паралельно для порівняння отриманої НБК ДЗ для біоплівки виконували контрольні дослідження і визначали чутливість тест-штаму в суспензії при тих самих експозиціях. Визначали кратність збільшення НБК біоплівки до НБК суспензії штамів сальмонел.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Визначення здатності тест-штамів сальмонел утворювати біоплівку засвідчило, що і музейні штами, і штами сальмонел, які виділені від хворих у лікувально-профілактичних закладах (ЛПЗ), здатні утворювати біоплівку вже через 24 години.

Показники оптичної густини біоплівки мали достовірну різницю з показниками контролю, що свідчить про достатній ступінь формування біоплівки в імунологічних планшетах, який не мав достовірної різниці між окремими штамами (табл. 1).

Таблиця 1

Здатність досліджених штамів сальмонел формувати біоплівку

Досліджений штам	Середні показники оптичної густини		
	Біоплівка	Контроль	P<0
<i>S. typhimurium</i> 1122	0,38±0,035	0,19±0,013	P<0,05
<i>S. derby</i> 1117	0,35±0,027	0,19±0,007	P<0,05
<i>S. jena</i> 1108	0,34±0,029	0,19±0,007	P<0,05
<i>S. java</i> 1106	0,33±0,034	0,19±0,007	P<0,05

Антимікробна дія четвертинно-амонієвого ДЗ №1 на експериментальну модель біоплівки штамів сальмонел

Назва тест-штаму	Вид біоплівки	Найменша бактерицидна концентрація ДЗ в г/л (НБК)					
		Експозиція ДЗ 30 хв			Експозиція ДЗ 60 хв		
		Біоплівка	Суспензія	Кратність збільшення НБК ДЗ на біоплівці	Біоплівка	Суспензія	Кратність збільшення НБК ДЗ на біоплівці
<i>S. typhimurium</i> 1122	планшетна	0,0054	0,0013	4	0,0054	0,0013	4
<i>S. typhimurium</i> 1122	планшетна	0,0108	0,0054	2	0,0434	0,0054	8
<i>S. derby</i> 1117	планшетна	0,0217	0,0027	8	0,0217	0,0027	8
<i>S. jena</i> 1108	планшетна	0,0054	0,0108	2	0,0108	0,0027	4
<i>S. jena</i> 1108	планшетна	0,0434	0,0027	16	0,0054	0,0027	2

Таблиця 3

Антимікробна дія четвертинно-амонієвого ДЗ №2 на моделі біоплівки штамів сальмонел

Назва тест-штаму	Вид біоплівки	Найменша бактерицидна концентрація ДЗ №2 в г/л (НБК)					
		Експозиція ДЗ 30 хв			Експозиція ДЗ 60 хв		
		Біоплівка	Суспензія	Кратність збільшення НБК ДЗ на біоплівці	Біоплівка	Суспензія	Кратність збільшення НБК ДЗ на біоплівці
<i>S. typhimurium</i> 1122	планшетна	0,01	0,00125	8	0,01	0,0012	16
<i>S. typhimurium</i> 1122	планшетна	0,01	0,0025	8	0,01	0,005	2
<i>S. derby</i> 1117	планшетна	0,04	0,02	2	0,005	0,0025	2
<i>S. derby</i> 1117	планшетна	0,04	0,0025	16	0,005	0,0025	2
<i>S. java</i> 1106	планшетна	0,005	0,00125	4	0,005	0,005	-

Отже, в експериментальних умовах досліджені і музейні, і свіжовиділені від хворих у ЛПЗ штами сальмонел незалежно від виду здатні формувати бактеріальні біоплівки через 24 години вирощування в термостаті.

Визначення антибактеріальної дії дезінфекційного засобу №1 із четвертинно-амонієвою основою на біоплівки штамів сальмонел засвідчили, що для знезараження біоплівки музейного тест-штаму і свіжовиділених від хворих штамів сальмонел знадобилась концентрація ДЗ у 2–16 разів вища за НБК, необхідну для знезараження суспензії планктонних клітин сальмонел при експозиції ДЗ 30 хв. При експозиції 60 хв концентрація ДЗ потребувала збільшення НБК у 2–8 разів (табл. 2).

Аналогічні результати отримали при дії комплексного дезінфекційного засобу №2, основними діючими речовинами якого також є четвертинно-амонієва сполука та пероксид. Кратність збільшення НБК ДЗ для біоплівок коливалась при 30 і 60 хв експозиції в межах 2–16 разів (табл. 3).

Кратність збільшення НБК ДЗ для знезараження 24-годинних сальмонельозних біоплівок на фрагментах апаратних носіїв (гумових, полівінілових тест-трубках) була вищою від показників знезараження планктонних клітин у 32 рази.

Чотири- і дворазового збільшення НБК ДЗ потребували планшетні біоплівки сальмонел, сформовані з додаванням 0,01% нативної крові і 20% сироватки крові.

Показники збільшення НБК дезінфекційних засобів щодо експериментальних біоплівок штамів сальмонел характеризують тільки 24-годинні біоплівки, адже саме такий термін рекомендовано для формування експериментальних біоплівок у працях Ю.М. Романової та ін. [10].

Проте термін, під час якого можуть формуватись біоплівки в організмі хворих, на медичній апаратурі може становити 28–30 діб [8,9], а це може змінити їхню стійкість до дії дезінфектантів.

Встановили, що резистентність до дії ДЗ формується протягом перших 5–8 пасажів, тобто можна припустити, що біоплівки можуть формуватись за рахунок резистентних штамів до дії ДЗ.

Безперечно, дослідження з вивчення дії ДЗ мають тривати на біоплівках зрілих мікроорганізмів і на інших групах дезінфектантів.

ВИСНОВКИ

1. В експериментальних умовах дослідили як музейні, так і свіжовиділені від хворих у ЛПЗ штами сальмонел (незалежно від виду), що характеризуються підвищеними показниками оптичної густини в порівнянні з планктонними клітинами суспензій цих самих штамів.

2. Досліджені штами роду *Salmonella* (незалежно від виду) як у біоплівках, так і в планктонних формах виявляли чутливість до дії дезінфекційних засобів класу четвертинно-амонієвих сполук.

3. Дезінфекційні засоби №1 і №2, основною діючою речовиною яких є четвертинно-амонієві сполуки, здатні знезаражувати сформовані експериментальні біоплівки сальмонел при 2–16-разовому збільшенні найменшої бактерицидної концентрації у порівнянні з НБК, визначеною для планктонних клітин досліджених штамів сальмонел.

4. Біоплівки сальмонел, сформовані на фрагментах апаратних носіїв і отримані при 24-годинному вирощуванні,



для знезараження потребують 32-разового збільшення НБК ДЗ, що містять четвертинно-амонієві сполуки.

5. Виявлена необхідність багаторазового збільшення найменшої бактерицидної концентрації дезінфекційних засобів для знезараження біоплівки сальмонел вимагає перегляду і корекції методичних підходів до визначення специфічної антимікробної активності дезінфекційних засобів.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. *Марієвський В.Ф.* Особенности развития резистентности при действии дезинфектантов на клетки и популяции микроорганизмов / Марієвський В.Ф., Жалко-Титаренко В.П., Кролевецкая Н.М. и соавт. // Тез. докл. VII Международ. конф. «Современное состояние и перспективы развития микробиологии и биотехнологии». – Минск, 2010. – С. 293–295.
2. *Марієвський В.Ф.* Про формування резистентності збудників внутрішньо-лікарняних інфекцій до дезінфекційних засобів / Марієвський В.Ф., Жалко-Титаренко В.П., Кролевецкая Н.М. та ін. // Мат. Всеукраїнської наук.-практич. Конф. з міжнарод. участю «ВЛІ та резистентність їх збудників до антимікробних препаратів». – К., 2011. – С. 86–88.
3. *Смирнова Т.А.* Структурно-функциональная характеристика бактериальных биопленок / Смирнова Т.А., Диденко Л.В., Романова Ю.М. // Микробиология. – 2010. – Т. 79, №4. – С. 435–446.
4. *Olson M.E.* Biofilm bacteria: formation and comparative susceptibility to antibiotics / Olson M.E., Ceri H., Morek D.W., Buret A.Y., Read R.R. // Can. J. Vet. Res. – 2002. – Vol. 66. – P. 86–92.
5. *Льюис К.* Персистирующие клетки и загадка выживания биопленок / Льюис К. // Биохимия. – 2005. – Т. 70. – С. 327–336.
6. *Николаев Ю.А.* Биопленка – «город микробов» или аналог многоклеточного организма? / Николаев Ю.А., Плакунов В.К. // Микробиология. – 2007. – Т. 76, №2. – С. 149–163.
7. Микробиология, вирусология, иммунология / За ред. акад. В.П. Широбокова – Вінниця: «Нова книга», 2011. – С. 97–99.
8. *Морозова Н.С.* Дезинфектологические аспекты проблемы борьбы с биопленкой / Морозова Н.С., Марієвський В.Ф. // Профилактика медицина. – 2009. – №2 (6). – С. 3–7.
9. *Donlan R.M.* Biofilms on central venous catheters: is eradication possible? / Donlan R.M. // Bacterial biofilms. – 2008. – Vol. 322. – P. 133–161.
10. *Романова Ю.М.* Способность к формированию биопленок в искусственных системах у различных штаммов *Salmonella typhimurium* / Романова Ю.М., Алексеева Н.В., Смирнова Т.А., Андреев А.Л., Диденко Л.В., Гинцбург А.Л. // Микробиология. – 2006. – №4. – С. 38–42.
11. *Абатуров А.Е.* Применение цефподоксима простила при лечении внебольничных пневмоний часто болеющих детей раннего возраста / Абатуров А.Е., Герасименко О.Н. // Современная педиатрия. – 2008. – №2. – С. 26–30.
12. *Гостев В.В.* Бактериальные биопленки и инфекции / Гостев В.В., Сидоренко С.В. // Ж. инфектологии. – 2010. – Т. 2, №3. – С. 4–15.

Відомості про авторів:

Марієвський В.Ф., д. мед. н., професор, зав. лабораторії дезінфектології ДУ «ІЕІХ ім. Л.В. Громашевського НАМН України».
 Бубало В.О., аспірант лабораторії кишкових інфекцій та паразитозів ДУ «ІЕІХ ім. Л.В. Громашевського НАМН України».
 Кролевецкая Н.М., к. мед. н., ст. науковий співробітник лабораторії дезінфектології ДУ «ІЕІХ ім. Л.В. Громашевського НАМН України».
 Рубан Н.М., науковий співробітник лабораторії дезінфектології ДУ «ІЕІХ ім. Л.В. Громашевського НАМН України».
 Дяченко О.П., мол. науковий співробітник лабораторії дезінфектології ДУ «ІЕІХ ім. Л.В. Громашевського НАМН України».
 Матошко Г.В., к. мед. н., ст. науковий співробітник лабораторії дезінфектології ДУ «ІЕІХ ім. Л.В. Громашевського НАМН України».

Поступила в редакцію 18.09.2013 г.