

В. А. Горбунов, доцент, кандидат медицинских наук

Сравнительная активность некоторых дезинфектантов в отношении клинических штаммов *P. aeruginosa*, выделенных в стационарах Республике Беларусь
УО «Белорусский государственный медицинский университет»

В статье приводятся данные об устойчивости к некоторым дезинфектантам клинических штаммов *P. aeruginosa* в составе биопленки и планктона. Результаты получены с использованием авторской модификации стандартной методики.

Ключевые слова: *P. aeruginosa*, устойчивость к дезинфектантам, биопленка.

Эффективность борьбы с возбудителями инфекций зависит от своевременности и качественно проводимых противоэпидемических мероприятий, к совершенствованию которых следует подходить дифференцированно, с учётом биологических особенностей микроорганизмов, определяющих их эпидемиологическую значимость. Развитие устойчивости к дезинфектантам у госпитальных штаммов микроорганизмов снижает эффективность профилактических мероприятий в стационарах и является важным фактором, обуславливающим распространение внутрибольничных инфекций [7, 8, 9]. Это указывает на необходимость осуществления мониторинга устойчивости микроорганизмов к дезинфектантам и разработки и внедрения в практику здравоохранения технологий, тормозящих это опасное явление.

Современные многочисленные дезинфицирующие препараты представляют собой композиции на основе сбалансированной формулы, включающей одно или более активно действующих веществ в соотношениях, позволяющих добиться максимального синергизма в отношении наиболее устойчивых микроорганизмов, а также функциональных добавок, целенаправленно изменяющих их свойства.

Выбор дезинфицирующих препаратов должен осуществляться с учетом целого ряда принципов, но в первую очередь на основе микробиологических данных об активности препарата в отношении штаммов микроорганизмов, циркулирующих в данном медицинском учреждении. Для получения этих данных в стационарах должен проводиться микробиологический мониторинг чувствительности бактерий к дезинфектантам.

В последние десятилетия сохраняется тенденция к увеличению удельного веса *Pseudomonas aeruginosa* среди других условно-патогенных возбудителей гнойно-септических инфекций. Синегнойная инфекция развивается, как правило, у иммунокомпрометированных лиц, а её возбудитель характеризуется устойчивостью к факторам внешней среды, в том числе госпитальной, высокими уровнями и широким спектром природной и приобретенной устойчивости к антимикробным средствам и, вероятно, будет иметь высокую значимость и в будущем [2].

Синегнойная палочка может существовать практически в любой экологической нише - почве, воде, воздухе, в тканях и органах животных и растений,

демонстрируя этим свои адаптационные способности, обеспечиваемые межклеточной сигнальной системой, генетическими детерминантами резистентности [1]. Кроме того, *P. aeruginosa* обладает целым рядом факторов патогенности, в том числе способностью к формированию биоплёнок. Это обеспечивает возможность существования *P. aeruginosa* не только в естественных экологических нишах, но и в искусственных, созданных человеком: больничной среде, медицинских приборах и инструментах, предметах санитарной и бытовой техники (умывальники, ванны, кондиционеры и др.). При определенных условиях такое существование приводит к развитию инфекций. При этом значимым является распространение в больничной среде посредством прямого или опосредованного контакта через предметы или руки пациентов и медперсонала. Синегнойная инфекция на фоне основного заболевания значительно ухудшает прогноз и нередко обуславливает атрибутивную летальность.

В связи со сказанным, представляется целесообразным сравнительное исследование активности дезинфектантов в отношении клинических штаммов *P. aeruginosa* находящихся в форме суспензии (планктон) на поверхностях объектов, а также составе биопленок.

Материалы.

В исследовании использованы дезинфицирующие препараты, зарегистрированные и используемые в учреждениях здравоохранения (УЗ):

1. Полидез. Препарат содержит бензалкониум хлорид (четвертичное аммониевое соединение - ЧАС), водорастворимый полимер на основе производных гуанидина; неионогенное ПАВ, комплексон, отдушку, краситель, воду. Режимы применения в УЗ для обработки поверхностей (бактериальные инфекции, исключая туберкулез) – 0,25% - 60 мин, 0,5% - 30 мин. (в % по препарату).

2. Комбинированный дезинфектант (КД) содержит глутаровый альдегид, бензалкониум хлорид (ЧАС), дидецилдиметиламмоний хлорид (ЧАС) в качестве действующих веществ. Режим для дезинфекции поверхностей (бактериальные инфекции, исключая туберкулез) - 0,1%-30 мин (в % по препарату). Дезинфекция изделий медицинского назначения (ИМН) - 1,0% - 30 мин.

3. Гексаниос Г+Р содержит: ЧАС - 9,75%, полигексаметиленгуанидин-1%. Режимы для обработки поверхностей (бактериальные инфекции, исключая туберкулез) приборов и аппаратов: 0,1%-10 мин; 0,5% - 5 мин.

4. Хлормисепт-Р содержит дихлоризоцианурат натрия-99,7%. Режимы применения в УЗ: для обработки поверхностей (бактериальные инфекции, исключая туберкулез) 0,027% - 60 мин (в % по препарату); 0,054% - 30 мин. Режимы дезинфекции ИМН: 0,108% - 90 мин; 0,189% - 60 мин.

Все исследованные образцы препаратов были приобретены через торговую сеть или в УЗ, находились в запечатанной упаковке производителя и имели достаточный запас срока годности.

В работе использованы общепринятые стандартные питательные среды, нейтрализаторы, реактивы, рекомендованные для подобных исследований [4, 5, 6].

Тест-штаммами являлись клинические штаммы *P. aeruginosa*, выделенные от пациентов в стационарах г. Минска в 2009 г. и являющиеся возбудителями

гнойно-септических инфекций. В качестве контроля использовался эталонный штамм *P. aeruginosa* ATCC 27853.

Методы. Для исследования активности дезинфектантов и чувствительности/устойчивости к ним бактерий использовался известный [5] модифицированный метод с применением тест-объектов, которыми служили металлические штыри специально изготовленной крышки для стандартного 96-луночного полистиролового планшета с плоскодонными лунками. Тест-объекты контаминировали стандартизированной (109 КОЕ/мл) суспензией суточных культур тест-штаммов, внесенных в лунки планшета по 100 мкл. После 10 минутной контаминации крышку с тест-объектами подсушивали на воздухе 10 мин и помещали в планшет, содержащий 8 двукратных разведений дезинфектанта (по 150 мкл) и экспонировали в течение рекомендуемого производителем дезинфицирующего препарата времени: Полидез – 30 мин, КД – 30 мин, Гексаниос Г+Р – 15 мин, Хлормисепт-Р – 30 мин. После этого штыри крышки погружали в лунки планшета с нейтрализатором на 10 мин, затем помещали в планшет с жидкой средой для контроля стерильности (по 200 мкл), который инкубировали (во влажной камере для предупреждения высыхания среды) в термостате при 37°C в течение 24-48 часов. Учет результатов проводили визуально по наличию (помутнение среды) или отсутствию роста тест-штаммов, подвергшихся воздействию разных концентраций дезинфектанта. Известно, что свойства бактерий в биопленках на поверхностях (в том числе и на поверхностях объектов больничной среды, подлежащих дезинфекции) отличаются от таковых у изолированных клеток (суспензия, планктон), что сказывается на всех аспектах взаимодействия микроба и окружающей среды, включая факторы иммунной защиты и антимикробные препараты.

Предварительно оценивалась способность штаммов *P. aeruginosa* к формированию биопленок, для чего в лунки полистироловых планшетов вносили по 0,1 мл бульонной культуры бактерий (5×10^7 КОЕ), выращивали в течение 24-х часов при 37°C. Для оценки состояния биопленок содержимое лунок удаляли, промывали трехкратно фосфатным буфером, высушивали, окрашивали раствором генцианвиолета (50 мкл/лунку) в течение 10 минут, промывали фосфатным буфером, затем добавляли 96° этиловый спирт (200 мкл/лунку) и учитывали результаты на планшетном ридере (Spectra, Германия) при длине волны 450 нм. Тестирование повторяли трехкратно, рассчитывали среднее значение оптической плотности. Сравнивая уровень оптической плотности с отрицательным контролем, штаммы условно распределяли на три категории: не образующие биопленку (средняя оптическая плотность менее 1,0), умеренно-формирующие биопленку (1,0 - 2,0) и формирующие выраженную биопленку ($>2,0$).

Была предпринята попытка исследования активности дезинфектантов в отношении биопленок штаммов *P. aeruginosa*. С этой целью тест-объекты оставляли погруженными в стандартизированную суспензию исследуемых штаммов в лунках планшета при 37°C в течение 24 часов, затем тест-объекты извлекали из лунок, подсушивали на воздухе 10 мин и исследовали как описано выше.

Основным дискретным параметром, устанавливаемым с помощью использованной методики, является величина минимальной бактерицидной концентрации (МБК) препарата для конкретной культуры за фиксированный промежуток времени. За МБК препарата принимали минимальную концентрацию дезинфектанта, после контакта с которой, тест-штамм не давал видимого помутнения среды для контроля стерильности в лунке со после 48 часов инкубации при оптимальных условиях.

На основании сопоставления величины МБК с концентрацией, рекомендованной для практической дезинфекции, культуры дифференцируются на клинически чувствительные и устойчивые. К клинически чувствительным относят культуры, погибающие при воздействии концентрации препарата, равной или меньшей его минимальной рабочей концентрации в течение наименьшей из рекомендуемых экспозиций, к устойчивым – не погибающие при таких условиях [8]. В качестве рабочих концентраций (из нескольких, рекомендуемых производителями) выбраны: Полидез – 0,25%, КД – 1%, Гексаниос Г+Р – 0,5%, Хлормисепт-Р – 0,054% по препарату. Методики, в которых микроорганизмы находятся на тест-объектах, максимально полно имитируют использование дезинфектантов на практике (в отличие от суспензионного метода).

Статистическую обработку и анализ данных проводили с помощью пакета программ Statistica 5.5.

Результаты и обсуждение. При оценке способности штаммов *P. aeruginosa* к образованию биопленок установлено, что 7 культур (14,6%) не образовывали биопленку на поверхности полистирола лунок, 30 культур (62,5%) формировали биопленку умеренной выраженности и 11 (22,9%) формировали выраженную биопленку при указанных выше условиях культивирования. Корреляционный анализ связи способности к образованию биопленок и более высокого уровня устойчивости штаммов к дезинфектантам в настоящем исследовании не позволил выявить достоверную закономерность.

Результаты определения активности дезинфектантов против исследованных штаммов *P. aeruginosa* обобщены в табл. 1.

Наибольшей активностью в отношении исследованных штаммов *P. aeruginosa* обладали Хлормисепт-Р и КД, среднегеометрическая МБК которых составляла для планктонных культур 0,018% и 0,81% по препарату, соответственно. Менее активными были Гексаниос Г+Р и Полидез (МБК планктонных культур составила соответственно 2,91 и 1,68 %). Достоверные понижение активности дезинфектанта при действии на биопленки по сравнению с планктонными культурами установлены только в отношении Полидеза.

Минимальная МБК всех дезинфектантов не зависела от состояния (планктон или пленка) культур *P. aeruginosa*. Значения МБК min указывают на предельные минимальные концентрации дезинфектантов, оказывающих достаточный антимикробный эффект в отношении исследованных штаммов *P. aeruginosa*. Вместе с тем, в рекомендациях производителей по применению отдельных препаратов имеются режимы с более низкими концентрациями, эффективность действия которых на возбудителя синегнойной инфекции вызывает сомнения. По показателю МБК *max* различия между планктоном и пленкой наблюдались только в отношении Гексаниоса Г+Р.

Таблица 1.

Активность дезинфектантов в отношении клинических штаммов *P. aeruginosa* (n=48), выделенных в Беларуси, в % по препарату

Дезинфектант	Среднегеометрическая МБК		МБК min		МБК max	
	планктон	пленка	планктон	пленка	планктон	пленка
Полидез	1,68±3,20	4,12±4,24*	0,5	0,5	16	16
КД	0,81±1,08	1,12±1,19	0,25	0,25	4	4
Гексаниос Г+Р	2,91±2,48	3,72±4,81	0,5	0,5	8	16
Хлормисепт-Р	0,018±0,076	0,025±0,098	0,003375	0,003375	0,432	0,432

Примечание. *- различия достоверны ($p < 0,05$).

В табл. 2 приведены некоторые показатели клинической устойчивости исследованных штаммов *P. aeruginosa* к дезинфектантам. Так, бактерицидная концентрация подавляющая 50% культур (МБК50), как правило, в 2 раза выше для бактерий в составе биопленок, а МБК90 – в 2-4 раза выше. При этом, такие концентрации Полидеза и Гексаниоса Г+Р не используются даже при более жестких (туберкуло- и вирулицидном) режимах.

Для клинической практики, вероятно, более важен показатель удельного веса клинически устойчивых штаммов. Устойчивыми к рекомендуемым рабочим концентрациям и экспозиции Полидеза и Гексаниоса Г+Р оказались 100% и 93,75% исследованных штаммов синегнойной палочки, соответственно. К Комбинированному дезинфектанту (1% - 30 мин) были устойчивы 8,33% штаммов в планктоне и 14,58% - в биопленке; к Хлормисепту-Р оказались устойчивыми 18,75% культур *P. aeruginosa*.

Таблица 2.

Показатели устойчивости штаммов *P. aeruginosa* (n=48) к дезинфектантам.

Показатели	Состояние культур	Дезинфектант			
		Полидез	КД	Гексаниос Г+Р	Хлормисепт Р
МБК50, % по препарату	планктон	2	0,75	4	0,0135
	пленка	4	1	4	0,027
МБК90, % по препарату	планктон	4	2	8	0,108
	пленка	16	4	16	0,216
Удельный вес резистентных штаммов, %	планктон	100	8,331	93,753	18,752,4
	пленка	100	14,581	93,753	18,752,4

Примечания: различия достоверны ($p < 0,05$): 1 - Полидез и КД, 2 – Полидез и Хлормисепт Р, 3 – КД и Гексаниос Г+Р, 4 – Гексаниос Г+Р и Хлормисепт Р.

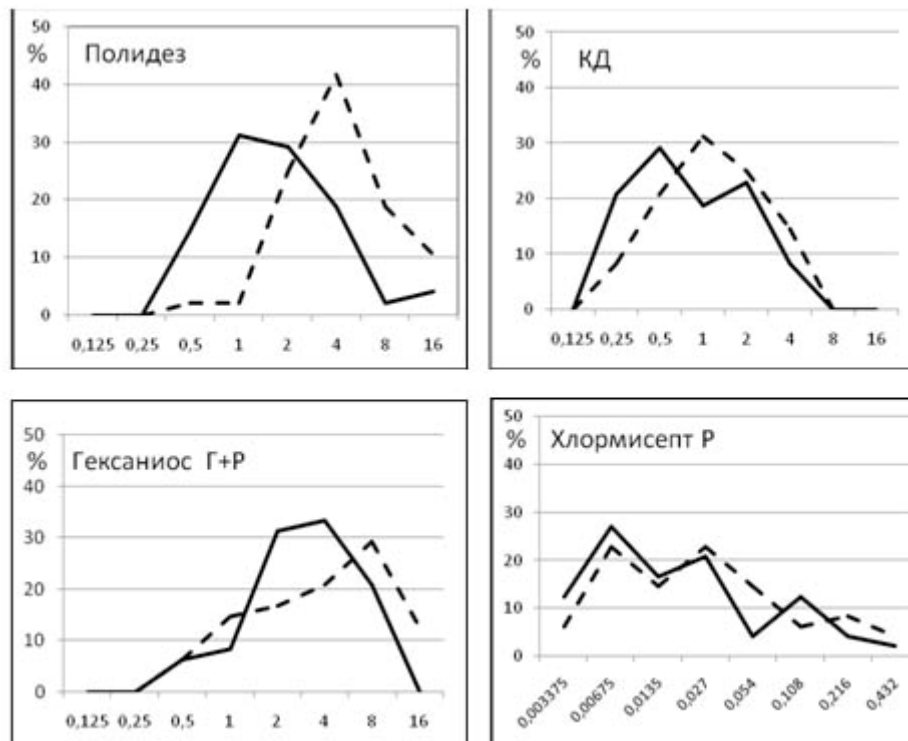


Рисунок 1. Распределение планктонных (—) культур *P. aeruginosa* и культур в биопленках (---) по минимальным бактерицидным концентрациям (% по препарату) дезинфектантов

Выраженные колебания чувствительности к дезинфектантам у отдельных штаммов послужили основанием для построения графиков их распределения в системе координат. Кривые распределения выборок штаммов *P. aeruginosa* в ряде случаев имеют двугорбный вид, указывающий на присутствие в данных выборках разнородных по этому признаку вариантов.

Штаммы *P. aeruginosa* по чувствительности к статическим концентрациям дезинфектантов (МБК), как правило, располагаются по типу нормального распределения, т.е. большинство культур подавляется какой-то средней концентрацией, а по мере снижения и повышения концентрации число чувствительных культур относительно одинаково и постепенно уменьшается. Вместе с тем, отмечаются отклонения от нормального распределения. Кривые распределения штаммов *P. aeruginosa* по чувствительности к КД, Хлормисепту-Р несколько деформированы в сторону более высоких концентраций, что свидетельствует о присутствии среди тестируемых штаммов более устойчивых к этим препаратам вариантов и об активности процесса селекции устойчивых штаммов.

Анализируемые графики распределения вместе с данными, приведенными в табл.1-2 подтверждают вывод о гетерогенности популяций *P. aeruginosa* по признаку чувствительности к дезинфектантам. Степень гетерогенности, частота и уровень чувствительности, согласно графикам распределения, зависят от типа препарата. Более однородные показатели чувствительности выявлены к Полидезу, Гексаниосу Г+Р, что вероятно, свидетельствует о менее выраженной активности процесса формирования устойчивости, т.к. большинство штаммов уже реализовали свой потенциал резистентности.

Распределение штаммов *P. aeruginosa*, находящихся в составе биопленок, более разнородно и сдвинуто в сторону более высоких концентраций дезинфектантов.

Определенный интерес могут представлять данные об ассоциированной резистентности штаммов *P. aeruginosa*, представленные в табл. 3.

Таблица 3.

Перекрестная резистентность к дезинфектантам клинических штаммов *P. aeruginosa* (n=48)

Дезинфектант, к которому резистентен <i>P. aeruginosa</i>	Кол-во резистентных штаммов	Удельный вес (%) резистентных штаммов к дезинфектантам:			
		Полидез	Гексаниос Г+Р	Хлормисепт Р	КД
Полидез	48		93,75	18,75	4,17
Гексаниос Г+Р	45	100,0		20,0	8,89
Хлормисепт Р	9	100,0	100,0		22,22
КДИ	4	100,0	100,0	100,0	

Так, все резистентные к Хлормисепту-Р штаммы *P. aeruginosa* были устойчивы к Полидезу и Гексаниосу Г+Р, в то же время только 22,22% КД-резистентных штаммов были устойчивы к Хлормисепту-Р. Резистентные к Полидезу *P. aeruginosa* были наиболее чувствительны к КД (4,17% устойчивых) и Хлормисепту-Р (18,75%). Подавляющее большинство штаммов устойчивых к Полидезу были резистентны к Гексаниосу Г+Р, что объясняется сходством составов препаратов по действующему веществу (ЧАС).

Таблица 4.

Наиболее частые фенотипы множественной устойчивости к дезинфектантам штаммов *P. aeruginosa* (n=48)

Дезинфектанты	Абс. число штаммов / %
Полидез	48/100,0
Полидез, Гексаниос Г+Р	45/93,8
Полидез, Гексаниос Г+Р, Хлормисепт Р	9/18,8
Полидез, Гексаниос Г+Р, Хлормисепт Р, КДИ	2/4,17

Наиболее частыми фенотипами множественной устойчивости были: Полидез, Гексаниос Г+Р (93,8%) и Полидез, Гексаниос Г+Р, Хлормисепт Р (18,8%).

Ассоциированная резистентность к 4 исследованным дезинфектантам: Полидезу, Гексаниосу Г+Р, Хлормисепту-Р и КД – была выявлена у 4,17% штаммов синегнойной палочки.

В последнее десятилетие в отечественной и зарубежной литературе регулярно появляются сообщения о резистентности тех или иных видов микроорганизмов к отдельным дезинфицирующим средствам, что заставляет более настороженно относиться к препаратам, появляющимся на отечественном рынке, несмотря на наличие соответствующего разрешения и их широкому

применению в УЗ [7, 8, 9]. В связи с этим, возникает необходимость проверки активности препаратов в отношении клинических штаммов, циркулирующих в стационарах и приводящих к возникновению вспышек гнойно-септических инфекций.

В Республике Беларусь распространение устойчивых к дезинфектантам вариантов бактерий изучалось в различных типах больничных стационаров (хирургический, ожоговый, реанимационный), к большому числу (более 20) дезинфектантов отечественного и зарубежного производства, содержащих в качестве активно действующих веществ гуанидин, ЧАС, спирты, хлоргексидин, глютаральдегид и др., среди ведущих возбудителей ВБИ: энтеробактерий, НГОБ, стафилококков, грибов. В больничных микробных популяциях выявлены устойчивые к различным дезсредствам варианты, частота выделения которых зависела от таксономической группы микроорганизмов, места их обитания, типа дезинфицирующего препарата. Ко многим препаратам, используемым в РБ для дезинфекции инструментария и поверхностей в больничных отделениях, среди возбудителей ВБИ выявлена значительная доля устойчивых вариантов. Так, в изученной госпитальной популяции *P. aeruginosa* обнаружены варианты, устойчивые к Дезомиксу П (100%), Асфену 381 (90%), Микробаку форте (24%), Полидезу (19%), Дезомиксу ПМ (17%) [8].

Эффективность дезинфекции, а, следовательно, и эпидемиологическая безопасность медицинских объектов при их последующем использовании находится в зависимости от целого ряда факторов, к числу которых относятся:

- наличие и степень органического загрязнения изделия;
- уровень микробной контаминации;
- видовой состав микроорганизмов и уровни их устойчивости к дезинфектантам;
- типы, концентрации и экспозиции дезинфицирующих агентов и др.

Учитывая указанные факторы, вероятно, можно в известных пределах управлять процессом дезинфекции, получая требуемый его уровень.

Целесообразно внедрение стандартных методов оценки чувствительности микроорганизмов к дезинфектантам в практику работы микробиологических лабораторий УЗ, как обязательных, рутинных. Значимой проблемой внедрения мониторинга устойчивости к дезсредствам является лабораторное обеспечение, а именно, методики определения устойчивости микроорганизмов к дезинфектантам. В существующих в республике нормативных документах [5, 6] отсутствуют подходы к тестированию клинических изолятов микроорганизмов, методики основаны на испытании действия дезинфектантов на эталонные штаммы. Отсутствует дифференциация понятий «антисептика» и «дезинфекция», «активность» и «эффективность» дезинфектанта. Кроме, того, в микробиологических лабораториях республики, как правило, отсутствуют референтные штаммы микроорганизмов с известной, стабильной чувствительностью/устойчивостью к определенным дезинфектантам. Все это не позволяет сделать «прозрачными» заключения об активности дезинфектантов в отношении микроорганизмов циркулирующих в УЗ республики и оптимизировать выбор препаратов с учетом чувствительности к ним микробов.

Имеется ряд авторских методик и модификаций [3, 9] (одна из которых описана выше), имеющих свои положительные и отрицательные стороны, однако они правомочны лишь в научно-практических исследованиях.

Данные микробиологического мониторинга устойчивости возбудителей внутрибольничных инфекций к дезинфектантам являются важным элементом эпидемиологического надзора для разработки рациональной системы мер борьбы и профилактики этой группы заболеваний. А вопрос о методическом обеспечении оценки устойчивости клинических штаммов к дезсредствам чрезвычайно актуален и требует незамедлительного решения.

Выводы:

1. Клинические штаммы *P. aeruginosa* характеризуются значительными уровнями и частотой устойчивости к ряду дезинфектантов.
2. Наиболее активными в отношении *P. aeruginosa* из исследованных дезинфектантов явились Хлормисепт-Р (в режиме 0,054% - 30 мин) и Комбинированный дезинфектант (1% - 30 мин).
3. Активные в отношении синегнойной палочки препараты (по МБК) в порядке убывания активности распределяются следующим образом: Хлормисепт-Р > Комбинированный дезинфектант > Полидез > Гексаниос Г+Р.
4. Удельный вес резистентных штаммов *P. aeruginosa* (при выбранных рабочих режимах) составил Хлормисепт-Р - 18,8%, Комбинированный дезинфектант 8,3 - 14,6%, Полидез -100%, Гексаниос Г+Р - 93,8%.

Литература

1. Горбунов, В. А. Многоцентровое исследование антибиотикорезистентности нозокомиальных штаммов *Pseudomonas aeruginosa* в Республике Беларусь / В. А. Горбунов, Л. П. Титов, Т. С. Ермакова // Минск: Здоровоохранение, 2007. № 1. С. 28–31.
2. Горбунов, В. А. Синегнойная инфекция (эпидемиология, патогенез, диагностика, терапия, профилактика) / В. А. Горбунов, Л. П. Титов // Военная медицина. 2007. № 1. С. 91–96.
3. Красильников, А. П. Справочник по антисептике / А. П. Красильников. Минск: Выш. шк., 1995. 267 с.
4. Методы испытания противомикробной активности дезинфицирующих средств: Временная инструкция МЗ РБ / сост. Е. И. Гудкова [и др.]. Минск, 1998. 8 с.
5. Методы проверки и оценки антимикробной активности дезинфицирующих и антисептических средств: инструкция по применению МЗ РБ / В. П. Филонов [и др.]. Минск, 2003. 41 с.
6. Определение бактерицидной активности антисептиков и дезинфектантов методом мембранной фильтрации: Инструкция по применению МЗ РБ / В. С. Голуб [и др.]. Минск, 2002. 12 с.
7. Распространение устойчивых к антисептикам и дезинфектантам вариантов бактерий – возбудителей внутрибольничных инфекций / Е. И. Гудкова [и др.] // Медицина на рубеже веков: материалы юбил. науч. конф. посвящ. 40-летию ЦНИЛ БГМУ, в двух частях. Минск, 2003. Ч. 1. С. 293–298.

8. Формирование устойчивости к антисептикам и дезинфектантам возбудителей внутрибольничных инфекций и её микробиологический мониторинг / Е. И. Гудкова [и др.] // Бел. мед. журн. 2003. № 3. С. 57–60.
9. Чувствительность к новым дезинфектантам клинических штаммов микробов. Методы определения: сб. / Е. И. Гудкова [и др.] // Актуальные вопросы современной медицины: материалы юбил. науч. конф., посвящ. 80-летию БГМУ. Минск, 2001. Ч. 1. С. 89–91.