

DOI: 10.31393/reports-vnmedical-2018-22(2)-12

УДК: 579.61/.84:615.28

ЧУТЛИВІСТЬ БІОПЛІВКОВИХ ТА ПЛАНКТОННИХ ФОРМ НЕФЕРМЕНТУЮЧИХ БАКТЕРІЙ ДО ДІЇ АНТИСЕПТИКІВ

Трофіменко Ю.Ю., Мацак Є.Ф., Стукан О.К., Буркот В.М.

Вінницький національний медичний університет ім. М. І. Пирогова (вул. Пирогова, 56, м. Вінниця, Україна, 21018)

Відповідальний за листування:
e-mail: yuliya-trofimenko@ukr.net

Статтю отримано 13 квітня 2018 р.; прийнято до друку 7 червня 2018 р.

Анотація. Відомо, що бактерії колонізуючи ендотрахеальні інтубаційні трубки [ЕІТ], утворюють біоплівки. Бактеріальні клітини, які знаходяться у плівковому матриксі, захищені від впливів зовнішніх факторів і різняться високим рівнем резистентності до дії антибіотиків, антисептиків, дезінфектантів. Метою нашого дослідження було визначення чутливості до антисептиків біоплівкових та планктонних форм неферментуючих грамнегативних бактерій до дії антисептиків декаметоксину, біглюконату хлоргексидину, повідон-йоду, перекис водню. Для того щоб створити бактеріальні біоплівки стерильні фрагменти ендотрахеальних трубок поміщали у пробірки з м'ясо-пептонним бульйоном та додавали завис добової культури досліджуваного штаму бактерій. Для встановлення впливу антисептиків на біоплівки бактерій використовували метод двократних послідовних розведень. Результати порівняльного дослідження активності антисептичних засобів (декаметоксину, біглюконату хлоргексидину, повідон-йоду, перекис водню) по відношенню до планктонних і біоплівкових форм штамів псевдомонад і акінетобактерій свідчать що в усіх досліджених антисептиків у складі бактеріальної плівки псевдомонади більш стійкі до дії препаратів, ніж у планктонній формі. У біглюконату хлоргексидину і декаметоксину МБЦК для бактеріальної плівки у 3,2 рази більша, ніж для планктонної форми. Найменша різниця МБЦК для планктонної і біоплівкової форм псевдомонад була у препараті повідон-йод. МБЦК біглюконату хлоргексидину для біоплівкової форми акінетобактерій, у порівнянні з планктонною формою, була більша у 3,3 рази, для декаметоксину - у 3,7 разів, для повідон-йоду - у 3,5 рази. Біоплівкові форми грамнегативних неферментуючих бактерій мають здатність до високого рівня резистентності до антисептиків.

Ключові слова: антисептики, ендотрахеальні інтубаційні трубки, біоплівка.

Вступ

Відомо, що на поверхні ендотрахеальних інкубаційних трубок [ЕІТ] бактерії здатні до утворення плівкових форм. Завжди виникає постійна загроза контамінації тканини легень мікробами. Мікроорганізми, які знаходяться у плівковому матриксі, захищені від зовнішніх факторів і різняться високим рівнем стійкості до дії факторів імунітету, антисептичних препаратів та антибіотиків. Високий рівень щільності бактеріальної популяції у біоплівкових формах підвищує обмін генетичною інформацією, у тому числі детермінантами антибіотикорезистентності [1, 3]. При екзогенному інфікуванні виникають пізні вентилятор-асоційовані пневмонії [ВАП], які спричинені високою резистентністю до антибіотиків госпітальними штамми бактерій, а саме грамнегативними неферментуючими паличками [ГНБ] з родів *Acinetobacter*, *Pseudomonas*, *Stenotrophomonas*, *Burkholderia*. Дані мікроорганізми наділенні високим рівнем резистентності до антибіотиків і антисептиків. ВАП, спричинена даними збудниками має несприятливий перебіг [2]. Високий рівень стійкості до зовнішніх впливів мікроорганізмів, які входять в склад біоплівки, обумовив пропозиції науковців щодо вивчення дії антисептичних лікарських препаратів саме на бактеріальні біоплівки. Метою нашого дослідження було визначення чутливості до антисептиків біоплівкових та планктонних форм неферментуючих грамнегативних бактерій до дії антисептиків декаметоксину, біглюконату хлоргексидину, повідон-йоду, перекис водню.

Матеріали та методи

Для того щоб створити біоплівки на поверхні інтубаційних трубок стерильні зразки трубок довжиною 2 см занурювали у пробірки з 10 мл м'ясо-пептонного бульйону та вносили 0,2 мл завису добової культури досліджуваного штаму бактерій у концентрації 10^9 КУО/мл. Культивування проводили протягом 96 год. при температурі 37°C.

Для того щоб визначити вплив антисептиків на біоплівки бактерій, зразки ендотрахеальних трубок з 4-добовою біоплівкою занурювали на 1 добу у пробірки з двократно послідовним розведенням препарату, після чого вносили у звичайний м'ясо-пептонний бульйон [МПБ] і протягом 24 год. термостатували. Найбільш максимальне розведення досліджуваного антисептика, після обробки яким трубки не спостерігалось росту, вважали мінімальною бактерицидною концентрацією [МБЦК] для бактеріальної плівки. МБЦК антисептиків для планктонних форм тих самих штамів бактерій визначали методом двократних серійних розведень препарату у рідкому поживному середовищі.

Ефективності дії робочих розчинів досліджуваних антисептиків на біоплівкові та планктонні форми акінетобактерій та псевдомонад визначали за величиною експозиції знезаражування тест-об'єктів, вкритих бактеріальною біоплівкою, при зануренні в розчин антисептика. Паралельно досліджували швидкість загибелі планктонної форми мікроорганізмів при вне-

сенні їх суспензії в розчин антисептика.

Результати. Обговорення

При виборі досліджуваних антисептиків для проведення наших досліджень звертали увагу на результати визначення активності щодо планктонних форм бактерій, фармакокінетикою даного препарату та його доступністю. Сучасний антисептик декаметоксин, що проявив високий рівень активності по відношенню до досліджених штамів бактерій. Біглюконат хлоргексидину 0,05% часто застосовується у медицині. Готові рідкі антисептики Горостен та Декасан - доступні, дієві, якісні, часто використовуються лікарями. Препарати перекису водню та повідон-йод можна охарактеризувати таким самим чином. Результати порівняльного дослідження активності досліджуваних антисептиків по відношенню до планктонних та біоплівкових форм штамів акінетобактерій і псевдомонад представлені у таблиці 1. Проводячи аналіз наведених даних у таблиці 1, слід відзначити, що по відношенню до усіх вказаних вище антисептиків у складі бактеріальної біоплівки псевдомонади більш стійкі до дії антисептичних препаратів, ніж у планктонній формі. Так, у біглюконату хлоргексидину та декаметоксину МБцК для бактеріальної плівки у 3,2 рази більша, ніж для вільної форми. Сама найменша різниця МБцК для плівкової та планктонної форм *P.aeruginosa* була у повідон-йоду. Саме найбільше зростає резистентність псевдомонад у складі бактеріальних плівок до дії перекису водню (у 13 разів). Окремі штами псевдомонад у складі бактеріальної плівки не знищувались під дією 1,5% розчину даного антисептика.

Подібні закономірності збільшення мінімальних бактерицидних концентрацій антисептичних препаратів спостерігались для біоплівкових форм акінетобактерій, по відношенню до їх вільної форми (табл. 2). Слід відзначити, що кратність збільшення МБцК усіх досліджених антисептичних препаратів для акінетобактерій, які формують біоплівку, у порівнянні з псевдомонадами, набагато вища. МБцК біглюконату хлоргексидину для біоплівкової форми *A.baumannii*, у порівнянні з планктонною формою, більша у 3,3 рази, для декаметоксину - у 3,7 разів, для повідон-йоду - у 3,5 рази. Так як і у *P.aeruginosa*, кратність зростання МБцК у *A.baumannii* для біоплівкових форм збільшилась у 14,5 рази для перекису водню.

Підводячи підсумки під вище викладеним можна зробити висновок, що бактеріальні біоплівки *A.baumannii* мають високий рівень захисту від дії антисептичних препаратів, ніж біоплівки, які утворенні псевдомонадами, і таким чином у практичних умовах знищення акінетобактерій, вкарбованих у біоплівку, буде більш складним завданням, ніж знищення такої ж форми *P.aeruginosa*. Однак, в умовах практичної діяльності використовуються розчини антисептичних препаратів у концентраціях набагато вищих мінімальних

Таблиця 1. Характеристика чутливості планктонної і біоплівкової форми *P.aeruginosa* до антисептичних препаратів.

Антисептичний препарат	МБцК (мкг/мл), (M±m)		Кратність зростання МБцК	p
	Планктонна форма	Біоплівкова форма		
Повідон-йод	12584,3±388,5	30107,7±725,6	2,4	<0,01
Біглюконат хлоргексидину	72,3±8,7	224,9±21,8	3,2	<0,01
Декаметоксин	116,5±10,3	357,7±30,7	3,2	<0,01
Перекис водню	997,6±72,8	12764,6±420,5	13	<0,01

Таблиця 2. Порівняльна характеристика чутливості плівкової і планктонної форми *A.baumannii* до антисептичних препаратів.

Антисептичний препарат	МБцК (мкг/мл), (M±m)		Кратність зростання МБцК	p
	Планктонна форма	Біоплівкова форма		
Декаметоксин	80,5±9,3	22,1±2,3	3,7	<0,01
Біглюконат хлоргексидину	132,3±9,9	40,7±5,3	3,3	<0,01
Повідон-йод	12671,8±422	3762,6±156,4	3,5	<0,01
Перекис водню	38201±137,4	268,8±31,8	14,5	<0,01

бактерицидних.

У наших дослідженнях були використані й антисептичні препарати декасан та горостен, діючою речовиною яких є декаметоксин. Так як концентрації діючої речовини у даних лікарських препаратах низькі, і наближаються до МБцК для досліджуваних штамів акінетобактерій і псевдомонад, то у нашому досліді використали 0,1% водний розчин декаметоксину. У дослідженні використовувались ефективні знезаражуючі експозиції для досліджуваних зразків 0,05% розчину біглюконату хлоргексидину та 3% розчину перекису водню. Результати дослідження дії робочих розчинів антисептичних препаратів на різні форми *P.aeruginosa* демонструє рисунок 1. Горостен містить концентрацію 0,025% декаметоксину і 15% етилового спирту. Горостен виявився ефективним у знищенні зразків ЕІТ, вкритих плівкою *P.aeruginosa*, при тривалості занурення їх у антисептичний препарат на 2 год. Під дією горостену загибель планктонної форми *P.aeruginosa* відбувається при тривалості експозиції у 4 рази меншій.

У декасані суспензія вільної форми *P.aeruginosa* повністю гинула при тривалості дії 180 хвилин. Досліджувані зразки інтубаційних трубок, вкриті плівкою цього виду бактерій, не гинули протягом 24 годин перебування у даному антисептику. Можна зробити висновок, що концентрація декаметоксину у декасані не є ефективною для знезараження біоплівкової форми *P.aeruginosa*.

Загибель біоплівкової форми *P.aeruginosa* у розчині хлоргексидину (0,05%) відбувалась при тривалості дії у три години. Даний антисептичний препарат у боротьбі з біоплівковою формою *P.aeruginosa* дещо по-

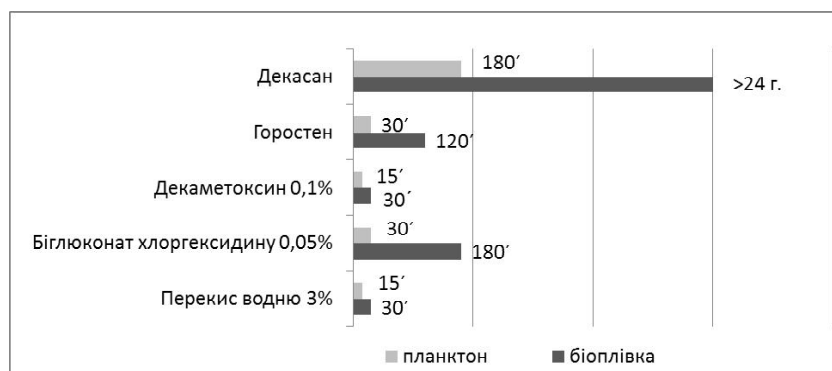


Рис. 1. Характеристика порівняльного впливу робочих розчинів антисептиків на планктонну та плівкову форми *P. aeruginosa*.



Рис. 2. Характеристика порівняльного впливу робочих розчинів антисептиків на планктонну та плівкову форми *A. baumannii*.

ступається горостену. Найбільш ефективним за своєю дією на біоплівкову форму *P. aeruginosa* є 0,1% розчин декаметоксину та 3% розчин перекису водню, ефективна тривалість дії експозиції яких складала 30 хвилин.

МБцК *A. baumannii* за ефективністю тривалості дії експозиції, виявились до антисептичних препаратів більш чутливими, ніж *P. aeruginosa*. Результати даного дослідження ілюстровані рисунком 2. Дані на рисунку 2 показують те, що біоплівкова форма цього виду бактерій теж нечутлива до дії антисептику декасану. Однак, для знищення планктонної форми *A. baumannii* вистачає на 60 хвилин меншої дії експозиції, аніж для знешкодження псевдомонад. Знищення досліджуваних фрагментів, вкритих біоплівковою форм *A. baumannii*, горостеном досягається при тривалості дії експозиції дії 150 хв., це на 30 хв. більшій, ніж

ментуючих грамнегативних бактерій у складі біоплівки 3% розчином перекису водню та 0,1% водним розчином декаметоксину відбувалось при дії експозиції 30 хвилин.

2. Біоплівкові форми грамнегативних неферментуючих бактерій характеризуються збільшенням рівня резистентності до антисептичних препаратів з числа четвертинних амонієвих сполук, йодвмісних препаратів, окислювачів та похідних бігуанідину. Одержані результати пояснюють невдачі застосування антисептиків у локусах, де неферментуючі бактерії існують достатній для утворення біоплівок час.

Потребує подальших досліджень вплив антисептиків на сам процес бактеріального плівкоутворення та пошук шляхів потенціювання протимікробної активності антисептиків на біоплівкові форми грамнегативних неферментуючих бактерій.

для знезараження біоплівки псевдомонад.

Найменш чутливими, у порівнянні з *P. aeruginosa*, виявились вкарбовані у бактеріальну біоплівку *A. baumannii* до антисептику хлоргексидину. Ефективна дія експозиції для цього антисептичного препарату відповідає 240 хвилинам. Для знешкодження вільної форми акінетобактерій було достатньо 30-хвилинної дії препарату хлоргексидину.

0,1% розчин декаметоксину та розчин перекису водню знезаражували плівкову форму акінетобактерій при дії такої самої експозиції, що і на біоплівкову форму *P. aeruginosa* (30 хв.).

Висновки та перспективи подальших розробок

1. Методом занурення досліджуваних фрагментів ЕІТ, вкритих біоплівковою неферментуючих грамнегативних бактерій, у антисептик 0,05% водний розчин біглюконату хлоргексидину чи у горо стен, повне знищення відбувалось при дії експозиції від 150 до 240 хвилин. Повне знищення неферментуючих грамнегативних бактерій у складі біоплівок 3% розчином перекису водню та 0,1% водним розчином декаметоксину відбувалось при дії експозиції 30 хвилин.

Список посилань

1. Балко, О. І. & Авдєєва, Л. М. (2013). Етапи біоплівкоутворення *Pseudomonas aeruginosa*. *Ukrainian Food Journal*, 2 (1), 23-26.
2. Белобородов, В. Б. (2012). Проблемы антибактериальной терапии тяжелых инфекций на примере нозокомиальной пневмонии, связанной с проведением искусственной вентиляции легких и сепсиса. *Болезни дыхательных путей*, 6, 289-293.
3. Сідашенко, О. І., Воронкова, О. С. & Сіроковаша, О. А. (2013). Біоплівка як особлива форма організації бактерій та її

роль в інфекційних процесах. *Вісник проблем біології та медицини*, 2 (103), 36-40.

References

1. Balko, O. I. & Avdieieva, L. M. (2013). Etapy bioplivkoutvorennia *Pseudomonas aeruginosa*. [Stages of *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation]. *Ukrainian Food Journal - Ukrainian Food Journal*, 2 (1), 23-26.
2. Beloborodov, V. B. (2012). Problemy antibakterialnoy terapii tyazhelyh infekcij na primere nozokomialnoy pnevmonii,

svyazannoї s provedeniem iskusstvennoї ventilyacii legkih i sepsisa. [Problems of antibacterial therapy of severe infections by the example of nosocomial pneumonia associated with the implementation of artificial ventilation and sepsis]. *Bolezni dyhatelnyh putej - Diseases of the respiratory tract*, 6, 289-293.

3. Sidashenko, O. I., Voronkova, O. S. & Sirokvasha, O. A. (2013). Bioplivka yak osoblyva forma orhanizatsii bakterii ta yii rol v infektsiinykh protsesakh. [Biofilm as a special form of bacteria and its role in infectious processes]. *Visnyk problem biolohii ta medytsyny - Bulletin of problems of biology and medicine*, 2 (103), 36-40.

Трофіменко Ю.Ю., Макац Є.Ф., Стукан О.К., Буркот В.М.,
ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ БИОПЛЕНОЧНЫХ И ПЛАНКТОННЫХ ФОРМ НЕФЕРМЕНТИРУЮЩИХ БАКТЕРИЙ К
ДЕЙСТВИЮ АНТИСЕПТИКОВ

Аннотация. Известно, что бактерии колонизируя эндотрахеальные интубационные трубки [ЭИТ], образуют биопленки. Бактериальные клетки, которые находятся в пленочном матриксе, защищены от воздействий внешних факторов и отличаются высоким уровнем резистентности к действию антибиотиков, антисептиков, дезинфектантов. Целью нашего исследования было определение чувствительности к антисептикам биопленочных и планктонных форм неферментирующих грамотрицательных бактерий к действию антисептиков декаметоксину, биглюконату хлоргексидину, повидон-йоду, перекиси водорода. Для того чтобы создать бактериальные биопленки, стерильные фрагменты эндотрахеальных трубок помещали в пробирки с мясопептонным бульоном и добавляли завис суточной культуры исследуемого штамма микроорганизма. Для определения влияния антисептиков на биопленки бактерий использовали метод двократных последовательных разведений. Результаты сравнительного исследования активности антисептических средств (декаметоксину, биглюконата хлоргексидина, повидон-йода, перекись водорода) по отношению к планктонным и биопленочным формам штаммов псевдомонад и акинетобактерий свидетельствуют, что во всех исследованных антисептиков в составе бактериальной пленки псевдомонады более устойчивы к действию препаратов, чем в планктонных формах. У биглюконата хлоргексидина и декаметоксину МБцК для бактериальной пленки в 3,2 раза больше, чем для планктонной формы. Наименьшая разница МБцК для планктонной и биопленочной форм псевдомонад была у препарата повидон-йод. МБцК биглюконата хлоргексидина для биопленочной формы акинетобактерий, по сравнению с планктонной формой, была больше в 3,3 раза, для декаметоксину - в 3,7 раза, для повидон-йода - в 3,5 раза. Биопленочные формы грамотрицательных неферментирующих бактерий обладают способностью к высокому уровню резистентности к антисептикам.

Ключевые слова: антисептики, эндотрахеальной интубационные трубки, биопленка.

Trofimenko Y.Y., Makac E.F., Stucan O.K., Burkot V.M.
SENSITIVITY OF BIOFILM AND PLANKTONIC FORMS OF NON-FERMENTING BACTERIA TO THE ACTION OF
ANTISEPTICS

Annotation. It is known that bacteria colonize endotracheal intubation tubes [EIT], form biofilms. Bacterial cells that are in the film matrix are protected from the effects of external factors and differ in high levels of resistance to the action of antibiotics, antiseptics, and disinfectants. The purpose of our study was to determine the sensitivity of the antiseptics of biofilm and planktonic forms of non-fermentable gram-negative bacteria to the action of the antiseptics of decamethoxin, chlorhexidine bigluconate, povidone iodine, hydrogen peroxide. In order to create bacterial biofilms, sterile fragments of the endotracheal tubes were placed in test tubes with meat-peptone broth and the daily culture of the studied strain of microorganisms was blocked. To determine the influence of antiseptics on biofilms of bacteria, the method of two successive dilutions was used. The results of a comparative study of the activity of antiseptic agents (decamethoxin, bichluconate chlorhexidine, povidone iodine, hydrogen peroxide) in relation to planktonic and biofilm forms of pseudomonad and acinetobacter strains testify that in all investigated antiseptics and bacterial films pseudomonads forms are more resistant to drugs preparations than in planktonic form. In bichluconate, chlorhexidine and decamethoxin MBcK for a bacterial film are 3,2 times greater than for a planktonic form. The smallest difference MBtsK for planktonic and biofilm forms of pseudomonad was in the drug povidone-iodine. MBcC bichluconate chlorhexidine for the biofilm form of acinetobacter, in comparison with planktonic form, was 3,3 times higher, for decamethoxin in 3.7 times, for povidone-iodine in 3,5 times. Biopharmaceutical forms of gram-negative nonfermenting bacteria have the ability to achieve high levels of resistance to antiseptics.

Keywords: antiseptics, endotracheal tubes, biofilm.
