

УДК 613.63

Марієвський В.Ф., Бубало В.О.

## ВИЗНАЧЕННЯ ЧУТЛИВОСТІ САЛЬМОНЕЛ В БІОПЛІВКАХ ДО ДІЇ ХІМІЧНИХ ДЕЗИНФЕКТАНТІВ

ДУ «Інститут епідеміології та інфекційних хвороб ім. Л.В. Громашевського» НАН України

*Показано, що штами різних видів сальмонел, як музейні, так і свіжо виділені від хворих здатні формувати бактеріальні біоплівки, що різко міняє їх чутливість до дезінфекційних засобів. В залежності від виду дезінфекційних засобів та носія сформованих біоплівок мінімальна бактерицидна концентрація для знезараження збільшується від 4 до 16 разів, що обов'язково повинно бути враховано при проведенні дезінфекційно-стерилізаційних заходів.*

Ключові слова: сальмонели, біоплівка, хімічні дезінфектанти

Основним завданням дезінфекції в системі протимікробних заходів є розрив механізму передачі збудника інфекції, а значить і розповсюдження його шляхом впливу на той чи інший фактор передачі [3].

Значення дезінфекції тим вище, чим більше боротьба з цією інфекцією основана на розриві механізму передачі збудника інфекції. При розробці і плануванні дезінфекційних заходів особливо увагу необхідно приділяти біологічним особливостям самого об'єкта дезінфекційного впливу – мікроба чи паразита [3]. Це має значення особливо в сучасних умовах, коли спостерігається широке розповсюдження формування стійкості збудників інфекційних хвороб до численних хімічних протимікробних засобів, в тому числі і до хімічних дезінфектантів. По даним літератури і результатів наших досліджень встановлено, що стійкість збудників інфекційних хвороб до дезінфектантів різних хімічних груп формується дуже швидко. При дії хлорутримуючих та четвертинно-амонієвих сполук стійкість до них у сальмонел починала формуватись вже з п'ятого пасажу. Крім того, в останні роки з'явилась інформація про наявність такої форми існування бактерій, як біоплівки [5,7]. Біологічні дослідження біоплівки показали, що їх можуть утворювати бактерії одного виду, або кількох видів мікроорганізмів. Мікроорганізми в біоплівках існують і поведуть себе не так, як в культуральних середовищах. В біоплівках по іншому, ніж в культурах, відбуваються їх чисельні фізіологічні процеси, змінюється продукція метаболітів і біологічних речовин [1,2,4].

Умови персистенції мікроорганізмів в біоплівках ускладнюються, якщо в біоплівку включаються клітини і тканини організму людини. Особливу увагу привертає здатність переживати в біоплівці мікроорганізмів, стійких до дії антибактеріальних препаратів – антибіотиків і дезінфекційних засобів, що робить проблематичним ефективність лікування і проведення дезінфекційних заходів [1,8].

Стійкість мікроорганізмів до антибіотиків і окремих антибактеріальних препаратів – в 100-1000 разів вище за їх планктонні форми [8].

Враховуючи все вище зазначене, біоплівки на наш погляд, можна віднести до категорії резервуара збудника інфекції. В загально епідеміологічному плані, на наш погляд, біоплівку можна

визначити, як екологічну нішу, сформовану бактеріальною спільнотою для виживання і захисту від негативно впливаючих факторів організму і зовнішнього середовища.

В літературі обмежені відомості про дію дезінфектантів на мікроорганізми в бактеріальних біоплівках.

Аналіз інфекційної захворюваності по Україні за останні 10 років показав, що серед збудників гострих кишкових інфекцій одне з провідних місць займає сальмонельоз. Крім того за результатами науково-дослідної роботи лабораторії кишкових інфекцій та паразитозів Інституту встановлений зв'язок між мінливістю біологічних властивостей збудника та впливом їх на епідеміологічний процес зоонозних сальмонельозів. Враховуючи, що для запобігання поширенню будь якої кишкової інфекції, в тому числі і сальмонельозів, важливою ланкою є переривання механізму передачі збудника, а саме проведення дезінфекційних заходів.

### Мета дослідження

Вивчення в експериментальних умовах активності формування біоплівки штамми сальмонел, виділених в ЛПЗ України. Визначити в експериментальних умовах змін ступеня чутливості сальмонел в біоплівках до окремих груп найбільш вживаних дезінфектантів в порівнянні з суспензійним станом сальмонел.

### Об'єкт дослідження

Дезінфекційні засоби (ДЗ):

- ДЗ№ 1, це комплексний засіб, який належить до класу четвертинно-амонієвих сполук і може використовуватись для дезінфекції з передстерилізаційним очищенням.

- ДЗ№ 2, який належить до класу хлорутримуючих засобів і може використовуватись для дезінфекції з передстерилізаційним очищенням

- ДЗ№ 3, це комплексний засіб, який вміщує полігексаметиленгуанідин гідрохлорид як діючу речовину, і має широкий спектр застосування.

Всі препарати зареєстровані до застосування в Україні і широко використовуються в практиці.

Дослідження проводилось на 135 штаммах сальмонел, з них *S. typhimurium* – 31, *S. enteritidis* – 88, *S. derby* -1, *S. infantis* – 1, *S. haifa* – 3, *S. Blegdam* – 2, *S. Montevideo* – 1, *S. Colorado* – 1, *S. java* -7, отриманих з музею патогенних для

людини мікроорганізмів ДУ «Інститут епідеміології та інфекційних хвороб ім. Л.В. Громашевського» НАН України, виділені в ЛПЗ України за останні 10 років. Бактеріальні культури вирощували на твердих та рідких поживних середовищах - мясо-пептонному бульйоні, мясо-пептонному агарі, триптон-соєвому бульйоні виробництва BioMerieux (Франція).

### Матеріали та методи

Експериментальні бактеріальні біоплівки вирощували в імунологічних планшетах за методом Романової та на гумових і полівінілхлоридних катетерах при 28 С 24 години [6]. Ступінь формування біоплівки визначали спектрофотометрично при довжині хвилі 630 нм, за показником оптичної густини, в порівнянні з контролем. Визначення показника оптичної густини біоплівки для кожного штаму проводилося в 6 повторях. Після чого визначалися середні його значення та достовірність різниці показників з цими ж показниками в контролі. Визначення чутливості сальмонел в біоплівках до дії ДЗ проводилося згідно розробленого нами способу визначення чутливості мікроорганізмів в біоплівках до дії дезінфектантів різних хімічних груп.

Дослідження проводилося на плоскодонних імунологічних 96-лункових планшетах. В лунках плоскодонного імунологічного планшета за ме-

тодом Романової протягом 24 годин, при 28 С вирощували біоплівку. Біоплівку досліджуваних штамів не фарбували, а відразу включали до тестування з різними дезінфектантами у різних концентраціях при експозиції 30 хв. При цьому визначалась найменша бактерицидна концентрація (НБК) досліджуваного дезінфектанту для даного штаму мікроорганізмів. Паралельно для порівняння отриманої НБК ДЗ для біоплівки ставились контрольні дослідження і визначається чутливість штамів мікроорганізмів в суспензії при тих же експозиціях. Статистична обробка отриманих даних виконана з використанням пакета програм Microsoft Excel.

### Результати та їх обговорення

Визначення здатності тест-штамів сальмонел утворювати біоплівку показало, що всі штами сальмонел здатні утворювати біоплівку, але активність формування біоплівки відрізняється і показник одиниць оптичної густини варіював у межах від 0,14±0,01 до 1,09±0,04, опосередковано вказуючи на здатність тестованих штамів сальмонел до біоплівкоутворення.

Показники оптичної густини біоплівки мали достовірну різницю з показниками контролю, що свідчить про достатній ступінь формування біоплівки в імунологічних планшетах.

Таблиця 1.  
Ефективність знезараження ДЗ №1 штамів сальмонел в біоплівках і в суспензії.

Концентрація дезінфектанту %	Відсоток стійких до ДЗ штамів	
	Біоплівки N=135, %, (M±m)	Суспензія N=135, %, (M±m)
0.8	0,00	0,00
0.4	0,00	0,00
0.2	0,00	0,00
0.1	0,00	0,00
0.05	1,65±1,08	0,00
0.025	15,06±6,30	0,00
0.0125	67,13±7,82	7,11±3,06
0.00625	94,67±2,15	88,64±6,18

Дані наведені в таблиці №1 свідчать, що у 15,06±6,30% штамів сальмонел в біоплівках найменша бактерицидна концентрація(НБК) ДЗ становила 0,05% і у 2 рази перевищувала показник найменшої бактерицидної концентрації

(НБК) суспензії (0,025%). Для знезараження 1,65±1,08% штамів в біоплівках необхідно було збільшити концентрацію ДЗ в 4 рази в порівнянні з бактеріями в суспензії.

Таблиця 2.  
Ефективність знезараження ДЗ №2 штамів сальмонел в біоплівках і в суспензії.

Концентрація дезінфектанту %	Відсоток стійких до ДЗ штамів	
	Біоплівки N=135, %, (M±m)	Суспензія N=135, %, (M±m)
0.8	0,00	0,00
0.4	0,00	0,00
0.2	0,00	0,00
0.1	0,00	0,00
0.05	3,26±2,49	0,00
0.025	6,27±1,80	0,00
0.0125	19,56±4,45	5,31±2,35
0.00625	92,71±2,83	81,92±6,57

Дані наведені в таблиці №2 свідчать, що у 6,27±1,80% штамів сальмонел в біоплівках найменша бактерицидна концентрація(НБК) ДЗ становила 0,05% і у 2 рази перевищувала показник

НБК суспензії (0,025%). Для знезараження 3,26±2,49% штамів в біоплівках необхідно було збільшити концентрацію ДЗ в 4 рази в порівнянні з бактеріями в суспензії.

Таблиця 3.  
Ефективність знезараження ДЗ №3 штамів сальмонел в біоплівках і в суспензії.

Концентрація дезінфектанту %	Відсоток стійких до ДЗ штамів	
	Біоплівки N=135, %, (M±m)	Суспензія N=135, %, (M±m)
0.5	0,00	0,00
0.25	0,00	0,00
0.125	0,00	0,00
0.0625	0,00	0,00
0.03125	2,86±2,55	0,00
0.01563	2,86±2,55	0,00
0.00781	8,51±3,82	0,00
0.00391	91,34±4,80	67,94±9,33

Результати наведені в таблиці №3 свідчать, що для 8,51±3,82% штамів сальмонел в біоплівках НБК ДЗ становила 0.01563% і у 2 рази перевищувала показник НБК суспензії (0,00781%). Для знезараження 2,86±2,55% штамів в біоплівках необхідно було збільшити концентрацію ДЗ в 8,85 рази в порівнянні з бактеріями в суспензії.

Оцінка наведених даних дає можливість відмітити, що така біологічна властивість, як здатність до формування біоплівок штамми сальмонел надає змогу витримувати вищі концентрації (від 4 до 8,85 разів) і захищає від знешкодження при застосуванні НБК для ДЗ №1-16,71±3,69% штамів, ДЗ №2 – 9,53±3,39%, ДЗ №3 – 14,23±2,97%.

Тобто дезінфекція сальмонел у біоплівках при застосуванні НБК визначеної для суспензії залишається неефективною.

Слід відмітити, що в таблицях представлені усереднені дані по трьох ДЗ, але в кожній з них були штами, які для знезараження потребували збільшення НБК від 4 до 16 разів.

#### Висновки

1. Штами різних видів сальмонел, як музейні, так і свіжовиділені від хворих в ЛПЗ, в експериментальних умовах здатні формувати бактеріальні біоплівки, але активність формування біоплівок відрізняється і показник одиниць оптичної густини варював у межах від 0,14±0,01 до 1,09±0,04, що свідчить про зміну можливості

формування біоплівки в процесі збереження.

2. Дезінфекційні засоби №1 і №3 основною діючою речовиною яких є четвертинно амонієва сполука та полігексаметиленгуанідин гідрохлорид здатні знезаражувати сформовані планшетні біоплівки сальмонел при 4-8,85 разовому збільшенні найменшої бактерицидної концентрації, визначеної для суспензійних клітин досліджених штамів сальмонел.

3. Біоплівки сальмонел сформовані на полівінілових та гумових носіях потребують до 16 разового збільшення НБК ДЗ № 1 для знезараження.

#### Література

1. Donlan R.M. Biofilms on central venous catheters: is eradication possible? / R.M. Donlan // Bacterial biofilms. – 2008. – v.322. – p.133-161.
2. Льюис К. Персистирующие клетки и загадка выживания биопленок / К. Льюис // Биохимия. – 2005. – Т. 70. – С. 327-336.
3. Громашевский Л.В. Избранные труды: в 3 томах / Громашевский Л.В. – К.: Здоровья, 1987. – Т.1. – С.71-81.
4. Морозова Н.С. Дезинфектологические аспекты проблемы борьбы с биопленкой / Н.С. Морозова, В.Ф. Мариевский // Профилактика медицина. – 2009. – № 2. – С.3-8.
5. Николаев Ю.А. Биопленка – «город микробов» или аналог многоклеточного организма / Ю.А. Николаев, В.К. Плакунов // Микробиология. – 2007. – Т. 76, №2. – С. 149-163.
6. Романова Ю.М. Способность к формированию биопленок в искусственных системах у различных штаммов Salmonella typhimurium / Ю.М. Романова, Н.В. Алексеева, Т.А. Смирнова [и др.] // Микробиология. – 2007. – №4. – С. 38-42.
7. Смирнова Т.А. Структурно-функциональная характеристика бактериальных биопленок / Т.А. Смирнова, Л.В. Диденко, Ю.М. Романова // Микробиология. – 2010. – Т. 79, №4. – С.435-446.
8. Ширококов В.П. Медична мікробіологія, вірусологія, імунологія (підручник) / В.П. Ширококов, Н.О. Виноград та інші // Вінниця: Нова книга. – 2011, -951 с.

#### Реферат

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ САЛЬМОНЕЛЛ В БИОПЛЕНКАХ К ДЕЙСТВИЮ ХИМИЧЕСКИХ ДЕЗИНФЕКТАНТОВ  
Мариевский В.Ф., Бубало В.А.

Ключевые слова: биопленка, сальмонелла, дезинфектанты.

Основной задачей дезинфекции в системе противомикробных мероприятий является разрыв механизма передачи возбудителя инфекции, а значит и распространения его путем влияния на тот или иной фактор передачи. При разработке и планировании дезинфекционных мероприятий особое внимание необходимо уделять биологическим особенностям самого объекта дезинфекционного влияния – микроорганизма или паразита. Особенно важным является способность отдельных микроорганизмов образовывать биопленки. Микроорганизмы в биопленках существуют и ведут себя не так, как в культуральных средах. Для исследования были использованы 3 дезинфекционные средства, которые зарегистрированы к использованию в Украине. Опыты проводились на 135 штаммах сальмонелл, как музейных, так и выделенных в ЛПУ Украины за последние 10 лет. Показано, что штаммы разных видов сальмонелл, как музейные, так и свежевыделенные от больных в ЛПУ, способны формировать бактериальные биопленки, но активность формирования биопленок разная. Дезинфекционные средства № 1 и № 3 основным действующим веществом которых является четвертинное амониевое соединение и полигексаметиленгуанидин гидрохлорид способны обеззараживать сформированные планшетные биопленки сальмонелл при 4 - 8,85 разовом увеличении минимальной бактерицидной концентрации, определенной для суспензивных клеток штаммов сальмонелл. Биопленки сальмонелл, сформированные на поливиниловых и резиновых носителях требуют до 16 кратного увеличения МБК ДЗ № 1 для обеззараживания.

### Summary

DETECTION OF SENSITIVITY DEMONSTRATED BY SALMONELLAS FOUND IN BIOFILMS TO CHEMICAL DISINFECTANTS

Marievsky V.F.y, Bubalo V.A.

Key words: biofilms, Salmonella, disinfectants.

Disinfection measures are recognized as one of the most influential in preventing infectious diseases and epidemic outbreaks. Their goal is to maximize disinfection effect towards potential pathogens persisting in the environment. At the same time, in recent years more and more attention is paid to the changes in the biological properties of pathogens, the study of natural self-defense mechanism of a variety of factors, including the action of disinfectants. In Ukraine the number of disinfectants (DMZ) is growing and is reaching several hundreds, although the effectiveness of disinfectants is not always adequate. Therefore it is especially important nowadays when we observe the increasing resistance of pathogens to many antimicrobials, including the chemical disinfectants. According to the data reported and the results of our researches we may suggest the resistance to infectious agents to disinfectants of different chemical groups is formed very quickly.

In addition, recently there have been data on such form of bacteria existence as biofilms. Biological researches focusing on biofilms have shown that they can be formed by bacteria of one species or several species of microorganisms. The vital activity of microorganisms in biofilms differs from that in the culture medium. Research data present little information about the effects produced by disinfectants on the microorganisms in bacterial biofilms. Therefore, to prevent the spread of intestinal infections, including salmonellosis, it is important to interrupt the mechanisms of pathogen transmission, and namely by implementing disinfection measures.

We have studied the activity of strains of Salmonella biofilm formation in the experimental conditions and determined the changes in sensitivity which Salmonella demonstrates in biofilms to certain groups of the most commonly used disinfectants in suspension. We used such disinfectants (DZ): DZ 1 used as a complex remedy that belongs to the class of quaternary ammonium compounds, and can be used for disinfection prior sterilization. DZ 2, which belongs to the class of chlorinated and can be used for disinfection with purification before sterilization. DZ 3 is a complex means which accommodates polyhexamethyleneguanidine hydrochloride as active substance and has a wide range of applications.

All products are registered for use in Ukraine and are widely used in practice. The research was conducted on 135 strains of Salmonella, which we obtained from the Museum of pathogenic microorganisms to humans «Institute of Epidemiology and Infectious Diseases. LV Gromashevsky "NAS of Ukraine, Ukraine PSI isolated in the last 10 years. Bacterial cultures were grown on solid and liquid nutrient media of BioMerieux (France). The experimental bacterial biofilms were grown in plates by the Romanova method and on the rubber and PVC catheters, 28°C for 24 hours. The degree of biofilm formation was determined spectrophotometrically at a wavelength of 630 nm, in terms of the optical density, when compared with the control. Determination of biofilm absorbance for each strain was carried out in 6 repetitions. Sensitivity of Salmonella in biofilms to disinfectants was detected by the method we had developed to determine the sensitivity of microorganisms in biofilms to disinfectants of different chemical groups. The research was conducted on flat-bottomed immunological plates. Determination of the ability of the test Salmonella strains to form biofilm showed that all strains of Salmonella were able to form biofilms, but biofilm formation activity was different and indicator of optical density units varied in the range from  $0,14 \pm 0,01$  to  $1,09 \pm 0,04$ , indirectly indicating tested the ability of Salmonella strains to form biofilm. We have identified changes in the sensitivity of Salmonella biofilms to some groups most commonly used disinfectants in suspension as comparison with the Salmonella in the experimental conditions. Disinfection with a few new means can disinfect Salmonella biofilm formed at least 4 - 8,85 fold increased bactericidal concentrations determined for suspension cell strains of Salmonella.