

ОРИГІНАЛЬНІ ДОСЛІДЖЕННЯ

DOI: 10.31393/reports-vnmedical-2018-22(3)-01

UDC: 579.61:615.28

THE INVESTIGATION OF THE RELATIONSHIP BETWEEN BIOFILM-FORMING PROPERTIES OF CLINICAL STRAINS OF P.AERUGINOSA AND THEIR SENSITIVITY TO ANTISEPTIC MEDICINES

Nazarchuk O.A.¹, Faustova M.O.², Bobyr V.V.³, Kordon Yu.V.¹

¹National Pirogov Memorial Medical University (Pirogov st., 56, Vinnytsya, Ukraine, 21018),

²Higher State Educational Establishment of Ukraine "Ukrainian Medical Stomatological Academy" (Shevchenko str., 23, Poltava, Ukraine, 36000),

³Bogomolets National Medical University Ministry of Health of Ukraine (Peremohy lane, 34, Kyiv, Ukraine, 03057)

Responsible for correspondence:
e-mail: nazarchukoa@gmail.com

Received 1 June 2018 ; Accepted 13 July 2018

Annotation. High antimicrobial properties of antiseptics determine the scientific interest in the study of their effect on the biofilm formation of clinically significant pathogens and the detection of a probable dependence between the sensitivity of bacteria to them and the ability to form biofilms. The aim - was to study the biofilm-forming properties of clinical strains of *P.aeruginosa*, depending on their sensitivity to various antiseptic medicines. 30 clinical strains of *P.aeruginosa* were isolated and identified from the patients with infectious complications of different areas who had been treated at the burn, intensive care and surgical units. The study of biofilm-forming properties of clinical isolates of *P.aeruginosa* was performed by using the spectrophotometric technique by G.D. Christensen (MtP microtiter plate test). The sensitivity assessment of the derived strains to antiseptics (decamethoxine, decasan, miramistin, chlorhexidine) was done by double serial dilutions according to the standard procedure approved by the Order №167 of the Ministry of Public Health of Ukraine. The statistical processing of the results obtained was carried out by "Microsoft Excel 2010" software package. In order to determine the relationship between the biofilm formation and sensitivity to antiseptic medicines of *P. aeruginosa* strains, we determined the correlation coefficient (*r*-Pearson coefficient). The clinical strains of *P.aeruginosa* were found to be the most sensitive to decasan and miramistin, and their MICs did not differ 70,31±25,98 mg/ml and 68,5±33,20 mg/ml respectively. Chlorhexidine has been shown a reducing of antimicrobial efficiency against *P.aeruginosa* (MIC 115,62±59,75 mg/ml). High biofilm-forming properties of clinical isolates *P.aeruginosa* have been proved. The optical density of the biofilms formed by these microorganisms was 0,674±0,17 density units for 24 hours of cultivation. A direct correlation between the sensitivity of strains *P.aeruginosa* to decamethoxine, decasan, miramistin and their biofilm-forming properties was established. The sensitivity of the clinical strains to chlorhexidine did not depend on their biofilm potential. Clinical strains of *P.aeruginosa* have high biofilm-forming properties and retain sensitivity to antiseptic medicines based on cationic surfactant antiseptics. Decamethoxine and miramistin provide the highest antimicrobial action on *P.aeruginosa* isolates. The sensitivity of *P.aeruginosa* to decamethoxine, decasan, miramistin has shown to be in a direct correlation with their biofilm-forming properties.

Keywords: antiseptics, biofilms, decamethoxine, decasan, miramistin, chlorhexidine.

Introduction

The last decade marked the emergence of new data on the role of opportunistic microorganisms, that can form biofilms, in the development of various nosological forms of purulent-inflammatory diseases with severe course during a treatment in hospital. Gram-negative non-fermenting microorganisms occupy a significant place among them. The ability of *Pseudomonas spp.* to exist in the environment of medical institutions, attach to the surfaces of catheters, probes, respiratory tubes, contact lenses and to form biofilms indicates their leading role among known pathogens of infectious complications associated with the medical care. The presence in the biofilms gives the pathogens additional resistance to antimicrobial agents and factors of the immune system, as well as new properties that are not characteristic for planktonic forms of bacteria. Therefore, it is naturally that the acquisition of antibiotic resistance is increasing among high-biofilm forming strains of bacteria [1, 3, 9, 10].

Taking into account these features, the development and implementation of new effective antimicrobial agents against microorganisms in planktonic and biofilm forms

are the important measures on the way of overcoming the resistance of microorganisms to chemotherapeutic drugs. Nowadays, there is the positive experience of clinical use in various fields of medicine a new group of medicines based on cationic surfactant antiseptics, which belong to the most effective ones, according to scientific literature. These drugs possess a multi-vector mechanism of antimicrobial action, because of their high surface activity, washing and emulsifying properties, ability to change the surface tension of the bacterial cell and the violation of its osmotic balance, resulting in a "osmotic shock" due to their diphilic structure of the molecule. It provides the death of the microorganism [2, 4, 6, 7, 8].

High antimicrobial properties determine the scientific interest in the study of the activity of antiseptics on the biofilm formation of clinically significant pathogens and the detection of a probable dependence between the level of bacterial sensitivity to them and the ability to form biofilms.

This work was aimed to study the biofilm-forming properties of clinical strains of *P.aeruginosa*, depending on the sensitivity to various antiseptic medicines.

Material and methods

There were isolated from the patients with severe burns and patients of intensive care and surgical units and identified 30 clinical strains of *P.aeruginosa*. Clinical strains of *P.aeruginosa* were previously identified by morphological, tinctorial, cultural and biochemical properties and had been possessed resistance to antibiotics. Isolation and identification of microorganisms were carried out according to the standard method using NEFERM test-24 (PLIVA - Lachema a.s. Brno, Czech Republic).

The sensitivity assessment of the derived strains to antiseptic medicines (decamethoxin, dekasen, miramistin, chlorhexidine) was done by double serial dilutions according to the standard procedure approved by the Order №167 of the Ministry of Public Health of Ukraine on "On Approval of Training Guidance "Assessment of the sensitivity of microorganisms to antibiotics", dated by April, 5, 2007. Minimum inhibitory concentration (MIC) was determined at the lowest concentration of antiseptic solution that was able to suppress the apparent growth of the microorganism. The minimum bactericidal concentration (MBC) of antiseptics was determined at the lowest concentration of antiseptic, which completely destroyed the bacterial culture, by inoculating microorganisms from a broth medium, where the growth of the microorganism was delayed, on an agar medium [5].

The study of biofilm-forming properties of clinical strains was performed by using the spectrophotometric technique by G.D. Christensen (MtP microtiter plate test). Biofilms were reproduced in wells of a sterile, flat-bottom 96-well polystyrene tray (Corning, USA) and stained with 1% solution of crystalline violet. Properties of the microorganisms to form a biofilm were evaluated by the degree of dye absorption in optical density units using a spectrophotometer (570 nm). Interpretation of the results was carried out according to the conventional methodology. Thus, the ability of microorganisms to form biofilms was assessed as low (at optical density <0,120), average (at optical density = 0,121-0,239) and high (at optical density > 0,240) [11].

The statistical processing of the results obtained was carried out by standard "STATISTICA+" and "Microsoft Excel 2010" software packages. In order to determine the relationship between the sensitivity to antiseptics and biofilm formation of investigated microorganisms, we determined the correlation coefficient (r-Pearson coefficient), the absolute value of which characterized the binding force.

Results. Discussion

According to the results of the research, it was found that the highest activity on the clinical strains of *P.aeruginosa*, isolated from severely ill patients, was decasan and miramistin, their MICs were almost identical (70,31±25,98 mcg/ml, 68,5±33,20 mcg/ml respectively (table 1)). In turn, the MIC (115,62±59,75 mcg/ml) and MBC

Table 1. The antimicrobial effect of antiseptic medicines on the planktonic form of clinical strains of *P.aeruginosa* (n=30), M±m.

Antiseptic	MIC (mcg / ml)	MBC (mcg / ml)
Decamethoxine 0,1%	79,37±39,20	153,75±73,90
Decasan* 0,02%	68,5±33,20	121,88±52,08
Chlorhexidine 0,05%	115,62±59,75	222,5±110,80
Miramistin 0,01%	70,31±25,98	89,29±16,84

Notes: * - main active substance equivalent; ** - in comparison with decamethoxin.

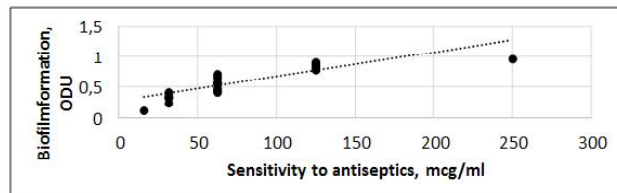


Fig. 1. Correlation between biofilm formation and sensitivity to decamethoxin of clinical strains of *P.aeruginosa* (n=30).

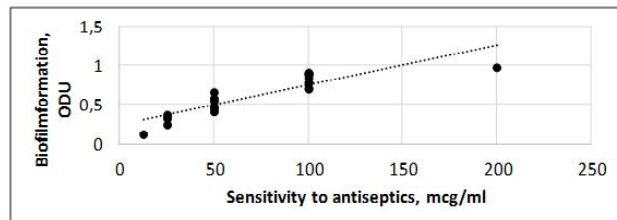


Fig. 2. Correlation between biofilm formation and sensitivity to decasan of clinical strains of *P.aeruginosa* (n=30).

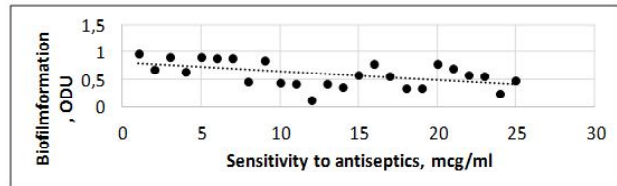


Fig. 3. Correlation between biofilm formation and sensitivity to miramistin of clinical strains of *P.aeruginosa* (n = 30).

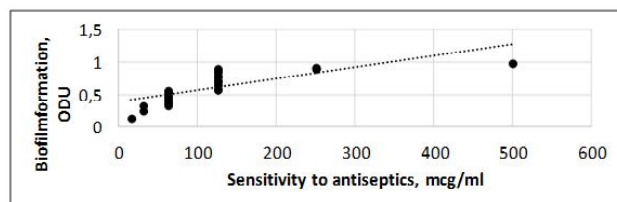


Fig. 4. Correlation between biofilm formation and sensitivity to chlorhexidine of clinical strains of *P.aeruginosa* (n=30).

(222,5±110,80 mcg/ml) of chlorhexidine for investigated strains were the highest, that indicated a decreasing of the effectiveness of this antiseptic in the treatment of infections, caused by *P.aeruginosa*.

As a result of the research, high biofilm-forming properties of clinical isolates of *P.aeruginosa* have been established. The degree of dye absorption of biofilms formed by investigated pathogens was 0,674±0,17 optical density units (ODU) for 24 hours of cultivation. However, it should be noted that this indicator was significantly different

for different clinical strains. So, some of them have shown the average ability to form biofilms.

A direct correlation between the sensitivity of isolates of *P.aeruginosa* to decamethoxine and their ability to form biofilms was established. The r-Pearson coefficient for these indicators amounted 0,74 (Fig. 1). It was quite naturally that the binding force between the biofilm formation of *Pseudomonas strains* and their sensitivity to decasan (r-Pearson 0,78) was similar to those indicators of sensitivity referring to decamethoxine (Fig. 2).

Moreover, direct correlation between sensitivity of *P.aeruginosa* strains to miramistin which was active against them and their biofilm-forming properties was established. The r-Pearson coefficient was found to be 0,77 (Fig. 3).

In turn, the properties of biofilm formation of clinical strains of *P.aeruginosa* were poorly correlated with their sensitivity to chlorhexidine. This was pointed by the low r-Pearson coefficient (0,55). So, the sensitivity of the clinical strains of *P.aeruginosa* to this antiseptic did not depend on their biofilm-forming potential (Fig. 4).

Conclusions and prospects for further research

1. Clinical strains of *P.aeruginosa* as pathogens of infectious complications, have high biofilm-forming properties and preserve sensitivity to antiseptic medicines based on cationic surfactants. The highest antimicrobial activity against isolates of *P.aeruginosa*, isolated from severely ill patients, was shown by decamethoxine and miramistin. It has been established that the sensitivity of *P.aeruginosa* to decamethoxine, decasan and miramistin has a direct correlation with their biofilm-forming properties. It means, the higher ability to form a biofilm has a pathogen, the higher bacteriostatic concentration of antiseptic should be applied to it. The sensitivity of clinical strains of *P.aeruginosa* to chlorhexidine does not depend on the biofilm-forming properties of these isolates.

Prospects for further research are based on the in-depth study of the effect of antiseptic medicines on *P.aeruginosa*, to overcome the high adaptive properties of these pathogens, which are aimed to make a treatment of the infectious complications caused by it more effective.

References

- Balko, O. B. & Avdeeva, L. V. (2010). Strukturni komponenti i osoblivosti organizatsii bioplivki *Pseudomonas aeruginosa* [Structural components and features of *Pseudomonas aeruginosa* biofilm organization]. *Mikrobiologichnyi zhurnal - Microbiological Journal*, 72 (4), 28-33.
- Kochneva, O. V. & Petrenko, L. O. (2016). *Vivchennya shlyahiv podolannya rezistentnosti mikroorganizmiv do himioterapevtychnih preparativ* [Study of ways to overcome the resistance of microorganisms to chemotherapeutic drugs]. Medytsyna tretoho tysiacholittia, Materialy mizhvuzivskoi konferentsii molodykh vchenykh ta studentiv. Kharkiv: (b.v.) - Medicine of the Third Millennium, Materials of the Intercollegiate Conference of Young Scientists and Students. Kharkiv: (w.p.).
- Nazarchuk, O. A. & Faustova, M. O. (2017). Bioplivkoutvoryuyuchi vlastivosti klinichnih shtamiv grampozitivnih mikroorganizmiv [Biofilm-forming properties of clinical strains of gram-positive microorganisms]. *Biomedical and Biosocial Anthropology*, 29, 6-9.
- Paliy, G. K., Nazarchuk, O. A., Bobir, V. V., Gonchar, O. O., Gridina, T. L., Paliy, D. V. ... Burkot, V. M. Otsinka antibakterialnih ta protigribkovih vlastivostey suchasnih antiseptiv [Evaluation of antibacterial and antifungal properties of modern antiseptics]. *Mikrobiologiya i biotekhnologiya - Microbiology and Biotechnology*, 4 (32), 67-74. [https://doi.org/10.18524/2307-4663.2015.4\(32\).57465](https://doi.org/10.18524/2307-4663.2015.4(32).57465).
- Pro zatverdzhennya metodychnykh vkazivok "Vyznachennya chutlyvosti mikroorganizmiv do antybakterial'nykh preparativ" ["On Approval of Training Guidance "Assessment of the sensitivity of microorganisms to antibiotics"]. Nakaz Ministerstva okhorony zdorovia Ukrainy № 167 (05.04.2007 p.). Retrieved from: <http://www.moz.gov.ua>.
- Selyuk, M. N., Kozachok, N. N. & Selyuk, O. V. (2013). Puti resheniya antibiotikorezistentnosti [Ways of solving antibiotic resistance]. *Semeynaya meditsina*, 2, 28-33.
- Paliy, G. K., Faustova, M. O., Nazarchuk, O. A. & Paliy, D. V. (2017). *Suchasni aspekti zastosuvannya antiseptiv dlya profilaktiki, likuvannya zapalnih zahvoryuvan porozhnini rota* [Modern aspects of the use of antiseptics for the prevention, treatment of inflammatory diseases of the oral cavity]. Liki - lyudini. Suchasni problemi farmakoterapii i pryznachennya likarskiykh zasobiv, Materiali I Mizhnarodnoi naukovy-praktichnoi konferentsii, 1, 224-231. Kharkiv: (b.v.).
- Chekman, I. S., Bobyrov, V. M. & Kresiun, V. Y. (2011). *Farmakolohiia: pidruchnyk dlia studentiv stomatomatolohichnykh fakultetiv vyshchykh medychnykh navchalnykh zakladiv* [Pharmacology: a textbook for the stud. stomat fac. of higher med. ed. Establishments]. Vinnytsia: Nova knyha.
- Alhede, M., Bjarnsholt, T., Givskov, M. & Alhede, M. (2014). *Pseudomonas aeruginosa* biofilms: mechanisms of immune evasion. *Adv. Appl. Microbiol.*, 86 (1), 40.
- Alipour, N., Karagoz, A., Taner, A., Gaeini, N., Alipour, N., Zeytin, H. ... Durmaz, R. (2017). Outbreak of hospital infection from biofilm-embedded pan drug-resistant *Pseudomonas aeruginosa*, due to a contaminated bronchoscope. *Tap Chi Y Hoc Du Phong*, 2 (2). doi: 10.21767/2572-5483.100014.
- Christensen, G. D., Simpson, W. A., Younger, J. J., Baddour, L. M., Barrett, F. F., Melton, D. M., & Beachey, E. H. (1985). Adherence of coagulase-negative staphylococci to plastic tissue culture plates: a quantitative model for the adherence of staphylococci to medical devices. *Journal of Clinical Microbiology*, 22(6). 996-1006.

Список посилань

- Балко, О. Б. & Авдеева, Л. В. (2010). Структурні компоненти і особливості організації біоплівки *Pseudomonas aeruginosa*. *Мікробіологічний журнал*, 72 (4). 28-33.
- Кочнева, О. В. & Петренко, Л. О. (2016). *Вивчення шляхів подолання резистентності мікроорганізмів до хіміотерапевтичних препаратів*, Медицина третього тисячоліття, Матеріали міжвузівської конференції молодих вчених та студентів. Харків: (б.в.).
- Назарчук, О. А. & Фаустова, М. О. (2017). Біоплівкоутворюючі властивості клінічних штамів грампозитивних мікроорганізмів [Biofilm-forming properties of clinical strains of gram-positive microorganisms]. *Biomedical and Biosocial Anthropology*, 29, 6-9.
- Палій, Г. К., Назарчук, О. А., Бобир, В. В., Гончар, О. О., Грідіна, Т. Л., Палій, Д. В. ... Буркот, В. М. (2015). Оцінка антибактеріальних та протигрибкових властивостей сучасних антисептиків. *Мікробіологія і біотехнологія*, 4 (32), 67-74. [https://doi.org/10.18524/2307-4663.2015.4\(32\).57465](https://doi.org/10.18524/2307-4663.2015.4(32).57465).
- Про затвердження методичних вказівок "Визначення чутливості мікроорганізмів до антибактеріальних препаратів".

- Наказ МОЗ № 167. (05.04.2007 р.). Взято з <http://www.moz.gov.ua>.
6. Селюк М. Н., Козачок, Н. Н. & Селюк, О. В. (2013). Пути решения антибиотикорезистентности. *Семейная медицина*, 2, 28-33.
 7. Палій, Г. К., Фаустова, М. О., Назарчук, О. А. & Палій, Д. В. (2017). *Сучасні аспекти застосування антисептиків для профілактики, лікування запальних захворювань порожнини рота*. Ліки - людині. Сучасні проблеми фармакотерапії і призначення лікарських засобів, Матеріали I Міжнародної науково-практичної конференції, 1, 224-231. Харків: (б.в.).
 8. Чекман, І. С., Бобирьов, В. М. & Кресюн, В. Й. (2011). Фармакологія: підручник для студентів стоматологічних факультетів вищих медичних навчальних закладів. Вінни-
ця: Нова книга.
 9. Alhede, M., Bjarsholt, T., Givskov, M. & Alhede, M. (2014). Pseudomonas aeruginosa biofilms: mechanisms of immune evasion. *Adv. Appl. Microbiol.*, 86 (1), 40.
 10. Alipour, N., Karagoz, A., Taner, A., Gaeini, N., Alipour, N., Zeytin, H. ... Durmaz, R. (2017). Outbreak of hospital infection from biofilm-embedded pan drug-resistant Pseudomonas aeruginosa, due to a contaminated bronchoscope. *Tap Chi Y Hoc Du Phong*, 2 (2). doi: 10.21767/2572-5483.100014.
 11. Christensen, G. D., Simpson, W. A., Younger, J. J., Baddour, L. M., Barrett, F. F., Melton, D. M., & Beachey, E. H. (1985). Adherence of coagulase-negative staphylococci to plastic tissue culture plates: a quantitative model for the adherence of staphylococci to medical devices. *Journal of Clinical Microbiology*, 22(6), 996-1006.

ДОСЛІДЖЕННЯ ВЗАЄМОЗВ'ЯЗКУ БІОПЛІВКУЮТЬОРЮЮЧИХ ВЛАСТИВОСТЕЙ КЛІНІЧНИХ ШТАМІВ P. AERUGINOSA З ЇХ ЧУТЛИВІСТЮ ДО АНТИСЕПТИЧНИХ ЛІКАРСЬКИХ ЗАСОБІВ

Назарчук О. А., Фаустова М.О., Бобир В.В., Кордон Ю. В.

Анотація. Високі протимікробні властивості обумовлюють науковий інтерес до вивчення дії антисептиків на біоплівкутворення клінічно значущих збудників та виявлення ймовірної залежності між чутливістю бактерій до них та здатністю утворювати біоплівку. Мета - вивчення біоплівкутворюючих властивостей клінічних штамів P.aeruginosa залежно від чутливості до різних антисептичних препаратів. Від пацієнтів з інфекційними ускладненнями різної локалізації, яких лікували в опіковому, реанімаційному, хірургічному відділеннях виділено та ідентифіковано 30 штамів P.aeruginosa. Досліджували біоплівкутворюючі властивості ізолятів P.aeruginosa спектрофотометрично (за G.D. Christensen, MtP-test "microtiter plate test"). Чутливість P.aeruginosa до антисептиків (декаметоксин, декасан, мірамистин, хлоргексидин) визначали методом послідовних серійних розведень за стандартною методикою (Наказ МОЗ України №167). Статистично визначали кореляційний зв'язок між чутливістю клінічних штамів P.aeruginosa та їх біоплівкутворюючими властивостями. Встановлено найвищу активність щодо клінічних штамів P.aeruginosa у декасану та мірамистину, МІК яких не відрізнялись 70,31±25,98 мкг/мл, 68,5±33,20 мкг/мл відповідно. У хлоргексидину встановлено зменшення протимікробної ефективності щодо синьогнійної палички (МІК 115,62±59,75 мкг/мл). Доведено високі біоплівкутворюючі властивості клінічних ізолятів P.aeruginosa. Ступінь світлопропускання біоплівок досліджуваних збудників протягом 24 годин був у межах (0,674±0,17) Од.ОЩ. Встановлено пряму залежність чутливості штамів P.aeruginosa до декаметоксину, декасану, мірамистину, від їх біоплівкутворюючих властивостей. Чутливість клінічних штамів синьогнійної палички до хлоргексидину не залежала від їх біоплівкутворюючого потенціалу. Клінічні штами P.aeruginos володіють високими біоплівкутворюючими властивостями, зберігають чутливість до антисептичних препаратів на основі катіонних поверхнево-активних речовин. Найвищою протимікробною дією на ізоляти P.aeruginosa володіють препарати на основі декаметоксину та мірамистин. Чутливість P.aeruginosa до декаметоксину, декасану, мірамистину має прямий кореляційний зв'язок з їх біоплівкутворюючими властивостями.

Ключові слова: антисептики, біоплівки, декаметоксин, декасан, мірамистин, хлоргексидин.

ИССЛЕДОВАНИЕ ВЗАИМОСВЯЗИ БИОПЛЕНКООБРАЗУЮЩИХ СВОЙСТВ КЛИНИЧЕСКИХ ШТАММОВ P. AERUGINOSA С ИХ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬЮ К АНТИСЕПТИЧЕСКИМ ЛЕКАРСТВЕННЫМ СРЕДСТВАМ

Назарчук А. А., Фаустова М.А., Бобырь В.В., Кордон Ю.В.

Аннотация. Высокие противомикробные свойства объясняют научный интерес к изучению действия антисептиков на биопленкообразование клинически значимых возбудителей и выявления возможной зависимости между чувствительностью бактерий к ним и способностью образовывать биопленки. Целью данной работы было изучение биопленкообразующих свойств клинических штаммов P.aeruginosa в зависимости от чувствительности к различным антисептикам. От пациентов с инфекционными осложнениями различной локализации, которых лечили в ожоговом, реанимационном, хирургическом отделениях выделены и идентифицированы 30 штаммов P.aeruginosa. Исследовали биопленкообразующие свойства изолятов P.aeruginosa спектрофотометрически (по G.D. Christensen, MtP-test "microtiter plate test"). Чувствительность P.aeruginosa к антисептикам (декаметоксин, декасан, мирамистин, хлоргексидин) определяли методом последовательных серийных разведений по стандартной методике (приказ МЗ Украины №167). Статистически определяли корреляционную связь между чувствительностью клинических штаммов P.aeruginosa и их биопленкообразующими свойствами. Установлено высокую активность в отношении клинических штаммов P.aeruginosa у декасана и мирамистина, МИК которых не отличались 70,31±25,98 мкг/мл, 68,5±33,20 мкг/мл соответственно. В хлоргексидина установлено уменьшение противомикробной эффективности в отношении синегнойной палочки (МИК 115,62±59,75 мкг/мл). Доказано высокие биопленкообразующие свойства изолятов P.aeruginosa. Степень светопропускания биопленок исследуемых возбудителей в течение 24 часов была в пределах (0,674 ± 0,17) Од.ОЩ. Установлена прямая зависимость чувствительности штаммов P.aeruginosa к декаметоксину, декасану, мирамистину, от их биопленкообразующих свойств. Чувствительность клинических штаммов синегнойной палочки к хлоргексидину не зависела от их биопленкообразующего потенциала. Клинические штаммы P.aeruginosa обладают высокими биопленкообразующими свойствами, сохраняют чувствительность к катионным поверхностно-активным антисептическим препаратам. Высоким противомикробным действием на P.aeruginosa обладают препараты на основе декаметоксина и мирамистин. Чувствительность P.aeruginosa к декаметоксину, декасану, мирамистина имеет прямую корреляционную связь с их биопленкообразующими свойствами.

Ключевые слова: антисептики, биопленки, декаметоксин, декасан, мирамистин, хлоргексидин.