

Чувствительность нозокомиальных штаммов *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa*, *A. baumannii* и *P. mirabilis* к антисептику на основе хлоргексидина

Е. В. Детушева¹, В. Б. Родин¹, П. В. Слукин¹, О. Н. Ершова², И. А. Александрова²,
Н. В. Курдюмова², С. Ю. Сазыкина², И. А. Дятлов¹, Н. К. Фурсова¹

¹ФБУН «ГНЦ прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора, Оболенск, Россия

²ФГБУ «НИИ нейрохирургии им. акад. Н. Н. Бурденко» РАМН, Москва, Россия

Изучено действие антисептика «Дезин», препарата на основе хлоргексидина (ХГ), на изоляты возбудителей госпитальных инфекций дыхательной системы (ДС): мочевого выделительной системы (МС) *Klebsiella pneumoniae* ($n=8$), *Pseudomonas aeruginosa* ($n=3$), *Acinetobacter baumannii* ($n=4$) и *Proteus mirabilis* ($n=3$), выделенных в отделении нейрореанимации и интенсивной терапии (ОРИТ) г. Москвы в 2013 г., а также на референс-штаммы *K. pneumoniae* ($n=1$), *P. aeruginosa* ($n=1$), *Escherichia coli* ($n=1$) и *Staphylococcus aureus* ($n=1$). Антибактериальную активность антисептика оценивали по степени ингибирования размножения культур бактерий, находящихся в планктонной форме (микрокапля) и в форме, приближенной к протобиопленке (на целлюлозном аппликаторе). По степени чувствительности планктонных клеток к ХГ, выраженной в среднем значении минимальной бактерицидной концентрации (МБК_{ХГ}), исследуемые культуры распределились в следующем порядке в сторону

увеличения: *P. mirabilis* (0,025%), *P. aeruginosa* (0,009%), *K. pneumoniae* (0,006%), *A. baumannii* (0,006%), *E. coli* (0,005%) и *S. aureus* (0,005%). Чувствительность к ХГ ассоциаций клеток данных штаммов на аппликаторах оказалась значительно меньше: в 23 раза для *P. aeruginosa* (МБК_{ХГ} — 0,2%), в 28 раз для *A. baumannii* (МБК_{ХГ} — 0,16%), в 48 раз для *K. pneumoniae* (МБК_{ХГ} — 0,3%), в 50 раз для *P. mirabilis* (МБК_{ХГ} — 1,3%), в 128 раз для *E. coli* (МБК_{ХГ} — 0,6%) и в 255 раз для *S. aureus* (МБК_{ХГ} — 1,3%). На основе полученных данных для защиты кожи и слизистых пациентов нейрохирургического ОРИТ, в целях профилактики госпитальных инфекций ДС и МС, может быть рекомендовано использование 1,5% раствора хлоргексидина.

Ключевые слова: хлоргексидин, антисептик, нозокомиальные штаммы, устойчивость; инфекции, связанные с оказанием медицинской помощи (ИСМП), планктонные бактерии, биопленки.

Контактный адрес:
Елена Владимировна Детушева
Эл. почта: klub@bk.ru

Susceptibility of Nosocomial *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa*, *A. baumannii*, and *P. mirabilis* Strains to a Chlorhexidine-Based Antiseptic Preparation

E. V. Detusheva¹, V. B. Rodin¹, P. V. Slukin¹, O. N. Ershova², I. A. Aleksandrova²,
N. V. Kurdyumova², S. Yu. Sazykina², I. A. Dyatlov¹, N. K. Fursova¹

¹ State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology, Obolensk, Russia

² Research Institute of Neurosurgery named after N.N. Burdenko, Moscow, Russia

This study was performed to investigate activity of chlorhexidine-based antiseptic preparation «Dezin» against the following pathogens causing nosocomial respiratory tract infections (RTI) and urinary tract infections (UTI): *Klebsiella pneumoniae* ($n=8$), *Pseudomonas aeruginosa* ($n=3$), *Acinetobacter baumannii* ($n=4$) and *Proteus mirabilis* ($n=3$) isolated from patients in neurosurgery ICU in 2013, as well as reference strains of *K. pneumoniae* ($n=1$), *P. aeruginosa* ($n=1$), *Escherichia coli* ($n=1$), and *Staphylococcus aureus* ($n=1$). Antimicrobial activity of the antiseptic preparation was evaluated by microbial growth inhibition in planktonic state (microdrop) and protobiofilm-like state (cellulose patch). Distribution of tested strains by susceptibility of planktonic cells to chlorhexidine (expressed in minimal bactericidal concentration [MBC]) was the following (in order of increasing suscep-

tibility): *P. mirabilis* (0.025%), *P. aeruginosa* (0.009%), *K. pneumoniae* (0.006%), *A. baumannii* (0.006%), *E. coli* (0.005%) и *S. aureus* (0.005%). Susceptibility of biofilm-like associations (on the surface of cellulose patches) to chlorhexidine was significantly decreased: 23 times in *P. aeruginosa* (MBC – 0.2%), 28 times in *A. baumannii* (MBC – 0.16%), 48 times in *K. pneumoniae* (MBC – 0.3%), 50 times in *P. mirabilis* (MBC – 1.3%), 128 times in *E. coli* (MBC – 0.6%), and 255 times in *S. aureus* (MBC – 1.3%). Based on the results, 1.5% chlorhexidine solution may be recommended as a measure to prevent nosocomial RTIs and UTIs in neurosurgery ICU patients.

Key words: chlorhexidine, nosocomial, resistance, healthcare-associated infections, planktonic bacteria, biofilm.

Введение

Качество оказания медицинской помощи на современном этапе развития здравоохранения постоянно возрастает, увеличивается спектр диагностических и лечебно-профилактических манипуляций, внедряются новые технологии сохранения здоровья людей, но, несмотря на это, риски, связанные с возникновением нозокомиальных инфекций в организациях здравоохранения, увеличиваются. По данным ВОЗ, во всем мире в любой отдельно взятый момент свыше 1,4 млн человек страдают от инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи (ИСМП). При этом от 5 до 10% пациентов, поступающих в стационары, получают одну или большее число инфекций [1]. ИСМП представляют серьезную проблему общественного здравоохранения в силу своей распространенности, отрицательного влияния на показатели заболеваемости, смертности и степени тяжести состояния пациентов, а также опасности для медицинских работников и значительного экономического ущерба. Такие инфекции являются мировой проблемой, затрагивая все страны вне зависимости от степени их развития [2].

Краеугольным камнем сдерживания распространения ИСМП является использование дезинфицирующих и антисептических средств для деkontaminации объектов окружающей среды (помещений,

инструментария) в близком окружении пациента, а также для защиты кожных покровов и слизистых оболочек больных, уход за которыми осуществляют медицинские работники. Успех профилактики в значительной степени зависит от оптимального выбора антисептика [3]. В настоящее время в клинической практике, как правило, не проводится предварительных испытаний, связанных с определением чувствительности возбудителей ИСМП к применяемым антисептикам, а выбор препарата проводится на основании данных о природной (естественной) чувствительности выделенного или предполагаемого возбудителя, без учёта его возможной приобретённой устойчивости [4]. Ранее подобная тактика практического здравоохранения была оправданной, поскольку частота встречаемости устойчивых к антисептикам вариантов микроорганизмов была низкой. В 1980–1990 гг. положение изменилось: в научной литературе появились многочисленные публикации о выделении устойчивых к антисептикам вариантов бактерий от больных с различными нозологическими формами гнойно-септических заболеваний, а также из объектов больницы среды, в том числе — из рабочих растворов антисептиков [5–7], о снижении в ряде случаев эффективности антисептиков, вплоть до полного ее отсутствия [8, 9]. Кроме того, показано, что неу-

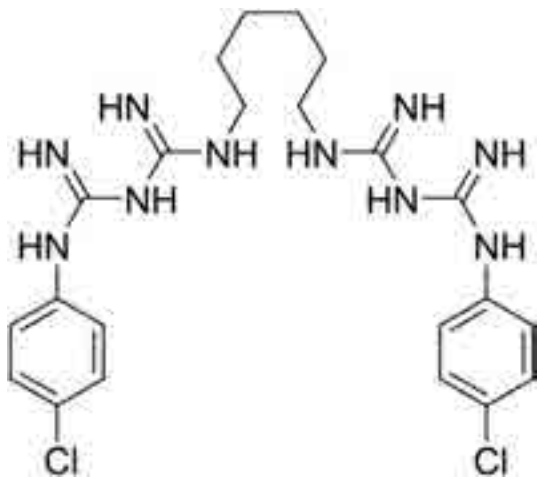


Рис. 1. Структурная формула хлоргексидина (<http://dxdy.ru/topic25394-15.html>).

дачи при использовании антисептиков для гигиены кожи и слизистых оболочек пациентов ОРИТ могут быть связаны с неадекватным тестированием активности препаратов: оценку антимикробного действия антисептиков традиционно проводят на бульонных культурах возбудителей, в то время как на практике патогены чаще всего находятся в составе биопленок — на поверхностях различных инвазивных устройств, обеспечивающих протезирование различных функций организма у критически больных пациентов — катетеров, дренажей и т. д. [10–13].

Одним из широко используемых в ОРИТ антисептиков является *хлоргексидин* (ХГ). С точки зрения химической структуры ХГ представляет собой амфипатическую молекулу с гидрофильными и гидрофобными группами, находящуюся в состоянии катиона при физиологических значениях pH. Молекула ХГ состоит из двух симметричных хлорфеноловых колец (4-хлорофенил) и двух бигуанидовых групп, объединённых в центре гидрофобной гексаметиленовой цепочкой, являясь симметричной молекулой — 1,6-ди-4-хлорофенил-дигуанидогексаном (рис. 1) [14, 15]. Как правило, ХГ используется в виде солей, главным образом — диацетата, биглюконата или дигидрохлорида [16]. Механизм антимикробного действия ХГ заключается в повышении проницаемости клеточной мембраны [17]. Он быстро адсорбируется на микробной стенке [18] благодаря наличию двух основных и симметричных групп хлорфенилгуанида, прикреплённых к липофильной цепочке гексаметилена, которые образуют бикатионную молекулу [19]. При этом происходит утечка из клетки ионов калия, фосфат-ионов и протонов; тормозятся дыхательные процессы,

изменяется осмотическая активность клеточных ферментов [20]. ХГ в низких концентрациях является бактериостатическим агентом, при удалении его из окружающей среды функции клетки восстанавливаются [17, 21]. При более высоких концентрациях ХГ является бактерицидным веществом: вызывает кристаллизацию клеточной мембраны, потерю её структурной целостности, катастрофическую потерю внутриклеточного вещества и гибель клетки [22].

Хлоргексидин является препаратом достаточно широкого спектра действия: при разных концентрациях активен против грамположительных и грамотрицательных бактерий, грибов, а также имеет некоторую активность в отношении липидных оболочек вирусов, таких как *вирус иммунодефицита человека* (ВИЧ), вирусы герпеса серотипов 1 и 2, вирус гриппа серотипа А [23, 24], но не действует на кислотоустойчивые бактерии [18, 25]. Одним из преимуществ ХГ является возможность его пролонгированного действия благодаря способности связываться с различными биологическими субстратами, а затем медленно высвобождаться в окружающую среду при сохранении антибактериальной активности. Достаточно эффективно ХГ используется в стоматологии: 0,1–0,2% раствор для обработки полости рта, 2% раствор или гель — для обработки зубных каналов перед пломбированием, несмотря на то, что 2% раствор этого препарата может вызывать раздражение кожи [26]. В то же время, использование 0,1% раствора хлоргексидина для обработки полости рта в целях профилактики нозокомиальной пневмонии у пациентов неврологических (сосудистых) отделений стационаров г. Смоленска, не выявило статистически достоверных отличий от групп сравнения в длительности госпитализации, частоте развития нозокомиальной пневмонии и уровне летальности [27]. Аналогично этому использование 0,5% раствора хлоргексидина для профилактики бактериальной колонизации трахеи у пациентов, находящихся на искусственной вентиляции легких, не позволило выявить существенных различий с группой сравнения, в которой антисептик не применялся [28].

Использование биоцидов в медицинской практике, товарах личной гигиены и потребительских товарах может оказывать влияние на формирование устойчивости микроорганизмов как к биоцидам, так и к антибиотикам, поскольку определяется общими механизмами: изменением проницаемости клеточной стенки [29], активацией эффлюксных насосов [30] и др. В ряде исследований такие факты описаны для хлоргексидина [31, 32]. Установлено, что биоцидные препараты, при их использовании

в заниженных концентрациях, индуцируют бактериальные механизмы резистентности, связанные с модификацией проницаемости клеточной стенки (порины) и с активацией эффлюксных насосов [8, 33]. Запуск названных механизмов является реакцией микроорганизмов на стрессовое воздействие биоцидных препаратов [34, 35]. Для ряда микроорганизмов (*E. coli*, *Salmonella* spp., *Staphylococcus aureus* и *Streptococcus agalactiae*) показано, что использование ХГ в сублетальных для них концентрациях (0,182, 0,177, 0,2 и 0,2 мг/л соответственно) ингибирует рост планктонных клеток, но индуцирует рост биопленок данных видов бактерий [34, 36]. При этом показатель МПК биоцида для планктонных клеток был в четыре раза ниже, чем для биопленок. С другой стороны, в ряде исследований показано, что существенных различий в МПК дезинфектантов для клеток и биопленок, культивируемых при сублетальных концентрациях ХГ, нет, поэтому использование завышенных концентраций данного антисептика нецелесообразно [34].

Целью нашего исследования явилось сравнение эффективности действия монокомпонентного антисептика «Дезин» — коммерческого препарата, содержащего ХГ в концентрации 20%, на лабораторные и клинические штаммы *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii*, *Proteus mirabilis*, *Escherichia coli* и *Staphylococcus aureus*. Клинические изоляты бактерий были выделены от пациентов отделения нейрореанимации в 2013 г. и охарактеризованы как патогены с высоким уровнем устойчивости к большинству используемых в терапии антибактериальных препаратов разных функциональных групп: бета-лактамам (цефалоспорином, карбапенемам), аминогликозидам, хинолонам, сульфаниламидам. В данной работе проведено сравнение чувствительности бактерий к ХГ в условиях, моделирующих планктонное состояние клеток (бульонная культура) и состояние протобиопленки (агаровая культура).

Материал и методы

Штаммы микроорганизмов. В работе использованы штаммы *K. pneumoniae* ($n=8$), *P. aeruginosa* ($n=4$), *A. baumannii* ($n=4$) и *P. mirabilis* ($n=3$), выделенные от пациентов отделения нейрореанимации в 2013 г. [37, 38], а также референс-штаммы, рекомендованные ФБУН «Научно-исследовательский институт дезинфектологии» Роспотребнадзора для оценки активности дезинфектантов и антисептиков [39, 40], полученные из Государственной коллекции патогенных микроорганизмов «ГКПМ-Оболенск»: *K. pneumoniae* ATCC 700603, *E. coli* ATCC 25922, *S. aureus* ATCC 25923 и *P. aeruginosa* ATCC 27853.

Питательные среды. Для культивирования микроорганизмов использовали агар и бульон Мюллера–Хинтон (Himedia, Индия) и среду ГРМ (Оболенск, Россия).

Препарат антисептика. В качестве тестируемого антисептического препарата использовали антисептик «Дезин» (ООО «Дезиндустрия», Россия), представляющий собой 20% водный раствор хлоргексидина.

Антибактериальную активность антисептика определяли тремя методами.

Метод серийных разведений в бульоне (МУК 4.2.1890–04) [39]: пробирки, содержащие 4 мл питательного бульона и двукратные разведения в диапазоне 0,00005–0,250% ХГ, засеивали 0,02 мл бактериальной культуры в концентрации 10^7 КОЕ/мл, инкубировали при температуре 37 °С. Наличие бактериального роста учитывали визуально по наличию мутности в пробирке. За *минимальную подавляющую концентрацию* (МПК) принимали минимальную концентрацию препарата, при которой рост отсутствовал через 24 ч инкубации, за *минимальную бактерицидную концентрацию* (МБК) — через 72 ч.

Метод серийных разведений на агаре (микрокаплями): на поверхность питательного агара, содержащего серийные разведения в диапазоне 0,0002–1,25% ХГ, наносили 10 мкл бактериальной суспензии в концентрации 10^7 – 10^8 КОЕ/мл. Результаты учитывали по наличию роста культуры в месте нанесения микрокапли через 24 ч (МПК) и через 72 ч (МБК) инкубирования при температуре 37 °С.

Метод аппликаторов: поверхность питательного агара, не содержащего ХГ, засеивали 0,1 мл суспензии исследуемой тест-культуры в концентрации 10^9 КОЕ/мл. Посевы культивировали при температуре 37 °С в течение 24 ч, после чего на поверхность бактериального газона накладывали при помощи стерильного пинцета стерильный целлюлозный аппликатор (7×7 мм) на 2–3 мин. Затем аппликатор с отпечатком культуры переносили стерильным пинцетом в другую чашку Петри и помещали на поверхность агара, содержащего серийные разведения (0,0002–1,25%) ХГ, в ориентации «вниз бактериальным отпечатком». Результаты учитывали по наличию роста тест-культуры на аппликаторе и вокруг него через 72 ч инкубирования при температуре 37 °С. За МБК принимали минимальную концентрацию антисептика, на которой отсутствовал рост культуры. МПК не определяли, поскольку через 24 ч культивирования на поверхности аппликатора наблюдался «инерциальный» рост тест-культуры.

Чувствительность штаммов бактерий к хлоргексидину, определенная методами серийных разведений в питательном бульоне (I), серийных разведений на агаре (II), и на аппликаторах (III)

Штамм	Год выделения	Источник выделения	Устойчивость к антибактериальным препаратам	Концентрация антисептика ХГ, %					
				I		II		III	
				МПК	МБК	МПК	МБК	МПК	МБК
<i>K. pneumoniae</i> B-1814	2013	Моча	AMC AMS CAZ CEF CEX CIP CM CPS CTA CTZ ERM FEP GEN NIT THR TOB	0,0008	0,0031	0,0063	0,0063	0,05	0,1563
<i>K. pneumoniae</i> B-1802	2013	Моча	AMC	0,0008	0,0016	0,0008	0,0008	0,05	0,1563
<i>K. pneumoniae</i> B-1739	2013	Моча	AMC AMS CAZ CEF CEX CIP CM CPS CTA CTZ ERM FEP GEN NIT THR TOB	0,0031	0,0031	0,0063	0,0063	0,05	0,1563
<i>K. pneumoniae</i> B-1759	2013	Моча	AMC AMS CAZ CEF CEX CIP CM CPS CTA CTZ ERM FEP GEN NIT TET THR TOB	0,0016	0,0063	0,0063	0,0063	0,0063	0,625
<i>K. pneumoniae</i> B-1104	2013	Эндотрахеальный аспират	AMC AMI AMS CAZ CEF CEX CIP CM CPS CTA CTZ ERM FEP GEN NIT TET THR TOB	0,0002	0,0004	0,0063	0,0063	0,0125	0,1563
<i>K. pneumoniae</i> B-335	2013	Моча	AMC AMS CAZ CEF CEX CIP CM CPS CTA CTZ ERM FEP NIT TET TGC THR	0,0004	0,0016	0,0063	0,0063	0,0125	0,3125
<i>K. pneumoniae</i> B-1224	2013	Мокрота	AMC AMI AMS CAZ CEF CEX CIP CM CPS CTA CTZ ERM FEP GEN NIT TET THR TOB	0,0002	0,0004	0,0098	0,0098	0,1563	0,625
<i>K. pneumoniae</i> B-38	2013	Моча	AMC AMS CAZ CEF CEX CIP CM CPS CTA CTZ ERM FEP NIT TET THR	0,0004	0,0016	0,0063	0,0063	0,0125	0,1563
<i>A. baumannii</i> B-1745	2013	Эндотрахеальный аспират	AMC AMI AMS CAZ CEF CEX CIP CM CPS CTA CTZ ERM FEP GEN NIT TET TGC THR TOB	0,0002	0,0016	0,0063	0,0063	0,0063	0,1563
<i>A. baumannii</i> B-1691	2013	Бронхиальный лаваж	AMC AMI AMS CAZ CEF CEX CIP CM CPS CTA CTZ ERM FEP GEN NIT THR	0,0008	0,0016	0,0031	0,0031	0,0063	0,1563
<i>A. baumannii</i> B-120	2013	Эндотрахеальный аспират	AMC AMI AMS CAZ CEF CEX CIP CM CPS CTA CTZ ERM FEP GEN NIT THR TOB	0,0004	0,0008	0,0031	0,0063	0,0063	0,1563
<i>A. baumannii</i> B-5	2013	Эндотрахеальный аспират	AMC AMI AMS CAZ CEF CEX CIP CM CTA CTZ ERM FEP GEN NIT THR TOB	0,0002	0,0016	0,0031	0,0063	0,0063	0,1563
<i>P. mirabilis</i> B-1901	2013	Эндотрахеальный аспират	AMC CEF CIP CM CPS CTA ERM IMI NIT TET TGC	0,0063	0,0063	0,0125	0,0125	0,025	>1,25
<i>P. mirabilis</i> B-123	2013	Моча	AMC AMI CAZ CEF CEX CIP CM CTA CTZ ERM FEP GEN IMI NIT TET THR TOB	0,0063	0,0125	0,0125	0,0125	0,025	>1,25

<i>P. mirabilis</i> B-318	2013	Операционная рана	AMC AMI AMS CAZ CEF CEX CIP CM CPS CTA CTZ ERM FEP GEN IMI NIT TET TGC THR TOB	0,0125	0,025	0,05	0,05	0,0125	1,25
<i>P. aeruginosa</i> B-1560	2013	Эндотрахеальный аспират	CAZ CIP CTZ ERM FEP GEN IMI IZE MER NIT PEF PIP PIT TCA TCC TET TGC THR TOB	0,0016	0,0063	0,0063	0,0063	0,0063	0,1563
<i>P. aeruginosa</i> B-431	2013	Эндотрахеальный аспират	AMI CAZ CIP CTZ ERM FEP GEN IMI IZE MER NIT PEF PIP PIT TCA TCC TET TGC THR TOB	0,0008	0,0016	0,0008	0,0031	0,0063	0,3125
<i>P. aeruginosa</i> B-2249	2013	Ликвор	AMI CAZ CIP CTZ ERM FEP GEN IMI IZE MER NIT PEF PIP TCA TCC TET TGC THR TOB	0,0008	0,0016	0,0008	0,0063	0,0031	0,025
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	1971	Кровь	ND	0,0004	0,0008	0,0195	0,0195	0,1563	0,3125
<i>K. pneumoniae</i> ATCC 700603	1994	Моча	ND	0,0016	0,0031	0,0063	0,0063	0,0125	0,3125
<i>E. coli</i> ATCC 25922	1946	Клинический изолят	ND	0,0002	0,0002	0,0049	0,0049	0,6250	0,625
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	1945	Клинический изолят	ND	0,0002	0,0002	0,0049	0,0049	0,6250	1,25

Примечание: AMC – амоксициллин/клавулановая кислота; AMI – амикацин; AMS – амоксициллин/сульбактам; CAZ – цефтазидим; CEF – цефуроксим; CEX – цефокситин; CIP – ципрофлоксацин; CM – хлорамфеникол; CTX – цефотаксим; CPS – цефоперазон/сульбактам; CPZ – цефоперазон; CTA – цефтриаксон; CTZ – ко-тримоксазол; ERM – эртапенем; FEP – цефепим; GEN – гентамицин; IMI – имипенем; IZE – изепамицин; NIT – нитрофурантоин; PEF – пefлоксацин; PIT – пиперацillin/тазобактам; PIP – пиперацillin; TET – тетрациклин; TGC – тигециклин; THR – триметоприм; TOB – тобрамицин; ND – нет данных

Результаты и обсуждение

ИСМП связаны с особенностями лечебно-диагностического процесса. В каждой группе пациентов складываются свои уникальные характеристики эпидемического процесса ИСМП. Это относится к этиологии заболеваний, их преобладающим нозологическим формам, факторам повышенного риска инфицирования. Подавляющее большинство этих инфекций (до 80%) [41, 42] имеют эндогенное происхождение, т.е. микроорганизм-возбудитель, входящий в микробное сообщество кожи, слизистых и кишечника, в результате формирования искусственных входных ворот при медицинских вмешательствах может быть перемещен в другой локус и/или во внутренние стерильные среды организма, что приводит к развитию инфекционного процесса. Наиболее часто среди возбудителей ИСМП обнаруживают микроорганизмы, способные формировать резистентность к основным классам антимикробных препаратов. Соотношение их меняется в зависимости от многих факторов, в том

числе – сезонности, возможного проникновения в экосистему новых генетических линий патогенов, горизонтального переноса факторов резистентности и т.д. В связи с этим рутинная защита кожи и слизистых критически больных пациентов является важным гигиеническим стандартом в уходе за такими пациентами и существенно снижает число случаев ИСМП.

Применение антисептических препаратов для подавления избыточного бактериального роста на коже и слизистых пациентов в ОРИТ может оказаться недостаточно эффективным по ряду причин. Важно отметить, что при разработке рекомендаций для применения антисептиков лабораторную оценку их антимикробной активности традиционно проводят, используя бульонные культуры патогенов, в то время как в реальной клинической практике эти патогены чаще всего находятся в состоянии биопленок, которые, как известно, значительно более устойчивы ко многим воздействиям.

Анализ нозокомиальных изолятов, выделенных

в отделении нейрореанимации г. Москвы в 2013 г., показывает, что доля *K. pneumoniae* в этиологической структуре заболеваемости ДС и МС составляет около 17 и 45% соответственно; они проявляют устойчивость ко многим из применяемых для лечения пациентов *антимикробным препаратам* (АМП), в том числе к цефалоспоринам (100% изолятов), цефоперазону/сульбактаму (75%), карбапенемам (56%), тигециклину (14%), аминогликозидам (64%), сульфаниламидам (81%), фторхинолонам (89%), нитрофуранам (96%).

A. baumannii также является актуальным этиологическим агентом инфекций ДС и МС у пациентов отделения нейрореанимации (до 20 и до 5% от общего количества изолятов соответственно) и демонстрирует высокий уровень устойчивости к применяемым АМП: цефалоспоринам (100% изолятов), цефоперазону/сульбактаму (75%), карбапенемам (100%), тигециклину (3%), аминогликозидам (98%), сульфаниламидам (93%), фторхинолонам (100%) и нитрофуранам (100%).

P. aeruginosa как этиологический агент инфекций ДС и МС (до 10 и 11% от общего количества изолятов соответственно) характеризуется устойчивостью к цефалоспоринам (75% изолятов), защищенным цефалоспоринам (50%), карбапенемам (100%), аминогликозидам (75%), сульфаниламидам (100%) и фторхинолонам (75%).

Клинические изоляты *P. mirabilis*, выделенные от больных с инфекциями ДС и МС (до 4 и 17% от общего количества изолятов соответственно), также являются высокорезистентными к цефалоспоринам (90% изолятов), карбапенемам (100%), тигециклину (84%), аминогликозидам (62%), сульфаниламидам (71%), фторхинолонам (75%) и нитрофуранам (100%).

На первом этапе работы была проведена предварительная оценка диапазонов $МПК_{ХГ}$ и $МБК_{ХГ}$ для исследуемых культур методом серийных разведений в питательном бульоне. По степени чувствительности (в сторону увеличения) к препарату антисептика исследуемые культуры распределились в следующем порядке: *P. mirabilis*, *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae*, *A. baumannii*, *E. coli* и *S. aureus* (таблица).

На следующем этапе антибактериальную активность ХГ оценивали по степени подавления размножения тест-культур бактерий в планктонной форме (в микрокапле) и в форме, приближенной к протобиопленке (на аппликаторе). Проведенные эксперименты показали, что $МБК_{ХГ}$ для клинических изолятов *K. pneumoniae* в планктонной форме составила в среднем 0,006%, а на поверхности аппликатора — 0,3%. Соответствующие показатели

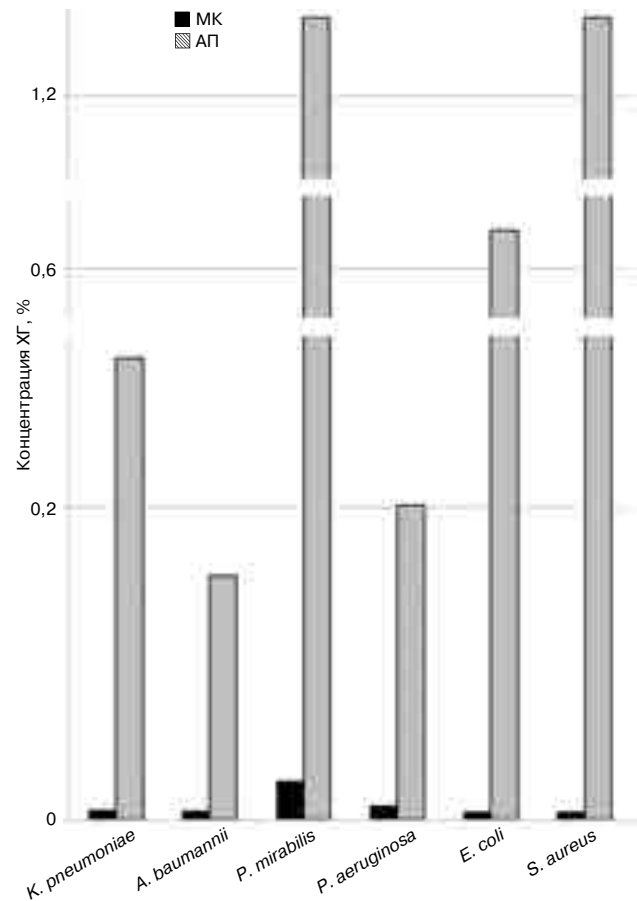


Рис. 2. МБК хлоргексидина для планктонных клеток в микрокапле (МК) и клеток в составе протобиопленки на аппликаторе (АП)

для изолятов *A. baumannii* составили 0,006 и 0,16%; для *P. aeruginosa* — 0,009 и 0,2%; для *P. mirabilis* — 0,03 и более 1,25%. Значения $МБК_{ХГ}$ для референс-штаммов составили: для *P. aeruginosa* ATCC 27853 — 0,02 и 0,3%, для *K. pneumoniae* ATCC 700603 — 0,006 и 0,3%, для *E. coli* ATCC 25922 — 0,005 и 0,6%, для *S. aureus* ATCC 25923 — 0,005 и 1,3% (см. таблицу). Средние значения $МБК_{ХГ}$ для ассоциаций клеток, иммобилизованных на аппликаторах, значительно выше, чем таковые для планктонных клеток *P. aeruginosa* (в 23 раза), *A. baumannii* (в 28 раз), *K. pneumoniae* (в 48 раз), *P. mirabilis* (в 50 раз), *E. coli* (в 128 раз) и *S. aureus* (в 255 раз) (рис. 2).

Стоит отметить, что при использовании метода аппликаторов при низких концентрациях ХГ в питательном агаре (0,0002–0,0004%) наблюдали рост бактериальной тест-культуры не только на поверхности аппликатора, но и вокруг него (рис. 3), а при высоких концентрациях — только на поверхности аппликатора. Последнее, на наш взгляд, может быть объяснено наличием «инерционного» роста

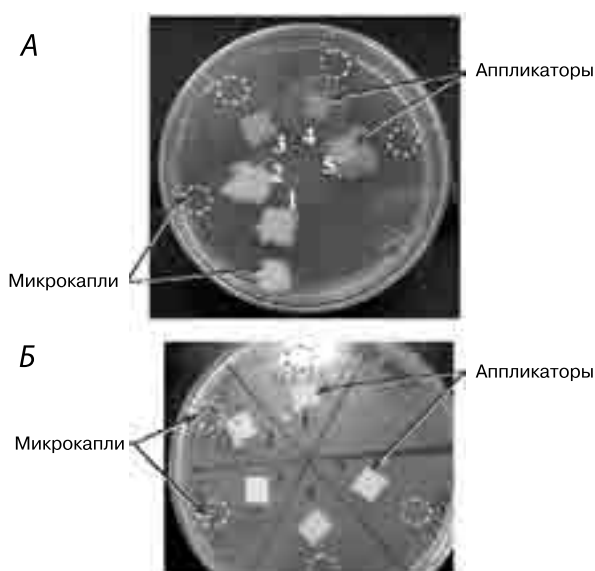


Рис. 3. А — характер роста культур *K. pneumoniae* ATCC 700603 (1), *K. pneumoniae* 1224 (2), *S. aureus* 906 (3), *P. aeruginosa* ATCC 27853 (4), *E. coli* ATCC 25922 (5) на питательной среде Мюллера–Хинтон, содержащей 0,02% ХГ, на аппликаторах и в микрокаплях; Б — отсутствие роста тех же культур на питательной среде Мюллера–Хинтон, содержащей 1,0% ХГ.

тест-культуры вследствие замедленной диффузии препарата через аппликатор с отпечатком культуры. К моменту учета МБК (72 ч культивирования) «инерционный» рост прекращался и культура погибала, что подтверждалось отсутствием роста культуры при пересеве клеток с поверхности аппликатора на питательную среду, не содержащую ХГ.

Таким образом, планктонные клетки нозокомиальных штаммов *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa*, *A. baumannii* и *P. mirabilis* оказались существенно чувствительнее к ХГ, чем бактериальные клетки в форме, приближенной к протобиопленке (иммобилизованные на аппликаторе). Увеличение резистентности к ХГ у бактерий, иммобилизованных на аппликаторе, по нашему мнению, может быть объяснено влиянием факторов, описанных в литературе для бактериальных биопленок: наличием защитного полисахаридного матрикса вокруг скопления клеток, значительными изменениями в экспрессии генов и метаболической активности [43–45] с последующим существенным повышением «выживаемости» бактерий и их устойчивости к антибактериальным препаратам [2, 43], переходом части клеток

в персистентное состояние [13], свойственное для хронических форм инфекции [44] и т. п.

Полученные нами данные по разной степени чувствительности к ХГ у планктонных клеток бактерий и клеток в составе биопленки позволяют объяснить причину неэффективности клинического использования 0,1% и 0,5% растворов хлоргексидина в ряде исследований [27, 28]. Таким образом, представляется целесообразным использование более высоких концентраций данного антисептика, а именно 1,5% раствора.

Заключение

Изучена чувствительность к антисептику хлоргексидину у нозокомиальных изолятов актуальных в настоящее время бактериальных патогенов ($n=18$) и референс-штаммов ($n=4$). В работе использованы бактериальные изоляты, выделенные в отделении нейрореанимации г. Москвы в 2013 г. и охарактеризованные с точки зрения устойчивости к широкому кругу антибактериальных препаратов. По степени чувствительности планктонных клеток исследуемых культур к препарату ХГ, выраженной в среднем значении МБК_{ХГ}, распределились в следующем порядке в сторону увеличения: *P. mirabilis* (0,025%), *P. aeruginosa* (0,009%), *K. pneumoniae* (0,006%), *A. baumannii* (0,006%), *E. coli* (0,005%) и *S. aureus* (0,005%). Устойчивость к ХГ клеток данных штаммов, иммобилизованных на аппликаторах, оказалась значительно выше: в 23 раза для *P. aeruginosa* (0,2%), в 28 раз для *A. baumannii* (0,16%), в 48 раз для *K. pneumoniae* (0,3%), в 50 раз для *P. mirabilis* (1,3%), в 128 раз для *E. coli* (0,6%) и в 255 раз для *S. aureus* (1,3%).

На основе полученных данных, для защиты кожи и слизистых пациентов отделения нейрореанимации от избыточной бактериальной колонизации, в целях профилактики инфекций ДС и МС, может быть рекомендовано использование 1,5% раствора хлоргексидина.

Финансирование работ. Данное исследование выполнено в рамках отраслевой научно-исследовательской программы «Научные исследования и разработки с целью обеспечения санитарно-эпидемиологического благополучия и снижения инфекционной заболеваемости в Российской Федерации» (на 2011–2015 гг.), утвержденной руководителем Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека 21 декабря 2010 г.

Литература

1. Программа ВОЗ по обеспечению безопасности пациентов. Всемирный альянс за безопасность пациентов. Глобальная задача по обеспечению безопасности пациентов. Чистая помощь — безопасная помощь. ВОЗ, Женева, 2006.
2. Основные компоненты для программ профилактики инфекций и инфекционного контроля. Второе совещание неформальной сети по профилактике инфекций и инфекционному контролю в здравоохранении. Женева, Швейцария, 26-27 июня 2008 г.
3. Гудкова Е. И., Адарченко А. А., Ласточкина Т. М., Симоненко Л. И., Слабко И. Н. Чувствительность к новым дезинфектантам клинических штаммов микробов, методы определения. Материалы юбилейной научной конференции, посвященной 80-летию Башкирского Государственного Медицинского Университета «Актуальные проблемы современной медицины» Под ред. С. Л. Кабака. Минск БГМУ 2001; 1:89-91.
4. The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 4.0; 2014; <http://www.eucast.org>
5. Gajadhar T., Lara A., Sealy P., Adesiyun A. A. Microbial contamination of disinfectants and antiseptics in four major hospitals in Trinidad. *Rev Panam Salud Publica* 2003; 14(3):193-200.
6. O'Rourke E., Runyan D., O'Leary J. Contaminated iodophor in the operating room. *Am J Infect Control* 2003; 31:255-6.
7. Weber D. J., Rutala W. A., Sickbert-Bennett E. E. Outbreaks associated with contaminated antiseptics and disinfectants. *Antimicrob Agents Chemother* 2007; 51(12):4217-24.
8. Красильников А. П. Справочник по антисептике. Минск: Высш. шк. 1995.
9. Weuffen W. *Handbuch der Antiseptik*. In 3 Bd; Berlin: Veb. Verlag Volk und Gesundheit 1984-1987.
10. Aparna M. S., Yadav S. Biofilms: microbes and disease. *Braz J Infect Dis* 2008; 12(6):526-30.
11. Costerton J. W., Stewart P. S., Greenberg E. P. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science* 1999; 284(5418):1318-22.
12. Krzyściak W., Jurczak A., Kościelniak D., Bystrowska B, Skalniak A. The virulence of *Streptococcus mutans* and the ability to form biofilms. *Clin Microbiol Infect Dis* 2014; 33(4):499-515.
13. Patel R. Biofilms and antimicrobial resistance. *Clin Orthop Relat Res* 2005; (437):41-7.
14. Al-Tannir M. A., Goodman H. S. A review of chlorhexidine and its use in special populations. *Special Care in Dentistry* 1994; 14:116-22.
15. Gilbert P., Moore L. E. Cationic antiseptics: diversity of action under a common epithet. *J App Microbiol* 2005; 99:703-15.
16. Ruppert M., Schlagenhauf U. La clorhexidina en Odontología. Aspectos generales. *Quintessence (Ed. Española)* 2005; 18:12-23.
17. Hugo W. B. Disinfection mechanisms. In: Russell A. D., Hugo W. B., Ayliffe G. A. J., eds. *Principles and Practice of Disinfection, Preservation and Sterilization*. Oxford: Blackwell 1992:187-210.
18. Albertos J. M., Junquera L. M., Albertos M. T., Olay S., López-Arranz E. La clorhexidina. Perspectiva actual. *En Odontostomatología* 1996; 5:217-23.
19. Musteata F. M., Pawliszyn J. Assay of stability, free and total concentration of chlorhexidine in saliva by solid phase microextraction. *J Pharm Biomedical Analysis* 2005; 37:1015-24.
20. Hugo W. B., Longworth A. R. The effect of chlorhexidine on the electrophoretic mobility, cytoplasmic constituents, dehydrogenase activity and cell walls of *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. *J Pharma Pharmacol* 1966; 18:569-78.
21. Fardal O., Turnbull R. S. A review of the literature on use of chlorhexidine in dentistry. *J American Dental Association* 1986; 112:863-9.
22. Longworth A. R. Chlorhexidine. In: Hugo W. B., ed. *Inhibition and destruction of the bacterial cell*. New York, N.Y.: Academic Press 1971:95-106.
23. Arévalo J. M., Arribas J. L., Calbo L., Hernández M. J., Lizán M., Herruzco R. Guía del grupo de trabajo sobre desinfectantes y antisépticos. Revisión 1998. *Medicina Preventiva* 1998; 4:38-43.
24. Bernimoulin J. P. Recent concepts in plaque formation. *J Clin Periodontology* 2003; 30:7-9.
25. Junco-Lafuente M. P., Baca-García P., Mesa-Aguado F. L. Utilización de la clorhexidina en la prevención oral de pacientes de la tercera edad. *Revista del Ilustre Consejo General de Colegios de Odontólogos y Estomatólogos de España* 2001; 6:81-9.
26. Rahimi S., Janani M., Lotfi M., et al. A review of antibacterial agents in endodontic treatment. *Iran Endod J.* 2014; 9(3):161-8.
27. Зверьков А. В., Зузова А. П. Актуальность обработки полости рта 0,1% раствором хлоргексидина и очищенной водой для профилактики нозокомиальной пневмонии у больных с острым нарушением мозгового кровообращения. Тезисы XVI Международного конгресса МАКМАХ по антимикробной терапии; 21-23 мая 2014 г.; Москва, Россия. *КМАХ* 2014; 16(2):20.
28. Bosca I. D., Berar C., Anton F. et al. The impact of 0.5% chlorhexidine oral decontamination on the prevalence of colonization and respiratory tract infection in mechanically ventilated patients. Preliminary study. *Pneumologia* 2013; 62(4):217-22.
29. Tattawasart U., Maillard J. Y., Furr J. R., Russell A. D. Development of resistance to chlorhexidine diacetate and cetylpyridinium chloride in *Pseudomonas stutzeri* and changes in antibiotic susceptibility. *J Hosp. Infect.* 1999 Jul; 42(3):219-29.
30. Randall L. P., Cooles S. W., Coldham N. G., et al. Commonly used farm disinfectants can select for mutant *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium* with decreased susceptibility to biocides and antibiotics without compromising virulence. *J Antimicrob Chemother* 2007; 60:1273-80.

31. Russell A. D., Tattawasart U., Maillard J.-Y., Furr J. R. Possible link between bacterial resistance and use of antibiotics and biocides. *Antimicrob Agents Chemother*, 1998; 42:2151.
32. Kõljalg S., Naaber P., Mikelsaar M. Antibiotic resistance as an indicator of bacterial chlorhexidine susceptibility. *J Hosp Infect* 2002; 51:106-13.
33. Mah T. F., O'Toole G. A. Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents. *Trends Microbiol* 2001; 9 (1):34-9.
34. Ebrahimi A., Hemati M., Habibian D. S. et al. Chlorhexidine digluconate effects on planktonic growth and biofilm formation in some field isolates of animal bacterial pathogens. *Jundishapur J Nat Pharm Prod* 2014; 9(2):e14298.
35. Wright N. E., Gilbert P. Influence of specific growth rate and nutrient limitation upon the sensitivity of *Escherichia coli* towards chlorhexidine diacetate. *J Appl Bacteriol* 1987; 62(4):309-14.
36. Houari A., Di Martino P. Effect of chlorhexidine and benzalkonium chloride on bacterial biofilm formation. *Lett Appl Microbiol* 2007; 45(6):652-6.
37. Асташкин Е. И., Карцев Н. Н., Пачкунов Д. М. и соавт. Характеристика клинических штаммов *Acinetobacter baumannii*. Тезисы XV Международного конгресса МАКМАХ по антимикробной терапии 22-24 мая 2013 г., Москва, Россия. КМАХ 2013; 15(2):46.
38. Карцев Н. Н., Асташкин Е. И., Пачкунов Д. М. и соавт. Экстремально лекарственно-устойчивые клинические изоляты *Klebsiella pneumoniae* и *Proteus mirabilis*. Тезисы XV Международного конгресса МАКМАХ по антимикробной терапии 22-24 мая 2013 г.; Москва, Россия. КМАХ 2013; 15(2):46.
39. Методические указания МУК 4.2.1890-04 от 4.03.2014 г. «Определение чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препаратам» (утв. Главным государственным санитарным врачом РФ 4 марта 2004 г.)
40. Руководство 4.2.2643-10. 3.5. Дезинфектология. Методы лабораторных исследований и испытаний дезинфекционных средств для оценки их эффективности и безопасности; утв. Роспотребнадзором 01.06.2010 г.
41. Kerver A. J. H., Rommes J. H., Mevissen-Verhage E. A. E., et al. Colonization and infection in surgical intensive care patients: a prospective study. *Intensive Care Med* 1987; 13:347-51.
42. Gastmeier P., Sohr D., Geffers C., Behnke M., Rüden H. Risk factors for death due to nosocomial infection in intensive care unit patients: findings from the Krankenhaus Infektions Surveillance System. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2007; 28(4):466-72.
43. Dukan S., Touati D. Hypochlorous acid stress in *Escherichia coli*: resistance, DNA damage, and comparison with hydrogen peroxide stress. *J Bacteriol* 1996; 178:6145-50.
44. Greenway D. L. A., England R. R. The intrinsic resistance of *Escherichia coli* to various antimicrobial agents requires ppGpp and σ^S . *Lett Appl Microbiol* 1999; 29:323-6.
45. Nøiby N., Bjarnsholt T., Givskov M., Molin S., Ciofu O. Antibiotic resistance of bacterial biofilms. *Int J Antimicrob Agents* 2010; 35(4):322-32.