

ДЕЙСТВИЕ ДЕЗИНФЕКТАНТОВ НА УЛЬТРАСТРУКТУРУ БАКТЕРИАЛЬНОЙ КЛЕТКИ

Турцевич Д.В., Секержицкая Е.А., Гаврилова И.А.

*Белорусский государственный медицинский университет,
кафедра микробиологии, вирусологии, иммунологии, г. Минск*

Ключевые слова: синегнойная палочка, дезинфектант, электронная микроскопия.

Резюме: *методом трансмиссионной электронной микроскопии изучена ультраструктура бактериальных клеток Pseudomonas aeruginosa после воздействия рекомендованных и субоптимальных концентраций полигескаметилenguанидина. Дана ультрамикроскопическая характеристика клеточной стенки, цитоплазматической мембраны, включений в цитоплазме, состояния нуклеоида.*

Resume: *the ultrastructure of Pseudomonas aeruginosa cells was studied with transmission electron microscopy using ultrathin slices when exposed to the guideline concentration and suboptimal concentrations of polyhexamethyleneguanidine. Ultramicroscopic characteristics of cell walls, cell membranes, cytoplasmic granules and bacterial nucleoids were obtained.*

Актуальность. На протяжении ряда десятилетий проблема нозокомиальных инфекций сохраняет актуальность для лечебных учреждений всех государств. Значимость указанной проблемы обусловлена как наличием медицинской составляющей (повсеместная заболеваемость, повышение уровней летальности), так и причинением социально-экономического ущерба (увеличение сроков пребывания в стационаре, повторные курсы противомикробной терапии), что делает её одной из приоритетных проблем системы здравоохранения [1,2].

С позиций эпидемиологии, любое учреждение здравоохранения, применительно к нозокомиальным инфекциям, следует рассматривать как потенциальный инфекционный очаг, в котором присутствуют все три компонента эпидемического процесса – источник инфекции (пациенты, персонал, посетители, внешняя среда), восприимчивый организм (пациенты, персонал) и факторы передачи потенциального патогена (оборудование, инструментарий и другие объекты внешней среды) [3]. Дезинфекционные мероприятия, направленные на разрыв путей передачи возбудителей инфекционного процесса во внешней среде, являются наиболее действенным и общедоступным способом предупреждения возникновения и распространения инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи [4].

Повсеместное использование химических веществ с биоцидной активностью привело к возникновению и широкому распространению вариантов бактерий с резистентностью к дезинфицирующим средствам (ДС). Это явление исследователи связывают как с применением неэффективного дезинфектанта, так и с систематическим воздействием биоцида в заниженных (суббактерицидных) концентрациях [5]. Вызывают тревогу и появляющиеся научные сообщения о возможном возникновении перекрестной устойчивости к антибиотикам и дезинфектантам [6].

К теоретическим вопросам изучения устойчивости бактерий к дезинфицирующим препаратам добавляется ряд проблем методологического характера. Существующие в настоящее время фенотипические методы определения чувствительности-устойчивости бактерий к дезинфектантам лишь констатируют факт повышенной устойчивости бактерий к биоциду, применяемому в концентрации рекомендуемой производителем. Они не дают представления об изменениях бактерий под воздействием дезинфектанта, о механизмах и закономерностях формирования устойчивости. В связи с этим, представляет интерес разработка критериев оценки жизнеспособности бактерий и получение новых данных о структурно-функциональных изменениях бактериальных клеток под воздействием различных концентраций ДС с помощью ультрамикроскопических методов исследования [7].

Выбранный в качестве объекта исследования микроорганизм *P. Aeruginosa* является одним из доминирующих патогенов в этиологической структуре внутрибольничных пневмоний, катетер-ассоциированных уроинфекций и инфекций кровотока [8]. В условиях стационара синегнойная палочка контаминирует медицинский инструментарий и оборудование, систему водопровода, вентиляции и кондиционирования, места для обработки рук хирурга, мыло, антисептические и дезинфицирующие растворы. [9].

Цель данного исследования – оценить выживаемость и изучить изменения ультраструктуры *Pseudomonas aeruginosa* после воздействия различных концентраций дезинфектанта на основе полигексаметиленгуанидина.

Задачи: 1. Оценить выживаемость синегнойной палочки после воздействия рабочей и суббиоцидных концентраций дезинфектанта; 2. Изучить ультраструктуру синегнойной палочки после воздействия различных концентраций дезинфектанта.

Материалы и методы. Методом просвечивающей электронной микроскопии изучены изменения ультраструктуры типовой культуры синегнойной палочки при воздействии различных концентраций дезинфектанта на основе полигексаметилен-

гуанидина; проведен подсчет количества выживших бактерий при воздействии суббиоцидных концентраций.

Постановка эксперимента

На суточную культуру тест-микроорганизма воздействовали дезинфектантом в рабочей и суббиоцидных концентрациях. Контрольный образец ресуспензировали в том же объеме стерильной водопроводной воды. Бактерии многократно отмывали в стерильной дистиллированной воде и физиологическом растворе (0,85% NaCl) с последующим осаждением клеток центрифугированием. Готовили препараты бактерий для электронной микроскопии.

Микроорганизмы

Типовая культура *Pseudomonasaeruginosa* ATCC 15412 (штамм депонирован в коллекции лаборатории внутрибольничных инфекций Научно-исследовательской части УО «Белорусский государственный медицинский университет»).

Дезинфектанты

Активно действующее вещество используемого в исследовании дезинфектанта – полигексаметиленгуанидин хлорид. Рабочий режим для достижения бактерицидного эффекта в соответствии с инструкцией производителя – применение 1% раствора дезинфектанта, экспозиция 30 мин.

Готовили рабочую концентрацию и её двукратные разведения ($1/2 - 1/4 - 1/8 - 1/16$) на стерильной водопроводной воде (суббиоцидные концентрации).

Оценка выживаемости бактерий

По истечении экспозиции нейтрализовали биоцид комплексным органическим нейтрализатором и проводили высев из раствора нейтрализатора на мясо-пептонный агар. Посевы инкубировали в термостате при 37°C 18 – 24 часа. На следующие сутки регистрировали наличие/отсутствие роста и подсчитывали количество выживших микроорганизмов по формуле [$n = \text{количество колоний} \times \text{степень разведения материала} \times \text{посевная доза}$]; результат выражали в десятичных логарифмах.

Изучение ультраструктуры бактерий

Ультратонкие срезы бактерий просматривали в трансмиссионном электронном микроскопе JEM-1011 (Jeol, Япония). Изображения получены и проанализированы с помощью программы для анализа изображений – iTEM (Olympus, Германия). Трансмиссионная электронная микроскопия проведена на базе лаборатории диагностики сочетанных бактериально-вирусных инфекций ГУ «РНПЦ эпидемиологии и микробиологии».

Результаты и обсуждение. При оценке выживаемости тест-культуры установлено, что после воздействия опытных разведений $1/8$ и $1/16$ применяемого в исследовании дезинфектанта отдельные клетки синегнойной палочки сохраняют жизнеспособность и способность к культивированию. При этом количество выживших клеток было обратно пропорционально концентрации дезинфектанта. На рисунке 1 представлена диаграмма, в которой отражено количество выживших бактерий после воздействия различных концентраций дезинфектанта и без обработки дезинфектантом.

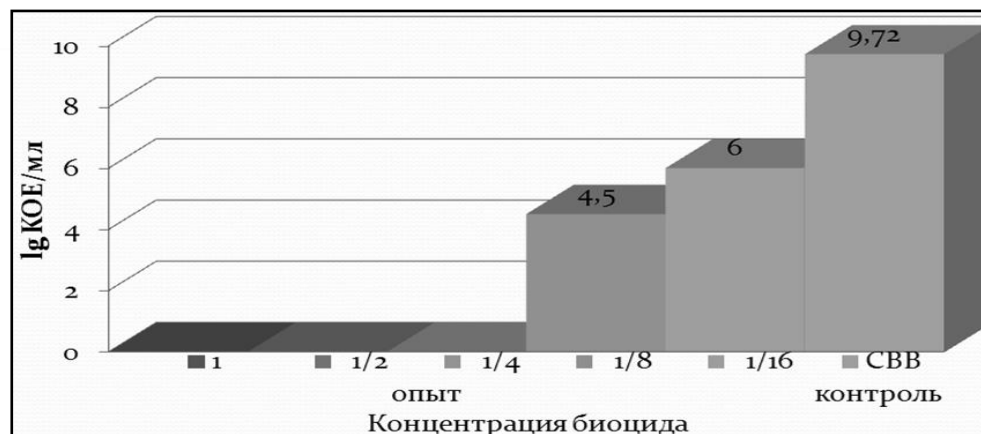


Рис. 1 - Выживаемость бактерий при воздействии различных концентраций дезинфектантов в контрольном и опытных образцах

При действии суббиоцидных концентраций можно выявить критическую и субкритическую степень действия дезинфектанта на бактериальную клетку (рисунок 2). Критическое действие биоцида характеризуется полной деструкцией генетического аппарата и, как следствие, утратой бактерией жизнеспособности (в эксперименте – при действии ДС в рабочей концентрации и разведениях $1/2$ и $1/4$). При субкритическом воздействии наблюдается частичное разрушение или сохранение нуклеоида и сохранение функциональной активности клеточной стенки (концентрации $1/8$ и $1/16$).

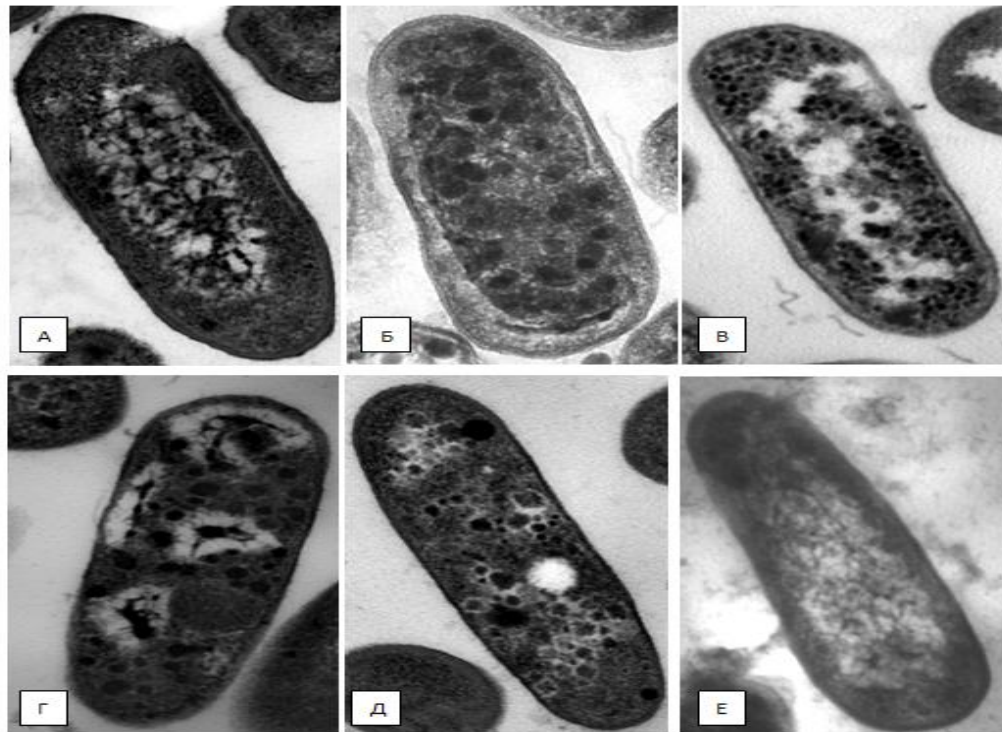


Рис. 2. - Ультратонкие срезы бактерий *Pseudomonasaeruginosa* в контрольном (А) и опытных образцах (Б-Е)

В таблице 1 приведены морфологические изменения ультраструктуры синегнойной палочки при действии на неё гуанидинсодержащего дезинфектанта.

Таблица 1 - Ультраструктура синегнойной палочки при воздействии различных концентраций дезинфектанта

<p>Контроль – Без воздействия дезинфектанта Ультраструктура поверхностных образований <i>Pseudomonas aeruginosa</i> соответствует типичной структуре клеточной стенки грамотрицательной бактерии. Клеточная стенка состоит из наружной мембраны и периплазматического пространства со слоем пептидогликана. Видимого повреждения клеточной стенки и цитоплазматической мембраны не выявлено. Область нуклеоида диспергирована. Определяются фибриллы хроматина. По периферии клетки цитоплазма равномерно насыщена рибосомами. (Рисунок 2А)</p>	<p>Воздействие рабочей концентрации ДС Тотальное разрушение клетки. Может наблюдаться разрыв клеточной стенки с истечением клеточного содержимого. Глубокие морфологические изменения со стороны всех компонентов клетки. Клеточная стенка отслоена от цитоплазматической мембраны, образовавшаяся полость заполнена аморфной массой. Вещество протопласта собрано в единый сгусток. Фиксация в клетке большого количества контрастирующего вещества за счет образования пор в клеточной стенке и мембране. Нуклеоид не определяется. (Рисунок 2Б)</p>	<p>Разведение 1/2 Периплазматическое пространство, как правило, неравномерно расширено. Частичное разрежение цитоплазмы, краситель фиксирован в клетке в виде мелких капель равномерно по периферии. Определяются единичные поры. Область нуклеоида разрежена. (Рисунок 2В)</p>
<p>Разведение 1/4 Поверхностные образования сохранены, у части клеток определяется внеклеточный полисахарид. Количество красителя в теле бактерии меньше, чем при более высоких концентрациях, он располагается неравномерно. У части бактерий определяется нуклеоид в виде дезорганизованной сети фибрилл. Частичная деструкция рибосом. (Рисунок 2Г)</p>	<p>Разведение 1/8 Поверхностные образования сохранены. Цитоплазма может быть собрана в отдельные мелкие сгустки, рибосомальный аппарат сохранен. Нуклеопротеидные нити сохранены у большинства клеток. (Рисунок 2Д)</p>	<p>Разведение 1/16 У части клеток не выявлено видимых изменений ультраструктуры. Может наблюдаться утолщение клеточной стенки. (Рисунок 2Е)</p>

Выводы: 1. Установлено, что при воздействии сублетальных концентраций дезинфицирующих средств, часть клеток бактериальной популяции сохраняет способность к росту и размножению на питательных средах; 2 При действии суббицидных концентраций можно выявить критическую (полная деструкция генетического аппарата) и субкритическую степень действия дезинфектанта (частичное/полное сохранение нуклеоида с возможной репарацией генома).

Литература

1. Гудкова Е.И. Проблема внутрибольничных инфекций в Республике Беларусь: основные направления, перспективы борьбы и профилактики / Е. И. Гудкова, А. А. Адарченко, Г. Н. Чистенко и др. // Белорусский медицинский журнал. – 2005. – N 2. – С. 4-7.

2. Richards M.J., Edwards J.R., Culver D.H. et al. Nosocomial infections in combined medical-surgical intensive care units in the United States. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2000; 21 (8): 510-515.

3. Канищев В.В. Эффективность дезсредств в отношении различных болезнетворных микроорганизмов и гарантия ее для практики процессам регистрационных и сертификационных испытаний // Актуальные вопросы теории и практики дезинфектологии: материалы Всерос. науч.-практ. конф., посвящ. 75-летию Научно-исследовательского института дезинфектологии Роспотребнадзора, М., 22-23 мая 2008 г. – М., 2008. – С.123-126.

4. Семина Н.А. Значение дезинфекции и стерилизации в профилактике внутрибольничных инфекций / Н.А. Семина, Г.П. Ковалева, В.В. Галкин // Дезинфекционное дело. – 2002. – №3. – С. 29-31

5. Шкарин В.В. Формирование устойчивости бактерий к четвертичным аммониевым соединениям в экспериментальных условиях / Шкарин В.В., Ковалишена О.В., Благоднарова А.С., Воробьева О.Н., Алексеева И.Г., Яковлева Е.И., Бугрова М.Л. // Медицинский альманах. 2012. №3(22). С. 129 – 133.

6. Russell A.D. Biocides and pharmacologically active drugs as residues and in the environment: is there a correlation with antibiotic resistance? //Am J Infect Control 2002; 30 (8): 495-8.

7. Афиногенов Г.Е., Доморад А.А., Краснова М.В. Оценка методов изучения эффективности дезинфектантов и антисептиков // Актуальные проблемы дезинфектологии в профилактике инфекционных и паразитарных заболеваний: материалы Всерос. науч. конф., посвящ. 100-летию со дня рождения В.И.Вашкова. – М.: ИТАР-ТАСС, 2002. – С.104-105.

8. Hidron Alicia I. Antimicrobial-Resistant Pathogens Associated With Healthcare-Associated Infections: Annual Summary of Data Reported to the National Healthcare Safety Network at the Centers for Disease Control and Prevention, 2006–2007 / Alicia I. Hidron, MD; Jonathan R. Edwards, MS; Jean Patel, PhD et al. // Infection control and hospital epidemiology. – 2008 – vol. 29, no. 11. – P. 996-1011.

9. Bertrand X, Thouverez M, Talon D, et al. Endemicity, molecular diversity and colonisation routes of *Pseudomonas aeruginosa* in intensive care units. Intensive Care Med 2001; 27(8):1263–1268.