

Чувствительность к антисептикам биоплёночных форм *Staphylococcus aureus* и *Pseudomonas aeruginosa*, выделенных из ожоговых ран

Андреева С.В.¹, Бахарева Л.И.^{1,2}, Нохрин Д.Ю.¹, Титова М.В.¹, Хайдаршина Н.Э.¹, Бурмистрова А.Л.¹

¹ ФГБОУ ВО «Челябинский государственный университет», Челябинск, Россия

² МБУЗ «Городская клиническая больница № 6», Челябинск, Россия

Контактный адрес:

Светлана Владимировна Андреева
Эл. почта: andreeva_sv81@mail.ru

Ключевые слова: *S. aureus*, *P. aeruginosa*, ожоговые раны, биоплёнки, антисептики, резистентность.

В статье представлены данные по чувствительности к антисептикам антибиотикорезистентных изолятов *S. aureus* и *P. aeruginosa*, выделенных из ожоговых ран, клетки которых находились в составе одновидовых и двухвидовых биоплёнок различной степени (24- и 48-часовой) зрелости. Исследования показали, что *S. aureus* и *P. aeruginosa* в составе одновидовых и двухвидовых биоплёнок были чувствительны к препаратам «Пронтосан», «Бетадин» и «Хлорофиллипт» и устойчивы к препаратам «Мирамистин» и «Хлоргексидин». Бактерицидный эффект у всех исследованных антисептиков достигался при концентрациях, в 1,64 раза превышавших таковые, при которых наблюдался бактериостатический эффект. По мере созревания биоплёнки отмечалось двукратное увеличение резистентности к антисептикам входящих в ее состав бактерий.

Susceptibility to antiseptic preparations in biofilm-forming *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* isolated from burn wounds

Andreeva S.V.¹, Bakhareva L.I.^{1,2}, Nokhrin D.Yu.¹, Titova M.V.¹, Khaidarshina N.E.¹, Burmistrova A.L.¹

¹ Chelyabinsk State University, Chelyabinsk, Russia

² City Clinical Hospital #6, Chelyabinsk, Russia

Contacts:

Svetlana V. Andreeva
E-mail: andreeva_sv81@mail.ru

Key words: *S. aureus*, *P. aeruginosa*, burn wounds, biofilm, antiseptic, resistance.

The article presents data on susceptibility to antiseptic preparations in antibiotic-resistant *S. aureus* and *P. aeruginosa* strains isolated from burn wounds, which were tested in single-species and double-species biofilms with varying degrees (24-hour and 48-hour) of maturity. The studies demonstrated susceptibility of *S. aureus* and *P. aeruginosa* in single- and double-species biofilms to "Prontosan", "Betadine" and "Chlorophyllipt" and resistance to "Miramistin" and "Chlorhexidine". The bactericidal effect was achieved at concentrations 1.64 times higher than bacteriostatic concentrations for all the antiseptics tested. A double increase in antiseptic resistance level was observed over biofilm maturation process.

Введение

Микроорганизмы в природе обитают в двух основных формах: планктонной, подразумевающей свободное передвижение отдельных клеток микроорганизмов в среде, и биоплёночной. Планктонный фенотип бактерий встречается лишь транзиторно и необходим для распространения и освоения новых территорий, в то время как большинство микроорганизмов в естественных и искусственно созданных средах существуют в виде биоплёнок – сообществ клеток, окруженных экзополисахаридным матриксом и функционирующих как пространственно-временной орган, аналогичный многоклеточным организмам [1-4]. Переход бактерий от планктонного к прикрепленному существованию реализуется на поверхностях абиотического и биотического происхождения.

Структурная и физиологическая сложность биоплёнки приводит к тому, что клетки, входящие в ее состав, приобретают качественно новые, по сравнению с планктонными формами, свойства: повышенную устойчивость к эффекторам иммунной системы, антибиотикам, антисептикам, дезинфектантам и другим неблагоприятным для них факторам среды [5-7].

Способность микроорганизмов к формированию биоплёнок имеет большое клиническое значение, т.к. они участвуют в развитии хронических воспалительных процессов, в том числе раневых инфекций, обуславливая отсутствие эффекта от проводимой этиотропной терапии [6, 8]. Большинство исследователей признают, что ведущую роль в развитии инфекций ожоговых ран играют *S. aureus* и *P. aeruginosa* [9-13]. Доказательства наличия на поверхности острых ран биоплёнки из *S. aureus* были получены с помощью электронной и конфокальной лазерной сканирующей микроскопии при моделировании раневого инфекционного процесса у мышей [14]. При изучении поверхности ран у свиней, структура кожи которых наиболее близка к человеческой, также отмечено образование биоплёнок, препятствующих заживлению ран. Результаты исследований экспериментально зараженного раневого ложа у свиней обнаружили наличие биоплёнок *S. aureus* на поверхности резаных ран, и биоплёнок *P. aeruginosa* на поверхности ожоговых ран. В дальнейшем было показано, что планктонные формы, выделенные из ран,

были более чувствительны к антимикробным препаратам, чем биоплёнки этих же бактерий [15].

В настоящее время доказана способность изолятов *S. aureus* и *P. aeruginosa*, выделенных из ран человека, к образованию биоплёнок *in vitro* [16, 17]. Образование биоплёнок на поверхности ран человека в последующем было доказано также с помощью упомянутых выше сканирующей электронной микроскопии и конфокальной лазерной сканирующей микроскопии [18]. Известно, что только в биоплёночной форме на поверхности ран *P. aeruginosa* с помощью молекулярной системы межклеточного общения («quorum sensing») продуцирует пигмент пиоцианин, окрашивающий раневое отделяемое в зеленый цвет [19]. Другие авторы отмечают, что биоплёнки в раневом ложе можно определять по наличию в раневом отделяемом сигнальных молекул. Так, представители нормального микробиоценоза кожи обычно продуцируют аутоиндукторы (АИ-2), в то время как агрессивные транзиторные виды, связанные с хронизацией раневого воспалительного процесса (в первую очередь, *P. aeruginosa*), образуют сигнальные молекулы на основе лактонов N-ацилированного гомосерина. Оба этих класса межклеточных сигнальных молекул присутствуют в хронических ранах человека [8, 20].

Различными авторами были предложены концепции, объясняющие то, как образование биоплёнок на поверхности ран способствует хронизации раневого воспалительного процесса. Например, *P. aeruginosa* синтезирует рамнолипиды, которые ухудшают функцию нейтрофилов и препятствуют эффективному удалению этих бактерий [21], а постоянное высвобождение планктонных бактерий из биоплёнки поддерживает воспалительный ответ в ране [22]. Хронические раны, как правило, характеризуются повышенными локальными уровнями провоспалительных цитокинов, свободных радикалов и протеаз, длительным присутствием активированных нейтрофилов и макрофагов. Такая реакция, казалось бы, должна способствовать нарушению формирования биоплёнки на тканях, однако реактивные окислители и протеазы также разрушают здоровые и заживающие ткани, протеины и иммунные клетки, что ухудшает процесс заживления. В связи с этим была выдвинута гипотеза о том, что неэффективный воспалительный ответ «выгоден» биоплёнке, т.к. он усиливает образование экссудата, являющегося источником питания и средством сохранения биоплёнки. Таким образом, биоплёнки в ранах способны длительно поддерживать воспаление, приводят к хронизации инфекционного процесса и нарушению заживления, что усложняет уход за раной и вызывает серьезные затруднения при лечении [10].

Наиболее уязвимой в этом отношении категорией являются пациенты ожоговых отделений, вследствие значительной угрозы внутрибольничного инфицирования и специфики раневого дефекта, создающего условия для формирования биоплёнки: нарушение целостности кожных покровов и слизистых оболочек, наличие продуктов некроза и детрита. Созревание биоплёнки и последующая дисперсия приводят к генерализации инфекционного процесса, возникновению плевропневмонии, эндокардита, менингоэнцефалита и сепсиса [23, 24].

В настоящее время широко распространенным ме-

тодом лечения инфекции ожоговых ран является обработка антисептическими препаратами. Однако эти средства чаще назначаются эмпирически, без учета чувствительности к ним возбудителей инфекции, при этом многие авторы указывают на растущую неэффективность антисептиков [25-27]. Имеющиеся в ряде работ данные посвящены изучению чувствительности к антисептикам планктонных форм бактерий или одновидовых биоплёнок [28, 29], в то время как почти все биоплёночные сообщества в природе являются полимикробными и включают в себя различные виды микроорганизмов [30].

Исходя из вышесказанного, определение чувствительности к антисептикам одновидовых и многовидовых биоплёнок, образованных клиническими изолятами микроорганизмов *in vitro*, является актуальным направлением.

Целью нашего исследования была оценка чувствительности к антисептикам антибиотикорезистентных раневых изолятов *S. aureus* и *P. aeruginosa* в составе сформированных *in vitro* одновидовых и двухвидовых биоплёнок разной степени зрелости.

Материалы и методы

Работа проводилась в учебной лаборатории микробиологии и иммунологии биологического факультета ФГБОУ ВО «Челябинского государственного университета» на базе бактериологической лаборатории городской клинической больницы № 6 г. Челябинска.

В исследование были включены 56 изолятов, выделенных из ран пациентов ожогового отделения: из них 14 штаммов *S. aureus* и 10 штаммов *P. aeruginosa* были выделены в монокультуре и 16 штаммов в составе ассоциаций *S. aureus* + *P. aeruginosa*. Все микроорганизмы были выделены в диагностическом титре и обладали полирезистентностью к антибиотикам. В качестве контроля использовали штаммы из американской коллекции типовых культур (ATCC): *S. aureus* 25923 и *P. aeruginosa* 27853.

Для культивирования микроорганизмов использовали агар и бульон Мюллера-Хинтон (HiMedia, Индия) и цветную питательную среду на основе питательного бульона из панкреатического гидролизата рыбо-костной муки с добавлением 0,5% глюкозы и 0,002% индикатора бром-крезолового пурпурного.

В ходе исследования изучались антисептики, применяемые для профилактики и лечения раневых инфекций у больных ожогового отделения. Антисептические средства использовали в рекомендованных производителем рабочих концентрациях: «Фурациллин» – 0,02%, «Борная кислота» – 2%, «Мирамистин» – 0,01%, «Хлоргексидин» – 0,05%, «Бетадин» – 10%, «Хлорофиллипт» – 1% спиртовой раствор, «Пронтосан» (ПС, ундециленовый амидопропил-бетаин – 0,1%, полиаминопропил бигуанид (полигексанид) – 0,1%).

Исследования проводились в 2 этапа. На первом этапе, для исключения потенциально неактивных в отношении биоплёнок антисептиков, у всех исследованных штаммов бактерий определяли чувствительность к антисептикам вне сформированной биоплёнки согласно методикам, предложенным Красильниковым А.П. [31],

Леви М.И. и Сучковым Ю.Г. [32]. В лунках 96-луночных полистироловых планшет (Медполимер, Россия) готовили последовательные двукратные разведения антисептического препарата в цветной питательной среде, начиная с рабочей концентрации, затем в каждую лунку вносили взвесь бактерий в концентрации 5×10^7 КОЕ/мл, инкубировали 24 часа при температуре 37°C. Учет бактериостатического эффекта антисептиков проводили по изменению цвета содержимого лунок (визуально). Бактерицидное действие антисептиков оценивали по наличию или отсутствию роста после высева содержимого лунок на агар Мюллера-Хинтон.

На втором этапе определяли чувствительность к антисептикам штаммов бактерий в составе биоплёнок по запатентованному нами методу «Способ оценки эффективности антимикробного воздействия антисептиков на бактерии, существующие в форме биоплёнки» [33]. Биоплёнки выращивали статически в плоскодонных 96-луночных планшетах при температуре 37°C в течение 24 и 48 часов. Одновидовые биоплёнки выращивали из всех исследованных штаммов ($n=56$), двухвидовые – из 16 ассоциаций *S. aureus* и *P. aeruginosa*. Для выращивания двухвидовых биоплёнок клетки *S. aureus* и *P. aeruginosa* смешивали *in vitro* в том же соотношении, в котором они были выделены из ожоговой раны. После завершения инкубации удаляли питательную среду, содержащую планктонные формы бактерий. В отдельном стерильном планшете готовили двукратные разведения антисептика в цветной питательной среде, начиная с концентрации, рекомендованной для практического применения, вносили разведения антисептика в лунки, содержащие биоплёнку определенной степени зрелости, инкубировали при температуре 37°C в течение 24 часов.

Полученные результаты регистрировали в виде:

1) **бактериостатического индекса активности антисептика (БС ИАА)**, который рассчитывался как отношение рабочей концентрации антисептика к его минимальной подавляющей концентрации;

2) **бактерицидного индекса активности антисептика (БЦ ИАА)**, который рассчитывался как отношение рабочей концентрации антисептика к его минимальной бактерицидной концентрации.

Таким образом, ИАА являлся показателем, позволявшим сравнивать антисептическое действие препаратов независимо от их рабочей концентрации, при этом имелась возможность дифференцировать бактерицидный и бактериостатический эффекты. Антисептик расценивали как активный при ИАА >4 , т.к. в естественных условиях активность антисептиков в результате разбавления, резорбции и инактивации снижается в среднем в 4 раза [31].

Для статистического анализа полученных данных использовали методы описательной статистики и выборочных сравнений. Ввиду сильной положительной асимметрии распределения значений ИАА, средние значения и 95%-ые доверительные интервалы (95% ДИ) для них рассчитывали по предварительно прологарифмированным данным с последующим преобразованием в исходную шкалу [34, 35]. Оценку влияния антисептиков на одновидовые и двухвидовые биоплёнки с учетом бактериостатического и бактерицидного типа действия

проводили с помощью перекрестной модели четырехфакторного дисперсионного анализа (ANOVA) [36]. Факторами в модели выступали: 1) препараты (5 градаций: «Мирамистин», «Хлоргексидин», «Бетадин», «Хлорофиллипт» и «Пронтосан»), 2) тип действия препарата (2 градации: бактериостатическое и бактерицидное), 3) степень зрелости биоплёнки (2 градации: 24 часа и 48 часов), 4) видовой состав биоплёнки (3 градации: *S. aureus*, *P. aeruginosa*, микст). Все факторы анализировались как фиксированные; данные перед анализом логарифмировали; множественные апостериорные сравнения проводили методом Тьюки.

Статистическая обработка проводилась с использованием электронной таблицы Microsoft Office Excel (v. 12.0.4518.1014, 2007) и программных пакетов Statistica (v. 10, StatSoft Inc.), PAST (v. 3.15). Построение графиков проводили в пакете KyPlot (v. 2.15). Различия считали статистически значимыми при $p \leq 0,05$, незначимыми – при $p > 0,10$, в промежуточных случаях ($0,05 < p \leq 0,10$) обсуждали тенденции к различиям.

Результаты и обсуждение

Известно, что бактериальные клетки, входящие в состав биоплёнки, обладают повышенной устойчивостью к антисептикам и антимикробным препаратам [5-7, 28, 37]. Бактерии, устойчивые к каким-либо антисептикам в планктонной форме, будут устойчивы к этим препаратам и в биоплёночной форме, поэтому для выявления антисептиков, неактивных в отношении биоплёнок, перед определением чувствительности биоплёночных форм определяли чувствительность к антисептикам у бактерий в планктонной форме.

Исследование показало, что фурациллин и борная кислота не обладали активностью в отношении планктонных форм исследованных бактерий (ИАА ≤ 4), поэтому данные антисептики были исключены из тестирования биоплёночных форм. Препараты «Мирамистин», «Хлоргексидин», «Бетадин», «Хлорофиллипт» и «Пронтосан» были активны в отношении планктонных форм исследованных штаммов бактерий: значения ИАА превышали минимальный уровень (Таблица 1). Наибольшую активность в отношении планктонных форм бактерий проявлял препарат «Пронтосан», менее активными были «Хлоргексидин» и «Мирамистин».

На следующем этапе было проведено определение чувствительности биоплёночных форм раневых изолятов *S. aureus* и *P. aeruginosa* к антисептикам, активным в отношении планктонных форм этих штаммов. Его результаты представлены в Таблицах 2-4 и на Рисунке 1.

При проведении многофакторного дисперсионного анализа (Таблица 2) было выявлено, что статистически значимое влияние на ИАА оказывали главные факторы: а) вид исследованных препаратов, б) степень зрелости биоплёнки, в) тип действия антисептиков на клетки (бактерицидный и бактериостатический), г) видовой состав биоплёнки. Значения среднего квадрата MS и F-критерий позволили ранжировать главные факторы по силе их влияния на ИАА. Наибольшее влияние на ИАА оказывал вид применяемого антисептического препарата; в меньшей степени ИАА зависел от зрелости биоплёнки,

Таблица 1. Среднее значение [95% ДИ] бактериостатического (БС) и бактерицидного (БЦ) ИАА в отношении планктонных форм раневых изолятов *S. aureus* и *P. aeruginosa*

Препарат	Тип действия	Планктонные формы		
		<i>S. aureus</i> (n=30)	<i>P. aeruginosa</i> (n=26)	Микст (n=16)
Пронтосан	БС	91,7 [70,3; 113]	85,6 [66,8; 104]	87,5 [55,2; 120]
	БЦ	71,6 [49,6; 93,6]	59,3 [40,8; 77,8]	67,5 [34,7; 100]
Бетадин	БС	62,8 [32,7; 92,8]	32,1 [21,3; 42,9]	59,8 [33,0; 86,5]
	БЦ	37,1 [21,4; 52,9]	20,8 [12,8; 28,7]	41,0 [23,8; 58,2]
Хлорофиллипт	БС	62,6 [32,5; 92,7]	35,9 [24,4; 47,5]	43,8 [22,7; 64,8]
	БЦ	48,8 [21,6; 76,0]	23,5 [15,2; 31,8]	31,5 [18,3; 44,7]
Хлоргексидин	БС	10,4 [7,15; 13,7]	10,1 [7,90; 12,3]	8,75 [5,42; 12,1]
	БЦ	5,21 [3,53; 6,89]	4,95 [3,94; 5,96]	5,50 [2,81; 8,18]
Мирамистин	БС	9,39 [6,93; 11,8]	9,91 [7,89; 11,9]	9,75 [4,53; 15,0]
	БЦ	4,52 [3,20; 5,83]	4,60 [3,67; 5,54]	5,00 [2,36; 7,63]

Для борной кислоты и фурациллина во всех случаях ИАА ≤ 4 .

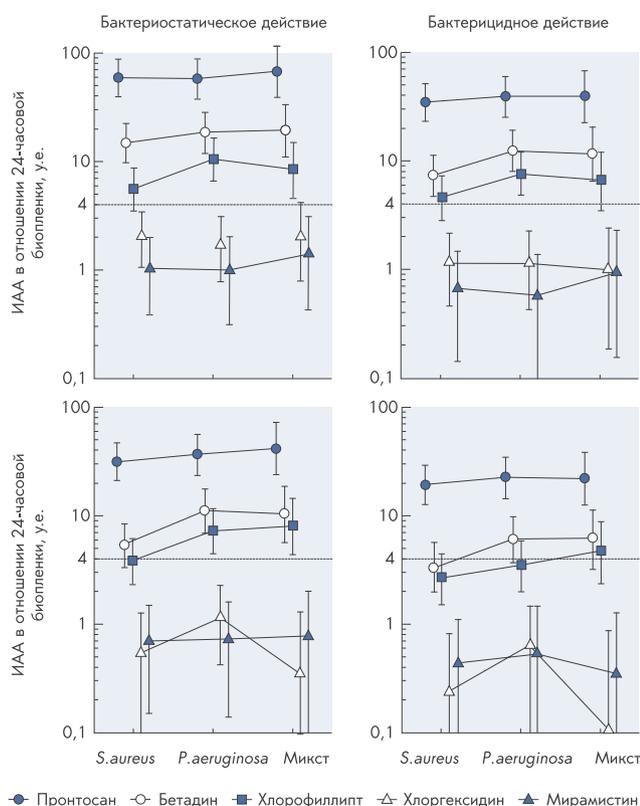


Рисунок 1. Чувствительность к антисептикам раневых изолятов *S. aureus* и *P. aeruginosa* в составе одновидовых и двухвидовых (микст) биоплёнок 24-часовой и 48-часовой степени зрелости

Примечание: «усы» – 95% ДИ, рассчитанные при проведении четырехфакторного дисперсионного анализа

типа действия антисептика и видового состава биоплёнки. Взаимодействия факторов не были статистически значимыми, что указывало на аддитивный характер их совместного антисептического действия. Для практики это означает возможность предсказать как влияние

каждого из этих факторов в отдельности, так и их сочетанное влияние, причем без учета специфики таких сочетаний. Таким образом, результаты дисперсионного анализа позволили нам ранжировать изученные факторы по силе влияния на ИАА.

Препараты. Результаты оценки чувствительности раневых изолятов *S. aureus* и *P. aeruginosa* в составе одновидовых и двухвидовых биоплёнок к разным антисептикам, полученные в ходе четырехфакторного анализа графически отражены на Рисунке 1. Исследованные изоляты *S. aureus* и *P. aeruginosa* в составе биоплёнок были чувствительны к препаратам «Пронтосан», «Бетадин» и «Хлорофиллипт», при этом множественные апостериорные сравнения показали, что различия в активности указанных препаратов имели высокую статистическую значимость ($p < 0,001$). Наибольшую активность в отношении исследованных биоплёнок проявлял «Пронтосан», менее активными были «Бетадин» и «Хлорофиллипт». Препараты «Мирамистин» и «Хлоргексидин», активность которых не показала статистически значимых различий ($p = 0,729$), оказывали достоверно меньший антимикробный эффект. Их активность была ниже порогового уровня, несмотря на то, что исследованные изоляты *S. aureus* и *P. aeruginosa* в планктонной форме были чувствительны к этим препаратам. Полученные результаты согласуются с данными литературы, указывающими на повышенную устойчивость биоплёночных форм бактерий к антимикробным веществам [5-7]. Высокую резистентность обеспечивает основной структурный компонент биоплёнки – матрикс, доля которого может составлять до 90% от общей массы биоплёнки, при этом только 10% приходится на клетки микроорганизмов. Матрикс биоплёнки, состоящий из воды, внеклеточных полимерных веществ – экзополисахаридов, протеинов, липидов, нуклеиновых и тейхоевых кислот, обладает сильными сорбционными свойствами и является биохимически активной системой, в которой происходят разнообразные химические реакции, в том числе накапливаются ферменты, приводящие к разрушению и нейтрализации антимикробных препаратов. Таким образом, матрикс защищает микробные клетки в составе биоплёнки от физических и химических воздействий [3, 38].

Таблица 2. Результаты дисперсионного анализа данных по чувствительности к антисептикам штаммов *S. aureus* и *P. aeruginosa* в составе биоплёнок различной степени зрелости

Источник изменчивости ИАА	Сумма квадратов SS	Степени свободы df	Средний квадрат MS	F-критерий	p
Главные факторы					
Вид препарата	331,2173	4	82,8043	374,7	<0,001
Зрелость биоплёнки	12,7846	1	12,7846	57,9	<0,001
Тип действия препарата	7,8459	1	7,8459	35,5	<0,001
Видовой состав биоплёнки	3,1152	2	1,5576	7,06	0,001
Двухфакторные взаимодействия					
а×б	1,5641	4	0,3910	1,77	0,133
а×в	0,7976	4	0,1994	0,90	0,461
а×г	2,6514	8	0,3314	1,50	0,152
в×г	0,0220	2	0,0110	0,05	0,951
в×б	0,0163	1	0,0163	0,07	0,786
г×б	0,2265	2	0,1133	0,51	0,599
Трёхфакторные взаимодействия					
а×в×г	0,1806	8	0,0226	0,10	0,999
а×г×б	0,8084	8	0,1010	0,46	0,886
а×в×б	0,2023	4	0,0506	0,23	0,922
в×г×б	0,1002	2	0,0501	0,23	0,797
Четырёхфакторное взаимодействие					
а×б×в×г	0,1170	8	0,0146	0,07	>0,999
Ошибка	304,9745	1380	0,2210	–	–

Вместе с тем, используемые в практике стандартные лабораторные тесты не позволяют определять чувствительность к антисептикам биоплёночных форм микроорганизмов, что диктует необходимость их модификации.

Зрелость биоплёнки. Менее значимым фактором, влияющим на ИАА, был эффект зрелости биоплёнки, который заключался в приблизительно двукратном росте резистентности изолятов по мере созревания биоплёнки от 24- до 48-часовой (Рисунок 1 и Таблица 4). Наблюдавшееся снижение активности антисептиков, возможно, связано с тем, что по мере созревания биоплёнки часть клеток может переходить в метаболически неактивную форму со сниженным уровнем обмена веществ. Кроме того, концентрация антимикробного препарата в глубоких слоях биоплёнки значительно ниже, что индуцирует экспрессию специфических генов, отвечающих за резистентность, которые не экспрессируются у планктонных форм, и приводит к появлению в глубоких слоях биоплёнки устойчивых клеток – персистеров [39]. Также значительно повышает выживаемость микроорганизмов в составе зрелой биоплёнки их способность общаться друг с другом с помощью сигнальных молекул, называемых аутоиндукторами. Механизм, обеспечивающий коммуникацию бактерий («quorum sensing»), позволяет бактериальным сообществам координировать свое поведение и адаптироваться к стрессовым воздействиям [40].

Тип действия антисептиков на клетки. Использованный нами метод позволил дифференцировать бактериостатический и бактерицидный эффекты антисептиков. Различие между бактериостатическим и бактерицидным действием на биоплёнки было высоко статистически

значимым ($p < 0,001$), при этом бактерицидный эффект у всех исследованных антисептиков достигался при более высоких концентрациях препаратов (в 1,64 раза выше), чем концентрации, при которых наблюдался бактериостатический эффект.

Для ранжирования антисептиков по силе бактерицидного действия на одновидовые и двухвидовые биоплёнки различной степени зрелости рассчитывали соотношение бактерицидного и бактериостатического ИАА (Таблица 3). Независимо от вида антисептического препарата, соотношение бактерицидного ИАА к бактериостатическому ИАА варьировало для разных условий эксперимента от 0,31 до 0,84 и составило в среднем 0,61. Выявлена тенденция, что наибольшая доля бактерицидного действия была у «Хлорофиллипта», а наименьшая – у «Хлоргексидина». Полученные результаты указывают на то, что больший антисептический эффект не обязательно обеспечивает препарат с большей долей именно бактерицидного действия. Таким образом, разработанный нами метод позволил выявить, что бактериостатический и бактерицидный эффекты в большей степени зависели от концентрации антисептика, а не от вида тестируемого препарата.

Видовой состав биоплёнки в нашем эксперименте оказывал наименьшее влияние на активность антисептиков. Однако, антимикробное воздействие на одновидовую биоплёнку, сформированную *S. aureus*, было слабее, чем на одновидовую биоплёнку из *P. aeruginosa* ($p = 0,003$) или двухвидовую биоплёнку ($p = 0,040$). Активность антисептиков в отношении одновидовых биоплёнок из *P. aeruginosa* и двухвидовых биоплёнок не различалась между собой ($p = 0,984$). Однако по дан-

Таблица 3. Соотношение бактерицидного и бактериостатического ИАА для одновидовых и двухвидовых (микст) биоплёнок различной степени зрелости

Препарат	Тип действия	Состав биоплёнки		
		<i>S. aureus</i> (n=30)	<i>P. aeruginosa</i> (n=26)	Микст (n=16)
Зрелость биоплёнки – 24 ч				
Пронтосан	БЦ/БС	0,61	0,69	0,60
Бетадин	БЦ/БС	0,50	0,69	0,61
Хлорофиллипт	БЦ/БС	0,84	0,73	0,80
Хлоргексидин	БЦ/БС	0,58	0,68	0,50
Мирамистин	БЦ/БС	0,66	0,60	0,68
Зрелость биоплёнки – 48 ч				
Пронтосан	БЦ/БС	0,62	0,61	0,53
Бетадин	БЦ/БС	0,62	0,55	0,60
Хлорофиллипт	БЦ/БС	0,70	0,48	0,59
Хлоргексидин	БЦ/БС	0,44	0,55	0,31
Мирамистин	БЦ/БС	0,63	0,74	0,45

Таблица 4. Среднее значение [95% ДИ] бактериостатического (БС) и бактерицидного (БЦ) ИАА в отношении раневых изолятов *S. aureus* и *P. aeruginosa* в составе биоплёнок различной степени зрелости

Препарат	Тип действия	Состав биоплёнки		
		<i>S. aureus</i> (n=30)	<i>P. aeruginosa</i> (n=26)	Микст (n=16)
Зрелость биоплёнки – 24 ч				
Пронтосан	БС	59,0 [34,8; 99,5]	57,9 [40,8; 82,1]	67,3 [43,8; 103,2]
	БЦ	35,3 [19,8; 62,4]	40,1 [27,0; 59,2]	40,1 [25,8; 62,0]
Бетадин	БС	14,9 [8,61; 25,3]	18,4 [11,6; 29,1]	19,4 [11,8; 31,6]
	БЦ	7,47 [3,80; 13,9]	12,7 [7,39; 21,2]	11,8 [6,49; 21,1]
Хлорофиллипт	БС	5,62 [3,17; 9,51]	10,6 [6,98; 15,8]	8,49 [4,46; 15,5]
	БЦ	4,70 [2,52; 8,22]	7,78 [4,93; 12,0]	6,79 [3,68; 12,0]
Хлоргексидин	БС	2,03 [1,07; 3,45]	1,71 [0,71; 3,30]	2,05 [0,87; 3,98]
	БЦ	1,17 [0,54; 2,06]	1,17 [0,47; 2,19]	1,02 [0,30; 2,14]
Мирамистин	БС	1,05 [0,38; 2,04]	0,99 [0,24; 2,20]	1,43 [0,38; 3,26]
	БЦ	0,69 [0,24; 1,29]	0,59 [0,12; 1,26]	0,97 [0,21; 2,21]
Зрелость биоплёнки – 48 ч				
Пронтосан	БС	31,5 [17,9; 54,9]	37,1 [24,2; 56,6]	42,0 [26,0; 67,5]
	БЦ	19,4 [11,5; 32,5]	22,5 [15,5; 32,4]	22,2 [13,8; 35,4]
Бетадин	БС	5,39 [2,50; 10,7]	11,2 [6,35; 19,3]	10,4 [5,65; 18,5]
	БЦ	3,33 [1,56; 6,33]	6,16 [2,99; 11,9]	6,23 [3,32; 11,1]
Хлорофиллипт	БС	3,90 [2,01; 6,99]	7,30 [4,24; 12,1]	8,10 [4,36; 14,5]
	БЦ	2,72 [1,35; 4,89]	3,53 [1,85; 6,21]	4,80 [2,47; 8,70]
Хлоргексидин	БС	0,54 [0,14; 1,09]	1,16 [0,48; 2,16]	0,35 [0,00; 0,91]
	БЦ	0,24 [0,01; 0,53]	0,64 [0,21; 1,23]	0,11 [0,00; 0,37]
Мирамистин	БС	0,70 [0,20; 1,39]	0,73 [0,19; 1,51]	0,78 [0,10; 1,87]
	БЦ	0,44 [0,08; 0,91]	0,54 [0,15; 1,07]	0,35 [0,00; 0,91]

ным литературы, многовидовые биоплёнки значительно более устойчивы к антибактериальной терапии и дезинфекции, чем одновидовые [37, 41-44]. Как считают авторы, одним из механизмов повышения устойчивости микроорганизмов в составе многовидовой биоплёнки является изменение состава экзополисахаридного матрикса, которое зависит от вида бактерий и условий окружающей среды и может обеспечить лучшую защиту от антимикробных препаратов [3]. Полученные нами результаты позволяют предположить, что сочетание

S. aureus и *P. aeruginosa* не дает значительного изменения состава матрикса биоплёнки и не приводит к увеличению устойчивости к антисептикам.

Среднее значение и 95% ДИ бактериостатического и бактерицидного ИАА в отношении раневых изолятов *S. aureus* и *P. aeruginosa* в составе биоплёнок различной степени зрелости представлены в Таблице 4. Приведенные в таблице данные показывают истинный диапазон значений ИАА в каждой конкретной выборке и, в целом, отражают результаты, полученные при анализе с

помощью методов описательной статистики. Следует отметить, что 95% ДИ, представленные в Таблице 4 и на Рисунке 1, отличаются; последние построены с учетом ошибки всего дисперсионного комплекса, и потому позволяют проводить визуальные сравнения, сходные с апостериорными.

Заключение

На основании приведенных выше результатов исследования можно сделать следующие выводы:

1) антибиотикорезистентные раневые изоляты *S. aureus* и *P. aeruginosa* чувствительны к препаратам «Пронтосан», «Бетадин», «Хлорофиллипт», «Мирамистин» и «Хлоргексидин» в планктонной форме, но в составе одновидовых и многовидовых биоплёнок приобре-

тают устойчивость к «Мирамистину» и «Хлоргексидину». Наибольшей антимикробной активностью в отношении биоплёночных форм обладал «Пронтосан», менее активными были «Бетадин» и «Хлорофиллипт».

2) Созревание биоплёнки сопровождалось двукратным увеличением резистентности к антисептикам входящих в ее состав бактерий.

3) Бактерицидный эффект у всех исследованных антисептиков достигался при концентрациях, которые в 1,64 раза превышали концентрации, при которых наблюдался бактериостатический эффект.

Полученные результаты свидетельствуют о необходимости проведения лабораторных тестов на чувствительность биоплёночных форм клинических изолятов бактерий к антисептикам с целью индивидуального подбора препаратов при лечении раневых инфекций.

Литература

1. Stoodley P., Sauer K., Davies D.G., Costerton J.W. Biofilms as complex differentiated communities. *Annu Rev Microbiol.* 2002;56:187-209.
2. Davey M.E., O'Toole G.A. Microbial biofilms: from ecology to molecular genetics. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2000;64:847-867.
3. Flemming H.C., Wingender J. The biofilm matrix. *Nat Rev Microbiol.* 2010;8(9):623-633.
4. Smirnova T.A., Didenko L.V., Romanova Y.M., Azizbekyan R.R. Structural and functional characteristics of bacterial biofilms. *Mikrobiologiya.* 2010;79(4):413-423. Russian. (Смирнова Т.А., Диденко Л.В., Азизбекян Р.Р., Романова Ю.М. Структурно-функциональная характеристика бактериальных биоплёнок. *Микробиология.* 2010;79(4):435-446.)
5. Vinnik Yu.S., Teplyakova O.V., Peryanova O.V., Onzul E.V., Kozlov V.V. Significance of film-forming ability of *Staphylococcus* cultures in a choice of drainage polymer and local antiseptics in infected рангонеонекrosis. *Vestnik jeksperimental'noj i klinicheskoj hirurgii.* 2011;4(4):666-670. Russian. (Винник Ю.С., Теплякова О.В., Перьянова О.В., Онзуль Е.В., Козлов В.В. Значение пленкообразующей способности культур стафилококков в выборе дренажного полимера и местных антисептиков при инфицированном панкреонекрозе. *Вестник экспериментальной и клинической хирургии.* 2011;4(4):666-670.)
6. Lyamin A.V., Botkin E.A., Zhestkov A.V. Medical Problems Associated with Bacterial Biofilms. *Klinicheskaja mikrobiologija i antimikrobnaja himioterapija.* 2012;14(4):268-275. Russian. (Лямин А.В., Боткин Е.А., Жестков А.В. Проблемы в медицине, связанные с бактериальными плёнками. *Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия.* 2012;14(4):268-275.)
7. Chebotar I.V., Mayansky A.N., Konchakova E.D., Lazareva A.V., Chistyakova V.P. Antimicrobial Resistance of Bacteria in Biofilms. *Klinicheskaja mikrobiologija i antimikrobnaja himioterapija.* 2012;14(1):51-58. Russian. (Чеботарь И.В., Маянский А.Н., Кончакова Е.Д., Лазарева А.В., Чистякова В.П. Антибиотикорезистентность биоплёночных бактерий. *Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия.* 2012;14(1):51-58.)
8. Rickard A.H., Colacino K.R., Manton K.M., et al. Production of cell-cell signaling molecules by bacteria isolated from human chronic wounds. *J Appl Microbiol.* 2009;108(5):1509-1522.
9. Andreeva S.V., Bahareva L.I., Nohrin D.Ju. Species composition of microflora of burn wounds. *Vestnik Cheljabinskogo gosudarstvennogo universiteta.* 2013;7(298):58-59. Russian. (Андреева С.В., Бахарева Л.И., Нохрин Д.Ю. Видовой состав микрофлоры ожоговых ран. *Вестник Челябинского государственного университета.* 2013;7(298):58-59.)
10. Cooper R. Biofilms and wounds: much ado about nothing? *Wounds UK.* 2010;6(4):84-90.
11. Hussien I.A., Habib K.A., Jassim K.A. Bacterial Colonization of Burn Wounds. *Baghdad Sci J.* 2012;9(4):623-631.
12. Keen E.F., Robinson B.J., Hospenthal D.R., et al. Incidence and bacteriology of burn infections at a military burn center. *Burns.* 2010;36:461-468.
13. Azimi L., Motevallian A., Ebrahimzadeh Namvar A., Asghari B., Lari A.R. Nosocomial Infections in Burned Patients in Motahari Hospital, Tehran, Iran. *Dermatol Res Pract.* 2011;2011:436952.
14. Akiyama H., Huh W.K., Yamasaki O., Oono T., Iwatsuki K. Confocal laser scanning microscopic observation of glycocalyx production by *Staphylococcus aureus* in mouse skin: does *S. aureus* generally produce a biofilm on damaged skin? *Br J Dermatol.* 2002;147:879-885.
15. Serralta V.W., Harrison-Balestra C., Cazzaniga A.L., Davis S.C., Mertz P.M. Lifestyles of bacteria in wounds: presence of biofilms? *Wounds.* 2001;13(1):29-34.
16. Akiyama H., Ueda M., Kanazaki H., Tada J., Arata J. Biofilm formation of *Staphylococcus aureus* strains isolated from impetigo and furuncle: role of fibrinogen and fibrin. *J Dermatol Sci.* 1997;16:2-10.
17. Harrison-Balestra C., Cazzaniga A.L., Davis S.C., Mertz P.M. A wound-isolated *Pseudomonas aeruginosa* grows a biofilm *in vitro* within 10 hours and is visualised by light microscopy. *Dermatol Surg.* 2003;29(6):631-635.
18. James G.A., Swogger E., Wolcott R., et al. Biofilms in chronic wounds. *Wound Repair Regen.* 2008;16(1):37-44.
19. Dietrich L.E., Price-Whelan A., Petersen A., Whiteley M., Newman D.K. The phenazine pyocyanin is a terminal signaling factor in the quorum-sensing network of *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol Microbiol.* 2006;61(5):1308-1321.
20. Gilbert P., Maira-Litran T., McBain A.J., Rickard A.H., Whyte F.W. The physiology and collective recalcitrance of microbial biofilm communities. *Adv Microb Physiol.* 2002;46:202-256.
21. Bjarnsholt T., Kirketerp-Moller K., Jensen P.O., et al. Why chronic wounds fail to heal: a new hypothesis. *Wound Rep Regen.* 2008;16(1):2-10.
22. Wolcott R.D., Rhoads D.D., Dowd S.E. Biofilms and chronic wound inflammation. *J Wound Care.* 2008;17(8):333-341.
23. Wolcott R.D., Dowd S.E. The role of biofilms: are we hitting the right target? *Plast Reconstr Surg.* 2011;127(1):28-37.
24. Kim M.H. Nanoparticle-based therapies for wound biofilm infection: opportunities and challenges. *IEEE Trans Nanobioscience.* 2016;15(3):294-304.
25. Ahtjamova N.E. New approaches in the treatment of purulent-inflammatory processes of the skin and subcutaneous tissue. *Russkij medicinskij zhurnal.* 2016;8(8):508-510. Russian. (Ахтямова Н.Е.

- Новые подходы в лечении гнойно-воспалительных процессов кожи и подкожной клетчатки. Русский медицинский журнал. 2016;(8):508-510).
26. Hanenko O.N., Tonko O.V., Levshina N.N., et al. Resistance to antiseptics of staphylococci isolated from burn wounds. Prevention and treatment of hospital infections, resistance of microorganisms to chemotherapy. Proceedings of the republican scientific-practical conference. Minsk, 2006. p. 208-211. Russian. (Ханенко О.Н., Тонко О.В., Левшина Н.Н. и соавт. Резистентность к антисептикам стафилококков, изолированных из ожоговых ран. Профилактика и лечение госпитальных инфекций, резистентность микроорганизмов к химиопрепаратам. Материалы республиканской научно-практической конференции. Минск, 2006. с. 208-211.).
 27. Sheldon A.T. Jr. Antiseptic «Resistance»: Real or Perceived Threat? Clin Infect Dis. 2005;40(11):1650-1656.
 28. Encheva Yu.A., Kuznetsova M.V., Rubtsova E.A., Afanasievskaya E.V., Samartsev V.A. Chlorhexidine and "Prontosan" effect on biofilm formed by *Staphylococcus aureus* (in vitro study). Biologija i jeksperimental'naja medicina. 2015;XXXIII(1):84-91. Russian. (Еньчева Ю.А., Кузнецова М.В., Рубцова Е.А., Афанасьевская Е.В., Самарцев В.А. Влияние хлоргексидина и «Пронтосана» на биоплёнку, сформированную *Staphylococcus aureus* (исследование in vitro). Биология и экспериментальная медицина. 2015;XXXIII(1):84-91.).
 29. Yarets Yu., Shauchenka N. A new method for the bacterial biofilms analysis in medicine. Nauka i innovacii. 2016;11(165):68-72. Russian. (Ярец Ю., Шевченко Н. Новый метод анализа бактериальной биоплёнки. Наука и инновации. 2016;11(165):68-72.).
 30. Elias S., Banin E. Multi-species biofilms: living with friendly neighbors. FEMS Microbiol Rev. 2012;(36):990-1004.
 31. Krasilnikov A.P. Guide on antiseptics. Minsk: Vyshjeshaja shkola, 1995. 368 p. Russian. (Красильников А.П. Справочник по антисептике. Минск: Высшая школа, 1995. 368 с.).
 32. Methodical guidelines on the rapid determination of resistance of bacteria to disinfectants #1100-27-0-117. Russian. (Методические рекомендации по ускоренному определению устойчивости бактерий к дезинфекционным средствам №1100-27-0-117).
 33. Andreeva S.V., Bahareva L.I., Burmistrova A.I. Method for evaluating the effectiveness of antimicrobial action of antiseptics on bacteria existing in the form of biofilms. Patent of Russian Federation #2603100, 2016. Russian. (Андреева С.В., Бахарева Л.И., Бурмистрова А.И. Способ оценки эффективности антимикробного воздействия антисептиков на бактерии, существующие в форме биоплёнки. Патент РФ № 2603100, 2016.).
 34. Jarvis B. Statistical Aspects of the Microbiological Examination of Foods, Second Edition. London: Academic Press, 2008.
 35. Sokal R.R., Rohlf F.J. Biometry: the principles and practice of statistics in biological research. NY: Freeman and Co, 1995. 887 p.
 36. Lang T.A., Sedic M. How to Report Statistics in Medicine: Annotated Guidelines for Authors, Editors, and Reviewers, 2nd edition. Philadelphia: American College of Physicians. 2006. 490 p.
 37. Whiteley M., Banger M.G., Bumgarner R.E., et al. Gene expression in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. Nature. 2001;413:860-864.
 38. Tchebotar I.V., Mayanskiy A.N., Mayanskiy N.A. Matrix of microbial biofilms. Klinicheskaja mikrobiologija i antimikrobnaja himioterapija. 2016;18(1):9-19. Russian. (Чеботарь И.В., Маянский А.Н., Маянский Н.А. Матрикс микробных биоплёнок. Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. 2016;18(1):9-19.).
 39. Hall-Stoodley L., Stoodley P. Evolving concepts in biofilm infections. Cell Microbiol. 2009;11(7):1034-1043.
 40. Miller M.B., Bassler B.L. Quorum sensing in bacteria. Annu Rev Microbiol. 2001;55:165-199.
 41. Leriche V., Briandet R., Carpentier B. Ecology of mixed biofilms subjected daily to a chlorinated alkaline solution: spatial distribution of bacterial species suggests a protective effect of one species to another. Environ Microbiol. 2003;5:64-71.
 42. Al-Bakri A.G., Gilbert P., Allison D.G. Influence of gentamicin and tobramycin on binary biofilm formation by co-cultures of *Burkholderia cepacia* and *Pseudomonas aeruginosa*. J Basic Microbiol. 2005;45:392-396.
 43. Burmolle M., Webb J.S., Rao D., et al. Enhanced biofilm formation and increased resistance to antimicrobial agents and bacterial invasion are caused by synergistic interactions in multispecies biofilms. Appl Environ Microbiol. 2006;72:3916-3923.
 44. Kara D., Luppens S.B., Cate J.M. Differences between single- and dual-species biofilms of *Streptococcus mutans* and *Veillonella parvula* growth, acidogenicity and susceptibility to chlorhexidine. Eur J Oral Sci. 2006;114:58-63.