

Немченко У.М.¹, Кунгурцева Е.А.¹, Григорова Е.В.¹, Белькова Н.Л.¹, Маркова Ю.А.², Носкова О.А.¹,
Чемезова Н.Н.¹, Савилов Е.Д.¹

МОДЕЛИРОВАНИЕ БАКТЕРИАЛЬНЫХ БИОПЛЕНК И ОЦЕНКА ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ ВОЗБУДИТЕЛЕЙ ИНФЕКЦИЙ, СВЯЗАННЫХ С ОКАЗАНИЕМ МЕДИЦИНСКОЙ ПОМОЩИ, К ДЕЗИНФИЦИРУЮЩЕМУ СРЕДСТВУ СЕКУСЕПТ АКТИВ

¹ФГБНУ Научный центр проблем здоровья семьи и репродукции человека, 664003, Иркутск, Россия;

²ФГБУН Сибирский институт физиологии и биохимии растений, 664033, Иркутск, Россия

Изучено действие дезинфицирующего средства Секусепт актив (ДС СА), препарата на основе надуксусной кислоты, на штаммы микроорганизмов, выделенных от пациентов с тяжёлыми инфекционными заболеваниями, находившихся на лечении в детском многопрофильном стационаре регионального уровня. При идентификации культуры отнесены к грамотрицательным неферментирующим бактериям (НГОБ) (22 штамма), семейству Enterobacteriaceae (18 штаммов), к бациллам – 3 штамма. Бицидную активность ДС СА оценивали по степени ингибирования роста бактерий, находящихся в планктонной форме и в биоплёнке (БП) (на плоскостном пластиковом иммунологическом планшете). Способностью образовывать БП обладали все исследуемые штаммы, большая их часть (67,4%) формировала умеренно выраженные БП, особенно выраженный коэффициент биоплёнокообразования имели НГОБ. Выбранные концентрации ДС СА подавляли рост планктонных клеток, способность ДС препятствовать образованию БП зависела от концентрации (наиболее эффективны концентрации 0,8 и 3,0%). Чувствительность к воздействию ДС культур, находящихся в зрелых БП, значимо ниже, особенно устойчивы к такому влиянию БП, сформированные НГОБ и представители сем. Enterobacteriaceae. Подтверждена важность тестирования эффективности биоцидов не только в соответствии со стандартными методиками, разработанными для микроорганизмов, находящихся в планктонной форме, но и в отношении БП.

Ключевые слова: биоциды; Секусепт актив; микроорганизмы; устойчивость; инфекции; связанные с оказанием медицинской помощи (ИСМП); планктонные бактерии; биоплёнки.

Для цитирования: Немченко У.М., Кунгурцева Е.А., Григорова Е.В., Белькова Н.Л., Маркова Ю.А., Носкова О.А., Чемезова Н.Н., Савилов Е.Д. Моделирование бактериальных биопленок и оценка чувствительности возбудителей инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи, к дезинфицирующему средству Секусепт актив. Клиническая лабораторная диагностика. 2020; 65 (10): 652-658. DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2020-65-10-652-658>

Nemchenko U.M.¹, Kungurtseva E.A.¹, Grigorova E.V.¹, Belkova N.L.¹, Markova Y.A.², Noskova O.A.¹, Chemezova N.N.¹, Savilov E.D.¹

SIMULATION OF BACTERIAL BIOFILMS AND ESTIMATION OF THE SENSITIVITY OF HEALTHCARE-ASSOCIATED INFECTION PATHOGENS TO BACTERICIDE SEKUSEPT ACTIVE

¹Scientific Centre for Family Health and Human Reproduction Problems, Irkutsk, Russia;

²Siberian Institute of Physiology and Biochemistry of Plants, Irkutsk, Russia

The effect of bactericide Sekusept active (B SA), a peracetic acid-based preparation, on microbial strains, isolated from patients with severe infectious diseases who were treated in a regional children's multi-specialty hospital, was studied. Based on the biochemical identification, the strains were classified as gram-negative non-fermenting bacteria (22 strains), Enterobacteriaceae family (18 strains), and bacilli – 3 strains. The biocidal activity of B SA was evaluated by the degree of inhibition of the growth of bacterial cells, existing in the planktonic form and in the form of biofilm (on a flat-bottomed plastic immunological tablet). It was shown that all the studied strains had the ability to biofilm formation, most of them (67,4%) formed moderately pronounced biofilms, and non-fermenting bacteria had a particularly pronounced coefficient of biofilm formation. The selected concentrations of B SA inhibited the growth of planktonic cells, and the ability of bactericide to prevent the formation of biofilms depended on the concentration (the most effective concentrations were 0,8 and 3,0%). Sensitivity of the strains existed in the aged biofilm to the bactericide was significantly lower, especially resistant to this effect were biofilms formed by non-fermenting bacteria and representatives of fam. Enterobacteriaceae. Our results confirm the importance of testing the effectiveness of biocides not only in accordance with standard methods developed for microorganisms in planktonic form, but also for biofilms.

Key words: bactericide; Sekusept active; microorganisms; resistance; healthcare-associated infection; planktonic bacteria; biofilms.

For citation: Nemchenko U.M., Kungurtseva E.A., Grigorova E.V., Belkova N.L., Markova Y.A., Noskova O.A., Chemezova N.N., Savilov E.D. Simulation of bacterial biofilms and estimation of the sensitivity of healthcare-associated infection pathogens to bactericide Sekusept active. Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics). 2020; 65 (10): 652-658. (in Russ.) DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2020-65-10-652-658>

For correspondence: Nemchenko U.M., PhD of biological Sciences, researcher of the laboratory of the microbiome and microecology; e-mail: umnemch@mail.ru

Information about authors:

Nemchenko U.M., ORCID iD: 0000-0002-7656-342;

Kungurtseva E.A., ORCID iD: 0000-0002-4535-9397;

Grigorova E.V., ORCID iD: 0000-0001-6588-2591;

Belkova N.L., ORCID iD: 0000-0001-9720-068X;
Markova Y.A., ORCID iD: 0000-0001-7767-4204;
Chemezova N.N., ORCID iD: 0000-0001-5375-7785;
Savilov E.D., ORCID iD: 0000-0002-9217-6876.

Acknowledgment. *The study was performed within the framework of the budget theme № AAAA-A18-118051190033-0.*

Conflict of interests. *The authors declare absence of conflict of interests.*

Received 20.04.2020
Accepted 25.05.2020

Введение. Инфекции, связанные с оказанием медицинской помощи (ИСМП), остаются глобальной мировой проблемой в силу широкого распространения, негативных последствий для здоровья пациентов, персонала медицинских учреждений и экономики государства [1-3]. Ежегодно в России регистрируется до 30 тыс. случаев ИСМП (официальная статистика), по мнению экспертов, эта величина достигает 2 млн. При этом длительность госпитализации пациентов с ИСМП возрастает трёхкратно, риск летального исхода – от 4 до 15 раз. Предполагают, что к 2050 г. число больных ИСМП достигнет 10 млн человек [2].

Наиболее тяжёлые формы ИСМП вызывают госпитальные штаммы, обладающие полирезистентностью к антимикробным препаратам (АМП). Инфекции, вызванные устойчивыми к АМП возбудителями, часто нивелируют не только результаты лечения в отделениях общего профиля и интенсивной терапии, но и результаты дорогостоящих высокотехнологичных и жизненно важных вмешательств [4].

Множественная резистентность госпитальной микрофлоры к АМП, в том числе к антисептикам и дезинфектантам, обусловлена преимущественным её существованием в виде биоплёночных сообществ и микробных консорциумов, способных колонизировать организм пациента, адгезироваться на инвазивных медицинских изделиях [5].

Одним из приоритетных направлений профилактики ИСМП является совершенствование микробиологического мониторинга возбудителей ИСМП, в т. ч. повышение эффективности дезинфекционных мероприятий, которые относятся к ключевым направлениям эпидемиологического надзора при ИСМП. Данное направление включает (наряду с другими аспектами) разработку методики определения чувствительности / устойчивости госпитальных штаммов микроорганизмов к дезинфицирующим средствам (ДС), т. к. многие методические вопросы проведения мониторинга устойчивости к ДС по-прежнему остаются актуальными. Разработаны методические указания МУ 3.5.1.3439-17 «Оценка чувствительности к дезинфицирующим средствам микроорганизмов, циркулирующих в медицинских организациях» (утв. 13.03.2017). Указанные МУ распространяются на микроорганизмы, находящиеся в планктонной форме¹. В составе биоплёнок (БП) клетки значительно более устойчивы к воздействию неблагоприятных факторов физической, химической, биологической природы, в т. ч. АМП [6-8].

Результаты тестирования ДС на планктонных клетках не могут быть экстраполированы для прогнозирова-

ния эффективности ДС в отношении бактериальных БП [9,10]. Отсутствует быстрый воспроизводимый метод оценки эффективности АМП и ДС по отношению к БП. Исследований, направленных на изучение чувствительности бактериальных БП к ДС и АМП недостаточно [11-13].

Одним из высокоэффективных средств для дезинфекции, очистки и стерилизации медицинского оборудования является актив ДС Секусепт актив (ДС СА), содержащее в качестве активного компонента надуксусную кислоту, относящуюся к кислородсодержащей группе. ДС СА оказывает антимикробный эффект, разрушая клетки грамположительных и грамотрицательных бактерий. Эффективен в отношении микобактерий туберкулёза, оказывает спороцидное действие. По степени воздействия на организм по ГОСТ 12.1.007-76 относится к 3 и 4 классу умеренно и малоопасных веществ [14].

Цель исследования – сравнительная оценка чувствительности возбудителей ИСМП, находящихся в планктонной и биоплёночной форме, к дезинфицирующему средству Секусепт актив.

Материал и методы. Штаммы микроорганизмов. Штаммы получены от пациентов с тяжёлыми инфекционными заболеваниями (сепсис, острый гематогенный остеомиелит, перитонит, пневмония) из отделений реанимации и интенсивной терапии детского многопрофильного стационара регионального уровня (г. Иркутск) в период с января 2018 г. по декабрь 2019 г. Материал для исследования – кровь, мокрота, смывы с трахеобронхиального дерева, зев, раневое отделяемое, жидкость из брюшной полости. Идентификацию клинических изолятов (43 штамма бактерий) осуществляли по морфологическим, тинкториальным, культуральным, биохимическим свойствам. Выделенные культуры относились к НГОБ (22 штамма) и сем. *Enterobacteriaceae* (18 штаммов), к бациллам – 3 штамма.

Дезинфицирующее средство. Использовано кислородсодержащее ДС СА производства компании «Эколаб Дойчленд ГмбХ» (Германия). Согласно инструкции производителя для дезинфекции и стерилизации инструментов медицинского назначения при бактериальных, вирусных инфекциях и кандидозе рекомендуются концентрации 0,5; 1,0; 2,0%. Учитывая данные литературы о большей устойчивости БП к воздействию АМП и ДС по сравнению с планктонными формами, использованы более высокие концентрации ДС СА: 0,8; 1,5; 3,0%. Указанные концентрации готовили в стерильной дистиллированной воде при температуре 22-25°C.

Подготовка культур. Способность культур образовывать БП, ингибирование процесса биоплёнокообразования, деструкцию зрелой БП под действием ДС моделировали с помощью определения способности микроорганизмов к адгезии на поверхности 96-ти луночного стерильного плоскостонного пластикового иммунологического план-

¹ МУ 3.5.1.3439-17 «Оценка чувствительности в дезинфицирующим средствам микроорганизмов, циркулирующих в медицинских организациях» (утв. 13.03.2017)

шета. Использовали суточную культуру бактерий в планктонной форме, суспендированную в мясо-пептонном бульоне (МПБ). Стартовую концентрацию исследуемых культур доводили до одной оптической плотности (ОП), которая составила 0,200-0,300 единиц при длине волны 492 нм, что эквивалентно $1,5 \times 10^8$ КОЕ/мл или 0,5 по McFarland. Тестируемые штаммы инокулировали в количестве 150 мкл в лунку планшета в 4-х повторностях. Контролем фона служил стерильный МПБ, так же вносимый в 4-х повторностях по 150 мкл.

Ингибирование образования БП ДС. Для определения способности ДС ингибировать образование БП в планшет с культурой вносили по 50 мкл ДС в тестируемых концентрациях, контролем служила стерильная вода. Планшеты культивировали во влажной камере в термостате в течение 48-ми час. По окончании срока инкубации планктонные клетки удаляли из лунок пипетированием, планшет трёхкратно промывали стерильной дистиллированной водой.

Окраска БП и определение ОП. В лунки добавляли 150 мкл дистиллированной воды и 20 мкл 1% генциан-виолета и инкубировали в течение 45 мин при комнатной температуре. Не связавшийся краситель удаляли путём трёхкратной отмывки дистиллированной водой. Затем в лунки добавляли по 200 мкл 95% этанола для экстракции связавшегося с биомассой красителя и измеряли ОП раствора при длине волны 492 нм. Для контрольных лунок все действия аналогичны. Интенсивность окрашивания содержимого лунок соответствовала степени плёнкообразования.

Количественным выражением активности образования БП служили значения ОП, измеряемые на микропланшетном фотометре STAT FAX®4300 (Awareness Technology Inc, USA) [15,16].

Деструкция ДС зрелых БП. Для определения способности ДС разрушать зрелую БП из планшета с исследуемыми культурами через 48 час инкубации удаляли планктонные клетки, планшет трёхкратно промывали стерильной дистиллированной водой и вносили в каждую лунку по 150 мкл стерильной воды и 50 мкл ДС в тестируемых концентрациях. В контрольные лунки вносили 150 мкл стерильной воды. Планшеты инкубировали 24 час. Дальнейший порядок действий аналогичен вышеизложенному.

Контроль биоплёнкообразования. Для определения контрольных значений биоплёнкообразования культуры не подвергалась воздействию ДС. После 48-ми час инкубирования БП окрашивали по выше изложенной методике. Полученные в экспериментах значения ОП использовали для расчёта коэффициента биоплёнкообразования (КБП) и сравнивали между собой.

Учёт результатов ОП. КБП рассчитывали после измерения ОП окрашенных лунок во всех планшетах как отношение $A_{492, \text{эксп}} / A_{492, \text{контроль}}$ [17,18]. Контролем служила ОП стерильного МПБ. Результаты интерпретировали следующим образом: при значениях $\text{КБП} \leq 2$ единиц штаммы относили к слабообразующим БП; при КБП от 2 до 3,99 – штаммы обладали умеренной способностью к образованию БП; при КБП от 3,99 и выше – высокой способностью к образованию БП.

Влияние ДС СА на процессы ингибирования и деструкции БП определяли как отношение ОП БП, подвергшихся влиянию ДС, к ОП БП культур, не подвергавшихся влиянию ДС ($\text{БП}_{\text{инг или дестр}} / \text{БП}_{\text{без ДС}}$) [19]. Для установления исходного уровня, превышение которого можно интерпретировать как способность ДС ингибировать образование или разрушать уже сформированную БП использованы следующие показатели: <0,5 ДС ингибирует или разрушает БП; от 0,5 до 0,7 – ДС слабо ингибирует или разрушает БП; от 0,7 и выше – ДС не ингибирует и не разрушает БП.

Прирост планктонных клеток в лунках планшета определяли по формуле: $\text{ОП}_{\text{кон}} / \text{ОП}_{\text{нач}}$, где $\text{ОП}_{\text{кон}}$ – оптическая плотность суспензии планктонных клеток бактерий через 48 ч культивирования, $\text{ОП}_{\text{нач}}$ – исходная

Таблица 1

Исследованные микроорганизмы

Вид	Количество штаммов
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	13
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	10
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	9
<i>Serratia marcescens</i>	3
<i>Acinetobacter baumannii</i>	3
<i>Enterobacter cloacae</i>	1
<i>Escherichia coli</i>	1
<i>Bacillus</i> spp.	3

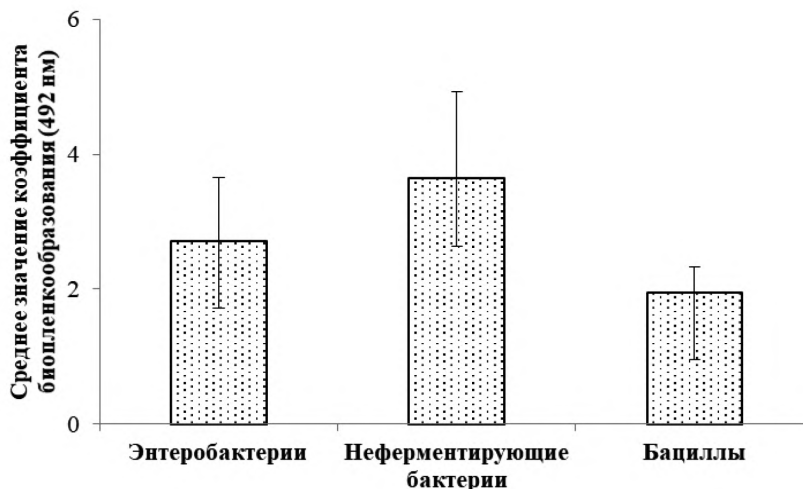


Рис. 1. Среднее значение коэффициента биообразования у разных видов возбудителей ИСМП.

Таблица 2

Планктонные клетки культур, рост которых варьировал под действием ДС СА (абс./%)

Концентрация ДС СА (%)	Отсутствие роста	Слабый рост	Значительный рост
0*	1 / 2,3	3 / 7,0	39 / 90,7
0,8	32 / 74,4	8 / 18,6	3 / 7,0
1,5	30 / 69,7	13 / 30,3	–
3,0	29 / 67,4	14 / 32,6	–

Примечание. * – ДС СА подавляет рост планктонных клеток, разница значима между ОП до и после воздействия ДС ($p < 0,001$).

Таблица 3

Влияние ДС СА на образование БП (доля чувствительных биопрёнкообразующих культур, %)

Концентрация ДС СА, %	Соотношение БП _{инг} /БП _{без ДЗ}		
	<0,5	от 0,5 до 0,7	0,7 и выше
0,8	67,4	23,3	9,3
1,5	55,8	11,6	32,6*
3,0	72	14,0	14,0

Примечание. * – концентрация 1,5% не ингибирует биопрёнкообразование ($\chi^2=4,17$ между концентрациями 1,5 и 3%; $\chi^2=7,03$ между концентрациями 0,8 и 1,5%; $p < 0,05$).

Таблица 4

Влияние ДС СА на разрушение зрелой БП (доля чувствительных биопрёнкообразующих культур, %)

Концентрация ДС СА (%)	Соотношение БП _{дестр} /БП _{без ДЗ}		
	<0,5	от 0,5 до 0,7	0,7 и выше
0,8	30,2	9,3	60,5*
1,5	34,9	20,9	44,2
3,0	41,9	20,9	37,2

Примечание. * – концентрация 0,8% не разрушает зрелую биопренку ($\chi^2=4,15$ между концентрациями 3% и 0,8%; $p < 0,05$).

плотность. Если показатель равен 1, прирост отсутствует, от 1 до 2 – слабый, больше 2 прирост считается значительным [20].

Статистическая обработка данных произведена при помощи лицензионных прикладных программ «MS Excel for Windows». Вычислялись основные показатели параметрических методов вариационной статистики (средняя арифметическая, достоверность полученных результатов), непараметрические критерии оценки достоверности (критерий χ^2 , U-критерия Манна-Уитни). Критический уровень значимости (P) принят равным 0,05 [21].

Результаты. Клинические изоляты выделяли со слизистой оболочки зева и носа (39,5%), смывов с трахеобронхиального дерева и мокроты (30,2%), в 18,6% – из крови (табл. 1).

Способностью к биопрёнкообразованию обладали все исследуемые штаммы, при этом большая их часть (67,4%) формировала умеренно выраженные БП, высокой и слабообразующей способностью образовывать БП обладали по 16,3% соответственно.

НГОБ (*P. aeruginosa*, *A. baumannii*, *S. maltophilia*) имели более выраженный КБП, чем энтеробактерии и бациллы (в среднем КБП НГОБ $3,64 \pm 1,29$; энтеробактерий $2,71 \pm 0,94$; бацилл $1,95 \pm 0,38$) (рис. 1).

При изучении роста микробной популяции без воздействия и под воздействием ДС установлено, что планктонные клетки возбудителей ИСМП обладают значительной скоростью роста, увеличивая за 48 час культивирования ОП более чем в два раза по сравнению с начальной (табл. 2). Выбранные концентрации ДС эф-

фективно подавляют рост планктонных клеток и только 7% культур не чувствительны к концентрации 0,8% ($p < 0,001$, см., табл. 2).

Способность ДС СА препятствовать образованию БП зависела от концентрации: самыми эффективными являлись концентрации 0,8 и 3%; соотношение БП_{инг}/БП_{без ДЗ} <0,5 в 67,4 и 72% соответственно. Концентрация ДС 1,5% меньше ингибировала образование БП – соотношение БП_{инг}/БП_{без ДЗ} от 0,7 и выше в 32,6% случаев (табл. 3).

Чувствительность к воздействию ДС культур, находящихся в зрелых БП, значимо ниже, соотношение БП_{дестр}/БП_{без ДЗ} <0,5 менее, чем в 50% случаев, при этом наименее эффективна концентрация 0,8% (табл. 4).

КБП культур, пребывающих в зрелых БП значимо выше, чем у культур, подвергшихся воздействию ДС до начала формирования БП, не зависит от концентрации ($U_{Эмп} = 483,5$ для 3%; $U_{Эмп} = 622,5$ для 1,5%; $U_{Эмп} = 322,5$ для 0,8%, $p < 0,01$).

Проанализировано влияние ДС на КБП различных видов возбудителей ИСМП. ДС в концентрациях 0,8 и 3% не разрушает зрелые БП НГОБ, КБП НГОБ в экспериментах по определению деструкции выше, чем при ингибировании ($U_{Эмп} = 107,5$ и 136 соответственно, $p < 0,01$) (рис. 2).

У энтеробактерий КБП зрелых БП выше при воздействии концентрации 0,8 и 3,0% ($U_{Эмп} = 88$ и 47, $p < 0,01$), для бацилл значимой разницы не обнаружено (рис. 3).

Обсуждение. Способность к образованию БП возбудителями ИСМП является основным фактором выживаемости. Микроорганизмы, находящиеся внутри БП,

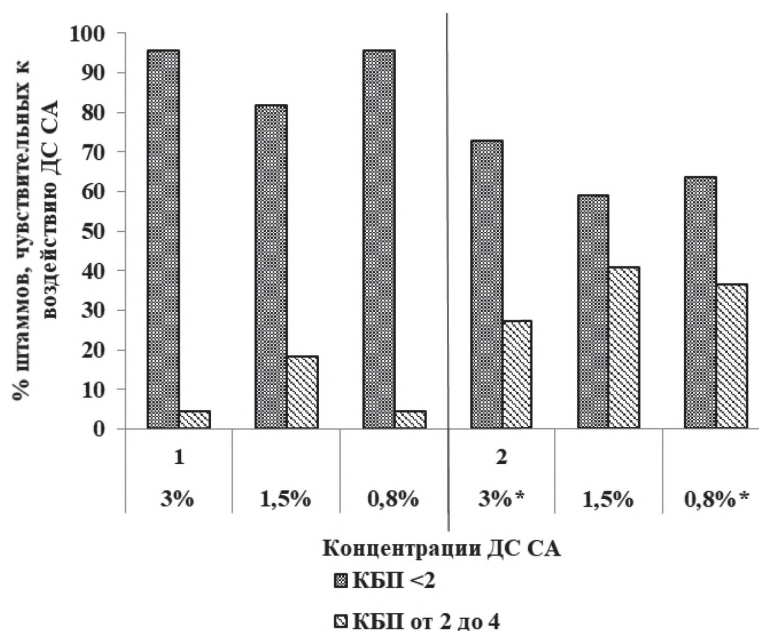


Рис. 2. Сравнение КБП при различном влиянии ДС СА на био пленки неферментирующих бактерий. * – КБП от 2 до 4 значимо выше в зрелой БП для концентраций 0,8 и 3,0%; $p < 0,01$.

1 – влияние ДС СА на образование БП (ингибирование); 2 – влияние ДС СА на разрушение БП (деструкция).

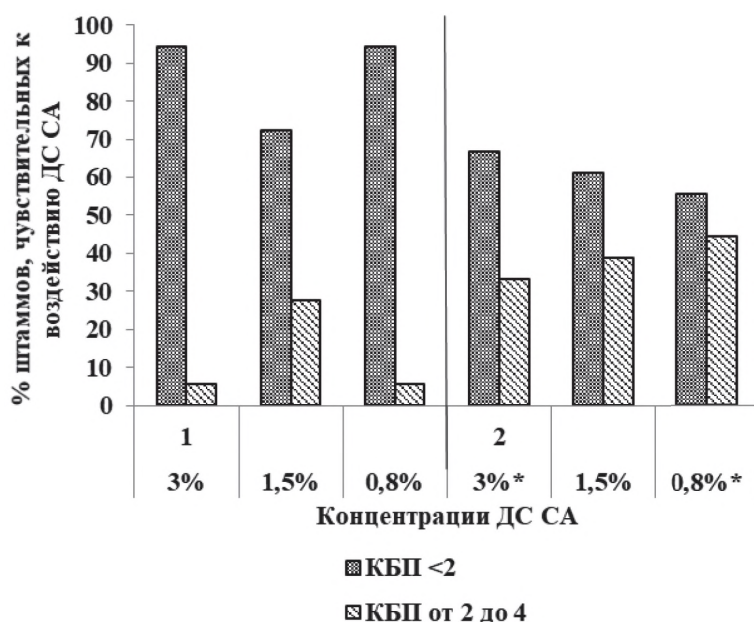


Рис. 3. Сравнение КБП при различном влиянии ДС СА на био пленки энтеробактерий. * – КБП от 2 до 4 значимо выше в зрелой БП для концентраций 0,8 и 3%; $p < 0,01$.

1 – влияние ДС СА на образование БП (ингибирование); 2 – влияние ДС СА на разрушение БП (деструкция).

проявляют повышенную устойчивость к АМП и биоцидам и служат в качестве резервуара патогенов в больнице, вызывая высокий процент ИСМП [6,8].

Способностью формировать БП обладали все штаммы изученных возбудителей ИСМП, более 80% культур обладали высокой и умеренно выраженной способностью к био пленкообразованию. Наибольший КБП имели НГОБ, что является одной из причин их лидерства среди возбудителей ИСМП в РФ [22].

Обязательным атрибутом ДС, используемых в клинической среде, является их высокая биоцидная эффективность, конечным результатом воздействия ДС должно являться полное уничтожение микроорганизмов на обрабатываемом объекте. Научные исследования по изучению эффективности действия препаратов биоцидов на бактерии в составе БП немногочисленны и фрагментарны [23,24], что тормозит разработку вопросов эпидемиологического надзора за ИСМП.

Модифицирован планшетный метод определения чувствительности к ДС СА планктонных культур и БП микроорганизмов, возбудителей ИСМП. ДС выбранных концентраций вносили одновременно с суспензией клеток для проверки эффективности воздействия на формирующиеся БП, после удаления планктонных клеток для оценки способности разрушать ДС зрелые БП.

Показано, что ДС СА подавляет рост планктонных клеток, но не препятствует образованию БП, которое значительно при концентрации 1,5% у более 30% культур, концентрации 0,8 и 3% не эффективны в 9,3 и 14% случаев. Сохранение способности к биоплёнокообразованию под воздействием ДС способствует селекции устойчивых микроорганизмов, поддерживая их длительную персистенцию во внутрибольничной среде [25].

Представляет интерес вопрос об эффективности ДС против патогенов ИСМП, уже сформировавших БП, прикрепленные к поверхности. Некоторые биоциды не эффективны против биоплёнокообразующих бактерий, их суббактерицидные концентрации индуцируют образование БП, тем самым поддерживая ИСМП [26,27].

Нами показано, что чувствительность к воздействию ДС клеток, находящихся в зрелых БП, значимо ниже, тестируемые концентрации ДС не разрушают БП у более чем 60% культур, КБП выше, чем у культур, подвергшихся воздействию ДС до начала формирования БП. БП, образованные НГОБ и представителями сем. *Enterobacteriaceae*, более устойчивы к концентрациям 0,8 и 3%, чем бациллы. Причины этого явления могут быть связаны, со структурой и физиологическими особенностями самой БП (наличием внеклеточного полимерного матрикса, уменьшением проницаемости со снижением метаболизма клеток, ферментативной инактивацией биоцидов, активацией эффлюксных систем), адаптацией бактерий к систематическому воздействию ДС, сопровождающейся фенотипическими изменениями клеток [24,28].

Заключение. Методические указания МУ 3.5.1.3439-17 разработаны для микроорганизмов, находящихся в планктонном состоянии, без учёта их способности образовывать БП. Для достижения антимикробного эффекта в отношении микробных клеток в составе БП требуются более высокие концентрации ДС.

Исследования по действию ДС СА на возбудителей ИСМП свидетельствуют о его активности в отношении планктонных клеток и ингибирующем влиянии на образование этими штаммами БП. Это воздействие не полностью удаляет сформированные БП. Полученные результаты подтверждают важность тестирования эффективности биоцидов не только в соответствии со стандартными указаниями, но и в отношении БП, что требует самостоятельных методических подходов и разработки унифицированных методов.

Финансирование. Работа выполнена в рамках бюджетной темы № АААА-А18-118051190033-0.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА (пп. 3, 6-10, 12, 13, 18, 26-28
см. REFERENCES)

1. Акимкин В.Г. Актуальные направления научных исследований в области неспецифической профилактики инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи. *Поликлиника*. 2014; 6: 6-9.
2. Найговзина Н.Б., Попова А.Ю., Бирюкова Е.Е., Ежлова Е.Б., Игонина Е.П., Покровский В.И., Акимкин В.Г. «и др.». Оптимизация системы мер борьбы и профилактики инфекций, связанных с ока-

- занием медицинской помощи в Российской Федерации. *Эпидемиология и инфекционные болезни. Актуальные вопросы*. 2018; 1:6-14.
4. Давыдов Д.С. Национальная стратегия Российской Федерации по предупреждению распространения устойчивости патогенных микроорганизмов к антимикробным препаратам: трудности и перспективы сдерживания одной из глобальных биологических угроз XXI века. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение*. 2018; 18(1):50-6.
 5. Галимзянов Х.М., Башкина О.А., Досмуханова Э.Г., Абдрахманова Р.О., Демина Ю.З., Даудова А.Д. и др. Клиническое значение биоплёнокообразования у бактерий. *Астраханский медицинский журнал*. 2018; 13(4):32-42.
 11. Ковалишена О.В., Алебашина Л.А., Саперкин Н. В. Устойчивость *Pseudomonas aeruginosa* и *Staphylococcus aureus* к дезинфектантам: систематический обзор. *Журнал МедиАль*. 2014; 3 (13):72-7.
 14. Абрамова И. М., Пантелеева Л. Г., Федорова Л. С., Левчук Н. Н., Дьяков В. В., Панкратова Г. П. и др. Инструкция № 03/05-11 по применению средства «Секусепт Актив» для дезинфекции, очистки и стерилизации изделий медицинского назначения М.; 2011.
 15. Анганова Е. В., Савилов Е. Д., Ушкарева О. А., Аблов А. М., Духанина А. В. Способность патогенных и условно-патогенных энтеробактерий к формированию биопленок. *Acta Biomedica Scientifica*. 2014; 5 (99):34-7.
 17. Малафеева Э. В., Гульнева М. Ю., Носков С. М., Романов В. А. Формирование биопленок условно-патогенными микроорганизмами, выделенными у больных с ревматическими заболеваниями. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2014; 59 (11): 53-5.
 19. Плюта В.А., Андреев Ю.В., Кузнецов А.Е., Хмель И.А. Образование биоплёнок *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 в присутствии перекиси водорода; влияние гена *aiiA*. *Молекулярная генетика, микробиология и вирусология*. 2013; 4:10-4.
 20. Савилов Е.Д., Маркова Ю.А., Немченко У.М., Носкова О.А., Чemezova Н.Н., Кунгурцева Е.А., Духанина А.В. Способность к биоплёнокообразованию у возбудителей инфекций, выделенных от пациентов крупного многопрофильного детского стационара. *Тихоокеанский медицинский журнал*. 2020; 1:32-5. doi: 10.34215/1609-1175-2020-1-32-35.
 21. Савилов Е.Д., Астафьев В.А., Жданова С.Н., Заруднев Е.А. Эпидемиологический анализ. Методы статистической обработки материала. Новосибирск; 2011: 156.
 22. Склеенова Е.Ю., Азизов И.С., Шек Е.А., Эйдельштейн М.В., Козлов Р.С., Дехнич А.В. *Pseudomonas aeruginosa* в РФ: история одного из наиболее успешных нозокомиальных патогенов. *Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия*. 2018; 3:164-71.
 23. Дегушева Е.В., Родин В.Б., Слукин П.В., Ершова О.Н., Александрова И.А., Курдюмова Н.В. и др. Чувствительность нозокомиальных штаммов *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa*, *A. baumannii* и *P. mirabilis* к антисептику на основе хлоргексидина. *Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия*. 2015; 17(1):57-66.
 24. Окулич В.К., Кабанова А.А., Плотников Ф.В. Микробные биопленки в клинической микробиологии и антибактериальной терапии. Витебск: ВГМУ; 2017: 300.
 25. Кобзев Е. Н., Чугунов В. А., Родин В. Б., Дегушева Е. В., Слукин П. В., Фёдорова Л. С., Акимкин В. Г. Формирование устойчивости микроорганизмов к дезинфицирующим средствам и пути решения проблемы. *Эпидемиология и инфекционные болезни*. 2014; 6:48-54.

REFERENCES

1. Akimkin V.G. Actual directions of scientific research in the field of non-specific prevention of infections associated with medical care. *Poliklinika*. 2014; 6: 6-9. (in Russian)
2. Naygovzina N.B., Popova A.Yu., Biryukova E.E., Ezhlova E.B., Igonina E.P., Pokrovskiy V.I., Akimkin V.G. et al. Optimization of the system of measures to control and prevent infections associated with the provision of medical care in the Russian Federation. *Epidemiologiya i infeksionnye bolezni. Aktual'nye voprosy*. 2018; 1: 6-14. (in Russian)
3. Khan H.A., Baig F.K., Mehboob R. Nosocomial infections: Epidemiology, prevention, control and surveillance. *Asian Pac. J. Trop. Biomed*. 2017; 7(5): 478-82. <https://doi.org/10.1016/j.apjtb.2017.01.019>

4. Davydov D. S. National strategy of the Russian Federation to prevent the spread of pathogenic microbial resistance to antimicrobial drugs: difficulties and prospects for containing one of the global biological threats of the XXI century. *BIOpreparaty. Profilaktika, diagnostika, lechenie*. 2018; 18(1):50-6. (in Russian)
5. Galimzyanov Kh.M., Bashkina O.A., Dosmukhanova E.G., Abdrahmanova R.O., Demina Yu.Z., Daudova A.D. et al. Clinical importance of biofilm formation in bacteria. *Astrakhanskiy meditsinskiy zhurnal*. 2018; 13(4):32-42. (in Russian)
6. Oz Y., Dag I., Kiraz N. Efficacy of disinfectants on *Candida* biofilms at different concentrations and contact time. *British Microbiology Research Journal*. 2012; 2(2):40-52 <https://doi.org/10.9734/BMRJ/2012/1281>.
7. Carter M.Q., Louie J.W., Feng D., Zhong W., Brandl M.T. Curli fimbriae are conditionally required in *Escherichia coli* O₁₅₇:H₇ for initial attachment and biofilm formation. *Food Microbiol.* 2016; 57: 81-9. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2016.01.006>.
8. Shittu A. S., Ja'afaru. Effect of biocides on biofilms of some multi-drug resistant clinical bacterial isolates. *Bayero Journal of Pure and Applied Sciences*. 2017;10(1): 126-32. <http://dx.doi.org/10.4314/bajopas.v10i1.26S>.
9. Lee K.W., Periasamy S., Mukherjee M., Xie C., Kjelleberg S., Rice S.A. Biofilm development and enhanced stress resistance of a model, mixed-species community biofilm. *ISME J*. 2014; 8:894-907. <https://doi.org/10.1038/ismej.2013.194>
10. Sanchez-Vizuet P., Orgaz B., Aymerich S., Le Coq D., Briand R. Pathogens protection against the action of disinfectants in multispecies biofilms. *Front. Microbiol.* 2015; 6:705. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00705>
11. Kovalishena O.V., Alebashina L. A., Saperkin N. V. Resistance of *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus* to disinfectants: a systematic review. *Zhurnal Meditsiny*. 2014; 3 (13):72-7. (in Russian)
12. Jurgens D.J., Sattar S.A., Mah T.F. Chloraminated drinking water does not generate bacterial resistance to antibiotics in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Lett. Appl. Microbiol.* 2008; 46 (5):562-7. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2008.02354.x>
13. Saitou K., Furuhashi K., Kawakami Y., Fukuyama M. Biofilm formation abilities and disinfectant-resistance of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from cockroaches captured in hospitals. *Biocontrol. Sci.* 2009; 14 (2):65-8. <https://doi.org/10.4265/bio.14.65>
14. Abramova I.M., Panteleeva L.G., Fedorova L.S., Levchuk N.N., D'yakov V.V., Pankratova G.P. et al. Instruction no. 03/05-11 on the use of Secusept Active for disinfection, cleaning and sterilization of medical devices. Moscow; 2011. (in Russian)
15. Anganova E. V., Savilov E. D., Ushkareva O. A., Ablov A. M., Dukhanina A. V. Ability of pathogenic and opportunistic enterobacteria to formation of biofilms. *Acta Biomedica Scientifica*. 2014; 5 (99):34-7. (in Russian)
16. O'Toole G. A. Microtiter dish biofilm formation assay. *J. Vis. Exp.* 2011; 47:2437. <https://doi.org/10.3791/2437>.
17. Malafeeva E. V., Gul'neva M. Yu., Noskov S. M., Romanov V. A. The formation of bio-films by opportunistic microorganisms isolated from patients with rheumatic diseases. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika*. 2014; 59 (11): 53-5. (in Russian)
18. Christensen G.D., Simpson W.A., Younger J.J., Baddour L.M., Barrett F.F., Melton D.M., Beachey E.H. Adherence of Coagulase-Negative *Staphylococci* to Plastic Tissue Culture Plates: A Quantitative Model for the Adherence of *Staphylococci* to Medical Devices. *J. Clin. Microbiol.* 1985; 22:996-1006.
19. Plyuta V.A., Andreenko Yu.V., Kuznetsov A.E., Khmel' I.A. Formation of *Pseudomonas aeruginosa* RAO1 biofilms in the presence of hydrogen peroxide; influence of the *aiiA* gene. *Molekulyarnaya genetika, mikrobiologiya i virusologiya*. 2013; 4:10-4. (in Russian)
20. Savilov E.D., Markova Yu.A., Nemchenko U.M., Noskova O.A., Chemezova N.N., Kungurtseva E.A., Dukhanina A.V. Ability to biofilm formation in infectious agents isolated from patients of a large general children's hospital. *Tikhookeanskiy meditsinskiy zhurnal*. 2020; 1:32-5. doi: 10.34215/1609-1175-2020-1-32-35. (in Russian)
21. Savilov E.D., Astaf'ev V.A., Zhdanova S.N., Zarudnev E.A. The epidemiological analysis. Methods of statistical processing of the material. Novosibirsk; 2011. (in Russian)
22. Skleenova E.Yu., Azizov I.S., Shek E.A., Eydel'shteyn M.V., Kozlov R.S., Dekhnich A.V. *Pseudomonas aeruginosa*: the history of one of the most successful nosocomial pathogens in Russian hospitals. *Klinicheskaya mikrobiologiya i antimikrobnaya khimioterapiya*. 2018; 3:164-71. (in Russian)
23. Detusheva E. V., Rodin V. B., Slukin P. V., Ershova O. N., Aleksandrova I. A., Kurdyumova N. V. et al. Sensitivity of nosocomial strains of *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa*, *A. baumannii* and *P. mirabilis* to chlorhexidine-based antiseptics. *Klinicheskaya mikrobiologiya i antimikrobnaya khimioterapiya*. 2015; 17(1):57-66. (in Russian)
24. Okulich V.K., Kabanova A.A., Plotnikov F.V. Microbial biofilms in clinical Microbiology and antibacterial therapy. Vitebsk: VGMU; 2017.
25. eSmith K., Hunter I. S. Efficacy of common hospital biocides with biofilms of multi-drug resistant clinical isolates. *J. Med. Microbiol.* 2008; 57(8): 966-73. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.47668-0>.
26. Ebrahimi A., Hemati M., Habibian Dehkordi S., Bahadoran S., Khoshnood S., Khubani 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; 14;9(2): e14298. doi: 10.17795/jjnpp-14298.
27. Markova J.A., Turskaya A.L., Bybin V.A., Anganova E.V., Savilov E.D. Regulation of *Escherichia coli* biofilm formation (Review). *Applied Biochemistry and Microbiology*. 2018; 54 (1).

Поступила 20.04.20

Принята к печати 25.05.20