



## Спорообразующие бактерии – возбудители заболеваний дыхательной системы и предотвращение их распространения в стационаре

Г.В. Тец, В.В. Тец, Н.К. Артеменко

Рассмотрена активность антисептиков в отношении спорообразующих бактерий, вызывающих заболевания дыхательной системы. Изучено действие мультицида на планктонно растущие культуры спорообразующих бактерий и их биопленки. Показано, что мультицид эффективен в отношении планктонных культур, при этом проникает в биопленки и убивает все вегетативные клетки и споры.

**Ключевые слова:** мультицид, биопленки, спорообразующие бактерии.

Среди бактерий, вызывающих заболевания дыхательной системы, наименее известными являются спорообразующие. В значительной степени это связано с недостаточной изученностью этой группы микроорганизмов. Долгое время практически единственной известной бактерией был возбудитель сибирской язвы *Bacillus anthracis*. В последние годы благодаря изучению ранее неизвестных бактерий в микрофлоре человека и среди возбудителей его болезней появились названия малоизвестных или неизвестных ранее спорообразующих микроорганизмов. Начиная с конца 1990-х годов описано несколько случаев пневмонии и трахеобронхита, вызванных спорообразующими бактериями *Bacillus cereus* [1–3].

Заболевания, вызванные этими бактериями, характеризовались тяжелым течением. В числе возбудителей пневмонии идентифицированы также анаэробные спорообразующие грамположительные бактерии *Clostridium difficile*, известные как возбудители кишечных инфекций [4]. Еще одними потенциально опасными воз-

будителями пневмоний являются недавно открытые представители рода *Paenibacillus*. Бактерии этого рода являются аэробными грамположительными спорообразующими палочками. Ранее неизвестные у человека представители этого рода выделены у пациентов с эндокардитом, бактериемией, раневой инфекцией [5, 6]. Нами в ротовой полости у детей были обнаружены и выделены спорообразующие бактерии по гену, кодирующему 16S рибосомальную РНК, близкие к роду *Paenibacillus*. Всё изложенное свидетельствует о том, что при диагностике, лечении и профилактике заболеваний дыхательной системы необходимо учитывать возможное распространение спорообразующих бактерий. Из этого, в частности, следует, что антисептики и дезинфектанты, используемые в пульмонологических стационарах, должны эффективно уничтожать не только вегетативные формы, но и споры бактерий.

В связи с этим мы изучали действие нового антисептика – мультицида – на вегетативные формы и споры бактерий при планктонном росте и в составе биопленок.

### Материал и методы

В работе использованы стандартный штамм *B. subtilis* ATCC, питательные среды LB и LA (Oxoid), препарат мультицид.

*Получение и изучение биопленок и планктонно растущих бактерий.* Изучение биопленок проводили с помощью разработанных нами

Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. акад. И.П. Павлова.

**Георгий Викторович Тец** – канд. мед. наук, ст. науч. сотр. лаборатории иммунологии Научно-исследовательского центра.

**Виктор Вениаминович Тец** – профессор, зав. кафедрой микробиологии, вирусологии и иммунологии.

**Наталья Константиновна Артеменко** – канд. мед. наук, доцент кафедры микробиологии, вирусологии и иммунологии.

Таблица 1. Действие мультицида на биопленку *B. subtilis*

| Проба                          | Количество бактерий в биопленке, КОЕ |                         |
|--------------------------------|--------------------------------------|-------------------------|
|                                | до прогрева                          | после прогрева при 80°C |
| Контрольная (добавлена вода)   | $2,5 \times 10^7$                    | $2,0 \times 10^2$       |
| Водный 0,1% раствор мультицида | Нет роста                            | Нет роста               |

методов [7]. При этом биопленки выращивали на дне лунок пластиковых 96-луночных планшетов (Sarstedt, Германия). В лунки вносили по 0,1 мл бульонной культуры бактерий ( $5 \times 10^5$  колониеобразующих единиц (КОЕ)), выращивали в течение 24 ч при температуре 37°C. Испытуемый препарат добавляли через 48 ч. Для оценки состояния биопленок жидкое содержимое лунок удаляли, трехкратно промывали фосфатным буфером, высушивали, окрашивали раствором генцианвиолета (50 мкл/лунка) в течение 10 мин, промывали фосфатным буфером, добавляли 96° этиловый спирт (200 мкл/лунка) и учитывали результаты на ридере Stat Fax 2100 (Awareness Technology, США). Выживаемость бактерий определяли по числу КОЕ после высева материала биопленок на агаризованную среду. Количество бактерий, растущих планктонно, определяли в надосадочной жидкости, удаленной с поверхности биопленок. Для отделения спор от вегетативных клеток взвесь ресуспендированной биопленки или среду с планктонно растущими бактериями прогревали в течение 30 мин при 80°C. После прогрева делали высева на питательную среду.

## Результаты

Изучаемый препарат добавляли к 48-часовой биопленке в конечной концентрации 0,1% на 1 мин и удаляли с поверхности биопленок путем трехкратного смывания изотоническим раствором хлорида натрия. При обработке бактерий, растущих планктонно, препарат добавляли к культуре и затем отделяли его от взвеси путем

центрифугирования (центрифуга MiniSpin, Eppendorf, Германия). Все остальные этапы исследования были идентичными в опытных и контрольных пробах. Полученные данные свидетельствуют о том, что в надбиопленочной жидкой среде у планктонно растущих микроорганизмов бактерии и споры в сумме давали рост в количестве  $9,8 \times 10^8$ , количество спор составляло  $3,0 \times 10^3$  в 1 мл.

В биопленке суммарное количество вегетативных форм и спор было  $2,5 \times 10^8$ , спор –  $2,0 \times 10^3$  в 1 мл.

Через 1 мин воздействия 0,1% раствором мультицида прогретые и непрогретые пробы после высева роста не дали. Таким образом, очевидно, что мультицид в виде 0,1% раствора эффективно убивает вегетативные клетки и споры *B. subtilis* (табл. 1).

В тех же условиях препарат проникает в биопленку использованного штамма *B. subtilis* и также в течение 1 мин убивает все вегетативные формы и споры. Полученные экспериментальным путем данные, результаты наших предыдущих исследований, а также данные литературы позволяют сравнить свойства различных наиболее часто используемых антисептиков (табл. 2) [8–11].

В табл. 2 показано, что среди основных используемых антисептиков/дезинфектантов практически нет препаратов, эффективно действующих на споры, особенно на те, которые расположены внутри биопленок. Следует отметить, что наиболее широко применяемые спиртосодержащие антисептики могут быть причиной распространения внутрибольничных инфекций, поскольку в них выживают и даже размножаются спорообразующие бактерии *B. subtilis* [12].

Таким образом, полученные данные указывают, что мультицид является единственным антисептиком, проникающим в биопленки и убивающим все вегетативные клетки и споры, причем делает это очень быстро и обладает выраженным последствием.

Таблица 2. Свойства антисептиков различных групп

| Группа   | Свойство            |             | Действие               |              |
|--|---------------------|-------------|------------------------|--------------|
|  | реализация действия | последствие | на бактериальные споры | на биопленки |
| Спирты   | Быстро              | Отсутствует | +                      | +            |
| Хлоргексидин (бигуанид 2 и 4%)                 | Немедленно          | Имеется     | Не действует           | ++           |
| Соединения йода                                | Немедленно          | Отсутствует | ++                     | +            |
| Производные фенола (триклозан)                 | Немедленно          | Отсутствует | +                      | +            |
| Четвертичные аммониевые основания (мирамистин) | Медленно            | Отсутствует | Не действует           | Не действует |
| Мультицид                                      | Немедленно          | Имеется     | +++                    | +++          |



### Список литературы

1. Katsuya H. et al. // J. Infect. Chemother. 2009. V. 15. № 1. P. 39.
2. Miyata J. et al. // Intern. Med. 2013. V. 52. P. 101.
3. Pavani G. // Int. J. Res. Med. Sci. 2014. V. 2. P. 28.
4. Carrabba M. et al. // Eur. Respir. J. 2012. V. 40. № 56. P. 2469.
5. Ferrand J. et al. // J. Clin. Microbiol. 2013. V. 51. № 10. P. 3439.
6. Flammer Anikpeh Y. et al. // BMJ Case Rep. 2010. pii: bcr0620103058.
7. Tetz G.V. et al. // Antimicrob. Agents Chemother. 2009. V. 53. № 3. P. 1204.
8. Тец В.В. и др. // Практик. пульмонолог. 2014. № 2. С. 27.
9. Тец Г.В., Тец В.В. // Практик. пульмонолог. 2014. № 3. С. 26.
10. McDonnell G., Russell D.A. // Clin. Microbiol. Rev. 1999. V. 12. № 1. P. 147.
11. Lachapelle J.-M. et al. // Clin. Pract. 2013. V. 10. № 5. P. 579.
12. Weber D. J. et al. // Antimicrob. Agents Chemother. 2007. V. 51. № 12. P. 4217.