

УДК 615.28+576.851.252+616.5-002.3

О.І. Юрчишин

ВИВЧЕННЯ ПРОТИМІКРОБНОЇ ДІЇ АНТИСЕПТИКІВ ВІДНОСНО СТАФІЛОКОКІВ – ЗБУДНИКІВ ПОДЕРМІЙ З РІЗНИМИ МЕХАНІЗМАМИ MLS-РЕЗИСТЕНТНОСТІ

Івано-Франківський національний медичний університет

Резюме. Методом дифузії в агар виконано дослідження прямої протимікробної активності поверхнево-активних антисептиків горостену, хлоргексидину біглюконату, мірамістину та декасану відносно трьох шкірних ізолятів стафілококів із різним рівнем MLS-резистентності (макроліди, лінкозаміди та стрептограмін В). Протимікробні концентрації антисептиків визначено методом серійних розведень в агарі. Встановлено виражену пряму протимікробну дію горостену, хлоргексидину

біглюконату та декасану відносно всіх тест-штамів, їх протимікробна активність однаково проявляється відносно MLS-резистентних та чутливих до антибіотиків MLS-групи штамів стафілококів. Мірамістин у досліджуваних концентраціях протимікробної дії не проявив.

Ключові слова: антисептики, антибіотикорезистентність, стафілококи, піддермії.

Вступ. Інфекційні ураження шкіри та м'яких тканин складають 1/3 усіх інфекційних захворювань, зокрема, піддермії посідають перше місце серед шкірних хвороб та становлять 30-40 % всієї дерматологічної патології в населення працездатного віку [1, 4]. У дорослих амбулаторних пацієнтів збудниками піддермії найчастіше є *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* та *P. acnes*, рідше *Streptococcus pyogenes*. Ентерококи, *E. Coli*, *Pseudomonas aurogenosa*, *Citrobacter* sp, *Acinetobacter* sp. у поодиноких випадках викликають інфекційні ураження шкіри у стаціонарних хворих. Одними з найчастіше застосовуваних при неускладнених піддерміях препаратів є макроліди. Та слід відмітити, що впродовж останніх років занепокоєння викликає прогресуюче зростання частоти виділення при піддерміях мікроорганізмів з резистентністю до даної групи антибіотиків [8]. Тому практичний інтерес становить зіставлення результатів чутливості збудників піддермії до макролідів та досліджуваних антисептиків.

Антисептичні препарати є однією з найбільш поширених і ефективних груп протимікробних лікарських препаратів, що використовують для лікування та профілактики гнійно-запальних захворювань різної локалізації та шкіри зокрема. Перспективними та сучасними антимікробними препаратами є антисептики з групи четвертинних амонієвих сполук. Вітчизняні антисептики із даної групи представлені переважно сполуками декаметоксину, який на фармацевтичному ринку зарекомендував себе як препарат з широкими антимікробними властивостями і має бактерицидну, вірусцидну, фунгіцидну та антипротозойну дію. В основі дії декаметоксину лежить вплив на мембрану мікробної клітини: декаметоксин руйнує надмембранний шар, розпушує мембрану, підвищує її проникність для речовин із великою молекулярною масою. Оскільки на мембранних структурах фіксується більшість ферментів, декаметоксин змінює ензиматичну активність клітини, пригнічуючи ферментативні системи. Гідро-

фобний радикал декаметоксину сприяє максимальному зв'язуванню препарату з клітинною мембраною мікроорганізмів. Катіонний радикал декаметоксину спочатку зменшує, а потім нейтралізує заряд мікробної клітинної стінки. Декаметоксин є активним компонентом антисептиків горостену та декасану. До складу горостену крім декаметоксину, входить 1% розчин цитралю спиртового [5].

В основі дії антисептика мірамістину лежить пряма гідрофобна взаємодія молекули мірамістину (катіонна поверхнево-активна речовина) з ліпідами мембран мікроорганізмів, що призводить до їх фрагментації та руйнування. Він чинить виражену протимікробну дію відносно грампозитивних (*Staphylococcus spp.*, *Streptococcus spp.*, *Streptococcus pneumoniae*) і грамнегативних, аеробних та анаеробних, спороутворюючих і аспорогенних бактерій у вигляді монокультур і мікробних асоціацій, включаючи госпітальні штами з полірезистентністю до антибіотиків, проявляє протигрибкову дію.

Хлоргексидину (1,6-ди-(пара-хлорфенілгуанідо)-гексану) біглюконат виявляє виражену бактерицидну дію щодо грампозитивних та грамнегативних бактерій (не впливає на кислотостійкі форми останніх), мікробних спор, вірусів та найпростіших, грибів; слабо впливає на деякі види протеза та псевдомонад. Активний також відносно трепонем, гонококів, трихомонад. Механізм дії ґрунтується на його здатності змінювати властивості клітинної мембрани мікроорганізмів. Після дисоціації солей хлоргексидину утворюються катіони, які взаємодіють із негативно зарядженими оболонками бактерій. При цьому ліпофільні групи препарату сприяють дезінтеграції клітинної мембрани бактерій, внаслідок чого відбувається порушення осмотичної рівноваги і втрата калію з бактеріальної клітини та настає загибель.

Мета дослідження. Порівняти чутливість до поверхнево-активних антисептиків шкірних ізолятів *S. epidermidis* та *S. aureus* з різним рівнем чутливості до макролідів.

Матеріал і методи. Як тест-культури використано 25 шкірних ізолятів стафілококів з різними механізмами MLS-резистентності: – фенотип R (резистентні до всіх антибіотиків MLS-групи) (МБсК >1000 мкг/мл), фенотип D (резистентні до еритроміцину з індукцією на кліндаміцин) (МБсК >125 мкг/мл), фенотип Neg (*S. aureus* резистентні до еритроміцину без індукції на кліндаміцин) (МБсК <125 мкг/мл) та стафілококи, чутливі до антибіотиків MLS-групи – фенотип S. Вибрані штами шкірних ізолятів стафілококів ідентифіковані за комплексом культуральних та біохімічних властивостей з використанням спеціальної тест-системи «СТАРНУtest 16» (Lachema, Чехія).

Ідентифікацію фенотипів MLS-резистентні в тест-штамів визначали дискодифузійним методом на середовищі Мюллера–Хінтона відповідно до рекомендацій NCCLS (Національний комітет клініко-лабораторних стандартів США, 2008) на основі результатів тестування відносно шести антибіотиків: еритроміцину (ЕРИ, 15 мкг/диск), кларитроміцину (КТМ, 15 мкг/диск), рокситроміцину (РКМ, 30 мкг/диск), спіраміцину (SR, 30 мкг/диск), лінкоміцину (ЛН, 15 мкг/диск) та кліндаміцину (СЛІ, 2 мкг/диск). Для диференціації конститутивного та індукційного типів MLS-резистентності використовували дводисковий (еритроміцин – кліндаміцин) та модифікований трьохдисковий (еритроміцин – кліндаміцин – джозаміцин) методи [7]. МБсК та МБцК еритроміцину для досліджуваних штамів стафілококів вивчали методом двократних серійних розведень антибіотика в сольовому агарі Мюллера–Хінтона. Показники МБцК та МБсК визначали шляхом реєстрації росту культур через 24 та 36 годин інкубації.

Для проведення дослідження використано чотири антисептики: горостен (декаметоксин – 0,25 мг/мл, 1 % розчин цитралу спиртового), хлоргексидину біглюконат (0,5 мг/мл), мірамістин (0,1 мг/мл), декасан (0,2 мг/мл). Дослідження протимікробної дії досліджуваних препаратів здійснювали за допомогою мікрометоду дифузії в агар [3] на трьох штамів стафілококів з конститутивним (фенотип Neg), індукційним (фенотип

D) механізмами MLS-резистентності та чутливого до антибіотиків MLS-групи (фенотип S). У контрольну лунку вносили 90 % етанол. Протимікробні концентрації (МБцК) антисептиків визначали методом серійних розведень у поживному агарі. Для посіву використовували стандартизовані за оптичною густиною (1×10^7 КУО/мл) суспензії добових тест-культур, які наносили на поверхню агару за допомогою штамп-реплікатора [2]. Ріст мікроорганізмів оцінювали двічі після інкубації чашок у термостаті при 37° С протягом одної (для визначення мінімальної бактеріостатичної концентрації МБсК) і чотирьох діб (для визначення мінімальної бактерицидної концентрації МБцК). Враховували макроскопічні ознаки росту культур, а також наявність мікроколоній при дослідженні під лупою. Для порівняння активності антисептиків вираховували величину МБцК₉₀ мінімальну концентрацію, яка викликала повне пригнічення росту 90% тест-штамів. Контрольною служила чашка з 1 мл спирт:DMSO (диметилсульфоксид) та 9 мл поживного агару.

Для статистичної обробки результатів використовували комп'ютерні програми UTHSCSA ImageTool 2.0 (UTHSCSA ImageTool 2.0, The University of Texas Health Science Center in San Antonio, ©1995-1996) та Microsoft Office Excel 2003.

Результати дослідження та їх обговорення. У зв'язку з тим, що макроліди достатньо часто використовуються для лікування підермії існує високий ризик набування шкірними ізолятами резистентності до даних препаратів. Тому нами досліджено протимікробні властивості поверхнево-активних антисептичних препаратів відносно шкірних ізолятів стафілококів з MLS резистентністю та чутливих до макролідів. Даний тип резистентності характеризується стійкістю до макролідів, лінкозамідів та стрептограміну В, які відрізняються за структурою, але мають майже однакові механізми дії [9,10]. Існують виразні паралелі між генетичними детермінантами MLS-резистентності стафілококів та її фенотипічними проявами. Дослідження феномену індукції еритроміцином резистентності до кліндаміцину до-

Таблиця 1

Протимікробна активність досліджуваних антисептиків відносно репрезентативних штамів стафілококів з індукційним та конститутивним типом MLS-резистентності

Назва антисептика	<i>S. aureus</i> Neg-фенотип	<i>S. epidermidis</i> D-фенотип	<i>S. aureus</i> S- фенотип
	Діаметр зон пригнічення росту (мм)		
1. Горостен	11,65±0,45*	10,71±0,15*	14,53±1,2*
2. Хлоргексидин	15,79±0,32*	14,16±0,21*	13,71±0,95*
3. Мірамістин	6,32±0,45	5,62±0,26	7,55±0,13
4. Декасан	13,75±0,21*	13,53±0,41*	13,25±1,22*
5. 90% етанол(контроль)	7,3±0,57	7,7±0,21	8,61±0,76

Примітка. * $p < 0,01$ при порівнянні з контролем

Таблиця 2

МБцК антисептиків відносно стафілококів з різним рівнем MLS-резистентності

Клінічні ізоляти	К-ть штамів	Горостен				Хлоргексидину біглюконат			
		1:10*	1:20	1:40	1:80	1:10	1:20	1:40	1:80
		мкг/мл	25**	12,5	6,25	3,125	50	25	12,5
<i>S. aureus</i>	11	9 [†] /81,8 ^{††}	9 [†] /81,8 ^{††}	9 [†] /81,8 ^{††}	6 [†] /54,5 ^{††}	11 [†] /100 [†]	11 [†] /100 [†]	11 [†] /100 [†]	11 [†] /100 [†]
<i>S. epidermidis</i>	14	11 [†] /78,5 ^{††}	11 [†] /78,5 ^{††}	9 [†] /64,2 ^{††}	6 [†] /42,8 ^{††}	14 [†] /100 [†]	14 [†] /100 [†]	14 [†] /100 [†]	14 [†] /100 [†]
MLS R	21	16 [†] /76,2 ^{††}	16 [†] /76,2 ^{††}	14 [†] /66,6 ^{††}	12 [†] /57,1 ^{††}	21 [†] /100 [†]	21 [†] /100 [†]	21 [†] /100 [†]	21 [†] /100 [†]
MLS S	4	4 [†] /100 ^{††}	4 [†] /100 ^{††}	3 [†] /75 ^{††}	2 [†] /50 ^{††}	4 [†] /100 ^{††}	4 [†] /100 ^{††}	4 [†] /100 ^{††}	4 [†] /100 ^{††}
<i>S. aureus</i>									
Фенотип R	4	4	4	4	2	4	4	4	4
Фенотип D	3	3	3	3	2	3	3	3	3
Фенотип Neg	3	1	1	1	0	3	3	3	3
Фенотип S	1	1	1	1	1	1	1	1	1
<i>S. epidermidis</i>									
Фенотип R	3	2	2	2	2	3	3	3	3
Фенотип D	4	3	3	3	2	4	4	4	4
Фенотип Neg	4	3	3	2	1	4	4	4	4
Фенотип S	3	3	3	2	1	3	3	3	3
Клінічні ізоляти	К-ть штамів	Мірамістин				Декасан			
		1:10	1:20	1:40	1:80	1:10	1:20	1:40	1:80
		мг/мл	10	5	2,5	1,25	20	10	5
<i>S. aureus</i>	11	0	0	0	0	11 [†] /100 [†]	10 [†] /90,9 ^{††}	9 [†] /81,8 ^{††}	1 [†] /9,1 ^{††}
<i>S. epidermidis</i>	14	0	0	0	0	14 [†] /100 [†]	14 [†] /100 [†]	7 [†] /50,0 ^{††}	0
MLS R	21	0	0	0	0	21 [†] /100 [†]	20 [†] /95,2 ^{††}	16 [†] /76,2 ^{††}	1 [†] /4,8 ^{††}
MLS S	4	0	0	0	0	4 [†] /100 ^{††}	4 [†] /100 ^{††}	4 [†] /100 ^{††}	0
<i>S. aureus</i>									
Фенотип R	4	0	0	0	0	4	4	4	0
Фенотип D	3	0	0	0	0	3	3	3	0
Фенотип Neg	3	0	0	0	0	3	2	1	1
Фенотип S	1	0	0	0	0	1	1	1	0
<i>S. epidermidis</i>									
Фенотип R	3	0	0	0	0	3	3	2	0
Фенотип D	4	0	0	0	0	4	4	2	0
Фенотип Neg	4	0	0	0	0	4	4	1	0
Фенотип S	3	0	0	0	0	3	3	3	0

Примітка. 1. [†] - розведення антисептика; 2. ^{**} - концентрація діючої речовини (мкг/мл); 3. [†] - кількість штамів, рід яких повністю пригнічується; 4. ^{††} - відсоток штамів, рід яких повністю пригнічується

зволяє розділити штами стафілококів на шість фенотипів зі встановленими закономірностями генотипу резистентності [11]. Раніше виконані нами дослідження показали, що серед шкірних

ізолятів стафілококів домінують штами з фенотипом R [6].

Дослідження методом дифузії в агар показали, що найбільш виражену протимікробну дію

відносно репрезентативних тест-штамів із фенотипами D, Neg та S MLS-резистентності (табл. 1) проявив хлоргексидин. Дещо меншу активність проявили горостен та декасан. *S. aureus* з фенотипом S проявив чутливість до даних антисептиків однаково. Водночас під впливом мірамістину ми спостерігали пригнічення росту тест-штамів навіть менше, ніж контролем (90% етанол).

Методом двократних серійних розведень в агарі встановлено МБцК і МБсК антисептиків (у перерахунку на вміст діючої речовини в 1 мл у різних розведеннях).

Усі штами стафілококів, незалежно від фенотипу MLS-резистентності, характеризуються високою чутливістю до хлоргексидину (МБцК \leq 6,25 мкг/мл). Результати тестування 25 шкірних ізолятів стафілококів з різним рівнем MLS-резистентності наведено в табл. 2. Горостен у такій же концентрації пригнітив ріст 81,8 % штамів *S. aureus* та 64,2 % штамів *S. epidermidis*. Епідермальні стафілококи виявилися менш чутливими до даного антисептика. Декасан пригнітив ріст усіх штамів стафілококів у діапазоні концентрацій 10-20 мкг/мл. Мірамістин у досліджуваних концентраціях активності не проявив.

Доведено, що антисептичні препарати горостен, декасан, мірамістин, крім вираженої протимікробної дії відносно широкого спектра мікроорганізмів, негативно впливають на адгезивну здатність музейних (*S. aureus* ATCC 25923) і клінічних штамів *S. aureus* та *S. epidermidis*. Так, за наявності всіх антисептичних препаратів адгезивна здатність бактерій зменшувалась [5].

Одержані в ході виконаного дослідження результати свідчать про приблизно однакову активність антисептиків відносно антибіотикочувливих і антибіотикорезистентних клінічних штамів стафілококів.

Висновки

1. Поверхнево-активні антисептики горостен, хлоргексидину біглюконат та декасан володіють вираженою протимікробною активністю відносно шкірних ізолятів стафілококів – збудників піодермій.

2. Протимікробна активність горостену, хлоргексидину біглюконату та декасану однаково про-

являється відносно MLS-резистентних та чутливих до антибіотиків MLS-групи штамів стафілококів.

3. Механізми набутої MLS-резистентності не впливають на рівень чутливості стафілококів до поверхнево-активних антисептиків.

4. Мірамістин протимікробної активності відносно досліджених тест-штамів не проявив.

Література

1. Калюжна Л.Д. Оцінка ефективності лікування препаратом "Цитрал" при інфекційних дерматозах та вугрової хвороби / Л.Д. Калюжна, М.В. Пацеля, А.М. Бойчук // Фармакотерапія в дерматол. – 2013. – № 2 (49). – С. 154-157.
2. Красильников А.П. Справочник по антисептике / Красильников А.П. – К.: Минск: Выш. шк., 1995. – 367 с.
3. Куцик Р.В. Скринінгове дослідження протимікробної активності лікарських рослин Прикарпаття відносно поліантибіотикорезистентних клінічних штамів стафілококів / Р.В. Куцик // Гал. лікар. вісник. – 2004. – Т. 11, № 4. – С. 44-48.
4. Кутасевич Я.Ф. Антибактериальная терапия в лечении гнойничковых заболеваний кожи / Я.Ф. Кутасевич, И.А. Олейник // Укр. ж. дерматол., венерол. та косметол. – 2011. – № 4 (43). – С. 67-70.
5. Фоміна Н.С. Вивчення антиадгезивних властивостей антисептиків на клінічних штамів мікроорганізмів / Н.С. Фоміна // Biomedical and Biosocial Anthropology. – 2013. – № 20. – С. 90-92.
6. Юрчишин О.І. Фенотипи MLS-резистентності шкірних ізолятів стафілококів – збудників піодермій / О.І. Юрчишин // Прикарпат. вісн. НТШ. Пульс. – 2014. – № 4 (28). – С. 16-32.
7. Lewis J.S. Inducible clindamycin resistance in staphylococci: should clinicals and microbiologists be concerned? / J.S. Lewis, J.S. Jorgensen // Antimicrobial resistance invited article. – 2005. – Vol. 1 (10). – P. 280-285.
8. Macrolides / L. Mulazimoglu, P.M. Tulkens, F. Bambeke [et al.] // Antimicrobial therapy and vaccines. – 2004. – Vol. 2 (2). – P. 243-278.
9. Molecular epidemiology of macrolides-lincosamides-streptogramin B resistance in *S. aureus* and CNS / S. Thakker-Varia, D.J. Warren, L. Moon- McDermot [et al.] // Antimicrob. Agents Chemother. – 1987. – Vol. 31 (6). – P. 883-888.
10. Mukhtar T.A. Streptogramins, oxazolidinones and other inhibitors of bacterial protein synthesis / T.A. Mukhtar, G.D. Wright // Chemical reviews. – 2005. – Vol. 2 (105). – P. 529-542.
11. Testing for induction of clindamycin resistance in erythromycin-resistant isolates of *S. aureus* / C.D. Steward, P.M. Raney, A.K. Morrell [et al.] // J. Clin. Microbiol. – 2005. – Vol. 43 (4). – P. 1716-1721.

ИЗУЧЕНИЕ ПРОТИВОМИКРОБНОГО ДЕЙСТВИЯ АНТИСЕПТИКОВ ОТНОСИТЕЛЬНО СТАФИЛОККОКОВ - ВОЗБУДИТЕЛЕЙ ПИОДЕРМИЙ С РАЗЛИЧНЫМИ МЕХАНИЗМАМИ MLS-РЕЗИСТЕНТНОСТИ

О.И. Юрчишин

Резюме. Методом диффузии в агар выполнено исследование прямой противомикробной активности поверхнево-активных антисептиков горостена, хлоргексидина биглюконата, мирамистина и декасана относительно трёх кожных изолятов стафилококков с разным уровнем MLS-резистентности (макролиды, линкозамиды и стрептограмин В). Противомикробные концентрации антисептиков определены методом серийных разведений в агаре. Установлено выраженное прямое противомикробное действие горостена, хлоргексидина биглюконата и декасана в отношении всех тестируемых штаммов, их противомикробная активность в равной степени проявляется в отношении MLS-резистентных и чувствительных к антибиотикам MLS-группы штаммов стафилококков. Мирамистин в исследуемых концентрациях противомикробного действия не проявил.

Ключевые слова: антисептики, антибиотикорезистентность, стафилококки, пиодермии.

ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF ANTISEPTICS STUDY AGAINST MLS-RESISTANT STAPHYLOCOCCI – PATHOGENS OF PYODERMA

O.I. Yurchyshyn

Abstract. Study of direct antimicrobial activity of surfactant antiseptics: horosten, chlorhexidine, miramistin and dekasen against 3 skin isolates of staphylococci with different levels of MLS-resistance (macrolides, streptogramins streptogramin B) was performed by agar diffusion method. Antimicrobial concentrations were determined by serial dilutions method. Strong antimicrobial activity of horosten, chlorhexidine and dekasen against all tested strains was established, their antimicrobial activity was equally manifested against MLS-resistant and sensitive strains of staphylococci. Miramistin did not exhibit antimicrobial activity in studied in concentrations against tested strains.

Key words: antiseptics, antibiotic resistance, staphylococci, pyoderma.

National Medical Univesity (Ivano-Frankivsk)

Рецензент – проф. С.Є. Дейнека

Buk. Med. Herald. – 2016. – Vol. 20, № 3 (79). – P. 197-201

Надійшла до редакції 27.04.2016 року