

ОРИГІНАЛЬНІ ДОСЛІДЖЕННЯ

coefficient of prevalence of autochthonous facultative bacteriums are remained mostly unchanged. At the same time there is a contamination of the large intestine cavity with the yeastlike fungi Candida. The middle dose tetracycline hydrochloride (20 mg/kg) causes a considerable changes in the microbiota in the biological layer on mucus membrane of large intestine. The selfrecovery process of mucose membrane microbiota is characterized by the increase population level constancy index and a quantitative coefficient of prevalence of

lactobacteriaci, bacterides, peptostreptococci, clostridium, enterobacterici and staphylococci. There are appeared bifidobacteriums in 40 % of experimental rats. In the other 40 % of rats the mucus membrane of large intestine was contaminated by the yeastlike fungi Candida.

Key words: *mucus membrane microbiota, large intestine, tetracycline hydrochloride.*

Отримано 15.03.2011 р.

© Криворутченко Ю.Л., Постнікова О.М., 2011
УДК 582.282.23:615.28-084-08.001.6

Ю.Л. Криворутченко, О.М. Постнікова

ВИЗНАЧЕННЯ ЧУТЛИВОСТІ МІКРООРГАНІЗМІВ ДО МІРАМІСТИНУ СЬОГОДНІ

Кримський державний медичний університет ім. С.І. Георгієвського

За допомогою методу визначення швидкості інактивзації мікроорганізмів in vitro вивчено чутливість Staphylococcus aureus, Escherichia coli та Candida albicans до мірамістину (М), який було представлено у формі антисептиків окомістину (0,01 % М) і дезмістину (0,1 % М). Досліджені мікроби повністю гинули протягом 15 хв інкубації з дезмістином. Окомістин знищував стафілококи за той же час, але пригнічував E. coli та C. albicans повільніше. Обговорюються причини розбіжностей між одержаними результатами і даними дослідників, які твердили, що окомістин не має протимікробної дії.

Ключові слова: *мірамістин, визначення ефективності антисептиків, бактерії, C. albicans.*

Розповсюдження збудників інфекцій, резистентних до антибіотиків, антисептиків і дезінфектантів, є глобальною проблемою [1]. В Україні спостерігається поширення мікроорганізмів, що є стійкими до хлоровмісних і альдегідовмісних дезінфектантів, деяких препаратів із груп гуанідину і четвертинних амонієвих сполук, антисептиків фурациліну і хлоргексидину [2, 3]. Повідомлялося, що недостатньо висока концентрація (0,01 %) антисептика мірамістину в деяких готових лікарсь-

ких формах не забезпечує згубної дії препаратів стосовно грамнегативних бактерій [4, 5]. Нарешті, з'явилася робота, автор якої стверджував, що препарат «Окомістин», який містить мірамістин, абсолютно не пригнічує життєдіяльність стафілококів і грамнегативних паличкоподібних бактерій [6].

Мірамістин є антисептиком, що належить до четвертинних амонієвих сполук. З 1993 р. він широко використовується в хірургії, гінекології, офтальмології та інших сферах медицини. Багатьма дослідниками було підтверджено, що мірамістин має широкий спектр протимікробної дії і високу лікувальну ефективність [5, 7]. Нам здавалося важливим з'ясувати причини розбіжностей в оцінках активності мірамістину різними авторами, оскільки вони могли ґрунтуватися як на поширенні резистентних штамів мікробів, так і на використанні некоректних методик визначення дії цього антисептика.

Завданням дослідження було встановити протимікробну активність лікарських форм мірамістину стосовно музейних і клінічних штамів мікроорганізмів за допомогою сучасної загальноприйнятої методики, що ураховує особливості механізму дії четвертинних амонієвих сполук.

Матеріали і методи

У роботі використано музейні штами *S. aureus* 209P і *C. albicans* CCM885, отримані з ДІСК ім. Л.А. Тарасевича (Москва, Росія), *E. coli* ATCC 25922 з ДУ «Інститут мікробіології та імунології ім. І.І. Мечникова АМНУ» (Харків) і три штами *S. aureus* клінічного походження, які ідентифікували за допомогою тест-системи «STAPHYtest 16» (Lachema, Чехія).

Для дослідження було обрано препарати дезмістин і окомістин, які містять водний розчин мірамістину з концентраціями 0,1 % і 0,01 % відповідно. Обидві лікарські форми випускаються фірмою «Інфамед-Україна». Вивчали біологічну дію як нерозведеного дезмістину, так і препарату, що був 10-разово розведеним у дистильованій воді.

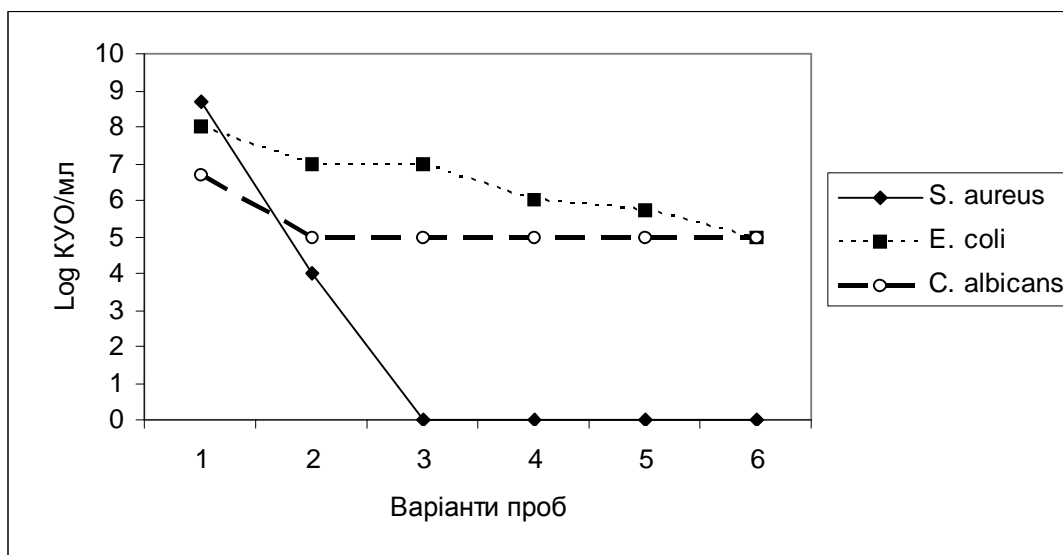
Чутливість мікробів до лікарських форм вивчали за методом визначення швидкості інактивації мікроорганізмів досліджуваним препаратом відповідно до Європейського стандартного кількісного суспензійного тесту (*European Standard EN 1040, 1997*) [8]. Для цього виготовляли стандартні інокулюми з концентрацією стафілококів $(1-5) \times 10^8$ колонієутворюючих одиниць (КУО) в 1 мл, *E. coli* – 10^7-10^8 КУО/мл і грибів – 5×10^6 КУО/мл. Інокулюми готували шляхом розведення мікробних культур, що активно росли у м'ясо-пептонному бульйоні (бактерії) чи рідкому середовищі Сабуро (гриби). Мікробні суспензії доводили до оптичної густини 1,58 од., яку визначали при довжині хвилі 540 нм за допомогою

фотоколориметра КФК-2 і кювети 10 мм завтовшки. Це відповідало кількості стафілококів 5×10^8 КУО/мл. Концентрації мікроорганізмів в інокулюмах підтверджували за допомогою висівів серійних розведень суспензій на агар в чашках Петрі. Зразки інокулюмів по 1 мл додавали до 9 мл досліджуваних препаратів. Ці суміші інкубували шляхом перемішування на ротаційному термостаті при 37 °С і швидкості 100 об./хв. Зразки сумішей по 0,1 мл відбирали відразу після приготування («0» хв) або через 5, 10, 15, 30 чи 60 хв інкубації. Ці зразки висівали на м'ясо-пептонний агар чи агар Сабуро і підраховували кількість мікробних колоній після інкубації при 37 °С протягом 24 або 48 (гриби) год.

Статистичне обчислення результатів дослідження здійснювали через оцінку вірогідності різниць одержаних величин за допомогою t-критерію Ст'юдента та визначення наявності кореляційного зв'язку для вибірок значень показників динаміки інактивації мікроорганізмів різними препаратами за допомогою коефіцієнта кореляції Пірсона. Для цього використовували комплект програм *Microsoft Excel 5,0* і програму *MedStat* [9].

Результати досліджень та їх обговорення

Спочатку було досліджено динаміку інактивації музейних штамів мікроорганізмів окомістином. Було виявлено, що цей препарат швидко знищує стафілококи і менш ефективно пригнічує життєдіяльність ешерихій і дріжджоподібних грибів (мал. 1).



Мал. 1. Інактивація колекційних мікроорганізмів окомістином.

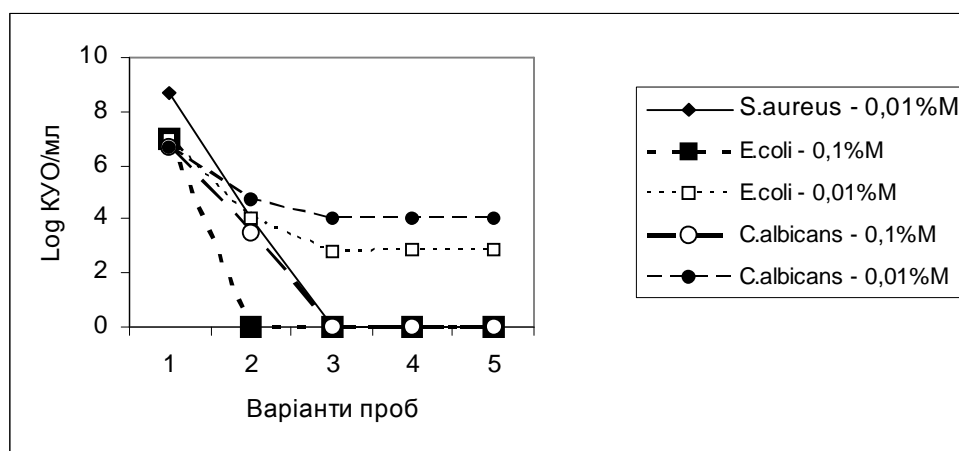
Примітка. Концентрація мікробів показана через log КУО/мл. Варіанти проб: п1 – початкові інокулюми мікроорганізмів, проби з 2 по 6 – мікроорганізми інкубували з окомістином «0» (п2), 5 (п3), 15 (п4), 30 (п5) або 60 (п6) хв.

ОРИГІНАЛЬНІ ДОСЛІДЖЕННЯ

Окомістин відразу після внесення в культуру знижував концентрацію життєздатних стафілококів у 50 000 разів, а ешерихій і кандид – відповідно в 10 і 50 разів. Протягом 5 хв він повністю знищував стафілококи, але життєздатність інших мікробів не змінювалася. Через 60 хв ступінь пригнічення ешерихій і кандид складав відповідно 1 000 і 50 разів.

Оскільки ешерихії і гриби демонстрували меншу за стафілококи чутливість до окомістину, було досліджено дію дезмістину. Намагалися з'ясувати, чи може дезмістин повністю знищити ешерихії

і гриби, а також порівняти ефекти зазначених лікарських засобів шляхом дослідження 10-разово розведеного дезмістину, який, як і окомістин, мав містити 0,01 % розчин мірамістину. Нерозведений дезмістин повністю знищував ешерихії і стафілококи (не показано на малюнку) відразу після унесення у мікробну культуру. За той же час розведений дезмістин, як і окомістин, знижував концентрацію стафілококів у 50 000, а ешерихій – у 1 000 разів. При інкубації протягом 15-60 хв розведений дезмістин пригнічував ріст ешерихій більш ніж у 10 000 разів (мал. 2).



Мал. 2. Інактивація мікроорганізмів нерозведеним і 10-разово розведеним дезмістином з концентраціями мірамістину (M) 0,1 % і 0,01 % відповідно.

Примітка. Варіанти проб: п1 – початкові інокулюми, проби 2-5 – мікроби інкубували з дезмістином «0» (п2), 15 (п3), 30 (п4) або 60 (п5) хв.

Більшу активність розведеного дезмістину від окомістину стосовно ешерихій можна пояснити тим, що при дослідженні дезмістину концентрація інокулюма *E. coli* була меншою (10^7 КУО/мл), ніж при вивченні окомістину (10^8 КУО/мл). Різниця в пригніченні ешерихій різними препаратами з 0,01 % мірамістином, на наш погляд, не мала принципового значення. Це підтверджувалося наявністю прямого кореляційного зв'язку для двох вибірок значень показників динаміки інактивації ешерихій окомістином і розведеним дезмістином (коефіцієнт кореляції Пірсона $R > 0$, $p < 0,001$).

Нерозведений дезмістин відразу після внесення в культуру знижував концентрацію кандид у 1 600 разів, а протягом 15 хв – повністю їх знищував. Розведений дезмістин відразу після внесення в культуру знижував концентрацію кандид у 100, а через 15 хв – 500 разів. Подальше збільшення терміну інкубації не впливало на ре-

зультат. Динаміка інактивації грибів розведеним дезмістином і окомістином була практично однаковою. Це підтверджувалося наявністю прямої кореляції для вибірок значень показників пригнічення кандид окомістином і розведеним дезмістином (коефіцієнт кореляції $R > 0$, $p < 0,001$).

Таким чином, стосовно музейних штамів незалежно від досліджуваного препарату, при концентрації мірамістину 0,01 % мали місце повне знищення *S. aureus* та повільніша часткова інактивація *E. coli* і *C. albicans*. Цей результат погоджувався з даними інших дослідників [4, 5]. Проте, на нашу думку, твердження цих авторів, що концентрація мірамістину 0,01 % у готовій лікарській формі звужує спектр показань для її застосування завдяки недостатній згубній дії на грамнегативну флору, вимагає додаткового уточнення. Справа в тому, що лікувальний ефект мірамістину залежить не тільки від його згубної дії на

ОРИГІНАЛЬНІ ДОСЛІДЖЕННЯ

мікроорганізми, а і від здатності антисептика стимулювати імунну систему і нормалізувати мікрофлору у вогнищі ураження. Різні дослідники відзначали, що дія мірамістину при застосуванні для лікування бактерійних, вірусних і грибкових захворювань пов'язана з його імуностимулювальним ефектом і здатністю прискорювати регенерацію [7]. Було доведено, що мірамістин змінює мікробні біоценози шкіри у хворих із мікозами стоп шляхом зниження загальної колонізаційної щільності бактерій [10]. При цьому спостерігалося зменшення частоти висівання як стафілококів, так і грамнегативних ентеробактерій та псевдомонад, що в експериментах *in vitro* демонструють малу чутливість до мірамістину [11].

Результати нашої роботи і публікації більшості інших авторів підтверджують, що мірамістин є анти-

септиком широкого спектра дії [4, 5, 7]. Тому несподіваним виявився висновок О.Г. Мартінек, що окомістин не має протимікробної дії стосовно клінічних ізолятів стафілококів і грамнегативних паличкоподібних бактерій [6]. Для визначення причини такої розбіжності у поглядах було потрібно з'ясувати, чи не пояснюється твердження про неефективність окомістину поширенням резистентних штамів бактерій. Для цього було досліджено динаміку інактивації окомістином трьох клінічних штамів стафілококів, ізольованих у 2008 р. (табл. 1). Було виявлено, що незалежно від терміну інкубації бактерій у присутності окомістину показники інактивації як клінічних штамів *S. aureus*, так і музейного штаму стафілококів не мали статистично значущих відмінностей ($p=0,225-0,869$). Окомістин повністю знищував усі досліджені стафілококи протягом 10 хв.

Таблиця 1

Інактивація окомістином клінічних і колекційного штамів *S. aureus*

Культура <i>S. aureus</i>	Концентрація бактерій (log КУО/мл)			
	Початкові інокулюми	Термін інкубації з окомістином (хв):		
		0	5	10
<i>S. aureus</i> 209P	8,35±0,35	5,50±1,50	0,50±0,50	0,00
Клінічні ізоляти (n=3)	8,47±0,23	7,00±0,00	0,67±0,67	0,00
Критерій Ст'юдента (p)	0,791	0,225	0,869	-

Таким чином, версію про неіездатність окомістину завдяки розповсюдженню резистентних штамів *S. aureus* підтверджено не було. На наш погляд, найбільш імовірною причиною розбіжностей в оцінюванні протимікробних властивостей мірамістину було некоректне використання в роботі О.Г. Мартінек методу серійних розведень у рідкому живильному середовищі для проведення визначення чутливості бактерій до цього антисептика. У зазначеному дослідженні антибактерійні засоби, у тому числі окомістин, вносили у суміші бульйону Готінгера з культурами мікробів, а потім інкубували протягом доби [6]. При цьому препарат мірамістину 10-15-разово розводився у живильному середовищі, що містило органічні сполуки у високій концентрації. За таких умов мірамістин мав бути неминуче нейтралізованим компонентами середовища, оскільки відомо, що четвертинні амонієві сполуки, до яких належить цей антисептик, дуже швидко позбуваються своєї активності внаслідок контакту з білком чи іншими органічними речовинами [12, 13].

Висновки

1. Антисептичні препарати дезмістин і окомістин, що містять мірамістин у концентраціях 0,1 %

і 0,01 % відповідно, протягом 10 хв повністю знищують *S. aureus*, що належить до клінічних або музейного штамів.

2. Дезмістин швидко знищує *E. coli* та *C. albicans*, але окомістин не повністю інактивує їх протягом 1 год. Розчини мірамістину з концентрацією 0,01 % відразу після внесення в культуру мікробів знижують концентрацію ешерихій у 10-1 000 і кандид – 50-100 разів, а через 15 хв інкубації – відповідно у 100-10 000 і 50-500 разів.

3. Для оцінки чутливості мікробів до мірамістину й інших четвертинних амонієвих сполук треба використовувати методи, які гарантують контакт досліджуваного препарату з мікроорганізмами у середовищі, що має мінімальну концентрацію органічних речовин. Ці речовини нейтралізують четвертинні амонієві сполуки, і тому використання рутинних методів визначення антибіотикочутливості для оцінки дії таких антисептиків помилкове.

Література

1. Морозова Н.С. Дезинфектологическая профилактика внутрибольничных инфекций: проблемы и пути решения // Профилактика медицина. – 2008. – № 3. – С. 3-6.

ОРИГІНАЛЬНІ ДОСЛІДЖЕННЯ

2. Вивчення процесів формування стійкості мікроорганізмів до дезінфекційних засобів з різних груп хімічних сполук / Марієвський В.Ф., Таран В.В., Кролевецька Н.М. та ін. // Профілактична медицина. – 2008. – № 2. – С. 13-17.

3. Обґрунтування ефективності антисептичного препарату «Амосепт» у профілактиці госпітальної інфекції / Палій Г.К., Ковальчук В.П., Палій В.Г. та ін. // Клінічна фармація. – 2008. – № 4. – С. 19-24.

4. Ковальчук В.П., Кондратюк В.М. Нові антисептичні засоби вітчизняного виробництва // Мистецтво лікування. – 2005. – № 10 (026). – С. 82-83.

5. Ковальчук В.П. Характеристика арсеналу антисептичних засобів, зареєстрованих в Україні // Biomedical and biosocial anthropology. – 2006. – № 6. – С. 71-76.

6. Мартінек О.Г. Вивчення впливу антибактерійних очних крапель на мікрофлору кон'юнктиви у порівняльному аспекті // Львівський медичний часопис. – 2007. – АМЛ XIII, № 3. – С. 101-105.

7. Мирамистин – новый отечественный антисептик широкого спектра действия // Человек и лекарство: VII Росс. нац. конгресс (10-14 апреля 2000 г.). – Москва, 2000. – 20 с.

8. *In vitro* activity of tea-tree oil against clinical skin isolates of methicillin-resistant and -sensitive *Staphylococcus aureus* and coagulase-negative staphylococci growing planktonically and as biofilms / Brady A., Loughlin R., Gilpin D. et al. // J. Med. Microbiol. – 2006. – V. 55. – P. 1375-1380.

9. Лапач С.Н., Чубенко А.В., Бабич П.Н. Статистические методы в медико-биологических исследованиях с использованием Excel. – К.: Морион, 2001. – 407 с.

10. Герасимів І.М., Климяк С.І., Кривошеїн Ю.С. Протимікробний ефект мірамістину щодо мікроорганізмів шкіри людини // Клінічна та експериментальна патологія. – 2006. – Т. V, № 4. – С. 18-20.

11. Герасимів І.М. Мікробіологічне обґрунтування застосування мірамістину для корекції мікробіоценозу шкіри: Автореф. дис. ... канд. мед. наук. – Харків, 2007. – 20 с.

12. Влияние эмбриональной сыворотки коров на анти-ВИЧ-свойства мирамистина / Криворучченко Ю.Л., Кривошеин Ю.С., Андроновская И.Б. и др. // Вопросы вирусологии. – 1994. – Т. 39, № 6. – С. 281-283.

13. Medical microbiology / Murray P.R., Rosenthal K.S., Kobayashi G.S., Pfaller M.A. / 4th edition. – Mosby. Inc., 2002. – 826 p.

NOWADAYS EVALUATION OF THE SUSCEPTIBILITY OF MICROORGANISMS TO MYRAMISTIN

Yu.L. Kryvorutchenko, O.M. Postnikova, N.V. Sukhina

SUMMARY. *The susceptibility of Staphylococcus aureus, Escherichia coli and Candida albicans to the detergent myramistin (M) in the form of antiseptic preparations Okomistin (0,01 % M) and Dismistin (0,1 % M) was studied using quantitative in vitro time-kill method. All the organisms were completely eradicated following exposure to Dismistin for 15 minutes. Staphylococci were killed following exposure to Okomistin for 15 minutes but populations of E.coli and C.albicans were reduced more slowly. Our results contrast with those reported by some other researchers, who found that Okomistin had no antibacterial effects. These discrepancies are discussed.*

Key words: *myramistin, evaluation of antiseptic effectiveness, bacteria, C. albicans.*

Отримано 18.02.2010 р.