

УДК 615.281.9:579.842.16

DOI: 10.14427/jipai.2022.3.30

Влияние субингибирующих концентраций биоцидов на формирование адаптивной устойчивости клинических изолятов *Klebsiella pneumoniae*

Ж.Ф. Циркунова, А.А. Емельянова, Е.И. Гудкова, Г.А. Скороход, В.В. Буткевич, И.Н. Слабко, Н.Н. Бердник, И.А. Гаврилова

Белорусский государственный медицинский университет, Минск

Effect of subinhibitory concentrations of biocides on formation of adaptive resistance of clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae*

Zh.F. Tsyrukunova, A.A. Emelyanova, E.I. Gudkova, G.A. Skorokhod, V.V. Butkevich, I.N. Slabko, N.N. Berdник, I.A. GavriloVA

Belarusian State Medical University, Minsk, Belarus

Аннотация

Цель исследований – изучить влияние субингибирующих концентраций биоцидов на формирование адаптивной устойчивости клинических изолятов *K. pneumoniae*. В работе проанализировано влияние хлоргексидина, бензалконииум хлорида, повидон йода, этанола, гликолевой кислоты, полигексаметиленгуанидин гидрохлорида на формирование адаптивной устойчивости клинических изолятов *Kl. pneumoniae* (n=9), выделенных в 2021 году от пациентов, проходящих лечение в различных отделениях онкологического стационара г. Минска. Определение устойчивости бактерий к биоцидам проводили методом серийных разведений в плотной питательной среде и методом серийных микрооразведений в жидкой питательной среде, используя двукратное разведение каждого антимикробного вещества. В ходе исследования установлено, что субкультивирование клинических изолятов *K. pneumoniae* на средах с субингибирующими концентрациями хлоргексидина и бензалконииум хлорида приводило к росту устойчивости бактерий к ним в 60 и 40 раз соответственно. Показано, что в развитие устойчивости клинических изолятов *K. pneumoniae* к хлоргексидину максимальный вклад вносит изменчивость, не затрагивающая геном бактерий, а к бензалконииум хлориду – как фенотипическая, так и мутационная изменчивость. Повидон йод, этанол и гликолевая кислота не вызывали развитие адаптивной устойчивости взятых в опыт бактерий. Полученные результаты свидетельствуют о том, что нерациональное и неконтролируемое использование антисептических и дезинфицирующих средств, содержащих хлоргексидин и бензалконииум хлорид в качестве активно действующих веществ, может привести к развитию адаптивной устойчивости микроорганизмов и тем самым снизить эффективность профилактических и лечебных мероприятий.

Summary

The purpose of the research is to study the effect of subinhibitory concentrations of biocides on the formation of adaptive resistance of clinical isolates of *K. pneumoniae*. The study analyzes the effect of chlorhexidine, benzalkonium chloride, povidone iodine, ethanol, glycolic acid, polyhexamethylene guanidine on the formation of adaptive resistance of clinical isolates of *Kl. pneumoniae* (n=9), isolated in 2021 from patients undergoing treatment in various departments of the oncological hospital in Minsk. Determination of the sensitivity of bacteria to biocides was carried out with the serial dilutions method in a dense nutrient medium and with the serial microdilutions method in a liquid nutrient medium, using a twofold dilution of each antimicrobial substance. Throughout the course of the research, it was found that subcultivation of clinical isolates of *K. pneumoniae* on media with subinhibitory concentrations of chlorhexidine and benzalkonium chloride led to 60 and 40 times increase in bacterial resistance to them, respectively. It was shown that variability which does not affect the bacterial genome makes the maximum contribution to the development of resistance of *K. pneumoniae* clinical isolates to chlorhexidine, and both phenotypic and mutational variability to benzalkonium chloride. Povidone iodine, ethanol and glycolic acid did not cause the development of adaptive resistance of microorganisms. The results obtained indicate that the irrational and uncontrolled use of antiseptic and disinfectants containing chlorhexidine and benzalkonium chloride as active substances can lead to the development of adaptive resistance of microorganisms and thereby reduce the effectiveness of preventive and therapeutic measures.

Ключевые слова

Биоциды, субингибирующие концентрации, адаптация, устойчивость, *Klebsiella pneumoniae*.

Keywords

Biocides, subinhibitory concentrations, adaptation, resistance, *Klebsiella pneumoniae*.

Введение

Необходимым условием эффективного контроля за распространением резистентных штаммов является понимание того, каким образом микроорганизмы, циркулирующие в лечебных учреждениях и взаимодействующие с антибиотиками, антисептиками и дезинфектантами, вырабатывают устойчивость к ним.

В настоящий момент подавляющее большинство исследований и научных публикаций касаются изучения действия противомикробных средств в концентрациях, достаточных для подавления роста микробов или их гибели. Однако следует признать, что в реальной практике часто микроорганизмы находятся под влиянием антибиотиков и биоцидов (к которым относятся антисептики и дезинфектанты) в концентрациях, не оказывающих ингибирующее или летальное действие. Такие концентрации противомикробных средств достигаются за счет нерационального их использования в здравоохранении и ветеринарии; неправильных расчетов рабочих концентраций биоцидов; ненадлежащего их хранения и наличия большого количества органических веществ в окружающей среде, приводящих к снижению эффективности препаратов [1]. По данным геологической службы США, в 80% проб поверхностных вод и почти 25% проб грунтовых вод обнаружена загрязненность отходами фармацевтической промышленности [2]. Следовые количества более чем 150 фармацевтических субстанций обнаружены в объектах внешней среды в Арктике [2]. Европейское агентство по окружающей среде (ЕЕА) обозначило влияние активных фармацевтических субстанций на окружающую среду как новую экологическую проблему [3].

Тот факт, что субингибирующие концентрации антибиотиков приводят к развитию резистентности у микроорганизмов, не вызывает уже ни у кого сомнения. Однако этот же тезис, но в отношении антисептиков и дезинфектантов, для многих все еще не так очевиден. Подавляющее большинство исследований касаются изучения влияния субингибирующих концентраций антибиотиков и очень мало – антисептиков и дезинфектантов. В отличие от антибиотиков биоцидные средства, как правило, не имеют специфической мишени действия в микробной клетке и характеризуются

широким спектром и высокой степенью повреждающего действия, следовательно, устойчивость в отношении биоцидов формируется медленнее, и удельный вес резистентных штаммов долгое время остается низким. Возможно, именно поэтому устойчивость к антисептическим и дезинфицирующим средствам длительное время не считали той проблемой, на которую следует обращать внимание. Однако в исследованиях Шкарина В.В. с соавторами получены доказательства, свидетельствующие о возможности формирования устойчивости микроорганизмов к дезинфицирующим средствам на основе четвертичных аммониевых соединений (ЧАС) под влиянием повторных воздействий их сублетальных концентраций [4]. Показано также, что воздействие субингибирующих концентраций хлоргексидина приводило к снижению чувствительности у таких распространенных внутрибольничных патогенов, как *E. coli* (увеличение минимальных ингибирующих концентраций (МИК) в 500 раз), *S. marcescens* (увеличение МИК в 128 раз), *P. aeruginosa* (увеличение МИК в 32 раза) и *K. pneumoniae* (увеличение МИК в 16 раз) [5]. Возможность возникновения индуцированной резистентности установлена для *S. aureus* к хлорсодержащему дезсредству [6].

Среди возбудителей внутрибольничных инфекций особое место занимает *Kl. pneumoniae*. Клебсиеллы – типичные возбудители оппортунистических инфекций, вызывающие манифестные формы болезни у пациентов групп риска: недоношенных детей, ВИЧ-инфицированных, больных сахарным диабетом, алкоголизмом, пациентов хирургических отделений и отделений интенсивной терапии [7]. Полирезистентные штаммы *Kl. pneumoniae* относятся к группе «ESKAPE-патогенов» (группа включает: *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacter*), ответственных за развитие угрожающих жизни инфекций. Для «ESKAPE-патогенов» характерна множественная лекарственная устойчивость, что представляет одну из самых серьезных проблем в клинической практике [7, 8].

Цель исследования – изучить влияние субингибирующих концентраций биоцидов на формирование адаптивной устойчивости клинических изолятов *Kl. pneumoniae*.

Материалы и методы

Объектами исследования послужили клинические изоляты *Kl. pneumoniae* (n=9), выделенные в 2021 году от пациентов, проходящих лечение в различных отделениях онкологического стационара г. Минска. В качестве типовой тест-культуры использовали *K. pneumoniae* ATCC 700603. В опыт по адаптации были взяты как чувствительные ко всем изученным антибиотикам клинические изоляты бактерий (n=3), устойчивые (n=2), так и множественно устойчивые (n=4).

Видовую идентификацию микроорганизмов и оценку их чувствительности к антибиотикам проводили с помощью автоматического анализатора Vitek2Compact (BioMerieux).

Бактерии культивировали на питательных средах: мясо-пептонный агар (МПА) (HiMedia, Индия), мясо-пептонный бульон (МПБ) (HiMedia, Индия), триптиказо-соевый бульон (ТСБ) (HiMedia, Индия), триптиказо-соевый агар (ТСА) (HiMedia, Индия), агар Мюллера-Хинтона (HiMedia, Индия) при $+35\pm 2^\circ\text{C}$ в течение 18-24 ч.

Адаптацию бактерий проводили к биоцидам, относящимся к ЧАС, гуанидинам, спиртам, кислотам и галогенам: перекись водорода (Белмедпрепараты, РБ), бетадин (ЭГИС, Венгрия), хлоргексидин (ХГ) (APL, Швеция), бензалкониум хлорид (БХ) (Acros organics, США), полигексаметиленгуанидин гидрохлорид (ПГМГ-ГХ) (РБ), этанол (РБ), гликолевая кислота (РБ).

Биоциды использовали в концентрациях ниже МИК, установленных опытным путем для каждого взятого в опыт клинического изолята бактерий (субингибирующие концентрации).

Определение устойчивости клинических изолятов бактерий к биоцидам проводили методом серийных разведений в плотной питательной среде (агаре) и методом серийных микроуразведений в жидкой питательной среде (бульоне), используя двукратное разведение каждого антибактериального вещества. МИК биоцидов в отношении клинических изолятов клебсиелл определяли для клеток в логарифмической фазе роста.

Значения МИК, определенные методом серийных микроуразведений в бульоне, были использованы для расчета субингибирующих концентраций биоцида в жидкой питательной среде, на которой велась адаптация микроорганизмов.

Метод разведений в агаре применяли для анализа динамики изменения уровней чувствительности бактерий в процессе их адаптации

к биоцидам. МИК биоцида, к которому велась адаптация, определяли для каждого 5-10 пассажа. Для инокулирования чашек Петри использовали штамп-репликатор. Штамп-репликатор изготовлен из нержавеющей стали, состоит из основания с 50-ю лунками глубиной 8 мм и диаметром 7 мм каждая и крышки с 50-ю штифтами-носителями (высота штифта – 10 мм, диаметр – 3 мм, площадь концевой площадки – 7,1 мм, посевной объем равен 0,001 мл), соответствующими лункам основания. Конечная посевная доза исследуемого микроорганизма на поверхности питательной среды составляла $1-2\times 10^6$ КОЕ/мл. Учет результатов проводили визуально по наличию или отсутствию роста культур.

Адаптацию бактерий к субингибирующим концентрациям биоцидов проводили 2 различными вариантами с использованием периодического культивирования бактерий. Периодическое культивирование осуществляли в 96-луночных культуральных планшетах для суспензионных культур (non-treated) без перемешивания. Через равные промежутки времени (обычно ежедневно) аликвоту культуры (30 мкл) переносили в новую лунку, содержащую 150 мкл питательной среды (ПС) с биоцидом или без него в случае контрольных планшетов для дополнительного цикла роста. Посевы инкубировали при температуре $+35\pm 2^\circ\text{C}$. Перенос клеток проводили, преимущественно, в логарифмической фазе роста.

При первом варианте адаптации бактерии последовательно пересеивали на жидкие питательные среды, содержащие антимикробные вещества в постоянных концентрациях. При втором – пошагово двукратно увеличивали концентрацию антимикробного вещества в ПС, «приучая» бактерии к постепенно повышающейся концентрации биоцида.

В работе были использовано два контроля: первый контроль (К1) – значения МИК биоцида, установленные перед началом работ по адаптации; второй контроль (К2) – значения МИК биоцида в отношении клинических изолятов бактерий, подвергшихся многократному перепассированию на питательной среде без биоцида (аналогично опытному варианту).

Для оценки устойчивости клинических изолятов к биоцидам использовали следующие показатели: МИК – минимальная концентрация антимикробного вещества, обеспечивающего подавление видимого роста исследуемого штамма через 18-24 часов воздействия при температуре $+35\pm 2^\circ\text{C}$; МИК₁₀₀ – минимальная ингибирующая

концентрация, при которой 100% изолятов бактерий подавлялись биоцидом; МИК₅₀ – минимальная ингибирующая концентрация, при которой 50% изолятов бактерий подавлялись биоцидом. МИК биоцида выражали в % по активно действующему веществу (АДВ).

Стабильность адаптивной устойчивости бактерий к хлоргексидину и бензалконииум хлориду исследовали путем определения МИК биоцидов адаптированных клеток при их пассировании в неселективном бульоне (без биоцида).

Ввод, статистическую обработку и анализ данных производили с помощью компьютерных программ Microsoft Excel версия 7.0 и Статистика версия 6.0.

Результаты

Установлено, что значения МИК биоцидов, определенные разными методами для одного и того же клинического изолята *Kl. pneumoniae*, отличались между собой (таблица 1). Для всех исследованных биоцидов, за исключением перекиси водорода, МИК, определенные методом серийных разведений в агаре, в среднем в 2-4 раза больше МИК, установленных методом разведений в бульоне. Подобный феномен можно объяснить тем, что прикрепление микроорганизмов к поверхностям изменяет их метаболическое состояние и снижает чувствительность к антибиотикам и биоцидам, в том числе за счет создания высокой плотности клеток, аналогичной плотности, достигаемой в биопленке [9, 10]. Противоположные данные, полученные в отношении перекиси водорода, обусловлены тем, что исследуемые микроорганизмы каталазоположительны. Фермент каталаза способствует разложению перекиси водорода на воду и молекулярный кислород. Очевидно, этот процесс более активно протекает в жидкой питательной среде.

Развитие устойчивости *Kl. pneumoniae* к биоцидам изучали в контролируемой среде с использованием метода адаптивной лабораторной эволюции (ALE). Адаптивная лабораторная эволюция – это инновационный подход к созданию эволюционировавших микробных штаммов с желаемыми характеристиками путем реализации правил естественного отбора вне естественной среды [11]. При этом микроорганизм культивируется в четко определенных условиях в течение длительных периодов времени, в диапазоне от недель до лет, что позволяет проводить отбор улучшенных фенотипов. ALE позволяет четко связать фенотипические изменения с

определенной питательной средой, приводящей к селекции признаков [12].

На первом этапе наших исследований мы изучили влияние хлоргексидина на развитие адаптивной устойчивости клебсиелл в концентрациях в 16-128 раз ниже минимальных ингибирующих значений (1 вариант адаптации).

Хлоргексидин является одним из наиболее часто используемых АДВ в составе антисептических средств, кроме того, он может использоваться в составе дезинфектантов и в качестве консерванта. Механизм действия хлоргексидина на бактерии хорошо изучен [13]. В готовых аптечных формах он используется в виде биглюконата.

Из данных, представленных в таблице 2, видно, что уровень устойчивости клинических изолятов *Kl. pneumoniae* к ХГ в процессе их пересева на питательные среды, содержащие постоянную низкую и супернизкую концентрации биоцида (1/16-1/128 МИК₁₀₀) к 80 пассажу увеличился в 2-4 раза по сравнению с контрольными значениями.

В процессе адаптации клинических изолятов *Kl. pneumoniae* к хлоргексидину было выявлено изменение их макроморфологии. Показано, что к 45 пассажу произошла диссоциация бактерий на 3 морфологических варианта. На среде Эндо было получено 2 варианта колоний (№1 и №3), представленных слизистыми, мукоидными М-колониями, и 1 вариант (№2) – гладкими, блестящими S-колониями. Кроме того, для варианта №2 было характерно наличие металлического блеска. Фотографии выявленных морфологических вариантов *Kl. pneumoniae* представлены на рисунке 1. Анализ чувствительности выявленных морфологических вариантов *Kl. pneumoniae* к хлоргексидину не установил корреляции между морфологией и уровнем устойчивости к биоциду. Варианты №1, 2 и 3 в условиях опыта характеризовались одинаковыми значениями МИК ХГ.

Второй этап адаптации клинических изолятов *Kl. pneumoniae* к ХГ показал, что субкультивирование бактерий в условиях постепенного повышения концентрации биоцида в питательной среде привело к увеличению МИК в 16-31 раз к 135 пассажу и концентрации биоцида в ПС 0,008% (таблица 3). Установлено, что в процессе длительного субкультивирования клебсиелл на питательных средах с увеличивающейся концентрацией ХГ происходит снижение жизнеспособности бактерий. Так, на концентрации 0,008% постепенно перестали расти все исследуемые изоляты микроорганизмов. Клинические изоляты №521 и №660 перестали расти на 127 пассаже, 838 и 846 – на 150 пассаже, и все остальные – на

Таблица 1. Характеристика клинических изолятов *Kl. pneumoniae* по их чувствительности к биоцидам

№	№ изолята	Минимальные ингибирующие концентрации (МИК) биоцидов, %													
		Хлоргексидин		Повидон йод		Перекись водорода		Этанол		Гликолевая кислота		Полигексамети-легуанидин гидрохлорид		Бензалко-ниум хлорид	
		I ¹	II ²	I	II	I	II	I	II	I	II	I	II	I	II
1	185/21	0,004	0,0013	1,25	0,625	0,05	0,25	24,0	24,0	0,25	0,0625	0,031	0,016	0,003	0,0010
2	199/21	0,004	0,0013	1,25	0,625	0,05	0,25	24,0	24,0	0,25	0,0625	0,031	0,016	0,003	0,0010
3	291/21	0,004	0,0013	1,25	0,625	0,05	0,25	24,0	12,0	0,25	0,0625	0,031	0,016	0,003	0,0010
4	313/21	0,004	0,0013	1,25	0,625	0,05	0,25	24,0	12,0	0,25	0,0625	0,031	0,016	0,003	0,0010
5	521/21	0,004	0,0013	1,25	0,625	0,05	0,25	24,0	12,0	0,25	0,0625	0,062	0,031	0,003	0,0004
6	660/21	0,004	0,0013	1,25	0,625	0,05	0,25	24,0	24,0	0,25	0,0625	0,062	0,031	0,003	0,0010
7	834/21	0,004	0,0013	1,25	0,625	0,05	0,25	24,0	24,0	0,25	0,0625	0,062	0,031	0,012	0,0004
8	838/21	0,004	0,0013	1,25	0,625	0,05	0,25	24,0	24,0	0,25	0,0625	0,062	0,031	0,012	0,0004
9	846/21	0,004	0,0013	1,25	0,625	0,05	0,25	24,0	12,0	0,25	0,0625	0,031	0,016	0,003	0,0010
10	ATCC 700603	0,004	0,0013	1,25	0,625	0,05	0,25	24,0	12,0	0,25	0,0625	0,031	0,016	0,003	0,0010

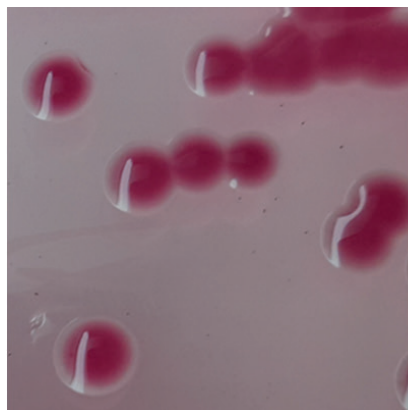
Примечание: ¹ – МИК, определенная методом серийных разведений в агаре; ² – МИК, определенная методом серийных разведений в бульоне.

Таблица 2. Изменение чувствительности клинических изолятов *Kl. pneumoniae* к хлоргексидину в процессе 1 варианта адаптации

№	№ изолята	Минимальные ингибирующие концентрации (МИК) хлоргексидина ¹ , %					
		K1 ²	K2 ³	конечная концентрация хлоргексидина в питательной среде ⁴ , %			
				1/16 МИК ₁₀₀	1/32 МИК ₁₀₀	1/64 МИК ₁₀₀	1/128 МИК ₁₀₀
1	185/21	0,004	0,008	0,008	0,008	0,008	0,004
2	199/21	0,004	0,008	0,008	0,008	0,008	0,008
3	291/21	0,004	0,008	0,008	0,008	0,004	0,004
4	313/21	0,004	0,008	0,008	0,008	0,008	0,008
5	521/21	0,004	0,008	0,008	0,008	0,008	0,004
6	660/21	0,004	0,008	0,008	0,008	0,008	0,008
7	834/21	0,004	0,004	0,008	0,008	0,008	0,008
8	838/21	0,004	0,004	0,004	0,004	0,004	0,004
9	846/21	0,004	0,008	0,016	0,008	0,016	0,016
10	ATCC 700603	0,004	0,008	0,008	0,016	0,016	0,016

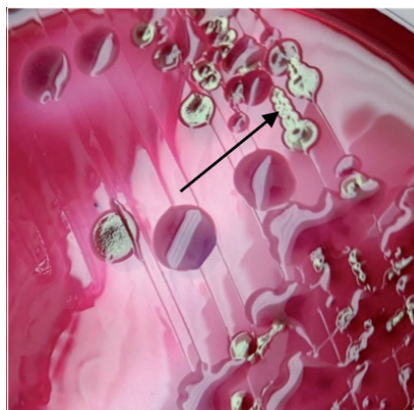
Примечание: ¹ – значения МИК биоцида, определённые методом серийных разведений в агаре; ² – значения МИК хлоргексидина, определённые перед началом работ по адаптации; ³ – значения МИК хлоргексидина в отношении клинических изолятов бактерий, подвергшихся многократному перепассированию на питательной среде без биоцида аналогично опытным вариантам; ⁴ – рассчитывали, исходя из МИК, определённых методом серийных разведений в бульоне.

Вариант 1



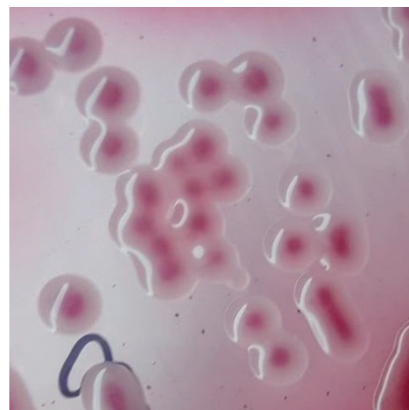
Колонии крупные, слизистые, куполообразные, малиновые. М-колонии.

Вариант 2



Колонии крупные, не слизистые, плоские, малиновые с металлическим блеском. S-колонии.

Вариант 3



Колонии слизистые, куполообразные, малиновые в центре и бесцветные (белые) по краю. М-колонии.

Рис. 1. Основные макроморфологические варианты *Kl. pneumoniae*, выявленные при субкультивировании (45 последовательных пассажей) бактерий на среде Эндо, содержащей 1/32 МИК₁₀₀ хлоргексидина

160 пассаже. Концентрация ХГ равная 0,008% оказалась предельной для изученных бактерий; никто из микроорганизмов не смог адаптироваться к более высокой концентрации ХГ. Однако длительное культивирование клебсиелл (20 последовательных пассажей) на ПС, содержащих максимальную адаптивную концентрацию ХГ (0,008%) привело к росту устойчивости 50% взятых в опыт клинических изолятов микробов еще в 2 раза (общее увеличение в 63 раза).

Данные по адаптации клинических изолятов *Kl. pneumoniae* к безалкониум хлориду с использованием 2 варианта адаптации представлены в таблице 4. Показано, что к 30 пассажиру и концентрации БХ в ПС 0,004% все изученные изоляты бактерий увеличили свой уровень устойчивости в 10 раз. Дальнейшее повышение концентрации биоцида до 0,008% привело к увеличению МИК еще в 2-5 раз в отношении 30% бактерий изученных изолятов. Концентрация БХ равная 0,008% оказалась предельной для изученных клинических изолятов микроорганизмов. В процессе субкультивирования клинических изолятов *K. pneumoniae* при постоянной концентрации БХ равной 0,008% был отмечен дополнительный рост устойчивости бактерий. В процессе исследований было достигнуто общее увеличение МИК БХ в 10 (изоляты №291, 846 и типовая культура), в 20 (изоляты №313, 521, 834 и 838) и 42 раза (клинические изоляты №185 и 199).

Установлено, что ПГМГ также способствует развитию адаптивной устойчивости изолятов *K. pneumoniae*. МИК ПГМГ в отношении 60% бактерий увеличились в 2-4 раза после 41 последовательного их перепассирования в присутствии биоцида в концентрациях от 0,0005% до 0,002% (таблица 5). На более высокой концентрации ПГМГ бактерии в условиях опыта не росли.

Такие антимикробные вещества, как повидон йод (в исследованиях использовали 10%-ный раствор повидон-йода (коммерческое название «Бетадин»)), этанол и гликолевая кислота, не вызывали увеличение устойчивости к ним клинических изолятов *K. pneumoniae*. В условиях регулярного перепассирования бактерий (28-51 пассажей) на ПС, содержащих повышающиеся концентрации биоцидов, МИК оставались на уровне контрольных значений (таблица 5).

Для оценки стабильности адаптивной устойчивости бактерий к хлоргексидину и бензалкониум хлориду и дифференцировки мутационной устойчивости к биоцидам от фенотипической, не связанной с изменением генотипа, адаптированные культуры продолжали перепассировать

на ПС без биоцида (26-36 последовательных пассажей). Клинические изоляты бактерий, адаптированные к ХГ, стали расти на ПС без биоцида, начиная со 144 пассажа, а к БХ – с 58 пассажа. На рисунках 2 и 3 эти места обозначены стрелкой. Из данных, представленных на рисунке 2, видно, что МИК ХГ резко снижались при культивировании бактерий на средах без биоцида. Так, уже через 5 пассажей МИК снизились с 0,125% до 0,03 и менее. Следует отметить, что на уровень контрольных значений МИК ХГ так и не вышли, они остались на уровне, превышающем контрольные значения в 2-4 раза.

Что же касается клинических изолятов *K. pneumoniae*, адаптированных к БХ, здесь сложилась несколько иная ситуация. Результаты субкультивирования адаптированных вариантов бактерий на ПС без БХ представлены на рисунке 3. Показано, что уровень чувствительности к БХ клинических изолятов *Kl. pneumoniae* №838 и №834 (20% исследуемых культур) не снизился и остался на адаптационном уровне. МИК БХ в отношении изолятов бактерий №313, 521 (20%), снизившись до уровня значений, в 10 раз превышающих контрольные, больше не снижались в течение 15-20 пассажей на ПС без биоцида. 30% бактерий, включая типовую культуру *Kl. pneumoniae*, перестали расти в процессе опыта. И только 3 штамма *Kl. pneumoniae* (30%) продемонстрировали снижение значений МИК БХ до контрольных значений.

Полученные данные свидетельствуют о том, что в развитие устойчивости клинических изолятов *K. pneumoniae* к ХГ максимальный вклад внесла изменчивость, не затрагивающая геном бактерий, а к БХ – как фенотипическая, так и мутационная изменчивость.

Обсуждение

Адаптивная или приобретенная устойчивость – это адаптация микроорганизмов к воздействию биоцида, характеризующаяся формированием устойчивости к бактериостатическим или бактерицидным концентрациям, к которым отсутствует исходная устойчивость [4]; она может проявляться на разных уровнях – генетическом и фенотипическом. Следует отметить, что устойчивость микроорганизмов к антимикробным средствам – это естественный процесс, при котором у них со временем развивается устойчивость к препаратам, применяемым для борьбы с ними. Чаще всего на фоне действия антимикробных средств происходит лишь селекция устойчивых микроорганизмов в результате подавления размножения чувствительных. И вполне очевидно,

Таблица 3. Динамика изменения чувствительности клинических изолятов *Kl. pneumoniae* к хлоргексидину (ХГ) в процессе 2 варианта адаптации

№	№ изолята	МИК хлоргексидина, %								Увеличение МИК по сравнению с К1
		К1 ¹ (0 пассаж)	К2 ² (160 пассаж)	97 пассаж	135 пассаж	145 пассаж	150 пассаж	155 пассаж	160 пассаж	
	ХГ ³	0%	0%	0,00025%	0,008%	0,008%	0,008%	0,008%	0,008%	
1	185/21	0,004	0,008	0,008	0,125	0,06	0,06	0,25	н.р.	в 63 раза
2	199/21	0,004	0,008	0,008	0,125	0,125	0,25	0,25	н.р.	в 63 раза
3	291/21	0,004	0,008	0,008	0,063	0,25	0,25	0,25	н.р.	в 31 раза
4	313/21	0,004	0,008	0,008	0,125	н.р. ⁴	0,25	0,25	н.р.	в 63 раза
5	521/21	0,004	0,008	0,008	н.р.	н.р.	н.р.	н.р.	н.р.	в 2 раза
6	660/21	0,004	0,008	0,008	н.р.	н.р.	н.р.	н.р.	н.р.	в 2 раза
7	834/21	0,004	0,004	0,008	0,125	0,03	0,125	0,25	н.р.	в 63 раза
8	838/21	0,004	0,004	0,008	0,125	0,008	н.р.	н.р.	н.р.	в 2 раза
9	846/21	0,004	0,008	0,008	0,063	0,016	н.р.	н.р.	н.р.	в 4 раза
10	ATCC 700603	0,004	0,008	0,016	0,125	0,125	0,125	0,25	н.р.	в 63 раза

Примечание: ¹ – значения МИК биоцида, замеренные перед началом работ по адаптации; ² – значения МИК биоцида в отношении клинических изолятов бактерий, подвергшихся многократному перепассированию на питательной среде без биоцида аналогично опытным вариантам; ³ – конечная концентрация биоцида в питательной среде; ⁴ – нет роста.

Таблица 4. Динамика изменения чувствительности клинических изолятов *Kl. pneumoniae* к бензалкониум хлориду (БХ) в процессе 2 варианта адаптации

№	№ изолята	МИК бензалкониум хлорида, %								Увеличение МИК по сравнению с К1
		К1 ¹ (0 пассаж)	К2 ² (80 пассаж)	30 пассаж	54 пассаж	63 пассаж	68 пассаж	72 пассаж	80 пассаж	
	БХ ²	0%	0%	0,004%	0,008%	0,008%	0,008%	0,008%	0,012%	
1	185/21	0,003	0,006	0,03	0,06	0,06	0,125	0,125	н.р.	в 42 раза
2	199/21	0,003	0,006	0,03	0,03	0,06	0,125	0,125	н.р.	в 42 раза
3	291/21	0,003	0,003	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03	н.р.	в 10 раза
4	313/21	0,003	0,003	0,03	0,03	0,06	0,06	0,016	н.р.	в 5 раза
5	521/21	0,003	0,006	0,03	0,03	0,03	0,06	0,06	н.р.	в 20 раза
6	660/21	0,003	0,006	0,03	0,016	н.р. ³	н.р.	н.р.	н.р.	в 10 раза
7	834/21	0,003	0,003	0,03	0,016	0,016	0,06	н.р.	н.р.	в 20 раза
8	838/21	0,003	0,003	0,03	0,03	0,03	0,06	н.р.	н.р.	в 20 раза
9	846/21	0,006	0,006	0,03	0,03	0,016	н.р.	н.р.	н.р.	в 3 раза
10	ATCC 700603	0,003	0,006	0,03	0,03	0,004	н.р.	н.р.	н.р.	в 1,3 раза

Примечание: ¹ – значения МИК биоцида, замеренные перед началом работ по адаптации; ² – значения МИК биоцида в отношении клинических изолятов бактерий, подвергшихся многократному перепассированию на питательной среде без биоцида аналогично опытным вариантам; ³ – конечная концентрация биоцида в питательной среде; ⁴ – нет роста.

Таблица 5. Динамика изменения чувствительности клинических изолятов *Kl. pneumoniae* к повидон йоду, этанолу, полигексаметиленгуанидин гидрохлориду и гликолевой кислоте в процессе 2 варианта адаптации; МИК, %

№	№ изолята	МИК, % по АДВ				МИК, % по АДВ			
		Повидон йод		Этанол		Полигексаметилен-гуанидин гидрохлорид		Гликолевая кислота	
		К1 ¹	51 пассаж	К1	51 пассаж	К1	41 пассаж	К1	28 пассаж
	Биоцид ²	0%	0,625%	0%	12,5%	0%	0,002%	0%	0,125%
1	185	1,25	1,25	24,0	24,0	0,031	н.р.	0,25	н.р.
2	199	1,25	1,25	24,0	24,0	0,031	н.р.	0,25	н.р.
3	291	1,25	1,25	24,0	24,0	0,031	0,06	0,25	0,25
4	313	1,25	1,25	24,0	24,0	0,031	0,125	0,25	н.р.
5	521	1,25	1,25	24,0	24,0	0,062	0,125	0,25	н.р.
6	660	1,25	1,25	24,0	24,0	0,062	0,125	0,25	н.р.
7	834	1,25	1,25	24,0	24,0	0,062	0,125	0,25	н.р.
8	838	1,25	1,25	24,0	24,0	0,062	0,06	0,25	0,25
9	846	1,25	1,25	24,0	24,0	0,031	н.р.	0,25	0,25
10	ATCC 700603	1,25	2,50	24,0	н.р. ³	0,031	н.р.	0,25	н.р.

Примечание: ¹ – значения МИК биоцида, замеренные перед началом работ по адаптации; ² – конечная концентрация биоцида в питательной среде; ³ – нет роста.

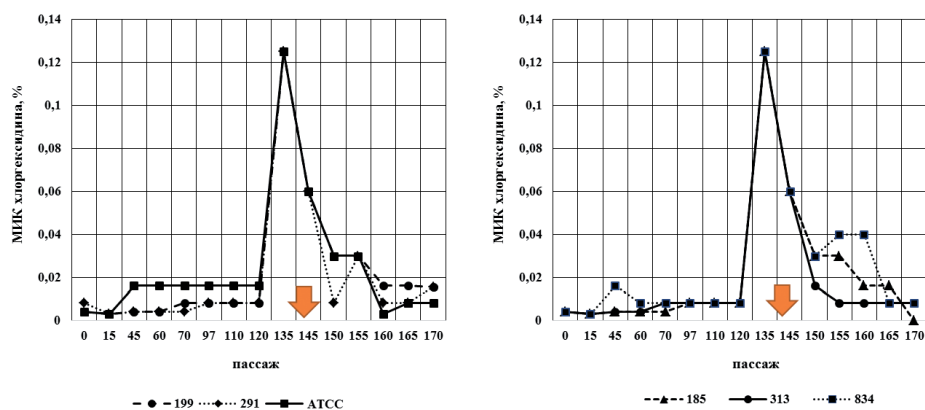


Рис. 2. Стабильность адаптивной устойчивости клинических изолятов *Kl. pneumoniae* к хлоргексидину. Стрелкой отмечен пассаж (144), с которого клинические изоляты начали расти на питательной среде без биоцида. В легенде к рисункам указаны № клинических изолятов бактерий

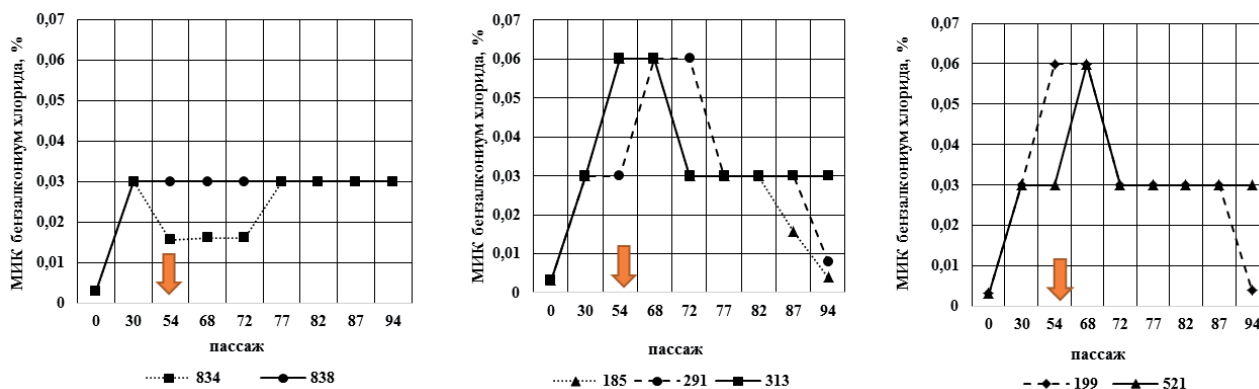


Рис. 3. Стабильность адаптивной устойчивости клинических изолятов *Kl. pneumoniae* к бензалконии хлориду. Стрелкой отмечен пассаж (58), с которого клинические изоляты начали расти на питательной среде без биоцида. В легенде к рисункам указаны № клинических изолятов бактерий

что выживание мутантных штаммов возможно лишь в том случае, если уровень приобретенной резистентности окажется выше той концентрации препарата, на фоне которой произошла селекция. Соответственно, чем выше концентрация применяемого препарата, тем менее вероятно формирование устойчивости [14, 15]. Существует понятие «окно селекции мутантов» – это диапазон концентраций антимикробных веществ, в пределах которых ингибируются чувствительные клетки, но происходит селекция мутантных устойчивых особей микроорганизмов или их субпопуляций. Эти концентрации больше значений минимальных ингибирующих концентраций и меньше минимальных бактерицидных концентраций (МБК). Считается, что концентрации антимикробных веществ ниже МИК не приводят к селекции устойчивых мутантов [16].

В наших исследованиях мы постепенно повышали концентрацию биоцидов в питательной среде, плавно выходя на концентрации, входящие в «окно селекции мутантов» и превышающие их. Полученные нами данные согласуются с результатами других исследований. Так, многократное последовательное воздействие бензалкония хлорида в увеличивающихся концентрациях на чувствительные штаммы *Enterobacter* spp. привело к увеличению МИК до 300 раз; *Escherichia coli* – 100 раз [17], *Klebsiella* spp. – 36 раз [18], *Pseudomonas aeruginosa* – 12 раз [19]. Воздействие сублетальных концентраций хлоргексидина приводило к снижению чувствительности у *E. coli* (увеличение МИК в 500 раз), *S. marcescens* (увеличение МИК в 128 раз), *P. aeruginosa* (увеличение МИК в 32 раза) и *K. pneumoniae* (увеличение МИК в 16 раз) [5].

В своих исследованиях мы также изучили влияние биоцидов в концентрациях значительно ниже значений МИК. Такие концентрации не оказывают селективного действия на отбор устойчивых к биоцидам штаммов, но они могут выступать в роли химических мутагенов или в качестве стрессового агента. Известно, что стрессы различной этиологии вызывают множество специфических и строго регулируемых адаптивных реакций, которые не только защищают бактерии от вредоносного стресса, но и стимулируют изменения в клетке, которые влияют на чувствительность микроорганизмов к противомикробным средствам [20-22]. Есть данные, что перуксусная кислота вызывает стресс, который стимулирует отбор генов устойчивости к антибиотикам [23, 24]. Кроме того, химические вещества в малых дозах могут вызывать различные стимулирующие эффекты. Термин «гормезис» принят для обозначения положительного действия малых доз химических или физических факторов. В научной литературе имеются данные, что биоциды в низких концентрациях могут вызывать гормезис у различных организмов, в том числе и бактерий. Субингибирующие дозы дезинфицирующих химических веществ могут усиливать пролиферацию и патогенность микробов, способствовать развитию и распространению устойчивости к антибактериальным средствам [25].

Несмотря на все вышесказанное, в научной литературе практически нет данных по влиянию биоцидов в концентрациях значительно ниже их МИК на микроорганизмы и их чувствительность к противомикробным средствам. По результатам наших исследований было показано, что воздействие низких и супернизких концентраций хлоргексидина (1/16–1/128 МИК₁₀₀) на клинические изоляты *K. pneumoniae* приводило к росту фенотипической устойчивости бактерий к биоциду в 2-4 раза при их субкультивировании на питательных средах, содержащих одну фиксированную

концентрацию антимикробного вещества. Также концентрации хлоргексидина в десятки раз ниже минимальных ингибирующих значений привели к диссоциации однородной популяции бактерий на варианты, различающиеся морфологическими и биохимическими свойствами. Зачастую с изменением макроморфологии бактерий связано изменение вирулентности, антигенных свойств микроорганизма и, возможно, резистентности. Есть данные, что отличительной особенностью «гипервирулентных» штаммов *Kl. pneumoniae* (англ. hvKP) является фенотип, для которого характерно повышенное производство полисахаридов, обеспечивающих высокую устойчивость клебсиелл к фагоцитозу. Такие штаммы клебсиелл устойчивы к действию бактерицидных факторов крови (комplementу и антимикробным пептидам) и способны к диссеминации в организме хозяина с участием нейтрофилов при незавершенном фагоцитозе [7].

Заключение

Нами продемонстрировано, что субингибирующие концентрации антисептических и дезинфицирующих средств, содержащих хлоргексидин и бензалкониум хлорид в качестве активно действующих веществ, могут привести к развитию адаптивной устойчивости микроорганизмов и тем самым снизить эффективность профилактических и лечебных мероприятий.

Финансирование

Исследования финансировались в рамках задания 3.11 «Изучить влияние сублетальных концентраций биоцидов (антисептиков и дезинфектантов) на формирование множественной устойчивости микроорганизмов-возбудителей оппортунистических инфекций к противомикробным средствам» ГПНИ «Трансляционная медицина», подпрограмма «Фундаментальные аспекты медицинской науки» (2021-2025 г.г.).

Литература

1. Andersson D.I., Hughes D. Microbiological effects of sublethal levels of antibiotics. *Nature Reviews Microbiology*. 2014; 12 (7): 465-78. doi: 10.1038/nrmicro 3270.
2. Наука о борьбе с инфекционными заболеваниями-2040. Горизонты науки глазами ученых. Центр стратегических разработок «Северо-Запад», Санкт-Петербург, 2017, 93 с.
3. Felicity T. Фармацевтические отходы в окружающей среде: взгляд с позиций культуры. Панорама общественного здравоохранения. 2017, 3(1): 1-140.
4. Шкарин В.В., Благоданова А.С., Ковалишена О.В. Современные представления о механизмах устойчивости

5. Kampf G. Adaptive bacterial response to low level chlorhexidine exposure and its implications for hand hygiene. *Microb Cell*. 2019; 1 (6-7): 307–320. doi: 10.15698/mic2019.07.683.
6. Wisplinghoff H., Seifert H., Wenzel R.P et al. Current trends in the epidemiology of nosocomial bloodstream infections in patients with hematological malignancies and solid neoplasms in hospitals in the United States. *Current. Clin Infect Dis*. 2003; 36: 1103-1110. doi: 10.1086/374339.

7. Семенова Д.Р., Николаева И.В., Фиалкина С.В. и др. Частота колонизации «гипервирулентными» штаммами *Klebsiella pneumoniae* новорожденных и грудных детей с внебольничной и нозокомиальной клебсиеллезной инфекцией. Российский вестник перинатологии педиатрии. 2020; 65:(5): 158-163. doi: 10.21508/1027-4065-2020-65-5-158-163.
8. Li B., Zhao Y., Liu C. et al. Molecular pathogenesis of *Klebsiella pneumoniae*. Future Microbiol 2014; 9(9): 1071-1081. doi: 10.2217/fmb.14.48.
9. Jamal M., Ahmad W., Andleeb S. et al. Bacterial biofilm and associated infections. J Chin Med Assoc. 2018; 81(1): 7-11. doi: 10.1016/j.jcma.2017.07.012.
10. Tusona H H., Weibel D B. Bacteria-surface interactions. Soft Matter. 2013; 17: 4368-4380. doi:10.1039/C3SM27705D.
11. Mavrommatia M., Daskalakis A., Papanikolaou S. et al. Adaptive laboratory evolution principles and applications in industrial biotechnology. Biotechnology Advances. 2022; 54: 107795. doi: 10.1016/j.biotechadv.2021.107795.
12. Dragosits M., Mattanovich D. Adaptive laboratory evolution – principles and applications for biotechnology. Microb Cell Fact. 2013; 12: 64. doi: 10.1186/1475-2859-12-64.
13. Saleem E.G., Seers C.A., Sabri A.N. et al. Dental plaque bacteria with reduced susceptibility to chlorhexidine are multidrug resistant. BMC Microbiol. 2016; 16: 214. doi: 10.1186/s12866-016-0833-1.
14. Белобородов В.В. Практические подходы к повышению эффективности подавления резистентной грамотрицательной флоры. Consilium Medicum. 2014; 12: 58-63.
15. Духанин А.С. Влияние фармакологического профиля антимикробного препарата на эффективность терапии инфекций мочевыводящих путей. Consilium Medicum. 2019; 07: 69-74.
16. Петровская Т.А., Тапальский Д.В. Влияние антибиотиков разных групп на возникновение мутационной устойчивости к колистину у *Klebsiella pneumoniae*. Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. 2021; 23 (2): 166-172. doi: 10.36488/cmasc.2021.2.166-172.
17. Braoudaki M., Hilton A.C. Adaptive resistance to biocides in *Salmonella enterica* and *Escherichia coli* O157 and cross-resistance to antimicrobial agents. J. Clin. Microbiol. 2004; 42: 73-78. doi: 10.1128/JCM.42.1.73-78.2004.
18. Gadea R., Fernandez Fuentes M.A., Perez Pulido R. et al. Effects of exposure to quaternary-ammonium-based biocides on antimicrobial susceptibility and tolerance to physical stresses in bacteria from organic foods. Food Microbiol. 2017; 63: 58-71. doi: 10.1016/j.fm.2016.10.03.
19. Mc Cay P.H., Ocampo-Sosa A.A., Fleming G.T. Effect of subinhibitory concentrations of benzalkonium chloride on the competitiveness of *Pseudomonas aeruginosa* grown in continuous culture. Microbiology. 2010; 156: 30-38. doi: 10.1099/mic.0.029751-0.
20. Poole K. Bacterial stress responses as determinants of antimicrobial resistance. Journal of Antimicrobial Chemotherapy. 2012; 67 (9): 2069-2089. doi: 10.1093/jac/dks196.
21. Roedel A., Dieckmann R., Brendebach H. et al. Biocide-Tolerant *Listeria monocytogenes* Isolates from German Food Production Plants Do Not Show Cross-Resistance to Clinically Relevant Antibiotics. Applied and Environmental Microbiology. 2019; 85 (20): 45-60. doi: 10.1128/AEM.01253-19.
22. Soumet C., Méheust D., Pissavin C. et al. Reduced susceptibilities to biocides and resistance to antibiotics in food-associated bacteria following exposure to quaternary ammonium compounds. J. Appl. Microbiol. 2016; 121: 1275-1281. doi: 10.1111/jam.13247.
23. Kampf G. Biocidal Agents Used for Disinfection Can Enhance Antibiotic Resistance in Gram-Negative Species. Review. Antibiotics. 2018; 7: 110-134. doi: 10.3390/antibiotics7040110.
24. Cesare A.Di., Fontaneto D., Doppelbauer J. et al. Fitness and recovery of bacterial communities and antibiotic resistance genes in urban wastewaters exposed to classical disinfection treatments. Environ. Sci. Technol. 2016; 50: 10153-10161. doi: 10.1021/acs.est.6b02268.
25. Agathokleous E., Barceló D., Iavicoli I. et al. Disinfectant-induced hormesis: An unknown environmental threat of the application of disinfectants to prevent SARS-CoV-2 infection during the COVID-19 pandemic? Environ Pollut. 2022; 292(Pt B):1-6. doi: 10.1016/j.envpol.2021.118429.

Сведения об авторах

Циркунова Жанна Федоровна – кандидат биологических наук, заведующий лабораторией внутрибольничных инфекций, Беларусь, 220116, Минск, пр. Дзержинского, д. 83; телефон: +375 (29) 124 27 37; ORCID: 0000-0001-8728-1113; e-mail: tsyrkunova@list.ru.

Емельянова Алеся Александровна – младший научный сотрудник лаборатории внутрибольничных инфекций, Беларусь, 220116, Минск, пр. Дзержинского, д. 83; ORCID: 0000-0001-8354-6380; e-mail: alesiaemel@gmail.com.

Гудкова Елена Ивановна – кандидат медицинских наук, доцент, руководитель научно-исследовательской части, Беларусь, 220116, Минск, пр. Дзержинского, д. 83; ORCID: 0000-0002-4818-289X; e-mail: GudkovaEI@bsmu.by.

Скороход Геннадий Алексеевич – кандидат медицинских наук, доцент, ведущий сотрудник лаборатории внутрибольничных инфекций, Беларусь, 220116, Минск, пр. Дзержинского, д. 83; ORCID: 0000-0002-7896-1413; e-mail: skorlabvbi@gmail.com.

Буткевич Василий Васильевич – младший научный сотрудник лаборатории внутрибольничных инфекций, Беларусь, 220116, Минск, пр. Дзержинского, д. 83; ORCID: 0000-0002-9252-3073; e-mail: vasbut31@gmail.com.

Слабко Ирина Николаевна – старший научный сотрудник лаборатории внутрибольничных инфекций, Беларусь, 220116, Минск, пр. Дзержинского, д. 83; e-mail: labsuperg@yandex.ru.

Бердник Наталья Николаевна – младший научный сотрудник лаборатории внутрибольничных инфекций, Беларусь, 220116, Минск, пр. Дзержинского, д. 83; ORCID: 0000-0002-1369-4246; e-mail: n-berdnik@yandex.ru.

Гаврилова Ирина Александровна – кандидат медицинских наук, доцент кафедры микробиологии, вирусологии, иммунологии, Беларусь, 220024, Минск, пер. Асалиева 5, e-mail: irga-1939@mail.ru.

Поступила 17.08.2022 г.