

HANNA KRZYWICKA, JOANNA JANOWSKA

OPORNOŚĆ BAKTERII NA DZIAŁANIE NIEKTÓRYCH ŚRODKÓW DEZYNFEKCYJNYCH

CZ. II. CHLORAMINA I PREPARATY JODOFOROWE

Z Zakładu Toksykologii Sanitarnej Państwowego Zakładu Higieny w Warszawie
Kierownik: prof. dr hab. T. Syrowatka

Przedstawiono wartości stężeń bakteriostatycznych chloraminy i 3 preparatów jodoforowych w czasie pasażowania na podłożach zawierających stopniowo podwyższone ilości badanych środków. Porównano najwyższe wartości stężeń bakteriostatycznych z wartościami stężeń roztworów działających bakteriobójczo.

Od początku lat sześćdziesiątych datuje się zainteresowanie możliwością powstawania szczepów drobnoustrojów opornych na działanie środków dezynfekcyjnych. Spośród trzech mechanizmów kształtowania się oporności: mutacja, adaptacja, selekcja, w przypadku tych środków największe znaczenie przypisuje się dwu ostatnim [2, 3, 4].

Oporność drobnoustrojów na środki dezynfekcyjne powstawać może w warunkach trwałej ekspozycji na ich działanie, jak np. źle użytkowane roztwory dezynfekcyjne, dezynfekowana woda w pływalniach lub woda do picia [1, 2, 3, 4, 5, 11, 12, 13, 14, 15]. Zaobserwowano, że w ogromnej większości przypadków po usunięciu z otoczenia drobnoustrojów szkodliwego środka i pasażowaniu na normalnych podłożach wzrostowych tracą one oporność na dany czynnik.

Celem II części pracy było określenie czy drobnoustroje testowe mają zdolność nabywania oporności na chloraminę oraz niektóre jodoforowe preparaty dezynfekcyjne.

MATERIAŁY I METODY

Organizmy testowe:

Staphylococcus aureus 4163, *Escherichia coli* 8196, *Pseudomonas aeruginosa* 6749, *Proteus vulgaris* 4635, pochodzące z National Collection of Type Culture w Londynie.

Preparaty dezynfekcyjne:

- Chloramina T — chloramid sodowy kwasu p-toluenosulfonowego (czynnego chloru 25%), prod. Zakłady Chemiczne „Chemifarm” Chorzów
- Jodoseptan — kompleksowe połączenie jodu z eterem oleilowo-etanolowym, kwas ortofosforowy (czynnego jodu 1,9%) prod. Chemiczno-Farmaceutyczna Spółdzielnia Pracy „Septofarma” Zabki k/Warszawy
- Josan — kompleksowe połączenie jodu z eterem poliglikolowym, kwas fosforowy (czynnego jodu 1,75%) prod. Ciba-Geigy, Bazylea, Szwajcaria
- Wescodyna — kompleksowe połączenie jodu z eterem poliglikolowym (czynnego jodu 1,6%) prod. Ciba-Geigy, Bazylea, Szwajcaria

Metodyka

Metodą określania najniższych stężeń bakteriostatycznych (MIC) wytypowano stężenia stosowane w dalszej części badań, a mianowicie w metodzie określania zmian oporności na działanie chemicznych środków odkażających [8]. Metoda określania zmian oporności polega

na pasażowaniu bakterii w podłożach płynnych zawierających subletalne ilości preparatu dezynfekcyjnego w stopniowo podwyższanych stężeniach.

Metodą nośnikową ustalono wartość najniższego stężenia roztworów preparatów powodujących odkażenie 100% nośników metalowych w temp. 20°C, w czasie 10 min. działania [8].

WYNIKI

W tabeli I przedstawiono wyjściowe stężenia bakteriostatyczne oraz stężenia bakteriobójcze preparatów [9]. Ryc. 1—4 obrazują wartości najniższych stężeń preparatów działających bakteriostatycznie w czasie wielokrotnego pasażowania na podłożu z dodatkiem preparatów dezynfekcyjnych.

Tabela I. Wartości stężeń środków dezynfekcyjnych (w %) wykazujących działanie przeciwbakteryjne

Środek dezynfekcyjny	Organizm testowy	Stężenie bakteriostatyczne*)	Stężenie bakteriobójcze**)
Chloramina	<i>S. aureus</i>	0,30	1
	<i>E. coli</i>	0,32	1
	<i>P. vulgaris</i>	0,30	1
	<i>Ps. aeruginosa</i>	0,25	2
Jodoseptan	<i>S. aureus</i>	0,13	3
	<i>E. coli</i>	0,40	5
	<i>P. vulgaris</i>	0,40	8
	<i>Ps. aeruginosa</i>	0,30	10
Josan	<i>S. aureus</i>	0,5	10
	<i>E. coli</i>	0,7	10
	<i>P. vulgaris</i>	0,6	10
	<i>Ps. aeruginosa</i>	0,6	12
Wescodyna	<i>S. aureus</i>	2,0	10
	<i>E. coli</i>	2,5	10
	<i>P. vulgaris</i>	2,0	10
	<i>Ps. aeruginosa</i>	2,5	12

* — Zbadane metodą MIC

** — Zbadane metodą nośnikową, czas działania 10 min. temp. 20°C

W tabeli II zestawiono liczby wykazujące stosunek najniższych i najwyższych stężeń bakteriostatycznych w czasie pasażowania do stężeń wyjściowych oraz stosunek stężeń bakteriobójczych do najwyższych stężeń bakteriostatycznych preparatów.

Chloramina

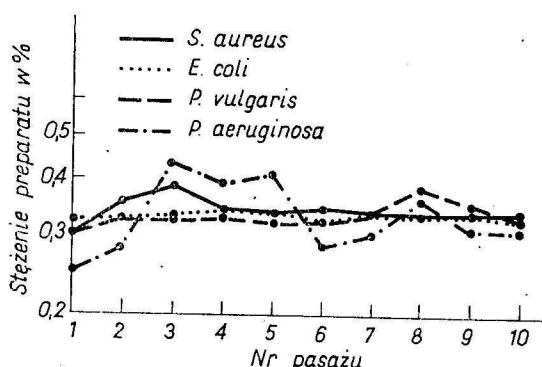
W czasie pasażowania na podłożu wzrostowym zawierającym chloraminę obserwuje się nieznaczne zmiany oporności *St. aureus*, *E. coli* i *P. vulgaris*. Stężenia działające bakteriostatycznie wahają się w granicach 0,30—0,38%. Jedynie w przypadku *Ps. aeruginosa* widoczne są nieco większe różnice oporności. Mają one jednak charakter skokowy, nie wykazują ciągłego wzrostu (ryc. 1). Bakteriobójcze stężenie chloraminy dla *Ps. aeruginosa* jest dwukrotnie wyższe niż dla pozostałych drobnoustrojów.

Tabela II. Zmiany stężeń bakteriostatycznych w czasie pasażowania drobnoustrojów w podłożu ze wzrastającym stężeniem środków dezynfekcyjnych

Środek dezynfekcyjny	<i>S. aureus</i>		<i>E. coli</i>		<i>P. vulgaris</i>		<i>Ps. aeruginosa</i>	
	A	B	A	B	A	B	A	B
Wescodyna	1,0—1,8	2,8	1,0—1,5	7,0	1,1—1,7	3,0	1,0—1,6	3,1
Jodoseptan	1,9—4,2	14,5	1,2—1,5	8,3	1,1—1,5	13,3	1,0—1,9	17,5
Josan	1,0—1,3	15,4	0,9—1,0	14,0	0,9—1,1	15,0	0,9—1,2	17,0
Chloramina	1,1—1,3	2,1	1,0—1,2	2,7	1,1—1,3	2,6	1,1—1,7	4,7

A — zakres stosunku stężeń bakteriostatycznych w czasie pasażowania do stężeń wyjściowych

B — stosunek stężeń użytkowych (10 min działania) do najwyższych stężeń bakteriostatycznych



Ryc. 1. Wartości stężeń bakteriostatycznych w czasie pasażowania organizmów testowych na podłożu z chloraminą.

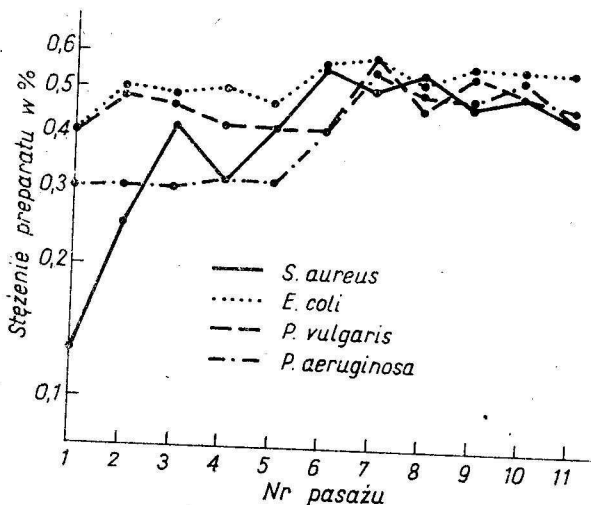
Jodoseptan

W przypadku Jodoseptanu wyjściowe stężenie bakteriostatyczne preparatu w stosunku do *S. aureus* wynosi 0,13% i różni się od stężenia bakteriostatycznego dla pozostałych drobnoustrojów wynoszącego 0,3—0,4% (tab. I). W przebiegu wszystkich prostych obrazujących zmiany stężeń bakteriostatycznych daje się zauważyć stopniowy ich wzrost wraz z liczbą pasażu (ryc. 2). Dla *S. aureus* w czasie pierwszych 6 pasażu mają one charakter skokowy. Stężenia bakteriostatyczne dla wszystkich drobnoustrojów ulegają wyrównaniu i począwszy od 7 pasażu wahają się w granicach od 0,45 do 0,57%.

Stosunek najwyższych stężeń bakteriostatycznych w czasie pasażowania do stężeń wyjściowych jest dla tego preparatu najwyższy. Wynosi on 1,5 (*P. vulgaris* i *E. coli*), 1,9 (*Ps. aeruginosa*) i 4,2 (*S. aureus*) (tab. II).

Josan

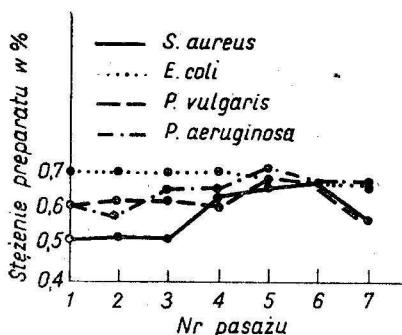
Bakteriostatyczne stężenia Josanu wynoszą od 0,5 do 0,7%. Przebieg prostych charakteryzujących zmiany stężeń Josanu, które działają bakteriostatycznie na wszystkie drobnoustroje testowe z wyjątkiem *E. coli*



Ryc. 2. Wartości stężeń bakteriostatycznych w czasie pasażowania organizmów testowych na podłożu z Jodoseptanem.

wykazuje niewielkie tendencje wzrostowe do 5 pasażu, a w dalszych pasażach ulega obniżeniu (ryc. 3). Stężenie bakteriostatyczne dla *E. coli* utrzymuje się na jednym poziomie do 4 pasażu, po czym również ulega obniżeniu.

Spośród wszystkich badanych preparatów jodoforowych najniższe wartości stosunku stężeń bakteriostatycznych otrzymano w przypadku Josanu, wynoszą one od 0,9 do 1,3 (tab. II).

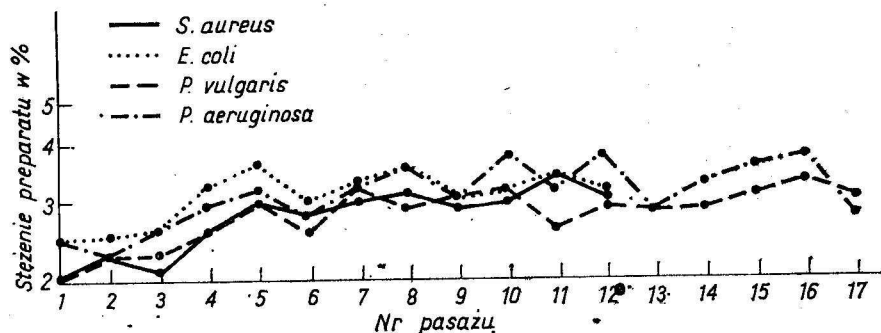


Ryc. 3. Wartości stężeń bakteriostatycznych w czasie pasażowania organizmów testowych na podłożu z Josanem.

Wescodyna

Wescodyna posiada najwyższe wartości stężeń bakteriostatycznych spośród badanych preparatów (2,0—3,9%).

Oporność wszystkich drobnoustrojów testowych na Wescodynę wzrasta najbardziej widocznie do 5 pasażu, po czym do 12 pasażu przebieg prostych ma charakter sinusoidalny z widoczną tendencją wzrostową (ryc. 4). Po 12 pasażach występuje zmniejszenie oporności, następnie ulega ona znów stopniowemu podwyższeniu lecz nie osiąga wartości widocznej w 12 pasażu. Po 16 pasażu jest ponowny spadek oporności.



Ryc. 4. Wartości stężeń bakteriostatycznych w czasie pasażowania organizmów testowych na podłożu z Wescodyną.

Wescodyna jest drugim po Jodoseptanie preparatem charakteryzującym się względnie wysokim (1,5—1,8) stosunkiem stężeń bakteriostatycznych (tab. II).

DYSKUSJA

Zarówno w przypadku chloraminy, jak i preparatów jodoforowych nie występują widoczne zmiany oporności drobnoustrojów testowych poddanych działaniu subletalnych stężeń preparatów w podłożu wzrostowym. Jedynie *S. aureus* po serii pasażu w podłożu z Jodoseptanem wymaga stosowania stężeń 4 krotnie wyższych od wyjściowych. Oporność pozostałych drobnoustrojów na działanie badanych preparatów nie zwiększa się nawet dwukrotnie. Do podobnych wniosków doszli Favero i Drake [5]. Nie stwierdzili oni obecności drobnoustrojów opornych na chlor w chlorowanej wodzie w pływalniach, przypuszczają jednak, że zwiększenie się liczby *Pseudomonas sp.* w wodzie jodowanej może być spowodowane genetycznymi zmianami tych drobnoustrojów, które pozwalają im na rozmnażanie się w wodzie poddanej dezynfekcji jodem. Willemu natomiast udało się uzyskać szczepy *E. coli*, *Ps. aeruginosa* i *Aerobacter cloacae* 4-krotnie bardziej odporne na chloraminę od wyjściowych [15].

W świetle badań oporności drobnoustrojów na czwartorzędowe zasady amoniowe i glukonian chlorohexydyny, w przypadku których notowano nawet 1000-krotny wzrost wartości stężeń działających bakteriostatycznie [3, 14], można uznać, że zarówno przedstawione wyniki badań, jak i uzyskane w cytowanym piśmiennictwie, wskazują na niewielkie jedynie zdolności nabywania przez drobnoustroje oporności na chloraminę i preparaty jodoforowe.

Wartości stosunku stężeń bakteriobójczych do najwyższych stężeń bakteriostatycznych, w przypadku Jodoseptanu i Josanu, mieszczą się w granicach od 8,3 do 17,5 (tab. II). Wydaje się, że stanowi to dostateczną gwarancję skuteczności działania preparatów w warunkach praktycznych. Stosowanie preparatów w stężeniach uznanych za bakteriobójcze i właściwe użytkowanie roztworów nie będzie sprzyjało rozwijaniu się w nich drobnoustrojów opornych.

Na uwagę zasługuje względnie mały, bo mieszczący się w granicach 2,1—2,7 stosunek stężeń bakteriobójczych do bakteriostatycznych dla *S. aureus*, *E. coli* i *P. vulgaris* w przypadku chloraminy oraz 2,7—3,1 dla wszystkich

drobnoustrojów testowych w przypadku Wescodiny. Niewielka rozpiętość tych stężeń nasuwa przypuszczenie, że przy zbyt małej dokładności w przygotowaniu roztworów dezynfekcyjnych ew. obciążeniu ich substancjami organicznymi, w przypadku trwałego użytkowania mogą wystąpić warunki sprzyjające adaptacji drobnoustrojów. Przy niewielkich nawet zdolnościach drobnoustrojów do nabywania oporności na działanie w/w preparatów nie można wykluczyć możliwości wykształcenia się w tych warunkach organizmów opornych.

WNIOSKI

Badane drobnoustroje testowe w niewielkim stopniu uodporniają się na działanie chloraminy i preparatów jodoforowych.

Dwukrotna różnica pomiędzy najwyższym stężeniem bakteriostatycznym i bakteriobójczym — użytkowym chloraminy i Wescodiny wydaje się nie stanowić dostatecznej gwarancji skuteczności bakteriobójczej w warunkach praktycznych, szczególnie gdy w środowisku znajdują się znaczne zanieczyszczenia substancjami organicznymi.

Wysoka wartość stosunku stężeń bakteriobójczych do bakteriostatycznych w przypadku Jodoseptanu i Josanu wskazuje, że preparaty te mogą być stosowane w stężeniach uznanych za bakteriobójcze bez zagrożenia możliwością wykształcenia się opornych na ich działanie szczepów.

Х. К живицка, Й. Яновска

УСТОЙЧИВОСТЬ БАКТЕРИЙ К ДЕЙСТВИЮ НЕКОТОРЫХ ДЕЗИНФЕКЦИОННЫХ СРЕДСТВ

Ч. II. Хлорамин и йодофорные препараты

Резюме

Целью проведённых исследований было установление, имеют ли тест-бактерии, представительные для больничной среды (*E. coli*, *S. aureus*, *P. vulgaris*, *Ps. aeruginosa*) способность приобретения устойчивости к хлорамину, Иодосептану, Иосану и Вескодину. Применяли метод определения наиболее низких бактериостатических концентраций (MIC). Микроорганизмы пассировали в жидких средах содержащих дезинфекционные препараты в постепенно увеличивающихся концентрациях. Бактерицидное действие препаратов оценивали методом носителей.

Только в случае Иодосептана было установлено 4-кратное увеличение устойчивости *S. aureus*. Устойчивость остальных микроорганизмов к действию исследуемых препаратов не увеличилась даже в 2 раза. Отношение бактерицидной концентрации к наибольшей бактериостатической концентрации составляло 8,3—17,3 в случае Иодосептана и Иосана, 2,8—7,0 в случае Вескодина и 2,1—4,7 в случае хлорамина.

H. Krzywicka, J. Janowska

BACTERIAL RESISTANCE TO CERTAIN DISINFECTANTS

II. Chloramine and iodophoric agents

Summary

The reported investigations were carried out for establishing whether the tested bacteria occurring commonly in hospital environment (*Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Proteus vulgaris*, *Pseudomonas aeruginosa*) possess the ability of acquiring resistance to chloramine, Jodoseptan, Iosan and Wescodin. The method used included determination of the minimal inhibitory concentrations (MIC). The organisms were passaged on liquid media containing the disinfectants in gradually increasing concentrations. The bactericidal effect of the preparations was determined by the carrier method.

Only in the case of Jodoseptan a fourfold increase of *S. aureus* resistance was observed. The resistance of the remaining organisms was not increased even twofold to the action of the other preparations. The ratio of the bactericidal concentration to the maximal bacteriostatic concentration was from 8.3 to 17.3 in the case of Jodoseptan and Iosan, from 2.8 to 7.0 in the case of Vescodin, and from 2.1 to 4.7 for chloramine.

PIŚMIENNICTWO

1. Causes and prevention of sepsis due to Gram-negative bacteria. Proc. Roy. Soc. Med., 1971, 64, 979. — 2. *Bielicka A.*: Wrażliwość drobnoustrojów wyosobnionych ze środowiska szpitalnego na działanie środków dezynfekcyjnych. Praca doktorska 1980. — 3. *Chaplin E. C.*: Bacterial resistance to quaternary ammonium disinfectants. J. Bacteriol. 1952, 63, 543. — 4. *Eigener U.*: Resistenz Gegen Desinfektionsmittel. Hosp Hygiene., 1976, 68, 13—17. — 5. *Favero S. M., Drake H. C.*: Factors influencing the occurrence of high numbers of iodine-resistant bacteria in iodinated swimming pools. Appl. Microbiol., 1966, 14, 627. — 6. *Janowska J., Krzywicka H.*: Oporność bakterii na działanie niektórych środków dezynfekcyjnych. Cz. I. Preparaty fenolowe i aldehydowe. Roczniki PZH 1980, 31, 593. — 7. *Jaszczuk E., Krzywicka H.*: Oporność bakterii na działanie niektórych kationowych związków powierzchniowo-czynnych. Roczniki PZH, 1973, 24, 241. — 8. *Krzywicka H., Bielicka A., Janowska J., Jaszczuk E., Tadeusiak B.*: Metody badania aktywności bakteriobójczej preparatów dezynfekcyjnych. Wyd. Met. PZH, 1974. — 9. *Krzywicka H., Bielicka A., Janowska J., Jaszczuk E.*: Zastosowanie chemicznych środków dezynfekcyjnych w szpitalach. Wyd. Met. PZH, 1976. — 10. *Krzywicka H.* red.: Dezynfekcja szpitalna — teoria i praktyka, PZWL, Warszawa 1979. — 11. *Pseudomonas* Species. The Third International Symposium Poznań 1977. — 12. Resistance of microorganisms to disinfectants. First International Symposium PAN, Poznań 1973. — 13. Resistance of microorganisms to disinfectants. Second International Symposium PAN, Poznań 1975. — 14. Resistance of Gram-negative rods. Proceedings of Fourth International Symposium PAN, Poznań 1980. — 15. *Wille B.*: Praktische Laborversuche zur Resistenzentwicklung von Mikroorganismen gegen Desinfektionsmittel. Hosp. Hygiene 1976, 68, 17.

Dn. 10.I.1981 r.

00-791 Warszawa, ul. Chocimska 24