

В.В. Малышев¹, Т.А. Змеева¹,
В.Б. Сбойчаков¹, Е.А. Аверина²

Оценка вирулицидных свойств дезинфицирующего вещества на основе полигексаметиленгуанидина гидрохлорида и алкилдиметилбензиламмония хлорида для профилактики инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи

¹Военно-медицинская академия им. С.М. Кирова, Санкт-Петербург

²Белгородская областная клиническая больница Святителя Иоасафа, Белгород

Резюме. Рассматриваются результаты экспериментального исследования по оценке вирулицидного действия дезинфицирующего вещества на основе полигексаметиленгуанидина гидрохлорида и алкилдиметилбензиламмония хлорида. Для оценки вирулицидных свойств исследуемого вещества использовался концентрат норовируса человека, полученный из пула фекалий госпитализированных с диагнозом острого гастроэнтерита. Концентрат норовируса получали многостадийной очисткой с использованием центрифугирования и мембранной фильтрации на фильтрах из нитроцеллюлозы в тангенциальном потоке. Первоначально наличие частиц норовируса в препарате и отсутствие сочетанной вирусной инфекции подтверждали с помощью просвечивающей электронной микроскопии с использованием стандартных методик идентификации по характерным морфологическим признакам и молекулярно-биологическим подтверждением. Установлена высокая вирулицидная активность препарата. Можно предположить, что заряженный поликатион (полигексаметиленгуанидина гидрохлорид и алкилдиметилбензиламмония хлорид) электростатически взаимодействует с частицами норовируса. Взаимодействие начинается с наружных отрицательно заряженных Р-доменов, затем охватывает гидрофобные S-домены, что приводит к диссоциации молекул капсидного белка и, таким образом, к разрушению вирусных частиц. Рибонуклеиновая кислота норовируса в отсутствие рецепторных белков не способна осуществлять заражение, более того, она также разрушается и инактивируется компонентами дезинфицирующего средства. Кроме того, изучался спектр циркулирующих доминирующих штаммов микроорганизмов в медицинском стационаре. Для ротации дезинфицирующих средств в медицинских учреждениях, связанных с оказанием медицинской помощи для профилактики инфекций, был использован полигексаметиленгуанидина гидрохлорид и алкилдиметилбензиламмония хлорид. В многопрофильном стационаре был применен указанный выше дезинфектант и получены положительные результаты, свидетельствующие об эффективности дезинфектанта из полигексаметиленгуанидина гидрохлорида и алкилдиметилбензиламмония хлорида.

Ключевые слова: инфекции, связанные с оказанием медицинской помощи, полигексаметиленгуанидина гидрохлорид, алкилдиметилбензиламмония хлорид, просвечивающая электронная микроскопия, полимерная цепная реакция в режиме реального времени, мембранная фильтрация, вирулицидное действие.

Введение. Стратегической задачей здравоохранения является обеспечение качества медицинской помощи и создание безопасной среды пребывания для пациентов и персонала в организациях, осуществляющих медицинскую деятельность. Инфекции, связанные с оказанием медицинской помощи (ИСМП), являются важнейшей составляющей этой проблемы в силу широкого распространения негативных последствий для здоровья пациентов, персонала и экономики государства. Общим критерием для отнесения случаев инфекций к ИСМП является непосредственная связь их возникновения с оказанием медицинской помощи (лечением, диагностическими исследованиями, иммунизацией и т. д.). Именно поэтому, к ИСМП относят случаи инфекции не только присоединяющиеся к основному заболеванию у госпитализированных пациентов, а также связанные

с оказанием любых видов медицинской помощи (в амбулаторно-поликлинических, образовательных, санаторно-оздоровительных учреждениях, учреждениях социальной защиты населения, при оказании скорой медицинской помощи, помощи на дому и др.), и случаи инфицирования медицинских работников в результате их профессиональной деятельности [2, 4, 5].

В национальной концепции профилактики инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи, отдельным вопросом рассматривается ротация дезинфицирующих средств, совершенствование лабораторной диагностики и мониторинга возбудителей ИСМП. Лабораторная диагностика и мониторинг возбудителей ИСМП – важнейшие компоненты системы эпидемиологического надзора за ИСМП. Микробиологический мониторинг возбудителей ИСМП предусматривает обязательное перманентное микробиоло-

гическое обеспечение системы эпидемиологического надзора за ИСМП; этиологическую расшифровку ИСМП у пациентов и медицинского персонала, внутривидовую идентификацию (типирование) возбудителей ИСМП; исследование объектов больничной среды; определение чувствительности выделенных штаммов микроорганизмов к антимикробным средствам; создание и ведение баз данных о возбудителях ИСМП; эффективный контроль качества микробиологических исследований в организациях здравоохранения; статистический анализ результатов исследований. Как правило, объем и уровень микробиологических исследований, должны соответствовать условиям и профилю организации здравоохранения, обеспечивать эффективность эпидемиологического надзора. Профилактика ИСМП тесно связана с дезинфекцией и совершенствованием лабораторной диагностики и мониторинга возбудителей ИСМП: изучением дезинфектантов и их ротацией; оптимизацией перечня показаний для микробиологического исследования клинического материала и объектов больничной среды; включением методов микробиологической диагностики в стандарты оказания медицинской помощи; развитием сети микробиологических лабораторий организаций здравоохранения; оснащением лабораторий, участвующих в этиологической расшифровке и мониторинге возбудителей ИСМП современным лабораторным оборудованием, диагностическими системами; оптимизацией системы забора и доставки образцов биологического материала в лабораторию; совершенствованием и унификацией методов выделения и идентификации возбудителей ИСМП; разработкой и внедрением экспресс-методов микробиологической диагностики ИСМП бактериальной и вирусной этиологии и др. [1, 2].

Особое место среди ИСМП занимают возбудители вирусных инфекций, в частности, норовирусы. Калицивирусы человека относятся к семейству *Caliciviridae*. Генетическим материалом калицивирусов является однополовая плюс-смысловая рибонуклеиновая кислота размером около 7500–7700 нуклеиновых оснований. В состав семейства *Caliciviridae* входят роды *Norovirus*, *Sapovirus*, *Lagovirus* и *Vesivirus*. Заболевания человека (вирусные гастроэнтериты) вызываются только представителями родов *Norovirus* и *Sapovirus*, представители двух других родов вызывают заболевания у различных животных, в том числе у кроликов, кошек и морских млекопитающих. Вирус *Norwalk* (Норволк), ставший впоследствии типовым представителем рода *Norovirus*, был открыт при помощи электронной микроскопии A.Z. Karpikian et al. в 1972 г. при изучении этиологии вспышки острого кишечного заболевания [8].

В настоящее время доказано, что норовирусы являются наиболее распространенными агентами, вызывающими острый гастроэнтерит у человека. Заражающая доза крайне мала, около 10 вирусных частиц. На долю норовирусов приходится свыше 90% вспышек острых кишечных вирусных инфекций в мире,

причем значительная часть заболеваний норовирусной этиологии регистрируется у больных в лечебно-профилактических учреждениях [2].

Поскольку норовирусы не культивируются, работа с ними крайне затруднена. В исследованиях используют либо суррогатный вирус, сходный по строению с норовирусом человека, либо вирусный концентрат, полученный многостадийной очисткой из клинических образцов фекалий больных людей. В качестве суррогатного вируса обычно используют калицивирус кошек (ринотрахеит кошек). Однако калицивирус кошек не является вполне адекватной моделью, поскольку он вызывает легкое респираторное заболевание у природного хозяина в отличие от норовируса человека, вызывающего острый гастроэнтерит. Многочисленными исследованиями [3, 4] показано, что респираторные вирусы менее устойчивы к воздействию дезинфектантов и различных физико-химических факторов, чем вирусы, поражающие кишечник. Именно в силу своей относительно высокой устойчивости во внешней среде кишечные вирусы хорошо сохраняются на поверхностях (до 28 дней и более), в холодной воде (более 2-х месяцев) и представляют собой реальную угрозу здоровью населения. Считается, что норовирусы более устойчивы к воздействию хлорсодержащих дезинфицирующих средств, чем полиовирус 1-го типа, ротавирусы человека [2, 9].

Цель исследования. Изучить вирулицидные свойства дезинфицирующего вещества «Дезавид» на основе полигексаметиленгуанидина гидрохлорида и алкилдиметилбензиламмония хлорида на модели норовируса, а также использовать указанный выше дезинфектант для ротации биоцидных препаратов в многопрофильном медицинском учреждении с целью профилактики инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи.

Материалы и методы. Оценка вирулицидных свойств дезинфицирующего вещества «Дезавид» проводилась в лаборатории электронной микроскопии Научно-исследовательского института гриппа Министерства здравоохранения Российской Федерации и на кафедре микробиологии Военно-медицинской академии им. С.М. Кирова.

В данном исследовании использовался концентрат норовируса человека, полученный из пула фекалий госпитализированных с диагнозом острого гастроэнтерита с молекулярно-биологическим подтверждением. Концентрат норовируса получали многостадийной очисткой с использованием центрифугирования и мембранных фильтров из нитроцеллюлозы в тангенциальном потоке. Первоначально наличие частиц норовируса в препарате и отсутствие сочетанной вирусной инфекции подтверждали с помощью просвечивающей электронной микроскопии с использованием стандартных методик идентификации по характерным морфологическим признакам [6, 7, 9]. Фекалии разбавляли буфером STE (pH 7,8) в соотношении 1:5, затем осаждали клеточный детрит

центрифугированием 30 мл суспензии фекалий при 5000 об/мин в течение 15 мин на настольной центрифуге. Супернатант отбирали в чистые пробирки, добавляли антибиотик (пенициллин/синтомицин) и центрифугировали при 15000 об/мин в течение 20 мин на ультрацентрифуге «Beckman L-8». Снова отбирали супернатант и центрифугировали при 40000 об/мин в течение 90 мин в бакет-роторе на ультрацентрифуге «Beckman L-8». Полученный осадок ресуспендировали в 200 мкл буферного раствора STE, дополнительно очищали от балластных белков методом мембранной фильтрации в тангенциальном потоке и хранили при 4°C не более 5 дней до использования.

Электронно-микроскопические исследования проводили в соответствии с методиками, описанными в руководстве Doane F.W., 1994 [8]. 100 мкл концентрата норовируса смешивали с 100 мкл раствора дезинфектанта, полигексаметиленгуанидина гидрохлорида и алкилдиметилбензиламмония хлорида, т. е. в соотношении 1:1, в итоге в этой смеси концентрация дезинфектанта составляла 0,256 г активного вещества (или 100-кратное разведение концентрата испытуемого дезинфицирующего средства тщательно перемешивали и через определенные промежутки времени исследовали под электронным микроскопом [6, 8]. Для этого каплю исследуемого препарата (дезинфектанта) помещали на поверхность биопленки в пластиковой чашке Петри. На каплю опускали медную сетку с углеродной подложкой. После адсорбции в течение 30–60 с сетку отмывали в капле дистиллированной воды 2 раза, затем препарат контрастировали 1,5% раствором калиевой соли фосфорно-вольфрамовой кислоты (ФВК) (рН 6,7), удаляли избыток жидкости о край фильтровальной бумаги и высушивали сетку с препаратом в течение 1–2 мин при комнатной температуре. Просмотр препаратов производили на электронном микроскопе «JEM-1011» фирмы «JEOL» (Япония) при инструментальном увеличении 50000. Исследовали не менее 20 полей зрения каждого препарата. Съемку производили с помощью встроенной в электронный микроскоп цифровой камеры «Morada» фирмы «Olympus-SIS» (Япония). Обработку изображений производили в цифровом формате.

Микробиологический мониторинг и оценка доминирующих штаммов микроорганизмов проводились также в медицинском стационаре Белгородской областной клинической больницы. Использовался клинический материал от больных; смывы с инструментария, устройств и аппаратов; с рук медицинского персонала; исследования воздуха; смывов с поверхности стен, панелей и др. Диагностические возможности лаборатории были расширены за счет применения методов полимеразной цепной реакции, иммуноферментного анализа, иммунохроматографии.

Результаты и их обсуждение. Результаты электронно-микроскопического исследования приведены на рис. 1–4. При морфологическом исследовании кон-

центрата норовируса человека до и после экспозиции с дезинфицирующим средством полигексаметиленгуанидина гидрохлорида и алкилдиметилбензиламмония хлорида в соотношении 9:1 было обнаружено, что воздействие испытуемого препарата на норовирус проявляется непосредственно в прямой деструкции вирусных частиц.

По истечении 15 мин экспозиции вирусного концентрата с раствором дезинфектанта в исследуемом препарате не было обнаружено полноценных вирусных частиц (рис. 1). Наблюдались лишь белковые коагуляты, состоящие из денатурированных капсидных белков норовируса и незначительного количества (менее 1%) полуразрушенных частиц (рис. 2). При

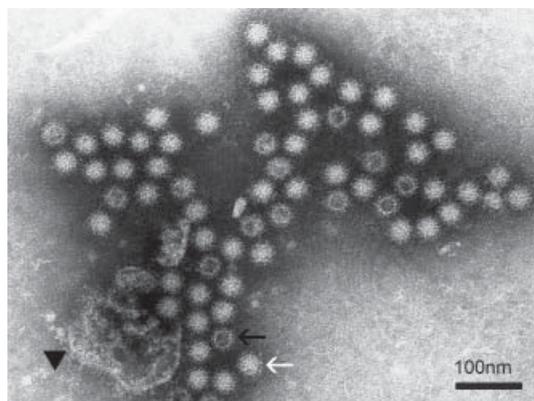


Рис. 1. Очищенный концентрат норовируса человека, содержащий $1,5 \times 10^{10}$ частиц в 1 мл диаметром 27–32 нм. Полноценные частицы – светлая стрелка; неполноценные частицы с проникшим внутрь контрастирующим веществом – темная стрелка; фрагменты клеточных мембран – треугольная стрелка. Негативное контрастирование фосфорно-вольфрамовой кислотой

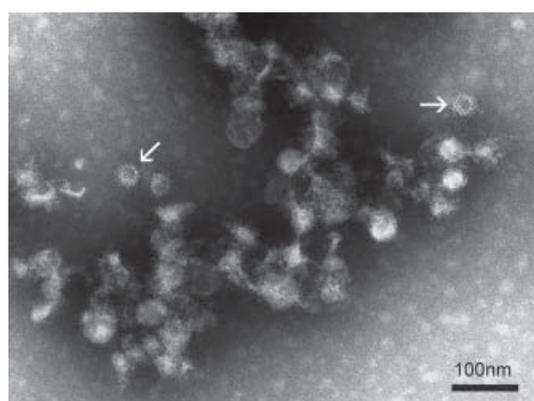


Рис. 2. Концентрат норовируса после 15 мин обработки средством «Дезавид» в рабочей концентрации. В препарате наблюдаются бесформенные белковые коагуляты, состоящие из полностью денатурированных частиц норовируса, и незначительное количество полуразрушенных вирусных частиц – светлые стрелки. Негативное контрастирование фосфорно-вольфрамовой кислотой

увеличении времени обработки вирусного концентрата дезинфектантом до 30 мин происходила полная деструкция всех вирусных частиц в исследуемом препарате (рис. 3). При дальнейшем увеличении времени обработки наблюдалось укрупнение и уплотнение белковых коагулятов, которые в последующем выпадали в осадок (рис. 4).

Полагаем, что механизм инактивации норовируса исследуемым дезинфектантом состоит в следующем. Частицы норовируса не содержат липидов и образованы только белковыми молекулами и РНК. Однако внутренняя поверхность капсидов норовируса – так называемые S-домены достаточно гидрофобны, благодаря чему и происходит сборка вирусных частиц в инфицированной клетке. В то же время наружные

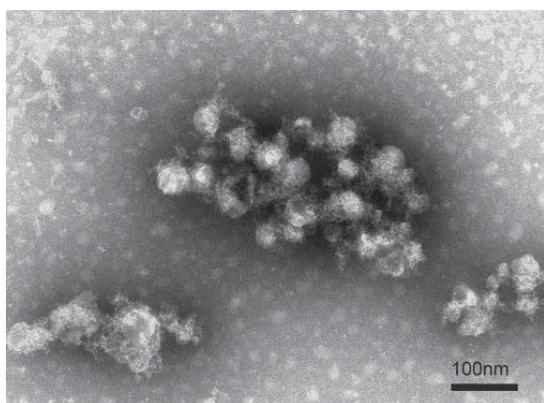


Рис. 3. Концентрат норовируса после 30 мин обработки средством «Дезавид» в рабочей концентрации. В препарате наблюдаются только бесформенные коагуляты, состоящие из денатурированных белков норовируса. Интактных вирусных частиц не обнаружено. Негативное контрастирование фосфорно-вольфрамовой кислотой

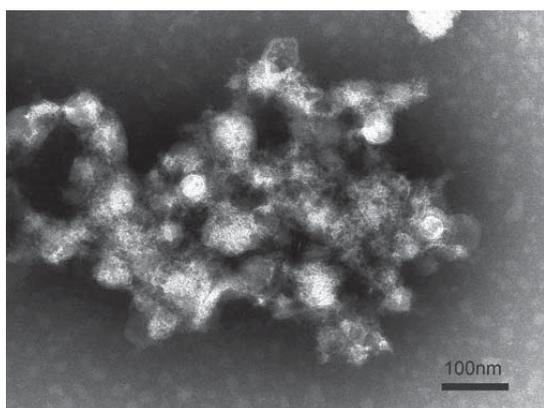


Рис. 4. Концентрат норовируса после 60 мин обработки средством «Дезавид» в рабочей концентрации. В препарате присутствуют только бесформенные коагуляты, состоящие из денатурированных белков норовируса. Вирусных частиц не обнаружено. Наблюдается укрупнение и уплотнение белковых коагулятов. Негативное контрастирование фосфорно-вольфрамовой кислотой

вариабельные домены капсидных белков, так называемые Р-домены, гидрофильны и несут положительно заряженные аминокислоты, что и приводит к деструкции вирусных частиц за счет сочетанного действия испытуемого дезинфектанта. Исследования по адсорбции норовирусов на заряженных углеродно-полимерных подложках показали, что норовирусы обладают выраженным отрицательным электростатическим зарядом, т. н. дзета-потенциалом, который должен учитываться при выборе рабочей концентрации дезинфектанта [3].

Проведенный нами анализ циркулирующих штаммов возбудителей в медицинских стационарах показал снижение долевого участия бактериальных патогенных и непатогенных возбудителей. Отсутствие вирусных контаминантов также можно предположительно отнести к смене дезинфектанта, что способствовало снижению уровня регистрируемой ИСМП.

После применения полигексаметиленгуанидина гидрохлорида и алкилдиметилбензиламмония хлорида в стационаре в клиническом материале больных на 22,1% снизилась доля грамположительных бактерий семейства *Micrococccaceae*. В смывах с поверхностей и инструментария в больнице отсутствовали норовирусы.

Применение дезинфектанта «Дезавид» позволило снизить не только контаминацию поверхностей, но и заболеваемость ИСМП в лечебном учреждении.

Заключение. Установлено, что входящие в состав дезинфицирующего средства «Дезавид» полигексаметиленгуанидина гидрохлорид и алкилдиметилбензиламмония хлорид (заряженный поликатион) электростатически взаимодействуют с частицами норовируса. Взаимодействие начинается с наружных отрицательно заряженных Р-доменов, затем охватывает гидрофобные S-домены, что приводит к диссоциации молекул капсидного белка и, таким образом, в итоге ведет к разрушению вирусных частиц. РНК норовируса в отсутствие рецепторных белков не способна осуществлять заражение, более того, она также разрушается и инактивируется компонентами дезинфектанта. Разрушенные вирусные частицы в дальнейшем превращаются в конгломераты денатурированных белков, которые со временем коагулируют, выпадают в осадок и подвергаются биодegradации. Ротация дезинфектантов в медицинском учреждении позволила снизить уровень заболеваемости ИСМП.

Литература

1. Малышев, В.В. Особенности микробиологического мониторинга и объективизации циркуляции доминирующих штаммов возбудителей инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи, в условиях многопрофильного медицинского стационара / В.В. Малышев, Е.А. Аверина // Новые методы экспресс-диагностики микроорганизмов в медицине, фармации, ветеринарии и экологии: сб. мат. Всеросс. научн.-практ. конф. – СПб.: Человек и его здоровье, 2015. – С. 97–101.
2. Malyshev, V.V. Intestinal virus infections in Russia. Northern outlook / V.V. Malyshev // 8th Nordic-Baltic Congress on Infectious Diseases (NBCID) «Well-known infections – the hottest features

- of diagnostics and treatment». – September, 23 26. SPb., 2009. – P. 218.
3. Malyshev, V.V. Water Quality for Human Health and New Approaches to Disinfection of Drinking and Waste Water / V.V. Malyshev, V.A. Chesnokov // Responding to Global Changes: The Water Quality Challenge-Prevention, Wise Use and Abatement: World Water Week in Stockholm, September 5–11. – Stockholm, 2010. – P. 117–118.
 4. Национальная концепция профилактики инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи. – М., 2011. – 32 с.
 5. Руководство «Профилактика инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи, в акушерских отделениях / стационарах». – М., 2012. – 184 с.
 6. Сироткин, А.К. Синтетические полимеры в изучении адсорбции вирусных частиц / А.К. Сироткин [и др.] // Доклады Академии наук. – М., 2003. – Т. 388, № 6. – С. 1–4.
 7. Doane, F.W. Electron microscopy for the detection of gastroenteritis viruses / F.W. Doane // In A.Z. Kapikian (ed), Viral infections of the gastrointestinal tract, 2nd ed. Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y. – 1994 – P. 101–130.
 8. Fong, C.K. Electron microscopy for the detection of viruses in clinical specimens / C.K. Fong // In Hsiung GD. «Hsiung's Diagnostic Virology», fourth ed. Yale University Press. – 1994 – P. 189–216.
 9. Glass, R.I. Norovirus gastroenteritis / R.I. Glass [et al.] // N. Engl. J. Med. 2009 – № 361 (18). – P.1776–1785.

V.V. Malyshev, T.A. Zmeeva, V.B. Sboychakov, E.A. Averina

Evaluation of virucidal properties of the disinfectant agent based on polyhexamethyleneguanidine hydrochloride and alkyldimethylbenzylammonium chloride for the prevention of infections associated with health care

Abstract. The results of experimental studies to assess virucidal action of the disinfectant on the basis of polyhexamethyleneguanidine hydrochloride and alkyldimethylbenzylammonium chloride are discussed. To assess the virucidal properties of the test substance was used the concentrate of norovirus obtained from a pool of human faeces, of the hospitalized with acute gastroenteritis. Concentrate of norovirus has received by multi-stage purification using centrifugation and membrane filtration on filters of nitrocellulose, in a tangential flow. Initially, the presence of particles of norovirus in the preparation and the absence of a concomitant viral infection was confirmed using transmission electron microscopy using standard techniques of identification by characteristic morphological features and molecular biological confirmation. High virucidal activity of the drug was revealed. We can assume that a charged polycation (polyhexamethyleneguanidine hydrochloride and alkyldimethylbenzylammonium chloride) electrostatically interacts with the particles of norovirus. The interaction starts with the outer negatively charged P-domains, then S covers the hydrophobic domains, which leads to dissociation of the capsid and thus to the destruction of viral particles. RNA of norovirus in the absence of the receptor protein is not capable to infect more than that, it also breaks down and inactivates components of the disinfectant. Furthermore, the authors investigated the spectrum of the dominant circulating strains of microorganisms in a medical hospital. For the rotation of disinfectants in hospitals associated with medical care for the prevention of infections the polyhexamethyleneguanidine hydrochloride and alkyldimethylbenzylammonium chloride has been used. In a multidisciplinary hospital the above-mentioned disinfectant was applied, and positive results were obtained, testifying to the effectiveness of the disinfectant of polyhexamethyleneguanidine hydrochloride and alkyldimethylbenzylammonium chloride.

Key words: infections associated with health care, polyhexamethyleneguanidine hydrochloride, alkyldimethylbenzylammonium chloride, transmission electron microscopy, polymerase chain reaction in real time, membrane filtration, virucidal activity.

Контактный телефон: +7-921-915-16-41; E-mail: vladmal_spb@list.ru