

- infections]. *Vestnik RAMN – Bulletin of Medical Sciences*, 2002, no. 2, pp. 6-11.
12. Kovalishena O.V. Kharakteristika vzbuditeley gospital'nykh infektsiy i ikh ustoychivosti k dezinfitsiruyushchim sredstvam [Characteristics of pathogens of nosocomial infections and their resistance to disinfectants]. *Dezinfektsionnoe delo – Disinfection Affairs*, 2005, no. 3, pp. 33-39.
 13. Shkarin V.V., Kovalishena O.V., Blagonravova A.S., Razgulin S.A. Printsipy monitoringa ustoychivosti mikroorganizmov k dezinfitsiruyushchim sredstvam v ramkakh epidemiologicheskogo nadzora za vnutribol'nichnymi infektsiyami [Principles of Monitoring of resistance to disinfectants under surveillance for nosocomial infections]. *Dezinfektsionnoe delo – Disinfection Affairs*, 2010, no. 1, pp. 46-50.
 14. Cloete T.E. Resistance mechanisms of bacteria to antimicrobial compounds. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 2003, vol. 51 (4), pp. 277-282.
 15. Akimkin V.G. Osnovnye napravleniya dezinfektsionnykh meropriyatiy v lechebno-profilakticheskikh uchrezhdeniyakh [The main directions of disinfection measures in health care settings]. *Dezinfektsionnoe delo – Disinfection Affairs*, 2003, no. 4, pp. 39-43.
 16. Blagonravova A.S. Nauchnye, metodicheskie i organizatsionnye osnovy monitoringa ustoychivosti mikroorganizmov k dezinfitsiruyushchim sredstvam v ramkakh epidemiologicheskogo nadzora: Diss. dokt. med. nauk [Scientific, methodological and organizational framework for the monitoring of microbial resistance to disinfectants under surveillance. Doct. Med. Sci. Diss.]. Nizhniy Novgorod, 2012.
 17. Gorbunov V.A. Sravnitel'naya aktivnost' nekotorykh dezinfektantov v otnoshenii klinicheskikh shtammov *P. aeruginosa*, vydelennykh v statsionarakh Respublike Belarus' [Comparative activity of some disinfectants against clinical strains of *P. aeruginosa*, isolated in hospitals of the Republic of Belarus]. *Voennaya meditsina – Military medicine*, 2010, no. 3, pp. 46-50.
 18. Shkarin V.V., Saperkin N.V., Kovalishena O.V., Blagonravova A.S., Shirokova I.Yu., Kulyukina A.A. Regional'nyy monitoring ustoychivosti mikroorganizmov k dezinfektantam: itogi i perspektivy [Regional monitoring of microbial resistance to disinfectants: results and prospects]. *Meditinskiy al'manakh – Medical almanac*, 2012, no. 3, pp. 122-125.
 19. Zueva L.P., Kolosovskaya E.N., Lyubimova A.V. Obosnovanie monitoringa chuvstvitel'nosti k dezinfektantam mikroorganizmov, tsirkuliruyushchikh v statsionarakh [Rationale for monitoring the sensitivity of microorganisms to disinfectants circulating in hospitals]. *Dezinfektsionnoe delo – Disinfection Affairs*, 2011, no. 2, pp. 45-48.
 20. Blagonravova A.S., Kovalishena O.V. Problemnnye voprosy monitoringa ustoychivosti mikroorganizmov k dezinfitsiruyushchim sredstvam [Problematic issues of monitoring of microbial resistance to disinfectants]. *Meditinskiy al'manakh – Medical almanac*, 2013, no. 2, pp. 103-107.
 21. *Postanovlenie Glavnogo gosudarstvennogo sanitarnogo vracha RF ot 18 maya 2010 g. N 58 «Ob urverzhenii SanPiN 2.1.3.2630-10 «Sanitarno-epidemiologicheskie trebovaniya k organizatsiyam, osushchestvlyayushchim meditsinskuyu deyatel'nost'» (elektronnyy resurs) http://base.garant.ru/12177989 (data obrashcheniya 10.10.2014) [Resolution of the Chief State Sanitary Doctor of the Russian Federation of May 18, 2010 N 58 «On approval of SanPin 2.1.3.2630 -10 «Sanitary requirements for organizations engaged in medical activities». Available at: http://base.garant.ru/12177989. Accessed October 10 2014].*

AUTHORS

Orlova Oksana Anatol'evna – Kandidat of Medical Science, Head of Epidemiological Department City Clinical Hospital № 8; Associate Professor of Chair Hygiene and Epidemiology; Tel.: (351) 773-06-10, e-mail: oksana_orlova@bk.ru

Akimkin Vasilii Gennad'evich – Member of Russian Academy of Science, Doctor of Medical Science, Professor; Director Deputy of Scientific Research Disinfectology Institute

УДК [579.842.11+579.862.1].044

ИЗУЧЕНИЕ МЕХАНИЗМА ДЕЙСТВИЯ ТРЕТИЧНЫХ АЛКИЛАМИНОВ НА КЛИНИЧЕСКИХ ИЗОЛЯТАХ *ESCHERICHIA COLI* И *STAPHYLOCOCCUS AUREUS*

Л.В. Диденко¹, Г.Г. Кардаш², Т.А. Смирнова¹, Э.Р. Толордава¹, М.В. Зубашева¹, Д.А. Куршин², О.В. Емшанов²

¹ФГБУ «НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России: 123098, Москва, ул. Гамалеи, дом 18;

²ООО «ИНТЕРСЭН-плюс»:

141004, Московская область, г. Мытищи, ул. Силикатная д. 19.

Третичные алкиламины обладают высокой активностью в отношении к *Mycobacterium tuberculosis*, а также эффективны ко всем видам бактерий, патогенным и плесневым грибам и вирусам. Изучено воздействие третичных алкиламинов на клинические изоляты *Escherichia coli* и *Staphylococcus aureus* методом трансмиссионной электронной микроскопии. Выявлены структурные изменения бактерий под воздействием препарата на основе третичных алкиламинов (тотальное разрушение клеток, возникновение новых морфологических структур в цитоплазме, деструкция нуклеоида), которые соответствуют механизмам взаимодействия алкиламина с фосфолипидами и кислотными группами белков. Повреждения структуры нуклеоида, рибосом и плазмид, ограничивает (лимитирует) возможности развития резистентности бактерий к триаминам в следствие тотального разрушения всех клеточных структур (в том числе плазмид и транспозонов, при наличии), и при условии использования рекомендованных (эффективных) концентраций действующего вещества в рабочих растворах дезинфицирующих средств.

Ключевые слова: Третичные алкиламины, дезинфицирующие средства, механизм действия, бактериальная клетка, трансмиссионная электронная микроскопия, резистентность.

В современной медицинской практике неспецифическая профилактика инфекций, связан-

ных с оказанием медицинской помощи (ИСМП) имеет исключительно важное значение. Наличие

на современном медицинском рынке широкого ассортимента дезинфекционных препаратов, созданных на основе различных химических субстанций, предопределило целый ряд проблем, связанных с правильным выбором необходимых в тех или иных условиях дезинфицирующих средств.

Основными требованиями к дезсредствам, применяемым в лечебных учреждениях являются:

- высокая биоцидная активность в отношении широкого спектра микроорганизмов;
- исключение возможности возникновения резистентности микроорганизмов к применяемому препарату;
- тотальное уничтожение микроорганизмов на различных обрабатываемых препаратами поверхностях, в том числе поверхности медицинских инструментов и оборудования, при условии, что свойства обрабатываемого материала не меняются под действием дезпрепаратов;
- низкое токсическое и аллергенное действие на организм человека.

В научной литературе достаточно широко освещены вопросы, касающиеся биоцидной активности различных химических субстанций, механизма их действия на микроорганизмы [4]

В то же время наименее изученными остаются механизмы возникновения резистентности микроорганизмов при воздействии на них дезинфекционных препаратов.

В последнее время появился ряд научных публикаций по использованию дезсредств на основе третичных алкиламинов. Препараты этой группы обладают высокой биоцидной активностью в отношении различных бактерий. Применение этих препаратов, при использовании рабочих растворов с определенной концентрацией активно действующего вещества (АДВ), не вызывает формирование у микроорганизмов резистентности к ним, даже при длительном использовании.

Алкиламину присущи особые свойства, существенно отличающие его от других химических

субстанций, используемых в качестве биоцидов. Прежде всего, он обладает высокой активностью в отношении к *Mycobacterium tuberculosis*, эффективен по отношению ко всем видам бактерий, патогенным и плесневым грибам и вирусам. Дезинфицирующие средства на основе аминов обладают высокой моющей активностью, особенно при совместном использовании с анионоактивными ПАВами и мылами [2, 3].

Одним из принятых методов оценки биоцидной активности дезпрепаратов является ультраструктурный анализ микроорганизмов, подвергшихся действию биоцидных агентов [8].

В настоящем исследовании была поставлена цель – оценить действие дезинфицирующего средства, созданного на основе алкиламина (Lonzabac 12–100) формулы: N,N-бис(3-аминопропил)додециламин, на клинические изоляты *Escherichia coli* и *Staphylococcus aureus* методом трансмиссионной электронной микроскопии.

Материалы и методы. Суточные культуры *Staphylococcus aureus* и *Escherichia coli* были обработаны препаратом на основе третичных алкиламинов в концентрациях – 0,25 и 0,5 % (концентрация по АДВ – алкиламину соответственно – 0,012–0,025 %) в течение 60 мин.

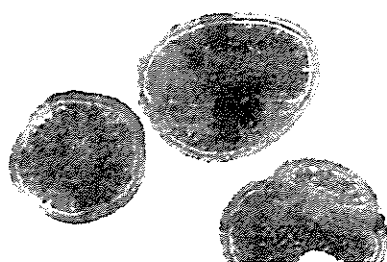
В качестве контроля были взяты культуры, выращенные на питательных средах и культуры в дистиллированной воде, инкубированные в течение 60 мин.

Образцы фиксировали по методу Ito-Karpovsky [5], обезжизивали в спиртах восходящей концентрации и заливали в LR White (PLANO W. Plannet (GmbH) по методу Newman [6].

Ультратонкие срезы получали на ультратоме «LKB-3», окрашивали по методу Reynolds [7] и анализировали в электронном микроскопе «JEOL–100B».

Результаты и обсуждение. В контрольных препаратах суточной бульонной культуры *Staphylococcus aureus* бактерии были округлой и овоидной формы, клеточная стенка (КС) – с четко выраженным мембраностеночным комплексом,

а



б

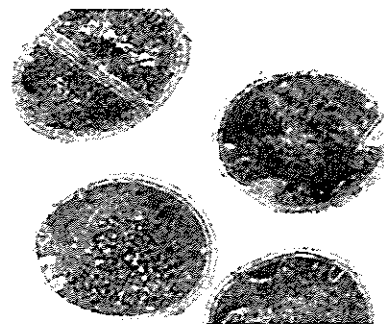


Рис. 1. Электронные микрофотографии контрольных образцов культуры *Staphylococcus aureus* (а), после инкубации в дистиллированной воде в течение 120 минут (б)

с хорошо видимыми перегородками деления. Обнаруживалось много делящихся клеток с типичным для грамположительных бактерий делением. Цитоплазма имела среднюю электронную плотность, в ней были хорошо видны рибосомы и полирибосомы. Нуклеоид был представлен тонкими нитями ДНК. Встречались инвагинаты цитоплазматической мембраны ЦПМ (рис. 1а).

При инкубации стафилококков в дистиллированной воде в течение 120 мин., форма и размеры клеток, структура мембраностеночного комплекса, нуклеоида не изменялись. Сохранялось деление клеток. В отличие от субмикроскопической организации интактной бульонной культуры в цитоплазме отдельных клеток выявлялись мелкозернистые участки (рис. 1б).

Анализ субмикроскопической организации грамположительных бактерий клинического изолята *Staphylococcus aureus*, обработанных препаратом на основе третичных алкиламинов, показал нарушение целостности поверхностных структур бактерий – КС и ЦПМ. Мелкозернистая цитоплазма выглядела неоднородной по плотности, в ней появлялись упорядоченные мембранные структуры, рибосомы и нуклеоид в клетках не определялись. (рис. 2а, б). Под влиянием препарата происходила флоккуляция

бактерий с формированием макроскопически видимого осадка, а при ультраструктурном исследовании обнаружено «склеивание» отдельных бактерий с образованием многоклеточных конгломератов (рис. 2в).

Установлено, что степень повреждения бактериальных клеток находилась в прямой зависимости от концентрации препарата.

Бактерии контрольной суточной культуры *Escherichia coli* были представлены клетками овоидной формы, у которых КС имела четкое слоистое строение, с нерасширенным периплазматическим пространством. Некоторые клетки имели «полярные шапочки». В средней электронной плотности цитоплазме хорошо определялись рибосомы и полирибосомы, в зоне нуклеоида были видны тонкие нити ДНК. Деление клеток происходило путем перетяжки, нарушений не выявлялось (рис. 3а). При инкубации кишечной палочки в дистиллированной воде в течение 120 мин. у бактерий форма и размеры, строение КС, ЦПМ, рибонуклеопротеидного комплекса не менялись (рис. 3б).

Под воздействием препарата на основе третичных алкиламинов в культуре кишечной палочки происходили следующие изменения: у большинства клеток нарушалась целостность

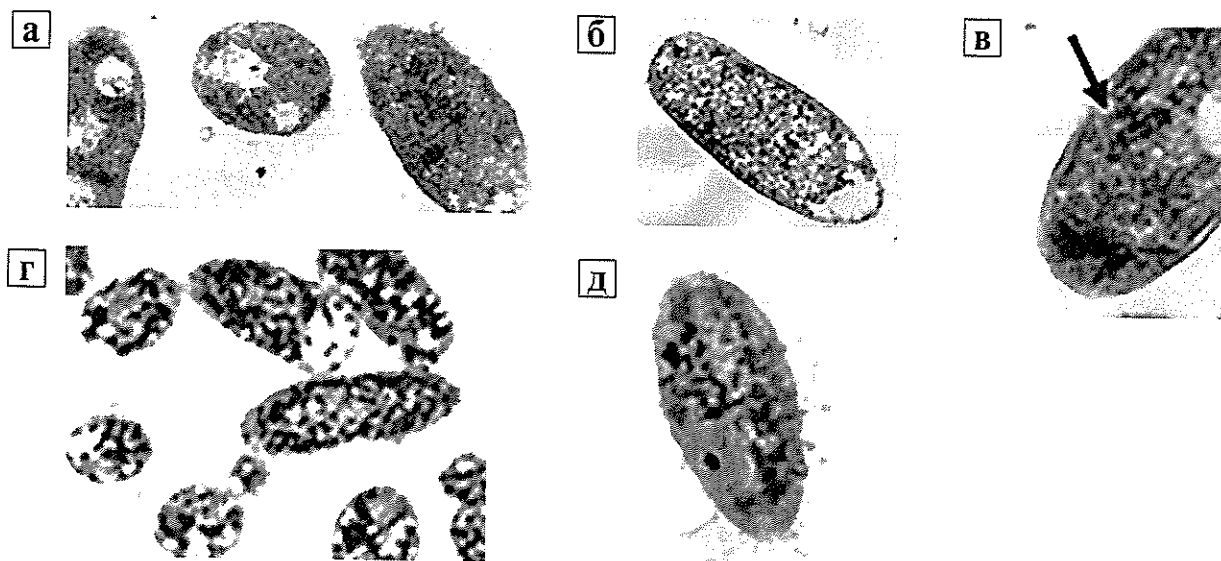


Рис. 3. Электронные микрофотографии контрольных образцов культуры *Escherichia coli* (а), после инкубации в дистиллированной воде в течение 120 минут (б), обработанных препаратом на основе третичных алкиламинов (в, г, д)

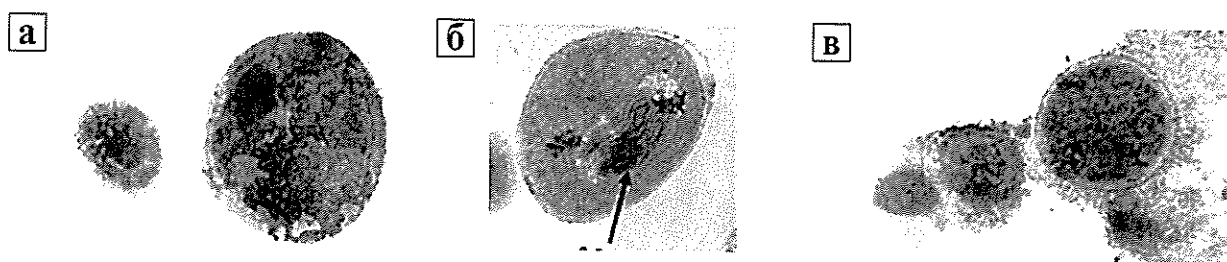


Рис. 2. Электронные микрофотографии образцов культуры *Staphylococcus aureus*, обработанных препаратом на основе третичных алкиламинов

КС и ЦПМ цитоплазма становилась неоднородной по плотности, в ней появлялись электронноплотные зернистые включения, ламеллярные структуры, не определялись рибосомы и нуклеоид (рис. 3в, г). Так же, как и у стафилококков, в культуре кишечной палочки после обработки препаратом происходило «склеивание» отдельных клеток между собой и образование конгломератов (рис. 3д). Степень выраженности повреждений клеток культуры кишечной палочки также зависела от концентрации препарата: чем выше концентрация препарата, тем сильнее были изменены клетки.

Рассмотрим механизмы биоцидного воздействия препарата на основе третичных алкиламинов на морфофункциональную организацию грамотрицательных и грамположительных бактерий.

В состав исследованного препарата входит третичный алкиламин, который представляет собой структурно-ассиметричную молекулу с длинной гидрофобной алифатической цепью ($R = C_{12}H_{25}$) и гидрофильными полярными группами $R-N(CH_2)_3NH_2$.

Такая структурно ассиметричная молекула в водном растворе образует мицеллы. По методике, разработанной на кафедре высокомолекулярных соединений МГУ им. М.В. Ломоносова была определена критическая концентрация мицеллообразования (ККМ) для алкиламина (Lonzac 12-100), которая составила величину $0,19 \cdot 10^{-3} \text{ mol/l} = 5,68 \cdot 10^{-3} \text{ g/100 cm}^3$ (% веса). Следовательно, при концентрации алкиламина в водном растворе 0,006 % молекулы образуют мицеллы. С увеличением концентрации в растворе образуются более сложные структуры – ламеллы и жидкие кристаллы. Ранее нами было установлено, что появление биоцидной активности препарата на основе третичных алкиламинов коррелирует с возникновением мицеллярной и ламеллярной структуры, поэтому атака молекул алкиламина на клетку бактерии происходит на уровне надмолекулярных структур (ассоциатов) и, соответственно, вступают в силу известные в химии высокомолекулярных соединений свойства кооперативности макромолекул [3].

В состав КС грамотрицательных бактерий входят пептидогликан, фосфолипиды, липополисахариды, белки (мажорные и минорные), у грамположительных бактерий основными компонентами КС являются пептидогликан и тейхоевые кислоты. ЦПМ грамположительных, и грамотрицательных клеток состоит из белков и фосфолипидов. Основными компонентами цитоплазмы являются белки, нуклеоид состоит из дезоксирибонуклеиновых кислот и белков [1].

Алкиламин при взаимодействии с фосфатными группировками образует нерастворимый комплекс, поэтому мишенью для атаки могут быть фосфолипиды цитоплазматической мембраны, а у грамположительных бактерий еще и тейхоевая кислота, обязательный компонент клеточной стенки. Алкиламин также взаимодействует с функциональными кислотными группами белков цитоплазмы и белков, входящих в состав нуклеоида.

Выявленные структурные изменения бактерий под воздействием препарата на основе третичных алкиламинов (тотальное разрушение клеток, возникновение новых морфологических структур в цитоплазме, деструкция нуклеоида) соответствуют механизмам взаимодействия алкиламина с фосфолипидами и кислотными группами белков.

Выводы. 1. Обработка средством на основе третичных алкиламинов бульонных культур *St. aureus* и *E. coli* приводит к флоккуляции бактериальных культур и образованию многоклеточных конгломератов.

2. Ультраструктурные изменения грамположительных и грамотрицательных бактерий, возникающие под влиянием средства на основе третичных алкиламинов, свидетельствуют о тотальном повреждении всех структурных компонентов бактериальных клеток.

3. При обработке средством на основе третичных алкиламинов тотальное повреждение рибонуклеопротеидного комплекса бактерий ограничивает возможность развития резистентности бактерий к триаминам вследствие тотального разрушения всех клеточных структур (в том числе плазмид и транспозонов, при наличии), и при условии использования рекомендованных (эффективных) концентраций действующего вещества в рабочих растворах дезинфицирующих средств.

ЛИТЕРАТУРА

1. Авакян А.А., Кац Л.Н., Павлова И.Б. Атлас анатомии бактерий, патогенных для человека и животных. — М.: Медицина, 1972. — 183 с.
2. Гудкова Е.И., Красильников А.А., Рябцева Н.Л. Прошлое, настоящее и будущее четвертичных аммонийных соединений // Дезинфекционное дело, 2002. — № 4. — С. 51.
3. Кардаш Г.Г., Беляев А.В., Помогаева Л.С., Мороз А.Ф. Некоторые аспекты создания эффективных дезинфицирующих средств на базе третичного amino Lonzac 12.100 // Дезинфекционное дело, 2002. — № 4. — С. 54.
4. Флоретт Д., Френей Д., Ревенди М.-Е. Антисептики и дезинфекция. — Париж: «ЕСКА», 1995. — С. 25.
5. Ito S., Karnovsky M. // J. Cell Biol., 1969 — V. 39. — P. 168-169.

6. Newman G.R., Jasani B., Williams E.D. // *Histochem. J.*, 1982. — V. 47. — P. 182-186.
7. Reynolds E.S. // *J. Cell Biol.*, 1963. — V. 17. — P. 208-212.
8. Timofeeva L.M., Kleshcheva N.A., Moroz A.F., Didenko L.V. Secondary and Tertiary Polydiallylam-

monium Salts: Novel Polymers with High Antimicrobial Activity Downloaded by LIB FOR NATURAL SCIENCE RAS on October 6, 2009. <http://pubs.acs.org> Publication Date (Web): October 1, 2009, doi: 10.1021/bm900435v.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ

Диденко Любовь Васильевна – доктор биологических наук, заведующая лабораторией анатомии микроорганизмов НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф. Гамалеи; служеб. тел.: (499) 193-30-40, e-mail: lyubov_didenko@mail.ru

Смирнова Татьяна Александровна – доктор биологических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории анатомии микроорганизмов НИИЭМ им. Н.Ф. Гамалеи

Толордава Этери Ромэовна – младший научный сотрудник лаборатории генной инженерии патогенных микроорганизмов НИИЭМ им. Н.Ф. Гамалеи

Зубашева Маргарита Владимировна – кандидат биологических наук, младший научный сотрудник лаборатории анатомии микроорганизмов НИИЭМ им. Н.Ф. Гамалеи

Куршин Дмитрий Александрович – генеральный директор ООО «ИНТЕРСЕН-плюс»

Кардаш Геннадий Григорьевич – кандидат химических наук, руководитель отдела инноваций ООО «ИНТЕРСЕН-плюс»

Емшанов Олег Владимирович – директор по научной работе ООО «ИНТЕРСЕН-плюс»

STUDYING THE ACTION MECHANISM OF TERTIARY ALKYLAMINES ON CLINICAL ISOLATES *ESCHERICHIA COLI* И *STAPHYLOCOCCUS AUREUS*

L.V. Didenko¹, G.G. Kardash², T.A. Smirnova¹, E.R. Tolordava¹, M.B. Zubasheva¹, D.A. Kurshin², O.V. Emshanov²

¹Scientific Research Institute of Epidemiology and Microbiology named after N.F. Gamalei of Ministry of Health Russian Federation:

18 Gamaleya st, Moscow, 123098, Russian Federation;

²INTERSEN-plus:

19 Silikatnaya st., Mytischki, Moscow region, 141004, Russian Federation.

Tertiary alkylamines possess high activity against *Mycobacterium tuberculosis*, and also are effective against all species of bacteria, pathogenic and mold fungus and viruses. The impact of tertiary alkylamines on clinical isolates *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* has been studied by the method of transmission electronic microscopy. It has been revealed structural changes of bacteria due to the influence of substance on the basis of tertiary alkylamines (total destruction of cells, emergence of new morphological structures in cytoplasm, destruction of a nucleoid), which correspond to mechanisms of interaction of alkylamines with phospholipids and acid groups of proteins. Damaging of nucleoid's structure, ribosomes and plasmids limits possibilities of development of resistance of bacteria to tertiary alkylamines in a consequence of total destruction of all cellular structures (including plasmids and transposone, if it the presence), and on condition of use of the recommended (effective) concentration of active ingredient in working solutions of disinfectants.

Key words: Tertiary alkylamines, disinfectants, action mechanism, bacterial cell, transmission electronic microscopy, resistance.

REFERENCES

1. Avakyan A.A., Kats L.N., Pavlova I.B. *Atlas anatomii bakteriy, patogennykh dlya cheloveka i zhivotnykh* [The atlas of bacteria's anatomy, which is pathogenic for the person and animals]. Moscow: Meditsina, 1972, 183 p.
2. Gudkova E.I., Krasil'nikov A.A., Ryabtseva N.L. Proshloe, nastoyashchee i budushchee chetvertichnykh ammoniynykh soedineniy [Past, present and future of quaternary ammonium compound]. *Dezinfektsionnoe delo - Disinfection Affairs*, 2002, no. 4, pp. 51.
3. Kardash G.G., Belyaev A.V., Pomogaeva L.S., Moroz A.F. Nekotorye aspekty sozdaniya effektivnykh dezinfitsiruyushchikh sredstv na baze tretichnogo amino Lonzabac 12.100 [Some aspects of creation of effective disinfectants on the basis of tertiary amine Lonzabac 12.100]. *Dezinfektsionnoe delo - Disinfection Affairs*, 2002, no. 4, pp. 54.
4. Florett D., Freney D., Revendi M-E. *Antiseptiki i dezinfektsiya* [Antiseptics and disinfection]. Parizh: «ESKA», 1995, pp. 25.
5. Ito S., Karnovsky M. *J. Cell Biol.*, 1969, vol. 39, pp. 168-169.
6. Newman G.R., Jasani B., Williams E.D. *Histochem. J.*, 1982, vol. 47, pp. 182-186.
7. Reynolds E.S. *J. Cell Biol.*, 1963, vol. 17, pp. 208-212.
8. Timofeeva L.M., Kleshcheva N.A., Moroz A.F., Didenko L.V. Secondary and Tertiary Polydiallylammonium Salts: Novel Polymers with High Antimicrobial Activity Downloaded by LIB FOR NATURAL SCIENCE RAS on October 6, 2009. <http://pubs.acs.org> Publication Date (Web): October 1, 2009, doi: 10.1021/bm900435v.

AUTHORS

Didenko Lyubov Vasilyevna – Doctor of Biological Science, Head of Microorganisms' Anatomy Laboratory at Scientific Research Institute of Epidemiology and Microbiology named after N.F. Gamaleya; Tel.: +7 (499) 193-30-40, e-mail: lyubov_didenko@mail.ru

Smirnova Tatyana Aleksandrovna – Doctor of Biological Science, Senior Researcher of Microorganisms' Anatomy Laboratory at Scientific Research Institute of Epidemiology and Microbiology named after N.F. Gamaleya

Tolordava Eteri Romeovna – Junior Researcher of Genetic Engineering of Pathogenic Microorganisms Laboratory at Scientific Research Institute of Epidemiology and Microbiology named after N.F. Gamaleya

Zubasheva Margarita Vladimirovna – Candidate of Science in Biology, Junior Researcher of Microorganisms' Anatomy Laboratory at Scientific Research Institute of Epidemiology and Microbiology named after N.F. Gamaleya

Kurshin Dmitry Alexandrovich – General Director of «INTERSEN-plus» LLC

Kardash Gennady Grigoryevich – Candidate of Chemical Science, Head of Innovations Department at «INTERSEN-plus»

Emshanov Oleg Vladimirovich – Director of Scientific Work at «INTERSEN-plus»