

Biofilm jako podstawowy mechanizm zakażenia miejsca operowanego – metody prewencji w leczeniu miejscowym

Biofilm as the basic mechanism of surgical site infection – prevention methods in local treatment

Marzena Bartoszewicz, Anna Rygiel

Katedra Mikrobiologii Akademii Medycznej, Wrocław (Department of Microbiology, Medical University in Wrocław, Poland)

Streszczenie

Wstęp: Zakażenie miejsca operowanego jest częstą przyczyną powikłań pooperacyjnych. Szczególną uwagę należy zwrócić na zakażenia występujące u pacjentów z wprowadzonymi wszczepami, tzn. zastawkami, implantami naczyniowymi, implantami kostnymi, protezami stawowymi czy protezami ścięgien wykonanych z biomateriałów. Zakażenia te są najczęściej wynikiem kontaminacji biomateriału w momencie jego implantacji lub też rezultatem przejściowej bakteriemii. Celem niniejszej pracy była ocena wpływu płynu dezynfekującego Octeniseptu na przeżywalność bakterii produkujących biofilm na biomateriałach.

Materiał i metody: Do określenia stopnia produkcji biofilmu badanych 25 szczepów użyto cewnik z lateksu silikonowanego oraz nić chirurgiczną niewchłaniającą poliamidową, 1-procentowy roztwór TTC (chlorrek 2, 3, 5-trójfenylotetrazoliowy), Octenisept, 0,5-procentowy roztwór saponiny, neutralizator o składzie: Tween 80 — 3%, saponina — 3%, histydyna — 0,1%, lecytyna — 0,1%.

Wyniki: Wszystkie badane bakterie produkowały śluz na cewniku i nici chirurgicznej. W metodzie z użyciem TTC po użyciu płynu Octenisept w ciągu minuty jego działania 100% szczepów zostało usuniętych z nici chirurgicznej, a 99% szczepów produkujących biofilm — z cewnika moczowego. Liczba żywych komórek w biofilmie wszystkich badanych gatunków, wynosząca początkowo 10^7 k/ml i 10^9 k/ml, obniżyła się w ciągu minuty działania zastosowanego preparatu do poziomu 10^2 k/ml. Aktywność preparatu antyseptycznego Octenisept o składzie: dichlorowodorek octenidyny i alkohol fenoksymetylowy oraz substancje pomocnicze, w warunkach przeprowadzonych badań, była podobna w stosunku do wszystkich badanych gatunków bakterii produkujących biofilm.

Wnioski: Preparat antyseptyczny Octenisept może być bezpiecznie stosowany do odkażania skóry, błon śluzowych i ran w ogniskach zakażeń wywoływanych przez bakterie produkujące biofilm.

Słowa kluczowe: zakażenie, biofilm, zapobieganie

Abstract

Background: Surgical site infections are a common cause of post-operative complications. Particular attention should be paid to infections occurring in patients who have had implants, i.e. valves, vascular and bone implants, joint prostheses, or tendon prostheses made of biomaterials. These infections are usually a result of biomaterial contamination occurring at the moment of its implantation or of a transient bacteraemia.

The purpose of our work was an assessment of the impact of Octenisept (disinfectant liquid) on the survival rate of bacteria producing biofilm on biomaterials.

Material and methods: In order to estimate the biofilm production ratio among 25 examined strains, a silicon-coated latex catheter was used along with a non-absorbable polyamide surgical thread, 1% TTC solution (2, 3, 5-triphenyltetrazolium chloride), Octenisept 0.5% saponin working solution, neutralising agent composed of: 3% Tween 80, 3% saponin, 0.1% histidine, 0.1% lecithin.

Results: All tested bacteria generated mucus on the catheter and surgical thread. In the method employing TTC, 100% of the strains were removed from the surgical thread after a 1-minute application of Octenisept. Using the same method 99% of the strains producing biofilm were removed from a urinary

catheter after a 1-minute application of Octenisept. The number of living cells in the biofilm of all examined strains, initially being at a level of 10^7 CFU/ml and 10^9 CFU/ml, was reduced to 10^2 CFU/ml within the 1-minute long action of applying the solution. The action of Octenisept antiseptic preparation, which is composed of octenidine dihydrochloride, phenoxymethyl alcohol and auxiliary substances, was, under examination conditions, similar in regards to all tested species of biofilm-producing bacteria.

Conclusions: Octenisept antiseptic preparation may be safely applied to disinfect skin, mucous membranes and wounds in areas infected by biofilm-producing bacteria.

Key words: infection, biofilm, prevention

Wstęp

Zakażenie miejsca operowanego jest główną przyczyną powikłań pooperacyjnych u pacjentów chirurgicznych i według statystyk stanowi trzecie co do częstości zakażenie u chorych hospitalizowanych na oddziałach chirurgii.

Zniszczenie efektu zabiegu operacyjnego poprzez zakażenie jest często niemożliwe do naprawienia, co prowadzi do przedłużenia czasu przebywania w szpitalu i zwiększa koszty hospitalizacji. Obok zakażeń ran czystych, mających miejsce po rutynowym nacięciu chirurgicznym, szczególną uwagę należy zwrócić na zakażenia występujące u pacjentów z wprowadzanymi wszczepami, tzn. zastawkami, implantami naczyniowymi, implantami kostnymi, protezami stawowymi czy protezami ścięgien wykonanych z biomateriałów [1, 2].

Zakażenia te najczęściej są wynikiem kontaminacji biomateriału w momencie jego implantacji lub też rezultatem przejściowej bakteriemii. Stosowanie tego typu materiałów stwarza możliwość infekcji, poprzez wprowadzenie bakterii do organizmu pacjenta ze środowiska szpitalnego, lub też zakażenie bakteriami stanowiącymi mikroflorę własną skóry i błon śluzowych oraz jelit. Czynniki ryzyka występowania powikłań septycznych miejsca operowanego należy podzielić na trzy podstawowe grupy.

Pierwsza dotyczy zakresu operacji (przedłużający się czas trwania operacji, wielkość pola operacyjnego, zastosowana technika operacyjna).

Drugim elementem wpływającym na możliwość wystąpienia zakażenia jest stan chorego (wiek, jego choroba podstawowa, choroby współistniejące — cukrzyca, otłuszczenie, wyniszczenie, zaburzenia odporności).

Trzecim istotnym czynnikiem ryzyka wystąpienia zakażenia miejsca operowanego jest nieprawidłowa toaleta chorego przed zabiegiem (mycie, golenie), nieodpowiednia okołoperacyjna profilaktyka antybiotykowa lub jej brak, stopień kontaminacji pola operacyjnego i niedostateczna opieka (antyseptyczna) miejsca operowanego przed operacją i po niej [3].

Drobnoustroje powodujące zakażenie miejsca operowanego mogą powikłać operację, a ich źródłem są drobnoustroje z istniejących już ognisk zakażenia w organizmie pacjenta (zapalenie wyrostka robaczkowego, głębokie ropnie narządowe — płuca, wątroba).

W trakcie hospitalizacji przed zabiegiem może nastąpić kolonizacja chorego przez szczep szpitalny, a niewłaściwa antyseptyka doprowadzi do przedostania się potencjalnego patogenu w miejsce nacięcia powłok.

Introduction

Surgical site infections are a common cause of post-operative complications in surgically treated patients, and, according to statistics, they constitute the third most common infection type in patients hospitalised in surgical wards.

The destruction of operation's healing effects due to infections is very often impossible to be avoided, which results in prolonged patients' stays in hospital and increases hospitalisation costs. Apart from infections of clean wounds, occurring after routine surgical incisions, particular attention should be paid to infections occurring in patients who have received implants, i.e. valves, vascular and bone implants, joint prostheses, or tendon prostheses made of biomaterials [1, 2].

Such infections are usually a result of biomaterial contamination occurring at the moment of its implantation or of a transient bacteraemia. The application of materials of this type enables infection through the introduction of hospital-environment bacteria into the patient's body, or through the infection with bacteria constituting patients' own microflora in the skin and mucous membranes, as well as in the intestines. The risk factors with respect to the occurrence of septic complications of the operated tissue should be divided into three basic groups.

The first of these applies to the scope of the operation (prolonged operation times, size of the operated area, surgical techniques applied).

The second element increasing the potential of infection occurrence is the condition of the patient (age, his/her basic lesions, associated illnesses — diabetes, adiposis, cachexy, immune disorders).

The third important risk factor with respect to the occurrence of operated tissue infections is inadequate cleaning of the patient before the operation (washing, shaving), incorrect or missing antibiotic prevention before/during the operation, the degree of contamination of the operated area and inadequate (antiseptic) care of the operated tissue before and after surgery [3].

Micro-organisms causing infections of operated tissues may result in surgical complications, and the source is usually microbes residing in the already existing infection foci in the patient's body (appendicitis, deep organ abscesses — lungs, liver).

During the pre-operation hospitalisation, the patient may be colonised by a hospital strain, and the incorrect use of antiseptics may result in a potential pathogen penetrating into the integument incision site.

W trakcie operacji źródłem drobnoustrojów może być środowisko sali operacyjnej (sprzęt, powietrze), a także skóra lub błony śluzowe chorego i/lub zespołu operacyjnego, jak również otwarcie w czasie zabiegu światła przewodu pokarmowego, układu oddechowego czy moczowo-płciowego.

Po operacji w wyniku niewłaściwej antyseptyki często następuje kolonizacja miejsca operowanego drobnoustrojami ze środowiska szpitalnego przeniesionymi na rękach personelu medycznego lub ze skóry pacjenta jako zakażenie endogenne. Źródłem potencjalnych patogenów mogą być też drobnoustroje kolonizujące założone cewniki naczyniowe i moczowe, dreny, wspomagane oddychanie oraz inne inwazyjne zabiegi lecznicze i diagnostyczne [4, 5].

Najczęstszymi czynnikami etiologicznymi zakażenia miejsca operowanego są *S. aureus*, *E. coli*, *Pseudomonas*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Bacteroides*, *Candida albicans*. U pacjentów ortopedycznych, ze względu na powszechne stosowanie biomateriałów, 55% zakażeń stanowi *Staphylococcus epidermidis*, a 10–20% — *Staphylococcus aureus*. Pozostałe czynniki etiologiczne to pałeczki Gram (–) *Klebsiella*, *Enterobacter*, *E. coli*, *Pseudomonas* i grzyby z rodzaju *Candida* [6–8].

Adhezja bakterii do powierzchni biomateriałów (nici chirurgiczne, wszczepy, powierzchnie cewników) to pierwszy etap powstawania infekcji, zapoczątkowany najczęściej w miejscu zetknięcia się biomateriału ze skórą. Wyróżniono dwa główne etapy adhezji drobnoustrojów. Wstępny etap przylegania jest odwracalny i zachodzi przy udziale sił fizycznych. Na ostateczny efekt tego procesu ma wpływ wypadkowy rozkład sił przyciągania i odpychania [1]. Adhezja nieswoista może być odwracalna poprzez modyfikację składu chemicznego powierzchni wszczepów (z chropowatych na gładkie), co zmniejsza możliwość przylegania bakterii, a także właściwe stosowanie środków antyseptycznych w miejscu przecięcia powłok skórnych i/lub założenia cewnika. Konsekwencją przylegania nieswoistego jest adhezja swoista, uwarunkowana posiadaniem przez bakterie zewnątrzkomórkowych adhezyn, oraz zdolności wytwarzania przez nie śluzu. Śluz jest integralnie związany z komórką bakteryjną i ułatwia przyleganie do powierzchni z tworzyw sztucznych bez udziału receptorów. Umożliwia to bakteriom przeżycie w organizmie gospodarza, a stanowiąc barierę przed składnikami układu odpornościowego, utrudnia także penetrację antybiotyków. Składniki śluzu mają zdolność do aktywacji makrofagów i stymulacji wydzielania IL6, IL1, TNF α , PG E5, a wytwarzanie śluzu podlega dużej zmienności. Cienka struktura złożona z komórek bakterii połączonych zewnątrzkomórkowym śluzem zwana jest biofilmem. Biofilm może być jednorodny (złożony z jednego rodzaju bakterii) lub złożony [9, 10].

Obecność biofilmu stwarza optymalne warunki dla tworzenia się kolonii bakteryjnych i wytwarzania polimerów egzopolisacharydu, niezależnie od niekorzystnych dla bakterii czynników zewnętrznych.

Biofilm chroni komórkę bakteryjną przed mechanizmami obronnymi ustroju gospodarza, utrudnia fagocy-

During the operation, a source of micro-organisms may be the operation ward environment (equipment, air), as well as the skin or mucous membranes of the patient and/or the operating team, plus the opening of the alimentary tract, the respiratory tract or the urinary and reproductive system during the operation.

Due to the incorrect use of antiseptics after the operation, colonisation of the operated site occurs quite frequently, with microbes originating in the hospital environment, carried on the hands of the medical personnel, or coming from the patient's skin, as an endogenic infection. Another source of potential pathogens may also be microbes that colonise the applied vascular and urinary catheters, drainage tubes, respiration aids as well as other therapeutic and diagnostic equipment [4, 5].

The most common etiologic factors that bring about infections of operated tissue are *S. aureus*, *E. coli*, *Pseudomonas*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Bacteroides*, *Candida albicans*. In orthopaedic patients, due to a broad use of biomaterials, 55% of infections is caused by *Staphylococcus epidermidis*, and 10–20% by *Staphylococcus aureus*. Other etiologic factors comprise Gram-negative bacilli *Klebsiella*, *Enterobacter*, *E. coli*, *Pseudomonas* and *Candida* type fungi [6–8].

Adhesion of bacteria to biomaterial surfaces (surgical threads, implants, catheter surfaces) is the first stage of infection formation, usually initiated in the spot where a biomaterial touches the skin. Two main stages of microbe adhesion have been distinguished. The initial adhesion stage is reversible, and occurs with the participation of physical forces. What influences the final effect of this process, is the resultant displacement of attracting and repelling forces [1]. Non-specific adhesion may be reversible via the modification of the chemical composition of the implants' surface (change from rough to smooth), which reduces the potential of bacterial adhesion occurrence, as well as the correct application of antiseptic measures in sites where skin integuments are incised and/or a catheter is inserted. A consequence of non-specific adhesions is a specific adhesion, conditional upon the possession of extra-cellular adhesins by bacteria, and their ability to produce mucus. Mucus is integrally bonded with bacterial cells, and facilitates adhesion to synthetic material surfaces without the participation of receptors. This enables the survival of bacteria in the host's organism; building up a barrier against immune system components, it also hampers the penetration of antibiotics. Moreover, mucus components are also capable of activating macrophages, the stimulation of the secretion of IL6, IL1, TNF α , PG E5, while the production of mucus is subject to a high variability. Thin structures consisting of bacterial cells joined to an extracellular mucus is called biofilm. Biofilm may be homogenous (composed of bacteria of one type) or of a complex type [9, 10].

The presence of biofilm creates optimal conditions for bacterial colonies to form and for exopolysaccharide polymers to be produced, regardless of adverse external conditions for the bacteria.

tożę, opsonizację, zaburza chemotaksję, hamuje blastogenezę komórek T i B, zmniejsza penetrację antybiotyków i przeciwciał. Bakterie tworzące biofilm charakteryzują się zwolnionym metabolizmem i podlegają zmianom fenotypowym, które warunkują ich oporność i zjadliwość. Wytworzona błona biologiczna może ulec fragmentacji i odklejeniu pod wpływem urazów, w efekcie czego jej fragmenty bogate w agregaty bakterii mogą rozprzestrzenić się drogą krwi i wywoływać zakażenia.

Zapobieganie zakażeniom miejsca operowanego związanych z powstawaniem biofilmu wiąże się ściśle z wprowadzeniem odpowiedniej antyseptyki w przygotowaniu pacjenta do zabiegu oraz stosowaniem okołoperacyjnej profilaktyki antybiotykowej, odpowiedniej wentylacji sali operacyjnej, jałowego sprzętu i właściwych technik chirurgicznych.

Dobierając antyseptyk, należy kierować się jego spektrum (uwzględniając bakterie produkujące śluz). Preparat nie powinien drażnić skóry i błon śluzowych oraz nie wywoływać bólu na ewentualnych mechanicznych uszkodzeniach skóry, być nietoksyczny (preparaty jodowe u dzieci). Istotnym elementem jest szybki czas działania oraz chemiczne zabezpieczenie przed kontaminacją.

Ważną cechą, jaką powinien posiadać antyseptyk, jest brak barwnika. Stosowany środek powinien być bezbarwny, co znacznie ułatwia późniejszą ocenę wizualną operowanego miejsca.

Celem niniejszej pracy była ocena wpływu Octeniseptu na przeżywalność bakterii produkujących biofilm na biomateriałach.

Materiał i metody

Szczepki pochodziły ze zbioru Katedry i Zakładu Mikrobiologii Akademii Medycznej we Wrocławiu. Zgromadzono kolekcję 25 szczepów z zakażeń ran, w tym 14 gronkowców koagulazoujemnych (*S. epidermidis*, *S. haemolyticus*, *S. warneri*), 5 szczepów *Klebsiella pneumoniae*, 3 *E. coli*, 3 *Pseudomonas aeruginosa* izolowanych od pacjentów hospitalizowanych na oddziale chirurgii ogólnej. Użyto również szczep wzorcowy *S. epidermidis* ATCC 35 984 z Amerykańskiej Kolekcji Kultur Wzorcowych.

Do określenia stopnia produkcji biofilmu badanych szczepów użyto cewnik z lateksu silikonowanego oraz nić chirurgiczną niewchłaniającą poliamidową, 1-procentowy roztwór TTC (chlerek 2, 3, 5-trójfenylotetrazoliowy), Octenisept, 0,5-procentowy roztwór saponiny, neutralizator o składzie: Tween 80 — 3%, saponina — 3%, histydyna — 0,1%, lecytyna — 0,1%.

Przygotowane fragmenty cewnika i nici umieszczano w 2 ml zawiesiny badanych szczepów o gęstości 1 McF. Po 2-godzinnej inkubacji w temperaturze 37°C badane biomateriały przenoszono na minutę do 3 ml Octeniseptu. Po tym czasie dezynfekowany cewnik lub nić umieszczano w próbkach zawierających 2 ml podłoża TSB (bulion tryptozowo-sojowy) z neutralizatorem. Następnie próbki płukano i dodawano kroplę 1-procentowego roztworu TTC. W metodzie tej oceniano powstawanie czerwonego formazanu, będącego wynikiem re-

Biofilm protects bacterial cells against defensive mechanisms of the host organism, hampers phagocytosis, opsonisation, causes disturbances in chemotaxis, hinders blastogenesis of T and B cells as well as reducing antibiotic and antibody penetration. Bacteria forming biofilms have a slower metabolism and are subject to phenotype changes, which condition their resistance and virulence. Biological film may be fragmented and deglutinated due to injuries, the effect of which are its fragments, which are rich in bacteria aggregates, being able to spread through the blood and cause infections.

The prevention of infections in the surgical site which are associated with the formation of biofilm, is strictly related to the application of correct antiseptics in the preparation of the patient for surgery and of the appropriate antibiotic protective measures before and during the operation, namely; adequate ventilation of the operating theatre, the provision of sterile equipment and the application of suitable surgical techniques.

When selecting the antiseptic preparation, its spectrum should be taken into consideration (with attention paid to mucus-generating bacteria). The preparation cannot be irritating to the skin and mucous membranes and cannot cause pain or possible mechanical damage to the skin, must be non-toxic (iodine preparations used in children). An important component is a prompt action time and chemical protection against contamination.

Another important feature that an antiseptic preparation should have is the lack of colour; the substance used should be colourless, which greatly facilitates further visual inspection of the operated tissue.

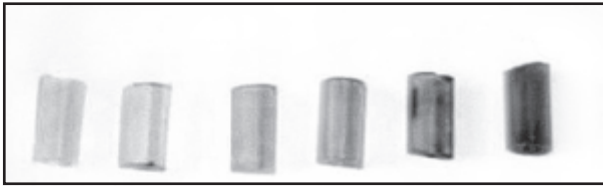
The purpose of our work was an assessment of the impact of Octenisept on the survival rate of bacteria producing biofilm on biomaterials.

Material and methods

Strains were obtained from the collection of the Department of Microbiology of the Medical University in Wrocław. A collection of 25 strains from wound infections was created, including 14 coagulase-negative staphylococci (*S. epidermidis*, *S. haemolyticus*, *S. warneri*), 5 strains of *Klebsiella pneumoniae*, 3 *E. coli*, 3 *Pseudomonas aeruginosa* isolated from patients hospitalised in the general surgery ward. A specimen strain of *S. epidermidis* ATCC 35 984 was used as well, obtained from the American Collection of Type Cultures.

In order to define the degree of biofilm production in the examined strains, a silicon-coated latex catheter was used along with a non-absorbable polyamide surgical thread, a 1% TTC solution (2, 3, 5-triphenyltetrazolium chloride), Octenisept, a 0.5% saponin working solution, a neutralising agent composed of: 3% Tween 80, 3% saponin, 0.1% histidine, 0.1% lecithin.

Prepared fragments of the catheter and thread were put in a 2-ml suspension containing the examined strains, at a density of 1 McF; following a 2-hour incubation at a temperature of 37°C, the tested biomaterials were immersed for 1 minute in 3 ml of Octenisept. After this time,



Rycina 1. Stopień zabarwienia cewnika (redukcja TTC) jako wyraz tworzenia biofilmu przez szczepy gronkowców wg metody Richarda (Odczyt wizualny redukcji TTC, kontola ujemna, -, +1, +2, +3, +4, od lewej)

Figure 1. Catheter colour degrees (TTC reduction) as an expression of biofilm formation by staphylococci strains, following Richards method (Visual reading of TTC reduction, negative control, -, +1, +2, +3, +4, from left)

dukcji chlorku 2, 3, 5-trójfenylo-tetrazoliowego (TTC) przez żywe drobnoustroje. Po dodaniu 1-procentowego roztworu TTC i inkubacji w temperaturze 37°C oceniano stopień redukcji TTC do czerwonego formazanu według następującej skali:

- +1 — lekkie zaróżowienie pojedynczych miejsc na powierzchni biomateriału;
- +2 — cała powierzchnia biomateriału różowa;
- +3 — zaróżowienie całej powierzchni i wnętrza implantu;
- +4 — zaróżowienie całej powierzchni i wnętrza implantu oraz zmętnienie podłoża [11] (ryc. 1).

Równocześnie przeprowadzono doświadczenie bez użycia Octeniseptu.

Obok wizualnej analizy powstawania formazanu określano ilościowo na podłożu stałym powstawanie biofilmu i jego redukcję pod wpływem Octeniseptu. Wytworzony biofilm odrywano od powierzchni cewnika i nici poprzez odmywanie w wytrząsaniu w 0,5-procentowej saponinie, a uzyskaną zawiesinę posiewano ilościowo na stałym podłożu tryptozowo-sojowym. Wyniki odczytywano jako liczbę jednostek koloniotwórczych na mililitr zawiesiny (CFU/ml).

Zdolność produkcji biofilmu i jego redukcji pod wpływem Octeniseptu oglądano i oceniano również w scanningowym mikroskopie elektronowym JEOL JSM-5800 LV.

Wyniki

Wszystkie badane bakterie produkowały śluz na cewniku i nici chirurgicznej. Po użyciu płynu Octenisept w ciągu minuty jego działania 100% szczepów zostało usuniętych z nici chirurgicznej (ryc. 2), a 99% szczepów produkujących biofilm — z cewnika moczowego.

Liczba żywych komórek w biofilmie wszystkich badanych gatunków, wynosząca początkowo 10^7 k/ml i 10^9 k/ml, obniżona się w ciągu minuty działania zastosowanego preparatu do poziomu 10^2 k/ml (ryc. 3).

Wizualną ocenę produkcji biofilmu i jego redukcji po użyciu płynu Octenisept na nici chirurgicznej przedstawia rycina 4, a na cewniku — rycina 5.

Analizę w mikroskopie elektronowym powstawania i redukcji biofilmu na nici chirurgicznej przedstawiają ryciny 6 i 7, a na cewniku naczyniowym — ryciny 8 i 9.

the disinfected catheter or thread was placed in test-tubes containing 2 ml TSB base (tryptose and soya broth) with a neutralising agent composed of: 35 Tween 80, 35 saponin, 0.15 histidine, 0.15 lecithin. Then, the samples were rinsed and 1 drop of 1% TTC solution was added. In this method, the formation of red formazan was assessed, being the result of a reduction of TTC (2, 3, 5-triphenyltetrazolium chloride), by living microbes. Following the addition of a 1% TTC solution and incubation at a temperature of 37°C, the reduction ratio of TTC to red formazan was assessed, according to the scale below:

- +1 — slight pinkening of individual spots on the biomaterial surface,
- +2 — pinkening of the entire surface of the biomaterial,
- +3 — pinkening of the entire surface and interior of the implant,
- +4 — pinkening of the entire surface and interior of the implant with base turbidity [11] (Fig. 1).

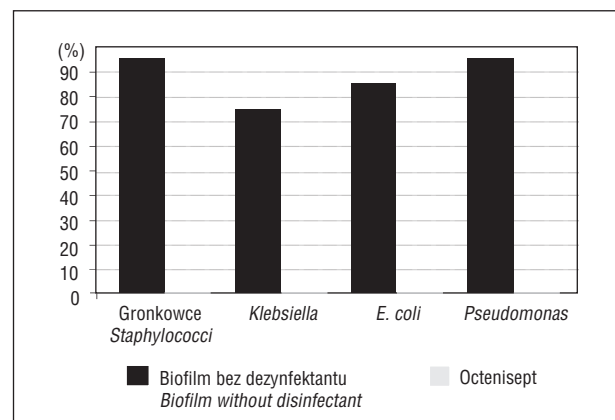
At the same time, an experiment without the use of Octenisept was being carried out.

Apart from a visual analysis of formazan formation, the generation of biofilm on a solid base was defined quantitatively, as well as its reduction under the influence of Octenisept. The produced biofilm was taken off the surface of the catheter and thread via elutriation with shaking in 0.5% saponin solution, and the suspension obtained was inoculated quantitatively on solid tryptose and soya plates. The results were read as the number of colony-forming units per 1 ml of suspension (CFU/ml)

The ability to produce a biofilm and its reduction under the influence of Octenisept was observed and assessed employing an electronic scanning microscope: JEOL JSM-5800 LV.

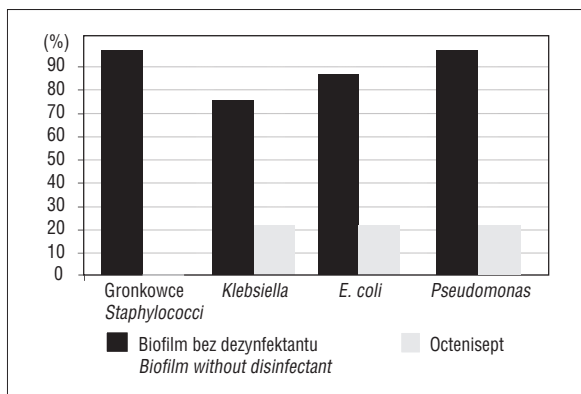
Results

All the tested bacteria produced mucus on the catheter and surgical thread. In the method employing TTC, 100% strains were removed from the thread after



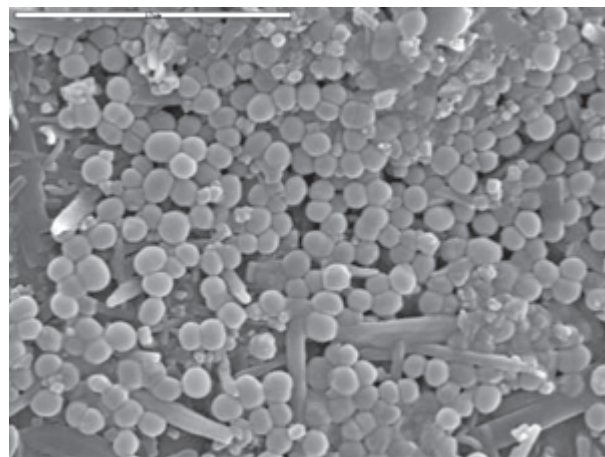
Rycina 2. Ocena ilościowa tworzenia i redukcji biofilmu na nici chirurgicznej

Figure 2. Quantitative assessment of biofilm forming and reduction on the surgical thread



Rycina 3. Ocena ilościowa tworzenia i redukcji biofilmu na cewniku

Figure 3. Quantitative assessment of biofilm forming and reduction on the catheter



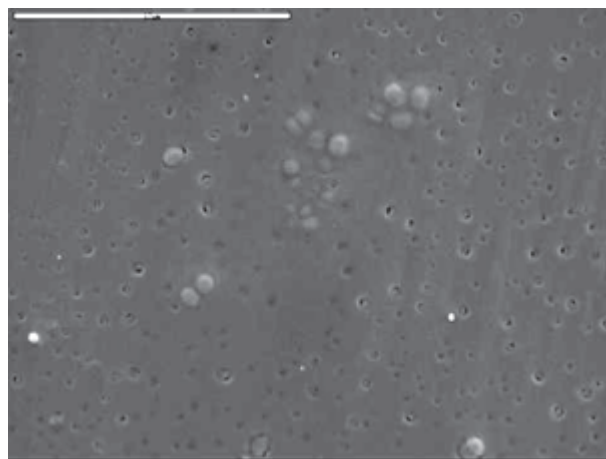
Rycina 6. Biofilm *S. epidermidis* na powierzchni nici. Mikroskop JSM-5800 LV firma Jeol — powiększenie 6000x

Figure 6. *S. epidermidis* biofilm on the thread surface. Microscope JSM-5800 LV, by Jeol — magnification 6000x



Rycina 4. Ocena wizualna tworzenia i redukcji biofilmu na nici chirurgicznej

Figure 4. Visual assessment of biofilm forming and reduction on the surgical thread



Rycina 7. Redukcja biofilmu *S. epidermidis* na powierzchni nici. Mikroskop JSM-5800 LV firma Jeol — powiększenie 6000x

Figure 7. *S. epidermidis* biofilm reduction on the thread surface; Microscope JSM-5800 LV by Jeol — magnification 6000x



Rycina 5. Ocena wizualna tworzenia i redukcji biofilmu na cewniku

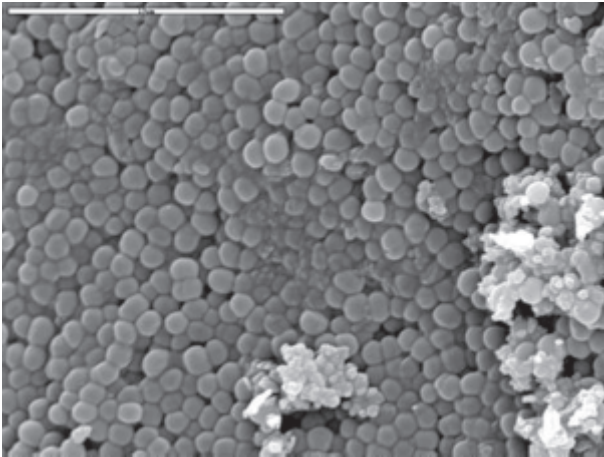
Figure 5. Visual assessment of biofilm forming and reduction on the catheter

a 1-minute application of Octenisept. (Fig. 2). In the same method 99% strains producing biofilm were removed from urinary catheter after a 1-minute application of Octenisept.

The number of living cells in the biofilm of all species tested, initially being at a level of 10^7 CFU/ml and 10^9 CFU/ml, was reduced within the 1-minute action of the solution applied to 10^2 CFU/ml (Fig. 3).

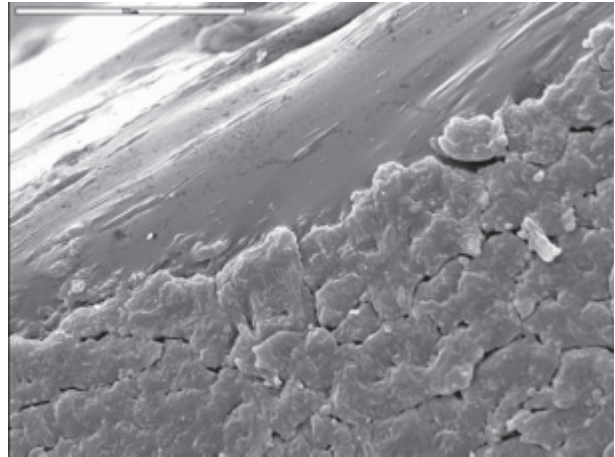
A visual assessment of biofilm production and reduction after the application of Octenisept on surgical threads is shown in Figure 4; Figure 5 presents the catheter.

An analysis of the formation and reduction of biofilm on surgical threads through an electronic microscope is presented in Figures 6 and 7, and a vascular catheter is shown in Figures 8 and 9.



Rycina 8. Biofilm *S. epidermidis* na powierzchni cewnika. Mikroskop JSM-5800 LV firma Jeol — powiększenie 6000x

Figure 8. *S. epidermidis* biofilm on the catheter surface. Microscope JSM-5800 LV by Jeol — magnification 6000x



Rycina 9. Redukcja biofilmu *S. epidermidis* na powierzchni cewnika. Mikroskop JSM-5800 LV firma Jeol — powiększenie 6000x

Figure 9. *S. epidermidis* biofilm reduction on the catheter surface. Microscope JSM-5800 LV by Jeol — magnification 6000x

Dyskusja

Niebezpieczeństwo możliwości zakażeń odcewnikowych wywołanych przez bakterie produkujące śluz jest związane z ich obecnością zarówno na skórze pacjenta i personelu, jak i w środowisku szpitalnym. Początkowa adhezja drobnoustrojów do powierzchni nieożywionych jest procesem odwracalnym i polega na tworzeniu niespecyficznego, głównie hydrofobowego, oddziaływań. Konsekwencją wstępnej adhezji może być swoisty (nieodwracalny) mechanizm, uwarunkowany procesami chemicznymi, polegającymi na wiązaniu struktur powierzchniowych komórki bakteryjnej (adhezyny, lektyny) z odpowiednimi białkowymi ligandami (receptory komórkowe) komórek gospodarza.

Aby skutecznie zapobiec powstaniu adhezji swoistej w miejscu operowanym lub w miejscu wprowadzenia cewnika, należy stosować odpowiedni antyseptyk.

Badany preparat antyseptyczny uważany jest za skuteczny, gdyż zmniejsza liczbę żywych komórek bakteryjnych w zawiesinie o 5 jednostek logarytmicznych, co odpowiada redukcji liczby żywych komórek w zawiesinie o 99%. Uzyskane wyniki badań wykazały, że wszystkie produkujące śluz szczepy bakterii izolowane z zakażenia miejsca operowanego były skutecznie zabijane przez użyty preparat antyseptyczny. Preparat antyseptyczny Octenisept, w warunkach przeprowadzonych badań, wykazywał silne działanie bakteriobójcze na szczepy bakterii produkujących śluz i tworzących biofilm. Redukował on, w zalecanej przez producenta czasie działania, liczbę żywych komórek w zawiesinie o 99% i spełniał w odniesieniu do badanych bakterii wymagania normy dla środków antyseptycznych przeznaczonych do odkażania skóry i błon śluzowych. Aktywność preparatu antyseptycznego Octenisept o składzie: dichlorowodorek octenidyny i alkohol fenoksymetylowy oraz substancje pomocnicze, w warunkach przeprowadzonych badań,

Discussion

The threat of catheter-originating infections, caused by mucus-generating bacteria is associated with their presence both on the patient's and medical personnel's skin, as well as in hospital environments. The initial adhesion of microbes to abiotic surfaces is a reversible process, and mostly concerns the creation of non-specific, mainly hydrophobic interactions. A consequence of the initial adhesion may be a specific (irreversible) mechanism, conditioned by chemical processes, the basis of which being the bonding of superficial structures of the bacterial cell (adhesins, lectins) with corresponding protein ligands (cellular receptors) of the host's cells.

In order to effectively prevent the formation of a specific adhesion in the operated area or in the catheter insertion spot, a suitable antiseptic substance should be used.

The tested preparation is considered to be effective, as it reduces the number of living bacterial cells in the solution by 5 logarithmic units, which corresponds to a reduction of living cells in the solution by 99%. The test results obtained demonstrated that all mucus-producing bacteria strains, isolated from the infected operated tissue, were effectively eliminated by the antiseptic preparation applied. Octenisept antiseptic preparation, under test conditions, demonstrated strong bactericidal properties against strains of mucus-producing and biofilm-forming bacteria. It reduced, in the time specified by the manufacturer, the number of living cells in the suspension by 99%, and is compliant with requirements set forth in the standard relating to antiseptic substances designed to disinfect skin and mucous membranes, with respect to the bacteria tested. The action of Octenisept antiseptic preparation, which is composed of: octenidine dihydrochloride, phenoxyethyl alcohol and auxiliary substances, was, under the examination condi-

była podobna w stosunku do wszystkich badanych gatunków bakterii. Zastosowana metoda neutralizacji preparatu antyseptycznego Octenisept w zawiesinie po upływie wymaganego czasu działania spełniała wszystkie wymagania zawarte w metodyce zalecanej przez Instytut Leków.

Wnioski

Należy stwierdzić, że preparat antyseptyczny Octenisept może być bezpiecznie stosowany do odkażania skóry, błon śluzowych i ran w ogniskach zakażeń wywołanych przez bakterie produkujące biofilm. Właściwa pielęgnacja miejsca operowanego zapobiega powstawaniu biofilmu i powikłań w postaci zakażeń odcewnikowych.

Piśmiennictwo (References)

1. Wójkowska-Mach J, Róžońska A, Bulanda M. Nadzór epidemiologiczny nad zakażeniami miejsca operowanego. *Zakażenia* 2002; 3-4: 5-17.
2. Christensen G. Adherence of slime-producing strains of *Staphylococcus epidermidis* to smooth surfaces. *Infection and Immunity* 1982; 37: 318-326.
3. Dzierżanowska D. Zakażenia szpitalne. *α-medica Press*. Bielsko-Biała 1999.
4. Hermann M, Peters G. Catheter-associated infections caused by coagulase-negative staphylococci: clinical and biological aspects. *Inc*. New York 1997; 97-208.
5. Pascual A. Pathogenesis of catheter-related infection: lessons for new designs. *Clin Microbiol Infect*. 2002; 8: 256-264.
6. Arciole C, Compocchia D. Antibiotic resistance in exopolysaccharide — forming staphylococcus epidermidis clinical isolates from orthopedic implant infections. *Biomaterials* 2005; 26: 6530-6535.
7. Hussain M, Wilcox M, White P. The slime of coagulase-negative staphylococci: biochemistry and relation to adherence. *FEMS Microbiol Reviews* 1993; 104: 191-208.
8. Huebner J, Goldmann A. Coagulase-negative Staphylococci: role as pathogens. *Annu Rev Med*. 1999; 50: 223-236.
9. Jones W. A study of coagulase-negative withreference to slime production, adherence, antibiotic resistance and clinical significance. *J Hosp Inf*. 1992; 22: 217-227.
10. Alcantar Curiel M, Ramos-Martinez A, Latorre-Garcia E. Capsular polysaccharide of *Klebsiella pneumoniae*. Immunogenic Properties *Rev Latinoam Microbiol*. 1993; 35: 109-115.
11. Różalska B. Wykrywanie biofilmu bakteryjnego na biomateriałach medycznych. *Med Dośw Mikrobiol*. 1998; 50: 115-122.

Adres do korespondencji (Address for correspondence):

Dr med. Marzenna Bartoszewicz
Katedra Mikrobiologii Akademii Medycznej we Wrocławiu
ul. Chalubińskiego 4
50-367 Wrocław
tel.: (071) 784-13-01
faks: (071) 784-01-17
e-mail: marzbp@mbio.am.wroc.pl

Praca wpłynęła do Redakcji: 15.08.2006 r.