

OCENA WRAŻLIWOŚCI SZCZEPÓW STAPHYLOCOCCUS AUREUS NA ŚRODKI DEZYNFEKCYJNE*

ASSESSMENT OF *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* STRAINS'
SUSCEPTIBILITY TO DISINFECTION AGENTS

Katarzyna Głuszek

Apteka „Dbam o Zdrowie” w Kielcach

Polska Grupa Farmaceutyczna

STRESZCZENIE

Wstęp. Gronkowiec złocisty (*Staphylococcus aureus*) jest najbardziej chorobotwórczym gatunkiem wśród gronkowców. Dzięki dużej wirulencji, nabywania oporności na antybiotyki, środki dezynfekcyjne i antyseptyczne stał się głównym czynnikiem etiologicznym zakażeń szpitalnych.

Cel pracy. Celem pracy była ocena skuteczności wybranych środków dezynfekcyjnych w zależności od ich stężenia i czasu działania na zahamowanie wzrostu szczepów *Staphylococcus aureus*.

Materiał i metodyka. Badania przeprowadzono na 55 szczepach *Staphylococcus aureus* wyizolowanych z materiałów klinicznych (ropa, krew, wymazy z nosa, gardła, ze skóry itp.) pobranych od pacjentów szpitalnych i ambulatoryjnych.

Do badań wrażliwości na środki dezynfekcyjne użyto wody utlenionej w stężeniu 1%, 2%, 3%; etanolu w stężeniu 20%, 30%, 40%, 50%, 60% i 70%; jodoformu w stężeniu 0,25%, 0,5%, 1%, 10%.

W badaniach uwzględniono również czas działania ww. preparatów na drobnoustroje. Działanie biobójcze określono po czasie 15 sekund, 1 oraz 2 minut.

Wyniki badań. W badaniach wykazano, że dopiero stężenie 3% wody utlenionej powoduje zahamowanie wzrostu izolatów *Staphylococcus aureus*.

Przy zastosowaniu 70% stężenia etanolu w czasie 15 sekund, 1 i 2 minut dochodzi do znaczącego zahamowania wzrostu izolatów o 85,5%. Etanol w stężeniu 10–60% nie hamował wzrostu bakterii.

Całkowite zahamowanie wzrostu wszystkich szczepów bakterii uzyskano po zastosowaniu 1% i 10% jodoformu w czasie 15 sekund, 1 i 2 minut; stężenie 0,5% powoduje zahamowanie wzrostu w 87,3%, a 0,25% w 80% szczepów.

Wnioski.

1. Stosowanie środków dezynfekcyjnych ogranicza liczbę drobnoustrojów.
2. Antyseptyki i preparaty dezynfekcyjne muszą być stosowane zgodnie z zaleceniami producenta, aby osiągnęły skuteczność wg EN.
3. Szczepy MRSA są szczepami o obniżonej wrażliwości na antybiotyki i środki dezynfekcyjne.

Słowa kluczowe: *Staphylococcus*, antyseptyki, drobnoustroje, środki dezynfekcyjne, działanie biobójcze, izolacja.

SUMMARY

Introduction. *Staphylococcus aureus* (golden staph) is the most pathogenic species amongst *Staphylococcus*. Thanks to a high virulence, acquiring immunity to antibiotics, disinfection and antiseptic agents it has become the main aetiological factor of hospital infections.

Goal of the research. The goal of the research was an efficacy assessment of *Staphylococcus aureus* strains' growth inhibition of select disinfection agents, depending on their concentration and operation time.

Material and methodology. The research were carried out on 55 strains of *Staphylococcus aureus* isolated from clinical materials (pus, blood, nose, pharyngeal, skin swabs etc.) collected from hospital and ambulatory patients.

For the research on susceptibility to disinfection agents a hydrogen peroxide solution with a concentration of 1%, 2%, 3%; ethanol with a concentration of 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%; iodophor with a concentration of 0.25%, 0.5%, 1%, 10% were used.

Operation time on the microbes of the above-mentioned preparations was also taken into consideration in the research. Biocidal effect was measured after 15 seconds, 1 and 2 minutes.

Research results. It was revealed in the research that only a concentration of 70% hydrogen peroxide solution causes growth inhibition of the *Staphylococcus aureus* isolates.

* Praca przygotowana na podstawie pracy magisterskiej wykonanej w Zakładzie Diagnostyki Mikrobiologicznej WF AM w Białymstoku, Kierownik Zakładu: dr hab. n. med. Piotr Jakoniuk.

Upon using a 70% concentration of ethanol, for a time of 15 seconds, 1 and 2 minutes, a significant growth inhibition of isolates by 85.5% is reached, in an equal degree during the times of 15 seconds, 1 and 2 minutes. Ethanol with a concentration ranging from 10% to 60% did not inhibit bacteria growth.

A complete inhibition of all bacteria strains was obtained after using 1% and 10% of iodophor during a time of 15 seconds, 1 and 2 minutes; a concentration of 0.5% causes strains' growth inhibition by 87.3%, and 0.25% by 80%.

Conclusions.

1. Use of disinfection agents reduces the number of microbes.
2. Antiseptics and disinfection preparations have to be used according to the producer's recommendations in order to achieve efficacy according to EN.
3. MRSA strains are strains of a reduced susceptibility to antibiotics and disinfection agents.

Key words: Staphylococcus, antiseptics, microbes, disinfection agents, biocidal effect, isolate.

WSTĘP

Gronkowiec złocisty (*Staphylococcus aureus*) jest najbardziej chorobotwórczym gatunkiem wśród gronkowców. Dzięki dużej wirulencji, nabywania oporności na antybiotyki, środki dezynfekcyjne i antyseptyczne stał się on głównym czynnikiem etiologicznym zakażeń szpitalnych o ciężkim przebiegu, szczególnie niebezpiecznym dla zdrowia i życia pacjentów. Powszechne nosicielstwo sprzyja szybkiemu rozprzestrzenianiu się drobnoustroju w środowisku – szczególnie metycylinoopornych szczepów (MRSA). Gronkowce należą do najbardziej rozpowszechnionych drobnoustrojów w przyrodzie. Najczęściej kolonizują skórę oraz błony śluzowe człowieka i zwierząt, poza organizmem zaś występują powszechnie w środowisku naturalnym – w powietrzu, glebie, kurzu, wodzie, ściekach, na przedmiotach, w żywności itp. Wśród ziarniaków występują gatunki chorobotwórcze, potencjalnie chorobotwórcze, komensalne i saprofityczne. Utrzymywanie się bakterii w organizmie, bez powodowania objawów chorobowych, jest możliwe dzięki wytworzeniu stanu równowagi między organizmem człowieka a drobnoustroju. Jednak wzrost patogenności szczepu lub osłabienie mechanizmów obronnych gospodarza powoduje zaburzenie tej równowagi i sprzyja rozwojowi zakażenia [1–6].

Przerywanie dróg przenoszenia bakterii i wprowadzanie kompleksowych zabiegów higienicznych (dezynfekcja, antyseptyka, sterylizacja) zmierzają do znacznego zmniejszenia zakażeń szpitalnych. W krajach, które w sposób bezwzględny przestrzegają zasad higieny, takich jak Holandia, Szwecja, Dania, Norwegia, liczba zakażeń wywołanych przez gronkowce MRSA na oddziałach intensywnej terapii wynosi mniej niż 1%, a w pozostałych państwach Europy (w tym w Polsce) i USA, oscyluje wokół 50–60% [3, 7–11].

Gronkowcowe zakażenia mogą wywoływać:

- choroby skórne (ropnie, czyraki, trądzik, zakażone rany),

- choroby układu oddechowego (zapalenie: gardła, migdałków, ucha środkowego, oskrzeli, płuc),
- choroby układu moczowego (odmiedniczkowe zapalenie nerek, zapalenie pęcherza),
- choroby przewodu pokarmowego (zatrucia pokarmowe, odzwierzęce zatrucia pokarmowe, zapalenie jelit),
- posocznice i ropowice,
- zapalenia ropne stawów,
- zapalenia sutków,
- zapalenia szpiku i kości,
- zapalenia opon mózgowo-rdzeniowych,
- zespół opatrzonej skóry (SSS – *scalded skin syndrome*),
- zespół wstrząsu toksycznego (TSS – *toxic shock syndrome*).

W ostatnich latach na świecie obserwuje się zwiększenie liczby zakażeń szpitalnych wywołanych przez bakterie Gram-dodatnie. Gronkowiec złocisty wg badań Banerjee i wsp., pozostaje drugim co do częstości występowania patogenem wywołującym zakażenia szpitalne. Jones ocenił częstość występowania bakterii jako przyczyn infekcji szpitalnych w latach 1993/1994 odpowiednio dla gronkowca złocistego na 16,6% [3].

Zakażenia szpitalne wywołane przez *Staphylococcus aureus* stanowią poważny problem ze względu na możliwość endemicznego rozprzestrzeniania się zakażeń, ciężki klinicznie przebieg związany z ich zjadliwością, a także narastającą oporność bakterii na wiele antybiotyków.

Okolo 90% gronkowców wytwarza penicylinazy i jest niewrażliwych na penicilinę, aminopenicilinę i ureidopenicilinę. Gronkowce wytwarzające penicylinazę są wrażliwe na penicyliny półsyntetyczne, penicyliny izokolidowe, penicyliny z inhibitorami, cefalosporyny (głównie I i II generacji) oraz karbapenemy. Szczepy te są wrażliwe na glikopeptydy i gentamycynę [3, 7, 12, 13–17].

Drobnoustroje wykazują różną wrażliwość na środki dezynfekcyjne. Znaczenie ma tu: grubość i skład ich ściany komórkowej (bakterie Gram-do-

datnie mają 2–3-krotnie grubszą ścianę niż bakterie Gram-ujemne), obecność otoczki czy przetrwalników, wytwarzanie śluzu.

W dezynfekcji stosowane są związki z różnych grup chemicznych, a niektóre z nich również w antyseptyce. Ograniczenia w stosowaniu tych związków jako antyseptyków wynikają z faktu, że są one stosowane na żywe tkanki. Dlatego bardzo ważną jest nieszkodliwość tychże środków, brak działań alergizujących, drażniących oraz brak toksyczności. Główne grupy chemiczne środków biobójczych podano w tabeli 1.

Środek odkażający najlepiej łączy się z drobnoustrojem w środowisku wodnym, dlatego zazwyczaj rozpuszczalnikiem jest woda. Mogą one być stosowane samodzielnie lub w mieszaninach – wzrasta wtedy ich skuteczność, a zakres działania się poszerza.

Środki dezynfekujące stosuje się do dezynfekcji powierzchni, narzędzi i pomieszczeń w celu zniszczenia wegetatywnych postaci drobnoustrojów. Dobierane są w zależności od miejsca użycia, zakresu oraz przeznaczenia. W małych stężeniach działają

Tabela 1. Podstawowe grupy chemiczne środków dezynfekujących i biobójczych [20, 21]

Grupa chemiczna	Substancje aktywne	Zastosowanie	Spektrum	Mechanizm działania
Alkohole	etanol, propanol	dezynfekcja, antyseptyka	wegetatywne formy bakterii, prątki kwasooporne, grzyby, wirusy	powodują uszkodzenie błony, denaturację białek, zaburzenia metabolizmu, lizę komórki
Aldehydy	aldehyd glutarowy, aldehyd mrówkowy (formaldehyd)	dezynfekcja	szerokie działanie (wegetatywne formy bakterii, przetrwalniki, grzyby, wirusy), średnio aktywne wobec prątków grzyźlicy	reakcja z grupami aminowymi i sulfhydrylowymi białek, hamujący wpływ na transport i systemy enzymów, uszkodzenie osłon komórkowych
Biguanidy	chlorheksydyna	antyseptyka	głównie bakterie Gram-dodatnie, prątki kwasooporne, grzyby, wirusy z otoczką lipidową	działa bakteriostatycznie, adsorpcja na powierzchni komórki i uszkodzenie osłon, liza, hamuje tworzenie przetrwalników
Fenole	fenole i krezole i ich pochodne (np. chlorokrezole)	dezynfekcja	formy wegetatywne bakterii, prątki, grzyby wirusy	w niższych stężeniach powodują lizę i wypływ składników komórkowych, w wyższych stężeniach powodują koagulację cytoplazmy i uszkodzenie komórki
Bifenole	triclosan	antyseptyka	głównie bakterie Gram-dodatnie	w połączeniu z EDTA powoduje zwiększenie przepuszczalności błony komórkowej
Diamidyny	propamidyna, dibromopropamidyna	antyseptyka	bakterie Gram-dodatnie, niektóre Gram-ujemne, grzyby, pierwotniaki	przypuszcza się, że hamują utlenianie w komórkach i indukują wypływ aminokwasów
Związki halogenowe: • związki chloru • związki jodu	podchloryn Na, podchloryn Ca, chloramina jodyna, jodofory	dezynfekcja antyseptyka	szerokie działanie (wegetatywne formy bakterii, przetrwalniki, grzyby, wirusy, prątki)	<ul style="list-style-type: none"> • powstawanie chlorowanych pochodnych nukleotydów, zakłóca oksydacyjną fosforylację, hamuje wzrost komórki; • jod atakuje: grupy SH sulfhydrylowe aminokwasów siarkowych, kwasy tłuszczowe albo nukleotydy, powodując śmierć komórki. W przypadku jodoforów wolny jod działa na białka cytoplazmatyczne komórki bakterii, w wyniku czego powstają sole powodujące wytrącenie się białek
Utleniacze	nadtlenek wodoru, ozon	dezynfekcja	szerokie działanie (wegetatywne formy bakterii, przetrwalniki, grzyby, wirusy, prątki)	często stosowany w stężeniach 3–90%, uwalnia on wolne grupy hydroksylowe, które atakują podstawowe składniki komórek, takie jak: białka, lipidy, DNA
IV-rzędowe związki amoniowe	chlerek (bromek) benzalkoniowy, chlerek (bromek) benzetoniowy, bromek cetydylotrójmetyloamoniowy (cetrimid)	antyseptyka	szerokie działanie (wegetatywne formy bakterii, przetrwalniki, grzyby, wirusy z lipidową osłonką w tym HIV i HBV, prątki)	działanie jest statyczne, natomiast miejsce działania to błona cytoplazmatyczna bakterii, a w przypadku grzybów – błona plazmatyczna

one głównie bakteriostatycznie, natomiast w większych – bakteriobójczo (tab. 2) [18–25].

Coraz częstsze stosowanie chemioterapeutyków prowadzi, poprzez selekcję szczepów z plazmidami, do zwiększenia oporności na środki biobójcze. W przypadku bakterii Gram-dodatnich najbardziej poznana została oporność na środki dezynfekcyjne u gronkowców [26–28]. Substancje wysokocząsteczkowe dość łatwo przechodzą przez ścianę komórkową gronkowców – być może wynika to z wrażliwości tych drobnoustrojów na środki dezynfekcyjne, posiadające w swoim składzie chlorheksydynę lub 4-rzędowe związki amoniowe.

Obecność plazmidów w komórce zwiększa oporność na niektóre substancje stosowane w dezynfekcji lub jako antyseptyki, takie jak np.: triclosan, diamidyny, bromek etydyne czy pochodne akrydynowe [29–31].

U gronkowców określanych mianem MRSA, czyli metycylinoopornych obserwujemy podwyższony poziom oporności na środki dezynfekcyjne oraz antyseptyki. Jest on bardzo częstym zjawiskiem, związanym z występowaniem na plazmidach dwóch rodzin genów: *gacAB* oraz *gacCD* – tak jest w przypadku oporności na 4-rzędowe środki amoniowe. Zjawisko to jest zwane wieloopornością. Wykazano w licznych badaniach – biorąc pod uwagę 4-rzędowe związki amoniowe i chlorheksydynę – szczepy MRSA są kilka razy bardziej odporne w stosunku do szczepów MSSA [4, 32].

Innym mechanizmem oporności na środki przeciwdrobnoustrojowe jest pompa błonowa – kodowany plazmidowo układ enzymatyczny usuwający substancje toksyczne z komórki w sposób czynny (*efflux mechanism*). Taka pompa występuje u bakterii Gram-dodatnich (w tym gronkowców) oraz bakterii Gram-ujemnych. Jest to mechanizm oporności na metale, kationowe środki dezynfekcyjne, antyseptyki (np. diamidyny, bromek etydyne, akrydyny, 4-rzędowe związki amoniowe, chlorheksydyna) czy antybiotyki takie, jak: tetracykliny, fluorochinolony, erytromycyna [13, 17, 23, 26, 33–38].

Należy również zaznaczyć, że konieczna jest okresowa kontrola skuteczności stosowanych środków dezynfekcyjnych i antyseptycznych w stosunku do drobnoustrojów występujących w danym środowisku, ponieważ szczepy MRSA wykazują zmniejszoną wrażliwość na niektóre preparaty [7, 34, 39–41].

CEL PRACY

Celem pracy była ocena skuteczności wybranych środków dezynfekcyjnych w zależności od ich

stężenia i czasu działania na zahamowanie wzrostu szczepów *Staphylococcus aureus*. Wybranymi środkami dezynfekcyjnymi były woda utleniona, etanol i jodofor w określonych stężeniach.

MATERIAŁ I METODY

Badania przeprowadzono na 55 szczepach *Staphylococcus aureus* wyizolowanych z materiałów klinicznych (ropa, krew, wymazy z nosa, gardła, ze skóry itp.) pobranych od pacjentów szpitalnych i ambulatoryjnych.

Hodowla i identyfikacja izolatów

Pobrane materiały kliniczne opracowywano według schematu:

1. Posiew próbek metodą izolacji na podłoże Mannitol Salt Agar (bioMerieux) – umożliwiające wybiórczy wzrost gronkowcom oraz różnicowanie ich na mannitolo-dodatnie i mannitolo-ujemne.
2. Oznaczanie *clumping factor* (koagulazy związanej) dla szczepów mannitolo-dodatnich wg rutynowo stosowanej metody na szkiełku podstawowym z osoczem króliczym (Biomed).
3. Identyfikacja biochemiczna bakterii przy użyciu testów API ID 32 STAPH (bioMerieux) zgodnie z instrukcją producenta.

Wykrywanie mechanizmów oporności

Staphylococcus aureus

1. Oznaczanie wytwarzania penicyliny z krążkiem z nitrocefiną – Cefinase test (bioMerieux) – zgodnie z instrukcją producenta.
2. Oznaczanie wrażliwości na metycylinę metodą dyfuzyjno-krążkową na podłożu Mueller Hinton 2 Agar (bioMerieux). Z 18–24-godzinnej hodowli izolatów wykonywano zawiesinę w jałowej soli fizjologicznej o inokulum 0,5 McFarlanda. Stosowano krążek z Oksacyliną 1 µg (bioMerieux). Antybiogram inkubowano 24 godziny w temperaturze 35°C. Odczyt przeprowadzano w świetle przechodzącym, zwracano uwagę na obecność mikrokolonii w strefie zahamowania wzrostu. Uzyskane strefy zahamowania wzrostu interpretowano wg następujących kryteriów: MRSA – strefa ≤ 10 mm; MSSA – strefa ≥ 13 mm.
3. Oznaczanie wrażliwości na wankomycynę metodą dyfuzyjno-krążkową na podłożu Mueller Hinton 2 Agar (bioMerieux). Postępowano jak w pkt. 2. Stosowano krążek z Wankomycyną 30 µg (bioMerieux). W przypadku szczepów wrażliwych VSSA – strefa zahamowania wzrostu ≥ 14 mm.

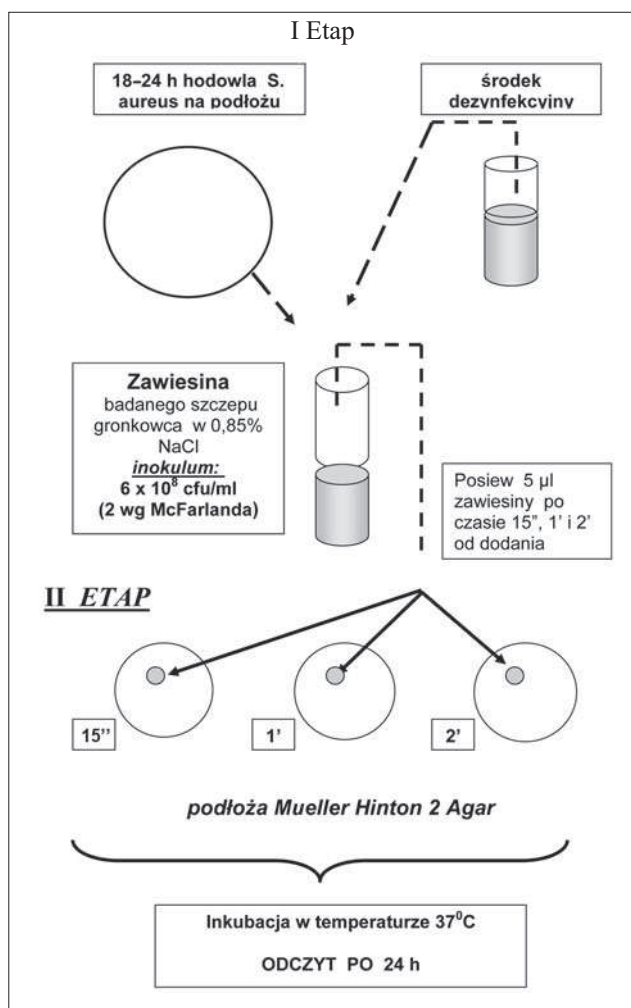
Określenie wrażliwości szczepów *Staphylococcus aureus* na środki dezynfekcyjne

Do badań wrażliwości na środki dezynfekcyjne użyto następujących związków chemicznych:

1. woda utleniona w stężeniu 1%, 2%, 3%,
2. etanol w stężeniu 20%, 30%, 40%, 50%, 60% i 70%,
3. jodofor w stężeniu 0,25%, 0,5%, 1%, 10%.

W badaniach uwzględniono również czas działania ww preparatów na drobnoustroje. Działanie biobójcze określono po czasie 15 sekund, 1 oraz 2 minut.

Schemat oznaczania wrażliwość wyizolowanych szczepów *Staphylococcus aureus* na środki dezynfekcyjne przedstawiono na rysunku 1. Stosowano go dla każdego badanego izolatu gronkowca oraz wszystkich stężeń wybranych związków chemicznych. Dla każdej serii badań nastawiano kontrolę – poszczególne zawiesiny izolatów (bez preparatów biobójczych) w ilości 5 μ l nanoszono punktowo na powierzchnię podłoża Mueller Hinton 2 Agar (bioMerieux). Kontrolę inkubowano w temperaturze 37°C i odczytywano po 24 godzinach razem z badaniami.

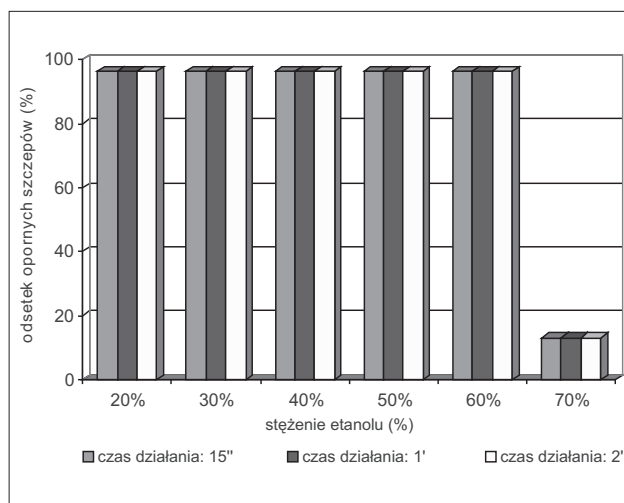


Rys. 1. Schemat oznaczania wrażliwość szczepów *Staphylococcus aureus* na środki dezynfekcyjne

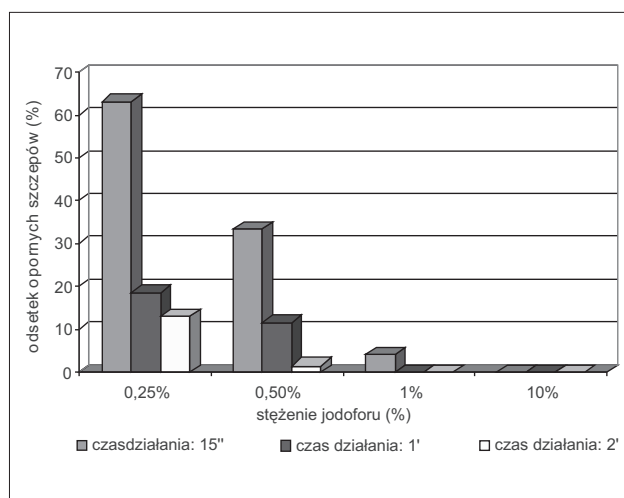
WYNIKI

Na rysunkach 2–4 przedstawiono wyniki badania wrażliwości 55 szczepów *Staphylococcus aureus* na środki dezynfekcyjne.

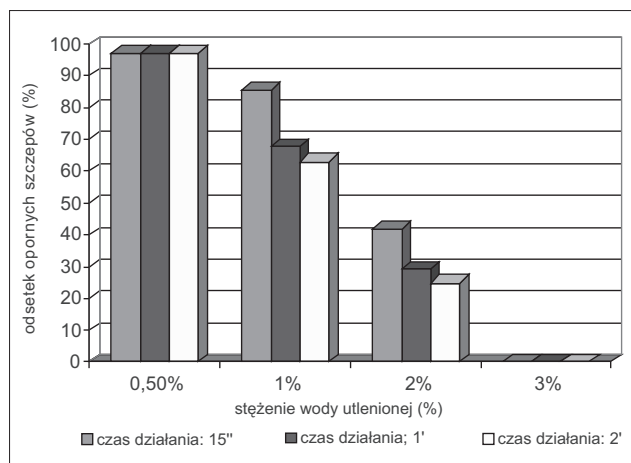
Stwierdzono, że etanol w stężeniu do 60% nie wykazywał działania bakteriobójczego, działając w czasie 15 sekund, 1 i 2 minut, natomiast 70% alkohol zahamował wzrost 47 (85,5%) izolatów w ciągu 1 minuty (rys. 2). Oceniając zaś intensywność wzrostu badanych szczepów po działaniu różnych stężeń etanolu w ciągu 1 minuty, stwierdzono, że wraz ze wzrostem stężenia alkoholu następowało stopniowe zahamowanie wzrostu bakterii (tab. 2). Działając 1 minutę 20% etanolem uzyskano obfity wzrost (+++) wszystkich 55 (100%) szczepów gronkowców, natomiast w przypadku 70% etanolu obfity wzrost (+++) wykazywał tylko 1 (1,8%) izolat, a słaby wzrost (+) – 7 (12,7%) izolatów.



Rys. 2. Wpływ stężenia i czasu działania etanolu na wzrost izolatów *S. aureus*



Rys. 3. Wpływ stężenia i czasu działania jodoforu na wzrost izolatów *S. aureus*



Rys. 4. Wpływ stężenia i czasu działania wody utlenionej na wzrost izolatów S. aureus

Badając wpływ stężenia i czasu działania jodoforu na wzrost gronkowców stwierdzono, że już w niskich stężeniach powodował redukcję wzrostu bakterii – po 1 minucie działania 0,25% jodoforu intensywnie (+++) rosło tylko 11 (20%) szczepów (rys. 3, tab. 3). Zalecane w antyseptyce 1% stężenie jodoforu po

1 minucie działania zahamowało wzrost 55 (100%) szczepów *Staphylococcus aureus*.

Również woda utleniona w zakresie stężeń od 1% do 3% powodowała stopniowe obniżenie liczby komórek bakterii w zawieszynie (rys. 4, tab. 4). Na jednonumutowe działanie 1% H_2O_2 opornych było 38 (69,1%) szczepów w tym 12 (21,8%) rosło obficie (+++), a 9 (16,4%) – słabo (+). Natomiast po 1 minucie działania 2% H_2O_2 uzyskano wzrost tylko 17 (30,9%) szczepów, wśród których tylko 1 (1,8%) rósł intensywnie (+++). Całkowite zahamowanie wzrostu badanych 55 (100%) gronkowców uzyskano po zastosowaniu 3% H_2O_2 w ciągu 15 sekund.

Wśród gronkowców izolaty 3-laktamazododatnie stanowiły 92,7%, a tylko w przypadku 8 (14,5%) szczepów stwierdzono metycylinooporność. Wszystkie badane drobnoustroje były wrażliwe na wankomycynę (tab. 5).

W tabeli 6 porównano wrażliwość 8 izolatów MRSA na badane środki dezynfekcyjne. Stwierdzono, że wszystkie były odporne na 70% etanol, natomiast w 100% wrażliwe na 1% jodofor i 3% H_2O_2 .

Tabela 2. Ocena intensywności wzrostu izolatów S. aureus po działaniu w różnych stężeniach etanolu w ciągu 1 minuty

Stężenie procentowe etanolu	Wzrost bakterii po 1 min działania etanolu				Liczba izolatów ogółem
	Obfity (+++)	Średni (++)	Słaby (+)	Brak wzrostu (-)	
20%	55 (100%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	55 (100%)
30%	51 (92,7%)	3 (5,5%)	1 (1,8%)	0 (0%)	55 (100%)
40%	40 (72,7%)	14 (25,5%)	1 (1,8%)	0 (0%)	55 (100%)
50%	35 (63,6%)	19 (34,6%)	1 (1,8%)	0 (0%)	55 (100%)
60%	31 (56,3%)	20 (36,4%)	4 (7,3%)	0 (0%)	55 (100%)
70%	1 (1,8%)	0 (0%)	7 (12,7%)	47 (85,5%)	55 (100%)

Tabela 3. Ocena intensywności wzrostu izolatów S. aureus po działaniu w różnych stężeniach jodoforu w ciągu 1 minuty

Stężenie procentowe jodoforu	Wzrost bakterii po 1 min działania jodoforu				Liczba izolatów ogółem
	Obfity (+++)	Średni (++)	Słaby	Brak wzrostu (-)	
0,25%	5 (9,1%)	6 (10,9%)	0 (0%)	44 (0%)	55 (100%)
0,5%	0 (0%)	5 (9,1%)	2 (3,6%)	48 (87,3%)	55 (100%)
1%	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	55 (100%)	55 (100%)
10%	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	55 (100%)	55 (100%)

Tabela 4. Ocena intensywności wzrostu izolatów S. aureus po działaniu w różnych stężeniach wody utlenionej w ciągu 1 minuty

Stężenie procentowe H_2O_2	Wzrost bakterii po 1 min działania H_2O_2				Liczba izolatów ogółem
	Obfity (+++)	Średni (++)	Słaby (+)	Brak wzrostu (-)	
0,5%	50 (90,9%)	5 (9,1%)	0 (0%)	0 (0%)	55 (100%)
1%	12 (21,8%)	17 (30,9%)	9 (16,4%)	17 (30,9%)	55 (100%)
2%	1 (1,8%)	10 (18,2%)	6 (10,9%)	38 (69,1%)	55 (100%)
3%	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	55 (100%)	55 (100%)

Tabela 5. Oznaczone mechanizmy oporności na antybiotyki wśród badanych szczepów *S. aureus*

Mechanizmy oporności	Liczba szczepów	Odsetek
P-laktamaza dodatnia (+)	51	92,7%
P-laktamaza ujemna (-)	4	7,3%
Wrażliwość na metycylinę (MSSA)	47	85,5%
Oporność na metycylinę (MRSA)	8	14,5%
Wrażliwość na vankomycynę (VSSA)	55	100,0%

Tabela 6. Wrażliwość izolatów MRSA na badane środki bakteriobójcze

Numer badanego szczepu	Wrażliwość na:				Wytwarzanie 3-laktamazy
	70% etanol po 1'	1% jodofor po 1'	3% H ₂ O ₂ po 1'	Metycylinę	
6	R	S	S	R	(+)
9	R	S	S	R	(+)
11	R	S	S	R	(+)
12	R	S	S	R	(+)
20	R	S	S	R	(+)
32	R	S	S	R	(+)
37	R	S	S	R	(+)
40	R	S	S	R	(+)

Objaśnienia:

R – szczep odporny, S – szczep wrażliwy, (+) – reakcja dodatnia

DYSKUSJA

Staphylococcus aureus jest bardzo poważnym chorobotwórczym gatunkiem wśród gronkowców. Oporność gronkowca złocistego na antybiotyki i środki dezynfekcyjne jest dużym problemem klinicznym, stanowiącym przyczynę zakażeń szpitalnych o ciężkim przebiegu, prowadzących do śmierci. Zakażenia szpitalne znacznie zwiększają koszty leczenia chorego, gdyż wiążą się z kosztowną antybiotykoterapią, niekiedy żywieniem pozajelitowym i długotrwałą rehabilitacją.

Postępowanie dezynfekcyjne, antyseptyczne i sterylizacja, stanowiąc możliwość przerywania dróg przenoszenia bakterii, zmierzają do znacznego zmniejszenia zakażeń szpitalnych.

W dostępnym polskim piśmiennictwie [3, 18–20, 23, 27, 36, 42–48] można znaleźć doniesienia dotyczące wrażliwości gronkowców złocistych na środki dezynfekcyjne. W takich pracach określana jest skuteczność środków dezynfekcyjnych. Wiadomo, że oporność na środki dezynfekcyjne dotyczy zwłaszcza szczepów wieloopornych *Staphylococcus aureus* i *Staphylococcus epidermidis*. Stefańska i wsp. [47] podkreślają, że dla szczepów klinicznych, szczególnie MRSA, wartości MIC chlorheksydyny i czwartorzędowych soli

amoniowych, tj. cetrymidu, chlorku benzalkoniowego i chlorku benzetonowego, są znacznie wyższe niż dla szczepów pozaszpitalnych. Na mechanizm działania środków dezynfekcyjnych i ich skuteczność ma wpływ wiele cech bakterii, w tym zdolność do niespecyficznego przywierania chorobotwórczych bakterii do powierzchni stałych. Zdolność ta może decydować o rozprzestrzenianiu się chorób zakaźnych, zwłaszcza w szpitalu. Właściwości takie mają ważny wpływ na kolonizację skóry lub błony śluzowej, a także na stopień inwazyjności szczepu [49]. Badane szczepy gronkowców charakteryzują się zróżnicowanym stopniem powierzchniowej hydrofobowości, co decyduje o ich zdolnościach do adhezji [49].

Z punktu widzenia przydatności środków dezynfekcyjnych w praktyce medycznej ocena ich skuteczności w hamowaniu wzrostu bakterii jest bardzo ważnym zagadnieniem. W przedstawionej pracy analizowano skuteczność trzech środków dezynfekcyjnych, w różnych stężeniach i o różnym czasie działania. Do badań wybrane zostały woda utleniona w stężeniu 0,5%, 1%, 2% i 3%, jodofor w stężeniu 0,25%, 0,5%, 1% i 10% oraz etanol w stężeniu 20%, 30%, 40%, 50%, 60% i 70%.

W badaniach wykazano, że dopiero stężenie 3% wody utlenionej powoduje zahamowanie wzrostu izo-

latów *Staphylococcus aureus* w czasie 15 sekund, 1 i 2 minut. Natomiast niewielki wpływ na zahamowanie wzrostu ma 0,5%, 1%, 2% stężenie wody utlenionej, w różnym czasie, a więc 15 sekund, 1 i 2 minut. Należy jednak podkreślić, że już 1% woda utleniona powodowała ograniczenia wzrostu szczepów *Staphylococcus aureus*.

Wpływ alkoholu na zahamowanie wzrostu szczepów *Staphylococcus aureus* można przedstawić następująco. Przy zastosowaniu 70% stężenia etanolu, w czasie 15 sekund, 1 i 2 minut dochodzi w jednakowym stopniu do zahamowania wzrostu izolatów o 85,5%. Na analizowanych 55 szczepów *Staphylococcus aureus* 8 szczepów (14,5%) było opornych. Etanol w stężeniu od 10–60% nie hamował wzrostu bakterii.

W praktyce, po umyciu chirurgicznym rąk, należy je wysuszyć i dopiero wówczas zastosować 70% alkohol, aby osiągnąć właściwy wynik w ciągu 2 minut. Stosowanie alkoholu 70% na mokre, niewysuszone ręce, powoduje obniżenie stężenia alkoholu i uniemożliwia osiągnięcie pożądanego zahamowania wzrostu *Staphylococcus aureus* i innych bakterii.

Inni autorzy [44] stwierdzili po zbadaniu aktywności bakteriobójczej antyseptyków stosowanych w higienicznej dezynfekcji rąk, 60% n-propanolu, mieszaniny 70% 2-propanolu z glukonianem chlorheksydyny oraz 30% wodą, że związki te posiadają wymaganą aktywność bójczą w stosunku do bakterii zgodnie z EN. Natomiast preparaty, których główną substancją czynną był etanol nie wykazują tolerancji na rozcieńczenie, a ich aktywność przeciwbakteryjna ulega znacznemu obniżeniu. Etanolowy preparat oraz preparat z chlorheksydyną po zastosowaniu zmniejszył liczbę badanych szczepów gronkowca złocistego, ale stopień redukcji był niski [44]. Własne badania potwierdzają również obserwacje innych autorów [44], że antyseptyki zawierające etanol jako substancję czynną w rozcieńczeniu niższym niż 70% mogą być nieskuteczne w warunkach prawidłowego praktycznego zastosowania. Metycylinooporne szczepy *Staphylococcus aureus* wykazują niższą wrażliwość na alkoholowe antyseptyki na bazie etanolu w porównaniu do antybiotykoopornych szczepów pałeczek Gram-ujemnych [42, 44].

Wyniki porównania preparatu z 60% propanolem oraz preparatu z 70% propanolem wykazują wyższą skuteczność 70% n-propanolu skojarzonego z chlorheksydyną i H_2O_2 . Zwiększona dawka (6 ml) oraz zwiększony czas działania (z 30 sekund do 1 minuty) pozwala na ujawnienie się aktywności pozostałych składników czynnych dodawanych do antyseptyków. W efekcie następuje zwiększony stopień redukcji badanych szczepów i zmniejszenie transmisji patogen-

nych drobnoustrojów ze skóry rąk personelu medycznego [44].

Antyseptyki zawierające w swoim składzie 1-propanol, 2-propanol oraz etanol w czasie 1 minuty wykazują aktywność bakteriobójczą w stosunku do opornych na antybiotyki gronkowców oraz pałeczek Gram-ujemnych. Jak już wspomniano, rozcieńczenie środka zawierającego etanol zmniejsza skuteczność, a nawet powoduje jej brak w odróżnieniu preparatów na bazie 1- i 2-propanolu.

Wiśniewska i wsp. [50] podają, że MSSA wrażliwe na gentamycynę charakteryzowały się najniższymi wartościami MIC. Wzrost 100% szczepów w badaniach tych autorów był hamowany przez 0,03 ul/ml Manusanu, 0,02 ui/l Sterinolu, 0,004 ul/ml Lysoforminu. Szczepy MRSA są bardziej wrażliwe na alkoholowe antyseptyki na bazie etanolu niż antybiotykooporne pałeczki Gram-ujemne [42].

MRSA są bardziej odporne na 4-rzędowe związki amoniowe oraz chlorheksydynę niż MSSA [47].

Wpływ stężenia i czasu działania jodoforu na wzrost izolatów *Staphylococcus aureus* przedstawia się następująco.

Całkowite zahamowanie wzrostu wszystkich szczepów bakterii uzyskano po zastosowaniu 1% i 10% jodoforu, w czasie 15 sekund, 1 i 2 minut. Natomiast stężenie 0,5% powoduje zahamowanie wzrostu w 87,3%, a 0,25% w 80% szczepów.

W przedstawionych badaniach własnych wszystkie szczepy MRSA były odporne na stosowanie 70% etanolu, natomiast wykazały wrażliwość na 1% jodofor i 3% H_2O_2 po 1 minucie. Wszystkie badane szczepy wytwarzały B-laktamazę.

Samet i wsp. [50] w badaniach antyseptyku o nazwie Betadine, gdzie substancją czynną jest poliwinylprolidon wykazali, że powodował on redukcję żywych drobnoustrojów w 99,99% już w czasie 1 minuty, co świadczy o jego skuteczności na szczepy charakteryzujące się wieloopornością, np. *Staphylococcus aureus*, obecne w środowisku szpitalnym, będące czynnikiem etiologicznym wielu zakażeń [50].

Po określeniu wartości MIC (minimalne stężenie hamujące) w badaniach środków dezynfekcyjnych jakimi były: Manusan (4% glukonian chlorheksydyny), Sterinol (10% bromek dwumetylo-laurylo-benzyloamoniowy), Septyl R (13% o-fenylofenol, 1% p-tert-amylofenol) oraz Lysoformin Special zawierający 9,8% chlorek dwumetyloamoniowy w określonych stężeniach okazało się, że szczepy MRSA potrzebują wyższych stężeń środków dezynfekcyjnych do zahamowania ich wzrostu w porównaniu ze szczepami MSSA [27].

Preparaty Manusan, Sterinol, Lysoformin spowodowały zahamowanie 85% szczepów MSSA i ana-

logicznie 33,3%, 30%, 30% MRSA; preparat Septyl R o stężeniu 0,6% spowodował zahamowanie tylko 6,7% szczepów MRSA.

Oporność na środki dezynfekcyjne, w przypadku szczepów MRSA jest bardzo często związana z opornością na antybiotyki betalaktamowe.

Oporne na gentamycynę szczepy MSSA charakteryzowały się zmniejszoną wrażliwością na badane środki. Szczepy MRSA wykazały zmniejszoną wrażliwość na Manusan, Sterinol, Septyl R, Lysoformin Special [27].

W grupie MRSA zwiększona tolerancja na środki dezynfekcyjne pozostaje bez związku z opornością na gentamycynę.

W ostatnich dziesięciu latach szereg doniesień z piśmiennictwa opartego na analizach zakażeń szpitalnych i skuteczności środków dezynfekcyjnych oraz wrażliwości na antybiotyki wskazuje na szybko narastającą oporność drobnoustrojów, w tym gronkowców złocistych, na środki dezynfekcyjne i antybiotyki. Oporność na środki dezynfekcyjne i antybiotyki jest już bardzo dużym problemem, a w przyszłości stanowić może częstsze zagrożenie dla życia chorych. Szczepy kliniczne są bardziej odporne na IV rzędowe amoniowe związki i chlorheksydynę. Wykryte u gronkowców białka qacA i qacB, działające na zasadzie pompy błonowej usuwającej środki dezynfekcyjne z wnętrza komórki są również odpowiedzialne za rozwój oporności na środki dezynfekcyjne [42, 51, 52].

Wyniki własnych badań wskazują jednoznacznie, że dopiero odpowiednie stężenia środków dezynfekcyjnych i odpowiedni czas działania powoduje w znaczącym stopniu zahamowanie wzrostu szczepów gronkowca złocistego. Badania własne potwierdzają również doniesienia innych autorów, że alkohol etylowy w stężeniu 70% nie powoduje zahamowania (zniszczenia) wszystkich szczepów bakteryjnych.

WNIOSKI

1. Stosowanie środków dezynfekcyjnych ogranicza liczbę drobnoustrojów, a co za tym idzie zakażenia i związaną z tym chorobotwórczość.
2. Antyseptyki i preparaty dezynfekcyjne muszą być stosowane zgodnie z zaleceniami producenta, aby osiągnęły skuteczność wg EN.
3. Szczepy MRSA są szczepami o obniżonej wrażliwości na antybiotyki i środki dezynfekcyjne, dlatego w celu zapobiegania ich rozprzestrzenianiu należy używać preparatów biobójczych odpowiedniego rodzaju i w większym stężeniu.

PIŚMIENNICTWO

- [1] Anusz Z. Mikrobiologia i parazytologia lekarska. Wydawnictwo Lekarskie PZWL, Warszawa 1999; 289–294.
- [2] Gago J, Noworyta J, Ząbek J. Niezbędna wiedza na temat oporności drobnoustrojów na chemioterapeutyki. Reumatologia 2004; 42: 64–76.
- [3] Krymska B. Gronkowiec złocisty metycylinooporny – jego znaczenie w środowisku szpitalnym. Antidotum 2001; 8: 49–53.
- [4] Pawińska A, Dzierżanowska D. Epidemiologia zakażeń szpitalnych MRSA. Klinika Chorób Zakaźnych i Zakażenia Szpitalne 1998; 2: 29–33.
- [5] Salyers A, Whitt D. Mikrobiologia Różnorodność, chorobotwórczość i środowisko. Wydawnictwo Naukowe PWN. Warszawa 2003.
- [6] Zaremba M, Borowski J. Podstawy mikrobiologii lekarskiej. Wydawnictwo Lekarskie PZWL. Warszawa 1994; 246–250.
- [7] Bartoszewicz-Potyrała M, Przondo-Modarska A. Cechy gronkowców koagulazoujemnych warunkujące ich chorobotwórczość. Postępy Mikrobiologii 2002; 41: 351–366.
- [8] Bulanda M. Komentarz do artykułu: Przeciwdziałanie szerzeniu się metycylinoopornych szczepów *S. aureus* Medycyna po Dyplomie 2002; 11: 111–113.
- [9] Hugonnet S, Pittet D. Hand hygiene – beliefs or science. Clinical Microbiology and Infections 2000; 6: 350–356.
- [10] Kozielski J. Ciężkie zakażenia szpitalne wywołane bakteriami Gram-dodatnimi. Medipress Medical Update Supl 2004; 2: 5–11.
- [11] Rybicki Z. Zakażenia szpitalne – wyzwanie dla współczesnej medycyny. Medipress Medical Update Supl 2004; 2: 3–4.
- [12] Dzierżanowska D. Komentarz do artykułu: Różne oblicza zakażenia gronkowcem złocistym. Medycyna po Dyplomie 2002; 2: 192–193.
- [13] Hart CA, Kariuki S. Antimicrobial resistance in developing countries. BMJ 1998; 317: 647–650.
- [14] Łopaciuk U, Dzierżanowska D. Gronkowce metycylinooporne: mechanizmy oporności, czynniki zjadliwości oraz metody genotypowania. Postępy Mikrobiologii 2002; 41: 401–418.
- [15] Łopaciuk U, Semczuk K, Dzierżanowska D. Mikrobiologia zakażeń szpitalnych. Zakażenia 2002; 1–2: 98–103.
- [16] Morita MM. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Past, present and future. Nurs Clin North Am 1993; 28: 625–637.
- [17] Mulligan M, Murray-Leisure K, Ribner B et al. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: a consensus review of the microbiology, pathogenesis, and epidemiology with implications for prevention

- and management. *The American Journal of Medicine* 1993; 94: 313–328.
- [18] Bocian E, Tyski S. Zastosowanie alkoholi w antyseptyce. *Zakażenia* 2003; 3: 68–74.
- [19] Johnson AP, Livemore DM, Tillotson GS. Antimicrobial susceptibility of gram-positive bacteria: whats current, whats anticipated? *J Hosp Infect* 2001; 49: Supl. A: 3–11.
- [20] Parnowska W. Znaczenie stosowania i badań skuteczności środków dezynfekcyjnych w profilaktyce zakażeń szpitalnych. *Postępy Nauk Medycznych* 2000; 13: 54–60.
- [21] Parnowska W. *Mikrobiologia farmaceutyczna*. Wydawnictwo Lekarskie PZWL, Warszawa 1998.
- [22] Simor AE. Przeciwdziałanie szerzeniu się metycyloopornych szczepów *S. aureus*. *Medycyna po Dyplomie* 2002; 11: 105–111.
- [23] Stefańska J. Substancje czynne środków dezynfekcyjnych – mechanizmy działania oporność drobnoustrojów. *Mikrobiologia Medycyna* 2000; 1(22): 17–24.
- [24] Strzelczyk A, Jaworska-Łuczak B. Wprowadzenie do obrotu środków do dezynfekcji i sterylizatorów w świetle przepisów ustawy o wyrobach medycznych. *Zakażenia* 2004; 4: 26–33: 231–235.
- [25] Śledzińska A i wsp. Szpitalne szczepy endemiczne i ich wrażliwość na preparaty antyseptyczne. *Przegląd Epidemiologiczny* 2000; 54: 161–168.
- [26] Wilk I, Ekiel A, Martirosian G. Gronkowce – nowe właściwości starych patogenów. *Nowa Klinika* 2004; 11: 718–723.
- [27] Wiśniewska K, Galiński J, Piechowicz L. Wrażliwość na środki dezynfekcyjne metycyloopornych gronkowców złocistych (MRSA) i szczepów opornych na gentamycynę. *Medycyna Doświadczalna Mikrobiologiczna* 1997; 49: 145–151.
- [28] Yamamoto T, Tamura Y, Yokota T. Antiseptic and antibiotic resistance plasmid in *Staphylococcus aureus* that possesses ability to confer chlorhexidine and acrinol resistance. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 1988; 32: 932–935.
- [29] Rashmi S, Chaman Lal S, Bhuvneshwar K. Antibacterial resistance: Current problems and possible solutions. *Indian Journal of Medical Sciences* 2005; 59: 120–129.
- [30] Rotter ML, Simpson RA, Koller W. Surgical hand disinfection with alcohols at various concentrations: parallel experiments using the new proposed European standards method. *Infect Control Hospital Epidemiology* 1998; 19: 778.
- [31] Schlegel H. *Mikrobiologia ogólna*. Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 1996; 123: 73–75.
- [32] Pawińska A, Dzierżanowska D. Zapobieganie szpitalnym zakażeniom o etiologii MRSA. *Standardy Medyczne Lekarza Pediatri* 2000; 2: 25–27.
- [33] Jy A, Ezike E, Asmar BI. Antibacterial resistance. *The Indian Journal of Pediatrics* 2004; 71: 229–239.
- [34] Kotilainen P, Routamaa M i wsp. Elimination of epidemic methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* from a University Hospital and District Institutions, Finland. *Emerging Infectious Diseases* 2003; 9: 169–175.
- [35] McDonell G, Russell A. Antiseptics and disinfectants: activity, action, and resistance. *Clinical Microbiology Reviews* 1999; 12: 147–179.
- [36] Stefańska J, Starościak B. Oporność gronkowców złocistych związana z aktywnym usuwaniem substancji przeciwdrobnoustrojowych z komórek. *Mikrobiologia Medycyna* 2003; 1: 16–18.
- [37] Tadeusiak B. Normy europejskie dotyczące antyseptyków – stan obecny i przyszły. *Zakażenia* 2003; 3: 75–80.
- [38] Virella G. *Mikrobiologia i choroby zakaźne*. Wydawnictwo Medyczne. Wrocław 2000; 113–117.
- [39] Basta M, Heczko P. Proces rejestracji wyrobów medycznych w tym preparatów biobójczych w kontekście wejścia Polski do Unii Europejskiej. *Zakażenia* 2004; 1: 66–72.
- [40] Chi Ch, Wong W, Fung Ch, Yu K, Liu Ch. Epidemiology of community – acquired *Staphylococcus aureus* bacteremia. *Microbiology Immunology Infections* 2004; 37: 16–23.
- [41] Leszczyńska K, Jakoniuk P. Dezynfekcja szpitalna – praktyczna efektywność alkoholi. *Zakażenia* 2004; 6: 72–73.
- [42] Andraszyk J, Borowiec K. Aktywność alkoholowych antyseptyków skóry rąk wobec opornych na antybiotyki gronkowców i pałeczek Gram-ujemnych. *Nowiny Lekarskie* 2001; 70 (2): 145–152.
- [43] Giedrys-Kalemba S. Ciężkie zakażenia Gram (+). *Zakażenia* 2004; 3: 20–24.
- [44] Matuska K, Moulis M. Skuteczność alkoholowych preparatów do higienicznej dezynfekcji rąk w zapobieganiu zakażeniom szpitalnym. *Nowiny Lekarskie* 2000; 69: 270–276.
- [45] Różalska B, Burow A, Pachelska M i wsp. Udział gronkowców koagulazoujemnych (CNS) w zakażeniach. *Postępy Mikrobiologii* 1995; 37: 453–456.
- [46] Samet A, Padzik O, Śledzińska A i wsp. Występowanie metycyloopornych szczepów *Staphylococcus aureus* (MRSA) w posiewach krwi pacjentów PSK 1 w Gdańsku w latach 1996–1998. *Klinika Chorób Zakaźnych i Zakażenia Szpitalne* 1999; 3: 29–33.
- [47] Stefańska J i wsp. Oporność szczepów *Staphylococcus aureus* na czwartorzędowe sole amoniowe i chlorheksydyne. *Medycyna Doświadczalna Mikrobiologiczna* 2002; 54: 191–197.
- [48] Szkaradkiewicz A i wsp. Lekowrażliwość szczepów klinicznych *S. aureus* i ich zdolność do wytwarzania śluzu. *Klinika Chorób Zakaźnych i Zakażenia Szpitalne* 1999.

- [49] Dziejdzina D, Kołodyński J, Jankowski S. Nie-specyficzna przyczepność komórek *Staphylococcus aureus* do powierzchni stałych. *Medycyna Doświadczalna Mikrobiologiczna* 2000; 52: 1–7.
- [50] Samet A, Bronk M, Kur J. Działanie preparatu antyseptycznego Betadine (EGIS Pharmaceutical L.t.d) na wielooporne szpitalne szczepy bakterii. *Blok Operacyjny* 2002; 5: 16–20.
- [51] Dzierżanowska D, Jeljaszewicz J. Zakażenia szpitalne. Alfa-Medica Press, Bielsko-Biała 1999.
- [52] Tadeusiak B, Krzywicka H. Wrażliwość wybranych drobnoustrojów na środki dezynfekcyjne w zależności od wieku hodowli. *Roczniki PZH* 1994; 3: 232–235.

Adres do korespondencji:

mgr Katarzyna Głuszek
Kielce, ul. Świętokrzyska 20
e-mail: kasia.kielce@wp.pl
tel. 41 349 69 64