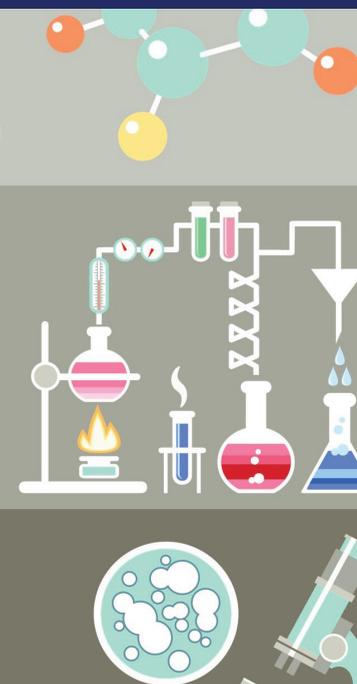


С конца 60-х годов XX века отмечается рост клинической значимости коагулазоотрицательных стафилококков, а в последние годы все чаще появляются данные об этиологической роли этих микроорганизмов в развитии гнойно-септических инфекций новорожденных. Несмотря на увеличивающееся число сообщений об их роли в патологии человека, эта группа стафилококков остается недостаточно изученной. В работе приводятся данные по встречаемости коагулазоотрицательных стафилококков у новорожденных и пациентов детских стационаров в различных городах России. Приводятся данные по чувствительности этой группы микроорганизмов к антибиотикам, бактериофагам, дезинфицирующим средствам. Рассматривается проблема образования биопленок у коагулазоотрицательных стафилококков, приводятся данные по изучению таких их факторов патогенности как гемолитическая и протеолитическая активность. Литературные данные дополняются собственными исследованиями коллектива авторов. Монография предназначена для специалистов медицинских и научных организаций.

MOLECULE

CHEMICAL EXPERIMENTS

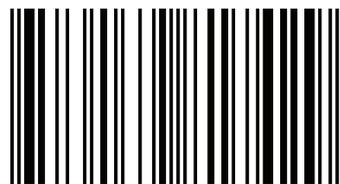


Кряжев Дмитрий Валерьевич родился в 1978 году в Нижнем Новгороде. В 2001 году окончил биологический факультет Нижегородского государственного университета. В 2015г. получил степень доктора биологических наук. С 2016 года работает в Нижегородском НИИ эпидемиологии и микробиологии в лаборатории микробиологии (Отдел микробиологии и эндоэкологии)

Дмитрий Кряжев
Елена Беляева
Галия Ермолина

Биологическая характеристика коагулазоотрицательных стафилококков

Эковары, циркулирующие в детском стационаре



978-613-9-81742-9

LAP LAMBERT
Academic Publishing

**Дмитрий Кряжев
Елена Беяева
Галия Ермолина**

**Биологическая характеристика коагулазоотрицательных
стафилококков**

**Дмитрий Кряжев
Елена Беяева
Галия Ермолина**

**Биологическая характеристика
коагулазоотрицательных
стафилококков**

**Эковары, циркулирующие в детском
стационаре**

LAP LAMBERT Academic Publishing RU

Imprint

Any brand names and product names mentioned in this book are subject to trademark, brand or patent protection and are trademarks or registered trademarks of their respective holders. The use of brand names, product names, common names, trade names, product descriptions etc. even without a particular marking in this work is in no way to be construed to mean that such names may be regarded as unrestricted in respect of trademark and brand protection legislation and could thus be used by anyone.

Cover image: www.ingimage.com

Publisher:

LAP LAMBERT Academic Publishing

is a trademark of

International Book Market Service Ltd., member of OmniScriptum Publishing Group

17 Meldrum Street, Beau Bassin 71504, Mauritius

Printed at: see last page

ISBN: 978-613-9-81742-9

Copyright © Дмитрий Кряжев, Елена Беляева, Галия Ермолина

Copyright © 2018 International Book Market Service Ltd., member of
OmniScriptum Publishing Group

All rights reserved. Beau Bassin 2018

Кряжев Д.В., Беляева Е.В., Ермолина Г.Б.

**БИОЛОГИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ЭКОВАРОВ
КОАГУЛАЗОТРИЦАТЕЛЬНЫХ СТАФИЛОКОККОВ,
ЦИРКУЛИРУЮЩИХ В ДЕТСКОМ СТАЦИОНАРЕ**

монография

Содержание

	Стр.
Список сокращений	3
Введение	4
1. Общая характеристика коагулазоотрицательных стафилококков и особенности вызванных ими инфекций	5
2. Встречаемость КОС у новорожденных в различных стационарах	10
3. Антибиотикорезистентность коагулазоотрицательных стафилококков	16
3.1 Распространение резистентности КОС в различных стационарах	16
3.2 Некоторые аспекты формирования антибиотикорезистентности у КОС	21
4. Исследование чувствительности стафилококков к различным препаратам бактериофагов	33
5. Способность стафилококков к образованию биопленок	39
6. Устойчивость стафилококков к дезинфицирующим средствам	45
7. Исследование некоторых факторов патогенности КОС	51
Заключение	55
Литература	58

Список сокращений

ИСМП – инфекции, связанные с оказанием медицинской помощи

ГСИ – гнойно-септические инфекции

KOC – коагулазоотрицательные стафилококки

MRS – метициллин-резистентные стафилококки

MRSA – метициллин-резистентные *S.aureus*

MRSE – метициллин-резистентные *S.epidermidis*

MSSA – метициллин-чувствительные *S.aureus*

MRCNS – метициллин-резистентные коагулазонегативные стафилококки

MSCNS - метициллин-чувствительные коагулазонегативные стафилококки

Van – ванкомицин

Введение

Формирование микрофлоры человека начинается с первых минут жизни. Этот процесс является многофакторным и во многом зависит от среды обитания.

Среди разнообразного видового состава микроорганизмов, колонизирующих различные локусы, значительное количество приходится на коагулазоотрицательные стафилококки, которые находятся на коже и слизистых, входят в состав микробных ассоциаций. Являясь нормальными симбионтами, при определенных условиях они могут выступать в роли оппортунистических патогенов (Тетелютина, 2010; Патяшина и др., 2015; Беляева и др., 2016).

Стафилококковые инфекции являются актуальной проблемой практического здравоохранения из-за их широкой распространенности, вреда для здоровья, и значительного социально-экономического ущерба. Значимость стафилококковых инфекций определяется высокой частотой заболеваемости, распространенностью, нозологическим и клиническим разнообразием форм инфекции (Покровский и др., 2012). В особом положении находятся новорожденные дети, госпитализированные в стационар, так как при этом они из госпитальной среды родильного дома попадают в госпитальную среду больницы. В этом случае формирование микробиоценоза неизбежно происходит с участием госпитальной микрофлоры, которая, как известно, отличается особой агрессивностью и резистентностью к лечебным и дезинфицирующим средствам (Митрофанова и др., 2009; Сергевнин и др., 2014). Стафилококки являются доминирующей микрофлорой в детских стационарах, что требует не только постоянного эпидемиологического мониторинга за их циркуляцией, но и определения устойчивости к антимикробным препаратам и бактериофагам (Гриценко и др., 2014; Авчинников, Егоричева, 2015). Учитывая особенности защитных механизмов детей периода новорожденности, а особенно недоношенных, представляется важным оценить потенциальную угрозу со стороны коагулазоотрицательных стафилококков госпитального происхождения, определив некоторые биологические характеристики этих бактерий.

1. Общая характеристика коагулазоотрицательных стафилококков и особенности вызванных ими инфекций

К концу 2011 г. род *Staphylococcus* насчитывал около 70 самостоятельных таксонов, включая 46 видов, в том числе 39 видов коагулазоотрицательных стафилококков (Лабинская, 2014).

Стафилококки были открыты Л. Пастером в 1880 г. В настоящее время род *Staphylococcus* включает следующие виды: *S.arlettae*, *S.aureus* (стафилококк золотистый), *S.auricularis*, *S.capitis*, *S.caprae*, *S.carnosus*, *S.caseolyticus*, *S.chromogenes*, *S.cohnii*, *S.condimenti*, *S.delphini*, *S.devriesei*, *S.epidermidis* (стафилококк эпидермальный), *S.equorum*, *S.felis*, *S.fleurettii*, *S.gallinarum*, *S.haemolyticus*, *S.hominis*, *S.hyicus*, *S.intermedius*, *S.kloosii*, *S.lentus*, *S.lugdunensis*, *S.lutrae*, *S.massiliensis*, *S.microti*, *S.muscae*, *S.nepalensis*, *S.pasteuri*, *S.pettenkoferi*, *S.piscifermentans*, *S.pseudintermedius*, *S.pulvereri*, *S.rostri*, *S.saccharolyticus*, *S.saprophyticus* (стафилококк сапрофитный), *S.schleiferi*, *S.sciuri*, *S.simiae*, *S.simulans*, *S.succinus*, *S.vitulinus*, *S.warneri*, *S.xylosus*.

Ряд видов рода стафилококков, исходя из общности физиологических признаков и генетического родства, объединены в 4 группы:

- группа *Staphylococcus epidermidis*: *S.epidermidis*, *S.capitis*, *S.warneri*, *S.haemolyticus*, *S.hominis* и *S.saccharolyticus*
- группа *Staphylococcus saprophyticus*: *S.saprophyticus*, *S.cohnii* и *S.xylosis*
- группа *Staphylococcus simulans*: *S.simulans* и *S.carnosus*
- группа *Staphylococcus sciuri*: *S.sciuri* и *S.lentus*

В зависимости от способности продуцировать коагулазу, экстрацеллюлярный фермент, вызывающий свертывание плазмы крови, стафилококки подразделяются на коагулазоположительные (коагулазопозитивные) и коагулазоотрицательные (коагулазонегативные).

Коагулазоположительными являются 7 видов стафилококков: *S.aureus*, *S.delphini*, *S.hyicus*, *S.intermedius*, *S.lutrae*, *S.pseudintermedius*, *S.schleiferi subsp.coagulans*. К коагулазоотрицательным относятся эпидермальный и сапрофитный стафилококки, а также *S.caprae*, *S.haemolyticus*, *S.hominis*, *S.lugdunensis*, *S.pettenkoferi*, *S.schleiferi*, *S.warneri*, *S.xylosus* и другие виды (Добровольский, Сереброва, 2007).

С конца 60-х годов XX века отмечается рост клинической значимости коагулазоотрицательных стафилококков, а в последние годы все чаще появляются данные об этиологической роли этих микроорганизмов в развитии ГСИ новорожденных. Несмотря на увеличивающееся число сообщений о роли КОС в патологии человека, эта группа стафилококков остается недостаточно изученной (Дерябин, 2000).

Одним из ключевых факторов патогенности стафилококков, имеющих таксономическую значимость, является способность коагулировать плазму крови, которая обусловлена продукцией внеклеточно секретируемого протеина с молекулярной массой около 44 кДа. Взаимодействуя с протромбином, плазмокоагулаза активирует процесс превращения фибриногена в фибрин. Образовавшийся сгусток защищает микробные клетки от действия бактерицидных факторов макроорганизма и обеспечивает благоприятную среду для их размножения. На основании этого критерия род делят на две большие группы: коагулазоположительные стафилококки, т. е. обладающие способностью свертывать плазму, и коагулазоотрицательные.

Место обитания стафилококков – человек и теплокровных животные, внешняя среда. Локализация у человека – кожа и слизистые оболочки, толстый кишечник. Источником стафилококковых инфекций является больной человек или здоровый носитель. Пути передачи: воздушно-капельный, воздушно-пылевой, контактный, пищевой (Trülzsch et al., 2007).

Коагулазоотрицательные стафилококки (КОС) входят в состав нормальной микрофлоры кожи. Наибольшее клиническое значение из

многочисленных представителей этой группы имеют *Staphylococcus haemolyticus*, *Staphylococcus saprophyticus* и в особенности *Staphylococcus epidermidis* (Sawant et al., 2009).

Восприимчивость к инфекции зависит от общего состояния организма и возраста. Наиболее восприимчивы дети, особенно новорожденные и грудного возраста. В норме способность стафилококка к инвазии и резистентность хозяина хорошо сбалансированы, поэтому инфекция не развивается, пока не создается ситуация, когда встречаются высоковирулентный микроорганизм или макроорганизм со сниженной резистентностью (Trülsch et al., 2007).

Несмотря на увеличивающееся число сообщений о роли КОС в патологии человека, эта группа стафилококков остается недостаточно изученной. Известно, что КОС не обладают большим набором факторов вирулентности. Однако благодаря широкому использованию разнообразных высокоинвазивных медицинских вмешательств происходит быстрая эволюция их свойств, в результате которой они получают все большее распространение. Большинство инфекций начинается с процесса адгезии и колонизации в зоне первичного инфицирования. Микробная адгезия вызывает изменения клеток за счет двух основных механизмов: медиаторных сигналов, запускаемых через клеточные рецепторы, захваченные бактериальными лигандами (адгезинами) и в результате воздействия бактериальных белков, инъецируемых внутрь клетки. Адгезии противостоит ряд защитных механизмов со стороны кожи и слизистых оболочек; нормальная микрофлора, играющая роль не только антагониста, но и конкурента за сайты адгезии (Маянский, 2006).

Все вышеперечисленное формирует колонизационную резистентность, т. е. способность противостоять адгезии и размножению микроорганизмов. Адгезия стафилококков на наружных покровах и во внутренней среде макроорганизма также определяется различными механизмами. Наиболее изучены эти свойства у *S. aureus*, в то время как данные об адгезивности КОС практически отсутствуют. Вопрос о том, могут ли эти свойства

рассматриваться как факторы патогенности стафилококков, остается спорным, однако очевидно, что без предварительного прикрепления патогена к клеткам восприимчивого организма инициация любого инфекционного процесса вряд ли была бы возможна (Благодарова и др., 2014).

Развитие стафилококковых инфекций в большинстве случаев связывается с предшествующим носительством стафилококков в различных экологических нишах. Факторами риска развития манифестных форм стафилококковой инфекции у носителей являются: иммунодефицитные состояния, нарушение целостности кожи и слизистых, инвазивные вмешательства и угнетение нормальной микрофлоры кожи и слизистых (Jarvis, 1996). Наиболее восприимчивы к стафилококковым инфекциям новорожденные и дети первых месяцев жизни. Носительство стафилококков имеет клиническое и эпидемиологическое значение. Установлено, что у новорожденных детей — носителей стафилококков, чаще развиваются манифестные формы стафилококковой инфекции.

Изучение различных факторов патогенности КОС представляет особый интерес, поскольку позволяет понять, каким образом реализуется потенциал этих микроорганизмов как возбудителей инфекций, почему одни и те же бактерии при разных условиях могут быть как безобидными обитателями организма человека, так и опасными агентами. К известным факторам патогенности стафилококков относятся такие структурные элементы клетки как микрокапсула, компоненты клеточной стенки, а также адгезивные способности, продукция ферментов агрессии и защиты (плазмокоагулаза, гиалуронидаза, лецитиназа, ДНК-аза, каталаза, протеаза, липаза, эстераза, нуклеаза, фермент FAME, β -лактамаза и др.) и токсинообразование (гемотоксин, энтеротоксин, лейкоцидин, эксфолиатины и др.) (Лабинская А.С. и др. 2005).

КОС могут являться этиологическими агентами заболеваний, которые делятся на:

- Бактериемии. Группу наибольшего риска развития бактериемии, обусловленной *S.epidermidis*, представляют новорожденные, особенно, в блоках интенсивной терапии, а также больные, лечение которых включает использование сосудистых катетеров и имплантацию протезных устройств.
- Эндокардиты. Коагулазоотрицательные стафилококки (преимущественно, *S.epidermidis*) являются основными возбудителями эндокардита, развивающегося после имплантации искусственного клапана сердца. Смертность достигает 43%-74%.
- Хирургические раневые инфекции. Коагулазоотрицательные стафилококки занимают второе место после *S. aureus* по частоте выделения из инфицированных хирургических ран (при этом чаще всех высевается *S.epidermidis*) (Emori, Gaynes, 2007).
- Послеоперационные инфекции глаз. Встречаются редко, однако являются серьезным осложнением хирургических вмешательств по поводу катаракты.

Источниками коагулазоотрицательных стафилококков в стационаре являются:

- Колонизированные больные
- Колонизированные медицинские работники
- Предметы больничной среды, особенно жидкости для парентерального введения и медицинские инструменты (крайне редко).

Патогенность стафилококков – результат скоординированной деятельности нескольких выделяемых ими токсинов и ферментов, а также большого количества белков на бактериальной поверхности, которые связывают внеклеточные матричные и плазменные белки организма человека. Обращает на себя внимание, что действие этих факторов является экологическим показателем, и для его проявления на макроуровне изолят с большой долей вероятности будет экспрессировать все факторы патогенности (Тюрин, Долбин, 2008).

Клеточная стенка стафилококков на 50% по весу состоит из пептидогликана. Ее компоненты не только принимают участие в адгезии и распространении микроорганизма по тканям, но и являются ответственными за такие клинические проявления, как анафилаксия, феномен Артюса, угнетение активности фагоцитов и др. Обычно адгезивный потенциал *S.epidermidis* обусловлен полисахаридными адгезинами, обеспечивающими прикрепление к эукариотическим клеткам (Шаркова и др., 2012).

2. Встречаемость КОС у новорожденных в различных стационарах

В работе, выполненной по материалам акушерского стационара и отделения патологии новорожденных за 2000-2005 гг. одного из городов Пермской области (Сергевнин, Редько, 2007) указывается, что среди 170 штаммов КОС, изолированных от больных с ГСИ, было идентифицировано 11 видов стафилококков (табл. 1).

Таблица 1

Видовая структура КОС, изолированных от новорожденных с ГСИ

Виды КОС	Всего штаммов		Выделенные			
			в микробных ассоциациях		в монокультуре	
	абс.	% от общего к-ва КОС	абс.	% от вида КОС	абс.	% от вида КОС
<i>S.epidermidis</i>	82	48,2	32	39,1	50	60,9
<i>S.haemolyticus</i>	36	21,2	22	61,1	14	38,9
<i>S.saprophyticus</i>	13	7,6	8	61,5	5	38,5
<i>S.wameri</i>	11	6,5	8	72,7	3	27,3
<i>S.hominis</i>	9	5,3	3	33,3	6	66,7
<i>S.felis</i>	8	4,7	3	37,5	5	62,5
<i>S.chromogenes</i>	7	4,1	2	28,6	5	71,4
<i>S.auriculus</i>	1	0,6	1	100	0	0
<i>S.gallinarum</i>	1	0,6	0	0	1	100
<i>S.klosi</i>	1	0,6	1	100	0	0
<i>S.capitis</i>	1	0,6	1	100	0	0
Итого	170	100	32	39,1	81	47,6

Доминирующее положение занимали *S.epidermidis* и *S.haemolyticus*, доля которых в структуре всех КОС составила 48,2 и 21,2%, соответственно. Реже встречались *S.saprophyticus*, *S.warneri*, *S.hominis*, *S.felis* и др. Причем в 47,6% случаев от новорожденных изолировали КОС в ассоциации с другими микроорганизмами. Количество вариантов ассоциаций составило 12. Чаще всего КОС выделялись в сочетании с *Enterococcus spp.* (в 38,2% случаев) и *Streptococcus spp.* (в 13,5% случаев). Вместе с тем в 52,4% случаев КОС выделялись в монокультуре, что подтверждает этиологическую значимость этих микроорганизмов в формировании ГСИ новорожденных. Наиболее часто в монокультуре изолировали *S.epidermidis*, *S.hominis*, *S.felis* и *S.chromogenes* – в 60,9 - 66,7 - 62,5 - 71,4% случаев, соответственно. Доля КОС в структуре выделенных от больных микроорганизмов увеличилась с 16,7% в 2000 г. до 53,7% в 2005 г. Для ГСИ новорожденных, ассоциированных с КОС, характерным является преимущественное вовлечение в эпидемический процесс детей раннего неонатального периода, преобладание в структуре клинических форм омфалита и конъюнктивита, отсутствие сезонных подъемов заболеваемости.

По данным оперативного и ретроспективного анализа заболеваемости за 2007-2008 гг. в родовспомогательных учреждениях г. Нижнего Новгорода и Нижегородской области установлено, что в этиологической структуре ГСИ новорожденных преобладали микроорганизмы рода *Staphylococcus* – 74%. Существенно меньший удельный вес приходился на *E.coli* – 7,4%, *E.faecalis* – 3,7%, *S.pyogenes* – 2,8% и другие микроорганизмы – 28,6%.

Среди *Staphylococcus spp.* доминировали КОС, удельный вес которых составил 70,24% (табл. 2). Среди *Staphylococcus spp.* в целом и среди КОС наибольшая доля приходилась на *S.epidermidis* (48,29%). Таким образом, *S.epidermidis* можно рассматривать в сложившейся ситуации как ведущий возбудитель ГСИ родильниц и новорожденных.

При изучении микробного пейзажа внешней среды родовспомогательных учреждений также установлено преобладание рода *Staphylococcus* (83,4%) с доминированием в структуре *S.epidermidis* (23,3%) .

Спектр выделенных микроорганизмов включал 14 видов КОС, представленность которых несколько различалась в материале, выделенном от больных и из внешней среды.

Таблица 2

Структура *Staphylococcus spp.*, выделенных от новорожденных и родильниц с ГСИ, из объектов внешней среды родовспомогательных учреждений г. Н. Новгорода и Нижегородской области в период эпидемического неблагополучия

микроорганизмы	от новорожденных и родильниц с ГСИ	из объектов внешней среды
	удельный вес, %	удельный вес, %
<i>Staphylococcus spp.</i>	68,4	83,4
<i>S.epidermidis</i>	48,29	27,9
<i>S.aureus</i>	29,76	14,4
<i>S.saprophyticus</i>	5,37	11,3
<i>S.cohnii</i>	1,46	13,5
<i>S.auricularis</i>	2,44	3,6
<i>S.warneri</i>	0,98	1,7
<i>S.haemolyticus</i>	3,4	9
<i>S.hominis</i>	3,9	4,4
<i>S.lentus</i>	0,98	1,7
<i>S.simulans</i>	0,49	5,4
<i>S.xylosum</i>	2,44	1,7
<i>S.gallinarum</i>	0,49	-
<i>S.saccharolyticus</i>	-	2,8
<i>S.sciuri</i>	-	0,9
<i>S.capitis</i>	-	1,7

При расследовании вспышки ГСИ в одном из акушерских стационаров г. Нижнего Новгорода в 2007 г. был выявлен большой процент выделения стафилококков от новорожденных и родильниц (Беляева и соавт., 2008). Культуры стафилококков, выделенные из наружного слухового прохода

(НСП), пупка, кала новорожденных и мочи, вагинального секрета, кала родильниц, были идентифицированы до вида с использованием стандартного набора классических питательных сред и систем индикаторных бумажных (СИБ) для идентификации микроорганизмов производства НПО «Микроген» МЗ РФ. Распределение культур по локусам выделения представлено в таблице 3.

Таблица 3

Выделение стафилококков разных видов от новорожденных и родильниц

	Источник выделения	Общее число изолятов	Виды стафилококков				
			<i>S.aureus</i>	<i>S.epidermidis</i>	<i>S.haemolyticus</i>	<i>S.hominis</i>	<i>S.lentus</i>
новорожденные	НСП	12	-	1	11	-	-
	пупок	26	7	4	15	-	-
	кал	11	7	2	2	-	-
	меконий	2	-	1	1	-	-
родильницы	моча	15	2	7	4	2	-
	вагинальный секрет	3	-	1	1	1	-
	кал	2	1	-	-	-	1

Большинство культур от новорожденных, выделенных из НСП и пупка, относились к виду *S.haemolyticus*, тогда как в кале чаще обнаруживали *S.aureus*. У родильниц стафилококки были выделены, в основном, из мочи, причем половину культур составлял *S.epidermidis*. Исходя из полученных данных, было предположено, что большое обсеменение новорожденных штаммами *S.haemolyticus* обусловлено циркуляцией этих бактерий в различных отделениях акушерского стационара.

Мониторинг условно-патогенных микроорганизмов, выделяемых от новорожденных в учреждениях родовспоможения г. Перми в 2006-2010 гг. (Кузнецова и соавт., 2011), показал высокий удельный вес грамположительной микрофлоры (77,9%), среди которой преобладали стафилококки (57,4%). В их структуре доминировали КОС - *S.epidermidis* (22,0%), *S.haemolyticus* (9,4%) и прочие виды – *S.cohnii*, *S.warneri*, *S.hominis*, *S.saprophyticus*, *S.lentus*, *S.capitis*, *S.gallinarum* (по частоте встречаемости, в сумме 18,6%). Большая часть представителей *Staphylococcus spp.* была изолирована с кожной складки, конъюнктивы и из пупочной ранки.

В работе, выполненной авторами монографии (Кряжев и соавт., 2017), был исследован 271 штамм КОС, выделенных в одном из детских стационаров Нижнего Новгорода в ходе текущей профилактической и лечебной работы в 2016 г. от детей возраста от 1 часа до 28 суток. Микробиологический мониторинг включал взятие мазков из глаз, ушей, зева, носа, кожных складок и пупочных ранок новорожденных при поступлении в стационар и в ходе лечения, а также с интубационных трубок пациентов ОРИТ, из крови, спинномозговой жидкости и промывных вод желудка; и штаммы из внешней среды, – выделенные с рук медперсонала и из смывов с манипуляционных столиков.

Идентификация штаммов была любезно проведена сотрудниками лаборатории микробиома человека и средств его коррекции ФБУН ННИИЭМ им. академика И.Н.Блохиной с использованием метода времяпролетной MALDI-TOF масс-спектрометрии на масс-спектрометре Autoflex speed (Bruker Daltonics, Германия) с программным обеспечением MALDI Biotyper 3.0. Внешнюю калибровку проводили с использованием бактериального тест-стандарта (Bruker Daltonics, Германия), в качестве матрицы - α -циано-4-гидрокси-коричную кислоту (α -CHCA). Пробоподготовка суточных культур исследуемых микроорганизмов проводилась методом прямого нанесения по стандартному протоколу, представленному в руководстве пользователя. О

достоверности идентификации судили по значению коэффициента совпадения Score values (2,000-3,000 – идентификация до вида, 1,999-1,700 – идентификация до рода, 1,699-0 – идентификация не прошла) и значению категорий: А – достоверная идентификация до вида, В – достоверная идентификация до рода, С – недостоверный результат.

Подавляющее большинство изолятов, циркулирующих в детском стационаре г.Н.Новгорода, были отнесены к 4 видам: *S.epidermidis* (125 штаммов), *S.haemolyticus* (102 штамма), *S.hominis* (24 штамма), *S.warneri* (12 штаммов) и лишь восемь изолятов были представлены другими видами КОС – *S.simulans*, *S.lugdunensis*, *S.hyicus*, *S.cohnii*.

По локусу выделения штаммы 4-х видов КОС - основных представителей стафилококков в детском стационаре - подразделены в таблице 4. В графе «раневое отделяемое» объединены изоляты из пупочной ранки и из очагов поражения на коже, штаммы из верхних дыхательных путей включали изоляты из зева, носа и отделяемого ушей, в качестве внешней среды были исследованы смывы с рук медперсонала и с манипуляционных столиков.

Таблица 4

Распределение штаммов с учетом источника выделения

Источник выделения	Число выделенных штаммов				
	Всего	<i>S. epidermidis</i>	<i>S. haemolyticus</i>	<i>S. hominis</i>	<i>S. warneri</i>
Раневое отделяемое	80	45	24	4	7
Отделяемое глаз	46	31	12	—	3
Отделяемое верхних дыхательных путей	88	33	43	3	9
Кровь	31	12	12	3	4
Интубационные трубки	10	3	6	—	1
Внешняя среда	8	1	5	2	—

Таким образом, КОС являются доминирующей микрофлорой в детских стационарах, преимущественно *S.epidermidis* и *S.haemolyticus*, что требует не только постоянного эпидемиологического мониторинга за их циркуляцией, но и определения устойчивости к антимикробным препаратам и бактериофагам.

3. Антибиотикорезистентность коагулазоотрицательных стафилококков

3.1 Распространение резистентности КОС в различных стационарах

Результаты исследования резистентности микроорганизмов, выделенных из внешней среды учреждений родовспоможения, к антибактериальным препаратам (антибиотикам и дезинфектантам) свидетельствуют о широкой циркуляции штаммов, адаптированных к условиям ЛПУ данного типа. Удельный вес полирезистентных штаммов колебался от 33,3 до 71,4%, отмечена высокая доля КОС, обладающих перекрестной устойчивостью к различным группам антибиотиков. В четырех из пяти учреждений родовспоможения выявлено наличие устойчивости к применяемым в данных стационарах дезинфицирующим средствам на высоком уровне: удельный вес устойчивых штаммов колебался в широких пределах от 9,1 до 50,0% (Благонравова и др., 2009).

Особое значение имеет распространение стафилококков, резистентных к метициллину (или к оксациллину) (Bootsma et al., 2006; Шаркова и др., 2012). Эти особенности возбудителя существенно ограничивают выбор антибактериальных препаратов. Штаммы стафилококков со сниженной чувствительностью к оксациллину выявляются со всевозрастающей частотой.

Большинство исследований указывает на наличие резистентности у 25,0% *S.aureus* и более чем у 50,0% КОС.

В исследовании И.Н.Околова и соавт. (2009) проводилась оценка резистентности к антибиотическим препаратам коагулазонегативных стафилококков, выделенных у больных острыми и хроническими конъюнктивитами. Среди грамположительных микроорганизмов КОС оказались ведущими возбудителями острых и хронических бактериальных конъюнктивитов в 2007–2008 гг. Их доля в этиологической структуре составила 75,3 %. В группе КОС преобладали *S.epidermidis* (64,2 %) и *S.warneri* (17,9 %), доля других видов была незначительна и колебалась от 0,4% до 8,3%. За период наблюдения был изучен 181 штамм КОС. Из них 65 (35,9%) оказались метициллин-резистентными и 116 (64,1%) — метициллин-чувствительными. Примерно половина изученных штаммов метициллин-резистентных КОС были устойчивы к ципрофлоксацину (47,7%), офлоксацину (49,2%), ломефлоксацину (55,4%) и норфлоксацину (55,4%). 38,5% выделенных метициллин-резистентных КОС были также устойчивы к тобрамицину. Наименьшая доля резистентных штаммов метициллин-резистентных КОС регистрировалась к левофлоксацину (26,2 %). Резистентность выделенных метициллин-чувствительных КОС к левофлоксацину также была минимальной по сравнению с другими антибиотиками и составила 0,9% (рис. 1).

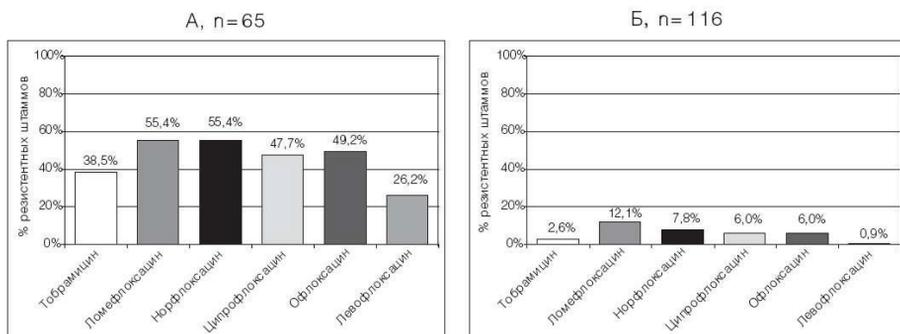


Рис. 1. Резистентность выделенных метициллин-резистентных (А) и метициллин-чувствительных (Б) коагулазонегативных стафилококков к антибактериальным препаратам

В многоцентровом исследовании чувствительности стафилококков в Москве и Санкт-Петербурге (1998) были выявлены различия в распространении резистентности в отдельных стационарах. При этом устойчивость к оксациллину значительно чаще встречалась среди КОС (до 65,9%), чем среди *S.aureus* (до 40,0%). В целом в Москве частота выделения MRSA составила 33,4%, в Санкт-Петербурге – 4,1%. Все резистентные к оксациллину стафилококки были чувствительны к ванкомицину, а 95,0, 84,0 и 70,0% штаммов MRSA были чувствительны к фузидиевой кислоте, рифампицину и ципрофлоксацину, по сравнению с 80,0, 85,0 и 61,0% КОС, соответственно.

В исследованиях антибиотикорезистентности КОС, выделенных от новорожденных в детском стационаре г.Н.Новгорода (Кряжев и соавт., 2017), была выявлена наибольшая чувствительность культур КОС к амикацину и ванкомицину – 23,8±3,8% и 17,5±3,4% резистентных штаммов *S.epidermidis*, 27,5±4,4% и 19,6±3,9% резистентных штаммов *S.haemolyticus*, 20,8±1,7% и 8,3±1,2% резистентных штаммов *S.hominis*, 8,3±2,4% и 16,6±3,2% резистентных штаммов *S.warneri*, соответственно (таблица 5).

Подавляющее большинство исследованных штаммов *S.haemolyticus* (от 63% до 92%) показало устойчивость к действию 9 из 12 антибиотических

препаратов. Более половины культур *S.epidermidis* (от 62% до 76%) были резистентны к 5 из 12 тестируемых антибиотиков.

Культуры *S.haemolyticus* достоверно отличались более высокой резистентностью к антибиотикам пенициллинового ряда (более 92,0% штаммов), цефалоспорином 3-го и 4-го поколения (86,0 - 90,0% штаммов), карбапенемам (76,5±4,2%), азитромицину (63,7±4,8%), чем штаммы *S.epidermidis* (от 34,1±4,2% до 76,2±3,8% устойчивых культур, $p = 0,0001-0,005$).

Штаммы *S.hominis*, в основном, были резистентны к антибиотикам пенициллинового ряда (от 91,7±5,6% до 95,8±4,0%) и цефепиму (87,5±1,4%), реже – к цефалоспорином 3-го поколения (от 45,8±2,1% до 79,2%±1,7%). От трети до половины исследованных штаммов *S.hominis* были резистентны к азитромицину (41,7±2,1%) и карбопенемам (33,3±2,0% - к имипенему и 54,2±2,1% - к меропенему). В целом, более половины штаммов *S. hominis* (от 54% до 95%) были устойчивы к 6 из 12 антибиотических препаратов.

Таблица 5

Антибиотикорезистентность штаммов коагулазоотрицательных стафилококков, выделенных в детском стационаре (%)

Вид	<i>S.epidermidis</i>	<i>S.haemolyticus</i>	<i>S.hominis</i>	<i>S.warneri</i>	
Кол-во штаммов	126	102	24	12	
Антибиотики	Оксациллин	76,2±3,8	92,2±2,6	91,7±5,6	33,3±14,2
	Амоксициллин	62,7±4,0	90,1±2,9	95,8±4,0	66,7±4,1
	Цефтриаксон	65,9±4,2	90,2±2,9	62,5±10,0	41,7±14,8
	Цефотаксим	69,0±4,1	89,2±3,0	79,2±1,7	33,3±14,2
	Цефоперазон	46,8±4,4	86,3±3,4	45,8±10,3	41,7±14,8
	Цефепим	66,7±4,2	90,2±2,9	87,5±1,4	41,7±14,8
	Имипенем	34,1±4,2	76,5±4,2	33,3±2,0	33,3±14,2
	Меропенем	47,6±4,5	76,5±4,2	54,2±2,1	33,3±14,2
	Амикацин	23,8±3,8	27,5±4,4	20,8±1,7	8,3±2,4
	Азитромицин	37,3±4,3	63,7±4,8	41,7±2,1	41,7±2,1
	Ванкомицин	41,7±2,1	19,6±3,9	8,3±1,2	16,6±3,2
	Линкомицин	28,6±4,0	44,1±4,9	45,8±2,1	8,3±2,4

Напротив, культуры *S. warneri* чаще проявляли чувствительность к тестируемому антибиотику, за исключением амоксициллина и азитромицина (66,7±4,1% и 58,3±4,3% резистентных штаммов, соответственно).

Среди культур *S. epidermidis* полирезистентными (устойчивыми к трем и более антибиотикам) были 78,8±3,7%, среди штаммов *S.haemolyticus* – 93,1±2,5%, *S.hominis* – 87,5±1,4%), *S.warneri* – 50,0±4,4% штаммов. Так же полирезистентность показали все представленные культуры *S.hyicus*, *S.lugdunensis* и *S.simulans*.

3.2 Некоторые аспекты формирования антибиотикорезистентности у КОС

Использование гликопептидного антибиотика ванкомицина (Van) для лечения заболеваний, вызванных грамположительными микроорганизмами, введено в практику в 1958 г. и, несмотря на появление резистентных к этому антибиотику штаммов *Staphylococcus epidermidis* (Siebert et al., 1979), он продолжает оставаться препаратом выбора для лечения инфекций, обусловленных метициллин-резистентными КОС (Sieradzki et al., 1999).

Л.И.Кононовой и В.П.Коробовым (2011) обнаружено, что селекционированный в лаборатории Van^r-штамм обладал высоким уровнем устойчивости к ванкомицину (МПК ≥ 400 мкг/мл). Формирование Van^r-фенотипа производного штамма сопровождалось снижением интенсивности роста по сравнению с чувствительным штаммом.

Важно отметить, что возрастание резистентности к Van сопровождается появлением устойчивости и к ряду других антибиотиков, обладающих различными механизмами антибактериального действия. Характеристика чувствительности к антибиотикам исследованных штаммов представлена в таблице 6.

Таблица 6

Фенотипическая резистентность исследованных штаммов

Штаммы	Антибиотики											
	Бен	Ген	Цеф	Тет	Лин	Окс	Риф	Эр	Фуз	Лев	Ван	Цип
<i>S.epidermidis</i> 33	ч	ч	ч	ч	ч	ч	ч	ч	ч	ч	ч	ч
<i>S.epidermidis</i> 33 Van ^r	у	ч	ч	п	у	у	п	ч	у	ч	у	ч

Прим. Обозначения устойчивости к антибиотикам: У – устойчивый, П – промежуточный, Ч – чувствительный.

Антибиотики: Бен – бензилпенициллин, Ген – гентамицин, Цеф – цефалексин, Тет – тетрациклин, Лин – линкомицин, Окс – оксациллин, Риф – рифампицин, Эр – эритромицин, Фуз – фузидин, Лев – левомицетин, Ван – ванкомицин, Цип – ципрофлоксацин

Большинство известных изолятов стафилококков, гетерорезистентных к Van, являются одновременно метициллин- или оксациллин-резистентными, таким образом, устойчивость к Van часто связана с устойчивостью к оксацилину. Возможно, устойчивость к Van обусловлена изменениями в метаболизме клеточных стенок, что в свою очередь влияет на активность бета-лактамовых антибиотиков. Экспрессия Van^r-фенотипа стафилококков не ограничивается резистентностью только к бета-лактамам, так как все они обладают различными уровнями резистентности ко многим антибиотикам (Palazzo et al., 2005).

После 20 последовательных пассажей на питательной среде без антибиотика Van^r-штамм сохранял высокий уровень устойчивости к Van и оставался устойчивым и к другим антибиотикам.

Важно отметить, что исследования других авторов указывают на специфические особенности работы с резистентными штаммами стафилококков из-за ревертирования ванкомицин-чувствительного фенотипа многих изолятов (Howden et al., 2010).

Как показало исследование поверхности клеток методом бактериальной адгезии к углеводородам, штамм *S.epidermidis* 33 обладает гидрофобной поверхностью. Показатель гидрофобности его поверхности составляет $45,0 \pm 10,0\%$, в то же время поверхность Van^r-штамма менее гидрофобна и составляет лишь $11,0 \pm 4,0\%$.

Анализ липидов клеточных мембран изучаемых штаммов выявил значительные различия в их качественном и количественном составе, развитие резистентности к Van сопровождается увеличением относительного количества кардиолипина и фосфатидилглицерина в составе липидов мутантного штамма с одновременным снижением количества гликолипидов. Следует отметить появление лизилфосфатидилглицерина и лизоформ фосфолипидов, отсутствующих в составе липидов исходного штамма *S.epidermidis* 33. Накопление кардиолипина в клетках резистентного штамма, возможно, являясь результатом адаптации к стрессовым условиям, компенсирует нарушение жесткости клеточной стенки и ингибирует аутолиз клеток (Kariyama, 1982), а появление лизилфосфатидилглицерина вызывает изменение заряда клеточных поверхностей, приводя к накоплению положительных зарядов на цитоплазматической мембране, что в свою очередь снижает чувствительность производного штамма к катионному пептиду варнерину.

Определение МПК низкомолекулярного пептида варнерина показало возрастание устойчивости Van^r-штамма к данному антибактериальному препарату – МПК варнерина для него составляет ≥ 8 мкг/мл, что значительно превышает МПК варнерина родительского штамма *S.epidermidis* 33, равную $0,25$ мкг/мл.

Таким образом, возникновение устойчивости штамма *S.epidermidis* 33 к Van вызывает изменение важных физиологических свойств данного микроорганизма. При этом снижение чувствительности к низкомолекулярному катионному пептиду варнерину, возможно, происходит вследствие изменения

уровня гидрофобности бактериальной поверхности, а также вследствие адаптивного накопления полярных липидов клеток.

Устойчивость к β -лактамам у стафилококков опосредована геном *mecA*, кодирующим пенициллинсвязывающий белок 2a (PBP2a, или PBP2'), который имеет меньшее сродство к β -лактамам (Зайцев и др., 2003). Наличие этого белка указывает на устойчивость ко всем β -лактамам антибиотикам (пенициллины, цефалоспорины, карбапенемы и монобактамы) и непредсказуемую клиническую эффективность этого класса препаратов. Стафилококки, несущие модифицированные пенициллинсвязывающие белки, обозначаются как метициллин-резистентные *S.aureus* (MRSA) и метициллин-резистентные *S.epidermidis* (MRSE).

Формирование устойчивости стафилококков к β -лактамам препаратам связывают с инсерцией в бактериальную хромосому в области старта репликации *orfX* генетической кассеты SCC*mec* размером около 52 т. п. о., в состав которой входит ген устойчивости к β -лактамам – *mec* и транспозоны/плазмиды, обуславливающие ассоциированную резистентность к другим группам противомикробных препаратов: макролидам, тетрациклинам, аминогликозидам, фторхинолонам. Впервые *mecA* ген клонирован и секвенирован японскими исследователями в 1987 г., а геномный островок SCC*mec* клонирован и секвенирован в 1999 г. (Kobayashi et al., 1999). SCC*mec* выявлены у *S.aureus*, *S.epidermidis*, *S.haemolyticus*, *S.hominis*, *S.warneri* (Katayama, 2000).

Генетическая кассета SCC*mec* имеет сложную структуру: на концах она ограничена прямыми (DR) и непрямыми (IR) повторами, между которыми располагаются два комплекса генов – *mec* и *ccr*, а также J участок. Комплекс генов *ccr* содержит открытые рамки считывания (ORFs) и гены сайт-специфических рекомбиназ (*ccrA*, *ccrB*, *ccrC*), отвечающих за эксцизию и сайт-специфическую интеграцию кассеты SCC*mec* в уникальный локус *attB*SCC недалеко от области старта репликации *orfX*, что обеспечивает ее

горизонтальный перенос. Комплекс генов *mec* включает ген *mecA*, IS элементы (IS1272, IS431), регуляторные гены *mecR1* и *mecI* (Shore et al., 2005). *MecA* ген кодирует продукцию пенициллин-связывающего белка PBP2a, который, в отличие от обычных PBP (1–4), слабо ацетируется β -лактамами антибиотиками, в связи с чем синтез клеточной стенки у MRS не прерывается в присутствии этой группы химиопрепаратов. Регуляторный ген *mecI* кодирует белок-репрессор, а ген *mecR1* – рецептор к β -лактамам, являющийся переносчиком сигнала. Делеции/мутации в *mecI* или мутации в промоторе гена *mecA*, с которым связывается белок-репрессор, приводят к активации гена *mecA* и формированию фенотипа MRS. Наиболее частыми мутациями в гене *mecI* являются замены C→T и T→A в положениях 202 и 260 соответственно (Machado et al., 2007).

Ген *mecA* имеет размер 2,1 Кб и находится на мобильных генетических элементах, известных как стафилококковая хромосомная кассета *mec* (SCC*mec*). Элементы SCC*mec* состоят из *mec*-комплекса, содержащего *mecA*-ген, регуляторные гены и инсерционные последовательности (IS431, IS1182, IS1272); *ccr*-комплекса, состоящего либо из 1 (*ccrA*) или 2 (*ccrA* и *ccrB*) сайтспецифических рекомбиназ и 3 соединительных регионов. В настоящее время известно 5 классов *mec* комплекса: А, В, С1, С2, D и 5 аллотипов *ccr* комплекса: 1, 2, 3, 4 и 5. Различные комбинации классов *mec*-комплекса и аллотипов *ccr*-комплекса составляют основу классификации SCC*mec* кассет по типам. Регуляторные гены могут быть повреждены посредством встраивания инсерционных элементов, что приводит к стабильной дерепрессии *mecA* (Plata et al., 2009). SCC*mec*-элементы могут нести дополнительные детерминанты устойчивости к антибиотикам нескольких классов, расположенные на интегрированной плазмиде или транспозоне (van der Zee et al., 2011). Например, плазмиды pUB110, присутствующие в SCC*mec* типа II, содержат ген устойчивости к блеомицину (*ble*) и ген резистентности к канамицину и тобрамицину [*ant*(4')]. Плазмиды p1258 и pT181, обнаруженные в SCC*mec* III,

могут нести детерминанты устойчивости к эритромицину, тетрациклину, и тяжелым металлам. Транспозон Tn554, который содержит гены устойчивости к эритромицину, линкозамидам, стрептограмину (*ermA*), стрептомицину и спектиномицину (*aad9/spc*), присутствует в SCCmec II, III, VIII и SCCHg. SCCmec IV может содержать Tn4001c геном *aacA-aphD*, кодирующий бифункциональный аминогликозидмодифицирующий фермент.

Ранее происхождение MRSA связывали с приобретением чувствительным стафилококком-предшественником *mecA* гена, после чего, как предполагали, произошла дивергенция клонов с формированием генетического разнообразия, но большинство проводимых ныне исследований (доказано существование четких генетических групп и способность к горизонтальной передаче гена *mecA*) свидетельствует о независимом приобретении этого гена несколькими изолированными геногруппами штаммов-предшественников.

О.А.Дмитренко и др. (2013) изучались особенности строения и распределения типов SCCmec у изолятов *S.epidermidis*, вызвавших различные нозологические формы внутрибольничной инфекции в стационарах страны. Исследовалось 46 изолятов *S.epidermidis*, выделенных в 2009 – 2010 гг. в Научном центре сердечно-сосудистой хирургии им. А.Н.Бакулева (I), в Научном центре акушерства, гинекологии и перинатологии им. В.И.Кулакова (II), а также в родильных домах Нижнего Новгорода (III).

Были идентифицированы генные комплексы, характерные для рекомбиназ типов: 1 (*ccrA1B1*), 2 (*ccrA2B2*), 4 (*ccrA4B4*) и 5 (*ccrC1*). Содержали по два генных комплекса типов 1 и 2 – 33 (71,7%) изолята. Помимо комплексов *ccr* типов 1 и 2 один изолят (№ NN804), выделенный из крови новорожденного, нес комплекс *ccr* типа 5. Поскольку идентификация комплексов *ccr1* и *ccr2* в одном и том же изоляте была возможна только при использовании моно-ПЦР для подтверждения специфичности образовавшихся ампликонов, у случайно отобранного изолята (№ Mcv35) определили нуклеотидную последовательность ампликонов, образовавшихся при

использовании праймеров, выявляющих наличие комплексов *ccr1* и *ccr2*. Было установлено, что гомология последовательности *ccr1* с ранее зарегистрированными подобными последовательностями в базе генного банка составляет 70,4%, что позволяет рассматривать выявленную последовательность как новый аллотип генов комплекса *ccr1* (International Working Group on the Classification of Staphylococcal Cassette Chromosome Elements, 2009). Гомология последовательности *ccr2* составила 98,7%, что характерно для SCCmec IV типа. Обе последовательности занесены в генный банк под номерами KFKF154274 и KF042470 соответственно.

Были идентифицированы комплексы *mec* классов А, В, С2, которые образовали соответствующие ампликоны со специфичными праймерами. Доминировал комплекс *mec* класса В, который был обнаружен у 34 (73,9%) изолятов. С праймерами, выявляющими фрагмент комплекса *mec* класса С1, у имевшихся в коллекции изолятов коагулазонегативных стафилококков, принадлежащих к различным видам, образовалось два типа ампликонов: один – размером 300 н.п., другой – более 1000 н.п. Оба ампликона были проанализированы методом секвенирования. Консенсусная последовательность для ампликона размером 300 н.п. составила 235 н.п. Была выявлена ее 100%-ная гомология с последовательностью фрагментов гена *mecA* и транспозона *tn431* у штамма JCSC6945, представленного как типичный для идентификации комплекса *mec* класса С1 у SCCmec X. Таким образом, амплифицированный фрагмент оказался специфичным для комплекса *mec* класса С1. У пяти изолятов идентифицировать комплекс *mec* не удалось. Они не образовали характерных ампликонов с праймерами, выявляющими специфические нуклеотидные последовательности известных комплексов *mec*. Три из них тем не менее несли ген *mecA*. У двух других, несмотря на устойчивость к оксациллину, выявленную при использовании фенотипических методов, ген *mecA* и его известный к настоящему времени гомолог – ген *mecC* – выявить не удалось. У изолятов *S.epidermidis* по результатам идентификации генных

комплексов *tes* и *сгг* были идентифицированы кассеты II, IV, VII, VIII типов, а также композитная кассета, несущая комплекс *tes* класса В и два комплекса генов рекомбиназ: *сггA1B1* (*сгг1*) и *сггA2B2* (*сгг2*). Доминировали изоляты, несущие композитную кассету. Данный тип кассет был выявлен у 32 (69,6%) изолятов, принадлежащих к различным *сиквенс*-типам. Преобладал вариант кассеты, несущей область J1a, который обнаружили у 25 (54,3%) изолятов. Варианты кассеты с фрагментами J1b и J1c обнаружили у трех и двух изолятов соответственно. У двух изолятов идентифицировать область J1 не удалось. На втором месте по распространенности была кассета IV типа, которая несет комплекс *tes* класса В в сочетании с генами рекомбиназ типа 2. Этот тип кассет обнаружили у трех изолятов, при этом у двух из них область J1 была представлена вариантом J1a, а у одного изолята эту область идентифицировать не удалось. У единичных изолятов обнаружили кассеты II, V и VII типов. У двух изолятов была обнаружена кассета VIII типа, несущая комплекс *tes* класса А и 4-ый тип генов рекомбиназ. У изолята № Msp211 образовался ампликон, специфичный для комплекса *tes* типа А. Однако ампликоны, характерные для рекомбиназ 2-го или 3-го типа, которые совместно с комплексом *tes* типа А образуют кассету II или III типа соответственно, не образовались. При амплификации ДНК, выделенной из этого штамма, образовался ампликон, специфичный для рекомбиназы типа 5 (C1), характерной для кассет V и VII типов. В связи с этим была проведена ПЦР с праймерами, выявляющими присутствие комплексов *tes* C1 и *tes* C2, специфичных для кассет этих типов. При использовании праймеров, определяющих наличие комплекса *tes* класса C1, был получен ампликон размером около 1000 н.п. Определение нуклеотидной последовательности амплифицированного фрагмента и последующий анализ результатов секвенирования с использованием программы BLAST показали, что эта последовательность имеет 99%-ную гомологию с регуляторной областью *tesR1* гена *tesA* в штамме ST228, представленном в геномном банке. Данная

область специфична для комплекса тес типа А. Таким образом, результаты секвенирования подтвердили наличие комплекса тес типа А у данного изолята и отсутствие у него комплекса тес класса С1, так как ген тесR1 комплекса тесС1 частично делегирован. Полученные результаты позволили идентифицировать у данного изолята новый, отсутствующий в базе данных *S.aureus* тип кассет, содержащий комплекс тес типа А в сочетании с генами рекомбиназ типа 5 (ссrС1). У одного изолята (№ NN804) были выявлены комплекс тес класса С2 и комплекс рекомбиназ типа 5, специфичные для кассеты V типа. Однако у этого изолята дополнительно было выявлено два комплекса генов рекомбиназ: ссr1 и ссr2. Вероятно, данный изолят также содержит новый, не идентифицированный ранее тип кассет. У пяти изолятов не удалось идентифицировать тип кассеты. У изолята № Мср810-2, принадлежащего к ST59, был обнаружен комплекс рекомбиназ типов 1 и 2 и идентифицирована область J1a, но, несмотря на наличие гена тесА, идентифицировать комплекс тес не удалось. У изолята № 835-2 были идентифицированы ген тесА и комплекс ссr5. Еще у трех изолятов не смогли получить специфические продукты амплификации ни с одним из использованных праймеров. При определении чувствительности этих изолятов к оксациллину методом дисков они проявляли к нему переменную устойчивость. В связи с этим их чувствительность к оксациллину исследовали методом стандартных разведений в агаре. Для изолята № 780, не содержащего генов тесА и тесС, минимальная ингибирующая концентрация превышала 0,5 мкг/мл. Рост двух других изолятов (№ Мсv12 и Мср835-1) наблюдали только на среде с содержанием оксациллина 0,25 мкг/мл. Согласно критериям CLCI, к категории чувствительных к оксациллину следует относить изоляты КОС, для которых МИК $\leq 0,25$ мкг/мл, к категории устойчивых – изоляты, для которых МИК $\geq 0,5$ мкг/мл. В соответствии с этими критериями данные изоляты необходимо отнести к категории резистентных к оксациллину. Только один из этих изолятов (№ Мср835-1) нес ген тесА. Ни у одного из изолятов не

обнаружили SCCmec III. Согласно результатам мультилокусного секвенирования изоляты *S.epidermidis* были распределены на 21 сиквенс-тип (ST). Доминировал ST59, к которому были отнесены 19 изолятов (40,4%). Изоляты этого сиквенс-типа были выделены в стационарах как Москвы, так и Нижнего Новгорода. Остальные сиквенс-типы были представлены одним-двумя изолятами (Дмитренко и др., 2011). Композитная SCCmec была обнаружена у изолятов, отнесенных к 16 сиквенс-типам, при этом она доминировала и среди изолятов наиболее распространенного ST59. Преобладал подтип кассет SCCmec-CIa. Именно этот аллельный вариант кассет был обнаружен у изолятов, отнесенных к данному сиквенс-типу, выделенных в разных стационарах Москвы и Нижнего Новгорода. Это позволяет говорить об эпидемическом распространении *S.epidermidis* сиквенс-типа ST59, несущих данный аллотип SCCmec. Кассета IV типа также была обнаружена в геноме изолятов сиквенс-типов ST4 и ST59. Кассета VIII типа была обнаружена в геноме изолятов двух сиквенс-типов: ST2 и ST22. Кассеты V и VII типов были обнаружены у изолятов ST5 и ST266 соответственно. Изоляты, отнесенные по результатам секвенирования к наиболее распространенному сиквенс-типу ST59 (n = 19), содержали SCCmec разных типов: II (один изолят), IV (два изолята), а также композитный тип (14 изолятов), у двух изолятов идентифицировать SCCmec не удалось. Новый тип кассет, у которого комплекс тес класса A сочетался с генами рекомбиназ 5-го типа, был обнаружен в геноме только одного из изолятов 22-го сиквенс-типа. Еще у одного изолята – ST2 – комплекс тес класса C2 сочетался с генами рекомбиназ трех типов: ccr1, ccr2 и ccr5.

У 18 изолятов, выделенных в стационаре I, были обнаружены кассеты нескольких аллотипов, в том числе SCCmec-CI (четыре подтипа), а также кассеты VII и VIII типов. Несмотря на то что SCCmec-CI доминировала, ее структура у изолятов разных сиквенс-типов была неоднородной. Так, SCCmec-CIa была обнаружена у изолятов пяти сиквенс-типов: ST6, ST20, ST59, ST174 и ST189; SCCmec-CIb – у изолятов трех сиквенс-типов: ST10, ST54 и ST264. Оба

изолята ST23 несли аллотип SCCmec-CIc, а один из изолятов ST174 несли аллотип SCCmec-CI, у которого область J1 идентифицировать не удалось. Не было выявлено доминирующего сиквенс-типа, несущего определенный вариант кассет. Двадцать шесть изолятов, выделенных в стационаре II, относились к девяти сиквенс-типам. У них были обнаружены кассеты пяти типов: II, IV (подтип «а» и не идентифицированный), SCCmec-CIa, SCCmec-CIb, SCCmec-VIII, SCCmec-new (комплекс mecA, ccr5). Превалировали изоляты (65,3%), отнесенные по результатам MLST к сиквенс-типу 59, которые можно было дифференцировать на основании различий в структуре SCCmec. При этом 10 (62,5%) из 16 изолятов ST59 содержали SCCmec-CIa. Изоляты, выделенные в стационаре III, принадлежали к разным сиквенс-типам и несли разные типы кассет.

Проведенные исследования позволили идентифицировать SCCmec у 41 (89,1%) тестируемого изолята *S.epidermidis*. Полученные данные о наличии семи типов кассет (или более десяти, включая подтипы) у изученной немногочисленной выборки изолятов, выделенных в нескольких стационарах, свидетельствуют о значительном структурном разнообразии геномных «островов», кодирующих устойчивость к бета-лактамам антибиотикам у представителей вида *S.epidermidis*. Доминирующим типом SCCmec оказался композитный тип, несущий комплекс mec класса B и два комплекса генов рекомбиназ типов 1 и 2.

Согласно современной классификации, комплекс mec класса B несут либо кассеты I типа, у которых он сочетается с генами рекомбиназ типа 1, либо кассеты IV типа, у которых он сочетается с генами рекомбиназ типа 2. Поскольку у многих тестируемых изолятов *S. epidermidis* присутствовали кассеты IV типа, можно предположить, что рекомбинантная кассета, несущая два комплекса генов – ccr1 и ccr2, сформировалась именно на основе кассеты IV типа путем приобретения дополнительного комплекса генов рекомбиназ.

Интересно, что недавно появились сообщения о выделении изолятов *S.epidermidis*, несущих несколько комплексов рекомбиназ (Ruppe et al., 2009), а исследователи из Швеции также обнаружили у *S.epidermidis* SCCmec, несущую два комплекса генов csg – типов 1 и 2 – и комплекс mec класса B (Swenson et al., 2011). Дальнейшее, более детальное исследование структурных особенностей композитной кассеты у разных видов стафилококка, выполненное методом секвенирования, так же как и исследование более ранних изолятов *S.epidermidis*, позволит подтвердить или опровергнуть высказанную гипотезу.

Особого внимания заслуживает и обнаружение изолятов *S.epidermidis*, несущих кассету VIII типа, представленную комплексом mec класса A и генами csg типа 4. Как недавно было показано, отличительной особенностью кассет mec II, III и VIII типов, которые в своей структуре имеют комплекс mec класса A, является наличие в его составе гена *psm-mec*, кодирующего синтез фенолрастворимого модулина альфа-типа – цитолитического токсина, мишенью действия которого являются нейтрофилы. В отличие от *S.aureus*, большая часть изолятов которого в коровой части генома несет ген, кодирующий фенол-растворимый модулин именно альфа-типа, у КОС присутствует ген, кодирующий синтез фенолрастворимого модулина бета-типа, который существен для формирования биопленок, но обладает значительно меньшей цитолитической активностью по сравнению с альфа-типом. Приобретение дополнительного гена, кодирующего синтез высокоактивного цитолитического токсина, может приводить к повышению вирулентности микроорганизма, поэтому интеграция кассеты VIII типа – крайне важное генетическое событие, способствующее формированию *S.epidermidis* как патогена. Немаловажен и факт выявления изолятов *S.epidermidis*, у которых не удалось идентифицировать тип SCCmec. Эти данные свидетельствуют о наличии еще неизвестных типов кассет и механизмов резистентности к оксациллину у CoNS. С учетом возможности межвидовой передачи устойчивости к метициллину от *S.epidermidis* к *S.aureus* в организме больного

во время антибиотикотерапии (Bloemendaal et al., 2010); вышеприведенные результаты еще раз подчеркивают роль *S.epidermidis* как резервуара генов антибиотикорезистентности и источника новых кассет мес для *S.aureus*.

Известно, что к основным антибиотикам, используемым для терапии стафилококковых инфекций, относятся бета-лактамы (прежде всего оксациллин, цефазолин и амоксициллин/клавуланат), гликопептиды (ванкомицин) и оксазолидиноны (линезолид) (Шляпников, Сидоренко, 2010). Ключевым моментом в выборе антибиотика служит выявление MRS. Резистентность стафилококков к метициллину может быть обусловлена тремя механизмами: продукцией дополнительного пенициллинсвязывающего белка (ПСБ) – ПСБ-2а, кодируемого геном месА; инактивацией вследствие гиперпродукции бета-лактамаз; модификацией нормальных ПСБ. При этом клиническое значение имеет месА-обусловленная резистентность. Это связано с тем, что при инфекциях, вызванных штаммами стафилококков с месА, терапия бета-лактамами антибиотиками неэффективна. Что говорит о приобретении КОС полирезистентности к антибактериальным препаратам. Препаратом выбора при инфекциях, вызванных MRS штаммами, является ванкомицин (Дехнич, 1999; Сидоренко, Шляпников, 2004; Благодарова и др., 2009; Никулин, Дехнич, 2010).

4. Исследование чувствительности стафилококков к различным препаратам бактериофагов

В условиях глобального распространения антибиотикорезистентности препараты бактериофагов с успехом используются в лечебно-профилактических целях, включая борьбу с ИСМП (Каттер, Сулаквелидзе, 2012). Клиническая и эпидемиологическая эффективность данной группы

медицинских иммунобиологических препаратов хорошо изучена и доказана (Brusina et al., 2015).

В исследовании Р.Ф.Чанышевой и О.В.Ковалишеной (2014) проводилась оценка состояния чувствительности к стафилококковым бактериофагам, используемым в качестве лекарственных препаратов, клинических штаммов *Staphylococcus spp.*, выделенных от пациентов с инфекцией в ходе регионального микробиологического мониторинга в ЛПО. В исследование были включены 289 штаммов *Staphylococcus spp.*, выделенных из клинического материала пациентов с инфекцией, преимущественно ИСМП, из 6 ЛПО Н. Новгорода и Нижегородской области (городская детская больница, родильный дом, 2 центральные районные больницы, 2 медицинских центра). Культуры были выделены и исследованы в рамках регионального микробиологического мониторинга в Проблемной научной лаборатории НИИ профилактической медицины НижГМА. Всего была оценена фагочувствительность 239 изолятов *S.aureus* и 50 – КОС. Была проведена оценка литических свойств коммерческих препаратов бактериофагов, включая монопрепарат «Бактериофаг стафилококковый жидкий» (СБФ), и комплексные препараты со стафилококковым компонентом – «Интести-бактериофаг» (ИБФ) и «Пиобактериофаг комбинированный» (ПБФ).

Оценка литической активности фагов была проведена методом «стерильного пятна», учет результатов – по пятибалльной шкале (по количеству «крестов»). В исследовании культуры стафилококков по их чувствительности к применяемым коммерческим препаратам БФ были разделены на чувствительные с интенсивностью лизиса «++++», «+++», «++», слабочувствительные – «+» и нечувствительные – с отсутствием лизиса культуры. Распространенность чувствительности/нечувствительности рассчитывалась на 100 исследованных культур (в %) с определением доверительных границ колебаний показателей с вероятностью безошибочного прогноза 95% (95% ДИ).

При оценке фагочувствительности всей популяции *Staphylococcus spp.* были получены результаты, свидетельствующие о широкой распространенности устойчивости этиологически значимых стафилококков, циркулирующих в ЛПО, к применяемым коммерческим препаратам стафилококкового БФ. Преобладание устойчивых культур отмечено по отношению к каждому из тестируемых препаратов БФ. Доля нечувствительных штаммов *Staphylococcus spp.* колебалась от 41,6% (95% ДИ 35,8–47,4%) для СБФ до 48,7% (95% ДИ 42,2–54,7%) для ИБФ. Относительно большую активность показал препарат СБФ, чувствительными к которому оказались 31,8% (95% ДИ 26,4–37,2%) vs 28,2% (95% ДИ 22,8–33,6%) у ПБФ и 26,0% (95% ДИ 20,6–31,4%) у ИБФ; однако, различия статистически недостоверны.

Наряду с лидированием нечувствительных культур в общей популяции *Staphylococcus spp.*, схожая картина была отмечена и среди *S.aureus* и КОС. При этом доля устойчивых штаммов КОС была в среднем в 2 раза больше, чем у *S.aureus* ($p=0,01$) и составила 74,0–82,2%. Удельный вес фагоустойчивых КОС достоверно превосходил удельный вес чувствительных КОС относительно всех 3 коммерческих препаратов. Такое подавляющее преобладание устойчивости к стафилококковым бактериофагам у КОС в какой-то степени является ожидаемым, т. к. данные бактериофаги создавались с учетом литической активности в отношении прежде всего *S.aureus*. Однако БФ позиционируются как активные в отношении рода стафилококков. Исходя из инструкции по применению исследуемых препаратов БФ (а именно при «инфекции стафилококковой этиологии»), можно было ожидать их одинаковую активность в отношении как *S.aureus*, так и КОС. Однако результаты исследования показали значительно более низкую чувствительность в популяции КОС (в 3,5 раза ниже, чем у *S.aureus*).

Была проведена оценка перекрестной устойчивости культур к разным препаратам, содержащим стафилококковый бактериофаг (Шкарин, Благоднравова, 2010). Доля штаммов, характеризующихся отсутствием

чувствительности к двум и более препаратам БФ, значительно выше как среди *S. aureus*, так и в популяции КОС, и составляет 75,2% (95% ДИ 67,0–83,4%) и 94,7% (95% ДИ 87,4–100%) соответственно. Удельный вес нечувствительных к действию одного и более бактериофагов штаммов из числа КОС составил 84,4% (95% ДИ 73,6–95,2%), что в 1,7 раза больше, чем у *S.aureus* – 49,6% (95% ДИ 43,0–56,2%) ($p=0,01$).

В наших исследованиях (Кряжев и соавт., 2017) тестирование культур на чувствительность к бактериофагам показало, что большинство исследованных штаммов КОС устойчиво к их действию (таблица 7). Так, к секстафагу, пиобактериофагу поливалентному, интести-бактериофагу, пиобактериофагу комплексному были устойчивы от 60,3% до 87,3% штаммов *S.epidermidis*, от 69,6% до 86,3% штаммов *S.haemolyticus*, от 62,5% до 100% штаммов *S.hominis*. Лучший результат по фаголизису культур показал стафилококковый бактериофаг – не менее 62% чувствительных штаммов.

Таблица 7

Чувствительность к бактериофагам штаммов коагулазоотрицательных стафилококков, выделенных в детском стационаре

Вид	Всего культур	секстафаг	пиобактериофаг поливалентный	интести-бактериофаг	пиобактериофаг комплексный	стафилококковый бактериофаг
<i>S.epidermidis</i>	126	60,3±4,3	76,1±3,8	87,3±2,9	79,4±3,6	37,3±4,0
<i>S.haemolyticus</i>	102	69,6±4,5	82,4±3,7	86,3±3,4	84,3±3,6	37,3±4,8
<i>S.hominis</i>	24	62,5±10,0	79,2±8,4	100,0±0,0	91,7±5,7	37,5±10,0
<i>S.warneri</i>	12	25,0±13,0	50,0±15,0	91,7±8,3	58,3±14,8	8,3±8,3

Распространенность фагорезистентных штаммов в популяции стафилококков, выделенных от пациентов медицинских организаций в результате регионального микробиологического мониторинга 2015–2016 гг. (Шкарин, Благонравова, 2010), составила 21,3% [95% ДИ 15,3–27,3] штаммов, слабочувствительных штаммов – 4,2% [95% ДИ 1,3–7,1]. В целом, чувствительность проявили 74,5% [95% ДИ 68,1–80,9] штаммов стафилококков. Имеются различия по видам стафилококков. Так, наибольшая устойчивость отмечена среди КОС – 25,8% [95% ДИ 18,0–33,6], в 2 раза ниже распространенность фагорезистентных штаммов среди *S.aureus* – 12,1% [95% ДИ 3,9–20,3], но без достоверных различий. Доля слабочувствительных штаммов среди КОС также была выше. Итого, среди *S.aureus* 84,7% штаммов [95% ДИ 75,5–93,9] были чувствительны, среди КОС – 69,5% штаммов [95% ДИ 61,3–77,7], без достоверных различий. Эти данные свидетельствуют об обоснованной целесообразности применения обновленного коммерческого препарата стафилококкового бактериофага для борьбы с инфекциями в условиях высокого уровня чувствительности к нему циркулирующих в медицинских организациях региона стафилококков. Сравнительная оценка чувствительности *Staphylococcus spp.* к адаптированному препарату «Бактериофаг стафилококковый» с данными 2009–2011 гг. выявила изменение распространенности фагоустойчивости и чувствительности стафилококков (рис. 2).

Доля фагочувствительных культур составила: *S.aureus* – 84,7% [95% ДИ 75,5–93,9], КОС – 69,5% [95% ДИ 61,3–77,7], *Staphylococcus spp.* – 74,5 [95% ДИ 68,1–80,9], что в 2,3 и 7 раз выше по сравнению с чувствительностью к необновленным (ранее выпускаемым) препаратам. Распространенность фагорезистентности снизилась в 2,9 раза среди *S.aureus* и составила в 2015–2016 гг. 12,1% [95% ДИ 3,9–20,3] vs 34,71% [95% ДИ 28,5–40,9] в 2009–2011 гг. ($p=0,03$), в 2,9 раза для КОС – 25,8% [95% ДИ 18,0–33,6] vs 74,03% [95% ДИ 61,6–86,4] ($p=0,002$). В целом, среди *Staphylococcus spp.* распространенность

фагорезистентности к применяемому коммерческому препарату «Бактериофаг стафилококковый» достоверно снизилась в 2 раза – 21,3% [95% ДИ 15,3–27,3] штаммов vs 41,6% [95% ДИ 30,1–53,1] ($p=0,035$).

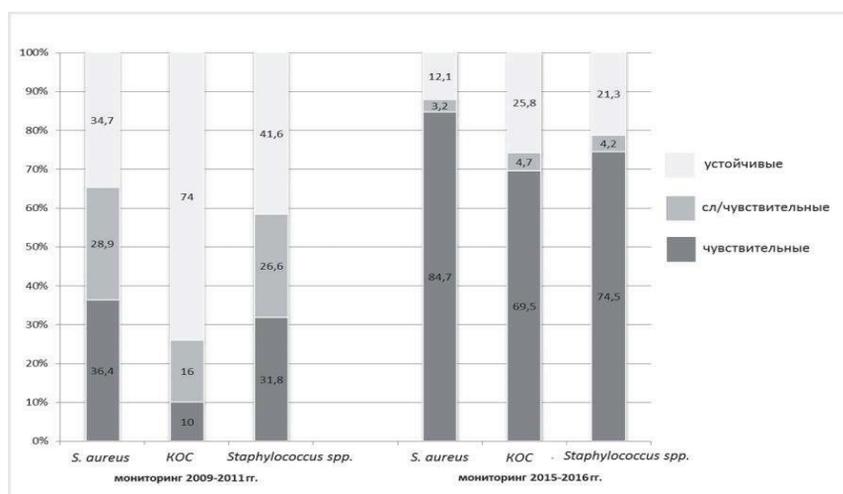


Рис. 2. Спектр чувствительности стафилококков к препарату бактериофага («Бактериофаг стафилококковый») по результатам регионального мониторинга 2009-2011 и 2015-2016 годов

В рамках мониторинга 2015–2016 гг. была проведена оценка фагочувствительности к разным сериям бактериофага. Вне зависимости от серии актуализированного фагового препарата, доля чувствительных штаммов стафилококков также доминировала ($p=0,01$) и составила 82,3–87,1% у *S.aureus* и 68,5–71,7% у KOC. Однако, несмотря на достоверное снижение частоты выделения устойчивых к бактериофагам штаммов KOC почти в 3 раза, кратность их превышения относительно *S.aureus* не изменилась и составляла 2,1 раза (различия статистически не достоверны для всех серий, за исключением № 213 – доля KOC, фагорезистентных к данной серии, в 2,4 раза больше, чем *S.aureus*, $p=0,01$).

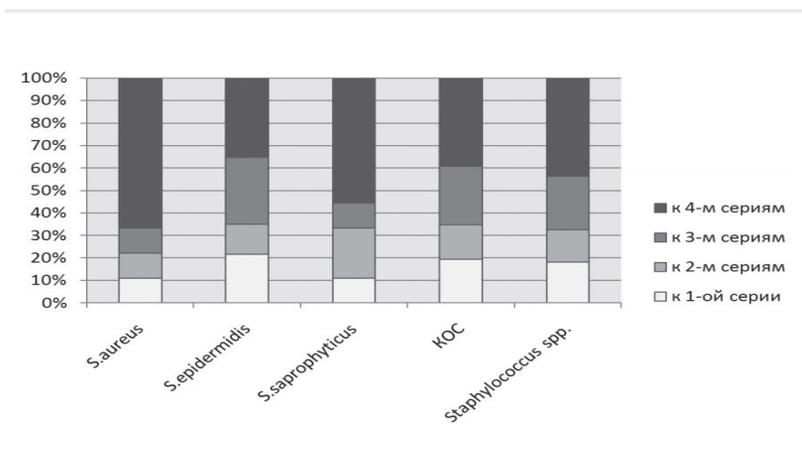


Рис. 3. Перекрестная устойчивость к разным сериям бактериофага у фагорезистентных культур *Staphylococcus spp.*

Определение литической активности разных серий стафилококкового фага позволило оценить частоту формирования к ним перекрестной резистентности у клинических штаммов (рис. 3). Такой результат подтверждает необходимость выделения и создания специфического коагулазонегативного стафилококкового бактериофага.

5. Способность стафилококков к образованию биопленок

Основные свойства, которыми должен обладать микроорганизм, чтобы выжить в лечебном учреждении: непритязательность к факторам роста, экологическая пластичность и высокие адаптационные возможности; устойчивость к антибактериальным и дезинфицирующим препаратам и действию факторов окружающей среды. Сочетание этих признаков обеспечивает высокую конкурентоспособность штамма по сравнению с другими микроорганизмами при колонизации любых экологических ниш с

последующим закреплением и распространением. Одной из важных характеристик при этом может быть степень пленкообразующей способности.

Нами (Беляева и соавт., 2016) была исследована способность к пленкообразованию культур КОС, циркулирующих в детском стационаре г.Н.Новгорода (табл. 8).

Таблица 8

Показатели пленкообразования у штаммов коагулазоотрицательных стафилококков, выделенных в детском стационаре

Выделенные штаммы	Пленкообразование (ПО)	
	Число штаммов с ПО	Значения ПО (k)
<i>S.epidermidis</i> (38)	35	4,345±0,400*
<i>S.haemolyticus</i> (13)	13	6,086±0,640*
<i>S.hominis</i> (3)	2	5,691±1,894
<i>S.warneri</i> (3)	3	3,726±0,940

Примечание: *- различия статистически значимы при $p=0,027$

Абсолютное большинство выделенных штаммов обладало способностью к формированию биопленки, которую считали высокой при $k>5$, умеренной при значениях k от 2 до 5. Наивысшей способностью к формированию биопленки обладал штамм *S.epidermidis*, выделенный из трахеостомы, однако в целом наибольшие значения пленкообразования показали штаммы *S.haemolyticus*, причем эти показатели были достоверно выше, чем у *S.epidermidis* (при $p=0,027$).

Проводилось изучение влияния условий культивирования на формирование биопленок коагулазонегативных стафилококков (Коробов и соавт., 2011). В качестве объекта исследования использовали штамм бактерий *Staphylococcus epidermidis* 33. Формирование биопленок проводили на различающихся по физико-химическим свойствам поверхностях: стекла (предметные стекла “Huida”, Китай), венозных катетеров (поливинилхлорид,

“Teramo”, Италия) и иммунологических микропланшетов (полистирол, “Медполимер”, Россия). Изучение формирования биопленок *S.epidermidis* 33 проводили при культивировании в течение 7 сут., с ежедневной детекцией динамики их биомассы. Образование биопленок наблюдалось на всех использованных поверхностях. Интересно отметить, что динамика роста биопленок во всех случаях в значительной степени напоминала таковую планктонных культур с хорошо выраженными физиологическими фазами – логарифмической, торможения роста и стационара. На венозных катетерах и в планшетах рост биопленок наблюдался вплоть до 6 сут. культивирования, а затем в обоих вариантах следовало резкое снижение их биомассы. Наибольшее накопление биомассы пленок к этому сроку происходило на венозных катетерах, превосходя, практически, в 2 раза содержание биопленок в микропланшетах. Образование пленок на стекле на несколько порядков уступало рассмотренным выше поверхностям, однако, необходимо отметить, что в течение всего срока эксперимента и в этом случае наблюдался перманентный рост биомассы клеток. Важно отметить, что при изучении формирования пленок на стеклянной поверхности не удалось зафиксировать снижения их биомассы при использованных сроках культивирования. Возможно, формирование биопленок на стекле происходит в течение более длительного времени. Высокие гидрофильные свойства поверхности стекла, в отличие от выраженных гидрофобных свойств полимерных поверхностей катетеров и планшетов, по-видимому, значительно затрудняют первоначальные события при формировании бактериальных пленок в этих условиях – адсорбцию – «приклеивание» бактерий к стеклу и, как следствие, тормозят включение сигнальной системы “quorum sensing”, замедляя колонизацию этой поверхности (Dickschat, 2010).

В работе Л.И. Кононовой и В.П. Коробова (2011) сравнительный анализ динамики роста на среде LB стафилококков, различающихся по чувствительности к Van, показал, что характерной особенностью всех

клинических и лабораторных Van^r-штаммов стафилококков являлось значительное увеличение времени генерации и меньшее накопление биомассы по сравнению с исходными штаммами, при этом приобретение устойчивости к Van не вызывало каких-либо значительных изменений в способности штаммов к образованию биопленок. На рисунке 4 приведены результаты двух независимых исследований биопленок, образованных на вторые сутки культивирования штаммов.

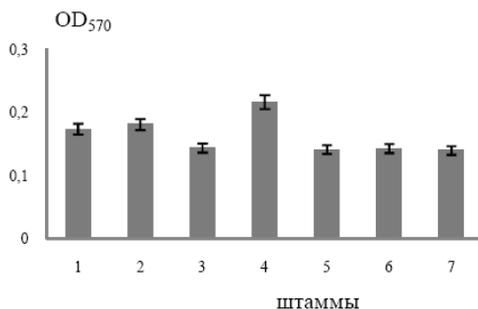


Рис. 4. Способность изученных штаммов стафилококков к образованию биопленок:

1 – *S.epidermidis* 33, 2 – *S.epidermidis* 33 Van^r₍₁₆₎, 3 – *S.epidermidis* 33 Van^r2₍₁₂₎, 4 – *S.epidermidis* 33 Van^r3₍₁₂₎, 5 – КОС клинический 337 Van^r, 6 – КОС клинический 713 Van^r, 7 – КОС клинический 699 Van^r

Результаты сравнительного изучения образования биопленок и чувствительности уже сформированных на поверхности полистирола суточных биопленок в присутствии ферментов, расщепляющих белки (трипсин), нуклеиновые кислоты (ДНКаза и РНКаза) и клеточные стенки бактерий (лизозим), и периодата натрия, окисляющего α-гликольные группировки углеводов (Ерошенко, Коробов, 2015), показали, что лизоцим и периодат натрия при внесении в среду одновременно с бактериями отрицательно влияли как на процессы адгезии, так и на формирование биопленок всеми

исследованными в работе штаммами *Staphylococcus epidermidis*. Высокая чувствительность первых этапов формирования биопленок к действию лизоцима и периодата натрия, скорее всего, связана со способностью этих соединений разрушать пептидогликан в составе клеточной стенки бактерий. Вместе с тем необходимо отметить, что суточные биопленки всех изученных штаммов обладали устойчивостью к лизоциму и окислительному действию периодата натрия. Вероятно, это связано с отсутствием в матриксе полисахаридного межклеточного адгезина, который представляет собой полимер N-ацетилглюкозамина (Mack et al., 2009) и является мишенью действия данных гидролитических факторов (Qin et al., 2007). Действительно, отсутствие способности к синтезу PIA (полисахаридного межклеточного адгезина) у исследованных стафилококков было подтверждено с помощью тестирования с использованием агара с индикатором Конго красный. Бактерии этих штаммов при выращивании на данной среде формируют красные колонии, что свидетельствует о PIA-негативном фенотипе (Freeman et al., 1989). В таком случае, согласно литературным данным, основным компонентом матрикса биопленок стафилококков чаще всего являются белковые соединения (Rohde et al., 2007).

В.П.Коробовым и соавт. (2010) при изучении значения степени гидрофобности поверхностей бактерий группы КОС для проявления их способности к сорбции на полистироле было показано, что сорбционные свойства бактерий большей части штаммов зависели от уровней этого показателя. Была обнаружена положительная корреляция между гидрофобностью клеточной поверхности стафилококков и их адгезией на полистироле (критерий Спирмена $r = 0,79$; $p < 0,05$). Особый интерес представляют данные о резистентности биопленок изученных в работе штаммов КОС к действию различных бактериолитических факторов. Как показали эти исследования, биопленки большей части клинических штаммов КОС, сформированные на полистироле в богатой питательной среде в течение

48 ч, обладали выраженной чувствительностью к действию таких гидролизующих ферментов, как лизоцим и протеиназа К. При действии этих ферментов примерно у 40,0% исследованных штаммов наблюдалось интенсивное разрушение биопленок, при этом у ряда штаммов биомасса пленок снижалась более чем в 2 раза. Выраженным разрушающим действием на зрелые биопленки стафилококков обладал низкомолекулярный катионный пептид варнерин, литический эффект которого был убедительно продемонстрирован ранее на планктонных бактериальных клетках (Коробов и др., 2011). Двухчасовая инкубация зрелых биопленок КОС с варнерином приводила к разрушению биомассы пленок у 68,0% штаммов КОС. Следует также отметить, что были выявлены и штаммы (12,0%), формирующие биопленки, резистентные к действию использованных в работе лизирующих агентов.

Таким образом, зрелые биопленки клинических КОС подвергались разрушению пептидными антибактериальными агентами, при этом в наибольшей степени деградация биомассы пленок стафилококков наблюдалась при действии низкомолекулярного катионного пептида варнерина.

В работе В.П. Коробова и соавт. (2010) действия низкомолекулярного пептида варнерина при концентрации 4 мкг/мл на сформированную в течение 24 ч биопленку не обнаружено. Однако при увеличении концентрации пептида от 16 до 128 мкг/мл отмечалось снижение уровня биомассы и количества живых клеток в образованных в течение суток биопленках (рис. 5).

В дальнейших экспериментах на биопленках низкомолекулярный пептид варнерин использовался в концентрации 128 мкг/мл. При сравнении лизирующего действия пептида на планктонные клетки и биопленку отмечено, что через 4 ч контакта с варнерином (4 мкг/мл) количество жизнеспособных клеток в планктонной культуре падало практически до нуля, тогда как в биопленке в три раза. Причем, число живых клеток в биопленке оставалось достаточно высоким даже при 24-часовом воздействии варнерина.

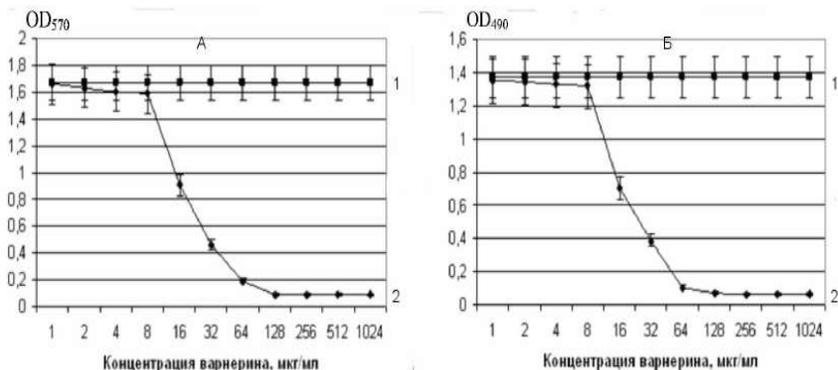


Рис. 5. Действие варнерина на сформированную пленку *S. epidermidis* 33. А – накопление биомассы, Б – жизнеспособность клеточных компонентов (1 – контроль, 2 – варнерин)

Важно отметить, что сам варнерин не обладал какой-либо ферментативной активностью, и это позволило предположить опосредованность его действия за счет проявления им детергентных свойств и активации аутолитических систем бактериальных клеток (Коробов и др., 2010).

6. Устойчивость стафилококков к дезинфицирующим средствам

В работе В.И. Сергеевнина и соавт. (2012) проводилась оценка устойчивости к рабочим растворам дезинфектантов штаммов *Staphylococcus haemolyticus*, выделенных от новорожденных и из объектов больничной среды акушерского стационара в период регистрации неединичных случаев ГСИ. Параллельно изучалась чувствительность к тем же препаратам эталонной тест-культуры (*S. aureus* № 906). В качестве ДС использовался применявшийся в изучаемом стационаре в течение последнего года Амиксидин (комбинация ЧАС и гуанидина), Экобриз-окси (комбинация перекиси водорода и гуанидина) и Фрисепт-гамма (сочетание ЧАС, амина и гуанидина). Музейная тест-культура

S.aureus (штамм 906) была чувствительна ко всем ДС. В то же время у клинических изолятов, несмотря на идентичность антибитикофенотипов, чувствительность к ДС была неодинаковой. К Амиксидину $5,5 \pm 0,5\%$ штаммов *S.haemolyticus* оказались устойчивыми и столько же отличались неполной чувствительностью (неполное бактерицидное действие). По отношению к Фрисепт-гамма и Экбриз-окси были обнаружены только штаммы с неполной чувствительностью – в $27,8 \pm 10,9\%$ и $16,7 \pm 2,2\%$ случаев (неполное бактерицидное действие – в $22,2 \pm 10,0\%$ и $16,7 \pm 2,2\%$, суббактерицидное – в $5,5 \pm 5,5\%$ и 0% , соответственно).

В.И. Присакарем и Д.Ю. Спэтару (2015) на протяжении 2014 и 2015 годов была изучена чувствительность к дезинфицирующим средствам *S.aureus* и *S.epidermidis*. Исследуемые штаммы были выделены от больных клинической больницы травматологии и ортопедии и больницы скорой медицинской помощи. Исследования проведены в лаборатории «Внутрибольничные инфекции» Государственного университета медицины и фармации им. Николая Тестемицану Республики Молдова. Изучена чувствительность штаммов к 11 типам дезинфектантов следующих групп: окислители (Секусепт актив, Секусепт классик, Хайжен, Оксигран, Перостер), четвертичные аммониевые соединения (ЧАС) + альдегид (Хиросептол, Стерисепт, Профик), четвертичные аммониевые соединения + альдегид + спирт (Виробак), хлорсодержащие препараты (Жавилар, Септохлораль).

Чувствительность к дезинфектантам определялась как в растворах, так и на поверхностях, в соответствии с методом определения чувствительности микроорганизмов к дезинфектантам, разработанным в Нижегородской медицинской академии Российской Федерации.

Более чувствительными оказались *S.epidermidis* (71,0%), нежели *S.aureus* (56,4%). Неполную чувствительность к дезинфектантам проявил *S.aureus* – 33,3%. Высокую степень устойчивости к дезинфицирующим средствам проявили штаммы *S.aureus* – 10,3%.

Чувствительность тестируемых культур к различным типам дезинфектантов варьировала от 15,0 до 78,4%. Наиболее высокую чувствительность штаммы проявили к следующим дезинфектантам: Перостеру – 78,4%, Хайжену – 72,3%, Секусепту актив – 70,4%, Секусепту классик – 69,1%, Виробаку – 66,7%, Жавилару – 63,4%. И, наоборот, менее чувствительными штаммы оказались к таким дезинфектантам, как Профик – 52,9%, Оксигран – 47,7% и Стерисепт – 15,0%.

Неполную чувствительность штаммы проявили в отношении Стерисепта – 50,0%, Оксиграна – 27,3%, Жавилара – 26,8%, Секусепта актив – 25,9%, Секусепта классик – 23,8%, Профика – 23,6%, Хайжена – 23,4%, Хиросептола – 22,7%, Виробака – 22,2% и Перостера – 18,9%.

Высокая устойчивость исследованных штаммов отмечена к Хиросептолу – 38,7%, Стерисепту – 35,0%, Оксиграну – 25,0% и Профику – 23,5%.

Сотрудники лаборатории ВБИ ЦНИЛ БГМУ (Республика Беларусь) совместно с клиницистами исследовали частоту и динамику распространения устойчивых к 15 антисептикам вариантов у этиологически значимых бактерий при различных нозологических формах (абсцессы, флегмоны, маститы, инфекции области хирургического вмешательства, ожоги, перитониты и др.) инфекций, внутрибольничном и внебольничном происхождении заболеваний, в различных типах отделений. Установлено широкое распространение устойчивых к антисептикам вариантов бактерий и нарастание их доли среди госпитальных экovarов во времени. Частота, уровни и спектры приобретённой устойчивости к антисептикам зависели от вида и экoвара (госпитальный и внегоспитальный) бактерий, препарата, нозологической формы заболеваний, типа отделения, периода исследований, масштабов применения препаратов. Устойчивые к антисептикам варианты выявлены у всех исследованных видов бактерий (золотистый и коагулазоотрицательные стафилококки), по отношению к большинству испытанных препаратов, однако, в величинах значительно меньших, чем к антибиотикам. Динамические исследования

показали нарастание частоты устойчивости к антисептикам у госпитальных эковаров стафилококков и увеличение числа антисептических препаратов, к которым обнаруживаются устойчивые варианты. Так, 77,0–88,0% штаммов золотистого и коагулазоотрицательных стафилококков проявили устойчивость к фурацилину и хлорамину.

Ко многим препаратам, используемым в Беларуси для дезинфекции инструментария и поверхностей в больничных отделениях, среди возбудителей ИСМП выявлена значительная доля устойчивых вариантов.

Так, среди госпитальных штаммов стафилококков устойчивых к Асфену 381 оказалось 30,0% вариантов, Дезомиксу П – 40,0%, Микробаку форте – 20,0%, Полидезу – 63,0%. Среди энтеробактерий устойчивые варианты выявлены по отношению к Асфену 381 (90,0%), Дезомиксу П (92,0%), Микробаку форте (40,0%), Полидезу (10,0%), Дезомиксу ИМ (10,0%).

Для всех испытанных популяций стафилококков была характерна неоднородность по признаку чувствительности – устойчивости к большинству испытанных дезинфектантов, что является важным фактором селекции и формирования устойчивых к ним вариантов бактерий (Будевская и др., 1989; Красильников и др., 1989; Krasilnikov et, al., 1992; Абаев и др., 1996; Леонович, 1999; Титов и др., 1999).

Нами (Кряжев и соавт., 2017) была изучена чувствительность к дезинфицирующим средствам у 99 штаммов КОС, выделенных от новорожденных и с объектов внешней среды в детском стационаре, отнесенных к 2 видам: *S. epidermidis* (60 штаммов), *S. haemolyticus* (39 штаммов).

Из всех тестируемых микроорганизмов 61,0% были оценены как чувствительные, 38,0% – не полностью чувствительные, 1,0% – устойчивые.

Наблюдалось различие в проявлении чувствительности к дезинфицирующим средствам в зависимости от вида микроорганизмов. Более чувствительными оказались штаммы *S. epidermidis* (72,1%) не полностью

чувствительных 26,3%, устойчивых 1,6%; и менее чувствительными – *S.haemolyticus* (35,9%), не полностью чувствительных 64,1% (рис. 6).

Наиболее высокую чувствительность штаммы КОС проявили к препаратам «Жавилар Эффект» – 94,0% и «Авансепт» – 89,0% от общего количества.

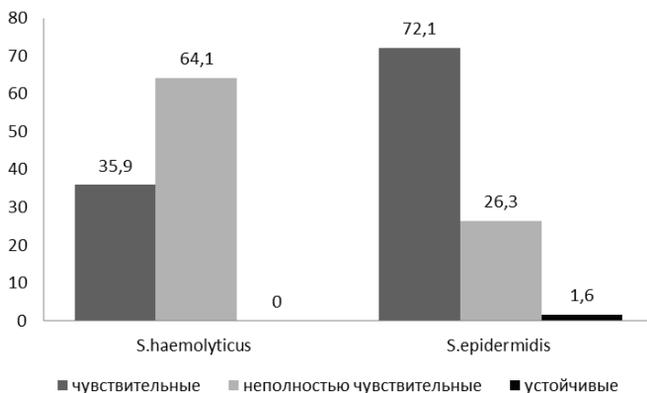


Рисунок 6. Штаммы чувствительные / не полностью чувствительные / устойчивые к дезинфектантам (%)

Неполную чувствительность штаммы КОС максимально проявили в отношении «Сепотосана-Т» – 33,0% от общего количества (табл. 9).

Таблица 9

Чувствительность выделенных штаммов к дезинфицирующим препаратам

Вид	«Авансепт»			«Жавилар Эффект»			«Сепотосан-Т»		
	чувствительные	не полностью чувствительные	устойчивые	чувствительные	не полностью чувствительные	устойчивые	чувствительные	не полностью чувствительные	устойчивые
<i>S.haemolyticus</i>	94,9%	5,1%	0,0%	94,9%	5,1%	0,0%	48,7%	51,3%	0,0%
<i>S.epidermidis</i>	90,2%	8,2%	1,6%	95,1%	4,9%	0,0%	77,1%	21,3%	1,6%

Анализ полученных результатов показал, что культуры КОС, устойчивые к действию дезинфектантов, также проявляли полирезистентность к антибиотикам и бактериофагам. Так, штамм *S.epidermidis*, выделенный в 8-ом отделении с кожи пациента, обладал устойчивостью к оксациллину (пенициллины), цефтриаксону и цефотаксиму (цефалоспорины III поколения) и всем фагам, а также отличался неполной чувствительностью к дезсредствам «Авансепт» и «Сепотосан-Т». У штамма *S.epidermidis*, выделенного в отделении реанимации и интенсивной терапии (ОРИТ) из глаза пациента, отмечена полирезистентность к антибиотикам пенициллинового ряда, цефалоспорином III и IV поколения, карбапенемам и пио-поливалентному, интести- и пио-комплексному бактериофагам, устойчивость к дезсредствам «Авансепт» и «Сепотосан-Т» и неполная чувствительность к препарату «Жавилар Эффект». Штамм *S.haemolyticus*, выделенный в ОРИТ с интубационной трубки был устойчив к действию макролидов, пенициллинов, цефалоспоринов III и IV поколения, карбапенемов и характеризовался неполной чувствительностью к дезсредствам «Авансепт» и «Сепотосан-Т». Штамм *S.haemolyticus*, выделенный из смыва с рук медсестры был устойчив к

действию макролидов, пенициллинов, цефалоспоринов III поколения, аминогликозидов и всех фагов, а также продемонстрировал неполную чувствительность к препаратам «Авансепт» и «Сепотосан-Т».

7. Исследование некоторых факторов патогенности КОС

Одним из показателей вирулентности культур бактерий является их гемолитическая активность (Усвяцов и соавт., 2006). Для представителей *S.haemolyticus* это является видовым признаком и в наших исследованиях все выделенные штаммы *S.haemolyticus*, а также *S.warneri* проявляли гемолитическую активность (ГА), тогда как 9,5% и 6,5% *S.epidermidis* и *S.hominis* соответственно, не обладали этим признаком. Однако исследованные культуры различались по количественному выражению ГА (табл. 10).

Таблица 10

Гемолитическая активность штаммов КОС, выделенных в детском стационаре

Вид	Количество культур с ГА(%)				
	Всего культур	«-»*	«+-»*	«+»*	«++»*
<i>S.epidermidis</i>	126	9,5	16,7	28,6	45,2
<i>S.haemolyticus</i>	102	0	2,0	13,7	84,3
<i>S.hominis</i>	24	6,5	3,2	51,6	38,7
<i>S.warneri</i>	12	0	25,0	41,7	33,3

Примечание: *«-» – зона гемолиза отсутствует, «+» – зона гемолиза менее 0,5 мм, «+-» – зона гемолиза 0,5-1,9 мм, «++» – зона гемолиза 1,9 мм и более

Наибольшее количество культур с высокими показателями ГА (84,3%) было отмечено у *S.haemolyticus*. В свою очередь среди штаммов *S.epidermidis*,

высокими показателями ГА обладали 45,2%. Больше половины штаммов *S.hominis* (51,6%) обладали средней по показателям ГА, а 38,7% проявляли высокую ГА. Треть культур *S.warneri* (33,3%) показали высокую ГА, а четверть (25,0%) – низкую.

Количественные значения ГА *S.haemolyticus* были достоверно выше ($4,098 \pm 0,139$ мм), чем у штаммов *S.epidermidis* ($1,798 \pm 0,105$ мм) и *S.warneri* ($2,000 \pm 0,381$), при $p=0,05$.

Одним из факторов патогенности бактерий считается их способность гидролизовать белковые субстраты, что во многом определяет их инвазию в ткани макроорганизма. Исследованные нами культуры КОС не проявляли значительной протеолитической активности (табл. 11). Так, среди исследуемых культур высокую протеолитическую активность (ПА) показали только 4,2% штаммов *S.hominis*. Большая часть исследованных штаммов *S.haemolyticus* и *S.warneri* проявили очень низкую ПА, тогда как 92% культур *S.epidermidis* показали низкую и среднюю ПА, а 12,5% штаммов *S.hominis* - среднюю и высокую. Наиболее высокой протеолитической активностью обладали штаммы *S.epidermidis*: уровень ПА у штаммов *S.epidermidis* ($0,663 \pm 0,044$ е.а./мл) был достоверно выше, чем у штаммов *S.hominis* ($0,386 \pm 0,089$ е.а./мл) и *S.warneri* ($0,109 \pm 0,038$ е.а./мл) при $p=0,05$.

Протеолитическая активность штаммов коагулазоотрицательных стафилококков, выделенных в детском стационаре

Вид	Количество культур с ПА(%)				
	Всего культур	<0,1 е.а/мл*	0,1-0,9 е.а/мл*	0,9-4,9 е.а/мл*	>4,9 е.а/мл*
<i>S.epidermidis</i>	126	7,9	76,1	15,9	0
<i>S.haemolyticus</i>	102	76,5	22,5	1,0	0
<i>S.hominis</i>	24	45,8	41,6	8,3	4,2
<i>S.warneri</i>	12	75,0	25,0	0	0

Примечание: *<0,1 е.а/мл – очень низкая активность, 0,1-0,9 е.а/мл – низкая активность, 0,9-4,9 е.а/мл – средняя активность, >4,9 е.а/мл – высокая активность

Сравнение показателей протеолитической и гемолитической активности (табл. 12), проведенное методом корреляционного анализа с определением коэффициента ранговой корреляции Спирмена, показало, что связь между протеолитической и гемолитической активностью сильная и обратная, коэффициент ранговой корреляции статистически значим и ранговая корреляционная связь между оценками по двум тестам значимая. Данные результаты могут свидетельствовать о том, что протеолитическая активность подавляет гемолитическую. Аналогичный эффект был показан для *Bacillus anthracis* О.И Цыганковой с соавторами (1998), однако требуются дальнейшие исследования для подтверждения или опровержения этого факта.

Таблица 12

Средние показатели гемолитической и протеолитической активности штаммов коагулазоотрицательных стафилококков, выделенных в детском стационаре

Вид	ПА, е.а./мл	ГА, мм
<i>S.epidermidis</i>	0,663±0,044	1,798 ±0,105
<i>S.haemolyticus</i>	0,096 ±0,021	4,098±0,139
<i>S.hominis</i>	0,386±0,089	1,916 ±0,228
<i>S.warneri</i>	0,109±0,038	2,000±0,381

Заключение

Анализ приведенных в настоящей монографии данных литературы показывает, что с конца 90-х годов прошлого века в стационарах России отмечается рост частоты выделения антибиотикорезистентных стафилококков, что делает неэффективным использование многих антимикробных препаратов и существенно ухудшает качество оказания медицинской помощи населению. В этих условиях совершенствование методов эпидемиологического и микробиологического мониторинга, направленных на выявление эпидемически значимых штаммов, все более актуальна. Существует также необходимость организации эффективного надзора и контроля за циркуляцией штаммов КОС на локальном уровне — в лечебно-профилактическом учреждении, что позволит разработать меры профилактики роста множественной резистентности, проводить адекватную антимикробную терапию и санитарно-противоэпидемические мероприятия.

В условиях экологического и социального неблагополучия, изменившейся иммунологической резистентности организма человека, нерационального использования значительного арсенала антибактериальных препаратов и антисептических средств наблюдается изменение этиологической структуры возбудителей современных гнойно-септических инфекций. В этиологической структуре госпитальной инфекции новорожденных грамположительная флора составляет от 17 до 40 % и представлена стафилококками и стрептококками, причем преобладают коагулазоотрицательные стафилококки. Причем среди коагулазоотрицательных стафилококков, выделенных нами в детском стационаре, преобладали штаммы *S.epidermidis* и *S.haemolyticus*. Полирезистентными (устойчивыми к трем и более антибиотикам) были более 70% исследованных нами культур КОС, причем максимальные показатели устойчивости к антибиотикам показали штаммы *S.haemolyticus*. Наибольшую чувствительность культуры КОС проявляют к амикацину и ванкомицину. Большинство исследованных штаммов

КОС устойчиво к секстафагу, пиобактериофагу поливалентному, интести-бактериофагу, пиобактериофагу комплексному. Наилучший результат по фаголизису показал стафилококковый бактериофаг.

Профилактика ГСИ включает комплекс дезинфекционных мероприятий, направленных на уничтожение патогенных и условно-патогенных микроорганизмов на объектах в окружении пациента, при этом недостаточно учитывается специфика, закономерности бактериальной контаминации и перманентного реинфицирования различных биотопов организма человека, включая новорожденных.

Так, не полностью чувствительными к дезинфицирующим средствам были 38,0% исследованных нами культур КОС, причем минимальные показатели чувствительности показали штаммы *S.haemolyticus*. Наибольшую чувствительность культуры КОС проявляют к препаратам «Жавилар Эффект» и «Авансепт». Из этого следует необходимость осуществления мер, направленных на сдерживание селекции штаммов микроорганизмов, резистентных к дезинфицирующим средствам и антисептикам, путём повышения качества проведения дезинфекции, совершенствования тактики дезинфекционных мероприятий с учётом результатов мониторинга резистентности микроорганизмов к дезинфектантам.

Были изучены, некоторые ключевые биологические характеристики исследованных нами культур КОС. В частности, способность к формированию биопленки был выявлена у всех исследованных штаммов. Наибольшей гемолитической активностью обладали штаммы *S.haemolyticus* (84,3%), а 9,5% и 16,7% *S.epidermidis* и *S.hominis* соответственно не обладали гемолитической активностью. Изучение внеклеточной протеолитической активности исследованных штаммов выявило, что данным фактором патогенности обладают в большей степени штаммы *S.epidermidis* и *S.hominis*, тогда как культуры *S.haemolyticus* и *S.warneri* обладали низким уровнем протеолитической активности. Самые высокие показатели протеолитической активности были у

4,2% штаммов *S.hominis*. Была найдена обратная прямая корреляционная связь между протеолитической и гемолитической активностью, что может свидетельствовать об их подавляющем действии друг на друга.

В свете проведенного анализа полученных нами данных о распространенности коагулазоотрицательных стафилококков в детском стационаре представляется важным в дальнейшем изучать их носительство среди медицинского персонала отделений реанимации, онкологии, хирургических и акушерских стационаров.

Литература

1. Абаев Ю.К., Адарченко А.А. Динамика устойчивости к антисептикам возбудителей гнойно-воспалительных заболеваний мягких тканей у детей // Вестник хирургии. 1996. №4. С.35-37.
2. Авчинников А.В., Егоричева С.Д. Гигиенические аспекты профилактики инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи в акушерских стационарах. Вестник Смоленской государственной медицинской академии. 2015. № 14(3). С. 92–96.
3. Бактериофаги: биология и практическое применение / Под ред. Э. Каттер, А. Сулаквелидзе // Пер. с англ.; науч. ред. А.В. Летаров. М.: Научный мир, 2012. 640 с.
4. Беляева Е.В., Ермолина Г.Б., Кичикова В.В., Борискина Е.В. Электрофоретическое типирование стафилококков, циркулирующих в акушерском стационаре // Мат-лы XIII Всероссийского конгресса «Экология и здоровье человека». - Известия Самарского научного центра РАН. Спец.выпуск. 2008. Т.1. С. 23-29.
5. Беляева Е.В., Борискина Е.В., Ермолина Г.Б., Кичикова В.В., Любавина Н.А., Макарова Е.В., Меньков Н.В., Шкуркина И.С. Биологическая характеристика бактерий, колонизирующих слизистые оболочки дыхательных путей, при хронических заболеваниях // Медицинский альманах. 2009. № 2. С. 114–117.
6. Беляева Е.В., Ермолина Г.Б., Борискина Е.В., Шкуркина И.С., Носова Т.В., Белова И.В., Точилина А.Г., Соловьева И.В., Никифоров В.А. Биологическая характеристика эковаров коагулазонегативных стафилококков, выделенных от новорожденных пациентов детского стационара. Медицинский альманах. 2016. № 3(43). С. 36–39.
7. Благонравова А.С., Воробьева О.Н., Ковалишена О.В., Алексеева И.Г., Иванова Н.Ю., Широкова И.Ю., Саперкин Н.В. Эпидемиологические и

- микробиологические аспекты госпитальных гнойно-септических инфекций новорожденных, обусловленных коагулазоотрицательными стафилококками. Медицинский альманах. 2009. № 2(7). С. 72–74.
8. Будевская Т.В., Адарченко А.А., Соснин Г.Г. Показатели чувствительности микроорганизмов к антисептикам при апикальном периодонтите // Стоматология. 1989. №3. С. 23-25.
9. Гриценко В.А., Бирюкова Т.В., Вялкова А.А., Иванов Ю.Б. Видовая структура и характеристика биопрофиля стафилококков – возбудителей перинатальной инфекционно-воспалительной патологии у детей Оренбурга. Журнал микробиологии. 2014. № 5. С. 90–95.
10. Дегтева Г.К., Беляева Е.В., Ермолина Г.Б. Белковые системы бактерий. Роль в таксономии и эпидемиологической практике. Нижний Новгород. Изд-во Нижегородского госуниверситета. 1999. 138 с.
11. Дерябин Д.Г. Стафилококки: экология и патогенность. Екатеринбург: УрО РАН. 2000. 239 с.
12. Дехнич А.В. // Клин. микробиол. антимикроб. химиотер. 1999. Т. 1. №1. С. 89–91.
13. Дмитренко О.А. Молекулярно-генетические аспекты эпидемиологии внутрибольничных инфекций, вызванных представителями вида *Staphylococcus aureus*, устойчивыми к метициллину/оксациллину. Дисс... докт. мед. наук. 2008.
14. Добровольский О.В., Сереброва С.Ю. Терапия язвенной болезни и проблемы сохранения микроэкологии желудочно-кишечного тракта // Русский Медицинский Журнал. 2007. Т. 15. № 16. С. 1193–1198.
15. Ерошенко Д.В., Коробов В.П. Сравнительный анализ формирования и разрушения биопленок P/A-отрицательных бактерий *Staphylococcus epidermidis* под действием гидролитических факторов // Вестник Томского государственного университета. Биология. 2015. № 1 (29). С. 28–36.

16. Зайцев А.А., Карпов О.И., Сидоренко С.В. Стафилококки и ванкомицин: тенденции противостояния // Антибиотики и химиотерапия. 2003. Т. 48. № 6. С. 20-26.
17. Кононова Л.И., Коробов В.П. Изменение биологических свойств бактерий *Staphylococcus epidermidis* 33 при формировании устойчивости к ванкомицину // Известия Самарского научного центра Российской академии наук. 2011. Т. 13, № 5(3). С. 152 – 155.
18. Коробов В.П., Лемкина Л.М., Полудова Т.В., Акименко В.К. Выделение и характеристика нового низкомолекулярного антибактериального пептида семейства лангибиотиков // Микробиология. 2010. Т. 79. № 2. С. 228-238.
19. Коробов В.П., Лемкина Л.М., Филатова Л.Б., Полудова Т.В. Разрушение биопленок коагулазонегативных стафилококков катионным пептидом варнерином // Известия Самарского научного центра Российской академии наук. 2011. Т. 13. № 5(3). С. 156-159.
20. Красильников А.П., Адарченко А.А., Собошук О.П., Чувствительность к антисептикам клинических штаммов *Staphylococcus aureus* // ЖМЭИ. 1989. №7. С.30-36.
21. Кряжев Д.В., Беляева Е.В., Борискина Е.В., Ермолина Г.Б., Никифоров В.А., Носова Т.В., Соловьева И.В., Шкуркина И.С. Чувствительность к антибиотикам, дезинфектантам и бактериофагам экзотрофов коагулазонегативных стафилококков, выделенных в детском стационаре // Медицинский альманах. 2017. №4. С. 66-69.
22. Кузнецова М.В., Николаева Н.В., Розанова С.М., Карпунина Т.И. Формирование биопленок нозокомиальными штаммами *Pseudomonas aeruginosa* // Журнал микробиологии. 2011. № 4. С. 8–14.
23. Кузнецова М.В., Карпунина Т.И., Авдеева Н.С. Мониторинг колонизации условно-патогенной микрофлорой новорожденных в период пребывания в лечебных учреждениях // Медицинский альманах. 2011. №6. С.156-159.

24. Лабинская А.С., Блинкова Л.П., Ещина А.С. Частная медицинская микробиология с техникой микробиологических исследований. М.: Медицина. 2005. 616 с.
25. Лабинская А.С., Костюкова Н.Н., Иванова С.М. Частная медицинская микробиология и этиологическая диагностика инфекций. М.: Бином. 2014. 1128 с.
26. Леонович С.С. Клиническая и микробиологическая оценка открытого метода лечения ожоговой раны. // Внутрибольничные инфекции – проблемы эпидемиологии, клиники, диагностики, лечения и профилактики: Тез. докл. Росс. Науч.-практ. конф. с междунар. участием. М. 1999. С. 137-138.
27. Маянский А.Н. Патогенетическая микробиология: руководство. Н.Новгород: Издательство Нижегородской государственной медицинской академии, 2006. 520 с.
28. Митрофанова Н.Н., Мельников В.Л., Слётов М.М. Анализ данных микробиологического мониторинга в многопрофильном стационаре // Медицинский альманах. 2009. № 2. С. 90–92.
29. Никулин А.А., Дехнич А.В. // Клин. микробиол. антимикроб. химиотер. 2010. Т. 12. № 1. С. 4–22.
30. Околов И.Н., Гурченко П.А., Вохмяков А.В. Резистентность к антибиотикам коагулазонегативных стафилококков, выделенных у больных конъюнктивитами // Офтальмологические ведомости. 2009. Т. II. № 2. С. 43-47.
31. Пяташина М.А., Авдонина Л.Г., Нуруллова Н.С., Трифонов В.А., Локоткова А.И., Мамкеев Э.Х., Сабаева Ф.С. Особенности заболеваемости инфекциями, связанными с оказанием медицинской помощи в республике Татарстан. Медицинский альманах. 2015. № 5(40). С. 48–49.

32. Покровский В.И., Акимкин В.Г., Брико Н.И., Брусина Е.Б., Зуева Л.П., Ковалишена О.В., Стасенко В.Л., Тутельян А.В., Фельдблюм И.В., Шкарин В.В. Национальная концепция профилактики инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи, и информационный материал по ее положениям. Н. Новгород. Ремедиум Приволжье. 2012. 84 с.
33. Присакарь В.И., Спэтару Д.Ю. Чувствительность возбудителей внутрибольничных гнойно-септических инфекций к дезинфицирующим средствам // Медицинский альманах. 2015. № 5 (40). С. 109-111.
34. Сергевнин В.И., Клюкина Т.В., Зуева Н.Г., Волкова Э.О. Устойчивость к дезинфицирующим средствам госпитального штамма *Staphylococcus haemolyticus*, выделенного в акушерском стационаре при неединичной заболеваемости новорожденных гнойно-септическими инфекциями // ЗНиСО. 2012. № 7 (232). С. 19-20.
35. Сергевнин В.И., Редько С.В. Особенности эпидемического процесса гнойно-септических инфекций, ассоциированных с коагулазоотрицательными стафилококками, среди новорожденных // Пермский медицинский журнал. 2007. том XXIV. № 3. С. 84-89.
36. Сергевнин В.И., Клюкина Т.В., Ключарева Н.М. и др. Чувствительность возбудителей внутрибольничных гнойно-септических инфекций к дезинфицирующим средствам и антибиотикам // Журнал микробиологии. 2014. № 4. С. 61–65.
37. Сидоренко С.В., Тишков В.И. Молекулярные основы резистентности к антибиотикам // Успехи биологической химии. 2004. Т. 44. С. 263-306.
38. Тетелютина Е.С. Особенности эпидемиологической характеристики внутрибольничной инфекции родильниц и новорожденных в акушерских стационарах Удмурдской республики. Медицинский альманах. 2012. 5(24). С. 51–53.

39. Титов Л.П., Адарченко А.А., Гудкова Е.И., Микробиологический мониторинг устойчивости возбудителей внутрибольничных инфекций к антимикробным препаратам // Мед. новости. 1999. №8. С. 8-10.
40. Тюрин Ю.А., Долбин Д.А. Роль факторов патогенности золотистых стафилококков в развитии атопического дерматита // Журн. микробиол. 2008. № 4. С. 105–110.
41. Усвятцов Б.Я., Хуснутдинова Л.М., Паршута Л.И., Ханина Е.А., Долгов В.А., Поршина О.В. Роль факторов персистенции и вирулентности при микробиологических изменениях в организме человека // Журн. микробиол. 2006. №4. С. 58-61.
42. Цыганкова О.И., Еременко Е.И., Буравцева Н.П. Способ определения гемолитической активности *Bacillus anthracis* // Патент РФ на изобретение № 2121506. Заявитель и патентообладатель Ставропольский научно-исследовательский противочумный институт. Заявка № 95116978/13; заявл. 04.10.1995; зарег. во ФГУП «Роспатент» 10.11.1998.
43. Чанышева Р.Ф., Ковалишена О.В. Состояние фагочувствительности стафилококков – возбудителей инфекций в медицинских организациях Нижегородской области // медицинский альманах. 2014. № 2 (32). С. 32-35.
44. Шаркова В.А., Лайман Е.Ф., Мазур М.Е., Просяникова М.Н. Молекулярно-генетический мониторинг метицилину-стойчивых штаммов *Staphylococcus spp.* // Клиническая микробиология и антимикробная терапия. 2012. Т.14, № 2. Прил. 1: тезисы XIV Международного конгресса МАКМАХ по антимикробной терапии. С. 57.

- 45.Шкарин В.В., Благонравова А.С. Термины и определения в эпидемиологии: словарь. Н. Новгород: Издательство НГМА, 2010. 300с.
- 46.Шкарин В.В., Саперкин Н.В., Ковалишена О.В., Благонравова А.С., Широкова И.Ю., Кулюкина А.А. Региональный мониторинг устойчивости микроорганизмов к дезинфектантам: итоги и перспективы. Медицинский альманах. 2012. № 3 (22). С. 122–125.
- 47.Brusina E., Drozdova O., Zueva L., Akimkin V., Fedorova L. Complex application of bacteriophages as a method of healthcare-associated infections control // Antimicrobial Resistance and Infection Control. 2015. Vol. 4. № 1. P. 46.
- 48.Bloemendaal A.L., Brouwer E.C., Fluit A.C.. Methicillin resistance transfer from *Staphylococcus epidermidis* to methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* in a patient during antibiotic therapy // PLoS One. 2010. V. 5 (7). P. 11841.
- 49.Bootsma M.C., Diekmann O., Bonten M.J. Controlling methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* quantifying the effects of interventions and rapid diagnostic testing // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2006. Vol. 103, No. 14. P. 5620–5625.
- 50.Dickschat, J.S. Quorum sensing and bacterial biofilms // Nat. Product Reports. 2010. Vol. 27. P. 343–369.
- 51.Emori T.G., Gaynes R.P. An Overview of Nosocomial Infections, Including the Role of the Microbiology Laboratory. Clinical Microbiology Reviews. 2007. № 6. P. 428–442.

52. Freeman D.J., Falkiner F.R., Keane C.T. New method for detecting slime production by coagulase negative staphylococci // *J. Clin Pathol.* 1989. № 42. P. 872-874.
53. Howden B.P., Davies J.K., Johnson P.D.R. Reduced vancomycin susceptibility in *Staphylococcus aureus*, including vancomycin-intermediate and heterogeneous vancomycin-intermediate strains: resistance mechanisms, laboratory detection and clinical implications // *Clin. Microbiol. Rev.* 2010. V. 23. № 1. P. 99-138.
54. Jarvis W.R. The epidemiology of colonization. *Infect. Control. Hosp. Epidemiol.* 1996. № 17(1). P. 47–52.
55. Katayama Y., Ito T., Hiramatsu K. // *Antimicrob. Agents Chemother.* 2000. Vol. 44, N 6. P. 1549-1555.
56. Kariyama R. Increase of cardiolipin content in *Staphylococcus aureus* by the use of antibiotics affecting the cell wall // *J. Antibiot.* 1982. V. 35. № 12. P. 1700-1704.
57. Kobayashi N., Urasawa S., Uehara N. et al. // *Antimicrob. Agents Chemother.* 1999. Vol. 43, № 11. P. 2780–2782.
58. Krasilnikov A.P., Adarchenko A.A., Gudkova E.I. Klinische Bedeutung der Empfindlichkeit nosokomialer bakteriellen Krankenhäuserreger gegen Antiseptika // *Klinische Antiseptik.* Berlin. 1992. Kap. 21. P.401 – 404.
59. Machado A. B. M. P., Reiter K. C., Paiva R. M. et al. // *J. Med. Microbiol.* 2007. Vol. 56. P. 1312 –1333.
60. Mack D., Davies A.P., Harris L.G., Knobloch J.K.M., Rohde H. *Staphylococcus epidermidis* biofilms: Functional molecules, relation to virulence, and vaccine potential // *Top Curr Chem.* 2009. № 288. P. 157-182.
61. Palazzo I.C.V., Araujo M.L.C., Darini A.L.C. First report of vancomycin-resistant staphylococci isolated from healthy carriers in Brazil // *J. Clin. Microbiol.* 2005. V. 43. № 1. P.179-185.

62. Plata K., Rosato A., Wegrzyn G. *Staphylococcus aureus* as an infectious agent: overview of biochemistry and molecular genetics of its pathogenicity // Acta. Biochim. Pol. 2009. Vol. 56 (4). P. 597–612.
63. Qin Z., Yang X., Yang L., Jiang J., Ou Y., Molin S., Qu D. Formation and properties of in vitro biofilms of ica-negative *Staphylococcus epidermidis* clinical isolates // J. Med Microbiol. 2007. № 56(1). P. 83-93.
64. Rohde H., Burandt E.C., Siemssen N., Frommelt L., Burdelski C., Wurster S., Scherpe S., Davies A.P., Harris L.G., Horstkotte M.A., Knobloch JK-M., Rangunath C., Kaplan J.B., Mack D. Polysaccharide intercellular adhesin or protein factors in biofilm accumulation of *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus aureus* isolated from prosthetic hip and knee joint infections. Biomaterials. 2007. № 28(9). P. 1711-1720.
65. Ruppe E., Barbier F., Mesli Y. et al. Diversity of staphylococcal cassette chromosome mec structures in methicillin-resistant *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus haemolyticus* strains among out patients from four countries // Antimicrob. Agents and Chemother. 2009. V. 53 (2). P. 442 – 449.
66. Sawant A.A., Gillespie B.E., Oliver S.P. Antimicrobial susceptibility of coagulase-negative *Staphylococcus* species isolated from bovine milk / Vet. Microbiol. 2009. Vol.134(1–2). P.73–81.
67. Siebert W.T., Moreland N., Williams T.W., Jr. Synergy of vancomycin plus cefazolin or cephalotin against methicillin resistance *Staphylococcus epidermidis* // J. Infect. Dis. 1979. V. 139. № 4. P. 452-457.
68. Sieradzki K., Roberts R.B., Serur D. et al. Heterogenously vancomycin-resistant *Staphylococcus epidermidis* strain causing recurrent peritonitis in a dialysis patient during vancomycin therapy // J. Clin. Microbiol. 1999. V. 37. № 1. P. 39-44.
69. Swenson K., Hellmark B., Soderquist B. Characterization of SCCmec elements in methicillin-resistant *Staphylococcus epidermidis* isolated from

- blood cultures from neonates during three decades // APMIS. 2011. V. 119 (12). P. 885 – 893.
70. Trülsch K. *Staphylococcus pettenkoferi* sp. nov., a novel coagulase-negative staphylococcal species isolated from human clinical specimens / Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2007. Vol. 57(7). P.1543–1548.
71. van der Zee A., Roorda L., Hendriks W. et al. Detection of novel chromosome-SCCmec variants in Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus* and their inclusion in PCR based screening // BMC Res. Notes. 2011. № 4. P. 150.

**More
Books!** 



yes
I want morebooks!

Покупайте Ваши книги быстро и без посредников он-лайн - в одном из самых быстрорастущих книжных он-лайн магазинов!
Мы используем экологически безопасную технологию "Печать-на-Заказ".

Покупайте Ваши книги на
www.morebooks.de

Buy your books fast and straightforward online - at one of the world's fastest growing online book stores! Environmentally sound due to Print-on-Demand technologies.

Buy your books online at
www.morebooks.de

SIA OmniScriptum Publishing
Brivibas gatve 1 97
LV-103 9 Riga, Latvia
Telefax: +371 68620455

info@omniscrptum.com
www.omniscrptum.com

OMNIscriptum 

