

*На правах рукописи*

**Детушева Елена Владимировна**

**МОДЕЛИРОВАНИЕ БИОПЛЕНКИ У БАКТЕРИЙ НА ПЛОТНОЙ  
ПИТАТЕЛЬНОЙ СРЕДЕ И ИЗУЧЕНИЕ ЗАКОНОМЕРНОСТЕЙ  
ФОРМИРОВАНИЯ УСТОЙЧИВОСТИ К ТРИКЛОЗАНУ**

03.02.03 микробиология

**АВТОРЕФЕРАТ**

диссертации на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук

Оболенск – 2016

Работа выполнена в Федеральном бюджетном учреждении науки «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека

**Научный руководитель:** кандидат биологических наук  
**Фурсова Надежда Константиновна**

**Научный консультант:** член-корреспондент РАН,  
доктор медицинских наук, профессор  
**Дятлов Иван Алексеевич**

**Официальные оппоненты:**

**Мавзютов Айрат Радикович**, доктор медицинских наук, профессор, Государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Башкирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения и социального развития Российской Федерации, заведующий кафедрой фундаментальной и прикладной микробиологии

**Краева Людмила Александровна**, доктор медицинских наук, Федеральное бюджетное учреждение науки «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Пастера» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, заведующая лабораторией медицинской бактериологии

**Ведущая организация:**

Федеральное бюджетное учреждение науки «Нижегородский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. академика И.Н. Блохиной» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека.

Защита состоится «16» декабря 2016 года в 13 часов на заседании диссертационного совета Д 350.002.01 при Федеральном бюджетном учреждении науки «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» по адресу: 142279, Московская обл., Серпуховский район, п. Оболенск, ФБУН ГНЦ ПМБ.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Федерального бюджетного учреждения науки «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии»

Автореферат разослан «14» октября 2016 г.

Ученый секретарь  
диссертационного совета

Коломбет Любовь Васильевна

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

### ВВЕДЕНИЕ

**Актуальность темы исследования.** По данным ВОЗ, в последние десятилетия во всем мире растет число регистрируемых госпитальных (нозокомиальных) инфекций, т. е. инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи (ИСМП). ИСМП являются мировой проблемой, затрагивая все страны, вне зависимости от их географического расположения и уровня развития (ВОЗ, 2016; Bardossy et al., 2016). В России ИСМП ежегодно регистрируются у 35 тыс. пациентов. По экспертным оценкам, реальная заболеваемость ИСМП может достигать 2,5 млн. человек в год. Предполагают, что к 2050 г. число больных ИСМП в мире достигнет 10 млн. человек (Попова с соавт., 2016).

В документе «Национальная Концепция профилактики инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи» (Утв. Главным государственным санитарным врачом РФ 6 ноября 2011 г.) отмечается, что в последние годы в России были зафиксированы случаи регистрации и внедрения в практику здравоохранения неэффективных антисептических и дезинфицирующих средств, что было связано с отсутствием должной квалифицированной оценки препаратов. Многие описанные вспышки ИСМП были вызваны микроорганизмами, обладающими множественной лекарственной устойчивостью (МЛУ), а также устойчивостью ко многим дезинфицирующим средствам, что связывают с иррациональным использованием антибиотиков и с загрязнением окружающей среды биоцидами (Levy, 2000).

Биоциды — (от греч. *bios* - жизнь и лат. *caedo* - убиваю) химические вещества, способные подавлять жизнедеятельность биологических объектов. Они подразделяются на антисептики (средства для обработки биотических поверхностей) и дезинфектанты (препараты для обработки абиотических поверхностей). Причиной возникновения бактерий, устойчивых к биоцидам, зачастую является неадекватное использование дезинфектантов и антисептиков. Бактерии, подвергнутые воздействию биоцидов в сублетальных дозах, способны адаптироваться к данным веществам, что иногда приводит к формированию бактерий, резистентных не только к биоцидам, но и к антибиотикам (Buffet-Bataillon et al., 2011). Во многих случаях было показано, что одни и те же или сходные молекулярные механизмы ответственны за устойчивость бактерий к антибиотикам и за отсутствие чувствительности к биоцидам, а именно уменьшение проницаемости клеточных мембран, активация эффлюкса, ферментативная инактивация молекул биоцидов (SCENIHR, 2009; Chuanchuen et al, 2001; Steven et al., 2004; Tennent et al., 1985).

Механизмы действия биоцидов на бактериальные клетки изучены недостаточно подробно. Известно, что механизм действия биоцидов из функционального класса бигуанидинов (например, хлоргексидина) – это воздействие преимущественно на оболочку бактериальной клетки, приводящее к разрушению мембран и утечке цитоплазматического содержимого (Broxton et al., 1984). Другой класс биоцидов - фенолы (например, триклозан) действуют на специфические фармакологические мишени в бактериальной клетке, такие как фермент еноил-ацил-редуктаза FabI, участвующий в биосинтезе липидов (McMurty, 1998).

По оценке Национального института здоровья США, 80 % всех бактериальных инфекций человека связаны с формированием в пораженном организме биопленок микроорганизмов. Зрелые биопленки имеют значительно более высокую толерантность к антимикробным препаратам, поэтому определение минимальных подавляющих концентраций (МПК) лекарств предложено проводить на бактериях в составе биопленки, а не в планктонном состоянии (Nance et al., 2013). Применение современных методов визуализации изменило представления о возникновении и течении инфекционных заболеваний, обусловленных наличием биопленок. В последние годы показано, что присутствие биопленок характерно для хронических инфекций (Афиногорова и др., 2011). К настоящему времени считается доказанной роль микробных биопленок в возникновении инфекций поражающих суставные протезы и сердечные клапаны, инфекций, связанных с катетеризацией сосудов, инфекций мочевыводящих путей, пародонта, среднего уха и др. (Aparna, 2008; Costerton et al., 1999; Patel, 2005; Krzyściak et al., 2014; Афиногорова и др., 2011). Показано, что описанные в литературе неудачи использования антисептиков для гигиены кожи и слизистых пациентов отделений реанимации и интенсивной терапии (ОРИТ) могут быть связаны именно с неадекватной оценкой активности препаратов - на бульонных культурах возбудителей, а не на биопленках (EUCAST, 2014).

В связи с вышесказанным, углублённый анализ чувствительности к антибактериальным препаратам у представителей госпитальных патогенов, включая моделирование бактериальных биопленок для оценки реальной чувствительности к антисептикам, а также изучение молекулярно-генетических механизмов адаптации бактерий к антисептическим препаратам, является весьма актуальным и важным научным направлением, необходимым для совершенствования контроля внутрибольничных инфекций в Российской Федерации.

**Степень разработанности темы исследования.** Публикации последних лет содержат обширные сведения, касающиеся характера и свойств микроорганизмов, находящихся не только в планктонной форме, но и в виде микробных сообществ – биопленок. Большое количество публикаций указывает на то, что множественная резистентность госпитальной флоры к антибактериальным препаратам, в том числе к антисептикам и дезинфектантам, обусловлена преимущественным существованием микрофлоры в виде биопленочных сообществ и микробных консорциумов, способных колонизировать организм пациента, а также адсорбироваться на инвазивных медицинских устройствах (катетерах, водителях ритма, ортопедических устройствах). Доказано принципиальное отличие хронических инфекций от острых, заключающееся в большой роли биопленок при формировании хронических процессов, которые наиболее трудны в лечении, имеют высокую частоту рецидивов и зачастую приводят к летальным исходам.

В мире проводится большое количество исследований, касающихся изучения устойчивости биопленок к различным антибактериальным препаратам – антибиотикам, дезинфектантам, антисептикам. Наибольшее число исследований направлено на изучение функциональных, биохимических, морфологических и иных свойств биопленок, а также на изучение механизмов возникновения устойчивости бактерий к антибактериальным препаратам. Установлено, что механизм действия

биоцида зависит от его принадлежности к определенному функциональному классу. Так, хлоргексидин действует преимущественно на оболочку бактериальной клетки, что приводит к разрушению мембран и гибели клетки. Триклозан воздействует на фермент биосинтеза липидов FabI, что блокирует формирование полноценной бактериальной поверхности. Показано, что устойчивость к триклозану у бактерий формируется в результате возникновения точечных мутаций в гене *fabI*, приводящих к изменению конформации фермента – мишени триклозана.

**Цель исследования** – Моделирование биопленок у представителей госпитальных патогенов для изучения их чувствительности к антисептикам; изучение молекулярно-генетических механизмов устойчивости к триклозану у *Staphylococcus aureus*.

#### **Задачи исследования**

1. Создать коллекцию штаммов госпитальных патогенов и референс-штаммов для моделирования бактериальных биопленок и изучения устойчивости к антисептикам; охарактеризовать культурально-морфологические свойства штаммов и чувствительность к антибактериальным препаратам.

2. Разработать метод оценки чувствительности планктонных клеток и биопленок бактерий к антисептикам.

3. Провести сравнительную оценку чувствительности к антисептику хлоргексидину госпитальных штаммов, представителей грамположительных и грамотрицательных бактерий, в планктонных культурах и в составе биопленок. Определить концентрацию хлоргексидина, эффективную в отношении современных штаммов госпитальных бактериальных патогенов.

4. Осуществить селекцию штамма *Staphylococcus aureus* ATCC25923, устойчивого к антисептику триклозану, охарактеризовать его культурально-морфологические свойства и чувствительность к антибактериальным препаратам.

5. Определить наличие мутаций в гене *fabI*, кодирующем еноил-ацил-редуктазу *S. aureus*, необходимую для биосинтеза жирных кислот стафилококков.

6. Провести полногеномное секвенирование штамма *S. aureus* ATCC25923 и его изогенных вариантов, устойчивых к триклозану; сравнить нуклеотидные последовательности геномов.

#### **Научная новизна результатов исследования**

На основании анализа чувствительности к антибактериальным препаратам госпитальных и референс-штаммов *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii*, *Proteus mirabilis*, *Escherichia coli* и *Staphylococcus aureus* при разных условиях культивирования получены новые знания о возможности моделирования биопленкообразования у бактерий при культивировании на плотных питательных средах. На микроскопическом уровне выявлены особенности морфологии бактериального газона, аналогичные структурам биопленок и макроколоний на примере штамма *A. baumannii* B-1745, для которого показано наличие пиле-подобных структур и слизистого матрикса, характерных для клеток *A. baumannii* в составе биопленки.

Показано, что антисептик хлоргексидин эффективен против антибиотикорезистентных госпитальных штаммов *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa*,

*A. baumannii* и *P. mirabilis* в концентрации 1,5 %, в отличие от концентрации 0,05 %, рекомендованной инструкцией по применению.

В условиях селективного давления в течение 40 суток получены два мутантных штамма *S. aureus* ATCC25923 – *S. aureus* Tr1 и *S. aureus* Tr2, устойчивых к 64 мг/л триклозана, характеризующихся наличием точечных мутаций в гене еноил-ацил-редуктазы *fabI* и в других генах, ассоциированных со структурами клеточной стенки и клеточным транспортом, что, вероятно оказывает влияние на формирование устойчивости к триклозану. Названные мутации стабильно наследовались и не утрачивались при длительном культивировании в течение 26 месяцев в отсутствие селективного давления, что подтверждено полногеномным секвенированием отобранных новых вариантов штаммов - *S. aureus* Tr1C и *S. aureus* Tr2C.

### **Теоретическая и практическая значимость работы**

Создана и охарактеризована рабочая коллекция штаммов госпитальных патогенов для использования в качестве референс-штаммов при изучении процессов биопленкообразования и формирования устойчивости к антисептикам. Разработан трехэтапный метод оценки чувствительности планктонных клеток и биопленок микроорганизмов к антисептикам (Методические рекомендации, Оболенск, 2016) – учрежденческий уровень внедрения.

Определена эффективная концентрация хлоргексидина (1,5 %), использование которой в программе ухода за пациентами отделения нейрореанимации позволило уменьшить интенсивность циркуляции патогенов - возбудителей нозокомиальных инфекций и снизить уровень заболеваемости инфекциями дыхательной системы пациентов, находящихся на искусственной вентиляции легких (Акт внедрения НИИ нейрохирургии им. Н.Н. Бурденко №1 от 06.04.2016) – межведомственный уровень внедрения.

В Государственной коллекции патогенных микроорганизмов «ГКПМ-Оболенск» депонированы четыре мутантных штамма *S. aureus* Tr1, *S. aureus* Tr2, *S. aureus* Tr1C и *S. aureus* Tr2C, устойчивых к высоким концентрациям триклозана (Справки о депонировании № 15 и № 16 от 18 марта 2016 г.; № 35 и № 36 от 27 мая 2016) - федеральный уровень внедрения.

В международной базе данных GenBank депонированы две последовательности мутантных генов *fabI*, кодирующих фермент еноил-ацил-редуктазу в штаммах *S. aureus* ATCC25923-Tr1 и ATCC25923-Tr2, устойчивых к триклозану (GenBank KP100447 и KP100446) – международный уровень внедрения.

### **МЕТОДОЛОГИЯ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ**

Методология диссертационной работы состоит в комплексном подходе к оценке чувствительности к биоцидам, основанном на гипотезе о различиях культурально-морфологических свойств планктонных клеток и клеток в составе биопленки. Показана адекватность подхода моделирования бактериальных биопленок на поверхности плотной питательной среды (микробиологическими, микроскопическими и биофизическими методами). В ходе работы был разработан трехэтапный метод оценки чувствительности бактерий к антисептикам. Показаны различия в чувствительности

бактерий в планктонном состоянии и в составе биопленок к антисептикам (на примере хлоргексидина). Определена эффективная концентрация хлоргексидина против современных штаммов госпитальных бактериальных патогенов.

Методом селекции бактерий при выращивании в средах с триклозаном получены триклозан-устойчивые варианты штамма *Staphylococcus aureus* ATCC25923, которые охарактеризованы микробиологическими и молекулярно-генетическими методами. Выявлены мутации в гене еноил-ацил-редуктазы FabI, являющейся мишенью действия триклозана, а также в четырех других генах, которые, предположительно, также ассоциированы с устойчивостью *S. aureus* к триклозану.

Научная литература, посвященная исследованиям в области мониторинга устойчивости бактерий к биоцидам, сравнительному изучению бактерий в планктонных культурах и биопленках, механизмам устойчивости бактерий к антибактериальным препаратам, проанализирована формально-логическими методами. В работе использованы микробиологические, биофизические, молекулярно-генетические, биоинформационные и статистические методы исследований.

### **Штаммы микроорганизмов**

В работе использованы штаммы *Klebsiella pneumoniae* (n=8), *Pseudomonas aeruginosa* (n=4), *Acinetobacter baumannii* (n=4) и *Proteus mirabilis* (n=3), выделенные от пациентов нейрореанимации в 2013 г., а также референс-штаммы, рекомендованные Научно-исследовательским институтом дезинфектологии Роспотребнадзора для оценки активности дезинфектантов и антисептиков, полученные из Государственной коллекции патогенных микроорганизмов «ГКПМ-Оболенск»: *K. pneumoniae* ATCC700603, *E. coli* ATCC25922, *S. aureus* ATCC25923 и *P. aeruginosa* ATCC27853.

### **Препараты антисептиков**

В работе использованы препараты антисептиков: «Дезин» - 20 %-ный водный раствор хлоргексидина (ООО Дезиндустрия, Россия), и триклозан - (Sigma-Aldrich Chemie, Германия).

### **Микробиологические методы**

Антибактериальную активность антисептиков оценивали: методом серийных разведений в бульоне (МУК 4.2.1890-04), методом разведения в агаре, аппликативным методом.

Чувствительность к антибиотикам бактериальных штаммов определяли диско-диффузионным методом (МУК 4.2.1890-04).

Селекцию устойчивых к триклозану вариантов штамма *S. aureus* ATCC25923 проводили путем пересевов в питательном бульоне с повышающимися концентрациями триклозана. Стабильность наследования устойчивости к триклозану изучали при культивировании в отсутствие селективного давления течение 26 месяцев.

Определение параметров роста колоний (бактериальный фитнес) проводили по «скорости роста диаметра колоний одноклеточных микроорганизмов» (Родин и др., 1998) по следующим показателям:

$K_D$ , (мм/ч) - скорость линейного роста диаметра колоний

$D_t$  - величина диаметра колонии к  $t$  часам инкубирования

$t_{1mm}$ , (час) - время достижения колониями диаметра в 1мм

$\mu_m$ , (ч<sup>-1</sup>) - максимальная удельная скорость роста биомассы колоний

$G_T$  – время одной генерации

$D_{24}$ , (мм) - диаметр колоний к 24 часам инкубации

Диаметр колоний измеряли восемь раз в течение 16 ч культивирования с использованием микроскопа Ломо Микмед Д-2 (ЛОМО, Санкт-Петербург, Россия).

Моделирование бактериальных биопленок проводили тремя способами: (1) на разделе фаз жидкость–твёрдая поверхность на купоне из полистирола в колбе с питательным бульоном; (2) на разделе фаз жидкость–воздух в пробирке с бульоном без аэрации; (3) на разделе фаз твёрдая поверхность–воздух в чашке Петри.

#### **Биофизические методы исследования**

MALDI масс-спектрометрия. Пробоподготовку образцов для масс-спектрометрии проводили по инструкции производителя (Bruker Daltonics, Германия). Масс-спектры анализировали с помощью программного обеспечения flexControl и flexAnalysis (Bruker Daltonics, Германия).

Атомно-силовую микроскопию использовали для визуализации отпечатка планктонных клеток и биопленки на пластинке слюды на приборе AFM Smart SPM (Аист NT, Москва).

Электронную микроскопию осуществляли в сканирующем электронном микроскопе S-450 (Hitachi, Япония) при ускоряющем напряжении 30 кВ.

#### **Молекулярно-генетические методы исследования**

Выделение бактериальной ДНК осуществляли СТАВ-методом (Thomas John et al, 1997). Концентрацию ДНК определяли с помощью спектрофотометра Gene Quantpro RNA/DNA Calculator (Amersham Biosciences, Великобритания).

Полимеразную цепную реакцию (ПЦР) на ДНК последовательность гена *fabI*, кодирующего еноил-ацил-редуктазу, осуществляли на амплификаторе (Thermo Fisher Scientific, Европа) с помощью специфичных олигонуклеотидных праймеров: *fabI-f* 5'-ggccacaagaacgt-3' и *fabI-R* 5'-gttcaccaactgggtgac-3' (Nelsen et al., 2013). Очистку ПЦР-продуктов осуществляли с помощью набора реактивов «Dyenaamic ETDye Terminator CycleS equencing» (Amersham Biosciences, Великобритания), ПЦР продукт секвенировали, используя протокол для автоматического секвенатора MegaBase 750 (Amersham Biosciences, Великобритания).

Полногеномное секвенирование штамма *S. aureus* ATCC25923 проводили в системе IonTorrent PGM (Life Technologies, США) с помощью набора реагентов IonPlusFragmentLibraryKit (LifeTechnologies, США). Секвенирование ДНК осуществляли на генетическом анализаторе IonTorrentPGM с помощью набора реагентов Ion PGM 400 Sequencing Kit и чипа для секвенирования Ion 318™ Chip KiT (LifeTechnologies, США).

#### **Биоинформационные и статистические методы исследования**

Статистическую обработку результатов и анализ полученных данных осуществляли с помощью программ Microsoft Office 2010.

Полный геном собирали с помощью ассемблера Newbler 2.9 (Roche Life Science, Германия) и анализировали с помощью программ Vector NTI10 (Invitrogen, США),

Mauve (<http://darlinglab.org/mauve/mauve.html>), LaserGene 11 (DNASTAR, США) и веб-ресурса BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

Разместили последовательности ДНК в международной базе данных GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank>) с присвоением кода доступа для каждой последовательности.

**Личное участие автора в получении результатов.** Автору принадлежит ведущая роль в выборе направления исследования, планировании и постановке экспериментов, анализе и обобщении полученных результатов. Микробиологические исследования выполнены совместно с к.б.н. Родиным В.Б. и м.н.с. Слукиным П.В.; биофизические и микроскопические исследования выполнены совместно с м.н.с. Детушевым К.В., д.б.н. Фирстовой В.В. и д.б.н. Герасимовым В.Н.; молекулярно-генетические работы выполнены совместно с к.б.н. Мухиной Т.Н., к.б.н. Кисличкиной А.А. и к.б.н. Фурсовой Н.К.; биоинформационный анализ проведен совместно с н.с. Скрябиным Ю.П. и к.б.н. Богуном А.Г. В работах, выполненных в соавторстве, автором лично проведено моделирование процессов, аналитическая и статистическая обработка, научное обоснование и обобщение полученных результатов. Вклад автора является и заключается в непосредственном участии на всех этапах исследования, обсуждении результатов в научных публикациях и докладах, и их внедрении в практику.

#### **Положения, выносимые на защиту**

1. Разработанный аппликативный метод позволяет моделировать биопленкообразование бактериальных патогенов и оценивать чувствительность к антисептикам и антибактериальным препаратам получаемых планктонных клеток и биопленок микроорганизмов.

2. Антисептик хлоргексидин в концентрации 1,5% обладает антибактериальной активностью против госпитальных штаммов *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii* и *Proteus mirabilis* при использовании раствора для обработки биотических поверхностей, обеспечивает уменьшение интенсивности циркуляции возбудителей нозокомиальных инфекций и снижение уровня заболеваемости.

3. Штамм стафилококка *S. aureus* ATCC25923 при длительном культивировании в условиях селективного давления триклозана приобрел устойчивость к 64 мг/л данного антисептика. В геномах мутантных вариантов *S. aureus* Tr1 и *S. aureus* Tr2 выявлены стабильно наследуемые мутации в гене еноил-ацил-редуктазы, а также в других генах, ассоциированных со структурами клеточной стенки и транспортом.

4. В геномах триклозан-устойчивых вариантов штамма *S. aureus* ATCC25923 - *S. aureus* Tr1 и *S. aureus* Tr2 выявлена нестабильность, выражающаяся в приобретении точечных мутаций при селективном давлении триклозана, утрате их при снятии селективного давления, а также в появлении новых точечных мутаций в процессе длительного культивирования без селективного давления.

## **Степень достоверности и апробация результатов**

Результаты диссертационной работы были представлены, доложены и обсуждены на пяти Всероссийских и международных конференциях: Всероссийской научно-практической конференции «Актуальные проблемы общей и военной гигиены», Санкт-Петербург, 2011 г.; Международном конгрессе «Современные средства и технологии дезинфекции и стерилизации в профилактике инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи», 2014 г.; Ежегодном Всероссийском Конгрессе по инфекционным болезням, 2014 г.; Международном конгрессе по антимикробной терапии, 2014 г.. Международном конгрессе по антимикробной терапии, 2015 г.

### **Публикации**

Автором опубликовано 11 научных работ, в том числе по теме диссертации 11, из них – 3 статьи в реферируемых журналах и 8 тезисов в материалах международных и Всероссийских конференций.

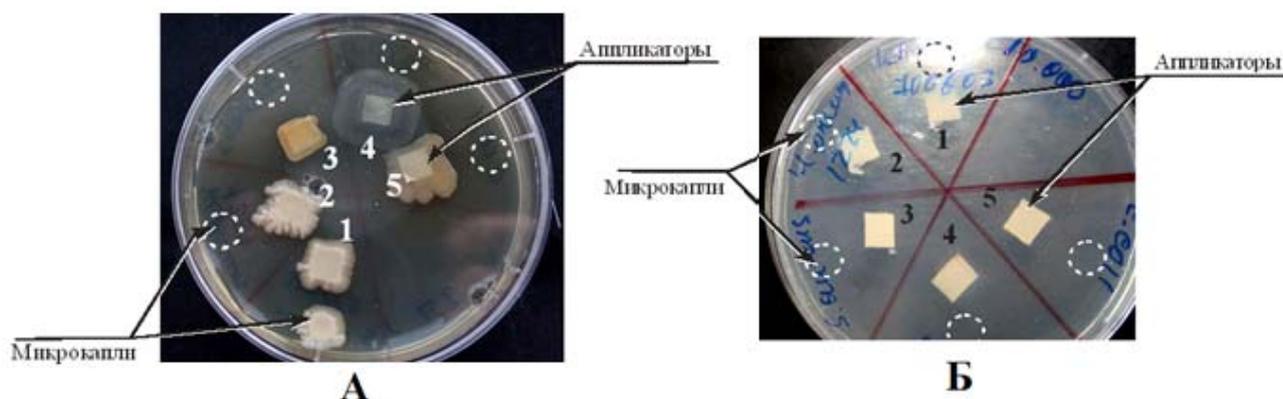
**Объём и структура диссертации.** Диссертация изложена на 157 страницах машинописного текста и включает следующие разделы: Введение, Обзор литературы, Материалы и методы, две главы Собственных исследований, Заключение, Выводы, 4 Приложения и Список использованных источников, включающий 287 ссылок, в том числе 37 отечественных и 250 зарубежных публикаций. Работа иллюстрирована 11 рисунками и 3 таблицами.

## **ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ**

### **Разработка метода и сравнение чувствительности планктонных культур и бактериальных биопленок к антисептикам**

Создана и охарактеризована рабочая коллекция госпитальных штаммов *Klebsiella pneumoniae* (n=8), *Pseudomonas aeruginosa* (n=4), *Acinetobacter baumannii* (n=4) и *Proteus mirabilis* (n=3) и референс-штаммов *K. pneumoniae* ATCC700603, *Escherichia coli* ATCC25922, *Staphylococcus aureus* ATCC25923 и *P. aeruginosa* ATCC27853, которая использована для сравнительной оценки чувствительности планктонных культур и бактериальных биопленок к антисептикам.

Разработан трехэтапный метод оценки чувствительности штаммов бактерий к антисептикам, включающий в себя: (1) предварительную оценку диапазонов минимальных подавляющих концентраций (МПК) и минимальных бактерицидных концентраций (МБК); (2) определение МПК и МБК хлоргексидина методом микрокапли; (3) определение МБК хлоргексидина аппликативным методом. При низких концентрациях хлоргексидина в питательном агаре (0,0002-0,0004 %) наблюдали рост бактериальной культуры не только на поверхности аппликатора, но и вокруг него (рисунок 1А), а при высоких концентрациях – только на поверхности аппликатора (рисунок 1Б).



1 - *K. pneumoniae* ATCC700603; 2 - *K. pneumoniae* B-1224; 3 - *S. aureus* 906;  
 4 - *P. aeruginosa* ATCC 27853; 5 - *E. coli* ATCC25922

Рисунок 1 – Тестирование чувствительности бактериальных культур к хлоргексидину методами микрокапли и аппликаторов на агаре Мюллера-Хинтона, содержащем: 0,02 % хлоргексидина (А) и 1,0 % хлоргексидина (Б)

Изучение чувствительности госпитальных и референс-штаммов бактерий к антисептикам проводили на примере хлоргексидина. По степени чувствительности (в сторону увеличения) к хлоргексидину, определенной методами серийных разведений и микрокапли, планктонные культуры исследуемых штаммов распределились в следующем порядке: *P. mirabilis*, *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae*, *A. baumannii*, *E. coli* и *S. aureus* (таблица 1). Определение чувствительности к хлоргексидину аппликативным методом показало, что средние значения МБК бактерий в составе биопленок значительно выше, чем таковые планктонных клеток: *P. aeruginosa* в 23 раза, *A. baumannii* в 28 раз, *K. pneumoniae* в 48 раз, *P. mirabilis* в 50 раз, *E. coli* в 128 раз и *S. aureus* в 255 раз.

На основе полученных данных, концентрация хлоргексидина, рекомендованная в инструкции по применению для использования в качестве антисептика для обработки рук (0,5%), недостаточна для инактивации современных штаммов госпитальных патогенов. Нами предложено использование более высоких концентраций хлоргексидина (1,5%-ного раствора) для обработки кожи и слизистых пациентов отделения реанимации и интенсивной терапии. Использование хлоргексидина в концентрации 1,5% в программе ухода за пациентами отделения нейрореанимации г. Москвы позволило уменьшить интенсивность циркуляции патогенов - возбудителей нозокомиальных инфекций и снизить уровень заболеваемости инфекциями дыхательной системы пациентов, находящихся на искусственной вентиляции легких (Курдюмова с соавт., 2015; Акт внедрения НИИ нейрохирургии им. Н.Н. Бурденко №1 от 06.04.2016).

Таблица 1 – Характеристика клинических и тест-штаммов бактерий

Штамм	Год выделения	Источник	Устойчивость к классам АП	Концентрация антисептика хлоргексидина, %					
				I		II		III	
				МПК	МБК	МПК	МБК	МПК	МБК
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
<i>A. baumannii</i> B-1745	2013	трахея	БЛ, ФХ, ХМ, АМ, НФ, СН, ТК	0,0002	0,0016	0,0063	0,0063	0,0063	0,1563
<i>A. baumannii</i> B-1691	2013	трахея	БЛ, ФХ, ХМ, АМ, НФ, СН	0,0008	0,0016	0,0031	0,0031	0,0063	0,1563
<i>A. baumannii</i> B-120	2013	трахея	БЛ, ФХ, ХМ, АМ, НФ, СН	0,0004	0,0008	0,0031	0,0063	0,0063	0,1563
<i>A. baumannii</i> B-5	2013	трахея	БЛ, ФХ, ХМ, АМ, НФ, СН	0,0002	0,0016	0,0031	0,0063	0,0063	0,1563
<i>K. pneumoniae</i> B-1814	2013	моча	БЛ, ФХ, ХМ, АМ, НФ, СН	0,0008	0,0031	0,0063	0,0063	0,05	0,1563
<i>K. pneumoniae</i> B-1802	2013	моча	БЛ	0,0008	0,0016	0,0008	0,0008	0,05	0,1563
<i>K. pneumoniae</i> B-1739	2013	моча	БЛ, ФХ, ХМ, АМ, НФ, СН	0,0031	0,0031	0,0063	0,0063	0,05	0,1563
<i>K. pneumoniae</i> B-1759	2013	моча	БЛ, ФХ, ХМ, АМ, НФ, СН	0,0016	0,0063	0,0063	0,0063	0,0063	0,625
<i>K. pneumoniae</i> B-1104	2013	трахея	БЛ, ФХ, ХМ, АМ, НФ, СН	0,0002	0,0004	0,0063	0,0063	0,0125	0,1563
<i>K. pneumoniae</i> B-335	2013	моча	БЛ, ФХ, ХМ, АМ, НФ, СН, ТК	0,0004	0,0016	0,0063	0,0063	0,0125	0,3125
<i>K. pneumoniae</i> B-1224	2013	мокрота	БЛ, ФХ, ХМ, АМ, НФ, СН, ТК	0,0002	0,0004	0,0098	0,0098	0,1563	0,625
<i>K. pneumoniae</i> B-38	2013	моча	БЛ, ФХ, ХМ, АМ, НФ, СН, ТК	0,0004	0,0016	0,0063	0,0063	0,0125	0,1563
<i>P. mirabilis</i> B-1901	2013	трахея	БЛ, АМ, НФ, СН, ТК	0,0063	0,0063	0,0125	0,0125	0,025	>1,25
<i>P. mirabilis</i> B-123	2013	моча	БЛ, ФХ, ХМ, АМ, НФ, СН, ТК	0,0063	0,0125	0,0125	0,0125	0,025	>1,25
<i>P. mirabilis</i> B-318	2013	рана	БЛ, ФХ, ХМ, АМ, НФ, СН, ТК	0,0125	0,025	0,05	0,05	0,0125	1,25
<i>P. aeruginosa</i> B-1560	2013	трахея	БЛ, ФХ, ХМ, АМ, НФ, СН, ТК	0,0016	0,0063	0,0063	0,0063	0,0063	0,1563
<i>P. aeruginosa</i> B-431	2013	трахея	БЛ, ФХ, ХМ, АМ, НФ, СН, ТК	0,0008	0,0016	0,0008	0,0031	0,0063	0,3125
<i>P. aeruginosa</i> B-2249	2013	ликвор	БЛ, ФХ, ХМ, АМ, НФ, СН, ТК	0,0008	0,0016	0,0008	0,0063	0,0031	0,025
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	1971	референс	НД	0,0004	0,0008	0,0195	0,0195	0,1563	0,3125
<i>K. pneumoniae</i> ATCC700603	1994	референс	НД	0,0016	0,0031	0,0063	0,0063	0,0125	0,3125
<i>E. coli</i> ATCC 25922	1946	референс	НД	0,0002	0,0002	0,0049	0,0049	0,6250	0,625
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	1945	референс	НД	0,0002	0,0002	0,0049	0,0049	0,6250	1,25

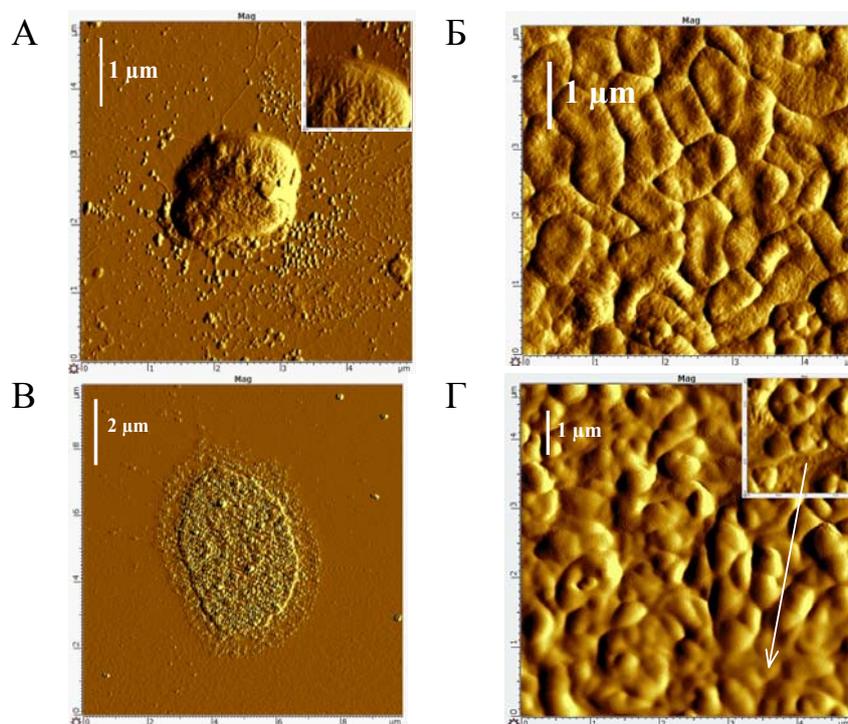
Примечание: БЛ – бета-лактамы, ФХ - фторхинолоны, ХМ - хлорамфеникол, АМ - аминогликозиды, НФ - нитрофураны, СН - сульфаниламиды, ТК – тетрациклины, НД – нет данных

## Сравнительный анализ морфологии и физико-химических параметров бактериальных клеток в планктонных культурах и биопленках

Сравнительный анализ морфологии и физико-химических параметров планктонных и биопленочных клеток бактерий проводили на примере госпитального штамма *A. baumannii* В-1745, выделенного из эндотрахеального аспирата пациента нейрореанимации г. Москвы в 2013 г. Бактериальную биопленку моделировали при выращивании культуры на поверхности плотной питательной среды в течение 7 суток (168 ч). Структура бактериальной биопленки подтверждена методами атомно-силовой и электронной микроскопии, а также MALDI-TOF масс-спектрометрией.

### Атомно-силовая микроскопия

Показано, что в планктонных культурах клетки штамма *A. baumannii* В – 1745 имеют размер 1 x 2,5 мкм, их границы четко очерчены, вокруг них отсутствует ореол (рисунок 2А).



А. – Планктонная клетка 24 ч культуры, площадь сканирования 5×5 мкм;

Б – Конгломерат клеток 24 ч культуры, площадь сканирования 5×5 мкм;

В – Отдельная клетка с пиле-подобными структурами, вычлененная из биопленки, площадь сканирования 10×10 мкм;

Г – Поверхность 7-суточной биопленки, погруженная в межклеточный матрикс, площадь сканирования 5×5 мкм

Рисунок 2 – АСМ-изображения клеток штамма *A. baumannii* В-1745

В 24 ч культуре наблюдаются конгломераты плотно сомкнутых клеток, границы которых четко очерчены (рисунок 2Б), а в 168 ч культуре – клетки с размытыми границами, «погруженные» в межклеточный матрикс (рисунок 2Г). Отдельно лежащие клетки отпечатка биопленки окружены густой сетью пиле-подобных структур (рисунок 2В). Культивирование бактерий в течение 7 сут обеспечивает формирование биопленки на поверхности плотной питательной среды, что

согласуется с данными Luo et al., 2015 г., в котором при помощи трансмиссионной электронной микроскопии было показано наличие пилей у клеток *A. baumannii* в биопленке.

#### Электронная микроскопия

Биопленка штамма *A. baumannii* В-1745 на поверхности плотной питательной среды при увеличении  $\times 2000$  имела вид скопления коротких, цилиндрических клеток, покрытых слизистым слоем матрикса и связанных друг с другом (рисунок 3). Структура бактериального газона 7-дневной культуры штамма *A. baumannii* В-1745 аналогична структуре клеточной ассоциации в составе биопленки на поверхности титановых, полипропиленовых и полистироловых пластин, описанной в статье Brossard et al., 2011 г.

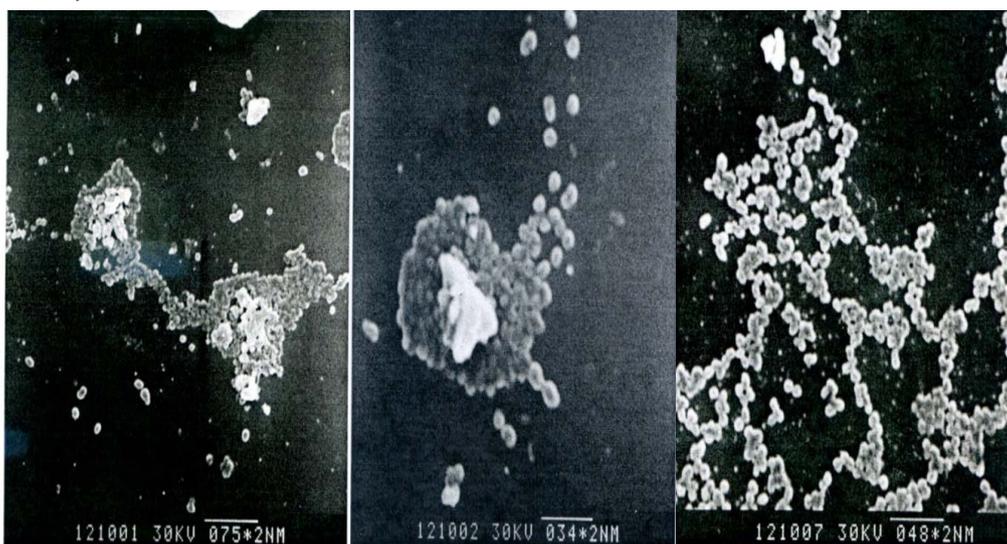
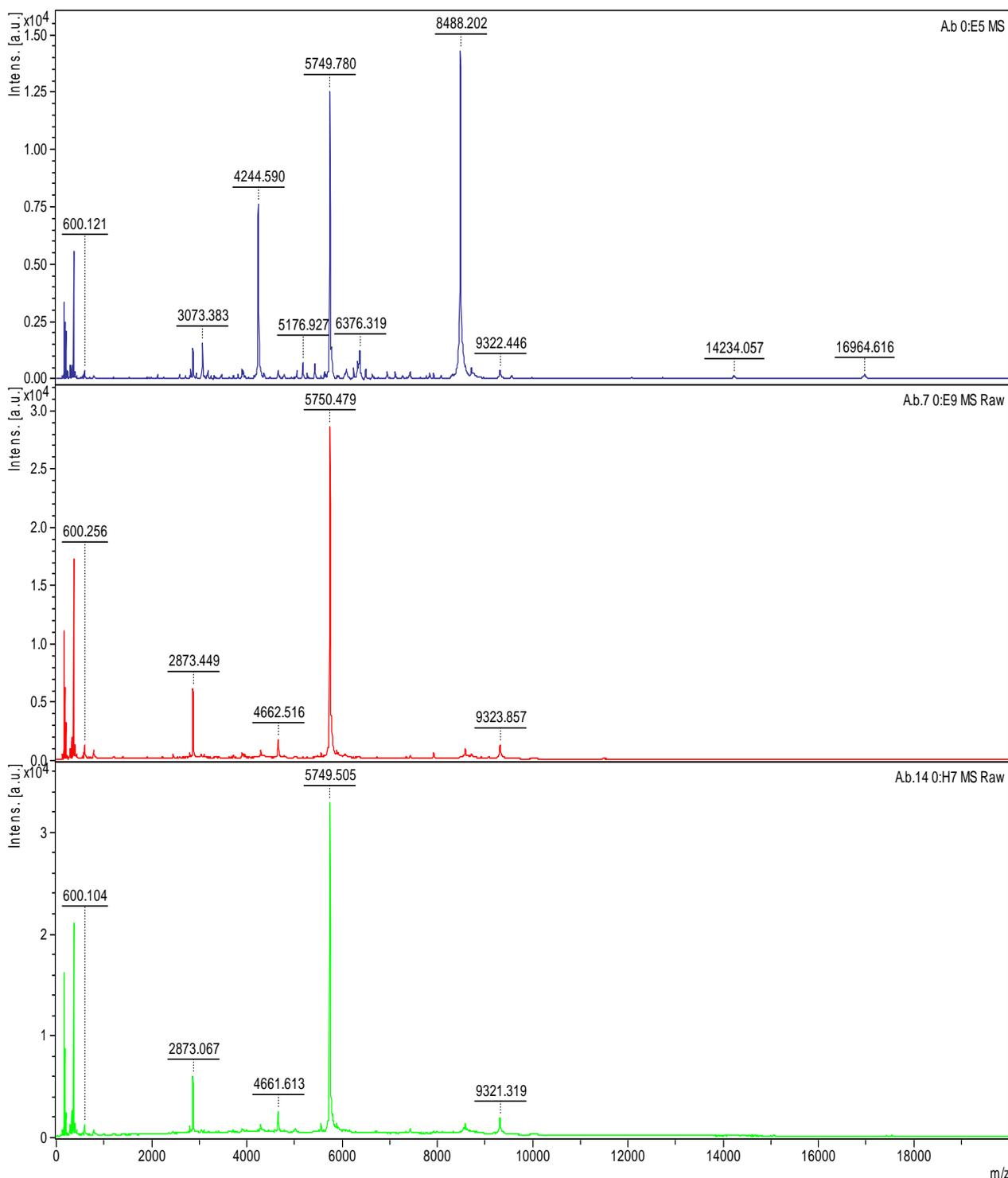


Рисунок 3 – Электронно-микроскопическое изображение фрагментов биопленки (7-дневная культура на поверхности плотной питательной среды) *A. baumannii* В-1745 при увеличении  $\times 2000$

#### MALDI-TOF масс-спектрометрия

Для сравнения белковых спектров планктонных культур и биопленок штамма *A. baumannii* В-1745 использовали алгоритм Кряжевских с соавт., 2015 г. технологии матрично-активированной лазерной десорбции/ионизации MALDI. Анализ белковых масс-спектров осуществляли сопоставлением показателя масса/заряд ( $m/z$ ) и относительной интенсивности пиков (относ. ед.). Биопленку моделировали двумя способами: классическим - на поверхности покровного стекла при инкубации в жидкой питательной среде; экспериментальным - на поверхности плотной питательной среды в чашке Петри при культивировании в течение 7 суток (рисунок 4).



А – масс-спектр биопленки, выращенной на поверхности покровного стекла;  
 Б – масс-спектр биопленки, выращенной на поверхности плотной питательной среды;  
 В – белковый масс-спектр планктонных клеток  
 Рисунок 4 – Белковые масс-спектры клеток *A. baumannii* В-1745

На белковом спектре клеток штамма *A. baumannii* В-1745 в интервале молекулярных масс до 20000 Да выявлено 106 пиков с показателями  $m/z$  от 138 до 16965. Общее количество пиков для планктонной культуры составило 55, для биопленки, выращенной на поверхности покровного стекла - 52, для биопленки, выращенной на поверхности плотной питательной среды – 48. Сравнительный анализ

MALDI-спектров выявил 26 общих пиков у планктонных культур и биопленок, что составило 25 % от общего количества пиков. MALDI-спектры биопленочных культур двух типов имели большое сходство по количеству пиков и их относительной интенсивности. При изучении белковых профилей биопленочных культур штамма *A. baumannii* B-1745 были отмечены некоторые специфические особенности, которые могут использоваться для их детекции. Значения интенсивности белковых пиков биопленок увеличились или уменьшились по сравнению с таковыми планктонной культуры (19 и 33 пика, соответственно), что говорит о существенной перестройке биохимии и физиологии бактериальной клетки при ее переходе из планктонного состояния в состояние биопленки. Полученные нами данные находятся в соответствии с результатами, представленными в исследовании Melvin Blaze et al., 2012 г., где описаны биопленки, выращенные на различных носителях. Авторами на MALDI-спектрах исследуемых культур *E. faecalis* и *E. coli* были выявлены пики, общие для разных видов бактерий, независимо от способа культивирования; пики, уникальные для каждого вида бактерий, а также несколько других пиков, которые наблюдались только у планктонных культур, либо только у биопленок исследуемых штаммов.

### **Изучение закономерностей формирования устойчивости к триклозану у *Staphylococcus aureus***

Селективный отбор мутантных вариантов стафилококков, устойчивых к триклозану. Формирование устойчивости *S. aureus* ATCC25923 к антисептику триклозану проводили в двух параллельно проходящих экспериментах, при одинаковых условиях культивирования. Процесс отбора триклозан-устойчивых штаммов осуществляли в условиях селективного давления ступенчато повышающихся концентраций триклозана. После 40 суток культивирования получены два варианта - штаммы *S. aureus* Tr1 и *S. aureus* Tr2, с МБК триклозана 64 мг/л, что превышает исходный уровень в 128 раз.

#### Оценка стабильности наследования устойчивости к триклозану

Культивирование триклозан-устойчивых штаммов *S. aureus* Tr1 и *S. aureus* Tr2 без селективного давления триклозана в течение 26 месяцев не привело к утрате устойчивости к антисептику. Полученные варианты штаммов *S. aureus* Tr1С и *S. aureus* Tr2С имели МБК=64 мг/л. Таким образом, показано, что приобретенная при селективном давлении триклозана устойчивость мутантов штамма *S. aureus* ATCC25923 к данному антисептику стабильно наследовалась при длительном культивировании в отсутствие селективного давления.

#### Оценка чувствительности к антибиотикам у триклозан-устойчивых штаммов стафилококков

Анализ чувствительности мутантных вариантов штамма *S. aureus* ATCC25923, устойчивых к триклозану, к препаратам антибиотиков пяти функциональных классов

(бета-лактамам, аминогликозидам, фторхинолонам, тетрациклинам и фениколам) показал, что данные варианты стафилококков сохранили чувствительность ко всем использованным препаратам антибиотиков. В нашем исследовании перекрестной устойчивости к триклозану и антибиотикам у мутантных штаммов *S. aureus* Tr1 и *S. aureus* Tr2 не выявлено.

Определение параметров роста колоний стафилококков, устойчивых к триклозану

Параметры роста (бактериальный фитнес) - удельная скорость роста и время достижения колонией диаметра 1 мм - у триклозан-устойчивого штамма *S. aureus* Tr1 увеличены, по сравнению с таковыми исходного штамма, то есть данный штамм отличается замедленным ростом. Другой триклозан-устойчивый штамм – *S. aureus* Tr2 имел скорость роста, сопоставимую с исходным штаммом. Данные показатели не изменились в ходе культивирования без селективного давления в течение 26 месяцев. Штамм *S. aureus* Tr1С имел параметры роста, сопоставимые с параметрами роста штамма *S. aureus* Tr1, а штамм *S. aureus* Tr2С – с параметрами штамма *S. aureus* Tr2.

Анализ структуры гена еноил-ацил-редуктазы *fabI*

Анализ первичной структуры гена, кодирующего еноил-ацил-редуктазу FabI, которая является мишенью действия триклозана, проведен с помощью амплификации и секвенирования фрагмента гена *fabI* размером 1358 п.н. из мутантных штаммов и исходного штамма *S. aureus* ATCC25923. Показано, что в штаммах *S. aureus* Tr1 и *S. aureus* Tr2 присутствуют идентичные нуклеотидные замены С284Т, приводящие к аминокислотной замене А95V в продукте гена. Данная мутация описана ранее в работе Ciusa et al., 2002 г. В нашем исследовании чувствительность к триклозану у триклозан-устойчивых штаммов увеличилась в 128 раз (с 0,5 до 64 мг/л), что согласуется с данными работы Xu et al., 2008 г., в которой для штамма с мутацией А95V этот показатель увеличился в 240 раз.

В международной базе данных GenBank депонированы две последовательности мутантных генов *fabI*, кодирующих фермент еноил-ацил-редуктазу в штаммах *S. aureus* ATCC25923-Tr1 и ATCC25923-Tr2, устойчивых к триклозану (GenBank KP100447 и KP100446).

Выявление мутаций в геномах штаммов *S. aureus*, устойчивых к триклозану, с помощью полногеномного секвенирования

Проведено полногеномное секвенирование пяти штаммов: исходного штамма *S. aureus* ATCC25923 и четырех его триклозан-устойчивых вариантов: *S. aureus* Tr1 и *S. aureus* Tr2, полученных после 40-дневного культивирования в условиях селективного давления триклозана, а также *S. aureus* Tr1С и *S. aureus* Tr2С, полученных в ходе последующего 26-месячного культивирования мутантных штаммов без селективного давления (рисунок 5).

<i>S. aureus</i> ATCC 25923						<i>S. aureus</i> Tr1						<i>S. aureus</i> Tr1C					
Ref Pos	Type	Ref Base	Called Base	Called Base	Amino Acid Change	Ref Pos	Type	Ref Base	Called Base	Called Base	Amino Acid Change	Ref Pos	Type	Ref Base	Called Base	Called Base	Amino Acid Change
673033	SNP	G	G	G		673033	SNP	G	G	C		673033	SNP	G	G	C	
691206	SNP	G	G	G		691206	SNP	G	G	A		691206	SNP	G	G	A	
692033	SNP	A	A	A		692033	SNP	A	A	G		692033	SNP	A	A	G	
718642	SNP	G	A	A	R 164 H	718642	SNP	G	G	G		718642	SNP	G	G	G	
872262	SNP	C	T	T	M 46 I	872262	SNP	C	C	C		872262	SNP	C	C	C	
901066	SNP	A	A	A		901066	SNP	A	T	A		901066	SNP	A	T	A	
901548	SNP	G	G	G		901548	SNP	G	G	A		901548	SNP	G	G	A	
902254	SNP	C	C	C		902254	SNP	C	C	A		902254	SNP	C	C	A	
915623	SNP	T	T	T		915623	SNP	T	C	C		915623	SNP	T	C	C	
934170	SNP	C	T	C		934170	SNP	C	C	C		934170	SNP	C	C	C	
935080	SNP	C	T	C		935080	SNP	C	C	C		935080	SNP	C	C	C	
949765	SNP	C	C	C		949765	SNP	C	T	C		949765	SNP	C	T	C	
949792	SNP	A	A	G		949792	SNP	A	A	A		949792	SNP	A	A	A	
950082	SNP	C	T	T	A 95 V	950082	SNP	C	T	T	A 95 V	950082	SNP	C	T	T	A 95 V
965576	SNP	C	T	C		965576	SNP	C	C	C		965576	SNP	C	C	C	
965577	SNP	T	A	T		965577	SNP	T	T	T		965577	SNP	T	T	T	
995823	SNP	A	T	A		995823	SNP	A	A	A		995823	SNP	A	A	A	
995827	SNP	A	T	A		995827	SNP	A	A	A		995827	SNP	A	A	A	
995830	SNP	T	A	T		995830	SNP	T	T	T		995830	SNP	T	T	T	
1031907	SNP	T	A	T		1031907	SNP	T	T	T		1031907	SNP	T	T	T	
1358035	SNP	A	T	A		1358035	SNP	A	A	A		1358035	SNP	A	A	A	
1626577	SNP	G	G	C		1626577	SNP	G	G	G		1626577	SNP	G	G	G	
1628017	SNP	G	G	G		1628017	SNP	G	A	G		1628017	SNP	G	A	G	
1716398	SNP	T	C	T		1716398	SNP	T	T	T		1716398	SNP	T	T	T	
1862440	SNP	A	A	A		1862440	SNP	A	G	G	I 82 V	1862440	SNP	A	G	G	I 82 V
2062764	SNP	G	A	G		2062764	SNP	G	G	G		2062764	SNP	G	G	G	
2063041	SNP	G	G	G		2063041	SNP	G	T	T	E 286 .	2063041	SNP	G	T	T	E 286 .
2320517	SNP	C	T	C		2320517	SNP	C	C	C		2320517	SNP	C	C	C	

Рисунок 5 – Нуклеотидные и аминокислотные замены, выявленные в триклозан-устойчивых штаммах, по сравнению с исходным штаммом *S. aureus* ATCC25923

Подтверждено наличие у всех четырех штаммов точечной нуклеотидной замены C284T в гене *fabI*, приводящей к аминокислотной замене аланина на валин A95V в белке еноил-ацил-редуктазы. Кроме того, в штамме *S. aureus* Tr1 выявлены дополнительно две мутации: (1) мутация G491A в гене гипотетического транспортного белка в позиции, которая приводит к аминокислотной замене аргинина на гистидин R164H; (2) мутация C137T в гене белка-антипортера, связанного с устойчивостью к высоким концентрациям Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, Li<sup>+</sup> и щелочам, приводящая к аминокислотной замене метионина на изолейцин M46I. В штамме *S. aureus* Tr2, помимо, мутации C284T, идентифицированы еще две мутации: (1) мутация A545G в гене мембранного белка, приводящая к аминокислотной замене изолейцина на валин I82V и (2) мутация G857T в гене гистидин-киназы, которая приводит к образованию стоп-кодона вместо триплета, кодирующего глутаминовую кислоту (E861·).

Интересно, что мутация C284T в гене еноил-ацил-редуктазы, а также описанные в данном разделе мутации в генах гипотетического транспортного белка (G491A), белка-антипортера (C137T), мембранного белка (A545G) и гистидин-киназы (G857T) стабильно наследовались при культивировании бактерий в отсутствие селективного давления триклозана в течение 26 месяцев, что показано полногеномным секвенированием штаммов *S. aureus* Tr1C и *S. aureus* Tr2C (рисунок 5). Стоит подчеркнуть, что все описанные выше мутации локализованы в генах, ассоциированных с транспортом веществ в клетке. Это указывает на важность транспортной функции бактериальной клетки при формировании устойчивости к триклозану. Таким образом, полногеномное секвенирование четырех триклозан-устойчивых вариантов штамма *S. aureus* ATCC25923 подтвердило значимость мутации C284T в гене еноил-ацил-редуктазы, как молекулярного механизма

устойчивости стафилококков к триклозану. Кроме того, выявлены четыре дополнительные мутации, не описанные ранее в литературе, связанные с модификацией бактериальных белков, участвующих в клеточном транспорте.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В ходе работы создана и охарактеризована рабочая коллекция госпитальных штаммов *Klebsiella pneumoniae* (n=8), *Pseudomonas aeruginosa* (n=4), *Acinetobacter baumannii* (n=4) и *Proteus mirabilis* (n=3) и референс-штаммов *Klebsiella pneumoniae* ATCC700603, *Escherichia coli* ATCC25922, *Staphylococcus aureus* ATCC25923 и *Pseudomonas aeruginosa* ATCC27853 для изучения чувствительности к биоцидам планктонных бактерий и в составе биопленки. В целях оптимизации методов изучения чувствительности к дезинфектантам и антисептикам, создан алгоритм, включающий в себя 3 этапа: (1) предварительную оценку диапазонов МПК и МБК; (2) определение МПК и МБК методом микрокапли; (3) определение МБК аппликативным методом. Данный подход использован для изучения чувствительности к биоцидам у планктонных и биопленочных культур бактерий. Показано, что чувствительность к хлоргексидину у госпитальных штаммов бактерий в составе биопленки существенно ниже, чем в планктонной форме: для *P. aeruginosa* разница составила в 23 раза, для *A. baumannii* – в 28 раз, для *K. pneumoniae* – в 48 раз, для *P. mirabilis* – в 50 раз, для *E. coli* – в 128 раз и для *S. aureus* – в 255 раз. Показана принципиальная возможность моделирования бактериальной биопленки на плотных питательных средах, что подтверждено визуализацией структуры биопленки на примере штамма *A. baumannii* В-1745. С помощью атомно-силовой и электронной микроскопии выявлены характерные особенности морфологии биопленки на поверхности плотной питательной среды (скопление клеток, соединенных внеклеточным матриксом и разделенных «каналами», наличие пиле-подобных структур на поверхности бактерий). Показано, что концентрация хлоргексидина 0,5 %, рекомендованная в инструкции по применению для использования в качестве антисептика для обработки рук, недостаточна для инактивации современных штаммов госпитальных патогенов. Предложенное нами использование хлоргексидина в концентрации 1,5 % в программе ухода за пациентами отделения нейрореанимации г. Москвы позволило уменьшить интенсивность циркуляции патогенов – возбудителей нозокомиальных инфекций и снизить уровень заболеваемости инфекциями дыхательной системы пациентов, находящихся на искусственной вентиляции легких.

В ходе проведенного исследования в условиях селективного давления триклозана получены два мутантных варианта штамма *S. aureus* ATCC25923 – *S. aureus* Tr1 и *S. aureus* Tr2, устойчивых к 64 мг/л антисептика, депонированные в Государственную коллекцию патогенных микроорганизмов «ГКПМ-Оболенск», которые могут быть использованы для дальнейших исследований механизмов резистентности к антисептикам.

Изучение молекулярных механизмов показало, что механизмом триклозан-устойчивости изучаемых мутантных штаммов *S. aureus* является мутационное изменение гена *fabI*, кодирующего еноил-ацил-редуктазу, фермент, участвующий в

синтезе жирных кислот стафилококков – мутация С284Т приводящая к аминокислотной замене аланина на валин - А95V, известная ранее по литературным данным и, по-видимому, существенная для формирования устойчивости стафилококков к триклозану. С помощью полногеномного секвенирования, в штаммах *S. aureus* Tr1 и *S. aureus* Tr1С описаны стабильно наследуемые без селективного давления триклозана мутации – в генах гипотетического транспортного белка и белка-антипортера, связанного с устойчивостью к высоким концентрациям Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, Li<sup>+</sup> и щелочам (G491A и C137T); в штаммах *S. aureus* Tr2 и *S. aureus* Tr2С идентифицированы мутации в генах мембранного белка и гистидин-киназы (A545G и G857T), которые, предположительно, вносят вклад в устойчивость к триклозану данных штаммов.

## ВЫВОДЫ

1. Создана и охарактеризована рабочая коллекция госпитальных штаммов *Klebsiella pneumoniae* (n=8), *Pseudomonas aeruginosa* (n=4), *Acinetobacter baumannii* (n=4) и *Proteus mirabilis* (n=3) и референс-штаммов *Klebsiella pneumoniae* ATCC700603, *Escherichia coli* ATCC25922, *Staphylococcus aureus* ATCC25923 и *Pseudomonas aeruginosa* ATCC27853 для использования при изучении процессов биопленкообразования и формирования устойчивости к антисептикам.

2. Разработан трехэтапный метод сравнительной оценки чувствительности к антисептикам бактериальных планктонных и биопленочных культур, включающий в себя: предварительную оценку диапазонов МПК и МБК, определение МПК и МБК методом микрокапли, определение МБК аппликативным методом.

3. Показана принципиальная возможность моделирования бактериальной биопленки на плотных питательных средах, что подтверждено визуализацией структуры биопленки на примере штамма *A. baumannii* В-1745. С помощью атомно-силовой и электронной микроскопии выявлены характерные особенности морфологии биопленки на поверхности плотной питательной среды (скопление клеток, соединенных внеклеточным матриксом и разделенных «каналами», наличие пиле-подобных структур на поверхности бактерий).

4. Показано, что чувствительность к хлоргексидину у госпитальных штаммов бактерий в составе биопленки существенно ниже, чем в планктонной форме: для *P. aeruginosa* разница составила в 23 раза, для *A. baumannii* – в 28 раз, для *K. pneumoniae* – в 48 раз, для *P. mirabilis* – в 50 раз, для *E. coli* – в 128 раз и для *S. aureus* – в 255 раз.

5. Показано, что концентрация хлоргексидина 0,5 %, рекомендованная в инструкции по применению для использования в качестве антисептика для обработки рук, недостаточна для инактивации современных штаммов госпитальных патогенов. Предложенное нами использование хлоргексидина в концентрации 1,5 % в программе ухода за пациентами отделения нейрореанимации г. Москвы позволило уменьшить интенсивность циркуляции патогенов – возбудителей нозокомиальных инфекций и снизить уровень заболеваемости инфекциями дыхательной системы пациентов, находящихся на искусственной вентиляции легких.

6. В условиях селективного давления триклозана получены два мутантных варианта штамма *S. aureus* ATCC25923 – *S. aureus* Tr1 и *S. aureus* Tr2, устойчивых к 64 мг/л антисептика, депонированные в Государственную коллекцию патогенных микроорганизмов «ГКПМ-Оболенск», которые могут быть использованы для дальнейших исследований механизмов резистентности к антисептикам.

7. Молекулярным механизмом триклозан-устойчивости изучаемых мутантных штаммов *S. aureus* является мутационное изменение гена *fabI*, кодирующего еноил-ацил-редуктазу, фермент, участвующий в синтезе жирных кислот стафилококков – мутация С284Т приводящая к аминокислотной замене аланина на валин - А95V, известная ранее по литературным данным и, по-видимому, существенная для формирования устойчивости стафилококков к триклозану.

8. С помощью полногеномного секвенирования, в штаммах *S. aureus* Tr1 и *S. aureus* Tr1С описаны стабильно наследуемые без селективного давления триклозана мутации – в генах гипотетического транспортного белка и белка-антипортера, связанного с устойчивостью к высоким концентрациям Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, Li<sup>+</sup> и щелочам (G491A и C137T); в штаммах *S. aureus* Tr2 и *S. aureus* Tr2С идентифицированы мутации в генах мембранного белка и гистидин-киназы (A545G и G857T), которые, предположительно, вносят вклад в устойчивость к триклозану данных штаммов.

### **ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ**

1. Для уменьшения интенсивности циркуляции патогенов – возбудителей нозокомиальных инфекций и снижения уровня заболеваемости инфекциями дыхательной системы пациентов, находящихся на искусственной вентиляции легких, рекомендуется использование 1,5 %-ного хлоргексидина в программе ухода за пациентами.

2. Для оценки антимикробного действия антисептиков рекомендуется использование предложенного нами трехэтапного метода, позволяющего оценить степень эффективности антисептического препарата против возбудителей бактериальных инфекций, находящихся как в виде планктонной культуры, так и в форме биопленки.

3. Необходимо учитывать возможность наличия точечных мутаций в генах *S. aureus*, связанных с клеточной стенкой и транспортом в бактериальной клетке, при разработке ПЦР тест-систем для детекции госпитальных патогенов, имеющих контакт с антисептиками.

#### **По теме диссертации опубликованы следующие работы:**

##### **а) статьи в научных журналах, рекомендованных ВАК**

1. Родин, В. Б. Перекрестная устойчивость микроорганизмов к антибиотикам, сопряженная с резистентностью к дезинфектантам / В. Б. Родин, Е. Н. Кобзев, **Е. В. Детушева**, В. Н. Мартынова, Е. В. Тимошинова, К. В. Детушев, В. А. Чугунов, В. П. Холоденко // Дез. дело. –2011. –№ 3. –С. 102-114. (Список ВАК до 30.06.2015 г. и действующий в н.в.) ИФ ISI/РИНЦ – 0,207. Цитирование – 11.

2. Кобзев, Е.Н. Формирование устойчивости микроорганизмов к дезинфицирующим средствам и пути решения проблемы / Е. Н. Кобзев, В. А. Чугунов, В. Б. Родин, **Е. В. Детушева**, П. В. Слукин, Л. С. Федорова, В. Г. Акимкин // Эпидемиол. Инф. Бол. 2014. –Т. 19. –№6. – С.48-54. (Список ВАК до 30.06.2015 г.) ИФ ISI/РИНЦ – 0,237

3. **Детушева, Е.В.** Чувствительность нозокомиальных штаммов *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii* и *Proteus mirabilis* к антисептику на основе хлоргексидина /Е. В. Детушева, В. Б. Родин, П. В. Слукин, О. Н. Ершова, И. А. Александрова, С. Ю. Сазыкина, И. А. Дятлов, Н. К. Фурсова // Клини. Микробиол. антимикроб. химиотер. – 2015. –Т. 17. –№1.–С. 57-66. (Список ВАК до 30.06.2015 г.) ИФ ISI/РИНЦ – 1,182

**в) тезисы научных конференций**

4. Родин, В. Б. Сопряженная с резистентностью к дезинфектантам перекрёстная устойчивость микроорганизмов к антибиотикам / В. Б. Родин, Е. Н. Кобзев, **Е.В. Детушева**, В. Н. Мартынова, Е. В. Тимошинова, К. В. Детушев, В. П. Холоденко // Матер. Всероссийской научно-практической конф. «Актуальные проблемы общей и военной гигиены» (Санкт-Петербург, 22 апреля 2011 г.). –2011. – С. 101–102.

5. **Детушева, Е. В.** Формирование устойчивости микроорганизмов к дезинфицирующим средствам и пути решения проблемы /**Е. В. Детушева**, Е. В. Кобзев, Л. С. Федорова // Матер. Международного конгресса "Современные средства и технологии дезинфекции и в профилактике "(Москва, 6-7 ноября 2014 г.). – 2014. – С. 63-65.

6. Слукин, П. В. Адаптация *Escherichia coli* к бензалкония хлориду / П. В. Слукин, Е. Н. Кобзев, В. А. Чугунов, **Е. В. Детушева**, В. Б. Родин // Матер. VI Ежегодного Всеросс. Конгресса по инф. болезням (Москва, 16 марта 2014 г.). –2014. – С. 290-291.

7. **Детушева, Е. В.** Повышение чувствительности к антибиотикам у штаммов *Staphylococcus aureus* резистентных к триклозану / **Е. В. Детушева**, В. Б. Родин, П. В. Слукин, В. А. Чугунов, Е. Н. Кобзев // Санкт-Петербургское региональное отделение Росс. ассоциации аллергологов и клин. иммунологов. «Инфекция и иммунитет». - Санкт-Петербург. –2014. – Т. 4. –№1. –С. 63.

8. Слукин, П. В. Оценка устойчивости клеточной ассоциации *Escherichia coli* к хлориду бензалкония / П. В. Слукин, **Е. В. Детушева**, В. Б. Родин, В. А. Чугунов, Е. Н. Кобзев // Санкт-Петербургское региональное отделение Росс. ассоциации аллергологов и клин. иммунологов «Инфекция и иммунитет». - Санкт-Петербург. – 2014. – Т. 4. – №1. –С. 92.

9. Слукин, П.В. Формирование устойчивости к хлориду бензалкония у клеток *Escherichia coli* АТСС в агрегированном и дезагрегированном состоянии /П. В. Слукин, **Е. В. Детушева**, В. Б. Родин, Н. К. Фурсова //Издательство ООО "Экспо-Медиа, Материалы VI Всеросс. научно-практической конф. молодых ученых и специалистов Роспотребнадзора. Актуальные пробл. эпидемиол. и профилактик. медицины. - Ставрополь– 2014. – С.108-109.

10. **Детушева, Е. В.** Устойчивость к антисептику на основе хлоргексидина клинических штаммов *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii*, *Proteus mirabilis* /Е. В. Детушева, В. Б. Родин, П. В. Слукин, В. А. Чугунов, Н. К. Фурсова, О. Н. Ершова, И. А. Александрова, Н. В. Курдюмова, С. Ю. Сазыкина // Материалы XVI Междун. конгресса по антимикроб. терапии (Москва, 21-23 мая 2014 г.). – 2014. – С. 38.

11. Детушева, Е. В. Атомно-силовая микроскопия клеток *Acinetobacter baumannii*, вовлеченных в процесс биопленкообразования / Е. В. Детушева, Н. К. Фурсова // Материалы XVII Междун. конгресса по антимикроб. терапии (Москва, 20-22 мая 2015 г.). – 2015. – С. 126-127.

## ПЕРЕЧЕНЬ СОКРАЩЕНИЙ, УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ, СИМВОЛОВ, ЕДИНИЦ И ТЕРМИНОВ

АСМ – атомно-силовая микроскопия  
ВОЗ – всемирная организация здравоохранения  
ГРМ – гидролизат рыбной муки  
ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота  
ИСМП – инфекции, связанные с оказанием медицинской помощи  
КОЕ – колониеобразующая единица  
МБК – минимальная бактерицидная концентрация антимикробного препарата.  
МИК – минимальная ингибирующая концентрация антимикробного препарата.  
МПК – минимальная подавляющая концентрация антимикробного препарата.  
МС – мочевыделительная система  
ОРИТ – отделение реанимации и интенсивной терапии  
ПЦР – полимеразная цепная реакция  
CLSM – конфокальная лазерная сканирующая микроскопия  
D24 - диаметр колоний к 24 часам культивирования  
D0 – эффективный диаметр клетки  
*d*- диаметр колонии в момент измерения  
*Dt* – величина диаметра колонии к *t* часам инкубирования  
*GT* – время одной генерации  
*E. coli*– *Escherichia coli*  
*KD* – скорость линейного роста диаметра колоний  
MAIDI – Матрично-активированная лазерная десорбция/ионизация  
ND – нет данных  
P  
*t*- время инкубации  
*t1mm* – время достижения колониями диаметра в 1мм  
*μm*, (ч-1) – максимальная удельная скорость роста биомассы колоний\_\_