

Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и
благополучия человека
Федеральное бюджетное учреждение науки
ГОСУДАРСТВЕННЫЙ НАУЧНЫЙ ЦЕНТР ПРИКЛАДНОЙ
МИКРОБИОЛОГИИ И БИОТЕХНОЛОГИИ
(ФБУН ГНЦ ПМБ)

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

Диссертация
на соискание учёной степени
кандидата биологических наук

Научный руководитель: к.б.н. Фурсова Н.К.

Научный консультант: член-корр. РАН, д.м.н. проф., Дятлов И.А.

Оболенск – 2016

ОГЛАВЛЕНИЕ

	Стр.
ВВЕДЕНИЕ.....	5
ГЛАВА 1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	15
1.1 Мониторинг чувствительности к антисептикам и дезсредствам у микроорганизмов, циркулирующих в госпитальной среде	15
1.2 Функциональные классы биоцидов и их антибактериальная активность	19
1.2.1 Хлоргексидин.....	26
1.2.2 Триклозан.....	28
1.3 Использование препаратов биоцидов.....	29
1.4 Механизмы устойчивости бактерий к биоцидам.....	30
1.4.1 Распространенность бактерий со сниженной чувствительностью к биоцидам.....	31
1.4.2 Природная устойчивость к биоцидам у бактерий.....	33
1.4.3 Приобретенная устойчивость бактерий к биоцидам.....	35
1.4.4 Механизмы сочетанной устойчивости бактерий к антибиотикам и биоцидам	38
1.5 Бактериальные биопленки и формирование резистентности к биоцидам.....	40
1.5.1 Биопленки бактериальных патогенов и их клиническая значимость	40
1.5.2 Механизмы и этапы формирования бактериальных биоплёнок.....	42
1.5.3 Молекулярные сигналы для начала формирования биопленки.....	45
1.5.4 Чувствительность планктонных форм бактерий и бактериальных биопленок к антибактериальным препаратам	48
1.6 Методы изучения биоплёнок.....	49
1.7 Заключение по обзору литературы.....	54
ГЛАВА 2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ.....	56
2.1 Микробиологические методы.....	56
2.1.1 Штаммы микроорганизмов.....	56
2.1.2 Питательные среды и условия культивирования.....	56
2.1.3 Антибактериальные препараты.....	57
2.1.3.1 Антибиотики.....	57
2.1.3.2 Антисептики.....	57
2.1.4 Определение чувствительности бактерий к антибактериальным препаратам	57
2.1.4.1 Диско-диффузионный метод.....	57
2.1.4.2 Определение минимальной подавляющей концентрации и минимальной бактерицидной концентрации	

	антисептика методом микроразведений в бульоне и агаре.....	58
2.1.4.3	Определение минимальной подавляющей концентрации и минимальной бактерицидной концентрации антисептика методом аппликаторов.....	58
2.1.5	Селекция штаммов стафилококков, устойчивых к триклозану	59
2.1.6	Определение параметров роста бактерий	60
2.1.7	Моделирование бактериальных биопленок при выращивании культур на жидких и плотных питательных средах	60
2.2	Биофизические методы исследования	61
2.2.1	MALDI-TOF масс-спектрометрия.....	61
2.2.2	Анализ белковых MALDI-профилей.....	62
2.2.3	Атомно-силовая микроскопия.....	62
2.2.4	Электронная микроскопия.....	62
2.3	Молекулярно-генетические методы	63
2.3.1	Выделение бактериальной ДНК.....	63
2.3.2	Полимеразная цепная реакция.....	64
2.3.3	Секвенирование продуктов амплификации.....	65
2.3.4	Полногеномное секвенирование.....	65
2.4	Биоинформационные методы	66
2.4.1	Анализ амплифицированных последовательностей ДНК..	66
2.4.2	Анализ полногеномных последовательностей ДНК.....	66
2.4.3	Размещение последовательностей ДНК в международных базах данных.....	66
2.5	Статистические методы	67
2.5.1	Статистическая обработка данных.....	67
2.5.2	Расчет математических показателей скорости роста колоний бактерий.....	67
	СОБСТВЕННЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ	69
	ГЛАВА 3 ОЦЕНКА ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ ПЛАНКТОННЫХ КЛЕТОК И БИОПЛЕНОК ГОСПИТАЛЬНЫХ ШТАММОВ БАКТЕРИЙ К АНТИСЕПТИКУ ХЛОРГЕКСИДИНУ	69
3.1	Разработка метода сравнения чувствительности планктонных культур и бактериальных биопленок к антисептикам на примере хлоргексидина.....	69
3.2	Изучение антибактериальной активности хлоргексидина в отношении госпитальных штаммов бактерий.....	73
3.3	Сравнительный анализ морфологии и физико-химических параметров бактериальных клеток в планктонных культурах и биопленках.....	78
3.3.1	Изучение планктонных и биопленочных культур штамма <i>A. baumannii</i> В-1745 с помощью атомно-силовой микроскопии	79

3.3.2	Изучение планктонных и биопленочных культур штамма <i>A. baumannii</i> В-1745 с помощью электронной микроскопии	80
3.3.3	Сравнение белковых спектров планктонных и биопленочных культур с помощью MALDI-TOF масс-спектрометрии.....	81
3.4	Заключение по Главе 3.....	85
ГЛАВА 4	ИЗУЧЕНИЕ ЗАКОНОМЕРНОСТЕЙ ФОРМИРОВАНИЯ УСТОЙЧИВОСТИ К ТРИКЛОЗАНУ У <i>STAPHYLOCOCCUS AUREUS</i>	88
4.1	Селекция и характеристика мутантных вариантов штамма <i>S. aureus</i> ATCC25923, устойчивых к триклозану	88
4.1.1	Селективный отбор мутантных вариантов стафилококков, устойчивых к триклозану	88
4.1.2	Изучение стабильности приобретенной устойчивости к триклозану у мутантных вариантов стафилококков.....	90
4.1.3	Оценка чувствительности к антибиотикам у стафилококков, резистентных к триклозану	91
4.1.4	Определение параметров роста колоний стафилококков, устойчивых к триклозану	91
4.2	Анализ структуры гена еноил-ацил-редуктазы <i>fabI</i>	92
4.3	Выявление мутаций в геномах штаммов <i>S. aureus</i> , устойчивых к триклозану, с помощью полногеномного секвенирования.....	95
4.4	Заключение по Главе 4.....	97
	ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	99
	ВЫВОДЫ.....	103
	ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ.....	105
	ПЕРЕЧЕНЬ СОКРАЩЕНИЙ, УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ, СИМВОЛОВ, ЕДИНИЦ И ТЕРМИНОВ	106
	СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ.....	109
	ПРИЛОЖЕНИЯ.....	143
	СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ.....	155

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования. По данным ВОЗ, в последние десятилетия во всем мире растет число регистрируемых госпитальных (нозокомиальных) инфекций, то есть инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи (ИСМП) [30]. ИСМП представляют серьезную проблему общественного здравоохранения в силу своей распространенности, отрицательного влияния на показатели заболеваемости, смертности и степени тяжести состояния пациентов, а также опасности для медицинских работников и значительного экономического ущерба. Такие инфекции являются мировой проблемой, затрагивая все страны вне зависимости от их географического расположения и уровня развития [5, 47]. В России ИСМП ежегодно регистрируются у 35000 пациентов. Согласно экспертным оценкам, реальная заболеваемость госпитальными инфекциями может составлять до 2,5 млн. человек в год. Такая разница возможна из-за несовершенства надзора за ИСМП в большинстве Российских медицинских учреждений для своевременного выявления случаев ИСМП и принятия адекватных мер в целях их предупреждения. Если ситуация не изменится коренным образом, то к 2050 г. показатель заболеваемости внутрибольничными инфекциями может возрасти до 10 млн. человек [29].

Многочисленные исследования показывают, что в последние годы многие вспышки ИСМП были вызваны патогенными микроорганизмами, обладающими множественной лекарственной устойчивостью (МЛУ), а также устойчивостью ко многим дезинфицирующим средствам. Появление таких патогенов в госпитальной среде связывают с иррациональным использованием антибиотиков, а также с загрязнением окружающей среды дезинфектантами [160]. По данным, представленным в «Национальной Концепции РФ по профилактике инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи», разработанной в 2011 г., наблюдаемые в последние годы в России случаи регистрации и внедрения в практику здравоохранения неэффективных антисептических и дезинфекционных средств связаны с нарушениями в экспертной оценке новых средств и

подчеркивается необходимость создания новых методов определения чувствительности госпитальных патогенов к антимикробным препаратам [27].

Профилактика распространения ИСМП включает в себя деконтаминацию объектов окружающей среды (помещений, инструментария и др.) в близком окружении пациента, а также защиту организма пациента (его кожных покровов, слизистых оболочек и др.) от воздействия патогенных микроорганизмов. Для этой цели используются биоциды (дезинфектанты и антисептики) являющиеся неотъемлемой частью клинической медицины и широко использующиеся для предотвращения распространения внутрибольничных патогенов в условиях стационара [193].

Бактерии, подвергнутые воздействию биоцидов в сублетальных дозах, способны адаптироваться к данным веществам, что при повторном воздействии субингибирующих концентраций биоцидов приводит к формированию бактерий, резистентных не только к биоцидам, но и к антибиотикам [59]. Во многих случаях было показано, что за устойчивость бактерий к антибиотикам и за отсутствие чувствительности к биоцидам ответственны одни и те же или сходные молекулярные механизмы – снижение проницаемости мембран, активация эффлюкса, ферментативная инактивация препарата [46, 70, 97, 250]. Данный феномен получил наименование кросс-чувствительности или кросс-резистентности между биоцидами и антибиотиками, однако механизмы данного явления до сих пор изучены недостаточно [32, 37, 67]. По литературным данным, механизм действия биоцидов функционального класса бигуанидинов (например, хлоргексидина) на бактериальную клетку – воздействие преимущественно на оболочку бактериальной клетки, приводящее к разрушению мембран и утечке цитоплазматического содержимого [56]. Другие биоциды действуют на специфические фармакологические мишени в бактериальной клетке, например, триклозан - на фермент еноил-ацил-редуктазу FabI, участвующий в биосинтезе липидов [181].

По оценке Национального института здоровья США, 80% всех бактериальных инфекций человека, в том числе ИСМП, связаны с формированием биопленок микроорганизмов. Показано, что зрелые биопленки имеют значительно более высокую толерантность к антимикробным препаратам,

чем клетки в планктонном состоянии. Поэтому определение чувствительности патогенов к антисептикам предпочтительно проводить именно на бактериальных биопленках [192]. Описанные в специальной литературе случаи неудачного использования биоцидов, в том числе – антисептиков для гигиены кожи и слизистых у пациентов ОРВИ – может быть связано именно с неадекватной оценкой активности препаратов на бульонных культурах возбудителей [256].

В последние годы разработано большое количество *in vitro* методов для оценки активности биоцидов, используемых для конкретных клинических приложений, например, определение индекса активности дезинфектанта (ИАД) который представляет собой отношение рабочей концентрации дезинфектанта к его минимальной бактерицидной концентрации (МБК) для конкретной культуры или для популяции вида или группы близкородственных бактерий [9]. Применение современных методов визуализации изменило представление о возникновении и течении инфекционных заболеваний, обусловленных наличием биопленок [84]. В последние годы показано, что присутствие биопленок характерно для хронических инфекций [3]. К настоящему времени считается доказанной роль микробных биопленок в возникновении инфекций суставных протезов, сердечных клапанов, инфекций, связанных с катетеризацией сосудов, инфекций мочевыводящих путей, инфекций пародонта, инфекций среднего уха и других [3, 43, 80, 82, 151, 208].

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 с 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.

Цели и задачи

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* ATCC 25923, 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* ATCC 25923 и его изогенных вариантов, устойчивых к триклозану; выявить наличие мутаций в генах, связанных с формированием клеточной стенки и транспортом веществ.

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 пилеподобных 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 *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 – *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 метод оценки чувствительности планктонных клеток и биопленок микроорганизмов к антисептикам (Методические рекомендации, 2016 г.) – 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 г.) – 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 г) – 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 спланирована в соответствии со структурой и задачами исследования. Предметом исследования явилось: моделирование биопленки у возбудителей госпитальных инфекций и оценка чувствительности бактерий в планктонном состоянии и в составе биопленок к антисептикам (на примере хлоргексидина) для определения концентраций хлоргексидина, эффективных против современных штаммов госпитальных бактериальных патогенов; проведение селекции штамма *Staphylococcus aureus* ATCC25923, устойчивого к триклозану, изучение особенностей формирования резистентности, проведение генетического анализа вариантов штамма *Staphylococcus aureus* ATCC25923, устойчивых к триклозану.

В ходе работы был разработан метод получения бактериальных биопленок, позволивший количественно оценить уровень их чувствительности к антисептикам относительно планктонных форм бактерий, что дало возможность определить эффективную концентрацию хлоргексидина для современных штаммов бактерий. Проведена атомно-силовая и электронная микроскопия, а также масс-спектрометрическое исследование, характеризующие различия бактериальных культур в планктонном состоянии и в состоянии биопленки. Получен вариант штамма *Staphylococcus aureus* ATCC25923, устойчивый к антисептику триклозану, сравнительный анализ геномов исходного и устойчивого к триклозану вариантов показал наличие у устойчивого варианта мутаций, что позволяет определить возможные механизмы устойчивости *Staphylococcus aureus* к триклозану.

Научная литература, посвященная исследованиям в области процессов биопленкообразования, формированию и механизмам устойчивости микроорганизмов к противомикробным препаратам, проанализирована

формально-логическими методами. В работе использованы бактериологические, биофизические, молекулярно-генетические, биоинформационные и статистические методы исследования.

Объекты исследования

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

В качестве антисептических препаратов использовали:

- 1). «Дезин» - 20 %-ный водный раствор хлоргексидина (Дезиндустрия, Россия);
- 1). Триклозан (Sigma-Aldrich Chemie, GmbH. США).

Методы исследования

Работа основана на использовании экспериментальных методов исследования: микробиологических (определение антибактериальной активности антисептиков, формирование бактериальных биопленок, селекция устойчивых к триклозану клонов штамма *S. aureus* ATCC 25923, определение чувствительности штаммов бактерий к антибиотикам), молекулярно-генетических (выделение бактериальной ДНК, электрофорез ДНК, секвенирование участка генома в пределах гена *fabI*, кодирующего еноил-ацил-редуктазу, полногеномное секвенирование вариантов штамма *S. aureus* ATCC 25923, устойчивых к триклозану), биофизических (атомно-силовая и электронная микроскопия, MALDI масс-спектрометрия); биоинформационных (обработка результатов секвенирования ДНК с помощью программ Chromas (Techonolizium Ply Ltd, Австралия), Vector NTI9 (Invitrogen, США), веб-ресурса BLAST; статистических (обработка результатов и анализ полученных данных с помощью статистических программ Windows Excel).

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 Слукиным П.В.; биофизические и микроскопические исследования выполнены совместно 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 со Скрыбиным 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 планктонных клеток и биопленок бактерий.

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 данному антисептику. 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 клеточным транспортом.

Степень достоверности и апробация результатов

Результаты диссертационной работы представлены и доложены на:

1. Всероссийской научно-практической конференции «Актуальные проблемы общей и военной гигиены», Санкт-Петербург, 22 апреля 2011 г.
2. Международном конгрессе «Современные средства и технологии дезинфекции и стерилизации в профилактике инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи», Москва, 6-7 ноября 2014 г.
3. Ежегодном Всероссийском Конгрессе по инфекционным болезням, Москва, 30 марта – 1 апреля 2014 г.
4. XVI Международном конгрессе по антимикробной терапии, Москва, 21-23 мая 2014 г.
5. XVII Международном конгрессе по антимикробной терапии, Москва, 20-22 мая 2015 г.

Публикации

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

План и аннотация диссертации обсуждены и одобрены на заседании Ученого совета ФБУН ГНЦ ПМБ 2 июня 2016 г., протокол № 46.

ГЛАВА 1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Мониторинг чувствительности к антисептикам и дезсредствам у микроорганизмов, циркулирующих в госпитальной среде

Совершенствование качества медицинской помощи, увеличение спектра лечебно-профилактических и диагностических манипуляций, внедрение новых технологических подходов к сохранению здоровья людей одновременно сопровождается риском возникновения инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи (ИСМП).

По данным Всемирной организации здравоохранения во всем мире 1,4 миллиона человек страдают от инфекций, полученных в организациях здравоохранения [30], поэтому сложившаяся в настоящее время эпидемиологическая ситуация требует повышенного внимания к профилактике внутрибольничных инфекций. Это ведет к повышению требований как к качеству разрабатываемых дезинфицирующих и антисептических средств, так и к проведению дезинфекционных мероприятий, направленных на уничтожение возбудителей инфекций на объектах, являющихся факторами их передачи.

Одно из основных требований осуществления качественной, современной медицинской помощи - это обеспечение эпидемиологической безопасности лечебно-диагностического процесса. Устойчивость возбудителей не только к антибиотикам, но и к антисептикам и дезинфектантам, негативно влияет на эффективность профилактических мероприятий и способствует развитию эпидемического процесса внутрибольничных инфекций [5].

Для проведения эффективных мероприятий по контролю внутрибольничных инфекций необходимо учитывать высокий уровень заболеваемости внутрибольничными инфекциями, возникновение новых и возвращение старых инфекций, формирование полирезистентных штаммов условно патогенных микроорганизмов [101]. Последнее связано с широким

применением в клинической практике антисептиков, дезинфектантов, химиопрепаратов, оказывающих селективное давление на популяции внутрибольничных штаммов (эковаров), вегетирующих в организме стационарных больных и медицинского персонала, а также контаминирующих объекты больничной среды [4, 10].

При выборе антисептиков и дезинфектантов для закупки и применения в лечебно-профилактических учреждениях (ЛПУ) необходимо учитывать, прежде всего, их антимикробную активность и распространенность устойчивости к ним определенных микроорганизмов, преобладающих в экосистеме отделения (возбудители туберкулеза, инфекций дыхательных путей, урологических, желудочно-кишечных, гнойно-септических и др. заболеваний), а также частоту и нагрузку контаминации потенциально опасными микроорганизмами объектов больничной среды, подлежащих антисептической и дезинфекционной обработке. Эти мероприятия служат основой для выявления эпидемических рисков и предупреждения вспышек ИСМП [18].

Организация контроля чувствительности/резистентности госпитальной микрофлоры к антимикробным средствам (антисептикам, дезинфектантам) является составной частью общего микробиологического мониторинга, а также одной из составных частей эпидемиологического наблюдения за госпитальными инфекциями в условиях каждого стационара. В связи с этим, разработка стандартных, простых в исполнении и достоверных методов определения устойчивости микроорганизмов к антисептикам и дезинфектантам в практических баклабораториях является актуальной задачей [9,16].

При организации и совершенствовании мероприятий по предотвращению и контролю ИСМП учитывают биологические особенности возбудителей, определяющие их эпидемиологическую значимость. Развитие устойчивости к антисептикам и дезинфектантам у госпитальных штаммов микроорганизмов снижает эффективность терапевтических и профилактических мероприятий в стационарах и является важным фактором, способствующим распространению ИСМП. Это указывает на необходимость установления контроля за

устойчивостью микроорганизмов не только к антибиотикам, но и к антисептикам и дезинфектантам и разработки и внедрения в практику здравоохранения методов, тормозящих это опасное явление [7, 9].

В клинических лабораториях, как правило, не проводится предварительного определения чувствительности к используемым антисептикам и дезинфектантам возбудителей местных и системных гнойно-воспалительных заболеваний, и выбор препарата производится на основании данных о природной чувствительности выделенного или предполагаемого возбудителя, без учёта его возможной приобретённой устойчивости. Это связано с тем, что ранее частота встречаемости устойчивых к антисептикам микроорганизмов была низкой, и тактика применения антисептических препаратов, не учитывающая этого явления, была оправданной. В 1980–1990-е гг. положение существенно изменилось. В научной литературе все чаще стали появляться данные о выделении устойчивых к антисептическим препаратам вариантов бактерий от больных с различными нозологическими формами гнойно-септических заболеваний, из объектов больничной среды, включая рабочие растворы антисептиков [99, 201, 275]. Отмечено также снижение антибактериального эффекта антисептиков или его полное отсутствие [119]. В последние годы активно обсуждается возможность возникновения перекрестной резистентности к биоцидам и антибиотикам [149]. Вероятно, возникновение эффекта перекрестной резистентности может быть объяснено сходством воздействия антибиотиков и биоцидов на мишени в бактериальной клетке [32, 55, 70].

Важной особенностью бактериальных патогенов является их способность формировать биопленки на биотических и абиотических поверхностях. Структура и свойства биопленок обеспечивают бактериям повышение устойчивости к антибиотикам и дезинфектантам [131, 162, 265]. В некоторых случаях это объясняется непроницаемостью наружных структур биопленки для молекул антибактериальных веществ [120].

Изучение распространения устойчивых к дезинфектантам вариантов бактерий широко проводилось в различных типах больничных стационаров

(хирургический, ожоговый, реанимационный), к большому числу (более 20) дезинфектантов в Республике Беларусь [7]. Эти исследования продемонстрировали наличие в госпитальных условиях микробных популяций, устойчивых к различным дезинфекционным средствам содержащих в качестве активно действующих веществ гуанидин, ЧАС, спирты, хлоргексидин, глютаральдегид и др. Ко многим препаратам, используемым в РБ для дезинфекции инструментария и поверхностей в больничных отделениях, среди возбудителей ИСМП выявлена значительная доля устойчивых вариантов. Так, в изученной госпитальной популяции *P. aeruginosa* обнаружены варианты, устойчивые к Дезомиксу П (100%), Асфену 381 (90%), Микробаку форте (24%), Полидезу (19%), Дезомиксу ПМ (17%) [8, 15, 234].

Изучение устойчивости бактериальных патогенов к антисептикам и дезинфектантам является одним из важнейших направлений эпидемиологического надзора за инфекциями в медицинских учреждениях Российской Федерации [29]. Данное положение определено в СанПин 2.1.3.2630-10 «Санитарно-эпидемиологические требования к организациям, осуществляющим медицинскую деятельность», где в разделе II «Организация дезинфекционных и стерилизационных мероприятий» п. 1.9. указывается, что «в целях предупреждения возможного формирования резистентных к дезинфектантам штаммов микроорганизмов 9 следует проводить мониторинг устойчивости госпитальных штаммов с последующей их ротацией при необходимости» [34]. В исследовании Зуевой Л. П. и соавт., 2011 г. [13] проведено тестирование штаммов *Acinetobacter* sp. и *P. aeruginosa* на чувствительность к дезинфектантам, циркулирующих в ожоговых стационарах. Чувствительность определялась к нейтральному анолиту, средству на основе четвертичных аммонийных соединений (ЧАС) и к комбинированному препарату, содержащему смесь спиртов и глутаровый альдегид. Наиболее часто используемый в стационаре для обработки поверхностей анолит, оказался не активен по отношению к госпитальным штаммам ацинетобактерий и *P. aeruginosa*, что также подтверждалось и результатами микробиологических

посевов объектов внешней среды стационара и эпидемиологическими данными. Аналогичные результаты были получены в урологическом стационаре. Были протестированы штаммы *K. pneumoniae* к 5 дезинфектантам: - 0,05% нейтральный анолит, препарат на основе хлора, препараты на основе комбинации ЧАС и глутарового альдегида. Результаты учитывались по наличию роста культур в месте контакта штырьков репликатора (12 штук) с питательной средой. Госпитальные штаммы не погибали при воздействии анолита и хлорсодержащего препарата, также наблюдалась высокая устойчивость к одному из препаратов на основе комбинации ЧАС и глутарового альдегида. Еще одно исследование в отделении реанимации показало, что 33 из 35 протестированных генотипически штаммов *Acinetobacter baumannii* содержали интегрон I класса (маркер множественной устойчивости к антибиотикам и дезинфектантам, содержащим ЧАС). Результаты тестирования показали, что госпитальные штаммы длительное время выживали при воздействии дезинфектантов при различной экспозиции. Приведенные выше примеры показывают, что именно госпитальные штаммы способны развивать устойчивость к дезинфектантам с различными действующими агентами. Именно поэтому необходимо регулярное тестирование штаммов, длительно циркулирующих в стационарах на чувствительность к биоцидам.

1.2 Функциональные классы биоцидов и их антибактериальная активность

Биоциды — (от греч. *bios* - жизнь и лат. *caedo* - убиваю) химические вещества, способные подавлять жизнедеятельность биологических объектов. К биоцидам относят: пестициды, альгициды, фунгициды, гербициды, инсектициды, акарициды, зооциды и пр., а также противомикробные препараты: антисептики, дезинфектанты, антибиотики и пр.

Различия между антисептиками (средствами для обработки биотических поверхностей) и дезинфектантами (препаратами для обработки абиотических

поверхностей) весьма условны, так как в некоторых случаях одно и то же средство, в зависимости от концентрации, может быть использовано либо в качестве антисептика, либо в качестве дезинфектанта. Например, хлорамин Б в качестве антисептика для обработки рук используют в виде 0,25–0,5 % раствора, а в качестве дезинфектанта для обеззараживания поверхностей и инструментария - в виде 2–3 % раствора [6].

Антибактериальное действие антисептиков и дезинфектантов основано на изменении параметров окружающей среды (ионное равновесие, осмотическое давление). При бактериостатическом действии препарата нарушаются обменные процессы в микробной клетке, что приводит к замедлению размножения микроорганизмов. Бактерицидное действие антисептических и дезинфицирующих веществ основано на их способности проникать в цитоплазму бактериальной клетки, приводить к свертыванию белков и вызывать ее гибель [37, 89].

Эффективность антибактериального действия биоцидных препаратов зависит не только от их химического строения, но также и от строения бактериальной клетки, на которую они действуют. Клеточная стенка и цитоплазматическая мембрана являются первым препятствием на пути взаимодействия препарата с бактериальной клеткой, которое обеспечивает наличие осмотического барьера и избирательного проникновения веществ в клетку [4]. Проникнув внутрь клетки, биоциды взаимодействуют с различными компонентами ее содержимого, в зависимости от своей химической природы, что ведет к нарушению процессов метаболизма клетки [17]. Например, действие биоцидов фтористого натрия, фенилгидразина и др. заключается в ингибировании ферментов, что подавляет ряд метаболических процессов и, в конечном итоге может оказаться смертельным для микроорганизма [17]. Катионы тяжелых металлов оказывают токсическое действие на бактерии, реагируя с различными функциональными группами белков, что приводит к нарушению их структурной организации и функционирования [98, 122, 165, 224]. Механизм антимикробного действия оловоорганических соединений, в основном, сводится к ингибирующему воздействию на транспорт электронов в процессе

окислительного фосфорилирования [17]. Четвертичные аммониевые соединения, в основном, вызывают денатурацию белка и нарушают целостность клеточных мембран [178, 213]. Хлорорганические соединения, фенолы и хиноны обладают токсическим эффектом, вследствие их влияния на процессы дыхания [17]. Фенолы, кроме того, способны образовывать нерастворимые комплексные соединения с полисахаридами клеточной стенки, нарушая ее свойства [133, 231]. Хиноны, взаимодействуя с клеточными метаболитами, блокируют их и «выключают» из обменных процессов (Приложение А).

К используемым в клинической практике антисептикам предъявляются следующие требования: хорошая растворимость в воде, сохранение высокого уровня активности в присутствии органических веществ и при контакте с обеззараживаемым объектом, высокий уровень антибактериальной активности, отсутствие раздражающего действия на ткани макроорганизма, отсутствие значимого всасывания в кровь пациента [30].

На основании химического строения антисептики и дезинфектанты подразделяются на 12 групп: (1) альдегиды и спирты, (2) детергенты, (3) четвертичные аммониевые соединения, (4) галогены и галогенсодержащие соединения, (5) соли тяжелых металлов, (6) соединения ароматического ряда, (7) окислители, (8) кислоты, (9) щелочи, (10) красители, (11) производные нитрофурана, (12) препараты растительного происхождения [15].

Альдегиды обладают способностью дегидратировать (обезвоживать) бактериальные клетки, вызывать коагуляцию белков и гибель бактерий. Альдегиды (глутаральдегид, раствор формальдегида, гексаметилентетрамин) применяются для низкотемпературной дезинфекции, стерилизации эндоскопов и хирургического оборудования. Они имеют широкий спектр действия против бактерий [192, 229], бактериальных спор [110], грибов [109], вирусов [149].

Спирты также обладают дегидратирующей способностью. Они имеют широкий спектр действия в отношении вегетативных бактерий, включая микобактерии, а также в отношении вирусов и грибов, но не имеют спороцидного действия, однако обратимо ингибируют образование и прорастание спор [267,

284]. Спирты широко используются для дезинфекции твердых поверхностей и обработки кожи. Спирты в невысоких концентрациях используются в качестве консервантов и для усиления активности других биоцидов [149].

Детергенты – синтетические поверхностно активные вещества (ПАВ) [17]. Воздействие детергентов на бактериальную клетку приводит к разрушению мембран (лизис клетки) и переходу внутриклеточных компонентов в растворимую форму. Оно основано на разрушении межбелковых и межлипидных связей, денатурации белков. При добавлении детергентов в воду они изменяют поверхностное натяжение на границе раздела фаз, которое приводит к нарушению транспорта ионов и веществ, необходимых для жизнедеятельности бактериальной клетки, а также к снижению активности ее ферментных систем. ПАВ делятся на четыре типа: анионные (сульфаты), катионные (амины и их соли), неионогенные (глицерил лаурат, оксиэтилированные спирты) и амфотерные производные бетаина и имидазолина) [17].

Четвертичные аммонийные соединения (ЧАС) – соли с четвертичным атомом азота в качестве характерной химической группы. Одна из четырех углеродных связей, как правило, имеет более 10 углеродных атомов (напр., хлорид бензалкония). При действии на чувствительные бактериальные клетки молекулы ЧАС адсорбируются на компонентах клеточной стенки и проникают внутрь, взаимодействуя с фосфолипидами цитоплазматической мембраны, что приводит к ее разрушению и вытеканию внутриклеточных низкомолекулярных веществ, распаду белков и нуклеиновых кислот и лизису клеточной стенки, вызванному аутолитическими ферментами. Действие суббактерицидных концентраций ЧАС проявляется в нарушении функций мембраны - повышении проницаемости, изменении осмотического давления, нарушении транспорта молекул и ионов через мембрану, что вызывает торможение деления клеток [116]. ЧАС не обладают спороцидным эффектом даже при высоких концентрациях, приводя лишь к торможению развития прорастающей споры, но не останавливают процесс прорастания [178].

Галогены и галогенсодержащие соединения подразделяются на хлорсодержащие (Пантоцид, Хлорамин Б, Хлоргексидин) и йодсодержащие галогены (Йодоформ, Йодид калия, Повидон-Йод). В водном растворе соединения хлора образуют хлорноватистую кислоту [168, 169], которая при кислотной и нейтральной реакции распадается с освобождением кислорода и атомарного хлора, которые взаимодействуют с белками бактериальной клетки, что приводит к коагуляции последних [48, 167], а в щелочной среде распадается до образования гипохлоридного иона, который обладает свойствами окислителя. Соединения хлора имеют выраженное бактерицидное и спороцидное действие [51]. Йод оказывает быстрое бактерицидное, и спороцидное действие даже при низких концентрациях [193]. Соединения йода быстро проникают через клеточную стенку и действует на ключевые группы белков [150], нуклеотидов и жирных кислот [193], приводя к гибели клетки [216]. В медицинской практике применяются соединения йода с поверхностно-активными веществами – йодофоры (йодиол, йодонат, йодовидон, йодопирон). В качестве поверхностно-активных веществ используют поливиниловый спирт, поливинилпирролидон и др. (йодиолийодовидон, йодонатийодопирон).

Соли тяжелых металлов – соли химических элементов со свойствами металлов (в том числе и полуметаллов) и значительным атомным весом либо плотностью. При низких концентрациях солей тяжелых металлов происходит блокирование сульфгидрильных групп ферментов, необходимых для жизнедеятельности бактерий. При высоких концентрациях ионы тяжелых металлов денатурируют белки клеток, образуя альбуминаты [122]. Фармакологический эффект зависит от того, насколько сильно выражена денатурация белков, которая, в свою очередь, определяется концентрацией иона и степенью диссоциации соли. Разные соли металлов различаются по типу действия: алюминия ацетат, свинца ацетат, висмута нитрат основной и др. оказывают преимущественно вяжущее и слабое противомикробное действие, а серебра нитрат и ртути дихлорид – прижигающее и выраженное антисептическое действие [98, 165, 223]. В качестве антисептиков наиболее широко применяют

препараты серебра (серебра нитрат или ляпис, колларгол или коллоидальное серебро, протаргол или белковый препарат серебра и ртути (ртути дихлорид или сулема, ртути амидохлорида, ртути окиси желтой) [17].

Соединения ароматического ряда - препараты на основе фенола, которые применяются для дезинфекции поверхностей, инструментов, белья и т.д. Фенол (карболовая, бисфенол, хлоркрезол, триклозан) оказывает не только сильное антибактериальное, но и противопаразитарное, инсектицидное и противогрибковое действие [133]. На споры фенол действует незначительно. Фенол вызывает дегидратацию и денатурацию белков бактериальных клеток, а с повышением концентрации - осаждение белков и гибель клеток. Раствор фенола в концентрации 2-5 % убивает вегетативные формы практически всех микроорганизмов в течение 5-10 мин. Антибактериальное действие фенола усиливается при добавлении в раствор хлорида натрия и кислот, а также при повышении температуры раствора [230].

Окислители - вещества, которые, разлагаясь, выделяют молекулярный или атомарный кислород, приводящий к окислению биологических молекул, в частности, белков бактериальных клеток [6]. В медицинской практике применяют перекись водорода, надуксусную кислоту, калия перманганат. При контакте с тканями макроорганизма перекись водорода, под влиянием каталаз, расщепляется с выделением молекулярного кислорода, что сопровождается образованием пены, способствует механическому очищению ран, язв, полостей. Перекись водорода также способствует остановке кровотечений. Калия перманганат в присутствии органических веществ отщепляет атомарный кислород, антисептическое действие которого выражено в большей степени, чем молекулярного. В связи с этим, калия перманганат по антисептической активности значительно превосходит перекись водорода. В высоких концентрациях это вещество оказывает раздражающее и прижигающее действие на ткани [17].

Кислоты и щелочи обладают антибактериальным действием, пропорциональным степени их диссоциации в растворах и основанным на гидролизе белков и других органических молекул цитоплазмы [17]. Однако

большинство кислот и щелочей невозможно использовать в качестве антисептиков из-за выраженного раздражающего действия. В практике широко используются кислота борная и раствор аммиака. Кислота борная применяется в виде растворов для полосканий при воспалительных поражениях слизистой оболочки рта и зева, для промывания глаз, а также при некоторых заболеваниях кожи. Раствор аммиака (нашатырный спирт) оказывает выраженное антисептическое действие. Кроме того, подобно другим щелочным соединениям, он обладает моющими свойствами, зависящими от его способности растворять жиры и жироподобные вещества [24].

Красители (бриллиантовый зеленый, риванол, трипафлавин и метиленовый синий) обладают избирательной антибактериальной активностью - действуют преимущественно на грамположительные бактерии. Они отличаются низкой токсичностью для человека. Их активность значительно снижается в белковой среде (гной, кровь) [209]. Бриллиантовый зеленый обладает высокой противомикробной активностью в отношении золотистого стафилококка, возбудителя дифтерии и других грамположительных бактерий. Наличие органических соединений в среде резко снижает противомикробное действие препарата. Применяется наружно как антисептик при гнойных поражениях кожи [17]. Риванол (лактат 2-этокси-6,9-диаминоакридина), производное акридина, эффективен как антисептик при инфекциях, вызванных кокковой флорой, особенно стрептококками, обладает преимущественно бактериостатическим действием [17]. Трипафлавин или флавакридин (смесь хлоргидратов 3,6-диаминоакридина и его 10-хлорметилата), отличается большой силой противомикробного действия, угнетающе влияет на возбудителя дифтерии и кокковую флору (стрептококки, стафилококки, менингококки, гонококки) [17]. Метиленовый синий (хлористый тетраметилтионин) по антисептическим свойствам уступает другим препаратам этой группы. при лечении ожогов, гнойных заболеваний кожи и заболеваний мочевых путей, а также в качестве антидота при отравлении синильной кислотой [17].

Производные нитрофурана характеризуются высоким уровнем и широким спектром антибактериальной активности, а также относительно малой токсичностью для человека, поэтому многие препараты нитрофурана используются также как химиотерапевтические средства. Наиболее распространённый препарат данной группы – антисептик нитрофуран (фурацилин) [52]. В зависимости от концентрации нитрофураны оказывают бактериостатическое или бактерицидное действие. Они блокируют цикл трикарбоновых кислот в бактериальной клетке, тормозят клеточное дыхание, рост и размножение бактерий из-за нарушения биосинтеза ряда мембранных белков и активности дыхательных ферментов. Благодаря уникальному механизму действия нитрофураны эффективны при устойчивости бактерий к антибиотикам и сульфаниламидам [17, 37]. Резистентность бактерий к нитрофуранам развивается крайне медленно. Эти препараты не теряют активности в присутствии гноя и продуктов тканевого распада, стимулируют образование грануляций и заживление ран, не оказывая раздражающего действия [17].

Препараты растительного происхождения (новоиманин, хлорофиллипт, эвкалимин) – антибактериальные препараты, получаемый из лекарственных растений (зверобоя продырявленного, эвкалипта голубого, эвкалипта прутовидного), которые действуют преимущественно на грамположительные микроорганизмы и обладают противовоспалительным эффектом [17, 191].

1.2.1 Хлоргексидин

Хлоргексидин – катионный антисептик бисбигуанидового ряда, широко используемый антисептический препарат, который также используется в качестве дезинфицирующего средства и консерванта. Формула молекулы хлоргексидина $C_{22}H_{30}Cl_2N_{10}$, молекулярная масса 505,46 Да (рисунок 1.1). В химическом отношении хлоргексидин — это N,N"-бис(4-хлорфенил)-3,12-диимино-2,4,11,13-тетраазатетрадекандиимидамид. Хлоргексидин представляет собой белый

кристаллический порошок с температурой плавления +137°C, растворимый в воде (800 мг/л), раствор имеет выраженную щелочную реакцию. [202].

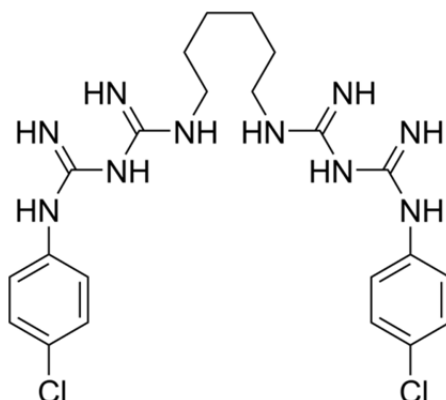


Рисунок 1.1 – Структурная формула хлоргексидина [202]

Хлоргексидин имеет широкий спектр антибактериальной активности. При разных концентрациях он активен против грамположительных и грамотрицательных бактерий, спор, грибов, а также имеет некоторую активность в отношении липидных оболочек вирусов, таких как вирус иммунодефицита человека (ВИЧ), вирусы герпеса серотипов 1 и 2, вирус гриппа серотипа А [47], но не действует на кислотоустойчивые бактерии [40]. Эффективность хлоргексидина в значительной степени зависит от pH и существенно снижается в присутствии органических веществ [228, 230]. Одним из преимуществ хлоргексидина является возможность его пролонгированного действия благодаря его способности связываться с различными биологическими субстратами, а затем медленно высвобождаться в окружающую среду, при сохранении антибактериальной активности. В низких концентрациях хлоргексидин является бактериостатическим агентом, при удалении его из окружающей среды функции бактериальной клетки восстанавливаются [135]. При более высоких концентрациях этот препарат является бактерицидным веществом – вызывает кристаллизацию клеточной мембраны, потерю её структурной целостности, катастрофическую потерю внутриклеточного вещества и гибель клетки [170].

Механизм действия хлоргексидина основан на его способности изменять свойства клеточной мембраны бактерии. При диссоциации молекул хлоргексидина образовавшиеся катионы взаимодействуют с клеточной оболочкой бактерий, имеющей отрицательный заряд. При этом липофильные группы препарата способствуют дезагрегации липопротеиновой мембраны бактерий, вследствие чего происходит нарушение осмотического равновесия и потеря калия и фосфора из клетки бактерии. Под действием препарата происходит разрушение цитоплазматической мембраны, нарушение осмотического равновесия, гибель бактерии [89, 123].

1.2.2 Триклозан

Триклозан (2,4,4'-трихлор-2'-гидроксидифениловый эфир, молекулярная формула $C_{12}H_7Cl_3O_2$, молекулярная масса 289.545 Да) – антисептический препарат, обладающий выраженной антибактериальной активностью (рисунок 1.2).

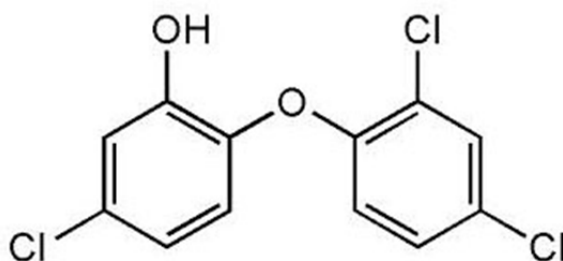


Рисунок 1.2 – Структурная формула триклозана [202].

Триклозан высоко активен в отношении грамположительных бактерий [240, 270], действие в отношении грамотрицательных бактерий менее выраженное, но значительно повышается при создании комплексных препаратов (напр., в сочетании с ЭДТА триклозан вызывает увеличение проницаемости внешней мембраны) [157]. Исследования показали, что, в дополнение к своим антибактериальным свойствам, триклозан обладает противовоспалительной активностью [271]. В низких концентрациях он ингибирует поглощение

питательных веществ, в то время как бактерицидные концентрации приводят к быстрому высвобождению клеточных компонентов и гибели клеток [223]. Долгое время антимикробная активность триклозана считалась неспецифичной [235]. Однако в настоящее время стало известно, что триклозан ингибирует синтез бактериальных жирных кислот, образуя комплекс с NAD^+ -зависимым ферментом еноил-ацил-редуктазой, обладая высоким сродством к данному ферменту, взаимодействует с его активным центром и конкурирует за место связывания с субстратом. Триклозан препятствует завершению цикла присоединения двухуглеродного фрагмента к основной цепи синтезируемого липида, кроме того, он ингибирует *de novo* биосинтез жирных кислот в клетке [247]. В результате синтез жирных кислот блокируется, сборка липидов останавливается, мембраны (в том числе плазматическая мембрана клетки, ограждающая ее от внешней среды) перестают обновляться. Такая «изношенная» мембрана уже не справляется со своими функциями (защитной, транспортной и пр.), и клетка довольно быстро погибает [89]. Еноил-ацил-редуктаза присутствует во всех без исключения прокариотических клетках. Для блокады одного фермента достаточно всего одной молекулы триклозана, которая проникает в цитоплазму и связывается с активным центром фермента [244].

1.3 Использование препаратов биоцидов

В практике здравоохранения используется большое количество коммерческих препаратов биоцидов, являющихся смесями (от двух до нескольких компонентов). Эффективность коммерческих препаратов биоцидов зависит от их состава, физико-химических характеристик, спектра антимикробной активности входящих в его состав компонентов, способа применения, применяемой концентрации и времени обработки [93]. Оптимальный режим обработки зависит от выбора концентрации препарата и времени обработки – один и тот же результат может быть достигнут с помощью высокой концентрации препарата в течение короткого времени обработки или с помощью более низкой

концентрации в течение более длительного периода контакта [242]. Большое значение для эффективности обработки имеют внешние факторы среды (температура, рН, присутствие ингибиторов), бактериальная нагрузка обрабатываемого объекта, наличие биопленок [166].

Появление штаммов бактерий, устойчивых к используемым на практике концентрациям биоцидов вызывает беспокойство клиницистов на протяжении последних десятилетий. В 1966 г. сообщалось об устойчивости грамотрицательных бактерий к серебру, применяемому в компрессах для обработки ожоговых ран [111, 190], в 1970-х гг. – об устойчивости грамотрицательных возбудителей инфекций ожоговых ран к сульфадиазину серебра (серебра в сочетании с сульфонамидом) [146, 278] и нитрату серебра [56, 179] (Приложение А).

1.4 Механизмы устойчивости бактерий к биоцидам

1.4.1 Распространенность бактерий со сниженной чувствительностью к биоцидам

Несмотря на широкое повсеместное использование биоцидов, феномен и механизмы приобретенной устойчивости к данному классу веществ у бактерий изучены недостаточно. В научной литературе описаны данные о формировании устойчивости к дезинфектантам и антисептикам у бактерий *in vitro*, однако информация о механизмах формирования такой резистентности в условиях госпитальной и внегоспитальной среды представлена недостаточно [78, 274].

Показано, что биоциды необходимо использовать в оптимальных концентрациях, чтобы избежать селекции устойчивых форм патогенов. В исследовании Lear J.C. с соавт. 2006 г. показано отсутствие появления клинических изолятов бактерий со сниженной чувствительностью к антисептикам, так как применяемые концентрации этих препаратов были значительно выше, чем минимальные подавляющие концентрации (МПК) биоцидов для изучаемых патогенов [274]. В ряде публикаций высказаны

предположения о связи снижения чувствительности бактерий к биоцидам с наличием у них плазмид устойчивости к антибиотикам. Так, клинические изоляты золотистого стафилококка, несущие плазмиду устойчивости к метициллину, имели сниженную чувствительность к хлоргексидину, цетримиду, хлориду бензалкония, триклозану и др. [74, 138]. В других исследованиях, напротив, не было зафиксировано связи между плазмидами устойчивости к метициллину и снижением устойчивости к исследуемым биоцидным препаратам. По мнению исследователей, повышение устойчивости к биоцидам у бактерий было связано с приобретением плазмиды дикого типа, что привело к существенным изменениям структуры клеточной стенки [90]. В другом исследовании было показано, что снижение чувствительности бактерий к бромистому этидию, акрифлавину, цетримиду, хлориду бензалкония и диамидину было опосредовано наличием структурно родственных плазмид, несущих гены оперона *qacABCD*, кодирующие эффлюксные насосы устойчивости к ЧАС. Многие исследования показывают, что эффлюксные насосы устойчивости к ЧАС широко распространены у клинических изолятов *Staphylococcus aureus* [129]. Наличие плазмид, кодирующих гены *qacA* и *qacC*, также показано для *Staphylococcus epidermidis* [155]. Озабоченность ученых вызывает тот факт, что данное семейство генов имеет значительную гомологию с другими энергетически-зависимыми транспортерами, такими как тетрациклиновый транспортер, найденный у устойчивых к тетрациклину клинических штаммов бактерий [69]. В литературе обсуждается влияние биоцидов на генетический обмен у бактерий. Показано, что передача рекомбинантных плазмид между донорными и реципиентными клетками значительно снижалась в присутствии катионных и ртутьорганических биоцидов [128], субингибирующие концентрации хлоргексидина, раствора йода и цетримиды тормозили конъюгативную и трансдуктивную передачу детерминант резистентности [210], конъюгативная передача TOL плазмид снижалась в присутствии фенола у различных видов бактерий [69].

В своем исследовании, Flores, M. et.al. 1997 г., описали выделение бактериальных штаммов, устойчивых к ряду консервантов и биоцидов, обычно

используемых в косметических продуктах. Для предотвращения контаминации косметической продукции подобными бактериями было предложено использовать многокомпонентные биоциды [96]. В других исследованиях резистентные к биоцидам штаммы *Enterobacter gergoviae* и *Pseudomonas aeruginosa* были выделены из косметических препаратов и из смывов с оборудования, на котором эти препараты производились [85, 94]. Оказалось, что широкое использование консервантов (парабены; формальдегид, имидазолидинилмочевина, 1,3-диметил-5, 5-диметил-(ДМДМ) гидантоин, феноксиэтанол) привело к селекции резистентных штаммов бактерий. Кроме того, было показано, что *Pseudomonas aeruginosa*, выделенные из косметических препаратов и некоторых других видов продуктов, обладали устойчивостью к ряду антибиотиков [136]. Широкое использование триклозана в косметических продуктах, товарах бытовой химии, а также средствах личной гигиены может объяснить факт выделения устойчивых к данному биоциду штаммов *S. aureus* [233]. Показано, что бактерии видов *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Mycobacterium smegmatis*, имели сниженную чувствительность к триклозану благодаря наличию у них эффлюксных насосов [274].

Несмотря на широкое использование биоцидов в процессе производства продуктов питания, данных об устойчивости к ним у микроорганизмов, выделенных из сырья или готовой продукции, достаточно мало. В литературе описаны случаи выделения пищевых патогенов, нечувствительных (толерантных) к биоцидам. Так, сальмонеллы, выращенные в среде с 72 мг/л недиссоциированной гипохлорной кислоты, приобретали устойчивость к данному препарату [187, 188]. Эти результаты согласуются с другим исследованием, в котором обнаружилось, что использование хлора в субингибирующих концентрациях приводит к селекции устойчивых вариантов *Salmonella* [38]. Также описаны изоляты *Salmonella enteritidis*, обладающие сниженной чувствительностью к хлору, нитриту натрия, бензоату натрия или уксусной кислоте, а также некоторым антибиотикам (тетрациклину, хлорамфениколу, налидиксовой кислоте, и ципрофлоксацину), что, по мнению авторов, связано с

наличием мутации в *tar* опероне, ответственном за устойчивость к данным антибактериальным препаратам [213]. Учитывая увеличение использования биоцидов на объектах животноводства, все большее опасение вызывает вероятность появления бактерий, резистентных к применяемым биоцидам [93]. Gradel K.O. et al. в 2005 г. изучали значения минимальных бактерицидных концентрация (МБК) для пяти коммерческих дезинфицирующих средств (формальдегида, глутаральдегида, бензалкония хлорида йодоформа и перекиси водорода), обычно используемых на птицеводческих фермах в Дании, для сальмонелл девяти серотипов, выделенных на разных птицефабриках [112], при этом штаммов с пониженной чувствительностью к дезинфектантам обнаружено не было. Аналогичные данные приводятся в работе Randall L.P. et al. 2007 г. [222]. Однако в исследовании Oethinger M. et al. 1998 г. была показана связь между применением циклогексана и возникновением толерантности к фторхинолонам у клинических изолятов *E.coli* [199]. В работе Randall L.P. 2001 г. описана устойчивость к циклогексану у сальмонелл различных сероваров, выделенных в животноводческих хозяйствах. Данные штаммы, кроме того, обладали повышенной устойчивостью к другим дезинфицирующим средствам (бромистому этидию, цетримиду, циклогексану и триклозану) и к нескольким антибиотикам [221]. Недавно опубликована работа исследователей из Таиланда, в которой показана широкая распространенность устойчивости к антибиотикам у изолятов *Salmonella enterica*, выделенных от домашней птицы и свиней, при этом только 1,9 % штаммов были толерантны к циклогексану [72].

1.4.2 Природная устойчивость к биоцидам у бактерий

Врожденные механизмы природной устойчивости бактерий к биоцидам обеспечивают высокий уровень устойчивости к данному классу препаратов. Наиболее хорошо изученным механизмом природной устойчивости является **непроницаемость бактериальной клеточной стенки** для биоцидов. Такое явление характерно не только для споровых, но и для вегетативных форм

бактерий, например, для микобактерий и, в некоторой степени, для грамотрицательных бактерий [74]. Низкая проницаемость клеточной стенки ограничивает количество биоцида, которое попадает в клетку, что приводит к снижению эффективности биоцидного действия при данной концентрации [4]. Например, наличие микоил-ацил-арабиногалактанового слоя у микобактерий делает их клеточную стенку непроницаемой для многих противомикробных препаратов [124]. Кроме того, наличие и состав арабиногалактана/арабиноманана в клеточной стенке также играет важную роль в действии различных концентраций биоцидов на микобактерии [56, 137, 203]. Некоторые работы указывают на важность липополисахаридов в качестве барьера проницаемости у грамотрицательных бактерий, а также других компонентов внешней ультраструктуры мембраны, включая белки, изменение состава жирных кислот и фосфолипидов [57, 182, 232, 236]. Следует отметить, что изменения ультраструктуры клеточной стенки, связанные со снижением чувствительности к биоцидам, наблюдали уже при низких (ниже, чем МПК) концентрациях биоцидов в среде культивирования [89].

Эффлюкс – еще один механизм природной устойчивости бактерий к биоцидам, который основан на снижении внутриклеточной концентрации токсичных соединений [161, 180, 211]. Наличие эффлюкса достаточно широко распространено среди бактерий, однако установлено, что активация эффлюксных насосов приводит к повышению МПК биоцидов для бактерий, но не сохраняется при длительном культивировании в отсутствие селективного давления биоцида. У золотистого стафилококка описаны эффлюксные насосы QacA-D, Smr, QacH и QacG [128, 129, 226, 272], у грамотрицательных бактерий *P. aeruginosa* - MexAB-OprM, MexCD-OprJ, MexEF-OPRN и MexJK [71, 189], у *E. coli* – AcrAB-TolC, AcrEF-TolC и EmrE [196].

Еще один механизм природной устойчивости бактерий к биоцидам - это **ферментативная модификация** молекул биоцида. Этот механизм описан для бактерий, имеющих устойчивость к катионам тяжелых металлов (например, серебра и меди), парабенам, альдегидам (формальдегиду), пероксидам. Он

обеспечивается наличием у бактерий специфических ферментных систем (каталаз, дегидрогиназ, супердисмутаза и др.) [74, 88, 268]. Экологическая биодegradация различных токсичных соединений многократно описана для псевдомонад и комплексных микробных сообществ [43]. Важность данного механизма для практического использования биоцидов не выяснена.

Модификация мишени, на которую действует биоцид в бактериальной клетке, мало распространен в качестве механизма природной устойчивости к биоцидам, однако описан как механизм приобретенной устойчивости к данному классу веществ.

1.4.3 Приобретенная устойчивость бактерий к биоцидам

Бактерии, изначально чувствительные к антибактериальным препаратам, приобретают нечувствительность к ним посредством накопления мутаций в геноме или в результате получения детерминант устойчивости в ходе горизонтального переноса генов. Развитие бактериальной резистентности может наблюдаться как к одному, так и к нескольким соединениям [55,70].

Бактерии способны достаточно быстро адаптироваться к неблагоприятным факторам, в том числе к воздействию биоцидов [245]. Описаны случаи размножения потенциально патогенных микроорганизмов в растворах, предназначенных для дезинфекции, адаптации к терапевтическим дозам антибиотиков и полирезистентности к десяткам антимикробных средств [98, 203, 275]. Причиной роста числа резистентных штаммов, возникновения и распространения полирезистентности во многих случаях является нерациональное и неадекватное использование антибиотиков, дезинфектантов и антисептиков. Роль селективного давления играют сублетальные концентрации антибактериальных препаратов, которые, с одной стороны, стимулируют формирование резистентности, а, с другой стороны, поддерживают резистентность бактериальной популяции на достигнутом уровне, за счет селективного преимущества резистентных штаммов [177].

Появление резистентных к биоцидам бактерий обусловлено определенными биохимическими и генетическими механизмами [100, 225]. Описаны случаи формирования резистентности к биоцидам у широкого спектра грамположительных и грамотрицательных микроорганизмов, - резистентность к ЧАС у *S. aureus* и коагулазонегативных стафилококков; резистентность к ЧАС, хлоргексидину, фурацилину и некоторым хлорсодержащим препаратам у *P. aeruginosa* [39, 115, 262]. Приобретенная устойчивость к биоцидам ассоциирована с появлением у бактериальной клетки новых молекулярно-генетических механизмов: изменение проницаемости мембран, изменение структуры мембранных липидов, активация эффлюксных насосов [121, 144, 161], появление новых ферментных систем [200, 245]. На генетическом уровне возникновение резистентных мутантов обусловлено точечными мутациями, делециями, инверсиями и т.д. Эти изменения могут происходить под воздействием повреждающего действия биоцидов или появляться спонтанно. Исследователи не исключают, что резистентность к биоцидам у бактерий может быть связана с островками патогенности, наличием генов вирулентности [4, 30].

Приобретение генов устойчивости имеет большое значение в описанных случаях возникновения перекрестной (сочетанной) устойчивости к антибиотикам и биоцидам [70, 74, 93, 113]. В ряде исследований сообщается, что в результате воздействия на бактериальную клетку субингибирующих концентраций биоцидов происходит индукция бактериальных механизмов резистентности, таких как сверхэкспрессия эффлюксных насосов [102, 222], гиперэкспрессия мультигенных систем *soxRS* и *OXYR*, а также индукция повышенной продукции универсальных регуляторных молекул – гуанозин-5'-дифосфат-3'-дифосфата (*ppGpp*) [92, 113]. Активация этих механизмов является реакцией бактериальной клетки на стресс, которым является присутствие биоцида в окружающей среде. Этот факт подтверждается рядом исследований, например, Wright N.E. & Gilbert P. 1997, Ma, D et.al. 1994 продемонстрировали снижение темпов роста у *E. coli* с повышенной экспрессией эффлюксных систем, находящихся в стрессовых условиях [172, 282]; Abdel Malek S. M. A. et al. в 2002 г. описали воздействие на клетки *P. aeruginosa*

изотиазолонов, индуцирующих реорганизацию клеточных обменных процессов [39]; Moken M. C. et al. в 1997 г. описали индукцию фенотипа множественной лекарственной устойчивости (МЛУ) и наличие перекрестной устойчивости к антибиотикам, сосновому маслу и триклозану [184].

Webber M. A. et al. в 2008 г. показали, что устойчивость к триклозану у *Salmonella typhimurium* может быть реализована разными механизмами: избыточной экспрессией или наличием мутаций в гене *fabI*, кодирующем фермент еноил-ацил-редуктазу, участвующий в синтезе жирных кислот, или активацией эффлюксных насосов AcrAB-TolC, MarA, SoxS [276, 251]. Мутации в активном центре фермента FabI не проходят для клетки бесследно. С одной стороны, фермент уже не блокируется триклозаном, но с другой стороны, его специфическая активность падает. Фермент частично, а иногда и полностью теряет способность катализировать реакцию, за которую ответственен. Именно поэтому большинство мутантов, у которых затрагивается активный центр фермента FabI, просто не способны выжить в естественных условиях. Этим и объясняется тот факт, что резистентность бактерий к триклозану в природе так и не была найдена [108]. Так как устойчивость к триклозану может быть обусловлена системой активного неспецифического выброса, при широком его применении возможно возникновение резистентности к другим антимикробным препаратам [65, 254].

Следует отметить, что на фермент еноил-ацил-редуктазу действуют еще два антимикробных агента – антибиотики изониазид (препарат, применяемый при лечении туберкулеза) [45, 53] и диазаборин (относительно новое соединение, которое используется при лечении инфекций вызванных *E. coli*) [86, 159]. Показано, что некоторые штаммы, устойчивые к данным антибиотикам, могут быть устойчивы и к триклозану [219].

Не выяснено окончательно, каким образом биоциды влияют на интенсивность генетического обмена у бактерий. В одних исследованиях показано, что они препятствуют передаче генетических элементов, а в других описано увеличение интенсивности горизонтального переноса генетической

информации [210]. Cookson V. et al., 2002 г. утверждает, что генетические детерминанты устойчивости к биоцидам могут быть переданы от одних бактерий к другим на фоне курса лечения антибиотиками. Он описывает факт передачи маркеров устойчивости к используемым биоцидам между штаммами метициллин-резистентных стафилококков (MRSA), выделенных от пациентов, получавших антибиотикотерапию [76, 77]. На фоне использования хлоргексидина, в течение шестилетнего периода, у грамотрицательных возбудителей нозокомиальных инфекций, выделенных из различных стационаров и являющихся носителями генов устойчивости к ЧАС, не было зарегистрировано передачи данных генетических детерминант [78]. При длительном использовании триклозана клинические изоляты MRSA увеличивали уровень устойчивости к мупироцину, но не изменяли уровня устойчивости к триклозану [77].

1.4.4 Механизмы сочетанной устойчивости бактерий к антибиотикам и биоцидам

Исследование чувствительности бактерий к антибиотикам и биоцидам традиционно проводилось по разным направлениям. Причиной этого является то, что антибиотики используются преимущественно для лечения бактериальных инфекций у человека и животных, а биоциды – для обработки биотических и абиотических поверхностей (дезинфекции окружающей среды и инструментов, консервации продуктов питания, косметических средств и бытовой химии и пр.).

Антибиотики действуют на конкретную мишень в бактериальной клетке, в то время как биоциды не имеют установленных мишеней и проявляют многофакторное действие на клетки бактерий [185, 235]. Однако, имеется ряд публикаций, в которых показано, что некоторые биоциды имеют определенную мишень в бактериальной клетке, например, триклозан который специфично подавляет фермент еноил-ацил-редуктазу, участвующую в синтезе липидов у стафилококка, кишечной палочки и микобактерий [108, 125, 126, 158, 198]. При летальных концентрациях триклозан влияет на синтез жирных кислот, вызывая

повреждения мембран [251, 287]. Изониазид, как и триклозан, ингибирует еноил-ацил-редуктазу у микобактерий [219]. Кроме того, показано, что антибиотики и биоциды имеют много общего с точки зрения условий и режимов их применения [212], а также выявленных механизмов, используемых бактериальными клетками для защиты от токсичного действия биоцидов и антибиотиков [218, 152, 253].

Кроме того, описаны факты, указывающие на сходство механизмов действия биоцидов и некоторых классов антибиотиков. Среди общих для биоцидов и антибиотиков механизмов действия можно отметить следующие: проникновение через клеточную стенку клетки путем пассивной диффузии; нарушение целостности мембраны бактериальной клетки; воздействие на разнообразные ключевые этапы бактериального метаболизма (репликация, транскрипция, транспорт, различные ферменты) [10].

К природным видоспецифичным механизмам устойчивости бактерий к антибактериальным препаратам относятся генетически закрепленные механизмы, такие как непроницаемость клеточной стенки для данных веществ, эффлюкс или внутриклеточная модификация токсичных для бактерии соединений [257]. Для уменьшения внутриклеточной концентрации токсичных молекул, грамотрицательные бактерии могут регулировать проницаемость мембран путем уменьшения синтеза белков-поринов, или активации гиперэкспрессии эффлюксных белков [104, 212]. Названные две стратегии защиты бактерий от токсических веществ являются общими для антибиотиков и биоцидов [175].

К приобретенным механизмам устойчивости относятся накопление точечных мутаций в геноме и горизонтальный перенос генов устойчивости на мобильных генетических элементах (плазмиды, профаги, транспозоны, IS-элементы, интегроны). Приобретенные механизмы могут обеспечивать устойчивость бактериальной клетки к токсическому действию как антибиотиков, так и биоцидов [175, 212].

В научной литературе дискутируется вопрос, является ли массированное использование антисептиков и дезинфектантов одним из факторов, которые способствуют формированию и распространению антибиотикорезистентности у

бактерий. Некоторые данные говорят в пользу высказанного предположения. Недавние исследования, проведенные на двух эпидемиологически важных патогенах, *Salmonella enterica* и *Stenotrophomonas maltophilia*, показали, что биоцид триклозан вызывает формирование перекрестной устойчивости к антибиотикам [55, 276]. Авторы сообщают, что устойчивые к триклозану *S. enterica* имеют пониженную чувствительность к антибиотикам, по сравнению с диким штаммом [144, 222]. Для бактерий вида *S. maltophilia*, подвергавшихся воздействию дезинфектантов на основе триклозана и фенола, описана активация эффлюксных насосов класса SmeDEF, которые также обеспечивают устойчивость к антибиотикам [144, 233]. В другом исследовании описана корреляция устойчивости к дезинфектантам и антибиотикам у *S. enterica* серовара Туфхумириум, которая сформировалась после выращивания сальмонелл при субингибирующих концентрациях биоцидов [222]. Описана активация эффлюксных систем у *P. aeruginosa* после воздействия на бактерии биоцида хлоргексидина [259]. Аналогично, воздействие биоцидов на клинические изоляты *S. aureus*, привело к селекции штаммов с повышенной экспрессией ряда генов антибиотикорезистентности [226, 272]. Похожие результаты были описаны для *S. enterica* и *E. coli*: штамм *E. coli* O157, сформировавший высокий уровень устойчивости к триклозану после двукратного пересева на питательных средах с сублетальными концентрациями триклозана, приобретал устойчивость к ряду антибиотиков, в том числе к хлорамфениколу, эритромицину импенему, тетрациклину и триметоприму, а также к некоторым биоцидам. Эти наблюдения показывают, что необоснованное и неадекватное использование биоцидов может играть немалую роль в формировании и распространении антибиотикорезистентности. Другим важным выводом является то, что механизмы устойчивости к антибиотикам и биоцидам имеют родство на генетическом уровне [73, 272, 281].

1.5 Бактериальные биопленки и формирование резистентности к биоцидам

1.5.1 Биопленки бактериальных патогенов и их клиническая значимость

Исследования последних десятилетий показали, что более 90 % бактерий в природной среде и в организме хозяина существуют в виде

сложноорганизованных сообществ — биопленок. Около 80% хронических заболеваний бактериальной этиологии ассоциировано с наличием биопленок [253]. Биопленки могут быть сформированы как одним видом бактерий, так и сообществом разных видов микроорганизмов. Образование биопленок является общепризнанной эволюционной стратегией выживания для бактерий [103].

Изучение биопленок вызывает огромный интерес исследователей в последние годы в силу того, что биопленки имеют большое клиническое значение, являются одной из проблем современного здравоохранения [8]. Важной особенностью бактериальных биопленок является их способность прикрепляться к абиотическим поверхностям, что объясняет трудности многократного использования инвазивного оборудования. Именно наличие биопленок является причиной описанных в литературе неудач в имплантологии, а также в антибиотикотерапии [174].

Исследования показывают, что бактериальные сообщества (ассоциации) в форме биопленок значительно более устойчивы к биоцидам и антибиотикам, чем планктонные клетки [49, 103, 248]. Причина этого явления связана, в первую очередь, со структурой биопленки (наличием внеклеточного полимерного матрикса, уменьшением проницаемости), а также с ее физиологическими особенностями (со снижением метаболизма клеток, ферментативной инактивацией биоцидов, активацией эффлюксных систем) [82, 106, 176, 207].

Доказано, что бактериальные патогены в составе биопленки имеют более высокий уровень вирулентности по сравнению с планктонными формами [255]. Частота инфекций, обусловленных наличием биопленок, оценивается на уровне до 80 % среди общего количества инфекций. Особенно высок этот показатель в индустриально развитых странах [120].

Показано, что многие возбудители кишечных инфекций, такие как *E. coli*, *Salmonella* spp., *Yersinia enterocolitica*, *Listeria* spp., *Campylobacter* spp., способны формировать биопленки на поверхности пищевых продуктов или на объектах окружающей среды на предприятиях пищевой промышленности. Госпитальные патогены, такие как *S. aureus*, *Enterococcus* spp., *Streptococcus* spp., *E. coli*,

Klebsiella spp., *P. aeruginosa*, как правило, формируют биопленки на инвазивном оборудовании (катетерах, искусственных суставах, механических клапанах сердца и т.д.) [62, 120, 252]. Биопленкообразование играет важную роль при таких инфекциях как кариес зубов, кистозный фиброз, инфекции мочевых путей, эндокардит, отит, глазные и раневые инфекции. Недавно продемонстрирована способность возбудителя гастритов и язвенной болезни *Helicobacter pylori* формировать биопленку на слизистой поверхности желудка, что поставило задачу перед клиницистами создание методов терапии, нацеленной эрадикацию биопленки *H. pylori* [60, 135]. Другим актуальным направлением антибактериальной терапии является поиск путей борьбы с биопленками, формируемыми возбудителями инфекций мочевыводящих путей [120, 258, 265].

1.5.2 Механизмы и этапы формирования бактериальных биоплёнок

Изучение вопросов адгезивной активности бактерий и формирования бактериальных биопленок в разных средах обитания является весьма актуальным научным направлением. Понятие биопленки значительно изменилось в течении периода времени с момента обнаружения организованных бактериальных сообществ. В настоящее время наиболее употребимым является определение биопленки как микробного сообщества, характеризующегося наличием клеток, прикрепленных к поверхности и/или друг к другу, заключенных в матрикс синтезированных ими внеклеточных полимерных веществ, которое характеризуется разделением функций клеток, находящихся на поверхности биопленки и внутри нее, и оказывающего огромное влияние на процессы, происходящие в природе, промышленности и медицине [43, 80].

В ряде публикаций, описан еще один тип организации бактериальных сообществ, а именно планктонные клеточные агрегаты, на примере *S. aureus* [117] и *P. aeruginosa* [41]. Подобно биопленкам, клеточные агрегаты имели внеклеточный экзополимерный матрикс (ЭПМ) и были более устойчивы к

антибактериальным препаратам, но биохимическая активность клеток в агрегатах была значительно выше таковой как в биопленках, так и у планктонных клеток. Таким образом, планктонные клеточные агрегаты объединяют в себе преимущества планктонного (мобильность) и биопленочного (повышенная толерантность к стрессовым условиям окружающей среды) способов существования бактерий [117].

Основное отличие зрелой биоплёнки от других вариантов микробных сообществ заключается в гетерогенности её внутренней среды, обуславливающей, прежде всего, локализацию метаболически дифференцированных клеток в различных участках трехмерного матрикса [26, 28] и наличие градиентов питательного субстрата [66], уровня pH и кислорода [65]. В результате последнего внутри биоплёнки формируется анаэробная зона [43, 65]. Полноценная биопленка высоко гидратирована и состоит из колоний микроорганизмов (около 15 % объема), окруженных экзополимерным матриксом (около 85 % объема) [43]. Биополимерные соединения матрикса играют роль молекулярного фильтра, сорбируя и концентрируя питательные вещества из внешней среды, а также ограничивая проникновение антимикробных препаратов к бактериям. Физиологическое значение ЭПМ бактерий состоит в создании и поддержании благоприятных условий для существования клеток бактерий [28]. Биополимерный матрикс, окружающий биопленку, неоднороден в разных слоях и у разных видов бактерий неодинаков, как по физическим свойствам, так и по химическому составу [66, 67]. Он меняется в результате адаптации бактерий к условиям внешней среды и состоит из смеси природных полимеров – экзополисахаридов, экзолипополисахаридов, гликопротеинов, протеогликанов, аналогичных веществам клеточной стенки, гликокаликса белков, полипептидов, нуклеиновых кислот и др. [249]. Матрикс пронизан каналами, по которым циркулируют питательные субстраты, ферменты, сигнальные метаболиты, кислород, продукты метаболизма бактериальных клеток [28]. Формирование бактериальных биопленок подчинено некоторым общим закономерностям, это сложный комплексный динамический процесс, состоящий из нескольких этапов [227]. Выделяют пять стадий развития

биопленки: адгезия, необратимое прикрепление, созревание, рост и дисперсия (рисунок 1.3).

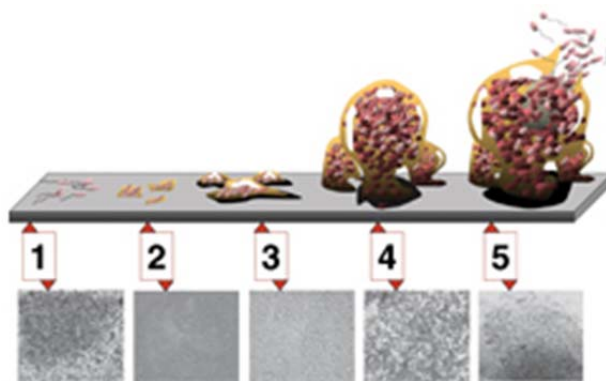


Рисунок 1.3 – Стадии формирования бактериальной биопленки

На первой стадии образования биопленки происходит первичное прикрепление (адгезия, сорбция) бактерий к поверхности на границе раздела фаз (чаще всего жидкость – твердая поверхность), эта стадия обратима. Первичное прикрепление планктонных клеток к поверхности обеспечивается наличием у них адгезинов, к которым относятся жгутики или пили IV типа *Pseudomonas* spp. и *Vibrio cholerae*, а также фимбрии, ворсинки и керли (от англ. – *curli*) *E. coli* [140, 204, 215, 240, 243, 260, 274]. Окончательное (необратимое) прикрепление биопленки, иначе называемое фиксацией, обеспечивается выделением внеклеточных полимеров, приводящим к прочной адгезии на поверхности [81]. На стадии созревания клетки, прикрепившиеся к поверхности, облегчают прикрепление последующих клеток, а внеклеточный матрикс удерживает вместе всю колонию. На стадии созревания клеточные агрегаты начинают расти в слоях внеклеточного матрикса [43]. Стадия созревания все еще требует наличия адгезинов, однако этот этап в основном характеризуется взаимодействием клеток между собой и формированием на поверхности важных компонентов, которые вносят вклад в структуру биопленки [84, 87]. На стадии роста образуется зрелая биопленка, которая изменяет свой размер и форму. Главным фактором, определяющим наличие зрелой архитектуры биопленки, является наличие внеклеточного полисахаридного матрикса, который служит защитой клеток от внешних угроз. Одним из наиболее распространенных и широко изученных матриксных экзополисахаридов является поли-N-ацетилглюкозамин [284],

который продуцируется бактериями разных видов, в том числе *E. coli*, *S. epidermidis*, *S. aureus*, *Yersinia pestis*. Некоторые бактерии способны продуцировать несколько видов полисахаридов, которые, как правило, придают различные физиологические свойства матриксу биопленки, например, биопленка *P. aeruginosa* построена из трех разных экзополисахаридов – альгината, первичный матричный полисахарид (PEL) и матриксный полисахарид (PSL), *Bacillus subtilis* секретирует два полимера – экзополисахарид (EPS) и поли-N-ацетилглюкозамин (PGA), в то время как *E. coli*, главным образом, синтезирует PGA и целлюлозу. Целлюлоза представляет собой полимер, образуемый группой кишечных патогенов, включая роды *Salmonella*, *Citrobacter*, *Enterobacter* и *Shigella*, который придает биопленке жесткость [107, 169]. Внеклеточная ДНК также может выступать в качестве структурного компонента матрикса биопленки. Внеклеточная ДНК является основным структурным компонентом биопленки *S. aureus* [107, 284]. Стадия дисперсии (выброса бактерий из биопленки) – стадия «рассеивания» биопленки, при которой от нее отрываются отдельные клетки, способные через некоторое время прикрепиться к поверхности и образовать новую колонию. В некоторых исследованиях изучены сигнальные молекулы, белки и ферменты, которые регулируют данный процесс в условиях уменьшения или изменения питательных веществ в окружающей среде [42, 140, 239, 246, 273]. Кроме доступности питательных веществ, существуют и другие факторы, влияющие на рассеивание биопленки, такие как наличие кислорода, присутствие продуктов анаэробного метаболизма, сигналы кворума и уровень синтеза молекулы c-di-GMP [72, 163, 169, 273]. Стадии развития биопленки, описанные выше, не синхронизированы по всей ее поверхности. Отдельные участки поверхности биопленки могут находиться на разных стадиях развития [169].243

1.5.3 Молекулярные сигналы для начала формирования биопленки

В процесс формирования бактериальных биопленок вовлекается ряд биохимических и генетических механизмов. Специфическим генетическим механизмом, ассоциированным с образованием биопленок, является наличие

генов, контролирующих прикрепление к субстрату и активных только в биопленках (Приложение Б, В).

После первоначального прикрепления бактериальные клетки размножаются с образованием агрегированных микроколоний, взаимодействуя между собой посредством молекул кворум-сенсинга (Quorum Sensing, QS). QS – особый тип регуляции экспрессии генов бактерий, зависящий от плотности их популяции. QS-системы включают низкомолекулярные сигнальные молекулы – аутоиндукторы и регуляторные рецепторные белки, с которыми связываются аутоиндукторы. QS-системы играют ключевую роль в регуляции большого числа процессов бактериальной клетки – регуляции вирулентности, экспрессии генов, связанных с синтезом экзоферментов, токсинов, антибиотиков. Также показано, что QS-системы являются одним из ключевых механизмов, приводящих к формированию биопленок у бактерий [63]. Наиболее изученной QS-системой является QS-система *P. aeruginosa*, у которой идентифицировано большое количество генов, в том числе ответственных за синтез факторов вирулентности, которые активируются двумя QS-системами LuxI-LuxR типа: LasI-LasR и RhlI-RhlR. LasI-LasR система регулирует синтез различных секретируемых факторов вирулентности, ответственных за разрушение тканей организма-хозяина при инфекционном процессе: эластазы, кодируемой геном *lasB*, протеазы, кодируемой *lasA*, экзотоксина, кодируемого *toxA*, щелочной фосфатазы, кодируемой геном *aprA*. LasR-LasI QS-система активирует также экспрессию генов RhlI-RhlR системы [91]. Комплекс белка RhlR с соответствующим аутоиндуктором C4-HSL индуцирует экспрессию двух генов, регулируемых QS-системой первого типа, *lasB* и *aprA*. Кроме того, этот комплекс участвует в регуляции экспрессии генов, важных для вирулентности бактерий и их выживания в природных условиях [102].

Экспериментально показано, что QS-системы *P. aeruginosa* необходимы для формирования зрелых, дифференцированных биопленок. Мутация по гену *lasI* приводит к неспособности *P. aeruginosa* формировать зрелые биопленки, образование которых останавливается на стадии микроколоний [87].

Во многих исследованиях приводятся данные о важной роли в процессе образования бактериальных биопленок специфических молекул – модифицированных нуклеотидов, прежде всего – циклического ди-гуанозинмонофосфата (с-di-GMP). Гены, ответственные за синтез и разрушение с-di-GMP имеются у всех прокариотических организмов и отсутствуют у высших эукариотических организмов [200]. Уровень с-di-GMP определяется двумя классами ферментов – дигуанилатциклазами, которые синтезируют с-di-GMP, а также фосфодиэстеразами, которые разрушают с-di-GMP, превращая его в дигуанозинмонофосфат [153, 154]. Показано, с-di-GMP положительно влияет на экспрессию *pel*- и *psl*-генов, обеспечивающих продукцию матричных полисахаридов *P. aeruginosa* [95]. Переключение синтеза с-di-GMP с высокого уровня на низкий является одним из центральных механизмов, контролирующих образование и разрушение биопленки [173]. Низкие уровни необходимы для фазы прикрепления бактерий к субстрату и наблюдаются на ранних стадиях адгезии бактерий. Они сменяются высокой продукцией с-di-GMP, которая отражает фазу активного образования биопленки, обеспечивая снижение подвижности, продукции внеклеточной ДНК, повышенный синтез экзополисахаридов, агрегацию клеток и т.д. Для стадии дисперсии биопленки необходимо очередное ослабление уровня с-di-GMP, которое сопровождается снижением продукции биопленочных экзополисахаридов и усилением жгутиковой подвижности [173]. Ma Q. et al. в 2011 г. обнаружили белок VdcA, который связывает с-di-GMP и, тем самым, запускает отторжение биопленки *E. coli*, не разрушая ее структуру [194].

1.5.4 Чувствительность планктонных форм бактерий и бактериальных биопленок к антибактериальным препаратам

Многочисленные исследования показали, что биопленки имеют повышенную устойчивость к антибактериальным препаратам. по сравнению с планктонными клетками бактерий [43, 80, 84]. Установлено, что в данный показатель вносят свой вклад как свойства бактериальных клеток, так и

внеклеточного матрикса [255]. Матрикс биопленки связывает и инактивирует антибактериальные препараты, а также не пропускает их внутрь структуры биопленки [80, 84]. Повышенная устойчивость бактериальных клеток, входящих в состав биопленки, объясняется уменьшением их свободной поверхности за счет плотных контактов друг с другом и формированием особых бактерий, получивших название персистеров. Персистеры, в силу дифференцировки, временно становятся устойчивы практически ко всем антибактериальным препаратам [244, 237]. Таким образом, основными механизмами повышенной устойчивости бактериальных биопленок являются: (1) ограничение проникновения антибиотиков в структуру биопленки; (2) уменьшение скорости деления бактерий в биопленке из-за ограничения питания и изменения микросреды; (3) активация эффлюксных насосов; (4) образование клеток-персистеров [87, 130, 162, 241].

Антибактериальные препараты, активные биопленок, подразделяются на два типа: (1) проникающие в биопленку, действующие бактериостатически или бактерицидно на образующие ее бактерии; (2) практически не проникающие в биопленку, но эффективно препятствующие расселению ее клеток на стадии дисперсии [84, 237]. Например, ампициллин плохо проникает в биопленки *Klebsiella pneumoniae*, а препараты ампициллин, ко-тримаксозол и ванкомицин – в биопленки *Enterococcus faecalis* [122]. К числу антибиотиков, хорошо проникающих через липиды клеток, относятся фторхинолоны. Поэтому данная группа антибактериальных препаратов используется при лечении инфекций мочевыводящих путей, при которых требуется накопление лекарства в достаточной концентрации в очаге инфекции [35].

Таким образом, повышение эффективности антибактериальной терапии инфекций, связанных с наличием бактериальных биопленок, вызывает необходимость тестирования антибактериальных препаратов на их способность проникать в биопленки, действовать на уже сформированные сообщества и угнетать их образование и расселение.

1.6 Методы изучения биоплёнок

Микробиологи выделяют несколько степеней организации бактериальных сообществ: планктонные клетки, клеточные агрегаты, колонии клеток, бактериальные биопленки. Наличие зрелой бактериальной биопленки связывают с наличием: генов, контролирующих биопленкообразование, элементов биопленочного внеклеточного матрикса, сложных архитектурных структур, специфичных для биопленки [19]. Для изучения биопленок используют разные методические подходы.

Методы культивирования биоплёнок. В последнее десятилетие произошло значительное расширение возможностей изучения формирования микробных биопленок, связанное с разработкой методов культивирования бактерий в динамических и статических условиях, имитирующих естественные условия образования биопленок [19]. К динамическим относятся методы с использованием лабораторных ферментеров, которые основаны на культивировании бактерий в закрытой проточной системе в условиях постоянного потока жидкости. Первоначальная адгезия бактерий происходит на поверхности системы фильтров и/или на внутренних частях ферментера. В дальнейшем адгезированные микроорганизмы образуют матрикс биопленки [75, 242]. Другим примером динамического метода является культивирование в аппарате Робинсона и в его модификациях. В этом методе используют аппарат сложной конструкции, обеспечивающий ток питательной среды, которая соприкасается с пластинами из искусственного или биологического материала, на поверхности которого находятся заранее адгезированные клетки изучаемых бактерий, на основе которых формируется биопленка [118]. Проточный метод относится к микроциркуляторным методам. Бактериальная биопленка образуется на поверхности силиконовых трубок проточных ячеек, через которые с помощью помпы постоянно прокачивается питательная среда. Такой метод позволяет моделировать процессы образования биопленки на абиотических объектах,

например, на внутрисосудистых катетерах [142]. Основным преимуществом динамических методов формирования биопленок является максимальное приближение к условиям в живых системах. Постоянное поступление питательных веществ и удаление продуктов жизнедеятельности бактерий позволяет значительно интенсифицировать процесс формирования биопленки. Условия, обеспечивающие жизнедеятельность бактерий в биопленке, полученной такими методами, стандартизированы, а влияние посторонних факторов минимизировано. К недостаткам данной группы методов можно отнести их ограниченное использование в связи с большими объемами потребления питательных сред, сложной конструкцией оборудования, затруднением стерилизации внутренних поверхностей аппаратов, низкой производительностью методов, высокой стоимостью эксплуатации [22].

Вторая группа методов культивирования бактериальных биопленок основана на создании статических условий культивирования. Наиболее часто используемым является метод в разных модификациях с применением 96-луночных пластиковых планшетов [206]. Метод основан на способности бактерий формировать биоплёнки на поливинилхлоридном пластике (ПВХ). Суспензию бактерий вносят в лунки планшета, после инкубации в оптимальных условиях планктонные бактерии удаляют вместе с питательной средой, образовавшиеся биопленки окрашивают красителем и проводят количественный учёт связанного красителя спектрофотометрически, что позволяет проводить количественное сравнение способности образования биоплёнок разными штаммами [206]. Этот метод до сих пор не потерял своей значимости, однако научный интерес отечественных исследователей к нему в последнее время значительно снизился, а практическое значение так и не получило должной оценки в нашей стране. В первую очередь, это связано с тем, что для этого метода не разработаны стандарты, позволяющие унифицировать его в разных лабораториях [22]. Одной из модификаций планшетного метода формирования биопленок является ALI-метод (air-liquid interface), основанный на культивировании бактерий в наклонном планшете так, чтобы мениск жидкой питательной среды соприкасался

с серединой дна лунки. В месте соприкосновения жидкой питательной среды с этой зоной формируются максимально благоприятные условия для формирования биопленки. Этот метод позволяет визуализировать биопленки с помощью фазово-контрастной микроскопии, без необходимости использования красителей, а мониторинг проводить в режиме реального времени. Недостатком метода является возможность упаривания питательной среды в лунке и высыхание биопленки [184]. Одним из вариантов статического метода является выращивание бактериальных биопленок на гидроксиапатитовых дисках, разработанный для изучения биопленок возбудителей инфекций в стоматологии. Материал дисков был выбран из-за высокой пористости и схожести его строения со строением зубной ткани. Диск помещают на поверхность плотной питательной среды, наносят на него суспензию исследуемой бактериальной культуры. Питательные вещества поступают из плотной среды к бактериям, путем диффузии через поры поликарбонатного диска [184].

Отдельно следует указать на метод, разработанный D. E. Kadouri et. al. в 2011 г, который занимает промежуточное положение между статическими и динамическими методами. В методе используют 6-луночные планшеты, к каждой лунке которых подведена система подачи и отвода питательной среды. После определенного времени инкубации, достаточного для адгезии бактерий на поверхности лунки, подключается система микроциркуляции, которая обеспечивает оптимальное поступление питательных веществ к формирующейся биопленке [184].

Методы визуализации биопленок. Ультраструктура бактериальных биопленок изучается методами, основанными на микроскопии, окраске биопленок, флуоресценции и флуоресцентной гибридизации.

Наиболее часто используемым методом микроскопии является конфокальная лазерная сканирующая микроскопия (CLSM) основанная на детекции рефлексированного изображения, получаемого через объективы в результате преломления по системе зеркал, на детекторе, который обрабатывает проходящие лучи, составляя изображение, передаваемое на монитор компьютера.

При помощи движения лазерного луча происходит послойное сканирование исследуемого объекта. Изображение, получаемое на мониторе CLSM, имеет зеркальное отображение под углом 90° , по отношению к изображению, получаемому в световом микроскопе. При регистрации флуоресценции в фокусе лазерного луча LSCM наблюдается объёмное изображение объекта [20, 36].

Упомянутый выше метод окрашивания биопленок красителями в статических методах культивирования также является широко используемым методом визуализации, который позволяет дать условную количественную характеристику образовавшимся бактериальным биопленкам. Количество сорбированного красителя прямо пропорционально количеству матрикса биопленки, поэтому позволяет оценить состояние биопленки по оптической плотности исследуемого образца [64, 285];

Достаточно новым методом изучения и детекции бактериальных биопленок, является биолюминесценция (BPI) – которая используется в экспериментах как *in vitro*, так и *in vivo*. Визуализация основана на наличии в изучаемых бактериальных объектах плазмид, несущих гены, кодирующие люминесцирующий белок. При этом визуализируются как адгезированные бактерии, так и матрикс биопленки [141];

Другим методом, который сравнительно недавно начал использоваться для изучения бактериальных биопленок, является метод флуоресцентной гибридизации *in situ* (FISH), который часто совмещается с методом CLSM. FISH-метод гибридизации применяют для детекции и определения расположения специфических мРНК в клетках, образующих биопленки, что позволяет установить пространственно-временные особенности экспрессии генов в бактериях в составе биопленки. С помощью этого метода была описана неоднородность структуры биопленки и выявлены клетки-персистеры, ответственные за выживание бактериальной популяции во время воздействия летальных для основной массы клеток факторов [197, 256].

Генетические методы изучения биоплёнок. Для выявления генов, участвующих в генетическом контроле процесса образования бактериальных

биофленок, используют методы направленного и ненаправленного инсерционного мутагенеза. В литературе описаны мутанты бактерий видов *P. aeruginosa* и *E. coli*, дефектные по способности образовывать биофленки, полученные с помощью транспозонного мутагенеза [250].

Другой подход для изучения генов, контролирующих развитие биофленок у *P. aeruginosa*, был использован А. Finelli et al. в 2003 г. которые использовали систему исследования генов, экспрессируемых в зрелой биофленке. В основе метода лежит использование мутанта-ауксотрофа со строгой питательной потребностью, позволяющего отбирать активные промоторы в биофленках, способные восстановить прототрофность у мутанта [95].

Для определения факторов, влияющих на трехмерную структуру бактериальных биофленок, используют подход введения в геном изучаемых бактерий репортерных генов, таких как зеленый флуоресцентный белок (green fluorescence protein – GFP) как на плазмидном векторе, так и в составе хромосомы. Для флуоресценции GFP не требуется каких-либо кофакторов или субстратов и, следовательно, возможно непосредственное наблюдение экспрессии GFP *in vivo* в индивидуальных клетках, клеточных популяциях или даже в целых организмах в режиме реального времени [194, 220]. Lefebvre M. D. & Valvano M. A в 2002 г. описали новые GFP-векторы, содержащие кассету гентамицин-устойчивости, для исследования регуляции генной экспрессии у *B. cephalosporium* [155, 156].

Изменения в метаболизме бактерий при их переходе к прикрепленному образу жизни в составе биофленки изучают путем сравнительного анализа состава мРНК и белков в клетках планктонных бактерий и в составе биофленки. Эти исследования, наряду с микроскопическими наблюдениями, позволили описать стадии развития биофленки, в том числе прикрепление к субстрату, образование микроколоний и каналов, созревание биофленки, а затем дисперсию клеток. Для выявления различий в экспрессии генов и, соответственно, в белковых составах клеток на разных стадиях развития биофленки применяют протеомный анализ. При этом выращенные бактерии после центрифугирования и промывания для

удаления среды выращивания подвергают одномерному электрофорезу. Преимущество одномерного электрофореза состоит в том, что белковый портрет культуры получается более полным, чем при двухмерном, при котором обработка культуры приводит к потере некоторых мембранных фракций. Далее получают протеомные карты посредством двухмерного гель-электрофореза и масс-спектрометрии по технологии MALDI, основанной на лазерной десорбции и ионизации макромолекул, опосредованной матриксом и детекторами ионов, которые позволяют определять время их полета [50, 75, 164]. Данный метод позволяет проводить сравнительный анализ белковых профилей мутантных штаммов, что дает возможность определить, каково влияние исследуемой мутации на экспрессию гена и на генетический контроль изучаемого процесса, в котором он участвует [1].

1.7 Заключение по обзору литературы

Анализ научной литературы позволяет сделать вывод о том, что биоциды, включая дезинфектанты и антисептики, играют важную роль в контроле возбудителей инфекционных заболеваний. Существуют научные доказательства того, что чрезмерное или неправильное использование биоцидов может способствовать формированию и распространению бактерий, устойчивых не только к биоцидам, но и к антибиотикам. Особую опасность представляет использование биоцидов в субингибирующих концентрациях, способствующее селекции бактерий, несущих гены резистентности и способных передавать их в результате горизонтального переноса генов.

Особенно важным моментом является необходимость мониторинга состояния чувствительности бактериальных патогенов, циркулирующих в госпитальной среде, поскольку данная среда является резервуаром генов резистентности не только к антибиотикам, но и к биоцидам. В этой связи актуальным является разработка стандартных методов для измерения и анализа уровней устойчивости, позволяющих выявлять неэффективные в данный момент

препараты и определять оптимальные схемы применения дезинфектантов и антисептиков.

В настоящее время проводятся исследования, направленные на выяснение механизмов резистентности бактерий к биоцидам и появления индуцированной биоцидами устойчивости к другим антибактериальным препаратам. Проводятся поиски новых методов оценки эффективности биоцидов в разных областях применения – здравоохранении, ветеринарии, производстве продуктов питания, косметики и потребительских товаров. Разрабатываются региональные и национальные программы наблюдения и контроля за уровнем резистентности бактерий, циркулирующих в госпитальной среде, ветеринарной сфере и пищевой промышленности. Важным направлением является изучение эффективности и механизмов воздействия биоцидов на бактерии, в разных физиологических состояниях, в том числе в планктонной форме, а также в составе агрегатов и биопленок.

Несмотря на значительный прогресс, который был достигнут в последние десятилетия в области разработки новых биоцидов, изучения их свойств, механизмов действия и обнаружения новых сфер применения, остается нерешенным достаточно широкий круг вопросов, требующих внимания микробиологов, молекулярных биологов и эпидемиологов. К таким вопросам относятся: изучение механизмов действия биоцидов на современные штаммы бактерий, характеризующиеся высоким уровнем резистентности к лекарственным препаратам; разработка новых методов быстрого тестирования активности используемых и вновь разрабатываемых антибактериальных препаратов, эффективных против потенциально опасных бактерий; выявление молекулярных и генетических механизмов перехода бактериальных клеток из планктонного состояния в биопленку; поиск новых мишеней воздействия антибактериальных препаратов.

ГЛАВА 2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1 Микробиологические методы

2.1.1 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. [2, 14], а также референс-штаммы *K.pneumoniae* ATCC 700603, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC25923 и *P. aeruginosa* ATCC 27853, рекомендованные Федеральным бюджетным учреждением науки «Научно-исследовательский институт дезинфектологии» Роспотребнадзора для оценки активности дезинфектантов и антисептиков [25, 33], полученные из Государственной коллекции патогенных микроорганизмов «ГКПМ-Оболенск».

2.1.2 Питательные среды и условия культивирования

Для культивирования штаммов *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa*, *A. baumannii*, *P. mirabilis* и *E. coli* использовали агар и бульон Мюллера-Хинтона (HiMedia, Индия). Культивирование проводили в течение 18-20 ч при температуре 37 °С.

Культивирование биопленок *A. baumannii* проводили: на агаре Мюллера-Хинтона (HiMedia, Индия) в течение 72 ч и 168 ч при температуре 37 °С; в бульоне Мюллера-Хинтона на пластине из полистирола в течение 72 ч и 168 ч при температуре 37 °С и интенсивном встряхивании.

Для культивирования *S. aureus* использовали Nutrient agar и Nutrient broth (HiMedia, Индия) и среду ГРМ (Оболенск, Россия). Культивирование проводили в течение 18-20 ч при температуре 37 °С.

2.1.3 Антибактериальные препараты

2.1.3.1 Антибиотики

Для определения чувствительности бактериальных культур к антибиотикам использовали коммерческие диски (HiMedia, Индия) с определенными концентрациями антибактериальных препаратов пяти функциональных классов: бета-лактамы - ампициллин (10 мг/л), тикарциллин (75 мг/л), тикарциллин /клавулановая к-та (75/10 мг/л), цефалеперзон (75 мг/л), цефотаксим (10 мг/л) и цефтазидим (30 мг/л), меропенем (10 мг/л); аминогликозиды - гентамицин (10 мг/л), стрептомицин (10 мг/л), нетилмицин (10 мг/л), миноциклин (30 мг/л), амикацин (10 мг/л); тетрациклины - тетрациклин (10 мг/л), доксициклина гидрохлорид (10 мг/л); фторхинолоны - ломефлоксацин (10 мг/л), норфлоксацин (10 мг/л), офлоксацин (5 мкг/мл); фениколы - хлорамфеникол (10 мг/л).

2.1.3.2 Антисептики

В качестве антисептических препаратов использовали:

1. Антисептик «Дезин» (ООО «Дезиндустрия», Россия), представляющий собой 20 %-ный водный раствор хлоргексидина.
2. Триклозан – (97%HPLS), Sigma-Aldrich Chemie, Германия).

2.1.4 Определение чувствительности бактерий к антибактериальным препаратам

2.1.4.1 Диско-диффузионный метод

Определение чувствительности к антибиотикам штаммов бактерий проводили при использовании диско-диффузионного метода [25]. Для этого засеивали газон 100 мкл бактериальной суспензии, эквивалентной стандарту мутности 0,5 по McFarland и содержащей примерно $1,5 \times 10^8$ КОЕ/мл бактериальной культуры, и выкладывали на поверхность агара целлюлозные

диски, содержащие антибиотик. После инкубации чашек в термостате при 37 °С в течение ночи учитывали результат путем измерения диаметра зоны задержки роста бактериальной культуры вокруг диска в мм.

2.1.4.2 Определение минимальной подавляющей концентрации и минимальной бактерицидной концентрации антисептика методом серийных разведений в бульоне и агаре

Антибактериальную активность антисептиков оценивали по степени ингибирования размножения культур бактерий в планктонной форме:

а) методом серийных разведений в бульоне (МУК 4.2.1890-04) [25]: пробирки, содержащие 4 мл питательного бульона и двухкратные разведения (0,00005-0,250 %) антисептика, засевали 0,02 мл бактериальной культуры в концентрации 10^7 КОЕ/мл, инкубировали при температуре 37 °С. Наличие бактериального роста учитывали визуально по наличию мутности в пробирке. За минимальную подавляющую концентрацию (МПК) принимали минимальную концентрацию препарата, при которой рост отсутствовал через 24 ч инкубации, за минимальную бактерицидную концентрацию (МБК) – через 72 ч.

б) методом серийных разведений в агаре – нанося 10 мкл клеточной суспензии с концентрацией 10^7 КОЕ/мл на поверхность питательного агара, содержащего серийные разведения препарата. Учитывали наличие роста тест-культур через 24 ч (минимальная подавляющая концентрация, МПК) и через 72 ч (минимальная бактерицидная концентрация, МБК).

2.1.4.3 Определение минимальной подавляющей концентрации и минимальной бактерицидной концентрации антисептика методом аппликаторов

Антибактериальную активность антисептиков методом аппликаторов оценивали по степени ингибирования размножения культур бактерий в форме

био пленки: поверхность питательного агара, не содержащего антибактериальных добавок, засеивали 0,1 мл суспензии, исследуемой культуры бактерий в концентрации 10^9 КОЕ/мл. Посевы культивировали при температуре 37 °С в течение 72 ч, после чего на поверхность бактериального газона накладывали при помощи стерильного пинцета стерильный целлюлозный аппликатор (7x7 мм) на 2-3 мин. Затем аппликатор с отпечатком культуры переносили стерильным пинцетом в другую чашку Петри и помещали на поверхность агара, содержащего серийные разведения антисептика, в ориентации «вниз бактериальным отпечатком». Результаты учитывали по наличию роста культуры на аппликаторе и вокруг него, а также в месте нанесения микрокапли, через 72 ч инкубирования при температуре 37 °С. За МБК принимали минимальную концентрацию антисептика, на которой отсутствовал рост культуры.

2.1.5 Селекция штаммов стафилококков, устойчивых к триклозану

Селекцию устойчивых к триклозану вариантов штамма *S. aureus* ATCC25923 проводили путем регулярного пересева бактериальной культуры в питательный бульон, содержащий серийные разведения триклозана, начиная с концентрации, в два раза меньшей МБК. Для этого в 4 мл питательного бульона готовили серию двукратных разведений препарата (0,000013%-0,013 %) (0,13-256 мг/л) триклозана и вносили в каждую пробирку по 50 мкл 10^5 КОЕ/мл бактериальной культуры и инкубировали при температуре 37 °С. После двух-трех дней инкубации, по 50 мкл из последней помутневшей пробирки пересевали в новые, с повышающимися концентрациями триклозана. Процесс селекции прекращали, в случае если МБК не изменялась в течение пяти пересевов [55].

Для определения стабильности приобретенной устойчивости у полученных субкультур, эти культуры в течение 26 мес пересевали на питательный агар, не содержащий триклозан. Регулярно, один раз в месяц, проверяли чувствительность к триклозану у исходного штамма и штаммов, полученных в результате селективного отбора методом серийных разведений в бульоне [25].

2.1.6 Определение параметров роста бактерий

Для определения параметров роста изучаемого штамма 100 мкл суспензии суточной бактериальной культуры ($\sim 1,5 \times 10^3$ КОЕ/мл) засеивали газоном на чашку Петри с питательной средой ГРМ (Оболенск, Россия), культивировали в течение 10-14 ч при температуре 37 °С. Измеряли диаметр 10 выросших колоний бактерий восьмикратно, с интервалом измерения 1-1,5 ч, с помощью микроскопа ЛОМО МИКМЕД Д-2 (ЛОМО, ОАО СПб, Россия).

2.1.7 Моделирование бактериальных биопленок при выращивании культур на жидких и плотных питательных средах

Для изучения бактериальных биопленок использованы штаммы *K. pneumoniae* (n=8), *P. aeruginosa* (n=4) и *A. baumannii* (n=4), выделенные от пациентов отделения нейрореанимации в 2013 г.; *S. aureus* ATCC25923, полученный из Государственной коллекции патогенных микроорганизмов «ГКПМ-Оболенск». Микроорганизмы культивировались на питательном агаре Мюллер-Хинтона (HiMedia, Индия) при 37°С в течение 24 ч. Для приготовления стандартной бактериальной взвеси использовали суспензию микроорганизмов в физиологическом растворе в концентрации 10^9 КОЕ/мл.

Выращивание биопленок проводили тремя различными методами в динамических (1) и статических условиях (2,3) [22]:

1. На разделе фаз жидкость–твердая поверхность: в колбу, содержащую 100 мл питательного бульона Мюллер-Хинтона, помещали купон из полистирола, размером 0,8 x 1,5 см; или покровное стекло, размером 1,5 x 1,5 см; засеивали 100 мкл стандартной бактериальной суспензии и инкубировали при интенсивном покачивании, при 37°С в течение 72 или 120 ч.

2. На разделе фаз жидкость–воздух: в пробирки, содержащие 5 мл питательного бульона Мюллер-Хинтона, засеивали 100 мкл стандартной бактериальной суспензии и инкубировали при 37°С в течение 72 ч.

3. На разделе фаз твердая поверхность–воздух: поверхность питательного агара Мюллер-Хинтона, засевали 0,1 мл стандартной бактериальной суспензии. Посевы культивировали при температуре 37 °С в течение 7 сут.

2.2 Биофизические методы исследования

2.2.1 MALDI-TOF масс-спектрометрия

Пробоподготовку образцов для масс-спектрометрии на приборе MALDI-TOF microflex series (Bruker Daltonics, Германия), проводили по стандартной методике, рекомендованной производителем прибора. При помощи бактериальной петли со дна чашки Петри забирали микробный материал и помещали в чистую пробирку типа Eppendorf, содержащую 300 мкл дистиллированной воды. Добавляли 900 мкл чистого этанола и перемешивали с помощью пипетки. Микропробирку центрифугировали в течение 2 мин при 111000 g и удаляли супернатант с помощью пипетки. Добавляли к осадку 40 мкл 70 % муравьиной кислоты и 40 мкл и 100 % ацетонитрила, тщательно перемешивали с помощью пипетки. Центрифугировали пробирку в течение 3 мин при 11000 g, 1 мкл полученного экстракта наносили на ячейку мишени и высушивали в вытяжном шкафу, покрывали образец 1 мкл раствора матрицы и высушивали на воздухе, после чего мишень загружали в масс-спектрометр и подвергали исследованию.

Сравнение полученного масс-спектра с библиотеками референсных масс-спектров осуществлялось с помощью программного обеспечения flexControl и flexAnalysis (Bruker Daltonics, Германия). Надежность идентификации отражала система баллов (scores), разработанная на основе статистических алгоритмов: 2,300-3,000 баллов соответствовало достоверной вероятности видовой идентификации [23].

2.2.2 Анализ белковых MALDI-профилей

Анализ белковых MALDI-профилей штаммов бактерий проводили с использованием алгоритма, описанного Кряжевских Н.А. и соавт. [19]: получение масс-листа с перечнем характеристик пиков масс-спектра; экспорт данных в программу Microsoft Excel 2010; учет общего количества пиков, соответствующих каждому пику значений m/z и интенсивности; идентификация специфичных пиков для каждого анализируемого образца; определение пика с максимальным значением интенсивности; расчет значений относительной интенсивности для каждого пика (в % по отношению к максимальному пику).

2.2.3. Атомно-силовая микроскопия

Для микроскопии планктонных клеток 10 мкл (10^6 КОЕ/мл) суспензии наносили на пластинку слюды, облучали ультрафиолетом в течение 30 мин, затем переносили образец в микроскоп и проводили исследование

Для микроскопии биопленок на пластинку слюды делали отпечаток фрагмента биопленки. Для этого на поверхность биопленки накладывали стерильный целлюлозный аппликатора на 2 мин. По истечении времени аппликатор переносили на пластинку слюды, делали отпечаток, снимали аппликатор, полученный образец облучали ультрафиолетом в течение 30 мин и переносили в микроскоп.

2.2.4 Электронная микроскопия

Электронно-микроскопическое исследование препаратов биоплёнок проводили после 168 ч культивирования массы биоплёнки на поверхности плотной питательной среды. Отпечаток биопленки на поверхности покровного стекла подвергали химической фиксации. Бактериальные клетки обрабатывали

4% раствором глутарового альдегида и 40 % раствором формальдегида, фиксировали в течение 24 ч при комнатной температуре. Образцы биоплёнки, после фиксации дегидратировали. Дегидратацию образцов проводили в охлаждённых до +4 °С водных растворах этилового спирта возрастающей концентрации для предотвращения экстракции различных компонентов клеток (30 % – 15 мин; 50 % – 15 мин; 70 % – 15 мин; 80 % – 15 мин; 96 % – 15 мин) и в 100% ацетоне (двукратно по 10 мин). Затем образцы биоплёнок высушивали на воздухе. Обезвоженные образцы биоплёнки помещали на предметный столик сканирующего электронного микроскопа и напыляли золотом в напылительной вакуумной установке EicoIB-3 ioncoater (фирма «Eico», Япония) при ионном токе 6-8 мА. Полученные образцы исследовали в сканирующем электронном микроскопе S-450 (фирма «Hitachi», Япония) при ускоряющем напряжении 30 кВ.

2.3 Молекулярно-генетические методы

2.3.1 Выделение бактериальной ДНК

Выделение бактериальной ДНК осуществляли СТАВ-методом [261]. Штаммы *S. aureus* выращивали на питательном агаре при температуре 37°C в течение 18 ч. Две полные петли культуры переносили в микропробирку типа Эппендорф с 400 мкл буферного раствора 1×TE (10 mM Tris и 1 mM EDTA, pH 8,0). Полученную смесь прогревали в течение 40 мин на водяной бане при температуре 75°C, охлаждали до комнатной температуры, добавляли 50 мкл лизоцима (10 мг/мл) и инкубировали при 37°C в течение 1-1,5 ч. Затем к смеси добавляли 75 мкл раствора SDS/протеиназы К (70 мкл 10 % SDS и 5 мкл протеиназы К), 100 мкл 5M NaCl и 100 мкл раствора СТАВ/NaCl (4,1 г NaCl, 10 г СТАВ, 100 мл дистиллированной воды), предварительно прогретого на водяной бане при 65°C. После встряхивания смесь инкубировали 10 мин при температуре 65°C. Затем добавляли 750 мкл хлороформ/изоамилового спирта (24:1), после чего центрифугировали 5 мин при 13000 g. Надосадочную жидкость, содержащую ДНК, переносили в новые пробирки, добавляли 450 мкл изопропилового спирта и

инкубировали 10 мин на льду. После центрифугирования в течение 15 мин при комнатной температуре осадок промывали 1 мл 70 %-ного этанола и повторно центрифугировали 15 мин при температуре 4°C при 9500 g. Супернатант удаляли, осадок подсушивали и растворяли в 20 мкл стерильной воды. Полученный раствор ДНК хранили при температуре минус 20°C. Концентрацию ДНК определяли с помощью спектрофотометра Gene Quantpro RNA/DNA Calculator («Amersham Biosciences», Великобритания). Количество полученной ДНК определяли по степени поглощения на спектрофотометре UV-1700 («Zhimadzu», Япония) при длине волны 260 нм.

2.3.2 Полимеразная цепная реакция

Для амплификации фрагментов генов *S. aureus* использовали реакционную смесь, содержащую буфер для ПЦР с 15 mM MgCl₂ («Thermo Fisher Scientific», Европа), по 200 мкМ dATP, dCTP, dGTP и dUTP, по 10 пмоль каждого праймера, 2,5 ед *Taq*-полимеразы и 10 нг ДНК.

Амплификацию проводили в термоциклере DNA Engine Dyad («Bio-Rad», США) при следующем режиме: начальная денатурация при 95°C – 4 мин, затем 25 циклов, включающих денатурацию при 95°C – 30 с, отжиг – 30 с и элонгацию при температуре 72°C – 80 с. Олигонуклеотидные праймеры, использованные для ПЦР-секвенирования были синтезированы компанией «СИНТОЛ» (Москва): *fabI*-f 5'-ggссасааасагаасgt-3' и *fabI*-R 5'-gttcaccaactgggtgac-3'.

Наличие ПЦР-продукта проверяли с помощью электрофореза в 1 % агарозном геле («Amersham Biosciences», Великобритания) с последующей визуализацией ДНК бромистым этидием. В качестве стандарта молекулярных масс использовали маркер молекулярных весов Thermo Scientific O'GeneRuler 1 kb DNA Ladder - 250, 500, 750, 1000, 1500, 2000, 2500, 3000, 3500, 4000, 5000, 6000, 8000, 10000 п. н. («Thermo Fisher Scientific», Европа).

2.3.3 Секвенирование продуктов амплификации

Очистку ПЦР-продуктов осуществляли, используя набор реактивов «Dyenaamic ETDye Terminator CycleS equencing» («Amersham Biosciences», Великобритания), согласно инструкции фирмы-изготовителя. Амплифицированный фрагмент гена секвенировали, используя протокол для автоматического секвенатора MegaBase 750 («Amersham Biosciences», Великобритания).

2.3.4 Полногеномное секвенирование

Для полногеномного секвенирования штаммов *S. aureus* в системе IonTorrent PGM («Life Technologies», США) были подготовлены геномные библиотеки с помощью набора реагентов для создания библиотек фрагментов ДНК IonPlusFragmentLibraryKit («LifeTechnologies», США). Фрагментные библиотеки длиной 400 п.н. были созданы из 500 нг тотальной геномной ДНК. Бактериальная ДНК была расщеплена с помощью ультразвука на приборе Diagenode (BioRuptor, США), к полученным фрагментам ДНК были пришиты баркоды, содержащие уникальные молекулярные метки (Ion Xpress Barcode Adapters Kit, «LifeTechnologies», США). Необходимое количество библиотеки для секвенирования было рассчитано, исходя из результатов ПЦР в реальном времени разведенных библиотек образцов (1:100) и разведения стандартной библиотеки из набора Ion Library Quantifitation Kit («LifeTechnologies», США). Амплификацию фрагментов ДНК-библиотек проводили с использованием системы эмульсионной ПЦР Ion One Touch (набор реагентов Ion One Touch 400 Template Kit, LifeTechnologies, США). Процедуру обогащения сфер после проведения эмульсионной ПЦР выполняли с помощью системы очистки Ion One Touch ES и магнитных частиц Dynabeads My One Streptavidin C1 (LifeTechnologies, США). Секвенирование ДНК осуществляли с использованием генетического анализатора

IonTorrentPGM, набора реагентов Ion PGM 400 Sequencing Kit и чипа для секвенирования Ion 318™ Chip Kit (LifeTechnologies, США), в соответствии с инструкциями фирмы-производителя (<http://ioncommunity.lifetechnologies.com>).

2.4 Биоинформационные методы

2.4.1 Анализ амплифицированных последовательностей ДНК

Биоинформационный анализ секвенированных последовательностей ДНК осуществляли с помощью программ Vector NTI9 (Invitrogen, США), CHROMAS («Technelyzium Pty Ltd», Австралия) и веб-ресурса BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

2.4.2 Анализ полногеномных последовательностей ДНК

Полученные в результате полногеномного секвенирования данные собирали с помощью ассемблера Newbler 2.9. В результате были получены первичные полногеномные сборки, на которых осуществляли биоинформационный анализ 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>).

2.4.3 Размещение последовательностей ДНК в международных базах данных

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

2.5 Статистические методы

2.5.1 Статистическая обработка данных

Статистическую обработку результатов и анализ полученных данных осуществляли с помощью общепринятых алгоритмов в программах Microsoft Office 2010. Результаты экспериментов были представлены как средняя величина, стандартное отклонение (ошибка среднего) и достоверность различий между группами, с вычислением доверительного интервала (P), определяемого путем расчета критерия Стьюдента (t) с помощью программ статистической обработки данных, встроенных в программу Microsoft Excel 2010. Стандартные отклонения P менее чем 0,05 считали статистически достоверными.

2.5.2 Расчет математических показателей скорости роста колоний

Определение математических показателей скорости роста колоний параметров роста колоний, для сравнительной характеристики роста исходной и устойчивых к триклозану культур, проводили по упрощенной модели роста диаметра колоний одноклеточных микроорганизмов [31, 225]. При этом использовали следующие показатели и формулы расчета:

(1) K_D , (мм/ч) – скорость линейного роста диаметра колоний

$$K_D = \frac{d_2 - d_1}{t_2 - t_1} \quad (1)$$

где d_1 - диаметр колонии в момент первого измерения, d_2 – диаметр колонии в момент второго измерения, t_1 - время первого измерения, t_2 – время второго измерения.

(2) D_t – величина диаметра колонии к t часам инкубирования

$$D_t = d_1 + (t - t_1)K_D \quad (2)$$

(3) t_{1mm} , (час) – время достижения колониями диаметра в 1 мм

$$t_{1\text{мм}} = t - \frac{D_t - 1}{K_D} \quad (3)$$

(4) где t – время инкубации, а D_t – измеренный диаметр колонии в момент времени t .

μ_m , (ч^{-1}) – максимальная удельная скорость роста биомассы колоний

$$t = \frac{D_t}{K_D} + \frac{2 [\ln (2 K_D / \mu'_m D_0) - 1]}{\mu'_m} \quad (4)$$

где D_0 – эффективный диаметр клетки – родоначальницы колонии, постоянная величина, равная 0,0018 мм

(5) GT – время одной генерации

$$GT = \frac{60 \ln 2}{\mu'_m} \quad (5)$$

(6) D_{24} , (мм) – диаметр колоний к 24 часам инкубации

$$D_{24} = D_t + K_D(24-t) \quad (6)$$

СОБСТВЕННЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

ГЛАВА 3. ОЦЕНКА ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ ПЛАНКТОННЫХ КЛЕТОК И БИОПЛЕНОК ГОСПИТАЛЬНЫХ ШТАММОВ БАКТЕРИЙ К АНТИСЕПТИКУ ХЛОРГЕКСИДИНУ

3.1 Разработка метода сравнения чувствительности планктонных культур и бактериальных биопленок к антисептикам на примере хлоргексидина

Метод сравнения чувствительности планктонных культур и бактериальных биопленок к антисептикам был разработан нами (Методические рекомендации «Оценка чувствительности планктонных клеток и биопленок микроорганизмов к антисептикам», утверждены на заседании ученого совета ФБУН ГНЦ ПМБ протокол №3 от 31.03.2016) для определения антибактериальной активности биоцидных препаратов против культур биопленок, которые, как известно, обладают повышенной устойчивостью к антибактериальным препаратам, по сравнению с планктонными культурами. Данный метод позволил визуально сравнивать устойчивость биопленочной и планктонной форм исследуемых культур к антибактериальным препаратам. Основными этапами данного метода являются: (1) предварительная оценка диапазонов минимальных подавляющих концентраций (МПК) и минимальных бактерицидных концентраций (МБК); (2) определение МПК и МБК хлоргексидина методом микрокапли; (3) определение МБК хлоргексидина аппликативным методом.

Для предварительной оценки диапазонов МПК и МБК хлоргексидина методом серийных разведений готовили серию двукратных разведений антисептика в жидкой питательной среде в пробирках – в большую и меньшую сторону от рекомендованной рабочей концентрации антисептика, которую определяли на основании инструкции к препарату. Дополнительно готовили одну пробирку с жидкой питательной средой без добавления хлоргексидина – для

контроля роста исследуемых микроорганизмов. Далее, готовили взвесь бактериальной тест-культуры в концентрации 1×10^7 КОЕ/мл. В пробирки, содержащие 4 мл питательного бульона и двукратные разведения хлоргексидина, а также в контрольную пробирку, не содержащую антисептика, вносили по 0,02 мл бактериальной культуры. При этом конечная концентрация микробных клеток составила 1×10^5 КОЕ/мл. Инкубировали посевы при оптимальных условиях для каждого вида бактерий. По истечении срока инкубации, при наличии роста в контрольной пробирке, оценивали рост в пробирках, содержащих разведения хлоргексидина. Минимальную концентрацию, в которой отсутствовал видимый рост, принимали за МПК. Из пробирки, принятой за МПК, и из последующих, в которых отсутствовал рост, производили контрольный высев по 0,1 мл на чашки Петри с плотной питательной средой, не содержащей подавляющих рост добавок, и инкубировали в условиях, оптимальных для каждого вида бактерий. Проводили учет результатов высевов. Минимальная концентрация, из которой был произведен высев на чашку Петри при отсутствии роста, после дополнительной инкубации в течение 24 ч, принимали за МБК (рисунок 3.1).

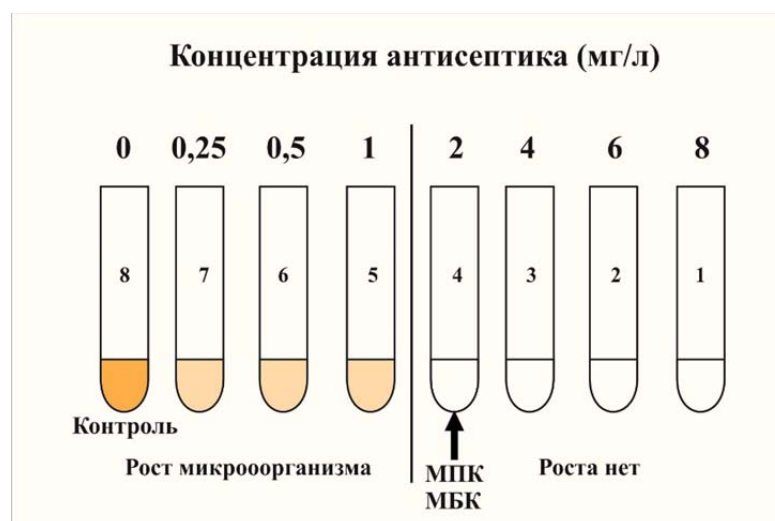


Рисунок 3.1 – Определение антибактериальной активности антисептика методом серийных разведений в бульоне

Для определения МПК и МБК хлоргексидина методом микрокапли использовали чашки Петри с плотной питательной средой, содержащей антисептик. Для этого готовили серию двукратных разведений антисептического препарата в плотной питательной среде, в большую и меньшую сторону от рекомендованной рабочей концентрации хлоргексидина (на основании инструкции к препарату). Дополнительно готовили одну чашку Петри, не содержащую антисептик, используемую для контроля роста исследуемого штамма бактерий. Далее, на поверхность плотной питательной среды, содержащей двукратные разведения хлоргексидина, а также в контрольную чашку Петри, вносили по 0,01 мл бактериальной культуры в концентрации 1×10^7 КОЕ/мл, и инкубировали при оптимальных условиях для каждого вида бактерий. По истечении срока инкубации проводили учет результатов высевов. Минимальную концентрацию антисептика, при которой на поверхности плотной питательной среды отсутствовал видимый рост, принимали за МПК. Минимальную концентрацию хлоргексидина, при которой отсутствовал видимый рост после дополнительной инкубации в течение 24 ч, принимали за МБК. Если на поверхности агар в месте нанесения микрокапли наблюдался рост единичных колоний, данную концентрацию учитывали как не подавляющую рост культуры (рисунок 3.2).

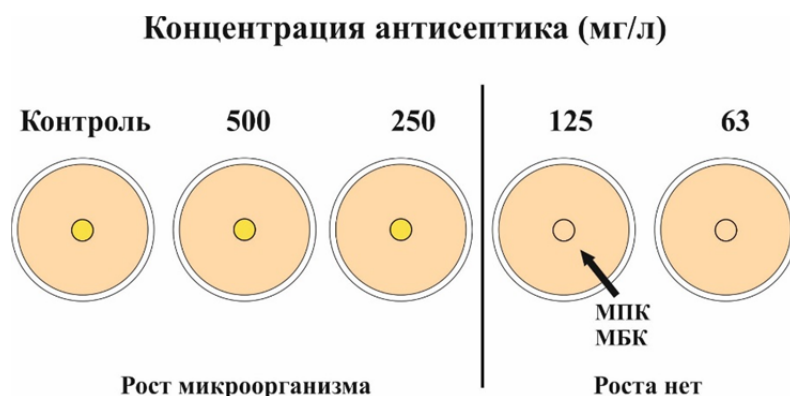


Рисунок 3.2 – Определение антибактериальной активности антисептика методом микрокапель на плотной питательной среде

Для определения МПК и МБК хлоргексидина аппликативным методом на поверхность плотной питательной среды, не содержащей антибактериальных добавок, вносили по 0,1 мл бактериальной культуры в концентрации 1×10^7 КОЕ/мл, растирали стерильным шпателем и инкубировали в течение трех суток. Предварительно из фильтровальной бумаги готовили аппликаторы размером 7×7 мм, стерилизовали автоклавированием при температуре 121°C в течение 15 мин. Далее готовили серию двухкратных разведений хлоргексидина в плотной питательной среде, в большую и меньшую сторону от рекомендованной в инструкции применения препарата рабочей концентрации хлоргексидина. На поверхность выращенного равномерного бактериального газона при помощи стерильного пинцета помещали стерильный аппликатор на 2-3 мин. Затем аппликатор с отпечатком культуры переносили стерильным пинцетом на поверхность агара, содержащего серийные разведения хлоргексидина, бактериальным отпечатком вниз; икубировали при оптимальных условиях для исследуемого микроорганизма. По истечении срока инкубации проводили учет результатов высевов по наличию видимого роста на поверхности аппликатора и вокруг него (рисунок 3.3). За МБК принимали минимальную концентрацию антисептика, при которой отсутствует рост культуры. Следует отметить, что в некоторых случаях получали «ложные» значения МБК, что было связано с замедлением роста бактериальной культуры при высоких концентрациях антисептика на ранних сроках культивирования. Поэтому учет результатов проводили после увеличения сроков культивирования до трех-пяти суток.

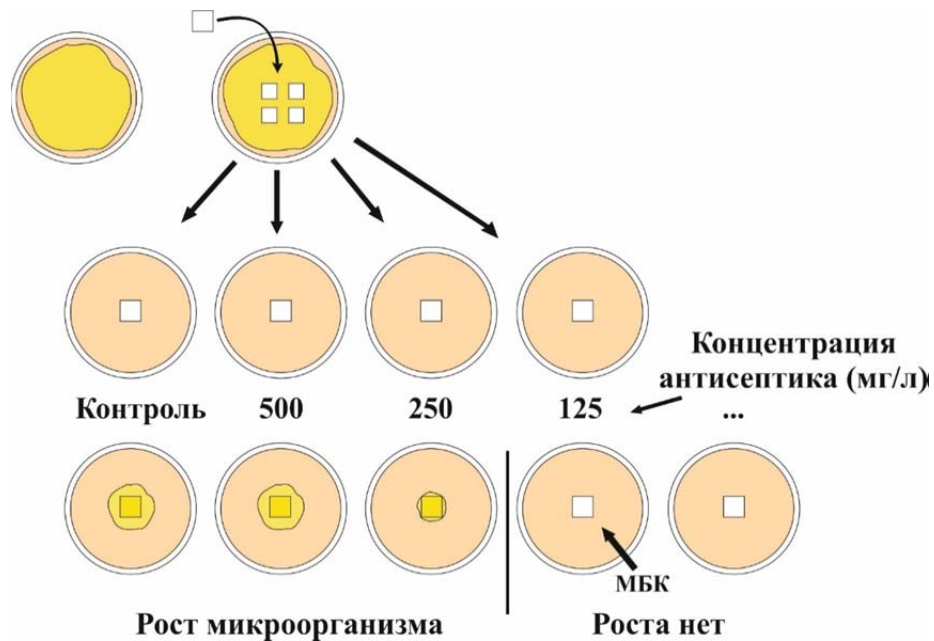


Рисунок 3.3 – Определение антибактериальной активности антисептика методом аппликаторов на плотной питательной среде

Разработанный трехэтапный метод сравнения чувствительности планктонных культур и бактериальных биопленок к антисептикам использован для изучения антибактериальной активности хлоргексидина в отношении госпитальных штаммов бактерий [11].

3.2 Изучение антибактериальной активности хлоргексидина в отношении госпитальных штаммов бактерий

Описанный в предыдущем разделе метод сравнения чувствительности планктонных культур и бактериальных биопленок к хлоргексидину, включающий в себя предварительную оценку диапазонов МПК и МБК, определение МПК и МБК методом микрокапли и определение МБК аппликативным методом использован для тестирования бактериальных культур клинических изолятов и референс-штаммов видов *P. mirabilis* (n=3), *P. aeruginosa* (n=5), *K. pneumoniae* (n=9), *A. baumannii* (n=4), *E. coli* и *S. aureus* (n=1).

По степени чувствительности (в сторону увеличения) к препарату 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 3. 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 (рисунок 3.4).

Таблица 3.1 – Чувствительность штаммов бактерий к хлоргексидину, определенная методами серийных разведений в питательном бульоне (I), серийных разведений на агаре (II) и методом аппликаторов (III)

Штамм	Год выделения	Источник выделения	Устойчивость к антибактериальным препаратам	Концентрация антисептика хлоргексидина, %					
				I		II		III	
				МПК	МБК	МПК	МБК	МПК	МБК
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
<i>K. pneumoniae</i> B-1814	2013	моча	AMC AMS CAZ CEF CEX CIP CM CPS CTA CTZ ERM FEP GEN NIT THR TOB	0,0008	0,0031	0,0063	0,0063	0,05	0,1563
<i>K. pneumoniae</i> B-1802	2013	моча	AMC	0,0008	0,0016	0,0008	0,0008	0,05	0,1563
<i>K. pneumoniae</i> B-1739	2013	моча	AMC AMS CAZ CEF CEX CIP CM CPS CTA CTZ ERM FEP GEN NIT THR TOB	0,0031	0,0031	0,0063	0,0063	0,05	0,1563
<i>K. pneumoniae</i> B-1759	2013	моча	AMC AMS CAZ CEF CEX CIP CM CPS CTA CTZ ERM FEP GEN NIT TET THR TOB	0,0016	0,0063	0,0063	0,0063	0,0063	0,625
<i>K. pneumoniae</i> B-1104	2013	эндотрахеальный аспират	AMC AMI AMS CAZ CEF CEX CIP CM CPS CTA CTZ ERM FEP GEN NIT TET THR TOB	0,0002	0,0004	0,0063	0,0063	0,0125	0,1563
<i>K. pneumoniae</i> B-335	2013	моча	AMC AMS CAZ CEF CEX CIP CM CPS CTA CTZ ERM FEP NIT TET TGC THR	0,0004	0,0016	0,0063	0,0063	0,0125	0,3125
<i>K. pneumoniae</i> B-1224	2013	мокрота	AMC AMI AMS CAZ CEF CEX CIP CM CPS CTA CTZ ERM FEP GEN NIT TET THR TOB	0,0002	0,0004	0,0098	0,0098	0,1563	0,625
<i>K. pneumoniae</i> B-38	2013	моча	AMC AMS CAZ CEF CEX CIP CM CPS CTA CTZ ERM FEP NIT TET THR	0,0004	0,0016	0,0063	0,0063	0,0125	0,1563
<i>A. baumannii</i> B-1745	2013	эндотрахеальный аспират	AMC AMI AMS CAZ CEF CEX CIP CM CPS CTA CTZ ERM FEP GEN NIT TET TGC THR TOB	0,0002	0,0016	0,0063	0,0063	0,0063	0,1563
<i>A. baumannii</i> B-1691	2013	бронхиальный лаваж	AMC AMI AMS CAZ CEF CEX CIP CM CPS CTA CTZ ERM FEP GEN NIT THR	0,0008	0,0016	0,0031	0,0031	0,0063	0,1563
<i>A. baumannii</i> B-120	2013	эндотрахеальный аспират	AMC AMI AMS CAZ CEF CEX CIP CM CPS CTA CTZ ERM FEP GEN NIT THR TOB	0,0004	0,0008	0,0031	0,0063	0,0063	0,1563
<i>A. baumannii</i> B-5	2013	эндотрахеальный аспират	AMC AMI AMS CAZ CEF CEX CIP CM CTA CTZ ERM FEP GEN NIT THR TOB	0,0002	0,0016	0,0031	0,0063	0,0063	0,1563
<i>P. mirabilis</i> B-1901	2013	эндотрахеальный аспират	AMC CEF CIP CM CPS CTA ERM IMI NIT TET TGC	0,0063	0,0063	0,0125	0,0125	0,025	>1,25

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
<i>P. mirabilis</i> B-123	2013	моча	AMC AMI CAZ CEF CEX CIP CM CTA CTZ ERM FEP GEN IMI NIT TET THR TOB	0,0063	0,0125	0,0125	0,0125	0,025	>1,25
<i>P. mirabilis</i> B-318	2013	операционная рана	AMC AMI AMS CAZ CEF CEX CIP CM CPS CTA CTZ ERM FEP GEN IMI NIT TET TGC THR TOB	0,0125	0,025	0,05	0,05	0,0125	1,25
<i>P. aeruginosa</i> B-1560	2013	эндотрахеальный аспират	CAZ CIP CTZ ERM FEP GEN IMI IZE MER NIT PEF PIP PIT TCA TCC TET TGC THR TOB	0,0016	0,0063	0,0063	0,0063	0,0063	0,1563
<i>P. aeruginosa</i> B-431	2013	эндотрахеальный аспират	AMI CAZ CIP CTZ ERM FEP GEN IMI IZE MER NIT PEF PIP PIT TCA TCC TET TGC THR TOB	0,0008	0,0016	0,0008	0,0031	0,0063	0,3125
<i>P. aeruginosa</i> B- 2249	2013	люмбарный ликвор	AMI CAZ CIP CTZ ERM FEP GEN IMI IZE MER NIT PEF PIP TCA TCC TET TGC THR TOB	0,0008	0,0016	0,0008	0,0063	0,0031	0,025
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	1971	кровь	ND	0,0004	0,0008	0,0195	0,0195	0,1563	0,3125
<i>K. pneumoniae</i> ATCC 700603	1994	моча	ND	0,0016	0,0031	0,0063	0,0063	0,0125	0,3125
<i>E. coli</i> ATCC 25922	1946	клинический изолят	ND	0,0002	0,0002	0,0049	0,0049	0,6250	0,625
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	1945	клинический изолят	ND	0,0002	0,0002	0,0049	0,0049	0,6250	1,25

Примечание: AMC – амоксициллин/клавулановая кислота; AMI – амикацин; AMS – амоксициллин-сульбактам; CAZ – цефтазидим; CEF – цефуросим; CEX – цефокситин; CIP – ципрофлоксацин; CM – хлорамфеникол; CTA – цефтриаксон; CTZ – котримоксазол; ERM – эртапенем; FEP – цефепим; GEN – гентамицин; IMI – имипенем; IZE – изепамицин; NIT – нитрофурантоин; PEF – пепфлоксацин; PIT – пиперациллин/тазобактам; PIP – пиперациллин; TET – тетрациклин; TGC – тигециклин; THR – триметоприм; TOB – тобрамицин; ND – нет данных

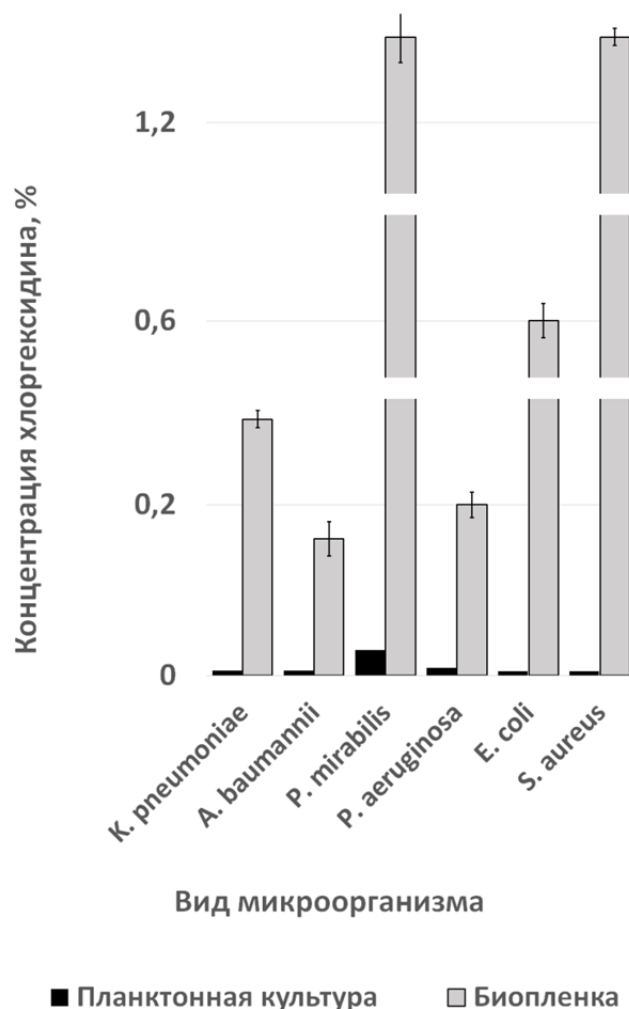
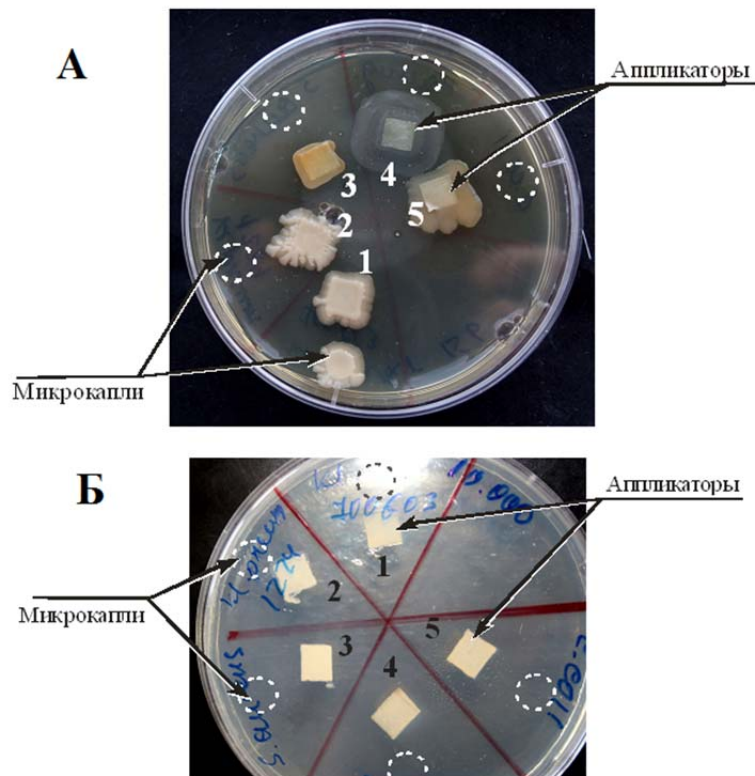


Рисунок 3.4 – Минимальные бактерицидные концентрации хлоргексидина для планктонных клеток в микрокапле и клеток в составе биопленки на аппликаторе

Стоит отметить, что при использовании метода аппликаторов 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 3.5), а при высоких концентрациях – только на поверхности аппликатора. Последнее, на наш взгляд, может быть объяснено наличием «инерционного» роста культуры на поверхности аппликатора, вследствие замедленной диффузии хлоргексидина из плотной питательной среды через целлюлозу. К моменту учета МБК (72 ч культивирования) инерционный рост культуры прекращался и она погибала, что подтверждалось отсутствием роста

культуры при пересеве клеток с поверхности аппликатора на свежую питательную среду, не содержащую хлоргексидин.



А – видимый рост культур *K. pneumoniae* ATCC700603: (1), *K. pneumoniae* 1224 (2), *S. aureus* 906 (3), *P. aeruginosa* ATCC 27853 (4), *E. coli* ATCC25922 (5) при концентрации хлоргексидина 0,02%; Б – отсутствие видимого роста тех же культур при концентрации хлоргексидина 1,0 %

Рисунок. 3.5 – Характер роста исследуемых культур на питательной среде Мюллера-Хинтона, содержащей различные концентрации хлоргексидина, на аппликаторах и в микрокаплях

Таким образом, планктонные клетки нозокомиальных штаммов *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa*, *A. baumannii* и *P. mirabilis* оказались существенно чувствительнее к хлоргексидину, чем бактериальные клетки тех же штаммов в составе биопленки (на аппликаторе). Увеличение резистентности к хлоргексидину у бактерий, иммобилизованных на аппликаторе, по нашему мнению, может быть объяснено влиянием факторов, описанных в литературе для бактериальных биопленок: наличием защитного полисахаридного матрикса вокруг скопления

клеток, значительными изменениями в экспрессии генов и метаболической активности [92, 114, 130] с последующим существенным повышением «выживаемости» бактерий и их устойчивости к антибактериальным препаратам [5], переходом части клеток в персистентное состояние [165], свойственное для хронических форм инфекции [17] и т.п.

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. Аналогичные данные представлены в нескольких исследованиях российских и зарубежных авторов, показавших неэффективность клинического использования 0,1%-ного и 0,5%-ного растворов хлоргексидина [12, 54]. 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 [21].

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

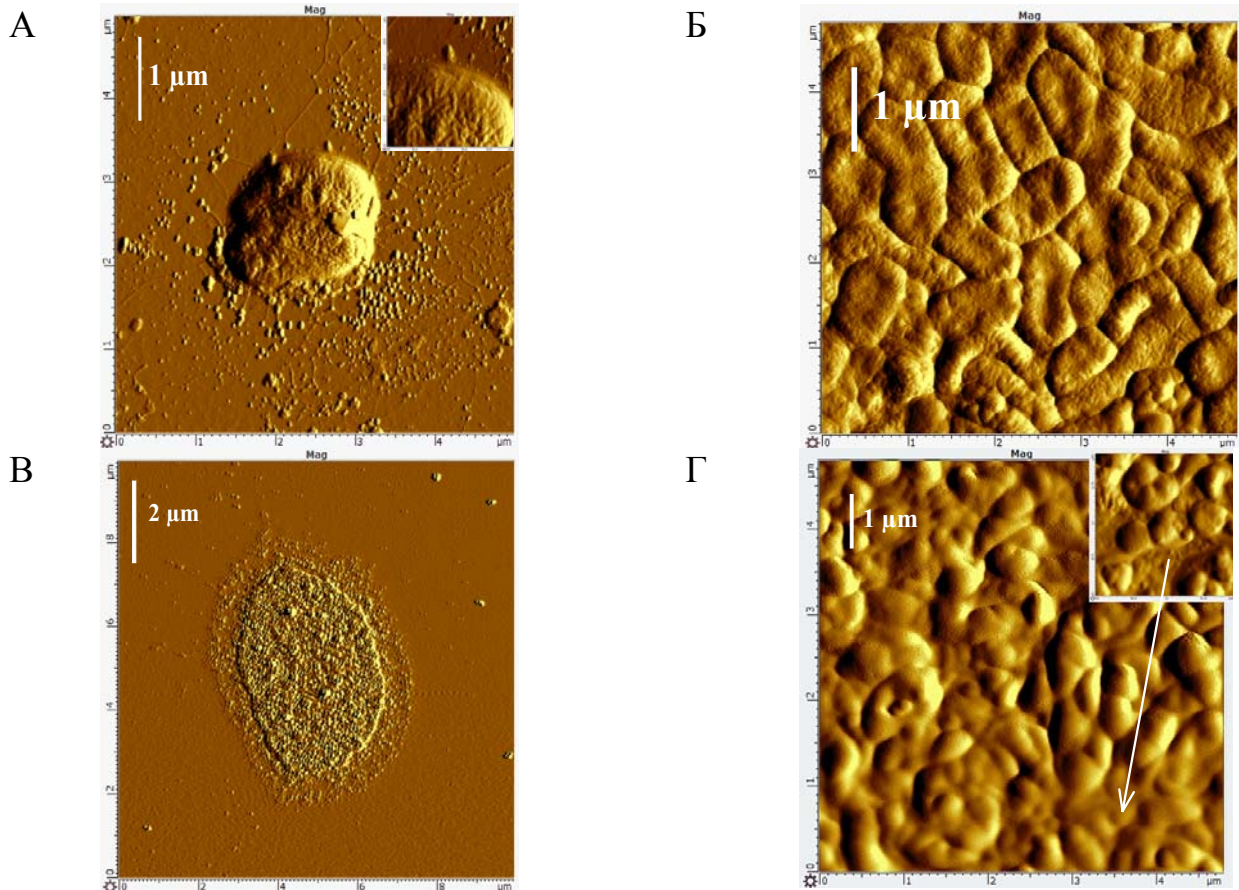
Сравнительный анализ морфологии и физико-химических параметров планктонных и биопленочных клеток бактерий проводили на примере госпитального штамма *A. baumannii* В-1745, выделенного из эндотрахеального аспирата пациента нейрореанимации г. Москвы в 2013 г.

3.3.1 Изучение планктонных и биопленочных культур штамма *A. Baumannii* В-1745 с помощью атомно-силовой микроскопии

Анализ изображений атомно-силовой микроскопии (АСМ) показал, 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 3.6А). В 24-часовой культуре наблюдаются конгломераты плотно сомкнутых клеток, границы которых четко очерчены (рисунок 3.6Б), а в 168-часовой культуре – клетки с размытыми границами, «погруженные» в межклеточный матрикс (рисунок 3.6Г). Отдельно лежащие клетки отпечатка биопленки окружены густой сетью пиле-подобных структур (рисунок 3.6В). На основании литературных данных известно, что у *A. baumannii* образование биопленок ассоциировано с формированием пиле-подобных структур, обеспечивающих клетке «дергающуюся» подвижность и являющихся ключевым фактором образования биопленки, играя важную роль в прикреплении бактерий к поверхности в начальной стадии формирования биопленки [143, 264].

Таким образом, изучение морфологии клеток штамма *A. baumannii* В-1745 выращенных на поверхности плотной питательной среды, показало, что после семи суток культивирования на поверхности агара сформировалась биопленка. Бактериальные клетки характеризуются наличием у них характерных для бактерий *A. baumannii* в составе биопленки пиле-подобных структур и внеклеточного матрикса. В планктонных культурах подобных клеточных образований не наблюдалось. Полученные нами результаты согласуются с исследованием Luo L. et al., 2015 г., в котором при помощи трансмиссионной электронной микроскопии было показано наличие пилей у клеток *A. baumannii*, вовлеченных в процесс биопленкообразования, и отсутствие таковых у планктонных клеток [171].

В ходе исследования, методом атомно-силовой микроскопии подтверждено, что культивирование бактерий в течении семи суток обеспечивает формирование биопленки на поверхности плотной питательной среды.



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

3.3.2 Изучение планктонных и биопленочных культур штамма *A. baumannii* В-1745 с помощью электронной микроскопии

Электронно-микроскопическое исследование биопленочных культур *A. baumannii* В-1745 позволило более подробно оценить морфологию клеток. Исследование препаратов биоплёнок проводили после 168 ч культивирования бактерий на поверхности плотной питательной среды. Полученная в этих

условиях биопленочная культура штамма *A. baumannii* В-1745 при увеличении $\times 2000$ имела вид скопления коротких, цилиндрических клеток, покрытых слизистым слоем матрикса и связанных друг с другом. На микрофотографиях биопленка штамма *A. baumannii* В-1745 имела вид скопления клеток, соединенных внеклеточным матриксом и разделенных «каналами» (рисунок 3.7).

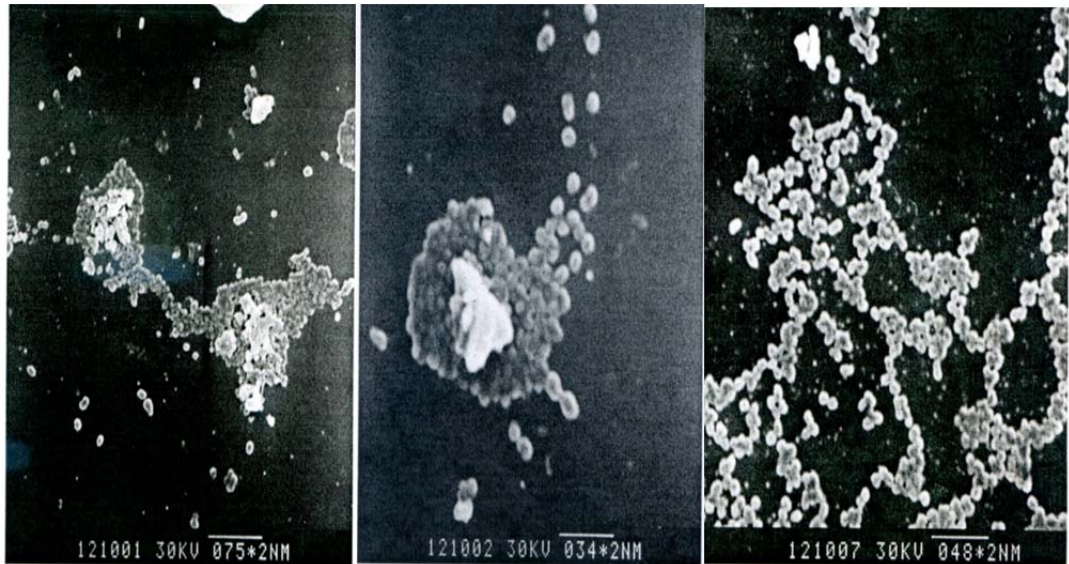


Рисунок 3.7 – Электронно-микроскопическое изображение фрагментов биопленки *A. baumannii* В-1745 при увеличении $\times 2000$

Аналогичные структуры описаны в статье Brossard K. A. et al. 2011 г. при изучении биопленок *A. baumannii*, формирующихся на поверхности титановых, полипропиленовых и полистироловых пластин [58].

Таким образом, с помощью электронной микроскопии подтверждено, что структура бактериального газона семидневной культуры клеток штамма *A. baumannii* В-1745 аналогична структуре клеточной ассоциации в составе биопленки.

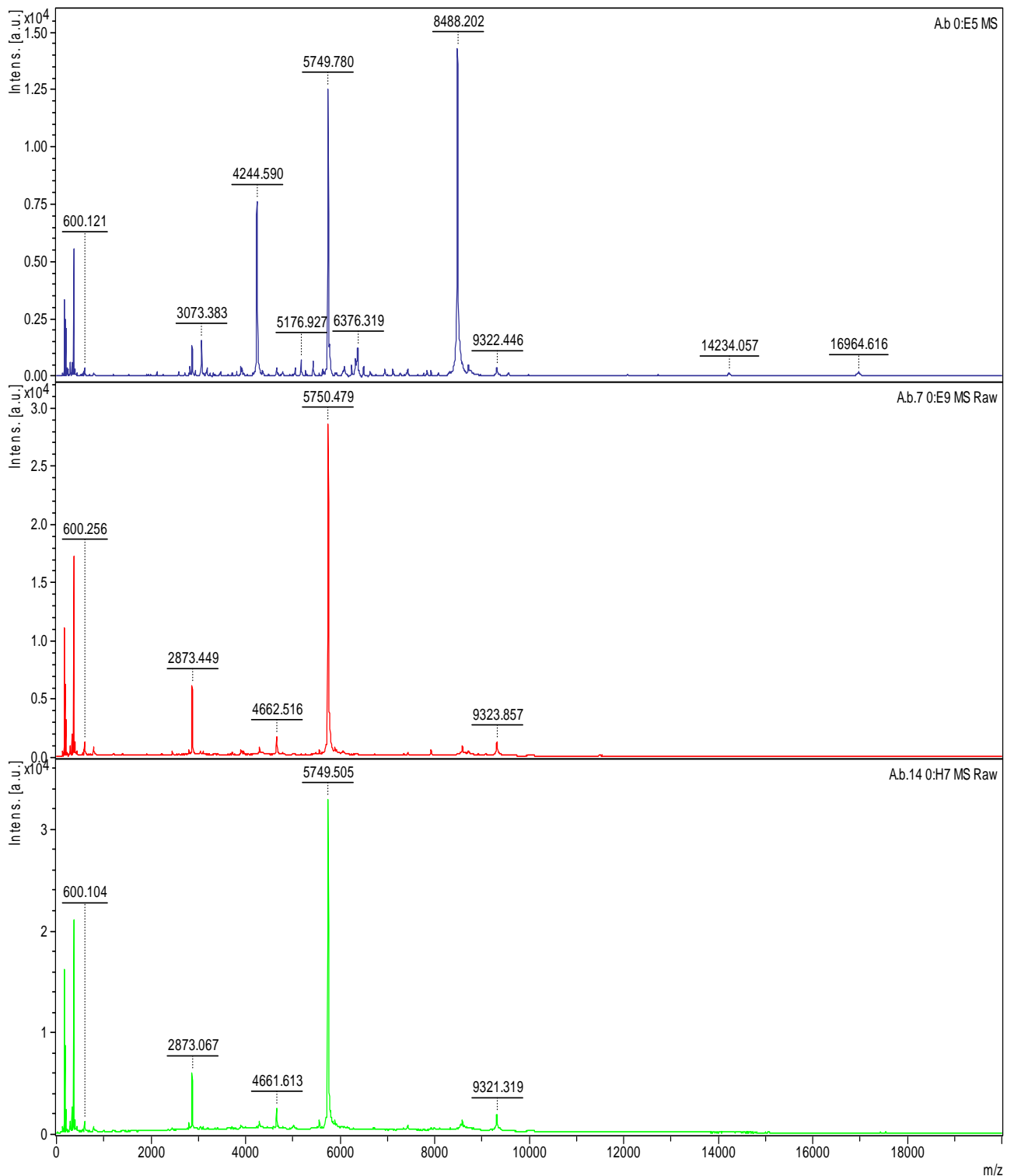
3.3.3 Сравнение белковых спектров планктонных и биопленочных культур с помощью MALDI-TOF масс-спектрометрии

Целью данного этапа работы было сравнение белковых спектров планктонных и биопленочных культур штамма *A. baumannii* В-1745 с

применением технологии матрично-активированной лазерной десорбции/ионизации MALDI, с использованием алгоритма, описанного Кряжевских Н.А. с соавт. [19]. Анализ белковых масс-спектров осуществляли сопоставлением пиков, анализом соотношения масса/заряд (m/z) и относительной интенсивности пиков (относ. ед.). Биопленку моделировали классическим способом (на поверхности покровного стекла при инкубации в жидкой питательной среде) и экспериментальным путем (на поверхности плотной питательной среды в чашке Петри) при культивировании в течение семи суток.

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* В-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 (рисунок 3.5, таблица 3.2). Полученные нами данные находятся в соответствии с результатами, представленными в исследовании Melvin Blaze M. T. 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 [167].



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 3.8 – Белковые масс-спектры клеток *A. baumannii* B-1745

Таблица 3.2 – Пики MALDI-спектров культур штамма *A. baumannii* В-1745

m/z	1	2	3
138	1	2	2
139		1	1
156			1
162	2	3	3
164	23	39	49
165	7		13
180	3	4	3
181	3	4	4
182	17	22	27
183	7	10	12
184	4	5	6
185	1		
196	1	2	2
204	15	12	7
220	2	2	1
221	1		
226	1	2	
246	2		
285			1
286		1	2
287		2	
296		3	
296		3	
297	2	2	
324			1
325	2		1
326		2	7
327		7	4
327		4	
328			2
329		2	1
352		1	
353		1	
354		1	
364		1	
369		3	4
296	4		
324	1		
325	1		
327	4		
327	2		
328	1		
369	2		
354	2		
355	2		
370			64
371	39	60	36
371	21		
392	1		1
393		2	
397	2	5	3
399	2	3	
408			1

m/z	1	2	3
409		2	
413		2	1
415		2	
435		2	1
436			1
560		2	1
584		3	
587			1
600	2	5	3
601	2		
789	1		3
604			3
2453		2	
2805			2
2873	9	22	17
2885		4	
2945	2		
3046		2	
3073	11		
3188	2		
3908	3	3	
4245	53		
4265	10		
4279			1
4294			2
4295		3	
4662			6
4663		6	
5028			1
5177	5		
5434	5		
5706			3
5750	88	100	100
5775			11
5776		14	
5780	10		
5806		6	
5894			2
5896		3	
5922		3	
6376	9	4	
6505	3		
8401	3		
8488	100		
8557			2
8590		5	
9321			5
9322	3		
9324	3	5	
14234	1		
16944	1		
16958	1		
16965	1		

Примечание: «1» – планктонная культура; «2» - биопленка, выращенная на поверхности покровного стекла; «3» – биопленка, выращенная на поверхности плотной питательной среды

Таким образом, применение масс-спектрометрического MALDI-анализа позволило нам зафиксировать биохимические различия между планктонной культурой бактериального штамма *A. baumannii* В-1745 и биопленками, формируемыми на поверхности покровного стекла и на поверхности плотной питательной среды. Данный метод может рассматриваться как перспективный для дальнейшей разработки подходов дифференциации состояния бактериальных культур, выделяемых из клинических образцов, от животных и из объектов окружающей среды. Идентификация белков, соответствующих пикам MALDI-спектра, позволит определить, какие биохимические цепи активируются, а какие подавляются в биопленках, по сравнению с планктонными культурами.

3.4 Заключение по Главе 3

В ходе исследования разработан трехэтапный метод сравнения чувствительности планктонных культур и бактериальных биопленок к антисептикам, включающий в себя: (1) предварительную оценку диапазонов минимальных подавляющих концентраций и минимальных бактерицидных концентраций методом микроразведений в бульоне; (2) определение МПК и МБК методом микрокапли и (3) определение МБК аппликативным методом. Данный подход использован для изучения антибактериальной активности хлоргексидина в отношении клинических изолятов и референс-штаммов видов *P. mirabilis*, *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae*, *A. baumannii*, *E. coli* и *S. aureus*. Показано, что планктонные клетки нозокомиальных патогенов существенно чувствительнее к хлоргексидину, чем бактериальные клетки тех же штаммов в составе биопленки, что, по-видимому, связано с влиянием факторов, характерных для бактериальных биопленок. Установлено, что 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 высокой концентрации – 1,5%. Применение 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 (Акт внедрения НИИ нейрохирургии им. Н.Н.Бурденко №1 от 06.04.2016 г.).

Предложенный для оценки эффективности биоцидов аппликативный метод является экспериментальным приемом, моделирующим биопленку бактерий на поверхности плотной питательной среды. Наличие структур, характерных для биопленок, у семидневных бактериальных культур подтверждено результатами атомно-силовой и электронной микроскопии, а также MALDI-анализа, на примере клинического штамма *A. baumannii* В-1745.

ГЛАВА 4. ИЗУЧЕНИЕ ЗАКОНОМЕРНОСТЕЙ ФОРМИРОВАНИЯ УСТОЙЧИВОСТИ К ТРИКЛОЗАНУ У *STAPHYLOCOCCUS AUREUS*

4.1 Селекция и характеристика мутантных вариантов штамма *S. aureus* ATCC25923, устойчивых к триклозану

4.1.1 Селективный отбор мутантных вариантов стафилококков, устойчивых к триклозану

Формирование устойчивости *S. aureus* к антисептику триклозану проводили в двух параллельно проходящих экспериментах, при одинаковых условиях культивирования. Для каждого из экспериментов было взято по 50 мкл 10^5 КОЕ/мл бактериальной культуры из одной пробирки и засеяно в пробирки с питательным бульоном, содержащим ступенчатые концентрации триклозана. Посевы инкубировали при температуре 37 °С в течение двух суток. Все пересевы и манипуляции с культурами из обоих экспериментов проводили в один и то же день и в одинаковых условиях. После 2-3 дней инкубации, по 50 мкл из последней помутневшей пробирки пересевали в новые, с повышающимися концентрациями триклозана. Процесс отбора устойчивых клонов прекращали в случае, если МБК не изменялась в течение пяти пересевов. По завершении процесса формирования устойчивости к антисептику триклозану были сформированы две субкультуры: *S. aureus* Tr1 (первая серия эксперимента) и *S. aureus* Tr2 (вторая серия эксперимента) (рисунки 4.1, 4.2).

Таким образом, в течение 40 суток культивирования в условиях селективного давления получены две субкультуры штамма *S. aureus* ATCC25923, характеризующиеся чрезвычайно высоким уровнем устойчивости к триклозану (МБК=64 мг/л), превышающим исходный уровень в 128 раз.

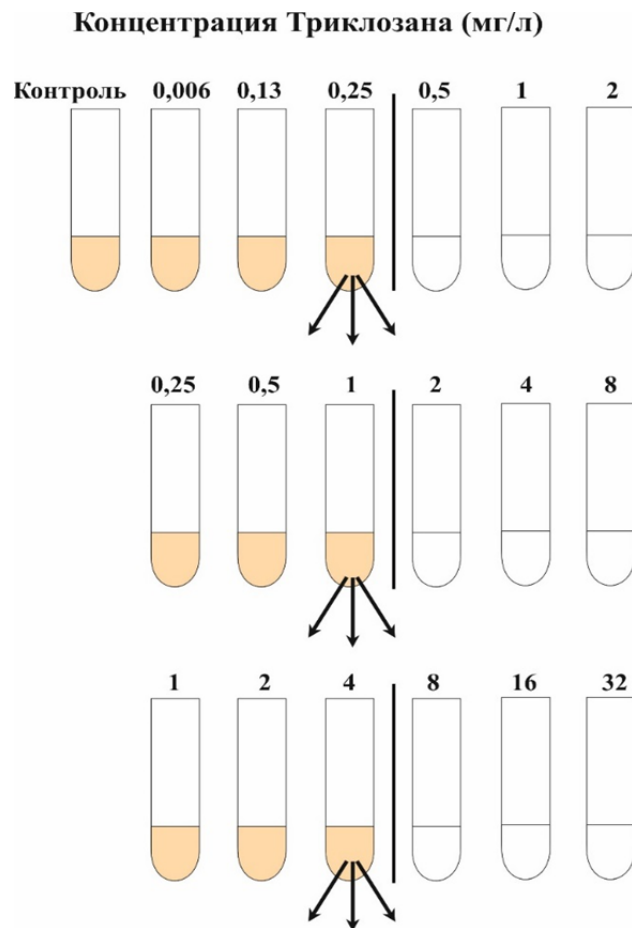


Рисунок 4.1 – Селекция клеток штамма *S. aureus* ATCC25923, устойчивых к триклозану

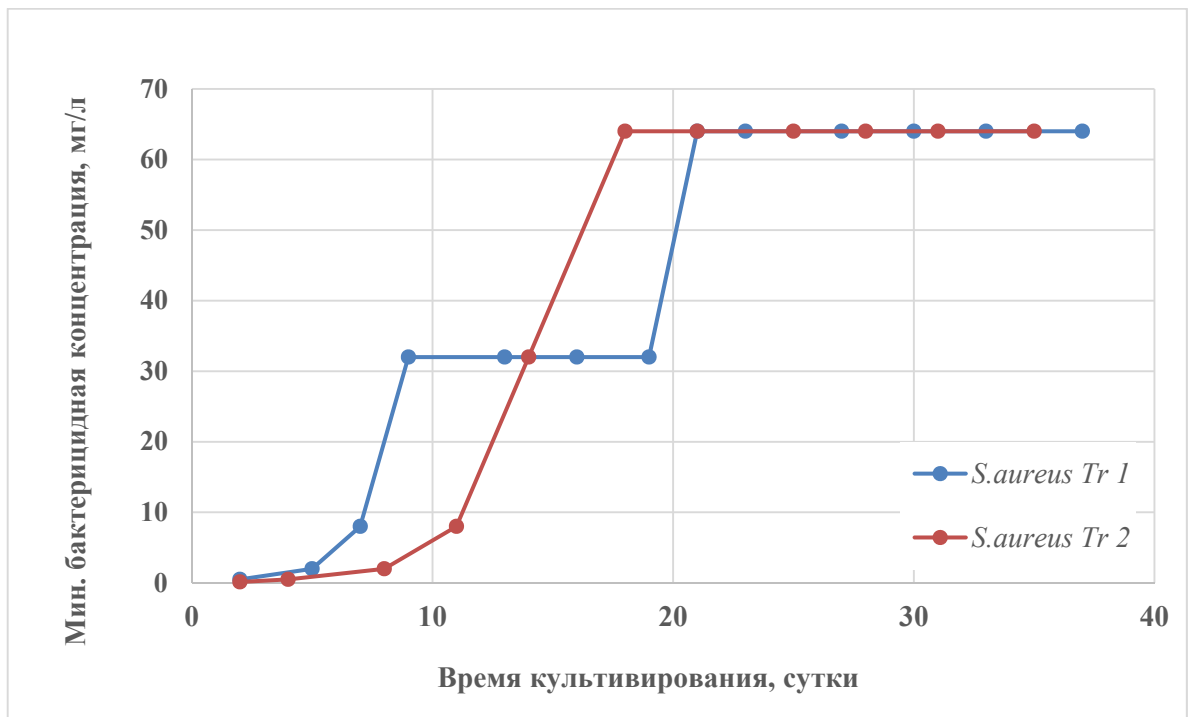


Рисунок 4.2 – Формирование устойчивости штамма *S. aureus* ATCC25923 к триклозану в жидкой питательной среде

4.1.2 Изучение стабильности приобретенной устойчивости к триклозану у мутантных вариантов стафилококков

Для определения стабильности приобретенной устойчивости к триклозану у субкультур *S. aureus* Tr1 и *S. aureus* Tr2 штамма *S. aureus* ATCC25923, субкультуры пересеивали на питательном агаре, не содержащем триклозан, в течение 26 месяцев. Полученные в результате культивирования без селективного давления триклозана варианты обозначены как *S. aureus* Tr1C и *S. aureus* Tr2C (рисунок 4.3).



Рисунок 4.3 – Изучение стабильности приобретенной устойчивости к триклозану у мутантных штаммов *S. aureus* Tr1 и *S. aureus* Tr2

МБК триклозана для исходного штамма *S. aureus* ATCC25923 составляла 0,5 мг/л. У субкультур *S. aureus* Tr1 и Tr2, а также *S. aureus* Tr1C и *S. aureus* Tr2C МБК триклозана составляла 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 отсутствии селективного давления.

4.1.3 Оценка чувствительности к антибиотикам у стафилококков, резистентных к триклозану

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 некоторых литературных источниках сообщалось о формировании перекрестной резистентности к антибиотикам у штаммов *S. aureus*, имеющих устойчивость к триклозану [69, 126]. В нашем исследовании перекрестной устойчивости к триклозану и антибиотикам у мутантных штаммов *S. aureus* Tr1 и *S. aureus* Tr2 не выявлено.

4.1.4 Определение параметров роста колоний стафилококков, устойчивых к триклозану

В ходе исследования определены параметры роста (бактериальный фитнес) резистентных к триклозану вариантов штамма *S. aureus* ATCC25923 – *S. aureus* Tr1, *S. aureus* Tr2, *S. aureus* Tr1C и *S. aureus* Tr2C: время одной генерации (G_T), скорость линейного роста диаметра колоний (K_D), время достижения колониями диаметра 1мм (t_{1mm}). Показано, что, по сравнению с исходным штаммом *S. aureus* ATCC25923, у триклозан-устойчивого штамма *S. aureus* Tr1 увеличены показатели G_T и t_{1mm} , то есть данный штамм отличается замедленным ростом. Другой триклозан-устойчивый штамм – *S. aureus* Tr2 имеет скорость роста, сопоставимую с исходным штаммом (таблица 4.1). Характерная скорость роста (бактериальный фитнес) у триклозан-устойчивых штаммов *S. aureus* сохранилась в ходе культивирования без селективного давления в течение 26 месяцев культивирования в среде не содержащей триклозан. Штамм

S. aureus Tr1C имел параметры роста, сопоставимые с параметрами роста штамма *S. aureus* Tr1, а штамм *S. aureus* Tr2C – с параметрами штамма *S. aureus* Tr2 (таблица 4.1).

Таблица 4.1 – Показатели параметров роста триклозан-устойчивых штаммов *S. aureus*

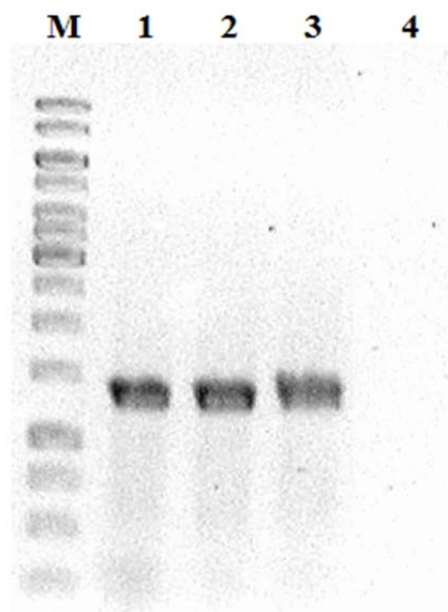
Штамм	G_T , мин	K_D , мм/ч	t_{1mm} , ч
<i>S. aureus</i> ATCC 625923	29 ± 2	$0,10 \pm 0,01$	15 ± 2
<i>S. aureus</i> Tr1	34 ± 1	$0,06 \pm 0,02$	23 ± 2
<i>S. aureus</i> Tr1C	35 ± 2	$0,06 \pm 0,02$	23 ± 2
<i>S. aureus</i> Tr2	30 ± 1	$0,10 \pm 0,01$	17 ± 2
<i>S. aureus</i> Tr2C	29 ± 1	$0,09 \pm 0,01$	16 ± 1

Примечание: G_T , мин – время одной генерации, K_D , – скорость линейного роста диаметра колоний, t_{1mm} , ч – времени достижения колониями диаметра 1 мм

Таким образом, изучение параметров роста триклозан-устойчивых штаммов стафилококков, по сравнению с исходным штаммом *S. aureus* ATCC25923, показало, что один из мутантных штаммов характеризуется пониженным бактериальным фитнесом, а другой по скорости роста не отличается от исходного штамма. Выявить корреляции между показателями роста и триклозан-устойчивостью не представилось возможным.

4.2. Анализ структуры гена еноил-ацил-редуктазы *fabI*

С целью изучения молекулярного механизма резистентности к триклозану у мутантных штаммов *S. aureus* Tr1 и *S. aureus* Tr2, проведен анализ первичной структуры гена, кодирующего еноил-ацил-редуктазу FabI, которая является мишенью действия триклозана. С помощью специфичных праймеров амплифицированы фрагменты гена *fabI* размером 1358 п.н. из мутантных штаммов и исходного штамма *S. aureus* ATCC25923 (рисунок 4.4).



М – маркер молекулярных масс ДНК «O'GeneRuler 1 kb DNA Ladder» (250, 500, 750, 1000, 1500, 2000, 2500, 3000, 3500, 4000, 5000, 6000, 8000, 10000 п. н.) (Thermo Scientific, Россия)

1 – *S. aureus* ATCC25923; 2 – *S. aureus* Tr1; 3 – *S. aureus* Tr2; 4 – отрицательный контроль (H₂O)

Рисунок 4.4 – Электрофореграмма ПЦР-продуктов гена *fabI*

Секвенирование амплифицированных фрагментов гена *fabI* и биоинформационный анализ последовательностей ДНК показало, что в штаммах *S. aureus* Tr1 и *S. aureus* Tr2 присутствуют идентичные нуклеотидные замены С284Т, по сравнению с аналогичной последовательностью в исходном штамме *S. aureus* ATCC25923 приводящие к аминокислотной замене А95V в продукте гена (рисунок 4.5). Данная мутация описана ранее в работе Ciusa M.L. et al., 2002 г. посвященной изучению механизмов резистентности к триклозану при мультиступенчатой и одноступенчатой *in vitro* селекции штаммов *S. aureus* в присутствии триклозана. Наличие аминокислотной замены А95V приводило к повышению МПК с 0,12 мг/л у исходного штамма до 4-8 мг/л у мутантного штамма и к повышению МБК с 1 до 8-16 мг/л, соответственно [73]. В нашем исследовании чувствительность к триклозану у триклозан-устойчивых штаммов увеличилась в 128 раз (с 0,5 до 64 мг/л) (рисунок 4.2), что согласуется с данными

работы Xu H. et al., 2008 г., в которой для штамма с мутацией A95V этот показатель увеличился в 240 раз [313].

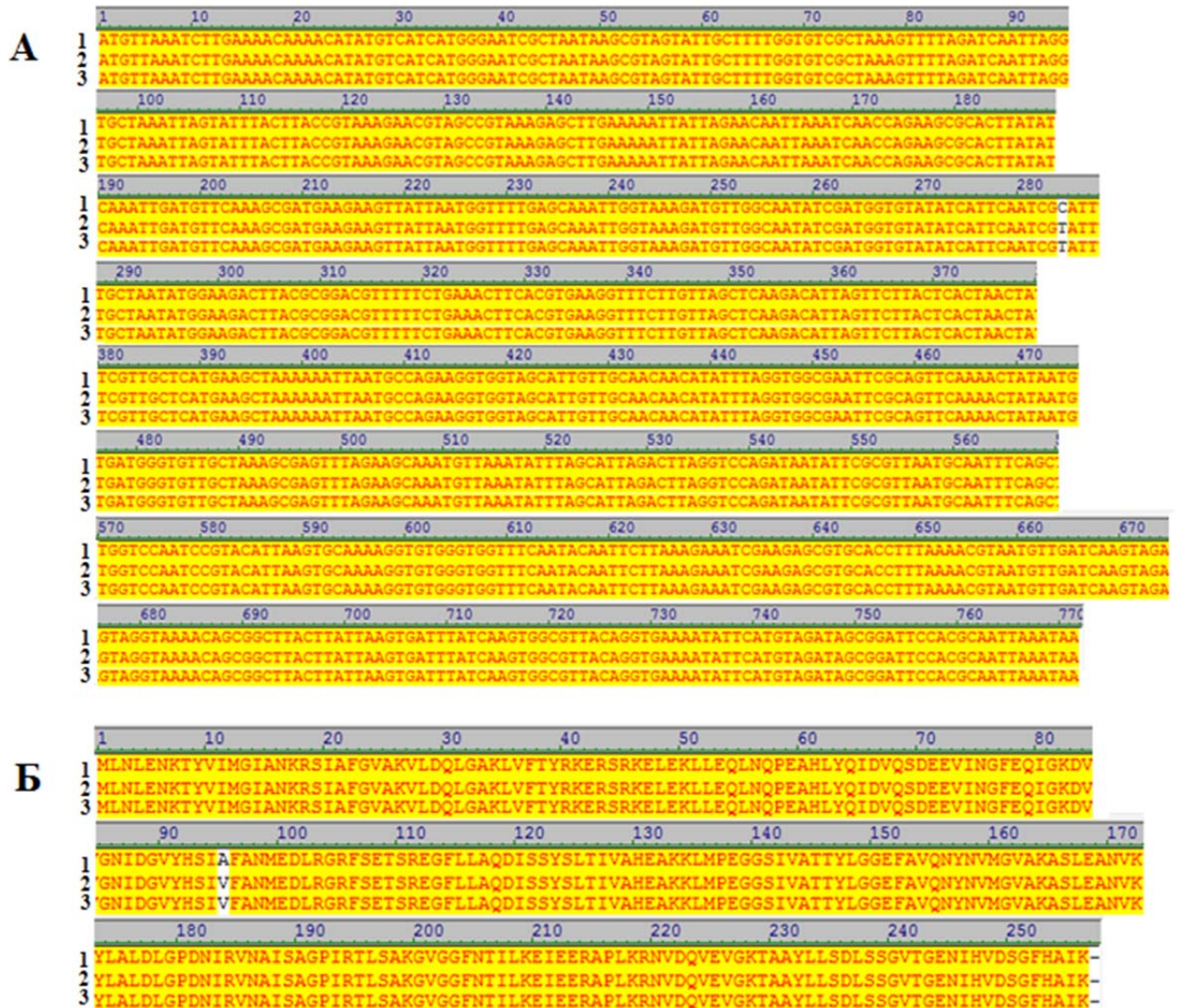


Рисунок 4.5 – Выравнивание нуклеотидных последовательностей гена *fabI*: (А) и аминокислотных последовательностей белка FabI; (Б) штаммов *S. aureus* ATCC25923 (1), *S. aureus* Tr1 (2) и *S. aureus* Tr2 (3)

Таким образом, в результате длительного эксперимента по культивированию штамма *S. aureus* ATCC25923 в условиях селективного давления повышающихся концентраций триклозана получены два мутантных варианта *S. aureus* Tr1 и *S. aureus* Tr2, которые устойчивы к 64 мг/л триклозана, что объясняется наличием у этих штаммов точечной мутации С284Т в гене еноил-ацил-редуктазы FabI, которая привела к аминокислотной замене аланина на валин

- A95V. Данная аминокислотная замена описана ранее как существенный механизм триклозан-устойчивости у стафилококков. 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).

4.3 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* Tr1C и *S. aureus* Tr2C, полученных в ходе последующего 26-месячного культивирования мутантных штаммов без селективного давления. Результаты биоинформационного анализа полученных последовательностей методом выравнивания с последовательностью полного генома штамма *S. aureus* ATCC25923, размещенного в базе данных GenBank [CP009361] представлены на рисунке 4.6.

Анализ полногеномных сиквенсов показал, что триклозан-устойчивые штаммы отличаются от исходного штамма *S. aureus* ATCC25923 наличием 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⁺, K⁺, Li⁺ 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 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 4.6). 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. Дополнительно стоит отметить, что в ходе эксперимента выявлена определенная нестабильность геномов мутантных штаммов *S. aureus* Tr1 и *S. aureus* Tr2, выразившаяся в наличии у них точечных мутаций в разных участках генома (16 и 3 соответственно), которые были утрачены при последующем культивировании в отсутствие селективного давления триклозана, а также в появлении новых точечных мутаций (3 и 6 соответственно) после длительного культивирования без селективного давления (рисунок 4.6)

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.

<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	<i>fabI</i>	965577	SNP	T	T	T	<i>fabI</i>	965577	SNP	T	T	T	<i>fabI</i>
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 4.6 – Нуклеотидные и аминокислотные замены, выявленные в триклозан-устойчивых штаммах, по сравнению с исходным штаммом *S. aureus* ATCC25923

4.4 Заключение по Главе 4

В ходе проведенной работы, с помощью культивирования штамма *S. aureus* ATCC25923 в условиях селективного давления ступенчатых концентраций триклозана, получены два варианта триклозан-устойчивых мутантных штаммов, которые резистентны к данному антисептику в концентрации 64 мг/л, что превышает уровень чувствительности исходного штамма в 128 раз. Показано, что приобретенная устойчивость к триклозану стабильно наследовалась данными мутантными штаммами при длительном культивировании, в течение 26 месяцев, в отсутствие селективного давления. Выявленным молекулярным механизмом триклозан-устойчивости двух независимо полученных мутантных штаммов является мутация в гене *fabI*, кодирующем еноил-ацил-редуктазу, фермент, участвующий в синтезе жирных кислот стафилококков. В обоих штаммах выявлена нуклеотидная замена C284T, приводящая к аминокислотной замене в кодируемом белке аланина на валин

A95V. Вероятно, данная мутация очень важна для формирования устойчивости к триклозану, так как зафиксированы нами в двух независимых событиях мутагенеза, а также описана в публикациях других авторов [73, 283]. По данным полногеномного секвенирования дополнительно описаны еще по две стабильно наследуемые без селективного давления мутации – в штамме *S. aureus* Tr1 – мутация G491A в гене гипотетического транспортного белка и мутация C137T в гене белка-антипортера, связанного с устойчивостью к высоким концентрациям Na⁺, K⁺, Li⁺ и щелочам; в штамме *S. aureus* Tr2 – мутация A545G в гене мембранного белка и мутация G857T в гене гистидин-киназы. По-видимому, выявленные стабильно наследующиеся без селективного давления триклозана мутационные изменения в геномах триклозан-устойчивых вариантов штамма *S. aureus* ATCC25923 обеспечили высокий уровень устойчивости к триклозану.

Охарактеризованные мутантные варианты штамма *S. aureus* ATCC25923, устойчивые к высоким концентрациям триклозана депонированы в государственную коллекцию патогенных микроорганизмов «ГКПМ-Оболенск» и могут быть использованы для дальнейших исследований механизмов резистентности к антисептикам.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Антибактериальные препараты класса биоцидов, включающий в себя дезинфектанты и антисептики, широко используются в практике контроля возбудителей инфекционных заболеваний. Неадекватное использование биоцидов является одним из факторов распространения бактерий, устойчивых к антибактериальным препаратам. Особую опасность представляет использование биоцидов в субингибирующих концентрациях, способствующее селекции бактерий, несущих гены резистентности, и передаче их посредством горизонтального переноса. Мониторинг чувствительности бактериальных патогенов, особенно циркулирующих в госпитальной среде, диктуется современными задачами здравоохранения, так как госпитальная среда является резервуаром генов резистентности к антибиотикам и биоцидам.

В последние десятилетия разработаны и широко используются новые препараты биоцидов, которые не всегда охарактеризованы с точки зрения механизмов их действия на бактериальные клетки, на современные штаммы патогенов, характеризующихся высоким уровнем резистентности к лекарственным препаратам. Особый практический интерес представляет вопрос об эффективности действия препаратов биоцидов на бактерии в разных физиологических состояниях – в планктонной культуре и в составе биопленки, а также выявление у бактерий новых мишеней действия антибактериальных препаратов.

В ходе проведенной работы изучена чувствительность к биоцидам, на примере хлоргексидина, у госпитальных штаммов *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa*, *A. baumannii* и *P. mirabilis*, а также у референс-штаммов, рекомендованных для оценки активности дезинфектантов и антисептиков – *E. coli* ATCC25922, *K. pneumoniae* ATCC700603, *P. aeruginosa* ATCC27853 и *S. aureus* ATCC25923.

Разработан трехэтапный метод для сравнительной оценки чувствительности к антисептикам бактериальных планктонных и биопленочных культур,

включающий в себя: предварительную оценку диапазонов минимальных подавляющих концентраций и минимальных бактерицидных концентраций, определение МПК и МБК методом микрокапли, определение МБК аппликативным методом. Данным методом показано, что МБК антисептика хлоргексидина для госпитальных штаммов бактерий в составе биопленки существенно выше, чем данный показатель для этих бактерий 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.

Показано, что концентрация хлоргексидина, рекомендованная в инструкции по применению для использования в качестве антисептика для обработки рук (0,5%), 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 (Акт внедрения НИИ нейрохирургии им. Н.Н. Бурденко №1 от 06.04.2016 г.).

Предложенный для оценки эффективности биоцидов аппликативный метод является экспериментальным приемом, моделирующим биопленку бактерий на поверхности плотной питательной среды. Адекватность модели биопленки подтверждена на примере госпитального штамма *A. baumannii* В-1745 с помощью атомно-силовой и электронной микроскопии, которые выявили характерные особенности морфологии биопленки на поверхности плотной питательной среды (скопление клеток, соединенных внеклеточным матриксом и разделенных «каналами», наличие пиле-подобных структур на поверхности бактерий). Применение масс-спектрометрического MALDI-анализа позволило зафиксировать биохимические различия между планктонной культурой и биопленкой, формирующейся на поверхности плотной питательной среды, а

именно были выявлены пики, общие для планктонных бактерий и биопленки; пики, уникальные для каждого вида бактерий, а также несколько других пиков, которые наблюдались только у планктонных культур либо только у биопленок исследуемых штаммов. MALDI-анализ является перспективным для дальнейшей разработки подходов дифференциации состояния бактериальных культур, выделяемых из клинических образцов, от животных и из объектов окружающей среды.

Формирование бактериальной резистентности к биоцидам описано на примере селекции устойчивых вариантов штамма *S. aureus* ATCC25923 к триклозану. Получены два варианта триклозан-устойчивых мутантных штаммов *S. aureus* Tr1 и *S. aureus* Tr2, которые резистентны к данному антисептику в концентрации 64 мг/л, превышающей уровень чувствительности исходного штамма в 128 раз. Приобретенная устойчивость к триклозану стабильно наследовалась мутантными штаммами при длительном культивировании в отсутствии селективного давления – штаммами *S. aureus* Tr1C и *S. aureus* Tr2C. Изучение параметров роста триклозан-устойчивых штаммов стафилококков, по сравнению с исходным штаммом *S. aureus* ATCC25923, показало, что один из мутантных штаммов характеризуется пониженным бактериальным фитнесом, а другой по скорости роста не отличается от исходного штамма.

Показано, что 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 C284T приводящая к аминокислотной замене аланина на валин - A95V, известная ранее по литературным данным и, по-видимому, существенная для формирования устойчивости стафилококков к триклозану. По данным полногеномного секвенирования дополнительно описаны еще по две стабильно наследуемые без селективного давления мутации – в штаммах *S. aureus* Tr1 и *S. aureus* Tr1C – мутация G491A в гене гипотетического транспортного белка и мутация C137T в гене белка-антипортера, связанного с устойчивостью к высоким концентрациям Na⁺, K⁺, Li⁺ и щелочам; в штаммах

S. aureus Tr2 и *S. aureus* Tr2С – мутация А545G в гене мембранного белка и мутация G857T в гене гистидин-киназы.

Охарактеризованные микробиологическими и молекулярно-генетическими методами мутантные варианты штамма *S. aureus* ATCC25923, устойчивые к высоким концентрациям триклозана депонированы в Государственную коллекцию патогенных микроорганизмов «ГКПМ-Оболенск» и могут быть использованы для дальнейших исследований механизмов резистентности к антисептикам.

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 *K. pneumoniae* ATCC700603, *Escherichia coli* ATCC25922, *Staphylococcus aureus* ATCC25923 и *P. 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 госпитальных штаммов бактерий в составе биопленки существенно выше, 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. По данным 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⁺, K⁺, Li⁺ 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.

ПЕРЕЧЕНЬ СОКРАЩЕНИЙ, УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ, СИМВОЛОВ, ЕДИНИЦ И ТЕРМИНОВ

АМП – антимикробный препарат

АП – аппликатор

АСМ – атомно-силовая микроскопия

ВБИ – внутрибольничные инфекции

ВИЧ – вирус иммунодефицита человека

ВОЗ – всемирная организация здравоохранения

ГРМ – гидролизат рыбной муки

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота

ДС – дыхательная система

ИСМП – инфекции, связанные с оказанием медицинской помощи

КОЕ – колониеобразующая единица

ЛПУ – лечебно-профилактические учреждения

МБК – минимальная бактерицидная концентрация антимикробного препарата.

МИК – минимальная ингибирующая концентрация антимикробного препарата.

МК – микрокапля

МПК – минимальная подавляющая концентрация антимикробного препарата.

МС – мочевыделительная система

ОРИТ – отделение реанимации и интенсивной терапии

ПАВ – поверхностно-активное вещество

ПВХ – поливинилхлорид

ПЦР – полимеразная цепная реакция

ЧАС – четвертично-аммониевые соединения

ЭДТА – этилендиаминтетрауксусная кислота

A. baumannii–*Acinetobacter baumannii*

ACP (acyl carrier protein) ацил-переносящий белок

ALI – air-liquid interface–раздел фаз воздух – жидкость

AMC – амоксициллин/клавулановая кислота

AMI – амикацин

AMS – амоксициллин-сульбактам

CAZ – цефтазидим

CEF – цефуроксим

CEX – цефокситин

CIP – ципрофлоксацин

CM – хлорамфеникол

CPS – цефоперазон-сульбактам

CPZ – цефоперазон

CTA – цефтриаксон

CTX – цефотаксим

CTZ- котримоксазол

CLSM – конфокальная лазерная сканирующая микроскопия

D_{24} - диаметр колоний к 24 часам культивирования

D_0 – эффективный диаметр клетки

d - диаметр колонии в момент измерения

D_t – величина диаметра колонии к t часам инкубирования

GT – время одной генерации

GFP (green fluorescence protein) –зеленый флуоресцентный белок

E. coli–*Escherichia coli*

FEP – цефепим

GEN – гентамицин

Enoyl-ACP-reductase – еноил-ацил-редуктаза

EPS- экзополисахарид, внеклеточный полимерный матрикс биопленки

ERM-эртапенем

- K_D – скорость линейного роста диаметра колоний
- K. pneumoniae* – *Klebsiella pneumoniae*
- H. pylori* – *Helicobacter pylori*
- IMI – имипенем
- IZE – изепамицин
- M. smegmatis* – *Mycobacterium smegmatis*
- MAIDI – Матрично-активированная лазерная десорбция/ионизация
- NAD- Никотинамидадениндинуклеотид
- ND – нет данных
- NIT – нитрофурантоин
- P. aeruginosa* – *Pseudomonas aeruginosa*
- PEF – пefлоксацин
- PGA – подигликолид, матриксный экзополисахарид
- Pel – матриксный полисахарид, поддерживающий структуру биопленки сразу после прикрепления к субстрату
- Psl – матриксный полисахарид, поддерживающий структуру биопленки на поздних стадиях развития биопленочного процесса
- PIA – внеклеточной полисахаридный адгезин
- PIP – пиперациллин
- PIT – пиперациллин/тазобактам
- QS – quorum-sensing – эффект чувства кворума
- P. mirabilis* – *Proteus mirabilis*
- S. aureus* – *Staphylococcus aureus*
- t - время инкубации
- t_{1mm} – время достижения колониями диаметра в 1мм
- TET- тетрациклин
- TGC – тигециклин
- TNR – триметоприм
- TOB – тобрамицин
- μ_m , ($ч^{-1}$) – максимальная удельная скорость роста биомассы колоний

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Андреев, А. Л. Получение мутантов *Burkholderia cenocepacia* с измененной способностью к формированию биопленок, и их характеристика *in vitro* и *in vivo* / А. Л. Андреев // диссертация канд. биол. наук 03.00.07 – М., 2009. – С.112.
2. Асташкин, Е. И. Характеристика клинических штаммов *Acinetobacter baumannii* / Е. И. Асташкин, Н. Н. Карцев, Д. М. Пачкунов // Тезисы XV Международного конгресса МАКМАХ по антимикробной терапии. – 2013. – М., 2013. – №15. – Т. 2. – С. 46.
3. Афиногенова, А.Г. Микробные биопленки ран: состояние вопроса / А.Г. Афиногенова, Е.Н. Даровская // Травматология и ортопедия России. – 2011. – Т. 3. – № 61. – С. 119-125.
4. Веткина, И. Ф. Современный подход к выбору дезинфицирующих средств в системе профилактики внутрибольничных инфекций (ВБИ). / Л. В. Комаринская, И. Ю. Ильин, М. В. Соловьева // ФАРМ индекс Практик. – СПб, –2005. - № 7. – С. 13-20.
5. Всемирная организация здравоохранения шестьдесят девятая сессия Всемирной Ассамблеи Здравоохранения. Пункт 14.4 предварительной повестки дня. – 13 мая 2016 г.
6. Галынкин, В.А. Фармацевтическая микробиология / В.И. Кочеровец, А.Э. Габидова// Арнебия. - М., - 2015. – С. 39.
7. Горбунов, В. А. Сравнительная активность некоторых дезинфектантов в отношении клинических штаммов *P. aeruginosa*, выделенных в стационарах Республике Беларусь / Воен. мед. – 2010. - № 3 . –С. 46-50.
8. Гостев, В. В. Бактериальные биопленки и инфекции / В. В. Гостев, С. В. Сидоренко // Журнал инфектологии. 2010. – №2(3). – С. 4-15.
9. Гудкова, Е. И. Чувствительность к новым дезинфектантам клинических штаммов микробов, методы определения / Е. И. Гудкова, А. А. Адарченко,

- Т. М. Ласточкина, Л. И. Симоненко, И. Н. Слабко// Материалы юбилейной научной конференции, посвященной 80-летию Башкирского Государственного Медицинского Университета «Актуальные проблемы современной медицины» Под ред. С.Л. Кабака. – Минск БГМУ. – 2001. – С. 89-91.
10. Гудкова, Е. И. Формирование устойчивости к антисептикам и дезинфектантам возбудителей внутрибольничных инфекций и её микробиологический мониторинг / Е. И. Гудкова // Белорусский медицинский журнал. – 2003. – № 3. – С. 57–60.
11. 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, Н.В. Курдюмова, С.Ю. Сазыкина, И.А. Дятлов, Фурсова Н.К // Клин. Микробиол. и антимикроб. химиотер. – 2016. – Т. 17. - №1. – С. 57-66.
12. Зверьков, А. В. Актуальность обработки полости рта 0,1 % раствором хлоргексидина и очищенной водой для профилактики нозокомиальной пневмонии у больных с острым нарушением мозгового кровообращения / А. В. Зверьков, А. П. Зузова // Тезисы XVI Международного конгресса МАКМАХ по антимикробной терапии. – 2014г. – М., 2014; – №16. – Т. 2. – С. 20.
13. Зуева Л. П. Обоснование мониторинга чувствительности к дезинфектантам микроорганизмов, циркулирующих в стационарах / Л. П. Зуева, Е. Н. Колосовская, А. В. Любимова, Б. И. Асланов, А. Е. Гончаров, Ю. С. Светличная // Дез. дело. – 2011. – №2. – С. 45-48.
14. Карцев, Н. Н. Экстремально лекарственно-устойчивые клинические изоляты *Klebsiella pneumoniae* и *Proteus mirabilis* / Н. Н. Карцев, Е. И. Асташкин, Д. М. Пачкунов // Тезисы XV Международного конгресса МАКМАХ по антимикробной терапии. – 2013 г. – М., 2013. – №15. – Т. 2. – С.46.

15. Кафтырева, Л. А. Резистентность к дезинфектантам энтеробактерий – возбудителей зооантропонозных инфекций. / С. А. Егорова, М. А. Макарова // Дез. дело. – М., 2008. – №3 – С. 12-14.
16. Ковалишена, О. В. Организация мониторинга устойчивости микроорганизмов к дезинфицирующим средствам / О. В. Ковалишена, А. С. Благоданова // [Электронный ресурс]. Режим доступа http://www.remedium.ru/public/journal/rem_volga/new/detail.php?ID=18621 (дата обращения 17.04.2012).
17. Красильников, А. П. Справочник по антисептике / А. П. Красильников // Высшая школа. – Минск, 1995. – 367с.
18. Красильников, А. П. Современные проблемы эпидемиологии и эпидемиологического надзора за инфекционными болезнями / А. П. Красильников, А. А. Адарченко, Е. И. Гудкова // – Мн., 1996. – Т. 3. – С. 201-211.
19. Кряжевских Н.А. оценка применимости масс-спектрометрического метода МАЛДИ для диагностики внутрипопуляционных диссоциантов бактерий / Н. А. Кряжевских, Н. Г. Лойко, Е.В. Демкина, А. Л. Мулюкин, А. Т. Лебедев, А. М. Гапонов, А. В. Тутельян, Ю. А. Николаев, Г. И. Эль-Регистан // Микробиол. – 2015. – Т. 84. – № 3. – С. 991-310.
20. Кулаков, О. Б. Оценка поверхности дентальных имплантатов при помощи конфокального лазерного сканирующего микроскопа (CLSM) / О. Б. Кулаков, В. В. Матюнин // Научно-практ. журнал Институт Стоматологии. - 2003. – №3. – Т. 20. – С. 23-25
21. Курдюмова, Н.В. Результаты клинико-эпидемиологического мониторинга пациентов в отделении нейрореанимации / Н.В. Курдюмова, О.Н. Ершова, И.А. Савин, М.А. Шифрин, И.А. Александрова, С.Ю. Сазыкина, Е.Ю. Соколова, Т.Ф. Табасаранский, Г.В. Данилов. Тезисы XVII международного конгресса по антимикробной терапии. // Клин. Микробиол. Антимикроб. Химиотер. – 2015. – Т. 17. - №2. - С. 27.

- 22.Лямин, А. В. Методы выявления биоплёнок в медицине: возможности и перспективы / А. В. Лямин, Е. А. Боткин, А. В. Жестков // Клини. Микробиол. и Антимикр. Химиотер. – М., 2012. – №14. – Т. 1. – С. 17-22.
- 23.Маянский, Н. А. MALDI-TOF масс-спектрометрия в рутинной работе микробиологической лаборатории / Н. А. Маянский, А. Н. Калакуцкая, О. В. Мотузова, Г. Г. Ломинадзе, О. А. Крыжановская, Л. К. Катосова // Вопросы диагностики в педиатрии. – 2011. – № 3. – Т. 5. – С. 20-25.
- 24.МУ-287-113. Методические указания по дезинфекции, предстерилизационной очистке и стерилизации изделий медицинского назначения: методические указания. – М., 1998.
- 25.МУ 4.2.1890-0.4 Определение чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препаратам: методические указания. – М., 2004. – 91 с.
- 26.Сироткин, А. С. Агрегация микроорганизмов: флоккулы, биопленки, микробные гранулы / А. С. Сироткин, Г. И. Шагинурова, К. Г. Ипполитов // – Казань. 2007. – С. 160.
- 27.Национальная Концепция профилактики инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи. Утверждена Главным государственным санитарным врачом РФ 6 ноября 2011 г. / [Электронный ресурс]. Режим доступа <http://www.garant.ru/products/ipo/prime/doc/70000121/#70000121> (дата обращения 29.08.2016).
- 28.Николаев, Ю. А., Плакунов В. К. Биоплёнка – «город микробов» или аналог многоклеточного организма / Ю. А. Николаев, // Микробиол. 2007 г. – Т. 76. –№ 2/ – С. 149-163.
- 29.Попова, А.Ю. Надзор за соблюдением санитарно-эпидемиологического законодательства при оказании медицинской помощи в целях обеспечения ее качества и безопасности / А.Ю. Попова, Е.Б. Ежлова, Е.И. Игонина // Вестник Росздравнадзора. – 2016. – № 1. – С. 74-80.
- 30.Программа ВОЗ по обеспечению безопасности пациентов. Всемирный альянс за безопасность пациентов. Глобальная задача по обеспечению

- безопасности пациентов. Чистая помощь – безопасная помощь. Всемирная организация здравоохранения. Женева, Швейцария. – 2006.
- 31.Родин, В. Б. Упрощенная модель роста колоний одноклеточных микроорганизмов и ее использование для оценки воздействия биоцидов на микробные клетки. / В. Б. Родин, Н. С. Паников, В. С. Кобелев, Н. А. Акимова, В. П. Холоденко // Прикл. биохим. и микробиол. – 1998. –Т. 34. – С. 403–409.
- 32.Родин, В. Б. Перекрестная устойчивость микроорганизмов к антибиотикам, сопряженная с резистентностью к дезинфектантам / Е. Н. Кобзев, В. А. Чугунов, В. Б. Родин, Е. В. Детушева, П. В. Слукин, Л. С. Фёдорова, В. Г. Акимкин // Дезинфекционное дело. – М., 2011. - № 4. – С. 20–26.
- 33.Руководство 4.2.2643-10. Методы лабораторных исследований и испытаний дезинфекционных средств для оценки их эффективности и безопасности. – 2010.
- 34.СанПиН 2.1.3.2630 -10 «Санитарно-эпидемиологические требования к организациям, осуществляющим медицинскую деятельность». Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора. – 2010.
- 35.Тец, В. В. Биопленки возбудителей уроинфекций и использование фторхинолонов / В. В. Тец, Н. К. Артеменко // Consilium Medicum. – Урология, 2008. – Т. 10. – № 4. – С. 110–114.
- 36.Чеботарь, И. В. Современные технологии исследования бактериальных биоплёнок / И. В. Чеботарь, А. Г. Погорелов, В. А. Яшин, Е. Л. Гурьев, Г. Г. Ломинадзе // Совр. Технол. в мед. – 2013. – Том5. - №1. – С. 14-20.
- 37.Шкарин, В. В. Современные представления о механизмах устойчивости микроорганизмов к дезинфицирующим средствам / В. В. Шкарин, А. С. Благоднравова, О. В. Ковалишена // Эпидемиол. и инфекц. бол. Актуальные вопросы. – 2011. – № 3. – С.48-53.
- 38.Aarestrup, F. M. Susceptibility of different species isolated from food animals to copper sulphate, zinc chloride and holeraial substances used for disinfection / F. M. Aarestrup, H. Hasman // Vet. Microbiol. – 2004. – V. 100. – P. 83–89.

39. Abdel Malek, S. M. A. Antimicrobial susceptibility changes and T-OMP shifts in pythione-passaged planktonic cultures of *Pseudomonas aeruginosa* / S. M. A. Abdel Malek., I. S. I. Al-Adham, C. L. Winder, T. E. J. Buuljens, K. M. A. Gartland, Collier P. J. // *J. Appl. Microbiol.* – 2002. – V. 92. – P. 729–736.
40. Albertos, J. M. La clorhexidina. / J. M. Albertos, L. M. Junquera, M. T. Albertos, S. Olay, E. López-Arranz // *Perspectiva actual. An Odontoestomatología.* – 1996. – V. 5. – P. 217–223.
41. Alhede M. Phenotypes of non-attached *Pseudomonas aeruginosa* aggregates resemble surface attached biofilm / M. Alhede, K. N. Kragh, K. Qvortrup, M. Allesen-Holm, M. van Gennip, L. D. Christensen, P. Ø. Jensen, A. K. Nielsen, M. Parsek, D. Wozniak, S. Molin, T. Tolker-Nielsen, N. Høiby, M. Givskov, T. Bjarnsholt // *PloS One.* – 2011. – V. 6. – N. 11.
42. Anderl, J. N. Role of nutrient limitation and stationary-phase existence in *Klebsiella pneumoniae* biofilm resistance to ampicillin and ciprofloxacin / J. N. Anderl, Zahller, J., Roe, F., and Stewart, P. S. // *Antimicrob. Agents Chemother.* – 2003. – V. 47. – P. 1251–1256.
43. Aparna, M. S. Biofilms: microbes and disease / M. S. Aparna, S. Yadav // *Braz. J. Infect. Dis.* – 2008. V. 6. – P. 526–530.
44. Arévalo, J. M. Guía del grupo de trabajo sobre desinfectantes y antisépticos / J. M. Arévalo, J. L. Arribas, L. Calbo, M. J. Hernández, M. Lizán, R. Herruzco // *Medicina Preventiva.* – 1998. – V. –4. – P. 38–43.
45. Argyrou A. New Insight into the Mechanism of Action of and Resistance to Isoniazid interaction of *Mycobacterium tuberculosis* enoyl-ACP Reductase with INH-NADP/ A. Argyrou, M. W. Vetting, S. Blanchard // *J. Am. Chem. Soc.* – 2007/ – V. 129. – 31. – P. 9582–9583.
46. Assesment of the Antibiotic Resistance Effects of Biocides: Scientific Committee on Emerging and Newly Identified Health Risks (SCENIHR) // 28th plenary on 19 January 2009. [электронный ресурс]. Режим доступа: http://ec.europa.eu/health/ph_risk/risk_en.htm.

47. Bardossy, A. C. Preventing Hospital-acquired Infections in Low-income and Middle-income Countries: Impact, Gaps, and Opportunities / A. C. Bardossy, J. Zervos, M. Zervos // *Infect. Dis. Clin. North. Am.* – 2016. – V. 30 – N. 3. – P. 805-818.
48. Benarde, M. A. Kinetics and mechanism of bacterial disinfection by chlorine dioxide / M. A. Benarde, W. B. Snow, V. P. Olivieri, B. Davidson // *Appl. Microbiol.* – 1967. – V. 15. – P. 257–265.
49. Bisset, L. A prospective study of the efficacy of routine decontamination for gastrointestinal endoscopes and the risk factors for failure / L. Bisset, Y.E. Cossart, W. Selby, R. West, D. Catterson, K. O'Hara // *Am. J. Infect. Control.* – 2006. – V. 34. – P. 274-280.
50. Blaze, M. T. M. Identification and Imaging of Peptides and Proteins on *Enterococcus faecalis* Biofilms by Matrix Assisted Laser Desorption Ionization Mass Spectrometry / M. T. M. Blaze, B. Aydin, R. Carlson, L. Hanley // *Analyst.* – 2012. – V. 137. – N. 21. – P. 5018–5025.
51. Bloomfield, S. F. Interaction of *Bacillus subtilis* spores with sodium hypochlorite, sodium dichloroisocyanurate and chloramine / S. F. Bloomfield, M. Arthur // *Appl. Bacteriol.* – 1992. – V. 72. – P. 166–172.
52. Boeris, P.S. Modification of phospholipid composition in *Pseudomonas putida* ATCC 12633 induced by contact with tetradecyltrimethylammonium / P. S. Boeris, C. E. Domenech, G. I. Lucchesi // *J. Appl. Microbiol.* – 2007. – V. 103. – P. 1048–1054.
53. Bonnac L. Synthesis of 4-phenoxybenzamide adenine dinucleotide as NAD analogue with inhibitory activity against enoyl-ACP reductase (InhA) of *Mycobacterium tuberculosis* / L. Bonnac, G. Y. Gao, L. Chen, K. Felczak, E. M. Bennett, H. Xu, T. Kim, N. Liu, H. Oh, P. J. Tonge, K. W. Pankiewicz // *Bioorg. Med. Chem. Lett.* – 2007. – V. 17. – N. 16. – P. 4588–4591.
54. Bosca, I. D. The impact of 0.5% chlorhexidine oral decontamination on the prevalence of colonization and respiratory tract infection in mechanically

- ventilated patients / I. D. Bosca, C. Berar, F. Anton // Preliminary study. *Pneumologia*. – 2013. – V. 62. –N. 4. – P. 217–222.
55. Braoudaki M. Adaptive Resistance to Biocides in *Salmonella enterica* and *Escherichia coli* O157 and Cross-Resistance to Antimicrobial Agents / M. Braoudaki, A. C. Hilton // *J Clin Microbiol*. – 2004.-V. 42. – N.1. – P. 73–78.
56. Bridges, K. Gentamicin – and silver-resistant *Pseudomonas* in a burn unit / K. Bridges, A. Kidson, E.J.L. Lowbury // *BMJ*, 1979. - V. 1. –P. 446–449.
57. Broadley, S. J. Potentiation of the effects of chlorhexidine diacetate and cetylpyridinium chloride on *mycobacteria* by ethambutol / S. J. Broadley, P. A. Jenkins, J. R. Furr, A. D. Russell. // *J. Med. Microbiol*. – 1995. – V. 43. – P. 458–460.
58. Brossard K. A. The *Acinetobacter baumannii* Biofilm-Associated Protein Plays a Role in Adherence to Human Epithelial Cells / K. A. Brossarda, A. A. Campagnari // *Infect. Immun*. – 2011. – V. 80. – N. 1. – P. 228–233
59. Buffet-Bataillon, S. Effect of higher minimum inhibitory concentrations of quaternary ammonium compounds in clinical *E. coli* isolates on antibiotic susceptibilities and clinical outcomes / S. Buffet-Bataillon, B. Branger, M. Cormier, M. Bonnaure-Mallet, A. Jolivet-Gougeon // *J. Hosp. Infect*. – 201. – N. 79. – V. 2. – P. 141–146.
60. Buzás, G. M. Nitrofurantoin-based regimens for the eradication of *Helicobacter pylori* infection / G. M. Buzás, J. Józsan // *J. Gastroenterol. Hepatol*. – 2007. V. 22. – P. 1571–1581.
61. Caiazza, N.C. Alpha-toxin is required for biofilm formation by *Staphylococcus aureus* / N.C. Caiazza, G.A. O’Toole, // *J. Bacteriol*. – 2003. – V. 185. – P. 3214–3217.
62. Camargo, A. C. Biofilm formation on catheters used after cesarean section as observed by scanning electron microscopy / A. C. Camargo, E. L. Pizzolitto // *Intern. J. Gynecol. Obst*. – 2005. – V. 90. P. 148–149.
63. Camilli, A. Bacterial small-molecule signaling pathways / A. Camilli, B. L. Bassler // *Science*. – 2006. – V. 311. – P. 1113–1116.

64. Cason, J. S., Antiseptic and septic prophylaxis for burns: use of silver nitrate and of isolators / J. S. Cason, D. M. Jackson, E. J. Lowbury // *BMJ*. – 1966. – V. 2. – P. 1288–1294.
65. Champlin, F. R. Effect of outer membrane permeabilisation on intrinsic resistance to low triclosan levels in *Pseudomonas aeruginosa* / F. R. Champlin, M. L. Ellison, J. W. Bullard, R. S. Conrad // *Int. J Antimicrob. Agents*. – 2005. – V. 26. – P. 159–164.
66. Charcklis, W. G., Gordon A., McFeters, Marshal K.C. Physiological ecology in biofilm systems in: *Biofilms*/ W. G. Charcklis, A. Gordon, K.C. Marshal // A Willey- Interscience Publication. New York. – 1990. – P. 341–395.
67. Charcklis W. G. Transport and interfacial transfer phenomena in: *Biofilms* / W. G. Charcklis, H. T. Mukesh, N. Zilver // A Willey- Interscience Publication. New York. – 1990. – P. 265–241.
68. Ghigo, J.M. Natural conjugative plasmids induce bacterial biofilm development / J.M. Ghigo // *Nature*. – 2001. – V. 412. – P.442–445.
69. Christensen, B. B. Establishment of new genetic traits in a microbial biofilm community / B. B. Christensen, C. Sternberg, J. B. Andersen, L. Eberl, S. Moller, M. Givskov, S. Molin // *Appl. Environ. Microbiol.* – 1998. – V. 64. – P. 2247–2255.
70. Chuanchuen, R., Beinlich K., Hoang T., Becher A., Karkhoff-Schweizer R., and P. Schweizer H. Cross-Resistance between Triclosan and Antibiotics in *Pseudomonas aeruginosa* Is Mediated by Multidrug Efflux Pumps: Exposure of a Susceptible Mutant Strain to Triclosan Selects *nfxB* Mutants Overexpressing MexCD-OprJ / R. Chuanchuen, K. Beinlich, T. Hoang, A. Becher, R. Karkhoff-Schweizer, H. Schweizer // *Antimicrob. Agents Chemother.* – 2001. – V. 45. – N. 2. – P. 428–432.
71. Chuanchuen, R. The MexJK efflux pump of *Pseudomonas aeruginosa* requires OprM for antibiotic efflux but not for effect of triclosan / R. Chuanchuen, C. T. Narasaki, H. P. Schweizer // *J. Bacteriol.* – 2002. – V.184. – P. 5036–5044.

72. Chuanchuen, R. Susceptibilities of antimicrobials and disinfectants in *Salmonella* isolates obtained from poultry and swine in Thailand / R. Chuanchuen, P. Pathanasophon, S. Khemtong, W. Wannaprasat, P. Padungtod. // J. Vet. Med. Sci. – 2008. – V. 70. – P. 595–601.
73. Ciusaa, M. L. A novel resistance mechanism to triclosan that suggests horizontal gene transfer and demonstrates a potential selective pressure for reduced biocide susceptibility in clinical strains of *Staphylococcus aureus* / M. L. Ciusa, L. Furi, D. Knight, F. Decorosi, M. Fondi, C. Raggi, J. R. Coelhof, L. Aragones, L. Moceg, P. Visa, A. T. Freitas, L. Baldassarri, R. Fani, C. Viti, G. Orefici, J. L. Martinez, I. Morrissey, M. R. Oggioni // Int. J. of Antimicrob. Agents. – 2012. – V. 40. – P. 210–220.
74. Cloete, T. E. Resistance mechanisms of bacteria to antimicrobial compounds / T. E. Cloete // Int. Biodet. Biodegrad. – 2003. – V. 51. – P. 2772–2782.
75. Coenye, T. In vitro and in vivo model systems to study microbial biofilm formation / T. Coenye, // J Microbiol Meth. – 2010. – V. 83. – P. 89–105.
76. Cookson, B. Chlorhexidine resistance in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* or just an elevated MIC? An in vitro and in vivo assessment / B. Cookson, M. Bolton, J. Platt // Antimicrob. Agents Chemother. – 1991. – V. 35. – P. 1997–2002.
77. Cookson, B. Transferable resistance to triclosan in MRSA / B. Cookson, H. Farrelly, P. Stapleton, R. P. Garvey, M. R. Price // Lancet. – 1991. V. 337. – P. 1548–1549.
78. Cookson, B. Clinical significance of emergence of bacterial antimicrobial resistance in the hospital environment / B. Cookson. J. Appl. Microbiol. – 2005. – V. 99. – P. 989–996.
79. Corona-Izquierdo, F.P. A mutation in *rpoS* enhances biofilm formation in *Escherichia coli* during exponential phase of growth / F.P. Corona-Izquierdo, J. Membrillo-Hernandez, // FEMS Microbiol. Lett. – 2002. – V. 211. – P. 105–110.

80. Costerton, J. W. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections / Costerton J. W., Stewart P. S., Greenberg E. P. // Science. – 1999. V. 284. – P. 1318–1322.
81. Couto, N. J Proteome Profiles of Outer Membrane Vesicles and Extracellular Matrix of *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms / N. Couto, S. R. Schooling, J. R. Dutcher, J. Barber // Proteome Res. – 2015. – V. 14. – N. 10. – P. 4207-4222.
82. Das, J. R. Changes in the biocide susceptibility of *Staphylococcus epidermidis* and *Escherichia coli* cells associated with rapid attachment to plastic surfaces / J. R. Das, M. Bhakoo, M. V. Jones, P. Gilbert // J. Appl. Microbiol. – 1998. – V. 84. – P. 852–858.
83. Davies, D.G. The involvement of cell-to-cell signals in the development of a bacterial biofilm / D.G. Davies, M.R. Parsek, J.P. Pearson, B.H. Iglewski, J.W. Costerton, and Greenberg, E.P. // Science. – 1998. – V. 280. – P. 295–298.
84. Davies, D. Understanding biofilm resistance to antibacterial agents / D. Davies // Nat. Rev. Drug Discov. – 2003. – V. 2. – P. 114–122.
85. Davin-Regli, A. *Enterobacter gergoviae* and the prevalence of efflux in parabens resistance / A. Davin-Regli, R. Chollet, J. Bredin, J. Chevalier, F. Lepine, J. M. Pagès. // J. Antimicrob. Chemother. – 2006. – V. 57. – P. 757–60.
86. De Boer G. J. Molecular genetic analysis of enoyl-acyl carrier protein reductase inhibition by diazaborine / G. J. De Boer, G. J. Pielage, H. J. Nijkamp, A. R. Slabas, J. B. Rafferty, C. Baldock, D.W. Rice, A.R. Stuitje // Mol. Microbiol. – V. 31. – N. 2. – P. 443–450
87. De Kievit, T. R. Quorum-sensing genes in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms: their role and expression patterns / T. R. De Kievit, R. Gillis, S. Marx, C. Brown, B. H. Iglewski // Appl. Environ. Microbiol. – 2001. – V. 67. – P. 1865–1873.
88. Demple, B. Redox signaling and gene control in the *Escherichia coli* soxRS oxidative stress regulon – a review / B. Demple // Gene. – 1996. – V. 179. – P. 53–57.

89. Denyer, S. P. Mechanisms of action of antibacterial biocides / S. P. Denyer, // Int. Biodeterior. Biodegrad. – 1995. V. 36. – P. 227–245.
90. Denyer, S. P. Cellular impermeability and uptake of biocides and antibiotics in Gram-negative bacteria / S. P. Denyer, J-Y. Maillard // J Appl. Microbiol. – 2002. – V. 92. – P. 35–45.
91. Duan K. Environmental regulation of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 Las and Rhl quorum-sensing systems / K. Duan, M.G. Surette // J. Bacteriol. – 2007. – V. 189. – N. 13. – P. 4827–4836.
92. Dukan S. Hypochlorous acid stress in *Escherichia coli*: resistance, DNA damage, and comparison with hydrogen peroxide stress / S. Dukan, D. Touati // J. Bacteriol. – 1996. – V. 178. – P. 6145–6150.
93. EFSA. Assessment of the possible effect of the four antimicrobial treatment substances on the emergence of antimicrobial resistance. Scientific Opinion of the Panel on Biological Hazards; 2008a. Published: 2 April 2008; Adopted: 6 March 2008. Available at URL: http://www.efsa.europa.eu/EFSA/efsa_locale-1178620753812_1178697425124.htm (accessed 25 February 2009).
94. Ferrarese, L., Paglia R., Ghirardini A. Bacterial resistance in cosmetics industrial plant: connected problems and their solution / L. Ferrarese, R. Paglia, A. Ghirardini // Ann. Microbiol. – 2003. – V. 53. – P. 477–490.
95. Finelli, A. Use of In-Biofilm Expression Technology To Identify Genes Involved in *Pseudomonas aeruginosa* Biofilm Development / A. Finelli, C. V. Gallant, K. Jarvi, and L. L. Burrows // J. Bacteriol. – 2003. – V. 185. – P. 2700–2710.
96. Flores, M. Deterioration of raw materials and cosmetic products by preservative resistant microorganisms / M. Flores, M. Morillo, M. L. Crespo // Int. Biodeterior. Biodegrad. – 1997. – V. 40. – P. 157–160.
97. Fraud S. Effects of ortho-phthalaldehyde, glutaraldehyde and chlorhexidine diacetate on *Mycobacterium chelonae* and *M. abscessus* strains with modified permeability / S. Fraud, A. C. Hann, Maillard J-Y, A. D. Russell. // J. Antimicrob. Chemother. – 2003. – V. 51. – P. 575–584.

98. Fuhrmann, G. F. The mechanism of the partial inhibition of fermentation in yeast by nickel ions / G. F. Fuhrmann, A. Rothstein. // *Biochim. Biophys. Acta.* – 1968. – V. 163. – P. 331–338.
99. Gajadhar, T. Microbial contamination of disinfectants and antiseptics in four major hospitals in Trinidad / T. Gajadhar, A. Lara, P. Sealy, A.A. Adesiyun. // *Rev. Panam. Salud. Publica.* – 2003. – V. 14. – N. 3. – P. 193–200.
100. Galperin, M.Y. Bacterial signal transduction network in a genomic perspective / M.Y. Galperin // *Environ. Microbiol.* – 2004. – V. 6. – N. 6. – P. 552–562.
101. Gastmeier, P. Risk factors for death due to nosocomial infection in intensive care unit patients: findings from the Krankenhaus Infektions Surveillance System / P. Gastmeier, D. Sohr, C. Geffers, M. Behnke, H. Rüdén // *Infect. Control. Hosp. Epidemiol.* - 2007. – V. 28. N. 4. – P. 466–472.
102. Gilbert, P. Potential Impact of Increased Use of Biocides in Consumer Products on Prevalence of Antibiotic Resistance / P. Gilbert, A. J. McBain // *Clin. Microbiol. Rev.* – 2003. – V. 16. – P. 189–208.
103. Gilbert, P. Formation of microbial biofilm in hygienic situations: a problem of control / P. Gilbert, A. J. McBain, A. H. Rickard. // *Int. Biodeter. Biodegrad.* – 2003. – V. 51. – P. 245–248.
104. Gilbert, P. Cationic antiseptics: diversity of action under a common epithet / P. Gilbert, L. E. Moore. // *J. Appl. Microbiol.* – 2005. – V. 99. – P. 703–715.
105. Gilmore, K.S Growth, development, and gene expression in a persistent *Streptococcus gordonii* biofilm / K.S. Gilmore, P. Srinivas, D.R. Akins, K.L. Hatter, M.S. Gilmore, // *Infect. Immun.* – 2003. – V. 71. – P. 4759–4766.
106. Giwercman, B. Induction of beta-lactamase production in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm / B. Giwercman, E.T. Jensen, N. Hoiby, A. Kharazmi, J.W. Costerton // *Antimicrob. Agents Chemother.* – 1991. – V. 35. – P. 1008–1010.
107. Gloag, E. S. Self-organization of bacterial biofilms is facilitated by extracellular DNA / E. S. Gloag, L. Turnbull, A. Huang, P. Vallotton, H. Wang, Nolan, L. M. // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* – 2013. – V. 110. – P. 11541–11546.

108. Gomez Escalada, M. Triclosan inhibition of fatty acid synthesis and its effect on growth of *E. coli* and *P. aeruginosa* / M. Gomez Escalada, J. L. Harwood, D. Ochs // J. Antimicrob. Chemother. – 2005. – V. 55. – P. 879–882.
109. Gorman, S. P. Uptake and media reactivity of glutaraldehyde solutions related to structure and biocidal activity / S. P. Gorman, E. M. Scott // Microbios. Lett. – 1977. – V. 5. – P. 163–169.
110. Gorman, S. P. Interaction of the *Bacillus subtilis* spore protoplast, cortex, ion-exchange and coat less forms with glutaraldehyde / S. P. Gorman, E. M. Scott, E. P. Hutchinson // J Appl. Bacteriol. – 1984. – V. 56. – P. 95–102.
111. Gottardi, W. Iodine and iodine compounds / W. Gottardi, S. S. Block // Disinfection, sterilization, and preservation. 4th ed. Lea & Febiger, Philadelphia Pa., 1991. – P. 152–166.
112. Gradel, K. O. Possible associations between *Salmonella persistence* in poultry houses and resistance to commonly used disinfectants and a putative role of mar / K. O. Gradel, L. Randall, A. R. Sayers, R. H. Davies. // Vet. Microbiol. – 2005. – V. 107. – P. 127–138.
113. Greenway, D. L. A. The intrinsic resistance of *Escherichia coli* to various antimicrobial agents requires ppGpp / D. L. A. Greenway, R. R. England // Lett. Appl. Microbiol. – 1999. – V. 29. – P. 323–326.
114. Gross, M. Key role of teichoic acid net charge in *Staphylococcus aureus* colonization of artificial surfaces / M. Gross, S.E. Cramton, F. Gotz, A. Peschel // Infect. Immun. – 2001. – V. 69. – P. 3423–3426.
115. Guérin-Méchin, L. Specific variations of fatty acid composition of *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15442 induced by quaternary ammonium compounds and relation with resistance to bactericidal activity / L. Guérin-Méchin, F. Dubois-Brissonnet, B. Heyd, J. Y. Leveau // J. Appl. Microbiol. – 1999. – V. 87. – P. 735–742.
116. Guérin-Méchin, L. Quaternary ammonium compounds stresses induce specific variations in fatty acid composition of *Pseudomonas aeruginosa* / L.

- Guérin-Méchin, F. Dubois-Brissonnet, B. Heyd, J. Y. Leveau // *Inter. J. Food Microbiol.* – 2000. – V. 55. – P. 157–159
117. Haaber, J. Planktonic Aggregates of *Staphylococcus aureus* Protect against Common Antibiotics/J. Haaber, M. Thorup Cohn, D. Frees, T. J. Andersen, H. Ingmer // *PloS One.* – 2012. –V.7. – N.7.
118. Hall-Stoodley, L. Establishment of experimental biofilms using the modified robbins device and flow cells / L. Hall-Stoodley, J. Rayner, P. Stoodley, H. Lappin-Scott // *Meth. Biotechn.* – 1999. – V. 12. – P. 307–318.
119. Handbuch der Antiseptik: in 3 Bd / - Berlin: Veb. Verlag Volk und Gesundheit. – 2006. – P. 1984 – 1987.
120. Hancock, V. Biofilm formation by asymptomatic and virulent urinary tract infections *Escherichia coli* strains / V. Hancock, L. Ferrieres, P. Klemm // *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* – 2007. – V. 51. – P. 212–219.
121. Harmsen, M. An update on *Pseudomonas auruginosa* biofilm formation, tolerance, and dispersal / M. Harmsen, L. Yang, S.J. Pamp, T. Tolker-Nielsen // *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* – 2010. – V. 59, N. 3. – P. 253–268.
122. Harrison, J.J. Persister Cells mediate tolerance to metal oxyanions in *Escherichia coli* / J. J. Harrison, H. Ceri, N. J. Roper, E. A. Badry // *Microbiol.* – 2005. – V. 151. – P. 3181–3195.
123. Harold, F. M. Dio 9 and chlorhexidine. Inhibition of membrane bound ATPase and of cation transport in *Streptococcus faecalis*. / F. M. Harold, J. R. Baarda, C. Baron, A. Abrams // *Biochim. Biophys. Acta.* – 1969. – V. 183. – P. 129–136.
124. Hawkey, P.M. Principles and practice of disinfection, preservation and sterilization / P. M. Hawkey, A. P. Fraise, P. A. Lambert, J. Y. Maillard // 4th ed. Oxford: Blackwell Scientific Publication. – 2004. – P.191–204.
125. Heath, R. J. Mechanism of triclosan inhibition of bacterial fatty acid synthesis / R. J. Heath, J. R. Rubin, D. R. Holland, E. Zhang, M. E. Snow, C. O. Rock // *J. Biol. Chem.* – 1999. – V. 274. – P. 100–104.

126. Heath, R. J. Inhibition of the *Staphylococcus aureus* NADPH-dependent Enoyl-acyl carrier protein reductase by triclosan and hexachlorophene / R. J. Heath, J. Li, G. E. Roland, C. O. Rock. // J. Biol. Biochem. – 2000. – V. 275. – P. 4654–4659.
127. Heilmann, C. Molecular basis of biofilm formation by *Staphylococcus epidermidis*. In: Medical Implications of Biofilms / C. Heilmann, M. Wilson, D. Devine // Eds. – 2003. – V. 1. – P. 110–135.
128. Heir, E. Resistance to quaternary ammonium compounds in *Staphylococcus* spp. Isolated from the food industry and nucleotide sequence of the resistance plasmid pST827 / Heir, E., G. Sundheim, and A. L. Holck. // J. Appl. Bacteriol. – 1995. – V. 79. – P. 149–156.
129. Heir, E. The qacG gene on plasmid pST94 confers resistance to quaternary ammonium compounds in *staphylococci* isolated from the food industry / E. Heir, G. Sundheim, A. L. Holck. // J. Appl. Microbiol. – 1999. – V. 86. – P. 378–388.
130. Hoiby, N. Antibiotic resistance of bacterial biofilms / N. Høiby, T. Bjarnsholt, M. Givskov, S. Molin, O. Ciofu // Int. J. Antimicrob. Agents. – 2010. – V. 35. – N. 4. – P. 322–332.
131. Hubner, R. Kramer Efficacy of Chlorhexidine, Polihexanide and Tissue-Tolerable Plasma against *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms Grown on Polystyrene and Silicone Materials / R. Hubner, I. Matthes, C. Koban, G. Randler, C. Muller, E. Bender, T. Kindel, A. Kocher // Skin Pharmacol. Physiol. – 2010. VC. 23.N. 1. – P. 28–34.
132. Hufnagel, M. A putative sugar-binding transcriptional regulator in a novel gene locus in *Enterococcus faecalis* contributes to production of biofilm and prolonged bacteremia in mice / M. Hufnagel, S. Koch, R. Creti, L. Baldassarri, J. Huebner, // J. Infect. Dis. – 2004. – V. 189. – P. 420–430.
133. Hugo, W. B. Studies on the mode of action of the phenolic antibacterial agent Fenticlor against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. III. The effect of Fenticlor on the metabolic activities of *Staphylococcus aureus* and

- Escherichia coli* / W. B. Hugo, S. F. Bloomfield // J. Appl. Bacteriol. – 1971. – V. 34. – P. 579–591.
134. Hugo, W B. The degradation of preservatives by microorganisms / W. B. Hugo // Int. Biodeterior. Biodegrad. – 1991. – V. 27. – P. 185–194.
135. Hugo, W.B. Principles and Practice of Disinfection, Preservation and Sterilization / W.B. Hugo, A. D. Russell, W. B. Hugo, G. A. J. Ayliffe // Oxford: Blackwell. – 1992. – P. 187–210.
136. Hunt, S.M. Hypothesis for the role of nutrient starvation in biofilm detachment / S. M. Hunt // Appl. Environ. Microbiol. – 2004. – V. 70. – P. 7418–7425.
137. Hussain, M. 140-kilodalton extracellular protein is essential for the accumulation of *Staphylococcus epidermidis* strains on surfaces / M. Hussain, M. Herrmann, C. Eiff, F. Perdreau-Remington, G. Peters, // Infect. Immun. – 1997. – V. 65. – P. 519–524.
138. Idone, V. Effect of an orphan response regulator on *Streptococcus mutans* sucrose-dependent adherence and cariogenesis / V. Idone, S. Brendtro, R. Gillespie, S. Kocaj, E. Peterson, M. Rendi, W. Warren, S. Michalek, K. Krastel, D. Cvitkovitch, G. Spatafora // Infect. Immun. – 2003. – V. 71. – P. 4351–4360.
139. Irizzary, L. Reduced susceptibility of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* to cetylpyridinium chloride and chlorhexidine / L. Irizzary, T. Merlin, J. Rupp, J. Griffith // Chem. – 1996. – V. 42. – P. 248–252.
140. Jackson, D. W. Biofilm formation and dispersal under the influence of the global regulator CsrA of *Escherichia coli* / D. W. Jackson, K. Suzuki, L. Oakford, J. W. Simecka, M. E. Hart, T. and Romeo, // J. Bacteriol. – 2002. – V. 184. – P. 290–301.
141. Jagath, L. Bioluminescent imaging of bacterial biofilm infections *in vivo* / L. Agath // Meth. Mol. Biol. – 2008. – V. 431. – P. 225–239.
142. Jakobsen, T.H. Qualitative and quantitative determination of quorum sensing inhibition *in vitro*. Quorum sensing: methods and protocols / T.H. Jakobsen // Methods in Molecular Biol. – 2011. – V. 692. – P. 253–263.

143. Jennifer, A. Regulation of *Acinetobacter baumannii* biofilm / A. A. Jennifer, J. Gaddy, A. Actis // Formation Future Microbiol. – 2009. – V. 4. – P. 273–278.
144. Karatzas, K, A. Prolonged treatment of *Salmonella enterica serovar Typhimurium* with commercial disinfectants selects for multiple antibiotic resistance, increased efflux and reduced invasiveness / K. A. Karatzas, M. A. Webber, F. Jorgensen, M. J. Woodward, L. J. Piddock, T. J. Humphrey // J. Antimicrob. Chemother. – 2007. – V. 60. – P. 947–955.
145. Kjaergaard, K. Antigen 43 facilitates formation of multispecies biofilms / K. Kjaergaard, M.A. Schembri, C. Ramos, S. Molin, and P. Klemm // Environ. Microbiol. – 2000. – V. 2. – P. 695–702.
146. Klasen, H. J. A historical review of the use of silver in the treatment of burns / H. J. Klasen, // II Renewed interest for silver. Burns. - 2000. – V. 26. – P. 131–138.
147. Knobloch, J.K. Biofilm formation by *Staphylococcus epidermidis* depends on functional RsbU, an activator of the sigB operon: differential activation mechanisms due to ethanol and salt stress / J.K. Knobloch, K. Bartscht, A. Sabottke, H. Rohde, H.H. Feucht, D. Mack // J. Bacteriol. – 2001. – V. 183. – P. 2624–2633.
148. Knobloch, J.K. Establishment of an arbitrary PCR for rapid identification of Tn917 insertion sites in *Staphylococcus epidermidis*: characterization of biofilm-negative and nonmucoid mutants / J.K. Knobloch, , M. Nedelmann, , K. Kiel, , K. Bartscht, M.A. Horstkotte, S. Dobinsky, H. Rohde, D. Mack, // Appl. Environ. Microbiol. – 2003. – V. 69. – P. 5812–5818.
149. Krasilnikov A.P. Klinische Bedeutung der Empfindlichkeit nosokomialer bakteriellen Krankheitserreger gegen Antiseptika / A. P. Krasilnikov, A. A. Adarchenko, E. I. Gudkova // Klinische Antiseptik.-Berlin, 1992. – Kap. – V. 21. – P. 401 – 404.

150. 149. Kruse, W. C. Halogen action on bacteria, viruses and protozoa, In Proceedings of the National Special Conference on Disinfection / W. C. Kruse // ASCE, Amherst, Mass, 1970. – P. 113–137.
151. 150. Krzyściak, W. The virulence of *Streptococcus mutans* and the ability to form biofilms / W. Krzyściak, A. Jurczak, D. Kościelniak, B. Bystrowska, A. Skalniak // Clin. Microbiol. Infect. Dis. – 2014. – V. 33. – N. 4. – P. 499–515.
152. 151. Lambert, R. J. Principles and practice of disinfection, preservation and sterilization. 4th ed. Oxford: Blackwell Science / R. J. Lambert. A. P. Fraise, P. A. Lambert, J. Y. Maillard. // Evaluation of antimicrobial efficacy. – 2004. – P. 345–360.
153. 152. Landini, P. Molecular mechanisms of compounds affecting bacterial biofilm formation and dispersal / P. Landini, D. Antoniani, J. G. Burgess, R. Nijland // Appl. Microbiol. Biotechnol. – 2010. – V. 86. – N. 3. – P. 813–823.
154. 153. Lunsford, R.D. Natural genetic transformation in *Streptococcus gordonii*: comX imparts spontaneous competence on strain wicky / R.D. Lunsford, J. London, // J. Bacteriol. – 1996. – V. 178. – P. 5831–5835.
155. 154. Lefebvre, M. D. Construction and Evaluation of Plasmid Vectors Optimized for Constitutive and Regulated Gene Expression in *Burkholderia cepacia* Complex Isolates / M. D. Lefebvreand, M.A. Valvano // Appl. Envir. Microbiol. – 2002. – V. 68. – P. 5956–5964
156. 155. Leelaporn, A. Multidrug resistance to antiseptics and disinfectants in coagulase-negative *staphylococci* / A. Leelaporn, I. T. Paulson, J. M. Tennent, T. G. Littlejohn, R. A. Skurray // J. Med. Microbiol. – 1994. – V. 40. – P. 214–220.
157. 156. Leive, L. The barrier function of the Gram-negative envelope / L. Leive, N. Y. Ann. // Acad. Sci. – 1974. – V. 235. – P. 109–129.
158. 157. Levy, C. W. Molecular basis of triclosan activity / C. W. Levy, A. Roujeinikova, S. Sedclnikova, P. J. Baker, R. Stuitje, A. R. Slabastl. // Nature. – 1999. – V. 398. – P. 384–385.
159. 158. Levy C.W. A study of the structure-activity relationship for diazaborine inhibition of *Escherichia coli* enoyl-ACP reductase/ C. W. Levy, C.

- Baldock, A. J. Wallace, S. Sedelnikova, R. C. Viner, J. M. Clough, A. R. Stuitje, A. R. Slabas, D. W. Rice, J. B. Rafferty // *J. Mol. Biol.* – 2001 . – V. 09. – N 1. – P. 171–180.
160. 159. Levy, S. B. Antibiotic and antiseptic resistance: impact on public health / S. B. Levy // *Pediatr. Infect. Dis. J.* – 2000. – V. 19. – N. 10. – P. 120–122.
161. 160. Levy, S. B. Active efflux, a common mechanism for biocide and antibiotic resistance / S. B. Levy // *J. Appl. Microbiol.* – 2002. – V. 92. – P. 65–71.
162. 161. Lewis, K. Multidrug tolerance of biofilms and persister cells / K. Lewis // *Curr. Top. Microbio. Immunol.* – 2008. – V. 322. – P. 107–131.
163. 162. Li, Y.H. A quorum-sensing signaling system essential for genetic competence in *Streptococcus mutans* is involved in biofilm formation / Y.H. Li, N.Tang, M.B. Aspiras, P.C. Lau, J.H. Lee, R.P. Ellen, D.G. Cvitkovitch // *J. Bacteriol.* – 2002. – V. 184. – P. 2699–2708.
164. 163. Li, B. A one-step matrix application method for MALDI mass spectrometry imaging of bacterial colony biofilms / B. Li, T. J. Comi, T. Si, S. J. Dunham, J. V. Sweedler // *J. Mass Spectrom.* – 2016.
165. 164. Liao, S. Y. Russell. Interaction of silver nitrate with readily identifiable groups: relationship to the antibacterial action of silver ions / S. Y. Liao, D. C. Read, W. J. Pugh, J. R. Furr, A. D. Russell. // *Lett. Appl. Microbiol.* – 1997. – V. 25. – P. 279–283.
166. 165. Littlejohn, T. G. Substrate specificity and energetics of antiseptic and disinfectant resistance in *Staphylococcus aureus* / T. G. Littlejohn, I. P. Paulsen, M. Gillespie, J. M. Tennent, M. Midgely, I. G Jones // *FEMS Microbiol. Lett.* - 1992. – V. 95. – P. 259–266.
167. 166. Loo, C.Y. Oral Streptococcal genes that encode biofilm formation. In: *Medical Implications of Biofilms*/ C.Y. Loo, M. Wilson, D. Devine // *J. Bacteriol.* – 2003. – №. 1. – P. 212–227.

168. 167. Loomfield, S. F. Chlorine and iodine formulations, Handbook of disinfectants and antiseptics / S. F. Loomfield, J. M. Ascenzi // Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y. 1996. – P. 133–158.
169. 168. Lopez, D. Biofilms / D. Lopez, H. Vlamakis, R. Kolter // Cold Spring Harb. Perspect. Biol. – 2010. – V. 2. – N. 7. – P. 522–528.
170. 169. Longworth, A. R. Chlorhexidine: inhibition and destruction of the bacterial cell / A. R. Longworth, W. B. Hugo // New York, N.Y: Academic Press. – 1971. – V. 95–106.
171. Luo, L. M. Enhancing pili assembly and biofilm formation in *Acinetobacter baumannii* ATCC19606 using non-native acyl-homoserine lactones / L. M. Luo , L. J. Wu , Y. L. Xiao , D. Zhao , Z. X. Chen , M. Kang , Q. Zhang , Y. Xie // BMC Microbiol. – 2015. – V. 15. – N. 1. – P. 62.
172. D. Efflux pumps and drug resistance in Gram-negative bacteria / D. Ma, D. N. Cook, J. E. Hearst, H. Nikaido // Trends. Microbiol. – 1994. – V. 2. – P. 489–493.
173. Ma, Q. Engineering a novel c-di-GMP-binding protein for biofilm dispersal / Q. Ma, Z. Yang, M. Pu, W. Peti, T. K. Wood // Environ. Microbiol. – 2011. – V. 13. – N.3. – P. 631–642.
174. Madhu Sharma Pt. B. D. Biofilms: Microbes and Disease / Madhu Sharma Pt.B.D. Sarita Yadav // The Brazilian Journal of Infectious Diseases. – 2008. – V. 12. – N. 6. – P. 526–530.
175. Maillard, J-Y. Bacterial resistance to biocides in the health care environment: should it be of genuine concern? / J. Y. Maillard // J. Hosp. Infect. – 2007. – V. 65. – N. 2. – P. 60–72.
176. Maira-Litrán, T. An evaluation of the potential of the multiple antibiotic resistance operon (*mar*) and the multidrug efflux pump *acrAB* to moderate resistance towards ciprofloxacin in *Escherichia coli* biofilms / T. Maira-Litrán // J. Antimicrob. Chemother. – 2000. – V. 45. – P. 789–795.

177. Mavri A. Developmen to f antimicrobial resistance in *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* adapted to biocides/ A. Mavri, S. Smole Možina // Int. J Food Microbiol.-2013. – V. 160. – N. 3. – P.304–312.
178. McDonnell G. Antiseptics and disinfectants: activity, astion and resistance / G. McDonnell, A. D. Russell // Clin. Microbiol. Rev. – 1999. – P. 147–179.
179. McHugh G. L. *Salmonella typhimurium* resistant to silver nitrate, chloramphenicol and ampicillin / G. L. McHugh, R. C. Moellering, C. C. Hopkins // Lancet. –1975. – P. 235–40.
180. McKeegan, K. S. The structure and function of drug pumps: an update / K. S. McKeegan, M. I. Borges-Walmsley, A. R. Walmsley // Trends Microbiol. – 2003. – V. 11. – P. 21–29.
181. McMurry, L. M. Triclosan targets lipid synthesis / L. M. McMurry, M. Oethinger, S. B. Levy // Nature. – 1998. – V. 394. – P. 531–532.
182. McNeil, M. R. Structure, function and biogenesis of the cell envelope of *mycobacteria* inrelation to bacterial physiology, pathogenesis and drug resistance; some thoughts and possibilities arising from recent structural information / M. R. McNeil, P. J. Brennan // Res. Microbiol. – 1991. – V. 142. – P. 451–463.
183. Merritt, J. Mutation of luxS affects biofilm formation in *Streptococcus mutans* / J. Merritt, F. Qi, S.D. Goodman, M.H. Anderson, W. Shi // Infect. Immun. – 2003. – V. 71. – P. 1972–1979.
184. Merritt, J. H. Growing and analyzing static biofilms / J. H. Merritt // Cur. Prot. Microbiol. – 2011. – V. 3. P. 36–39.
185. Meyer, B. Does microbial resistance or adaptation to biocides create a hazard in infection prevention and control? / B. Meyer, B. Cookson // J. Hosp. Infect. – 2010. – V. 76. – P. 200–205.
186. Moken, M. C. Selection of multiple-antibiotic-resistant (Mar) mutants of *Escherichia coli* by using the disinfectant pine oil: Roles of the mar and acrAB loci / M. C. Moken, L. M. McMurry, S. B. Levy // Antimicrob. Agents Chemother. – 1997. – V. 41. – P. 2770-2772.

187. Mokgatla, R. M. Isolation of *Salmonella* resistant to hypochlorous acid from a poultry abattoir / R. M. Mokgatla, V. S. Brözel, P. A. Gouws // *Lett. Appl. Microbiol.* – 1998. – V. 27. – P. 379–382.
188. Mokgatla, R. M. Mechanisms contributing to hypochlorous acid resistance of a *Salmonella* isolate from a poultry-processing plant / R. M. Mokgatla, P. A. Gouws, V. S. Brözel // *J. Appl. Microbiol.* – 2002. – V. 92. – P. 566–573.
189. Morita, Y. Induction of mex CD-oprJ operon for a multidrug efflux pump by disinfectants in wild-type *Pseudomonas aeruginosa* PAOI / Y. Morita, T. Murata, T. Mima, S. Shiota, T. Kuroda, T. Mizushima // *Antimicrob. Chemother.* – 2003. – V. 51. – P. 991–994.
190. Moyer, C. A. Treatment of large burns with 0.5% silver nitrate solution / C. A. Moyer, L. Brentano, D. L. Gravens // *Arch. Surg.* – 1965. – V. 90. – P. 812–867.
191. Mowbray, S. The Antibacterial Activity of Chlorophyll / S. Mowbray // *Br. Med. J.* – 1957; - V. 1. – N. 5013. – P. 268–270.
192. Munton, T. J. Aspects of the action of glutaraldehyde on *Escherichia coli* / T. J. Munton, A. D. Russell // *J. Appl. Bacteriol.* – 1970. – V. 33. – P. 410–419.
193. Nagel, J. L. Antimicrobial Stewardship for the Infection Control Practitioner / J. L. Nagel, K. S. Kaye, K. L. LaPlante, J. M. Pogue // *Infect. Dis. Clin. North. Am.* – 2016. – V.30. – N. 3. – P. 771-784.
194. Nance, W. C. A high-throughput microfluidic dental plaque biofilm system to visualize and quantify the effect of antimicrobials / W. C. Nance, S. E. Dowd, D. Samarian, J. Chludzinski, J. Delli, J. Battista et al // *J. Antimicrob. Chemother.* – 2013. – N. 68. – V. 11. – P. 2550–2560.
195. Nguyen, M. H. Probing of exopolysaccharides with green fluorescence protein-labeled carbohydrate-binding module in *Escherichia coli* biofilms and flocs induced by bcsB overexpression / M. H. Nguyen, Y. Ojima, M. Sakka, K. Sakka, M. Taya // *J. Biosci. Bioeng.* – 2015. – V. 119. – N. 1. – P.121.

196. Nishino, K. Yamagushi A. Analysis of a complete library of putative drug transporter genes in *Escherichia coli* / K. Nishino, A. Yamagushi // *J. Bacteriol.* – 2001. – V. 183. – P. 5803–5812.
197. Nistico, L. Fluorescence in situ hybridization for the detection of biofilm in the middle ear and upper respiratory tract mucosa / L. Nistico // *Auditory and Vestibular Research: Methods and Protocols.* – 2008. – V. 493. – P. 191-213.
198. Norby Nielsen L. *Staphylococcus aureus* but not *Listeria monocytogenes* adapt to triclosan and adaptation correlates with increased *fabI* expression and *agr* deficiency / L.Norby Nielsen, Marianne Halberg Larsen, Sissel Skovgaard, Vicky Kastbjerg, Henrik Westh, Lone Gram, and Hanne Ingmer // *BMC Microbiol.* – 2013. V. 13. – C.177.
199. Oethinger, M. Association of organic solvent tolerance and fluoroquinolone resistance in clinical isolates of *Escherichia coli* / M. Oethinger, W. V. Kern, J. D. Goldman, S. B. Levy. // *Mol. Microbiol.* – 1998. – V. 16. – P. 45–55.
200. Ogase, H. Identification and quantitative analysis of degradation products of chlorhexidine with chlorhexidine-resistant bacteria with three-dimensional high performance liquid chromatography / H. Ogase, I. Nigai, K. Kameda, S. Kume, S. Ono // *J. Appl. Bacteriol.* – 1992. – V. 73. – P. 71–78.
201. Oie, S. Microbial contamination of antiseptics and disinfectants / S. Oie, A. Kamiya // *Am. J Infect. Control.* – 1996. – V. 24. – N. 5. – P. 389–395.
202. O'Neil, M. J. *The Merck Index - An Encyclopedia of Chemicals, Drugs, and Biologicals.* / M. J.O'Neil // Whitehouse Station, NJ: Merck and Co., Inc. – 2001.
203. O'Rourke, E. E. Contaminated iodophor in the operating room / E. O'Rourke, D. Runyan, J. O'Leary. // *Am. J. Infect. Control.* – 2003. – Vol. 31. – P. 255–256
204. O'Toole, G. A. Initiation of biofilm formation in *Pseudomonas fluorescens* WCS365 proceeds via multiple, convergent holera pathways: a genetic analysis / G. A. O'Toole, R. Kolter, // *Mol. Microbiol.* – 1998. – V. 28. – P. 449–461.

205. O'Toole, G.A. The global carbon metabolism regulator Crc is a component of a signal transduction pathway required for biofilm development by *Pseudomonas aeruginosa* / G.A. O'Toole, K.A. Gibbs, P.W. Hager, P.V. Phibbs Jr., R. Kolter, // *J. Bacteriol.* – 2000. – V. 182. – P. 425– 431.
206. O'Toole, G. A. Microtiter dish biofilm formation assay / G. A. O'Toole // *J. Vis. Exp.* – 2011. – V. 47. – P. 2437.
207. Pan, Y. Resistance of *Listeria monocytogenes* biofilms to Cookson Breidt, S. Kathariou // *Appl. Environ. Microbiol.* – 2006. – V. 72. – P. 7711v7717.
208. Patel, R. Biofilms and antimicrobial resistance / R.Patel // *Clin. Orthop. Relat. Res.* – 2005. – V. 437. – P. 41-47.
209. Piccirillo, C. Antimicrobial activity of methylene blue and to luidine blue O covalently bound to a modified silicone polymer surface / C.Piccirillo, S. Perni, J. Gil-Thomas, P. Prokopovich, M. Wilson, J. Pratten, I. P.Parkin // **J. Mater. Chem.** – 2009. – V. 19, - P. 6167v6171.
210. Pearce, H. Effect of biocides commonly used in the hospital environment on the transfer of antibiotic-resistance genes in *Staphylococcus aureus* / H. Pearce, S. Messenger, J-Y. Maillard // *J. Hosp. Infect.* – 1999. – V. 43. – P. 101– 108.
211. Piddock, LJ. Clinically relevant chromosomally encoded multidrug resistance efflux pump in bacteria / L. J. Piddock // *Clin. Microbiol. Rev.* – 2006. – 19. – P. 382–402.
212. Poole, K. Efflux pumps as antimicrobial resistance mechanisms / K. Poole // *Ann Med.* – 2007. – V. 39. – P. 162–176.
213. Potenski, CJ. Exposure of *Salmonella enteritidis* to chlorine or food preservatives increases susceptibility to antibiotics / C. J. Potenski, M. Gandhi, K. R. Matthews // *FEMS Microbiol. Lett.* – 2003. – V. 220. – P. 181–186.
214. Prigent-Combaret, C. and Lejeune, P. Monitoring gene expression in biofilms / C. Prigent-Combaret, P. Lejeune // *Methods Enzymol.* – 1999. – V. 310. – P. 56–79.

215. Prigent-Combaret, C. Developmental pathway for biofilm formation in curli-producing *Escherichia coli* strains: role of flagella, curli and colanic acid / C. Prigent-Combaret, G. Prensier, T.T. Le Thi, O. Vidal, P. Lejeune, C. Dorel, // *Environ. Microbiol.* – 2000. – V. 2. – P. 450–464.
216. Prince, H. N. Principles of viral control and transmission / H. N. Prince, D. L. Prince, R. N. Prince, S. S. Block // *Disinfection, sterilization, and preservation*, 4th ed. Lea & Febiger, Philadelphia, Pa. – 1991. – P. 411–444.
217. Princt, D.L., Prince H.N., Thraenhart O. Et al. Methodological approaches to disinfection of human *hepatitis B* virus / D.L. Princt, H.N. Prince, O. Thraenhart // *J Clinic. Microbiol.* – 1993. – N.31. – P. 3296–3304.
218. Pulvertaft, R. J. V. Bacterial lysis and antiseptics / R. J. V. Pulvertaft, G. D. Lumb. // *J. Hyg.* – 1948. – V. 46. – P. 62–64.
219. Quémard A. Enzymatic characterization of the target for isoniazid in *Mycobacterium tuberculosis* /A. Quémard, J. C. Sacchetti, A. Dessen, C. Vilcheze, R. Bittman, W. R. Jr. Jacobs, J. S. Blanchard // *Biochem.* –1995. – V. 34. – N. 26. – P. 8235–8241.
220. Rachid, S. Alternative transcription factor sigma (B) is involved in regulation of biofilm expression in a *Staphylococcus aureus* mucosal isolate / S. Rachid, K. Ohlsen, U. Wallner, J. Hacker, M. Hecker, Ziebuhr, // *J. Bacteriol.* – 2000. – V. 182. – P. 6824–6826.
221. Randall, L. P. Association between cyclohexane resistance in *Salmonella* of different serovars and increased resistance to multiple antibiotics, disinfectants and dyes // *J. Med. Microbiol.* – 2001. – V. 50. – P. 919–9124.
222. Randall, L. P. Commonly used farm disinfectants can select for mutant *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium* with decreased susceptibility to biocides and antibiotics without compromising virulence / L. P. Randall, S. W. Cooles, N. G. Ncoldham, E. G. Penuela, A. C. Mott, M. J. Woodward, L. J. V. Piddock, M. Webber // *J. Antimicrob. Chemother.* – 2007. – V. 60. – P. 1273–1280.

223. Regos, J. Investigations on the mode of action of triclosan, a broad spectrum antimicrobial agent / J. Regos, H. R. Hitz. // Zentbl. Bakteriol. Mikrobiol. Hyg. I Abt. Orig. – 1974. – V. 226. – P. 390–401.
224. Richards, R. M. E. Antimicrobial action of silver nitrate / R. M. E. Richards, // Microbios. – 1981. – V. 31. – P. 83–91.
225. Rodin V.B. Efficacy of individual biocides and synergistic combinations / V. B. Rodin, S. K. Zhigletsova, V. S. Kobelev, N. A. Akimova, V. P. Kholodenko // Int. Biodeterioration & Biodegradation. – 2005. – V. 22. – P. 239–317
226. Rouche, D. A. Efflux-mediated antiseptic gene *qacA* in *Staphylococcus aureus*: common ancestry with tetracycline and sugar transport proteins / D. A. Rouche, D. S. Cram, D. Di Bernadino, T. G. Littlejohn, R. A. Skurray // Mol. Microbiol. – 1990. – V. 4. – P. 2051–2062.
227. Ryder, M.A. Catheter-Related Infections: It's All About Biofilm / M.A. Ryder, // Topicsin Advanced Practice Nursinge Journal. – 2005. – V. 5
228. Ruppert, M. La clorhexidina en Odontología. Aspectos holera / M. Ruppert, U. Schlagenhaut // Quintessence (Ed. Española). – 2005. – V. 18. – P. 12–23.
229. Russell, A. D. Bactericidal and bacteriostatic activity of glutaraldehyde and its interaction with lysine and proteins / A. D. Russell, T. J. Munton // Microbios. – 1974. – V. 11. – P.147–152.
230. Russell, A. D. Antibacterial activity of chlorhexidine / A. D. Russell, M. J. Day. // J. Hosp. Infect. – 1993. – V. 25. – P. 229–238.
231. Russell, A. D. Biocides: mechanisms of antifungal action and fungal resistance / A. D. Russell, J. R. Furr // Sci. Prog. – 1996. – V. 79. – P. 27–48.
232. Russell, A. D. Activity of biocides against *mycobacteria* / A. D. Russell // J. Appl. Bacteriol. – 1996. – V. 81. – P. 87–101.
233. 230. Russell AD, Mc Donnell G. Concentration: a major factor in studying biocidal action / A. D. Russell, G. Mc Donnell // J. Hosp. Infect. – 2000. – V. 44. – P. 1-3

234. 231. Russell, A.D. Biocides and pharmacologically active drugs as residues and in the environment: is there a correlation with antibiotic resistance? / A.D. Russell // *Am. J. Infect. Control.* – 2002. – V. 30. – N. 8. – P. 495–498
235. Russell, A.D. Antibiotic and biocide resistance in bacteria: comments and conclusions / A.D. Russell // *J. of Appl. Microbiol. Symposium Supplement.* – 2002. – V. 92. – P. 171–173.
236. 233. Sánchez, P. The biocide triclosan selects *Stenotrophomonas maltophilia* mutants that overproduce the SmeDEF multidrug efflux pump / P. Sánchez, J. F. Linares, E. Moreno, J. L. Martinez // *Antimicrob. Agents Chemother.* – 2005. – V. 49. – P.781–782.
237. Sandoe, J. Measurement of ampicillin, vancomycin, linezolid and gentamicin activity against enterococcal biofilms / J. Sandoe // *J. of Antimicrob. Chem.* – 2006. – V. 57. – P. 767–70.
238. 235. Sasatsu, M., Shimizu K., Noguchi N. & Kono M. Triclosan-resistant *Staphylococcus aureus* / M. Sasatsu, K. Shimizu, N. Noguchi M. Kono // *Lancet.* – V. 1993. – V. 341. – P. 756.
239. 236. Sauer, K. Characterization of nutrient-induced dispersion in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 biofilm / K. Sauer, M. C. Cullen, A. H. Rickard, L. A. Zeef, D. G. Davies, P. Gilbert, // *J. Bacteriol.* – 2004. – V. 186. – P. 7312–7326.
240. Savage, C. A. A new bacteriostat for skin care products / C. A. Savage // *Drug Cosmet. Ind.* – 1971. – V. 109. – P. 36-39. – P. 161–163.
241. Seaman, P. Small-colony variants: a novel mechanism for triclosan resistance in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* / P. Seaman, D. Ochs, M. J. Day // *J. antimicrob. Chemother.* – 2007. – V. 59. – P. 43–50.
242. Seker, S. The effects of biofilm thickness on biofilm density and substrate consumption rate in a differential fluidized bed biofilm reactor (DFBBR) / S. Seker // *J. Biotech.* – 1995. – V. 41. – P. 39–47.
243. Serra Diego, O. The green tea polyphenol EGCG inhibits *E. coli* biofilm formation by impairing amyloid curli fibre assembly and downregulating the

- biofilm regulator CsgD via the r E –dependent sRNA RybB / Diego O. Serra, Franziska Mika, Anja M. Richter, Regine Hengge // *Mol. Microbiol.* – 2016. – V. 101. – N. 1. – P. 136–151
244. Shah K.D. Specialized persister cells and the mechanism of multidrug tolerance in *Escherichia coli* / K.D. Shah, A.N. Spoering, K.K. Lewis // *J. Bacteriol.* – 2004. – V. 186. – P. 8172–8180.
245. Sheldon, A. T. Antiseptic “resistance”: real or perceived threat? / A. T. Sheldon // *Clin. Infect. Dis.* – 2005. – V. 40. – P. 1650–1656.
246. Sintim, H.O. Paradigm shift in discovering next-generation anti-infective agents: targeting quorum / H.O. Sintim // *Future Med. Chem.* – 2010. – V. 2. – N. 6. – P. 1005–1035.
247. Slater-Radosti C. Biochemical and genetic characterization of the action of triclosan on *Staphylococcus aureus* / C. Slater-Radosti, G. Van Aller, R. Greenwood, R. Nicholas, P. M. Keller, W. E. Jr. DeWolf, F. Fan, D. J. Payne, D. D. Jaworski // *J. Antimicrob. Chemother.* – 2001. – V. 48. – N. 1. – C. 1–6.
248. 245. Smith, K. Efficacy of common hospital biocides with biofilms of multi-drug resistant clinical isolates / K. Smith, I. S. Hunter // *J. Med. Microbiol.* – 2008. – V. 57. – P. 966–973
249. Sponza, D.T. Investigation of extracellular polymer substances (EPS) and physicochemical properties of different activated sludge flocs under steady-state conditions / D.T. Sponza // *Enzyme Microb. Technol.* – 2003. – V. 32. – P. 375–385.
250. 247. Steven, S. B. Genes Involved in Formation of Structured Multicellular Communities by *Bacillus subtilis* / Steven S. B., José Eduardo González-Pastor, Etienne Dervyn, S. Dusko Ehrlich, Richard Losick, and Roberto Kolter. // *J. Bacteriol.* – 2004. – V. 186. – N. 12. – P. 3970–3979.
251. 248. Stewart M. J. Structural basis and mechanisms of enoyl reductase inhibition by triclosan / M. J. Stewart, S. Parikh, G. Xiao, P. J. Tonge, C. Kisker // *J. molec. Biol.* – 1999. – V. 290. – P. 859–865.

252. Stickler DJ. Chlorhexidine resistance in *Proteus mirabilis* / D. J. Stickler // Clin. Pathol. – 1974. – V. 27. – N. 4. – P. 284-287.
253. 250. Stickler, D. J. Intrinsic resistance of Gram-negative bacteria / D. J. Stickler, A. P. Fraise, P. A. Lambert, J-Y. Maillard // Principles and Practice of Disinfection, Preservation and Sterilization 4th edn. Oxford: Blackwell Scientific Publication. – 2004. – P.154–169.
254. Su, C.C. The Cus efflux system removes toxic ions via a methionine shuttle / C. C. Su, F. Long, E. W. Yu // Protein Sci. – 2011. – V. 20. – P. 6–18.
255. 252. Sutherland, I. W. The biofilm matrix—an immobilized but dynamic microbial environment / I. W. Sutherland // Trends. Microbiol. – 2001. – V. 9. – P. 222–227.
256. Svensater, G. Protein expression by planktonic and biofilm cells of *Streptococcus mutans* / G. Svensater, J. Welin, J.C. Wilkins, D. Beighton, I.R. Hamilton // FEMS Microbiol. Lett. – 2001. – V. 205. – P. 139–146.
257. Tattawasart, U. Outer membrane changes in *Pseudomonas stutzeri* strains resistant to chlorhexidine diacetate and cetylpyridinium chloride / U. Tattawasart, A. C. Hann, J-Y. Maillard, J. R. Furr, A. D. Russell // Int. J. Antimicrob. Agents. – 2000. – V. 16. – P. 233–238.
258. 255. Tenke, P. The role of biofilm infection in urology / P. Tenke, B. Kovacs, J. M. Ackel, E. Nagy // World Journal of Urology. – 2006. – V. 24. – P. 13–20.
259. The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 4.0. – 2014. – <http://www.eucast.org>
260. Thelin, K. Toxin-coregulated pilus, but not mannose-sensitive hemagglutinin, is required for colonization by *Vibrio cholera* O1 El Tor biotype and O139 strains / K. H. Thelin, and R. K. Taylor // Infect. Immun. – 1996. – V. 64. – P. 2853–2856.
261. 258. Thomas John C. A Fast CTAB Method of Human DNA Isolation for Polymerase Chain Reaction Applications / John C. Thomas, Rami Khoury, Chris

- K. Neeley, Ann M. Akroush and Elizabeth C. // *Davies Biochemical Education*. – 1997. – V.25. – N.4. – P. 233–235.
262. Thomas, L. Development of resistance to chlorhexidine diacetate in *Pseudomonas aeruginosa* and the effect of ‘residual’ concentration / L. Thomas, J. Y. Maillard, R. J. Lambert, A. D. Russell // *J. Hosp. Infect.* – 2000. – V. 46. – P. 297–303.
263. 260. Toledo-Arana, A. The enterococcal surface protein, Esp, is involved in *Enterococcus faecalis* biofilm formation / A. Toledo-Arana, J. Valle, C. Solano, M.J. Arrizubieta, C. Cucarella, M. Lamata, B. Amorena, J. Leiva, J.R. Penades, I. Lasa, // *Appl. Environ. Microbiol.* – 2001. – V. 67. – P. 4538–4545.
264. Tomaras, A. P. Attachment to and biofilm formation on abiotic surfaces by *Acinetobacter baumannii*: involvement of a novel chaperone-usher pili assembly system / A. P. Tomaras, C. W. Dorsey, L. A. Actis // *Microbiol.* – 2003. – V 149. – N. 12. – P 3473–3484.
265. 262. Trautner, B.W. Role of biofilm in catheter-associated urinary tract infection / B. W. Trautner, R. O. Darouiche // *American Journal of Infection Control*. – 2004. – V. 32. – P. 177–183.
266. Tremoulet, F. A proteomic study of *Escherichia coli* O157:H7 NCTC 12900 cultivated in biofilm or in planktonic growth mode / F. Tremoulet, O. Duche, A. Namane, B. Martinie, J.C. Labadie, // *FEMS Microbiol. Lett.* – 2002. – V. 215. – P. 7–14.
267. 264. Trujillo, R. Reversible inhibition of spore germination by alcohols / R. Trujillo, N. Laible // *Appl. Microbiol.* – 1970. – V. 20. – P. 620–623.
268. Valkova, N. Hydrolysis of 4-hydroxybenzoic acid esters (parabens) and their aerobic transformation into phenol by the resistant *Enterobacter cloacae* strain EM / N. Valkova, F. Lepine, L. Valeanu, M. Dupont, L. Labrie, J. G. Bisailon // *Appl. Environ. Microbiol.* – 2001. – V. 67. P. 2404–2409.
269. 266. Vaudaux, P.E. Use of adhesion-defective mutants of *Staphylococcus aureus* to define the role of specific plasma proteins in promoting bacterial adhesion to canine arteriovenous shunts / P.E. Vaudaux, P. Francois, R.A.

- Proctor, D. McDevitt, T.J. Foster, R.M. Albrecht, D.P. Lew, H. Wabers, S.L. Cooper, // *Infect. Immun.* – 1995. – V. 63. – P. 585–590.
270. Vischer, W. A. Antimicrobial spectrum of Triclosan, a broad-spectrum antimicrobial agent for topical application / W. A. Vischer, J. Regos. // *Zentbl. Bakteriol. Mikrobiol. Hyg. Abt. Orig.* – 1973. – V. 226. – P. 376–389.
271. 268. Waaler, S. M. Effects of oral rinsing with triclosan and sodium lauryl sulfate on dental plaque formation: pilot study / S. M. Waaler, G. Rolla, K. K. Skjorland, B. Ogaard. // *Scand. J. Dent. Res.* – 1993. – V. 101. – P. 192–195.
272. Wang, J. T. Longitudinal analysis of chlorhexidine susceptibilities of nosocomial methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates at a teaching hospital in Taiwan / J. T. Wang, W. H. Sheng, J. L. Wang, D. Chen, M. L. Chen, Y. C. Chen // *J. Antimicrob. Chemother.* – 2008. – V. 62. – P. 514–517.
273. 270. Waters, L. S. Regulatory RNAs in bacteria / L. S. Waters, G. Storz, // *Cell.* – 2009. – V. 136. – P. 615–628.
274. Weber D. J. Use of Germicides in the Home and the Healthcare Setting: Is There a Relationship Between Germicide Use and Antibiotic Resistance? / D. J. Weber, W. A. Rutala // *Infect. Control. Hosp. Epidemiol.* – 2006. – V. 27. – P. 1107–1119.
275. 272. Weber D. J. Outbreaks associated with contaminated antiseptics and disinfectants / D. J. Weber, W. A. Rutala, E. E. Sickbert-Bennett // *Antimicrob. Agents. Chemother.* – 2007. – V. 51. – N. 12. – P. 4217–4224.
276. Webber, M. A. Triclosan resistance in *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium* / M. A. Webber, L. P. Randall, S. Cooles, M. J. Woodward, L. J. V. Piddock // *J. Antimicrob. Chemother.* – 2008. – V. 62. – P. 83–91.
277. 274. Wen, Z.T. Functional genomics approach to identifying genes required for biofilm development by *Streptococcus mutans* / Z.T. Wen, R.A. Burne, // *Appl. Environ. Microbiol.* – 2002. – V. 68. – P. 1196–1203.
278. Wenzel, R. P. *Providencia stuartii*, a hospital pathogen: potential factors for its emergence and transmission / R. P. Wenzel, K. J. Hunting, C. A. Osterman // *Am. J. Epidemiol.* – 1976. – V. 104. – P. 170-180.

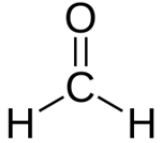
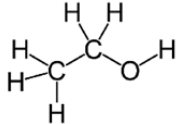
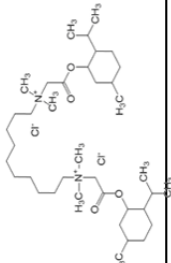
279. Whiteley, M. Gene expression in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms / M. Whiteley, M.G. Banger, R.E. Bumgarner, M.R. Parsek, G.M. Teitzel, S. Lory, E.P. Greenberg // *Nature*. – 2001. – V. 413. – P. 860–864.
280. 277. Winder, C. L. Outer membrane protein shifts in biocide-resistant *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 / C. L. Winder, I. S. Al-Adham, S. M. Abdel Malek, T. E. Buultjens, A. J. Horrocks, P. J. Collier // *J. Appl. Microbiol.* – 2000. – V. 89. – P. 289-295.
281. Wolz, C. Transcription of clumping factor A in attached and unattached *Staphylococcus aureus* in vitro and during devicerelated infection / C. Wolz, C. Goerke, R. Landmann, W. Zimmerli, U. Fluckiger // *Infect. Immun.* – 2002. – V. 70. – P. 2758–2762.
282. 279. Wright, N.E. Influence of specific growth rate and nutrient limitation upon the sensitivity of *Escherichia coli* towards chlorhexidine diacetate / N. E. Wright, P. Gilbert // *J. Appl. Bacteriol.* – 1997. – V. 62. – P. 309-314.
283. Xu H. Mechanism and Inhibition of saFabI, the Enoyl Reductase from *Staphylococcus aureus* / H. Xu, T. J. Sullivan, J. Sekiguchi, T. Kirikae, I. Ojima, C. F. Stratton, W. Mao, F. L. Rock, M. R. K. Alley, F. Johnson, S. G. Walker, P. J. Tonge // *Biochem.* – 2008. – V. 47. – N.14. – P. 4228–4236.
284. Yasuda-Yasuki, Y. Inhibition of germination of *Bacillus subtilis* spores by alcohols / Y. Yasuda-Yasuki, S. Namiki-Kanie, Y. Hachisaka, G. Chambliss, J. C. Vary // *Spores VII*. Washington, DC: American Society for Microbiology. - 1978. – P. 113–116.
285. Yerly, J. A two-step procedure for automatic and accurate segmentation of volumetric CLSM biofilm images / J. Yerly // *J. Microb. Meth.* – 2007. – V. 70. – P. 424–33.
286. Yoshida, A. Multiple *Streptococcus mutans* genes are involved in biofilm formation / A. Yoshida, H.K. Kuramitsu // *Appl. Environ. Microbiol.* – 2002. – V. 68. – P. 6283–6291.
287. Zhu, L. Triclosan resistance of *Pseudomonas aeruginosa* PA01 is due to FabV, a triclosan-resistant enoyl-acyl carrier protein reductase / L. Zhu, J. Lin, J.

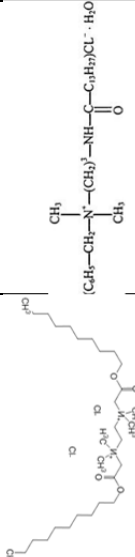
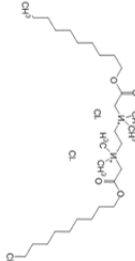
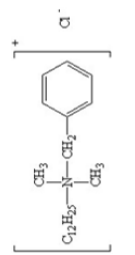
Ma, J. E. Cronan, H. Wang // *Antimicrob. Agents Chemother.* - 2009. – V. 54. – P. 689–698.

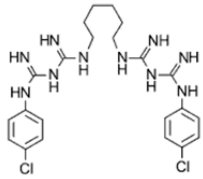
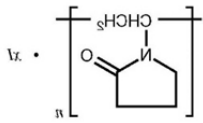
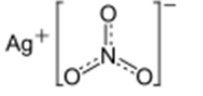
ПРИЛОЖЕНИЯ

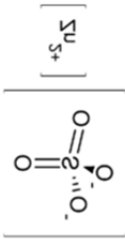
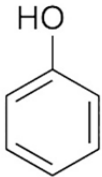
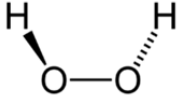
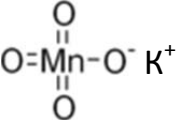
Приложение А

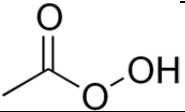
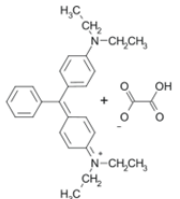
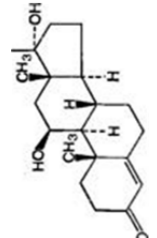
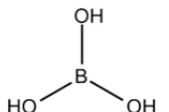
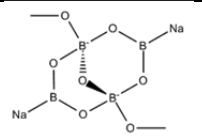
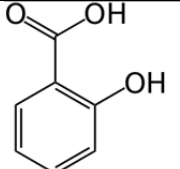
Классификация биоцидных препаратов, основные механизмы действия и применение.

Класс препарата (на основании химического строения)	Химическая формула	Механизм действия на бактериальную клетку	Основные препараты	Применение	Ссылки
Альдегиды		дегидратация бактериальной клетки, коагуляция белков	формальдегид	мытьё рук, обработка кожи, дезинфекция инструментов, спринцевание, потливость	[109, 110, 149, 192]
			метенамин (гексаметилентетрамин)	бактериальные поражения мочевыводящих путей (мочеточник, мочевой пузырь, уретра)	
			глутаральдегид	дезинфекция помещений и изделий медицинского назначения	
Спирты		дегидратация бактериальной клетки, коагуляция белков	этанол	обработка кожи, дезинфекция инструмента, обработка рук хирурга, операционного поля	[149, 267, 284]
Детергенты		разрушение мембран, разрушение межбелковых и межлипидных связей, денатурация белков, нарушение транспорта ионов и веществ, снижение активности ферментных систем клетки	бензододециния бромид	обработка операционного поля и ран	[17]

			мирамистин	обработка кожи и слизистых оболочек, ран, ожогов, профилактика венерических заболеваний. Универсальное средство личной гигиены	
		<p>адсорбция на компонентах клеточной стенки и проникновение внутрь клетки, взаимодействие с фосфолипидами цитоплазматической мембраны, разрушение и вытеканию внутриклеточных низкомолекулярных веществ, распад белков и нуклеиновых кислот и лизис клеточной стенки, вызванный аутолитическими ферментами; при суббактерицидных концентрациях - нарушение функций мембраны - повышение проницаемости, изменение осмотического давления, нарушение транспорта молекул и ионов</p>	этоний	Обработка кожи и слизистых оболочек, ран, язв	
<p>Четвертичные аммонийные соединения (ЧАС)</p>		<p>адсорбция на компонентах клеточной стенки и проникновение внутрь клетки, взаимодействие с фосфолипидами цитоплазматической мембраны, разрушение и вытеканию внутриклеточных низкомолекулярных веществ, распад белков и нуклеиновых кислот и лизис клеточной стенки, вызванный аутолитическими ферментами; при суббактерицидных концентрациях - нарушение функций мембраны - повышение проницаемости, изменение осмотического давления, нарушение транспорта молекул и ионов</p>	бензалкония хлорид	<p>обработка ран, профилактика вторичного инфицирования ран госпитальными штаммами микроорганизмов (травмы мягких и костных тканей, ожоги), местная контрацепция</p>	[178]

		через мембрану, вызывающее торможение деления клеток			
Галогены и галогенсодержащие соединения		<u>хлорсодержащие галогены</u> в водном растворе - образование хлорноватистой кислоты, которая при кислотной и нейтральной реакции распадается с освобождением кислорода и атомарного хлора, взаимодействуя с белками бактериальной клетки, что приводит к коагуляции белков, а в щелочной среде распадается до образования гипохлоридного иона, который обладает свойствами окислителя	хлоргексидин	обработка рук хирурга, операционного поля, ран, мочевого пузыря, стерилизация хирургического инструмента, профилактика венерических заболеваний	[51, 168, 193, 216, 217]
		<u>йодсодержащие галогены</u> проникают через клеточную стенку и действует на ключевые группы белков, нуклеотидов и жирных кислот, приводя к гибели клетки	йодиол	обработка слизистых оболочек, гнойных ран, инфицированных ожогов, трофических и варикозных язв	
				поливидон-йод(Бетадин)	
Соли тяжелых металлов		при низких концентрациях - блокирование сульфгидрильных групп ферментов, необходимых для жизнедеятельности бактерий, при высоких концентрациях - денатурация белков бактериальной клетки, образование альбуминатов,	ртути хлорид (Сулема)	дезинфекция белья, одежды, посуды, помещений	[17, 97, 122, 165]
			ртути амидохлорид	обработка кожи	

			серебра нитрат (Ляпис)	обработка кожи и слизистых оболочек	
			цинка сульфат	обработка слизистых оболочек, спринцевание	
			цинка оксид	кожные заболевания, опрелости у детей	
Соединения ароматического ряда		дегидратация и денатурация белков бактериальных клеток, а с повышением концентрации - осаждение белков и гибель клеток	карболовая кислота (Фенол)	дезинфекция предметов, помещений, инструментов, белья	[133, 230]
			резорцин	обработка кожи	
			биклотимол	обработка слизистых оболочек полости рта и носа	
			триклозан	в средствах по уходу за кожей как активная добавка с противомикробными и консервирующими свойствами	
Окислители		выделение молекулярного или атомарного кислорода при разложении, приводящего к окислению биологических молекул, в частности, белков бактериальных клеток, разрушение мембран, что приводит к гибели микроорганизма	водорода пероксид (Перекись водорода)	обработка слизистых оболочек, ран, дезинфекция	[17]
			калия перманганат	промывание ран, полоскание полости рта и горла, обработка язв и ожогов, спринцевание и промывание в гинекологической и урологической практике. Промывание желудка при отравлении фосфором,	

				морфином и другими алкалоидами	
			надуксусная кислота	дезинфекция	
Красители		вытеснение водорода из соединений, необходимых для обеспечения жизнедеятельности бактерий	бриллиантовый зеленый	обработка мелких повреждений кожи	[17, 209]
		действует как ко-фактор, усиливая превращение метгемоглобина в гемоглобин; в присутствии НАДФН-редуктазы, связывается с никотинамидадениндинуклеотид-фосфатом восстановленным (НАДФН), образуя лейкометиленовый синий, который восстанавливает метгемоглобин в гемоглобин.	метилтиониния хлорид (Метиленовый синий)	обработка кожи, промывание полостей, в качестве антидота при отравлении цианидами, окисью углерода, сероводородом	
Кислоты и щелочи			борная кислота	обработка слизистых оболочек (в том числе конъюнктивы), кожи. Педикулез	[17, 24]
		коагуляция белков бактериальной клетки, нарушение проницаемости клеточной оболочки	натрия тетраборат (Бура)	обработка кожи, спринцевание	
			салициловая кислота	обработка кожи	

Производные нитрофурана		<p>нарушение биосинтеза ряда мембранных белков, блокировка цикла трикарбоновых кислот в бактериальной клетке, торможение клеточного дыхания</p>	Фурацилин	обработка кожи, промывание полостей	[17, 37, 52]
Препараты растительного происхождения		разрушение мембран бактериальной клетки	хлорофиллипт	обработка кожи, слизистых оболочек, промывание полостей,	[17, 191]
			эвкалимин	инфекции среднего уха и дыхательных путей	

Приложение Б

Гены, необходимые для образования бактериальной биопленки

Ген	Белок/функция	Вид микроорганизма	Ссылки
1	2	3	4
Адгезия			
<i>abpA</i>	Связывание амилазы	<i>S. gordonii</i>	[290]
<i>sspA/B</i>	Связывание колагена	<i>S. gordonii</i>	[290]
<i>gbpA</i>	Формирование полисахарида	<i>S. mutans</i>	[290]
<i>tarC</i>	Регулятор гликозилтрансферазы S и глюкан-связывающего белка	<i>S. mutans</i>	[138]
<i>ica ADBC</i>	Синтез межклеточного адгезина	<i>S. aureus, S. epidermidis</i>	[127]
<i>hla</i>	Гемолитический токсин	<i>S. aureus</i>	[61]
<i>clfA</i>	Фактор слипания A, фибриноген-связывающий белок	<i>S. aureus</i>	[269]
<i>dltA</i>	D-аланин эстерификация тейхоевой кислоты	<i>S. aureus</i>	[113]
<i>atlE</i>	Автолизин/адгезин	<i>S. epidermidis</i>	[127]
<i>aap</i>	Накопление связанного белка	<i>S. epidermidis</i>	[136]
<i>bopABCD</i>	Оперон контролирующий образование биопленки на пластиковых поверхностях	<i>E. faecalis</i>	[132]
<i>esp</i>	Поверхностный белок энтерококков	<i>E. faecalis</i>	[263]
<i>agn43</i>	Антиген белок, участвующий в агрегации	<i>E. coli</i>	[145]
Quorum sensing			
<i>comX</i>	компетентность	<i>S. gordonii</i>	[153]
<i>comABCDE</i>	компетентность	<i>S. mutans</i>	[286]
<i>luxS?</i>	Quorum sensing	<i>S. mutans</i>	[186]
<i>lasI</i>	Синтез кворумного сигнала 3OC12-HSL	<i>P. aeruginosa</i>	[83]
Клеточная стенка			
<i>PBP2B</i>	Синтез пептидогликана	<i>S. gordonii</i>	[290]
<i>PBP5</i>	Синтез пептидогликана	<i>S. gordonii</i>	[290]
<i>glmM</i>	Синтез пептидогликана	<i>S. gordonii</i>	[290]
<i>bacA</i>	Синтез пептидогликана	<i>S. gordonii</i>	[290]
<i>brpA</i>	Регулятор автолиза	<i>S. mutans</i>	[290]
Метаболизм			
<i>ccpA</i>	Катаболит-зависимый белок углеродного обмена	<i>S. mutans</i>	[290]
<i>crc</i>	Катаболит-зависимый белок углеродного обмена	<i>P. aeruginosa</i>	[205]
Стрессовая реакция			
<i>dgk</i>	Регулятор стрессовой реакции	<i>S. mutans</i>	[286]

1	2	3	4
<i>rB?</i>	Альтернативный сигма фактор стрессовой реакции	<i>S. aureus, S. epidermidis</i>	[147, 220]
<i>purR</i>	Регулирование синтеза пуринов	<i>S. epidermidis</i>	[148]
<i>rpoS?</i>	Регулятор участвующий в замедленном росте	<i>E. coli</i>	[79]
<i>mutT</i>	Репарация ДНК	<i>S. gordonii</i>	[290]
Плазмиды			
<i>tra</i>	Конъюгативный пилус из F плазмиды	<i>E. coli</i>	[68]

Приложение В

Уровень экспрессии генов в биопленках, по сравнению с планктонными клетками

Ген	Белок/функция	Уровень экспрессии	Микроорганизм	Ссылки
1	2	3	4	5
Адгезия				
<i>algC</i>	Синтез альгината	повышенный	<i>P. aeruginosa</i>	[279]
<i>wcaB</i>	Синтез коланиковой кислоты	повышенный	<i>E. coli</i>	[214]
<i>csgA</i>	Керли	повышенный	<i>E. coli</i>	[277]
<i>clfA</i>	Фактор слипания/связывания фибриногена	пониженный	<i>S. aureus</i>	[281]
<i>scaA</i>	агрегация	пониженный	<i>S. gordonii</i>	[105]
<i>abpA</i>	Связывание амилазы	пониженный	<i>S. gordonii</i>	[105]
<i>rggD</i>	Индуктор глюкозилтрансферазы	повышенный	<i>S. gordonii</i>	[105]
<i>int/CoA</i>	Адгезин межродовой релевантной агрегации	пониженный	<i>S. gordonii</i>	[105]
<i>flpA</i>	Связывание фибронектина	пониженный	<i>S. gordonii</i>	[105]
<i>has</i>	Стрептококковый гемагглютинин	пониженный	<i>S. gordonii</i>	[105]
Quorum sensing				
<i>pA4296</i>	Регулятор двухкомпонентного ответа	пониженный	<i>P. aeruginosa</i>	[279]
<i>comD,E</i>	Факторы компетентности	повышенный	<i>S. mutans</i>	[254, 280]
Клеточная стенка				
<i>mreC</i>	Клеточная морфология	повышенный	<i>P. aeruginosa</i>	[279]
<i>dltA</i>	D-аланин-D-аланил-носитель	пониженный	<i>S. gordonii</i>	[104]
<i>ddl</i>	D-аланин-лигаза	пониженный	<i>S. gordonii</i>	[104]
Стрессовая реакция				
<i>rpoH</i>	Стрессовый фактор стационарной фазы	повышенный	<i>P. aeruginosa</i>	[279]
<i>rpoS</i>	Фактор теплового шока	пониженный	<i>P. aeruginosa</i>	[279]
<i>proU</i>	Транспортно-осмотическая адаптация	повышенный	<i>E. coli</i>	[214]
	DnaK: Сворачивание белка (при тепловом шоке)	повышенный	<i>S. mutans</i>	[281]
	Ggr: укладка (при тепловом шоке)	повышенный	<i>S. mutans</i>	[281]
	60 kDa chaperonin: тепловой шок	пониженный	<i>S. mutans</i>	[281]
<i>htgX</i>	Предполагаемый белок теплового шока	пониженный	<i>S. gordonii</i>	[104]

Углеводный обмен				
1	2	3	4	5
	Фруктозо-бисфосфат альдолаза	пониженный	<i>S. mutans</i>	[281]
	Пируват киназа	пониженный	<i>S. mutans</i>	[281]
	6-фосфо-В-галактозидаза	пониженный	<i>S. mutans</i>	[281]
<i>pbg</i>	Фосфо-В-галактозидаза	повышенный	<i>S. gordonii</i>	[104]
<i>P02925</i>	периплазматической D-рибоза-связывающий белок	повышенный	<i>E. coli</i>	[266]
<i>P02927</i>	D-галактоза-связывающий белок	повышенный	<i>E. coli</i>	[266]
<i>Q6150</i>	малатдегидрогеназа	повышенный	<i>E. coli</i>	[266]
Клеточное деление				
	белок Div IVA, ассоциированный с делением клеток	повышенный	<i>S. mutans</i>	[281]
	FtsZ: образование перегородки	повышенный	<i>S. mutans</i>	[281]
	АТФ-зависимая ДНК-хеликаза RECG: репликация ДНК	пониженный	<i>S. mutans</i>	[281]
	H-NS: связывание ДНК	повышенный	<i>E. coli</i>	[263]
Подвижность				
<i>PA2168</i>	Вероятный фимбриальный белок	пониженный	<i>P. aeruginosa</i>	[279]
<i>pilA</i>	белок пилинов	пониженный	<i>P. aeruginosa</i>	[279]
<i>flgD</i>	Модифицирующий белок базального тельца флагеллы	пониженный	<i>P. aeruginosa</i>	[279]
<i>PA1092</i>	Флагеллин типа В	пониженный	<i>P. aeruginosa</i>	[279]
<i>fliD</i>	Флагеллярный кэспирующий белок укупорки	пониженный	<i>P. aeruginosa</i>	[279]
<i>flgE</i>	Белок крюка флагеллы	пониженный	<i>P. aeruginosa</i>	[279]
<i>fliC</i>	флагеллярный синтез	пониженный	<i>E. coli</i>	[214]
Фаги				
	белок оболочки бактериофага Pfl	повышенный	<i>P. aeruginosa</i>	[279]
	Спиральный дестабилизирующий белок бактериофага Pfl	повышенный	<i>P. aeruginosa</i>	[279]
	Вероятный белок оболочки бактериофага Pfl	повышенный	<i>P. aeruginosa</i>	[279]

Приложение Г



ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ АВТОНОМНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
 «НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ИНСТИТУТ НЕЙРОХИРУРГИИ
 ИМЕНИ АКАДЕМИКА Н.Н. БУРДЕНКО»
 МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ



УТВЕРЖДАЮ:

Заместитель директора
 по лечебной работе
 Главный врач

Л.Ю. Глазман

АКТ ВНЕДРЕНИЯ

результатов научных исследований Детушевой Е.В., полученных в ходе выполнения диссертационной работы на тему: «Моделирование биопленкообразования у госпитальных патогенов и изучение закономерностей формирования устойчивости к антисептикам»

Наименование предложения для внедрения: использование раствора хлоргексидина в концентрации 1,5% для обработки кожи и слизистых пациентов отделения нейрореанимации .

Кем предложен, адрес исполнителя: Федеральное бюджетное учреждение науки «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии», отдел коллекционных культур, Московская область, п. Оболенск.

Где и когда внедрено: Федеральное государственное автономное учреждение «Научно-исследовательский институт нейрохирургии имени академика Н.Н. Бурденко» Министерства здравоохранения Российской Федерации, г. Москва, отделение нейрореанимации.

125047, Москва, 4-я Тверская-Ямская ул., д.16
 Факс: (499) 250-0100
 E-mail: info@nsi.ru
www.nsi.ru

Дирекция (499) 250-0100
 Главный врач (499) 251-3555
 Стол справок (499) 972-8668
 Канцелярия (499) 972-8520

Эффективность внедрения: Использование 1,5% раствора хлоргексидина в программе ухода за пациентами отделения нейрореанимации, предложенного в рамках диссертационной работы, позволило уменьшить интенсивность циркуляции патогенов-возбудителей нозокомиальных инфекций и снизить уровень заболеваемости инфекциями дыхательной системы пациентов находящихся на искусственной вентиляции легких.

Предложения: Считаю целесообразным использование результатов диссертационной работы Детушевой Е.В. в части применения раствора хлоргексидина в концентрации 1,5% для протекции кожи и слизистых пациентов в отделении реанимации.

Ответственные за внедрение:

Заместитель главного врача по
эпидемиологической работе,
д.м.н., доцент

Заведующий отделением
нейрореанимации, д.м.н., доцент



О.Н. Ершова

И.А. Савин

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ**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.) Импакт-фактор ISI/РИНЦ – 0,207. Количество цитирований – 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. и инфекц. болезни. 2014. –Т. 19.–№6. –С.48-54. (Список ВАК до 30.06.2015 г.) Импакт-фактор 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 // Клин. Микробиол. и антимикр. химиотерапия. – 2015.–Т. 17.–№1.–С. 57-66. (Список ВАК до 30.06.2015 г.) Импакт-фактор 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 // Материалы Всероссийской научно-практической конференции «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 // Материалы 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 // Материалы VI Ежегодного Всероссийского Конгресса по инфекционным 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 Российской ассоциации аллергологов и клинических 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 Российской ассоциации аллергологов и клинических 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* ATCC в агрегированном и дезагрегированном состоянии /П. В. Слукин, **Е. В. Детушева**, В. Б. Родин, Н. К. Фурсова //Издательство ООО "Экспо-Медиа, Материалы VI Всероссийской научно-практической конференции молодых ученых и специалистов Роспотребнадзора. Актуальные проблемы эпидемиологии и профилактической 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 Международного конгресса по антимикробной 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 Международного конгресса по антимикробной терапии (Москва, 20-22 мая 2015 г.). – 2015. – С. 126-127.