

© Беляева Е.В., Ермолина Г.Б., Борискина Е.В., Шкуркина И.С., Кропотов В.С., 2021
УДК 579.61

Исследование циркуляции *S. epidermidis* и *S. haemolyticus* в детском стационаре

Е.В. Беляева, Г.Б. Ермолина, Е.В. Борискина, И.С. Шкуркина, В.С. Кропотов

ФБУН «Нижегородский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. академика И.Н. Блохиной» Роспотребнадзора,
ул. Малая Ямская, д. 71, г. Нижний Новгород, 603950, Российская Федерация

Резюме: Введение. Среди инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи, значительное место занимают стафилококковые. Возбудителями воспалительных процессов у новорожденных часто выступают коагулазонегативные стафилококки, ведущая роль среди которых принадлежит *S. epidermidis* и *S. haemolyticus*. В связи с этим представляется актуальным исследование циркуляции данных микроорганизмов в педиатрических стационарах с помощью внутривидового дифференцирования, основанного на сопоставлении спектров их внеклеточных белков. Цель исследования – изучение циркуляции штаммов *S. epidermidis* и *S. haemolyticus* в детском стационаре методом электрофоретического типирования их внеклеточных белков. Материалы и методы. Исследованы 277 штаммов *S. haemolyticus* и 267 штаммов *S. epidermidis*, выделенных в детском стационаре от больных и с предметов окружающей среды. Получены внеклеточные белки изолятов, проведен их электрофоретический анализ в полиакриламидном геле. Определена антибиотикорезистентность и способность к формированию биопленки. Результаты. Анализ электрофоретических спектров белков стафилококков позволил выявить группы идентичных штаммов. Изоляты от разных пациентов были объединены в 21 группу *S. haemolyticus*, включающую 69 штаммов, и 13 групп *S. epidermidis*, включающих 38 штаммов. Все эти культуры были метициллинрезистентными, за исключением одной группы из двух штаммов *S. haemolyticus*. Более половины культур, сгруппированных по спектрам внеклеточных белков, были полирезистентны. Абсолютное большинство штаммов *S. haemolyticus* (97,2 %) и три четверти штаммов *S. epidermidis* (76,0 %) обладали способностью к формированию биопленки. Средние значения степени пленкообразования у штаммов *S. haemolyticus* были достоверно выше, чем у *S. epidermidis*. Выводы. Из всех исследованных культур стафилококков 25 % штаммов *S. haemolyticus* и 14 % *S. epidermidis* длительно циркулировали в детском стационаре, из них 88,4 % штаммов гемолитического и 42,1 % эпидермального стафилококка – более месяца, а 21,7 % штаммов *S. haemolyticus* и 21,1 % *S. epidermidis* – в течение года. Эти культуры отличались метициллинрезистентностью, а изоляты гемолитического стафилококка – высокой способностью к образованию биопленки.

Ключевые слова: коагулазонегативные стафилококки, электрофоретическое типирование, антибиотикорезистентность, формирование биопленки.

Для цитирования: Беляева Е.В., Ермолина Г.Б., Борискина Е.В., Шкуркина И.С., Кропотов В.С. Исследование циркуляции *S. epidermidis* и *S. haemolyticus* в детском стационаре // Здоровье населения и среда обитания. 2021. № 4 (337). С. 18–24. doi: <https://doi.org/10.35627/2219-5238/2021-337-4-18-24>

Информация об авторах:

✉ Беляева Елена Вячеславовна – к.б.н., ст. науч. сотр., вед. науч. сотр. лаборатории микробиологии; e-mail: labnikif@yandex.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-8889-8801>.

Ермолина Галия Бариевна – к.б.н., ст. науч. сотр. лаборатории микробиологии; e-mail: labnikif@yandex.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0520-2456>.

Борискина Елена Владимировна – мл. науч. сотр. лаборатории микробиологии; e-mail: labnikif@yandex.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-6249-9466>.

Шкуркина Ирина Сергеевна – мл. науч. сотр. лаборатории микробиологии; e-mail: labnikif@yandex.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-0682-5076>.

Кропотов Василий Сергеевич – к.б.н., ст. науч. сотр. лаборатории микробиологии; e-mail: labnikif@yandex.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6903-962x>.

The Study of Persistence of *S. epidermidis* and *S. haemolyticus* in a Children's Hospital

E.V. Belyaeva, G.B. Ermolina, E.V. Boriskina, I.S. Shkurkina, V.S. Kropotov

Academician I.N. Blokhina Nizhny Novgorod Scientific Research Institute of Epidemiology and Microbiology,
71 Malaya Yamskaya Street, Nizhny Novgorod, 603950, Russian Federation

Summary. Introduction: Staphylococcal infections rank high among healthcare-associated infections. Coagulase-negative staphylococci, especially *S. epidermidis* and *S. haemolyticus*, often induce inflammatory processes in newborns. In this regard, it is important to study the persistence of these microorganisms in pediatric hospitals using intraspecific differentiation based on the comparison of spectra of their extracellular proteins. Our objective was to study circulation of *S. epidermidis* and *S. haemolyticus* strains in a children's hospital by electrophoretotyping of their extracellular proteins. Materials and methods: We studied 277 strains of *S. haemolyticus* and 267 strains of *S. epidermidis* isolated from patients and various objects of the hospital environment by obtaining extracellular proteins of the isolates, analyzing them using polyacrylamide gel electrophoresis, and determining their antibiotic resistance and ability to form biofilms. Results: The analysis of electrophoretograms of extracellular proteins of staphylococci revealed groups of identical strains. Isolates from different patients were combined into 21 *S. haemolyticus* groups comprising of 69 strains and 13 groups of *S. epidermidis* comprising of 38 strains. All the cultures were methicillin-resistant, with the exception of one group of two *S. haemolyticus* strains. More than half of the cultures grouped by spectra of extracellular proteins were multidrug resistant. The absolute majority of *S. haemolyticus* strains (97.2 %) and three quarters of *S. epidermidis* strains (76.0 %) were able to form biofilms. The average values of the degree of film formation in *S. haemolyticus* strains were significantly higher than those in *S. epidermidis*. Conclusions: Of all the studied cultures of staphylococci, 25 % of strains and 14 % of *S. epidermidis* strains persisted and were endemic in the children's hospital, including 88.4 % of hemolytic and 42.1 % of epidermal staphylococcus strains for more than a month, and 21.7 % of *S. haemolyticus* and 21.1 % of *S. epidermidis* strains for almost a year. The strains were resistant to methicillin, and the isolates of *S. haemolyticus* had a high ability to form biofilms.

Keywords: coagulase-negative staphylococci, electrophoretotyping, antibiotic resistance, biofilm formation.

For citation: Belyaeva EV, Ermolina GB, Boriskina EV, Shkurkina IS, Kropotov VS. The study of persistence of *S. epidermidis* and *S. haemolyticus* in a children's hospital. *Zdorov'e Naseleniya i Sreda Obitaniya*. 2021; (4(337)):18–24. (In Russian). doi: <https://doi.org/10.35627/2219-5238/2021-337-4-18-24>

Author information:

✉ Elena V. Belyaeva, Candidate of Biological Sciences, Leading Researcher, Microbiology Laboratory, Academician I.N. Blokhina Nizhny Novgorod Scientific Research Institute of Epidemiology and Microbiology; e-mail: labnikif@yandex.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-8889-8801>.

Galiya B. Ermolina, Candidate of Biological Sciences, Senior Researcher, Microbiology Laboratory, Academician I.N. Blokhina Nizhny Novgorod Scientific Research Institute of Epidemiology and Microbiology; e-mail: labnikif@yandex.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0520-2456>.

Elena V. Boriskina, Junior Researcher, Microbiology Laboratory, Academician I.N. Blokhina Nizhny Novgorod Scientific Research Institute of Epidemiology and Microbiology; e-mail: labnikif@yandex.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-6249-9466>.
Irina S. Shkurkina, Junior Researcher, Microbiology Laboratory, Academician I.N. Blokhina Nizhny Novgorod Scientific Research Institute of Epidemiology and Microbiology; e-mail: labnikif@yandex.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-0682-5076>.

Vasily S. Kropotov, Candidate of Biological Sciences, Senior Researcher, Microbiology Laboratory, Academician I.N. Blokhina Nizhny Novgorod Scientific Research Institute of Epidemiology and Microbiology; e-mail: labnikif@yandex.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6903-962x>.

Введение. Одной из актуальных проблем здравоохранения остаются стафилококковые инфекции [1–3]. В последнее время отмечается неуклонный рост роли коагулазонегативных стафилококков (CoNS) в развитии инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи (ИСМП) [4], особенно у новорожденных с низкой массой тела, а также пациентов отделений реанимации и интенсивной терапии (ОРИТ) [5–7]. Мониторинг стафилококковой микрофлоры в детском стационаре, проведенный нами ранее [8], показал, что наиболее распространенными среди CoNS были представители двух видов — *S. epidermidis* и *S. haemolyticus*. Для оценки циркуляции CoNS представляется актуальной разработка методов внутривидовой дифференциации, позволяющих выявить пути распространения возбудителя в стационаре, разграничить случаи эндогенного и экзогенного инфицирования.

Популяция госпитальных штаммов, по определению Н.И. Брико и соавт., — «однородная по фено- и генотипическим признакам совокупность особей определенного вида микроорганизмов, сформировавшаяся в госпитальной экосистеме и адаптированная к условиям больничной среды» [9]. Одними из факторов такой адаптации являются резистентность к антимикробным препаратам и способность к образованию биопленки [10–13]. Фенотипическим признаком однородности популяции стафилококков могут служить спектры (электрофореграммы) их внеклеточных белков, которые являются уникальной штаммовой характеристикой и могут быть использованы в качестве эпидемиологических маркеров при расследовании различных эпидситуаций [14]. Направление по изучению различных эпидмаркеров было начато в институте при поддержке академика И.Н. Блохиной, которая уделяла большое внимание развитию диагностики и профилактики инфекционных заболеваний. В лаборатории микробиологии проводилась многолетняя работа по изучению свойств бактерий на клеточном, субклеточном и молекулярном уровне для создания схем дифференциации микроорганизмов разных таксономических групп по спектрам свободных и связанных с субклеточными структурами белков.

Цель исследования — изучение циркуляции штаммов *S. epidermidis* и *S. haemolyticus* в детском стационаре методом электрофоретического типирования их внеклеточных белков.

Материалы и методы. Были исследованы 277 штаммов *S. haemolyticus* и 267 штаммов *S. epidermidis*, выделенных в течение 3 лет в ОРИТ и двух отделениях патологии новорожденных и недоношенных детей с различной нозологией (1 и 2). Культуры были выделены с кожи, со слизистых оболочек зева и носа, из пупочной ранки, ушей и глаз новорожденных, с катетеров и из окружающей среды.

Получение внеклеточных белков и их электрофоретический анализ в полиакриламидном геле проводили по ранее описанному методу [14]. Экзопродукты бактерий, содержащие внеклеточные белки, получали путем выращивания культур на питательном агаре в чашках Петри, покрытых стерильными целлофановыми дисками. Через 20–24 часа инкубации клетки смывали стерильным физиологическим раствором, осаждали центрифугированием при 5600 г 30 мин, надосадочную жидкость декантировали и хранили до использования при -20°C .

Чувствительность к антибиотикам определяли диско-диффузионным методом на среде Мюллера — Хинтона. Присутствие гена *tesA* оценивали методом ПЦР в реальном времени.

Способность к формированию биопленки [15] оценивали по степени адгезии клеток к полистиролу в лунках планшета, измеренной после окрашивания кристаллвиолетом при 540 нм. Пленкообразующими считали культуры, если значения коэффициента k , рассчитанного как отношение разности оптической плотности ОП₅₄₀ опытных образцов и контрольных к суммарной ОП₅₄₀ выросших в лунках планшета культур до окрашивания, превышали 2.

Результаты. В результате анализа электрофореграмм внеклеточных белков были выявлены группы штаммов, идентичные или близкие по характеру расположения белковых фракций в полиакриламидном геле, что соответствовало их одинаковой электрофоретической подвижности. Выраженность отдельных фракций могла быть разной из-за различий в общем количестве белка в образцах и объемном соотношении их присутствия во внеклеточных продуктах (что может быть связано с интенсивностью их синтеза или секреции во внешнюю среду). По сути, каждая группа штаммов обозначала одну культуру стафилококка, которая была выделена из разных локусов одного или разных больных или из смывов внешней среды. Таким образом были сформированы 28 групп из 89 штаммов *S. haemolyticus* и 19 групп из 52 штаммов *S. epidermidis*. Необходимо заметить, что треть сгруппированных штаммов (30,5 %) представляли собой культуры, выделенные из разных локусов какого-либо одного пациента. Такие изоляты были получены от 13 больных (7 групп штаммов *S. haemolyticus* и 6 групп — *S. epidermidis*). Кроме того, изоляты от одного пациента могли входить в состав групп штаммов, выделенных из других источников, так были составлены три группы *S. haemolyticus* и одна — *S. epidermidis*. В целом, изоляты от разных пациентов были объединены по сходству электрофореграмм внеклеточных белков в 21 группу *S. haemolyticus*, включающую 69 штаммов, и 13 групп *S. epidermidis*, объединяющих 38 штаммов. Следует отметить, что из этого числа культур 71,0 % штаммов *S. haemolyticus* и 47,3 % *S. epidermidis* представляли собой изоляты от больных из разных отделений стационара.

В ОРИТ было выявлено 6 групп, включающих от 2 до 5 штаммов *S. haemolyticus*, и 4 группы *S. epidermidis*, состоящих из двух-трех штаммов. Электрофореграммы некоторых из них представлены на рис. 1.

В одном из отделений патологии новорожденных и недоношенных детей было выявлено 18 групп *S. haemolyticus*, включающих от 2 до 9 штаммов, и 14 групп *S. epidermidis*, объединяющих от 2 до 8 штаммов, что частично отражено на рис. 2 и 3.

Из штаммов, изолированных в разных отделениях детского стационара, были сформированы 12 групп *S. haemolyticus* и 4 — *S. epidermidis*. Культуры *S. haemolyticus*, выделенные в 1-м отделении и ОРИТ, составили одну группу из семи штаммов, две — из шести, одну — из четырех, две — из трех, четыре — из двух штаммов с одинаковыми спектрами внеклеточных белков. Во 2-м отделении была сформирована только одна группа (рис. 4) из двух штаммов

S. haemolyticus, выделенных из носа двух больных в течение месяца (509, 706), которые по электрофореграмме внеклеточных белков совпадали со штаммом, выделенном за полгода до них из пупка пациента 1-го отделения (411).

Самая большая группа штаммов, схожих по спектрам внеклеточных белков, включала 15 изолятов *S. haemolyticus*, выделенных в 3 отделениях стационара от разных пациентов в течение года. Первые изоляты были получены с кожи и из зева пациентов 1-го отделения в течение недели, далее штамм с идентичной электрофоретической подвижностью был выделен через два месяца с кожи пациента 2-го отделения. Через две недели подобные изоляты были получены от пациентов 1-го отделения — из глаза и зева трех новорожденных, а через месяц — с интубационных трубок и из зева двух пациентов ОРИТ. Затем подобные штаммы были выделены через 3,5–4 месяца из глаза пациента ОРИТ, из пупка и зева пациентов

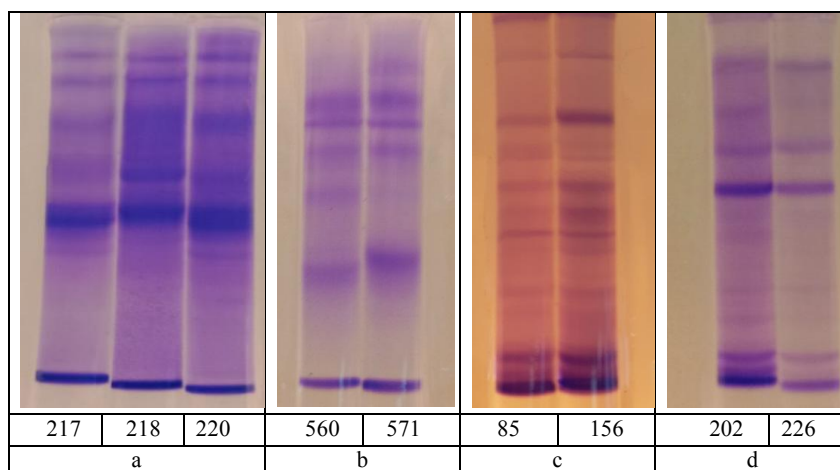


Рис. 1. Электрофореграммы внеклеточных белков *S. haemolyticus* (a, b) и *S. epidermidis* (c, d), выделенных в ОРИТ: а 217, 218, 220 — из правого глаза, с интубационной трубки и из левого глаза одной пациентки в течение одного дня; б 560, 571 — с интубационной трубки и из глаз двух пациентов в течение одной недели; с 85, 156 — из глаза и из пупочной ранки двух пациентов в течение двух недель; d 202, 226 — из глаза и из пупков двух пациентов в течение трех недель

Fig. 1. Electrophoregrams of extracellular proteins of *S. haemolyticus* (a, b) and *S. epidermidis* (c, d) isolated in the intensive care unit from: (a) 217, 218, 220 — the right eye, the intubation tube, and the left eye of a female patient on the same day; (b) 560, 571 — the intubation tube and the eyes of two patients during a week; (c) 85, 156 — the eye and umbilical wounds of two patients during two weeks; and (d) 202, 226 — eyes and navels of two patients during three weeks

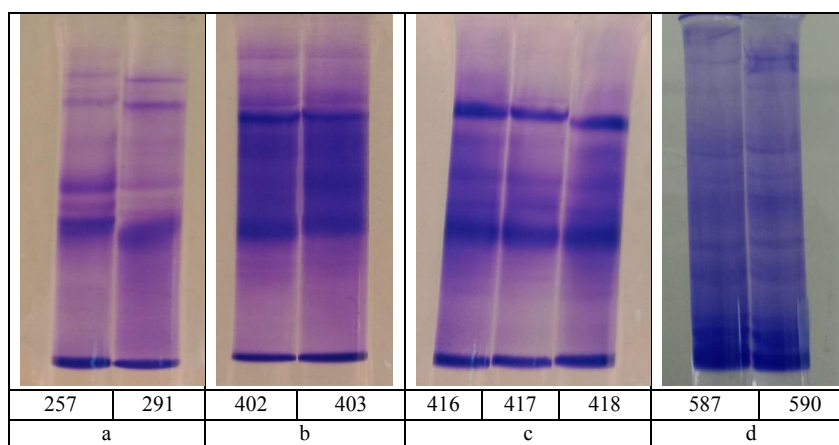


Рис. 2. Электрофореграммы внеклеточных белков *S. haemolyticus*, выделенных: а 257, 291 — из носа и зева двух пациентов в течение 1,5 месяцев; б 402, 403 из глаз двух близнецов в один день; с 416, 417, 418 — из носа, пупка и зева одного пациента в один день; d 587, 590 — из пупка и из зева двух пациентов в один день

Fig. 2. Electrophoregrams of *S. haemolyticus* extracellular proteins isolated from: (a) 257, 291 — the nose and pharynx of two patients during six weeks; (b) 402, 403 — the eyes of twins on the same day; (c) 416, 417, 418 — the nose, navel and pharynx of a patient on the same day; and (d) 587, 590 — from the navel and pharynx of two patients on the same day

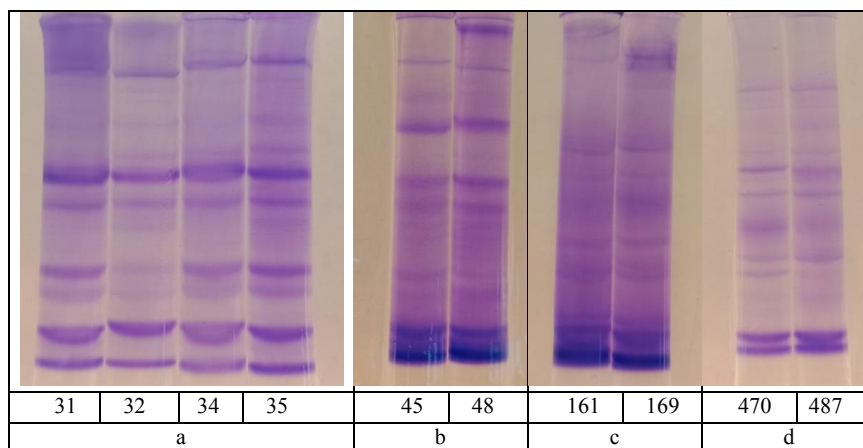


Рис. 3. Электрофореграммы внеклеточных белков *S. epidermidis*, выделенных: а 31, 32, 34, 35 — с кожи, из левого и правого уха, из пупочной ранки одного пациента в один день; б 45, 48 — из уха и с кожи двух пациентов в течение двух дней; в 161, 169 — с кожи двух пациентки в течение 2,5 недель

Fig. 3. Electrophoregrams of *S. epidermidis* extracellular proteins isolated from: (a) 31, 32, 34, 35 — skin, ears, and the umbilical wound of a patient on the same day; (b) 45, 48 — the ear and skin of two patients during two days; (c) 161, 169 — skin of two patients during a week; and (d) 470, 487 — the nose and skin of a female patient during 2.5 weeks

1-го отделения, еще через месяц — из пупка другого пациента ОРИТ и, наконец, через четыре месяца — с кожи новорожденного в 1-ом отделении.

Среди штаммов *S. epidermidis*, выделенных от больных из 1-го отделения и ОРИТ, были выявлены идентичные культуры только в четырех случаях. Одна группа из пяти штаммов (рис. 5а) включала изоляты с кожи и из уха двух пациентов 1-го отделения (234, 239), полученные в течение трех дней, а также выделенный в ОРИТ через неделю штамм из пупочной ранки больного (256). Через 3,5 месяца подобный штамм был выделен в ОРИТ с марлевого шарика (378), а еще через 3 месяца — с интубационной трубки пациента ОРИТ (423). Кроме того, в 1-м отделении и ОРИТ были выявлены две группы из двух штаммов, выделенных из глаз пациентов этих отделений в течение двух дней (рис. 5б), а также из пупка пациентки 1-го отделения (545) и с кожи пациента ОРИТ (547) — в течение одной недели (рис. 5с). Самая большая группа *S. epidermidis* включала 9 штаммов, схожих по

электрофоретической подвижности внеклеточных белков. Эти изоляты были получены из зева, носа, глаз, ушей, пупочной ранки пациентов 1-го отделения и с подключичного катетера пациента ОРИТ в течение года.

Всего из числа исследованных культур в формирование групп идентичных штаммов были вовлечены 32,1 % *S. haemolyticus* и 19,5 % *S. epidermidis*, при этом изоляты от разных пациентов составили 21 группу из 24,9 % штаммов *S. haemolyticus* и 13 групп из 14,2 % *S. epidermidis*. В состав групп, образованных штаммами из разных отделений, были включены 15,9 % культур гемолитического и 6,7 % эпидермального стафилококка из числа всех тестированных изолятов. Группы идентичных штаммов встречались в стационаре в течение разных промежутков времени. Так, среди изолятов *S. haemolyticus* выявлены 6 групп штаммов, выделенных в течение 1–3 месяцев (22 штамма), 4 группы — в течение 4–6 месяцев (17 штаммов), 2 группы — в течение 9–12 месяцев (22 штамма). Изоляты *S. epidermidis*, в основном, формировали группы в течение 1 недели — 1 месяца (7 групп, 18 штаммов), лишь три группы объединяли изоляты в течение 3, 7 и 14 месяцев (3, 5 и 8 штаммов соответственно). Итак, в составе групп идентичных штаммов, циркулирующих в стационаре более месяца, были 88,4 % штаммов гемолитического стафилококка и 42,1 % эпидермального стафилококка, выделенные от разных больных. Из них были выявлены две группы идентичных штаммов, состоящие из 15 культур *S. haemolyticus* и 8 *S. epidermidis*, циркулирующие в разных отделениях детского стационара в течение года.

Следует отметить, что в абсолютном большинстве культуры *S. haemolyticus* и *S. epidermidis*, сгруппированные по спектрам внеклеточных белков, были метициллинрезистентными. Только одна группа из двух штаммов *S. haemolyticus*, выделенных в один день из глаз двух близнецов (рис. 2б), отличалась чувствительностью к оксациллину и цефокситину, а также к аминогликозидам, макролидам и линкосамидам.

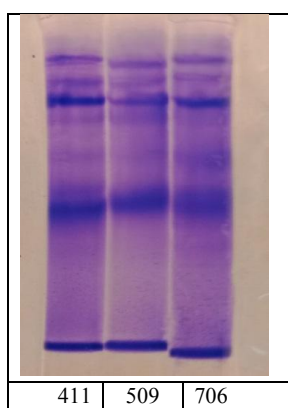


Рис. 4. Электрофореграммы внеклеточных белков *S. haemolyticus*, выделенных в двух отделениях детского стационара: 411 — из пупка пациента 1-го отделения; 509, 706 — из носа двух пациентов 2-го отделения

Fig. 4. Electrophoregrams of *S. haemolyticus* extracellular proteins isolated in two departments of the children's hospital from: 411 — the navel of a patient of the first department; 509, 706 — the nose of two patients of the second department

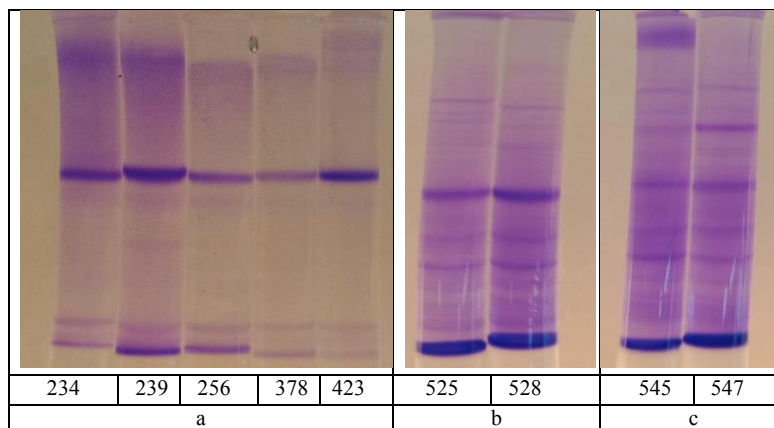


Рис. 5. Электрофореграммы внеклеточных белков *S. epidermidis*, выделенных в двух отделениях детского стационара: а 234, 239 — с кожи и из ушей двух пациентов 1-го отделения; 256, 378, 423 — в ОРИТ из пупка одного пациента, с марлевого шарика, с интубационной трубки другого пациента соответственно; б 525 — из глаза пациента ОРИТ; 528 — из глаза пациента 1-го отделения; в 545 — из пупка пациентки 1-го отделения; 547 — с кожи пациента ОРИТ

Fig. 5. Electrophoregrams of *S. epidermidis* extracellular proteins isolated in two departments of the children's hospital from: (a) 234, 239 — skin and ears of two patients of the first department; 256, 378, 423 — the navel of a patient, a gauze ball, and the endotracheal tube of another patient of the intensive care unit (ICU), respectively; (b) 525 — the eye of an ICU patient; 528 — the eye of a patient of the first department; and (c) 545 — the navel of a female patient of the first department; 547 — skin of an ICU patient

Метициллинрезистентные штаммы *S. epidermidis* и *S. haemolyticus* в составе остальных групп были резистентны к аминогликозидам в 46,1 % и 62,9 % случаев, к макролидам — в 65,4 % и 82,0 %, к линкосамидам — в 51,9 % и 33,7 % случаев соответственно. Все культуры были чувствительны к линезолиду, ванкомицину, тигециклину. В целом полирезистентность к трем и более классам антибиотиков проявили 53,8 % *S. epidermidis* и 57,3 % *S. haemolyticus*.

С целью подтверждения метициллинрезистентности стафилококков, определенной фенотипически по чувствительности штаммов к оксациллину или цефокситину, были проведены молекулярно-генетические исследования наличия тесА гена у 100 штаммов. Результаты детекции тесА гена у 75 проанализированных стафилококков были положительными, что свидетельствует о продукции данными штаммами дополнительного пенициллинсвязывающего белка и соответственно устойчивости ко всем бета-лактамам антибиотикам.

Было проведено исследование способности культур, выделенных в детском стационаре, к формированию биопленки. Из всех тестируемых штаммов 76,0 % *S. epidermidis* и 97,2 % *S. haemolyticus* были пленкообразующими. Средние значения степени пленкообразования k у штаммов *S. haemolyticus* ($6,71 \pm 0,18$) были достоверно выше, чем у *S. epidermidis* ($3,12 \pm 0,09$) при $p = 0,000001$.

Таким образом, из всех исследованных культур 25 % штаммов *S. haemolyticus* и 14 % *S. epidermidis* циркулировали в детском стационаре в течение длительного времени (в нашем исследовании — до одного года). Эти культуры отличались метициллинрезистентностью, а изоляты гемолитического стафилококка также и высокой способностью к образованию биопленки.

Обсуждение. Проблема циркуляции патогенов в стационарах различного профиля является предметом пристального внимания многих исследователей [16–19]; проводится анализ выделенной от больных и с предметов

окружающей среды микрофлоры с определением ее антибиотикорезистентности. Однако обычно не выясняются источники инфицирования, пути распространения возбудителей. Нами было показано ранее, что электрофореграммы внеклеточных белков стафилококков могут быть использованы для внутривидовой дифференциации [14] и служить специфическим маркером штамма, что позволяет более детально анализировать циркуляцию стафилококков в стационарах. Проведенное исследование CoNS, выделенных в детском стационаре, показало, что 67,9 % штаммов *S. haemolyticus* и 80,5 % *S. epidermidis* не имели сходства по спектрам внеклеточных белков, следовательно, представляли собой индивидуальную микрофлору пациентов, не связанную с экзогенным инфицированием. Соответственно, среди остальных культур (89 штаммов *S. haemolyticus* и 52 штаммов *S. epidermidis*) были выявлены группы с идентичным или очень близким характером расположения фракций внеклеточных белков в электрофореграммах. Некоторые группы были сформированы из штаммов, выделенных в один день или ближайшие дни, но иногда близкие по спектрам внеклеточных белков культуры были обнаружены у разных пациентов в течение нескольких месяцев, что может свидетельствовать об их длительной циркуляции как внутри одного отделения, так и между отделениями.

Все исследованные культуры *S. epidermidis* и 97,8 % *S. haemolyticus*, объединенные в группы идентичных штаммов, были метициллинрезистентными, проблемными в плане устойчивости к антибиотикам. То, что циркуляция коагулазонегативных стафилококков в стационаре связана с их антибиотикорезистентностью, подчеркивается многими авторами [20–23]. В нашем исследовании у 25 % тестируемых на наличие гена тесА фенотипически метициллинрезистентных штаммов не выявлено тесА гена. По всей вероятности, это можно объяснить гиперпродукцией бета-лактамаз данными изолятами, что проявляется фенотипически метициллинрезистентностью и множественной

устойчивостью к антибиотикам разных классов. Известно, что у многих метициллинрезистентных штаммов отмечается ассоциативная устойчивость не только к бета-лактамам, но и к другим антибиотикам [24, 25]. Например, группа *S. haemolyticus* из 15 штаммов, изолированных в трех отделениях детского стационара в течение года, отличалась полирезистентностью к антибиотическим препаратам.

Способность бактерий к формированию биопленки многократно увеличивает их выживаемость в условиях медицинских стационаров, позволяя им противостоять действию как антибиотиков, так и дезинфектантов [26–29]. В нашем исследовании культуры *S. haemolyticus* в два раза чаще, чем *S. epidermidis*, формировали группы идентичных штаммов, что вероятно связано с их более высокой способностью к пленкообразованию. Такие свойства гемолитического стафилококка были отмечены также в работе других авторов [30].

Таким образом, сопоставление электрофореграмм внеклеточных белков CoNS позволило выявить штаммы, длительно циркулирующие в детском стационаре, что соответствовало их антибиотикорезистентности и способности к формированию биопленки.

Заключение

На основе анализа спектров внеклеточных белков 267 культур *S. epidermidis* и 277 культур *S. haemolyticus*, выделенных в детском стационаре в течение 3 лет, сделан вывод о длительной циркуляции некоторых штаммов как внутри одного отделения, так и между отделениями. В целом, 25 % исследованных штаммов *S. haemolyticus* и 14 % *S. epidermidis* были объединены в группы идентичных штаммов, представляющих изоляты от разных пациентов. Из них 88,4 % штаммов гемолитического и 42,1 % эпидермального стафилококка циркулировали в стационаре более месяца, а 21,7 % штаммов *S. haemolyticus* и 21,1 % *S. epidermidis* – в течение одного года. Абсолютное большинство сгруппированных штаммов были антибиотикорезистентны и способны к формированию биопленки, что несомненно способствовало их выживаемости в условиях стационара.

Информация о вкладе авторов: Е.В. Беляева – разработка дизайна исследования, написание текста рукописи; Г.Б. Ермолина – обзор публикаций по теме статьи, анализ полученных данных; Е.В. Борискина, И.С. Шкуркина – получение данных для анализа; В.С. Кропотов – анализ и оформление данных для публикации.

Финансирование: исследование проводилось в рамках целевой научно-исследовательской программы 2016–2020 «Проблемно-ориентированные научные исследования в области эпидемиологического надзора за инфекционными и паразитарными болезнями».

Конфликт интересов: авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Список литературы

(пп. 3, 6, 10–13, 19, 21–24, 29 см. References)

- Божкова С.А., Полякова Е.М., Краснова М.В. Преодоление устойчивости к гентамицину у метициллинрезистентных штаммов стафилококка // Международный журнал прикладных и фундаментальных исследований. 2017. № 8-1. С. 97–103.
- Присакар В.И., Буга Д.В., Сава В.И. Внутрибольничные инфекции, вызванные метициллинрезистентными стафилококками (MRS) // Журнал МедиАль. 2018. № 2. С. 8–11.
- Покровский В.И., Акимкин В.Г., Брико Н.И., Брусина Е.Б., Зуева Л.П., Ковалишена О.В. и др. Национальная концепция профилактики инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи, и информационный материал по ее положениям. Нижний Новгород: Ремедиум Приволжье, 2012. 84 с.
- Любасовская Л.А., Корниенко М.А., Припутневич Т.В., Ильина Е.Н., Шеголев А.И. Микробиологическая и молекулярно-генетическая характеристика коагулазонегативных стафилококков, выделенных у новорожденных отделения реанимации и интенсивной терапии // Антибиотики и химиотерапия. 2013. Т. 58. № 3-4. С. 25–32.
- Шайхразиева Н.Д., Булычева И.А., Лопушов Д.В., Сабаева Ф.Н. Этиологическая структура и антибиотикорезистентность госпитальных штаммов микроорганизмов в отделении анестезиологии и реанимации // Медицинский альманах. 2019. № 1 (58). С. 32–34.
- Беляева Е.В., Ермолина Г.Б., Борискина Е.В., Кряжев Д.В., Шкуркина И.С. Мониторинг биопленкообразующей способности у циркулирующих в детском стационаре коагулазонегативных стафилококков // Медицинский альманах. 2018. № 4 (55). С. 26–30.
- Брико Н.И., Брусина Е.Б., Зуева Л.П., Ковалишена О.В., Ряпис Л.А., Стасенко В.Л. и др. Госпитальный штамм – непознанная реальность // Эпидемиология и вакцинопрофилактика. 2013. № 1 (68). С. 30–35.
- Дегтева Г.К., Беляева Е.В., Ермолина Г.Б. Белковые системы бактерий. Роль в таксономии и эпидемиологической практике. Н. Новгород: Изд-во Нижегород. госуниверситета им. Н.И. Лобачевского, 1999. 138 с.
- Кузнецова М.В., Николаева Н.В., Розанова С.М., Карпунина Т.И. Формирование биопленок нозокоммальных штаммов *Pseudomonas aeruginosa* // Журнал Микробиологии, Эпидемиологии и Иммунобиологии. 2011. № 4. С. 8–14.
- Гостев В.В., Калиногорская О.С., Круглов А.Н., Сидоренко С.В. Антибиотикорезистентность коагулазоотрицательных стафилококков, выделенных в стационарах Санкт-Петербурга и Москвы // Антибиотики и химиотерапия. 2015. Т. 60, № 9-10. С. 23–28.
- Петрухина М.И., Мартынова А.М., Политова Н.Г., Ющенко Г.В., Старостина Н.В. Сравнительный анализ микроорганизмов, выделенных от больных в отделениях реанимации разного профиля // Медицинский альманах. 2016. № 3 (43). С. 17–20.
- Граничная Н.В., Зайцева Е.А., Пятко В.Э. Микробиологический мониторинг и антибиотикорезистентность коагулазонегативных стафилококков, выделенных от пациентов кардиохирургического стационара // Здоровье. Медицинская экология. Наука. 2017. № 1 (68). С. 24–29.
- Омарова С.М., Алиева С.Ф., Османов А.С. Мониторинг антибиотикорезистентных стафилококков, возбудителей внутрибольничного инфицирования пациентов отделения челюстно-лицевой хирургии // Международный научно-исследовательский журнал. 2017. № 2-2 (56). С. 30–33.
- Зырянов С.К., Сычев И.Н., Гушина Ю.Ш. Современные проблемы инфекций, вызванных MRSA и пути их решения // Антибиотики и химиотерапия. 2017. Т. 62. № 7-8. С. 69–79.
- Сергеев В.И., Ключкина Т.В., Зуева Н.Г., Волкова Э.О. Устойчивость к дезинфицирующим средствам госпитального штамма *Staphylococcus haemolyticus*, выделенного в акушерском стационаре при неединичной заболеваемости новорожденных гнойно-септическими инфекциями // Здоровье населения и среда обитания. 2012. № 7 (232). С. 18–20.
- Белова Е.О. Биопленочные инфекции в педиатрии // Бюллетень медицинских Интернет-конференций. 2019. Т. 9. № 12. С. 574–576.
- Беляева Е.В., Ермолина Г.Б., Шкуркина И.С., Борискина Е.В., Кряжев Д.В. Оценка чувствительности к дезинфектантам коагулазонегативных стафилококков, циркулирующих в детском стационаре // Здоровье населения и среда обитания. 2019. № 8 (317). С. 20–24.

30. Корниенко М.А., Копыльцов В.Н., Шевлягина Н.В., Диденко Л.В., Любасовская Л.А., Припутневич Т.В. и др. Способность стафилококков различных видов к образованию биопленок и их воздействие на клетки человека // Молекулярная генетика, микробиология и вирусология. 2016. Т. 34. № 1. С. 18–25.

References

- Bozhkova SA, Polyakova EM, Krasnova MV. The breaking of resistance to gentamycin in methicillin resistant *Staphylococcus aureus* strains. *Mezhdunarodnyy Zhurnal Prikladnykh i Fundamentalnykh Issledovaniy*. 2017;(8-1):97–103. (In Russian).
- Prisakar VI, Buga DV, Sava V. Nosocomial infections caused by methicillin-resistant staphylococci (MRS). *Zhurnal Medial*. 2018;(2):8–11. (In Russian).
- Lee JYH, Monk IR, Gonçalves da Silva A, et al. Global spread of three multidrug-resistant lineages of *Staphylococcus epidermidis*. *Nat Microbiol*. 2018;3(10):1175–1185. doi: 10.1038/s41564-018-0230-7
- Pokrovskiy VI, Akimkin VG, Briko NI, Brusina EB, Zueva LP, Kovalishena OV, et al. [The National Concept for Prevention of Infections Associated with Medical Care, and Information Material on Its Provisions.] Nizhny Novgorod: Remedium Privolzh'e Publ., 2012. (In Russian). Accessed March 15, 2021. <http://www.kb51.ru/pdf/nk.pdf>
- Lubasovskaya LA, Kornienko MA, Priputnevich TV, Ilyina EN, Shchegolev AI. Microbiological and molecular genetic characteristics of coagulase-negative staphylococcal isolates from neonates in intensive care unit. *Antibiotiki i Khimioterapiya*. 2013;58(3-4):25–32. (In Russian).
- Rampelotto RF, Lorenzoni VV, Silva DDC, et al. Assessment of different methods for the detection of biofilm production in coagulase-negative staphylococci isolated from blood cultures of newborns. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2018;51(6):761–767. doi: 10.1590/0037-8682-0171-2018
- Shaikhrazieva ND, Bulycheva IA, Lopushov DV, Saibaeva FN. Etiological structure and antibiotic resistance of the nosocomial strains of microorganisms in the Department of anaesthesiology and resuscitation. *Meditsinskiy Almanakh*. 2019;(1(58)):32–34. (In Russian). doi: 10.21145/2499-9954-2019-1-32-34
- Belyaeva EV, Ermolina GB, Boriskina EV, Kryazhev DV, Shkurkina IS. Monitoring of biofilm formation ability of coagulase-negative staphylococcus circulating in children's inpatient clinics. *Meditsinskiy Almanakh*. 2018;(4(55)):26–30. (In Russian). doi: 10.21145/2499-9954-2018-4-26-30
- Briko NI, Brusina EB, Zueva LP, Kovalishena OV, Ryapis LA, Stasenko VL, et al. Hospital strain – Mysterious reality. *Epidemiologiya i Vaktsinoprofilaktika*. 2013;(1(68)):30–35. (In Russian).
- Shrestha LB, Bhattarai NR, Khanal B. Antibiotic resistance and biofilm formation among coagulase-negative staphylococci isolated from clinical samples at a tertiary care hospital of eastern Nepal. *Antimicrob Resist Infect Control*. 2017;6:89. doi: 10.1186/s13756-017-0251-7
- Manandhar S, Singh A, Varma A, Pandey S, Shrivastava N. Evaluation of methods to detect in vitro biofilm formation by staphylococcal clinical isolates. *BMC Res Notes*. 2018;11(1):714. doi: 10.1186/s13104-018-3820-9
- Rajivgandhi G, Maruthupandy M, Muneeswaran T, Anand M, Quero F, Manoharan N, et al. Biosynthesized silver nanoparticles for inhibition of antibacterial resistance and biofilm formation of methicillin-resistant coagulase negative *Staphylococci*. *Bioorg Chem*. 2019;89:103008. doi: 10.1016/j.bioorg.2019.103008
- França A, Gaio V, Lopes N, Melo L. Virulence factors in coagulase-negative staphylococci. *Pathogens*. 2021;10(2):170. doi: 10.3390/pathogens10020170
- Degteva GK, Belyaeva EV, Ermolina GB. [Protein Systems of Bacteria. Role in Taxonomy and Epidemiological Practice.] Nizhny Novgorod: Nizhegor. gosuniversitet im. N.I. Lobachevskogo Publ., 1999. (In Russian).
- Kuznetsova MV, Nikolaeva NV, Rozanova SM, Karpunina TI. Formation of biofilms by nosocomial *Pseudomonas aeruginosa* strains. *Zhurnal Mikrobiologii, Epidemiologii i Immunobiologii*. 2011;(4):8–14. (In Russian).
- Gostev VV, Kalinogorskaya OS, Kruglov AN, Sidorenko SV. Antibiotic resistance of coagulase-negative staphylococci isolated at hospitals of St. Petersburg and Moscow. *Antibiotiki i Khimioterapiya*. 2015;60(9-10):23–28. (In Russian).
- Petrukhina MI, Martynova AM, Politova NG, Yushchenko GV, Starostina NV. Comparative analysis of microorganisms separated from the patients in resuscitation departments of a different profile. *Meditsinskiy Almanakh*. 2016;3(43):17–20. (In Russian).
- Granichnaya NV, Zaitseva EA, Pyatko VE. Microbiological monitoring and antimicrobial resistance of coagulase-negative staphylococci isolated from patients cardiac surgery hospital. *Zdorov'e. Meditsinskaya Ekologiya. Nauka*. 2017;(1(68)):24–29. (In Russian). doi: 10.5281/zenodo.345607
- Bora P, Datta P, Gupta V, Singhal L, Chander J. Characterization and antimicrobial susceptibility of coagulase-negative staphylococci isolated from clinical samples. *J Lab Physicians*. 2018;10(4):414–419. doi: 10.4103/JLP.JLP_55_18
- Omarova SM, Alieva SF, Osmanov AS. Monitoring of antimicrobial resistance of staphylococci, agents of intrahospital infection of patients of department of maxillofacial surgery. *Mezhdunarodnyy Nauchno-Issledovatel'skiy Zhurnal*. 2017;(2-2(56)):30–33. (In Russian). doi: 10.23670/IRJ.2017.56.022
- Salgueiro VC, Iorio NL, Ferreira MC, Chamon RC, Santos KR. Methicillin resistance and virulence genes in invasive and nasal *Staphylococcus epidermidis* isolated from neonates. *BMC Microbiol*. 2017;17(1):15. doi: 10.1186/s12866-017-0930-9
- Deyno S, Fekadu S, Seyfe S. Prevalence and antimicrobial resistance of coagulase negative staphylococci clinical isolates from Ethiopia: a meta-analysis. *BMC Microbiol*. 2018;18(1):43. doi: 10.1186/s12866-018-1188-6
- Chon J-W, Lee UJ, Bensen R, West S, Paredes A, Lim J, et al. Virulence characteristics of mecA-positive multidrug-resistant clinical coagulase-negative staphylococci. *Microorganisms*. 2020;8(5):659. doi: 10.3390/microorganisms8050659
- Leclercq R, Cantón R, Brown DFJ, Giske CG, Heisig P, MacGowan AP, et al. EUCAST expert rules in antimicrobial susceptibility testing. *Clin Microbiol Infect*. 2013;19(2):141–60. doi: 10.1111/j.1469-0691.2011.03703.x
- Zyryanov SK, Sychev IN, Gushchina YuS. Current problems of infections caused by MRSA and ways to address them. *Antibiotiki i Khimioterapiya*. 2017;62(7-8):69–79. (In Russian).
- Sergevnin VI, Kluokina TV, Zueva NG, Volkova EO. Resistance to disinfectants hospital strains of *Staphylococcus haemolyticus*, highlighted in the obstetric hospital with non-unity morbidity purulent-septic infections. *Zdorov'e Naseleniya i Sreda Obitaniya*. 2012;(7(232)):18–20. (In Russian).
- Belova EO. [Biofilm infections in pediatrics.] *Bulletin of Medical Internet Conferences*. 2019;9(12):574–576. (In Russian).
- Belyaeva EV, Ermolina GB, Shkurkina IS, Boriskina EV, Kryazhev DV. Evaluation of sensitivity to disinfectants of coagulase-negative staphylococci circulating in a children's hospital. *Zdorov'e Naseleniya i Sreda Obitaniya*. 2019;(8(317)):20–24. (In Russian). doi: 10.35627/2219-5238/2019-317-8-20-24
- Kitti T, Seng R, Thummeepak R, Boonlao C, Jindayok T, Sitthisak S. Biofilm formation of methicillin-resistant coagulase-negative staphylococci isolated from clinical samples in Northern Thailand. *J Global Infect Dis*. 2019;11(3):112–117. doi: 10.4103/jgid.jgid_118_18
- Kornienko MA, Kopyltsov VN, Shevlyagina NV, Didenko LV, Lyubasovskaya LA, Priputnevich TV, et al. The ability of various strains of *Staphylococcus* to create biofilms and their effect on cells of the human body. *Molekulyarnaya Genetika, Mikrobiologiya i Virusologiya*. 2016;34(1):18–25. (In Russian). doi: 10.18821/0208-0613-2016-34-1-18-25