

ИНФЕКЦИОННЫЕ БОЛЕЗНИ INFECTIOUS DISEASES

АНАЛИЗ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ К АНТИБИОТИКАМ КЛИНИЧЕСКИХ ИЗОЛЯТОВ КОАГУЛАЗОНЕГАТИВНЫХ СТАФИЛОКОККОВ

Кононова Л.И.¹,
Лемкина Л.М.¹,
Коробов В.П.^{1,2}

¹ Институт экологии и генетики
микроорганизмов УрО РАН –
филиал ФГБУН Пермского федерального
исследовательского центра УрО РАН
(614081, г. Пермь, ул. Голева, 13, Россия)

² ФГАОУ ВО «Пермский национальный
исследовательский политехнический
университет» (614990, г. Пермь,
Комсомольский просп., 29, Россия)

Автор, ответственный за переписку:
Кононова Людмила Ивановна,
e-mail: kononova_l@iegm.ru

РЕЗЮМЕ

Введение. Возрастающая роль коагулазонегативных стафилококков в возникновении стафилококковых инфекций приводит к необходимости пристального внимания к ним. Требуется особый контроль над чувствительностью бактерий к антибиотикам и распространением метициллинрезистентности как признака множественной устойчивости к антибактериальным препаратам. Важным является и выявление факторов вирулентности коагулазонегативных стафилококков, определяющих их поведение в среде обитания.

Цель исследования. Оценить чувствительность штаммов коагулазонегативных стафилококков к клинически значимым антибиотикам даптомицину, ванкомицину, линезолиду и оксациллину и лантибиотику варнерину.

Методы. Определение минимальных подавляющих рост клинических штаммов коагулазонегативных стафилококков концентраций антибактериальных соединений стандартными методами серийных разведений и диск-диффузионным методом. Выявление феномена сниженной чувствительности бактерий к ванкомицину популяционным анализом и градиентом концентраций. Липидный анализ методом тонкослойной хроматографии.

Результаты. Показана высокая антибактериальная активность ванкомицина, даптомицина и линезолида в отношении клинических штаммов коагулазонегативных стафилококков. Выявлен верхний предел минимальных подавляющих концентраций ванкомицина в рамках чувствительного фенотипа и расширение диапазонов минимальных подавляющих концентраций даптомицина и варнерина в сторону увеличения оксациллинрезистентных изолятов. Установлен гетерогенный характер чувствительности к ванкомицину культур исследованных штаммов и возможность быстрого обогащения их субпопуляциями с пониженной чувствительностью к этому антибиотику. Селекция резистентности коагулазонегативных стафилококков к ванкомицину сопровождалась усилением синтеза лизилфосфатидилглицерина и снижением их чувствительности к катионным пептидным соединениям.

Заключение. Обнаруженное преобладание метициллинрезистентного фенотипа клинических штаммов коагулазонегативных стафилококков, наряду с наличием в липидном спектре универсального фактора устойчивости к катионным антибактериальным соединениям, лизилфосфатидилглицерина, влечёт необходимость в новых методологических решениях диагностики инфекций, вызванных коагулазонегативными стафилококками.

Ключевые слова: гетерорезистентность, ванкомицин, варнерин, даптомицин, лантибиотики, лизилфосфатидилглицерин, линезолид, оксациллин, стафилококки, хоминин

Статья получена: 16.03.2022

Статья принята: 11.05.2022

Статья опубликована: 05.07.2022

Для цитирования: Кононова Л.И., Лемкина Л.М., Коробов В.П. Анализ чувствительности к антибиотикам клинических изолятов коагулазонегативных стафилококков. *Acta biomedica scientifica*. 2022; 7(3): 75-89. doi: 10.29413/ABS.2022-7.3.9

ANTIBIOTIC SENSITIVITY ANALYSIS OF CLINICAL COAGULASE-NEGATIVE STAPHYLOCOCCI

Kononova L.I.¹,
Lemkina L.M.¹,
Korobov V.P.^{1,2}

¹ Institute of Ecology and Genetics
of Microorganisms, Ural Branch Russian
Academy of Sciences (Goleva str. 13,
Perm 614081, Russian Federation)

² Perm National Research Polytechnic
University (Komsomolsky ave. 29, Perm
614990, Russian Federation)

Corresponding author:
Lyudmila I. Kononova,
e-mail: kononova_l@iegm.ru

ABSTRACT

Background. The increasing role of coagulase-negative staphylococci in the occurrence of staphylococcal infections leads to the need for close attention to them. Special control is required over the sensitivity of bacteria to antibiotics and the spread of methicillin resistance, as a sign of multiple resistance to antibacterial drugs. It is also important to identify the virulence factors of coagulase-negative staphylococci, which determine their behavior in the environment.

The aim. To evaluate the sensitivity of strains of coagulase-negative staphylococci to clinically significant antibiotics daptomycin, vancomycin, linezolid and oxacillin and lantibiotic warnerin.

Methods. Determination of the minimal inhibitory concentrations of antibacterial compounds for clinical coagulase-negative staphylococci by standard methods of serial dilutions and disc diffusion. Identification of the phenomenon of decreased susceptibility of bacteria to vancomycin by population analysis and concentration gradient. Lipid analysis by thin layer chromatography.

Results. High antibacterial activity of vancomycin, daptomycin and linezolid against clinical strains of coagulase-negative staphylococci was shown. The upper limit of the minimum inhibitory concentrations of vancomycin within the sensitive phenotype and the expansion of the ranges of the minimum inhibitory concentrations of daptomycin and warnerin towards an increase in oxacillin-resistant isolates were revealed. The heterogeneous nature of sensitivity to vancomycin of the cultures of the studied strains and the possibility of their rapid enrichment with subpopulations with reduced sensitivity to this antibiotic have been established. The selection of resistance of coagulase-negative staphylococci to vancomycin was accompanied by an increase in the synthesis of lysylphosphatidylglycerol and a decrease in their sensitivity to cationic peptide compounds.

Conclusion. The revealed prevalence of the methicillin-resistant phenotype of clinical strains of coagulase-negative staphylococci, along with the presence in the lipid spectrum of the universal factor of resistance to cationic antibacterial compounds, lysylphosphatidylglycerol, entails the need for new methodological solutions for diagnosing infections caused by coagulase-negative staphylococci.

Key words: heteroresistance, vancomycin, warnerin, daptomycin, lantibiotics, lysylphosphatidylglycerol, linezolid, oxacillin, staphylococci, hominin

Received: 16.03.2022
Accepted: 11.05.2022
Published: 05.07.2022

For citation: Kononova L.I., Lemkina L.M., Korobov V.P. Antibiotic sensitivity analysis of clinical coagulase-negative staphylococci. *Acta biomedical scientifica*. 2022; 7(3): 75-89. doi: 10.29413/ABS.2022-7.3.9

Высокая частота выявлений метициллинрезистентных штаммов *Staphylococcus aureus* (MRSA, methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*), как в России, так и в других странах [1], представляет собой серьёзную угрозу их быстрой диссеминации. Несмотря на то, что в последние годы в стационарах России отмечено значительное снижение распространённости устойчивых к метициллину (оксациллину) штаммов *S. aureus*, MRSA сохраняют более высокие по сравнению с MSSA (methicillin-sensitive *Staphylococcus aureus*) уровни резистентности к не-β-лактамам антибиотикам [2]. Кроме того, MRSA являются своеобразными предшественниками гетерогенных по устойчивости к ванкомицину штаммов *S. aureus* [3], что, в свою очередь, может приводить к неблагоприятному исходу лечения этим антибиотиком как MRSA-инфекций [4], так и инфекций, вызванных коагулазонегативными стафилококками (КНС) [5, 6].

Обнаружена определённая связь снижения чувствительности стафилококков к ванкомицину с потерей их чувствительности к катионному антибиотику даптомицину [7], что обусловлено многочисленными изменениями структуры и функций цитоплазматических мембран бактериальных клеток, вызванных, в частности, мутациями в гене *mprF*, определяющем величину их электрического заряда. Было установлено, что продукт этого гена белок MprF является лизилфосфатидилглицеринсинтазой [8].

Метициллинрезистентные коагулазопозитивные стафилококки, как обладающие множественной устойчивостью, включены в список приоритетных бактериальных патогенов [9], однако известно, что частота выявления метициллинрезистентности среди КНС намного превышает таковую среди штаммов *S. aureus* [10]. Штаммы КНС обладают также более высокой устойчивостью к антибиотикам, дезинфектантам и антисептикам, и характеризуются также высокой способностью к образованию биоплёнок [11]. Возрастающая роль КНС как возбудителей внутрибольничных инфекций требует более пристального контроля, поскольку эта группа микроорганизмов недостаточно охвачена соответствующим вниманием исследователей.

В течение нескольких десятилетий проблема формирования резистентности бактерий к антибиотикам приобрела глобальные масштабы и достигла критического уровня ввиду отсутствия новых эффективных антибактериальных соединений. По последним данным Всемирной организации здравоохранения, 43 антибиотических препарата, проходящих в настоящее время клинические испытания в различных странах, по-видимому, не решат в достаточной степени проблемы устойчивости самых опасных в мире бактерий к лекарственным средствам [9], что указывает на острую необходимость разработки нетрадиционных антибактериальных соединений.

Выбор антибактериальных препаратов для тестирования чувствительности к ним стафилококков ограничен антибиотиками, обладающими выраженной активностью в отношении этой группы микроорганизмов. Наиболее часто для этих целей используются β-лактамы антибиотиками: бензилпенициллин (для оценки продук-

ции β-лактамаз) и оксациллин (для оценки наличия дополнительного пенициллинсвязывающего белка ПСБ2а). В качестве альтернативных антибиотиков исследуются также макролиды и линкозамиды, фторхинолоны, ванкомицин, линезолид, даптомицин и хинупристин/дальфопристин [12].

Критерии чувствительности КНС к антибиотикам выражаются в значениях минимальных ингибиторных концентраций (МИК), (мкг/мл), определяемых методами серийных разведений в агаре или бульоне, а также в диаметрах зон подавления роста бактерий (мм) в диффузионных методах. Так, пограничные значения МИК оксациллина могут быть выражены как: ≤ 0,25 мкг/мл – чувствительные, ≥ 0,5 мкг/мл – устойчивые; ванкомицина: ≤ 4 мкг/мл – чувствительные, 8–16 мкг/мл – обладающие средним уровнем устойчивости, ≥ 32 мкг/мл – устойчивые; даптомицина (для *Staphylococcus spp.*): ≤ 1 мкг/мл – чувствительные, ≥ 1 мкг/мл – нечувствительные; линезолида (для *Staphylococcus spp.*): ≤ 4 мкг/мл (≥ 21 мм) – чувствительные, ≥ 8 мкг/мл (≤ 20 мм) – устойчивые [12]. Критерии чувствительности к варнерину для *Staphylococcus spp.* составляют: ≤ 0,25 мкг/мл – чувствительные, > 0,25 мкг/мл – обладающие пониженной чувствительностью [13].

Целью работы явилось изучение *in vitro* антибактериальной активности оксациллина, ванкомицина, даптомицина, линезолида и лантибиотика варнерина в отношении клинических штаммов КНС и выявление корреляции устойчивости этих штаммов с наличием в их клеточных мембранах фосфолипида лизилфосфатидилглицерина.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе изучено 47 из более 2500 клинических штаммов КНС, выделенных в 2015–2016 гг. от пациентов родильных домов г. Перми и идентифицированных в лаборатории клинической диагностики ЦКБ № 7 как *S. haemolyticus* (63 %), *S. cohnii* (27 %), *S. warneri* (6 %) и другие КНС. Один из изолятов был идентифицирован также методом MALDI-TOF MS как *S. haemolyticus*. Культивированием бактерий этого штамма по методу, представленному в ранней работе [14], на питательной среде LB (г/л: триптон (ДИА М, Россия) – 10, дрожжевой экстракт (ДИА М, Россия) – 5, KCl (Biotech, Россия) – 6,4, pH 7,2) с повышающимися концентрациями ванкомицина был получен производный штамм *S. haemolyticus* 18₃₃, цифры в названии которого отражают номер изолята и концентрацию ванкомицина (мкг/мл), к которой он адаптирован. Индуцированные ванкомицином производные *S. haemolyticus* 18 штаммы, адаптированные к 16 и 27 мкг/мл ванкомицина, обозначенные как *S. haemolyticus* 18₁₆ и *S. haemolyticus* 18₂₇, использовались для изучения динамики спектров полярных липидов.

Бактерии *S. cohnii* ВКМ В-3165 и *S. aureus* ATCC 25923 использовались как контроли при определении чувствительности к антибактериальным препаратам.

Бактерии выращивали на среде LB в колбах с перемешиванием на орбитальном шейкере при 150 об./мин и температуре 37 °С.

МИК антибактериальных препаратов ванкомицина (Sigma, США), даптомицина (Novartis Pharma AG, Швейцария), оксациллина (Синтез, Россия), варнерина [15] и хоминина [16] определяли методом двукратных серийных разведений в 96-луночных полистироловых иммунологических планшетах (Медполимер, Россия) с использованием бульона Мюллера – Хинтона (Becton, Dickinson and Company, США) [17]. Инокуляты бактерий готовили из агаровых культур (18–24 ч) при доведении клеточных суспензий до плотности ~0,15 при 600 нм (10^8 КОЕ/мл) на спектрофотометре PD-303 (APEL, Япония), используя кюветы с длиной оптического пути 1 см, и добавляли в лунки планшетов до конечной концентрации 10^5 КОЕ/мл. Культивирование проводили при 37 °С в течение 24 ч. Минимальные концентрации антибактериальных препаратов, при которых отсутствовал видимый рост бактерий, принимали как МИК. Для характеристики чувствительности штаммов клинезолиду использовали метод диффузии с дисков (НИЦФ, Россия, 30 мкг) с использованием агара Мюллера – Хинтона (Becton, Dickinson and Company, США) [12].

МИК антибактериальных соединений для 50 и 90 % исследованных штаммов обозначали как МИК₅₀ и МИК₉₀ соответственно.

Выявление штаммов КНС, потенциально обладающих пониженной чувствительностью к ванкомицину, проводили, модифицируя метод Wootton [18] посевом произвольно выбранного ряда штаммов с различными уровнями устойчивости к антибактериальным препаратам на градиент концентрации ванкомицина (от 0 до 6 мкг/мл) в геле. Градиент концентраций ванкомицина в агаризованной питательной среде ВНИ (Oxoid, Англия) готовили путём внесения в чашку Петри 20 мл расплавленной среды с 6 мкг/мл ванкомицина. Чашку устанавливали под углом 10° до застывания питательной среды. Затем чашку ставили горизонтально и заполняли 20 мл расплавленного и охлаждённого до 45 °С ВНИ-агара. После затвердевания среды чашку выдерживали при комнатной температуре в течение 2 ч, после чего производили посев бактерий с помощью стерильных зондампонов из стандартных суспензий, приготовленных из жидких ночных культур. Учёт результатов проводили через 48 ч инкубации при 37 °С, сравнивая рост бактерий вдоль градиента. Бактерии *S. cohnii* ВКМ В-3165 использовали в качестве отрицательного контроля.

Гетерогенный характер устойчивости бактерий разных штаммов КНС к ванкомицину подтверждали с помощью популяционного анализа [19]. Инокуляты бактерий готовили как для градиента ванкомицина и высевали стандартные клеточные суспензии и их десятикратные серийные разведения на чашки с ВНИ-агаром, содержащим ванкомицин в различных концентрациях (0, 1, 2, 4, 6, 8 и 16 мкг/мл). Образовавшееся количество колоний было подсчитано через 48 ч инкубации при 37 °С. Для построения графика зависимости \log_{10} КОЕ/мл от концентрации ванкомицина и определения площади под кри-

вой (AUC) использовали программу GraphPad Prism 6.0 (GraphPad Software Inc., США). Минимальную концентрацию ванкомицина, ингибирующую появление 99,9 % бактериальных колоний, принимали как МИК [20].

In vitro селекцию бактериальных субпопуляций клинического штамма *S. saprophyticus* 30, обладающих сниженной чувствительностью к ванкомицину, осуществляли путём отбора колоний, выросших на чашках с 6 мкг/мл ванкомицина через 48 ч инкубации в методе популяционного анализа. Эти колонии, обозначенные как субпопуляция 30₆, были отобраны с чашек, ресуспендированы в среде LB и использованы в качестве инокулятов для получения ночных LB-культур с добавлением 1 мкг/мл ванкомицина и без ванкомицина и проведения последующего популяционного анализа. В результате были получены колонии на чашках с 8 мкг/мл ванкомицина и обозначены как субпопуляция 30₈. Далее эти колонии снова были использованы в качестве инокулятов для получения ночных LB-культур (с 2 мкг/мл ванкомицина и без ванкомицина) и постановки нового анализа чувствительности популяции к ванкомицину.

Экстракцию липидов из бактерий проводили по методу Bligh и Dyer [21]. Для тонкослойной хроматографии использовали пластины Sorbfil (сорбент – силикагель, толщина слоя – 110 мкм) (Сорбполимер, Россия). Разделение смеси липидов проводили в системе растворителей «хлороформ – метанол – вода» (65 : 25 : 4 по объёму). После разделения липидов пластины окрашивали раствором 3%-го ацетата меди в 8%-й серной кислоте [22] для определения общего состава липидов, 0,25 % нингидрином в ацетоне – липидов, содержащих свободные аминокгруппы, реактивом Цинцаде – фосфолипидов, α -нафтолом – гликолипидов [23].

Статистический и графический анализ полученных данных проводили с помощью программного обеспечения GraphPad Prism 6.0 (GraphPad Software Inc., США). Данные представляли в виде $M \pm SD$ трёх независимых экспериментов. Для величин МИК значения указаны в пределах точности $\pm 1 \log_2$ разведения.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Анализ чувствительности клинических штаммов КНС к антибиотикам (табл. 1) показал, что все они обладали чувствительностью к гликопептидному антибиотику ванкомицину с МИК от $\leq 0,5$ до 4 мкг/мл, причём для 50 % изолятов МИК ванкомицина составляла 2 мкг/мл. Другие клинически значимые препараты для лечения стафилококковых инфекций – липопептидный антибиотик даптомицин (~90 % чувствительных) и линезолид (~81 % чувствительных) – также обладали высокой антибактериальной активностью в отношении исследованных штаммов КНС. Наименьшая активность действия была установлена для оксациллина (~30 % чувствительных) и лантибиотика варнерина (~6 % чувствительных).

Важно отметить двукратное возрастание МИК₅₀ и МИК₉₀ ванкомицина для оксациллинустойчивых штаммов по сравнению с чувствительными к этому антибио-

ТАБЛИЦА 1
ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ ИСПОЛЬЗОВАННЫХ В РАБОТЕ
КОАГУЛАЗОНЕГАТИВНЫХ СТАФИЛОКОККОВ ($n = 47$)
К АНТИБИОТИКАМ

Антибиотик	Диапазон значений МИК (мкг/мл)	% чувствительных	МИК (мкг/мл)	
			50 %	90 %
Ванкомицин	0,5–4	100	2	4
Оксациллин	≤ 0,25 – ≥ 512	29,8	32	≥ 512
Даптомицин	≤ 0,25–4	88	0,5	1
Варнерин	≤ 0,25 – ≥ 512	6,4	8	64
Линезолид*	≤ 4 – ≥ 8	80,9	≤ 4	≥ 8

Примечание. * – здесь и далее: интерпретация результатов дискодиффузионного теста.

TABLE 1
SENSITIVITY OF THE COAGULASE-NEGATIVE
STAPHYLOCOCCI USED IN THE WORK ($n = 47$)
TO ANTIBIOTICS

ТАБЛИЦА 2
АКТИВНОСТЬ АНТИБИОТИКОВ В ОТНОШЕНИИ
ОКСАЦИЛЛИНЧУВСТВИТЕЛЬНЫХ ($n = 14$)
И ОКСАЦИЛЛИНУСТОЙЧИВЫХ ($n = 33$)
КОАГУЛАЗОНЕГАТИВНЫХ СТАФИЛОКОККОВ

Антибиотик	Диапазон значений МИК (мкг/мл)	% чувствительных	МИК (мкг/мл)	
			50 %	90 %
Чувствительные к оксациллину ($n = 14$)				
Ванкомицин	0,5–2	100	1	2
Даптомицин	≤ 0,25–2	85,7	0,5	1
Варнерин	≤ 0,25–128	14,3	8	32
Линезолид	≤ 4 – ≥ 8	78,5	≤ 4	≥ 8
Устойчивые к оксациллину ($n = 33$)				
Ванкомицин	0,5–4	100	2	4
Даптомицин	≤ 0,25–4	87,9	0,5	1
Варнерин	≤ 0,25 – ≥ 512	3	8	256
Линезолид	≤ 4 – ≥ 8	84,8	≤ 4	≥ 8

TABLE 2
ACTIVITY OF ANTIBIOTICS AGAINST OXACILLIN-SENSITIVE
($n = 14$) AND OXACILLIN-RESISTANT ($n = 33$)
COAGULASE-NEGATIVE STAPHYLOCOCCI

тику бактериями (табл. 2), для оксациллинустойчивых также выявлено восьмикратное увеличение МИК₉₀ варнерина.

Установлено перекрёстное увеличение МИК оксациллина и варнерина для КНС при возрастании МИК ванкомицина. Так, в таблице 3 представлены три группы штаммов: с МИК ванкомицина ≤ 1 мкг/мл ($n = 12$; 25,5 %), среди которых ~67 % штаммов чувствительны к оксациллину и 16,7 % – к варнерину; с МИК ванкомицина 2 мкг/мл ($n = 27$; 57,4 %) – 22 и 3,7 % штаммов чувствительны к оксациллину и варнерину, соответственно; стафилококки, для которых МИК ванкомицина составляет 4 мкг/мл ($n = 8$; 17 %), резистентны к оксациллину и варнерину.

При исследовании мембранных липидов клинических стафилококков выявлено наличие в них лизилфос-

фатидилглицерина (лизил-ФГ+) у 93,6 % ($n = 44$) штаммов, для которых характерно кроме устойчивости к варнерину (8 и 64 мкг/мл, МИК₅₀ и МИК₉₀ варнерина соответственно) и снижение чувствительности ко всем исследуемым антибиотикам в сравнении со стафилококками, не содержащими в липидном составе этого фосфолипида (лизил-ФГ-) (табл. 4). Сравнительный анализ липидного состава мембран исследованных штаммов стафилококков представлен на рисунке 1, из которого видно, что общими главными липидными компонентами мембран являются фосфатидилглицерин, кардиолипин и гликолипиды, при этом присутствие в их липидном составе принципиального фосфолипида лизил-ФГ придаёт им устойчивость к варнерину, характерную для бактерий *S. aureus*.

ТАБЛИЦА 3
ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ К АНТИБИОТИКАМ
КОАГУЛАЗОНЕГАТИВНЫХ СТАФИЛОКОККОВ (n = 47)
С РАЗЛИЧНОЙ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬЮ К ВАНКОМИЦИНУ

TABLE 3
ANTIBIOTIC SUSCEPTIBILITY OF COAGULASE-NEGATIVE
STAPHYLOCOCCI (n = 47) WITH VARYING SUSCEPTIBILITY
TO VANCOMYCIN

Антибиотик	Диапазон значений МИК (мкг/мл)	% чувствительных	МИК (мкг/мл)	
			50 %	90 %
Штаммы с МИК ванкомицина ≤ 1 мкг/мл (n = 12)				
Оксациллин	≤ 0,25–64	66,7	≤ 0,25	64
Даптомицин	≤ 0,25–1	100	≤ 0,25	1
Варнерин	≤ 0,25–128	16,7	8	32
Линезолид	≤ 4 – ≥ 8	75	≤ 4	≥ 8
Штаммы с МИК ванкомицина 2 мкг/мл (n = 27)				
Оксациллин	≤ 0,25 – ≥ 512	22,2	256	≥ 512
Даптомицин	≤ 0,25–4	81,4	0,5	2
Варнерин	≤ 0,25–128	3,7	8	64
Линезолид	≤ 4 – ≥ 8	77,8	≤ 4	≥ 8
Штаммы с МИК ванкомицина 4 мкг/мл (n = 8)				
Оксациллин	8 – ≥ 512	0	≥ 512	≥ 512
Даптомицин	≤ 0,25–2	87,5	0,5	2
Варнерин	2 – ≥ 512	0	8	≥ 512
Линезолид	≤ 4	100	≤ 4	≤ 4

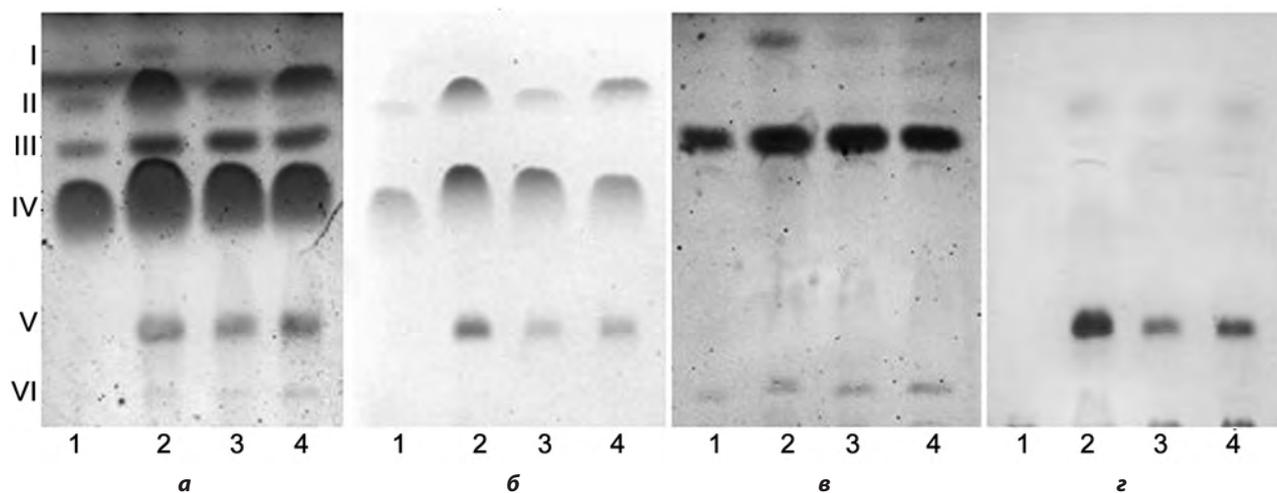


РИС. 1.
Тонкослойная хроматография полярных липидов стафилококков *S. cohnii* VKM B-3165 (1), *S. aureus* ATCC 25923 (2), *S. haemolyticus* 18 (3), *S. saprophyticus* 19 (4); окрашивание на общие липиды (а), фосфолипиды (б), гликолипиды (в), липиды, содержащие первичную аминогруппу (г); гликолипид (I), кардиолипин (II), гликолипид (III), фосфатидилглицерин (IV), лизилфосфатидилглицерин (V), гликолипид (VI)

FIG. 1.
Thin-layer chromatography of polar lipids of *S. cohnii* VKM B-3165 (1), *S. aureus* ATCC 25923 (2), *S. haemolyticus* 18 (3), *S. saprophyticus* 19 (4); staining for total lipids (a), phospholipids (b), glycolipids (c), lipids containing a primary amino group (d); glycolipid (I), cardiolipin (II), glycolipid (III), phosphatidylglycerol (IV), lysylphosphatidylglycerol (V), glycolipid (VI)

ТАБЛИЦА 4
ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ К АНТИБИОТИКАМ
КОАГУЛАЗОНЕГАТИВНЫХ СТАФИЛОКОККОВ
(n = 47) В ЗАВИСИМОСТИ ОТ НАЛИЧИЯ
ЛИЗИЛФОСФАТИДИЛГЛИЦЕРИНА (ЛИЗИЛ-ФГ)

TABLE 4
ANTIBIOTIC SENSITIVITY OF COAGULASE-NEGATIVE
STAPHYLOCOCCI (n = 47) DEPENDING ON THE PRESENCE
OF LYSYLPHOSPHATIDYLGLYCEROL (LYSYL-PG)

Антибиотик	Диапазон значений МИК (мкг/мл)	% чувствительных	МИК (мкг/мл)	
			50 %	90 %
Штаммы, лизил-ФГ- (n = 3)				
Оксациллин	≤ 0,25–4	66,7	≤ 0,25	4
Даптомицин	≤ 0,25–1	100	0,5	1
Ванкомицин	≤ 0,25–1	100	0,5	1
Варнерин	≤ 0,25	100	≤ 0,25	≤ 0,25
Линезолид	≤ 4	100	≤ 4	≤ 4
Штаммы, лизил-ФГ+ (n = 44)				
Оксациллин	≤ 0,25 – ≥ 512	25	64	≥ 512
Даптомицин	≤ 0,25 – 4	88,6	0,5	2
Ванкомицин	0,5–4	100	2	4
Варнерин	1 – ≥ 512	0	8	64
Линезолид	≤ 4 – ≥ 8	75,9	≤ 4	≥ 8

Исследование чувствительности к антибиотикам при формировании устойчивости к ванкомицину клинического изолята *S. haemolyticus* 18 показало (табл. 5), что оба штамма, исходный и производный, устойчивый ванкомицину (*S. haemolyticus* 18₃₃), обладают одинаковой чувствительностью к фузидину, линкомицину, хлорамфениколу, линезолиду, тетрациклину и рифампицину и характеризуются перекрёстной устойчивостью к группе β-лактамовых антибиотиков, аминогликозидам, макролидам и хинолонам. Они также обладают резистентностью к лантибиотикам варнерину и хоминину. Изучение динамики липидного состава клинического штамма *S. haemolyticus* 18 при формировании его устойчивости к ванкомицину выявило постепенное увеличение площадей и интенсивности окрашивания пятен лизил-ФГ на пластинах ТСХ, свидетельствующее о возрастании его содержания в составе мембран по сравнению с базовым уровнем, характерным для родительского штамма (рис. 2). Это, вероятно, определяет более чем двукратное повышение МИК лантибиотиков варнерина и хоминина и антибиотика даптомицина для производного штамма *S. haemolyticus* 18₃₃. Интересно отметить появление гликолипидов в липидных спектрах производных штаммов, что может также способствовать приобретению ими новых свойств, не типичных для родительского штамма *S. haemolyticus* 18.

Гетерогенная природа чувствительности кванкомицину была выявлена у трёх из пяти произвольно выбранных клинических КНС, МИК антибиотиков которых представ-

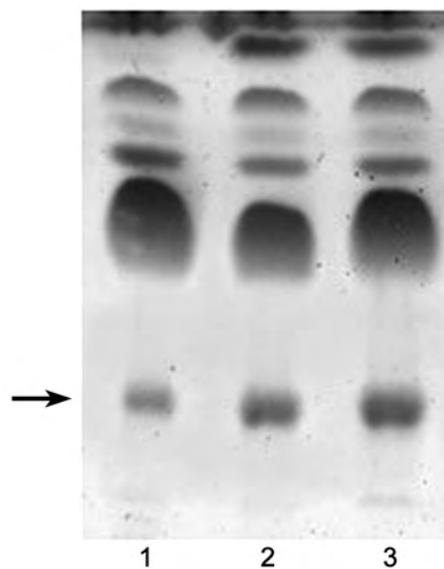


РИС. 2.
Визуализация увеличения концентрации лизилфосфатидилглицерина при формировании устойчивости к ванкомицину бактерий *S. haemolyticus* 18 (1), *S. haemolyticus* 18₁₆ (2), *S. haemolyticus* 18₂₇ (3)

FIG. 2.
Visualization of increasing concentration of lysylphosphatidylglycerol during the development of resistance to vancomycin in bacteria *S. haemolyticus* 18 (1), *S. haemolyticus* 18₁₆ (2), *S. haemolyticus* 18₂₇ (3)

ТАБЛИЦА 5
МИНИМАЛЬНЫЕ ИНГИБИТОРНЫЕ КОНЦЕНТРАЦИИ
АНТИБИОТИКОВ И ЛАНТИБИОТИКОВ ДЛЯ БАКТЕРИЙ
***S. HAEMOLYTICUS* 18, ЧУВСТВИТЕЛЬНЫХ И УСТОЙЧИВЫХ**
К ВАНКОМИЦИНУ

TABLE 5
MINIMUM INHIBITORY CONCENTRATIONS OF ANTIBIOTICS
AND LANTIBIOTICS FOR *S. HAEMOLYTICUS* 18 BACTERIA
SENSITIVE AND RESISTANT TO VANCOMYCIN

Антибиотик	МИК (мкг/мл)	
	<i>S. haemolyticus</i> 18	<i>S. haemolyticus</i> 18 ₃₃
Гликопептиды		
Ванкомицин	2	16
В-лактамы		
Бензилпенициллин	≥ 0,25	≥ 0,25
Цефалексин	≥ 32	≥ 32
Оксациллин	≥ 512	≥ 512
Фузидин	≤ 0,25	≤ 0,25
Аминогликозиды		
Гентамицин	≥ 16	≥ 16
Макролиды		
Эритромицин	≥ 8	≥ 8
Линкозамиды		
Линкомицин	≤ 2	≤ 2
Фениколы		
Хлорамфеникол	6,25	6,25
Оксазолидиноны		
Линезолид	≤ 4	≤ 4
Хинолоны		
Ципрофлоксацин	≥ 4	≥ 4
Тетрациклин	≤ 4	≤ 4
Рифампицин	0,0005	0,0005
Даптомицин	0,5	1,5
Варнерин	≥ 256	≥ 512
Хоминин	≥ 80	≥ 300

ТАБЛИЦА 6
АНТИБИОТИКОЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ ШТАММОВ
КОАГУЛАЗОНЕГАТИВНЫХ СТАФИЛОКОККОВ,
ИССЛЕДОВАННЫХ МЕТОДОМ ПОПУЛЯЦИОННОГО
АНАЛИЗА

TABLE 6
ANTIBIOTIC SENSITIVITY OF COAGULASE-NEGATIVE
STAPHYLOCOCCI STUDIED BY POPULATION ANALYSIS

Штамм	МИК (мкг/мл)			
	Оксациллин	Даптомицин	Варнерин	Ванкомицин*
<i>S. cohnii</i> BKM B-3165	≤ 0,25	≤ 0,25	≤ 0,25	1 (1,5)
<i>S. haemolyticus</i> 18	≥ 512	≤ 0,5	≥ 256	2 (2)
<i>S. saprophyticus</i> 19	≥ 512	≤ 0,5	≥ 8	2 (3)
<i>S. saprophyticus</i> 30	≥ 512	≤ 0,25	≥ 1	2 (4)
<i>S. saprophyticus</i> 34	≤ 0,25	≤ 2	≥ 8	2 (3)
<i>S. saprophyticus</i> 42	≤ 0,25	≤ 1	≤ 0,25	2 (3,5)

Примечание. * – МИК ванкомицина, установленная методом двукратных разведений (в скобках – МИК ванкомицина, установленная популяционным анализом)

лены в таблице 6. На диаграммах популяционного анализа видно, что в культурах *S. saprophyticus* 30, *S. saprophyticus* 34 и *S. saprophyticus* 42 присутствуют бактерии с частотой $< 10^{-7}$, способные к росту на среде с 6 мкг/мл ванкомицина (рис. 3в, г, д). Бактерии этих же штаммов были способны к росту вдоль градиента концентраций ванкомицина за пределами роста чувствительных бактерий *S. cohnii* VKM B-3165. При расчёте площади гистограмм (AUC), прямо пропорционально отражающей степень гетерогенно-

сти популяций, показано, что для стафилококков, способных к росту в широком диапазоне концентраций ванкомицина, значение AUC существенно превышает AUC чувствительных бактерий *S. cohnii* VKM B-3165.

Обогащение культуры *S. saprophyticus* 30 субпопуляциями клеток с пониженной чувствительностью к ванкомицину происходило довольно быстро, популяционный анализ селективно полученных культур представлен на рис. 4. Для бактерий субпопуляции *S. saprophyticus* 30,

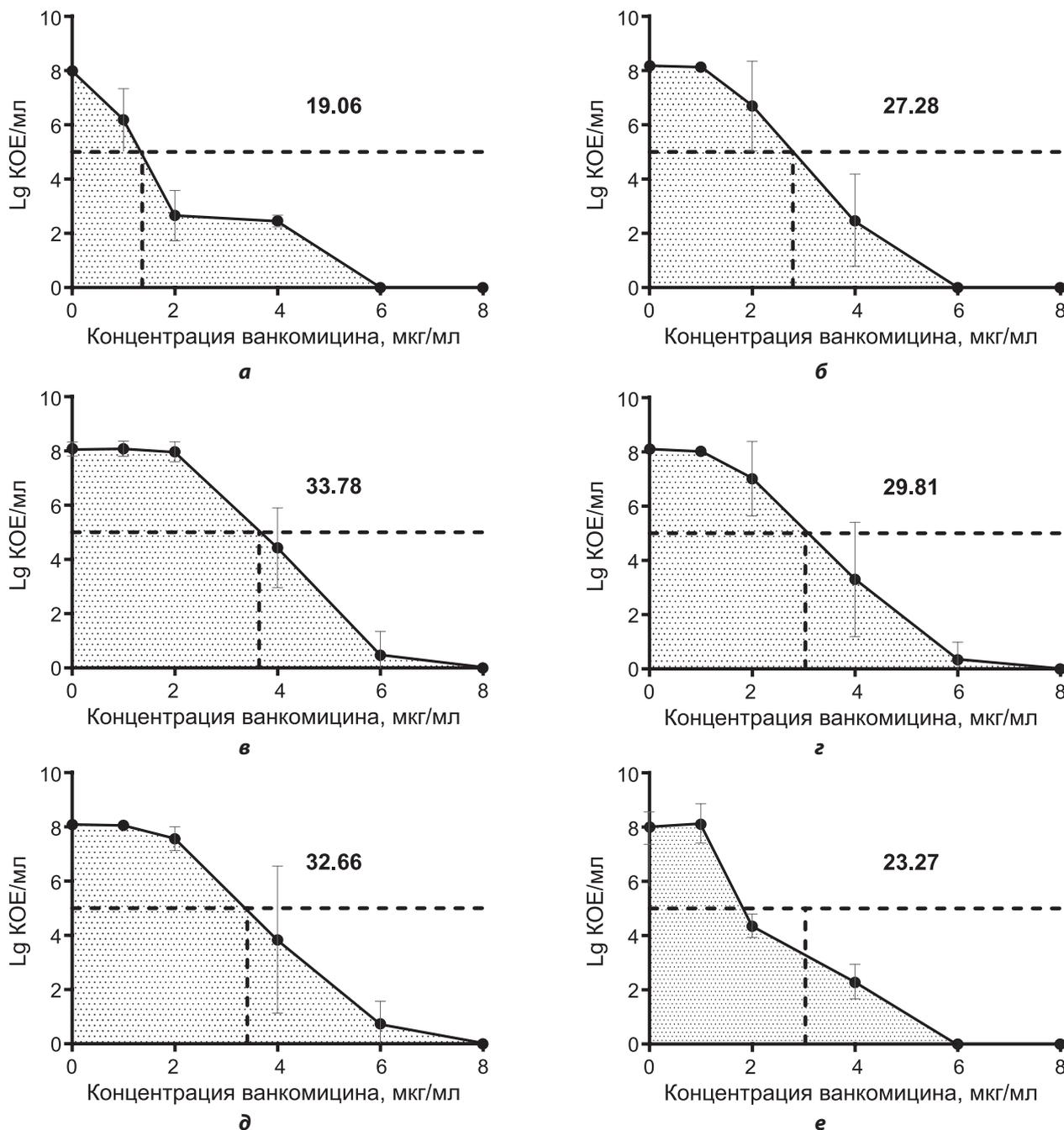


РИС. 3. Популяционный анализ чувствительности к ванкомицину коагулазонегативных стафилококков *S. cohnii* VKM B-3165 (а), *S. saprophyticus* 19 (б), *S. saprophyticus* 30 (в), *S. saprophyticus* 34 (г), *S. saprophyticus* 42 (д), *S. haemolyticus* 18 (е); значения AUC нанесены на графики

FIG. 3. Population analysis of sensitivity to vancomycin of coagulase-negative staphylococci *S. cohnii* VKM B-3165 (a), *S. saprophyticus* 19 (б), *S. saprophyticus* 30 (в), *S. saprophyticus* 34 (г), *S. saprophyticus* 42 (д), *S. haemolyticus* 18 (е); AUC values plotted on graphs

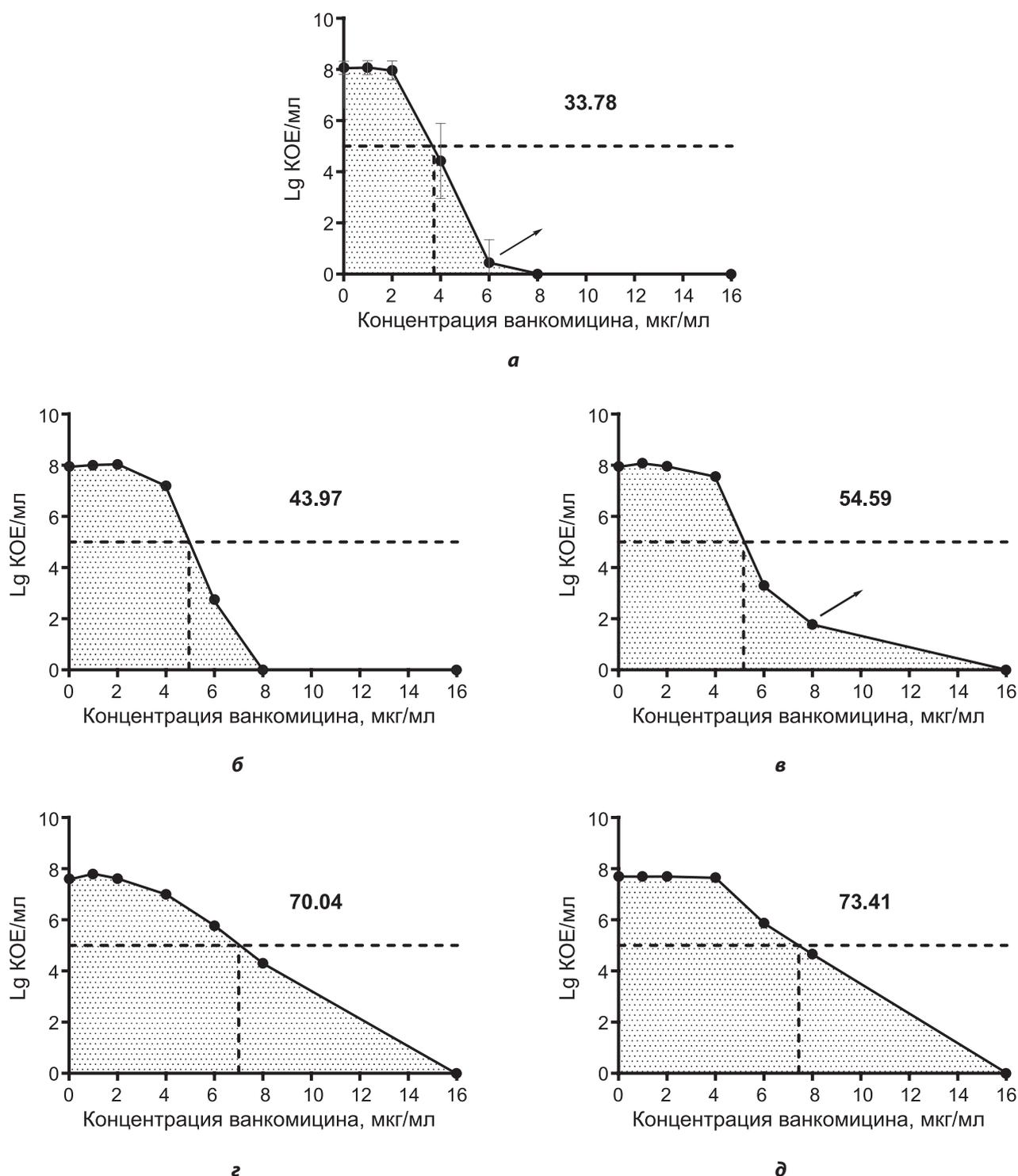


РИС. 4.

Селекция резистентных к ванкомицину бактерий *S. saprophyticus* 30: популяционный анализ исходной культуры (а), субпопуляции *S. saprophyticus* 30_г без предынкубации с ванкомицином (б), субпопуляции *S. saprophyticus* 30_г с предварительным культивированием в присутствии 1 мкг/мл ванкомицина (в), субпопуляции *S. saprophyticus* 30_г без предынкубации с ванкомицином (г), субпопуляции *S. saprophyticus* 30_г с предварительным культивированием в присутствии 2 мкг/мл ванкомицина (д); моменты отбора колоний обозначены стрелками; значения AUC нанесены на графики

FIG. 4.

Selection of vancomycin-resistant bacteria *S. saprophyticus* 30: population analysis of the initial culture (a), subpopulation of *S. saprophyticus* 30_g without preincubation with vancomycin (б), subpopulation of *S. saprophyticus* 30_g with precultivation in the presence of 1 μg/ml vancomycin (в), subpopulations of *S. saprophyticus* 30_g without preincubation with vancomycin (г), subpopulations of *S. saprophyticus* 30_g with preculture in the presence of 2 μg/ml vancomycin (д); the moments of selection of colonies are indicated by arrows; AUC values plotted on graphs

ТАБЛИЦА 7

СЕЛЕКЦИЯ *IN VITRO* СУБПОПУЛЯЦИЙ
S. SAPROPHYTICUS 30, ОБЛАДАЮЩИХ ПОНИЖЕННОЙ
ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬЮ К ВАНКОМИЦИНУ

TABLE 7

IN VITRO SELECTION OF SUBPOPULATIONS
OF *S. SAPROPHYTICUS* 30 WITH REDUCED SENSITIVITY
TO VANCOMYCIN

Бактерии	МИК ванкомицина (мкг/мл)			AUC
	Метод двукратных разведений		Популяционный анализ, 48 ч	
	24 ч	48 ч		
<i>S. saprophyticus</i> 30	2	2	4	33,78
30 ₆ без предынкубации с ванкомицином	2,5	2,5	5	43,97
30 ₆ предынкубация с ванкомицином, 1 мкг/мл	2,5	2,5	5,5	54,59
30 ₈ без предынкубации с ванкомицином	2,5	5	7	70,04
30 ₈ предынкубация с ванкомицином, 2 мкг/мл	2,5	5	7,5	73,41

МИК ванкомицина составляла 5 мкг/мл, а частота обнаружения бактерий, способных к росту, на среде с концентрацией ванкомицина 6 мкг/мл возрастала до 10^{-5} (рис. 4б, в). Кроме того, инкубация *S. saprophyticus* 30₆ в присутствии ванкомицина приводила к появлению бактерий, способных расти на среде с концентрацией ванкомицина 8 мкг/мл (рис. 4б). Для бактерий субпопуляции *S. saprophyticus* 30₈ МИК ванкомицина составляла уже 7 мкг/мл, а частота появления клеток, способных к образованию колоний, в присутствии 8 мкг/мл ванкомицина возрастала до 10^{-3} (рис. 4г, д). Таким образом, значения МИК ванкомицина для субпопуляций бактерий со сниженной чувствительностью к этому гликопептиду, установленные методом двукратных разведений, оказались существенно ниже значений МИК, полученных популяционным анализом (табл. 7).

ОБСУЖДЕНИЕ

Результатами наших исследований антибиотикорезистентности клинических КНС, выделенных от пациентов ряда стационаров г. Перми, показана прямая зависимость чувствительности стафилококков к лантибиотикам и гликопептиду ванкомицину от уровня их чувствительности к оксациллину.

Подобное явление не является редким для клинических КНС. Так, стафилококки, выделенные от пациентов кардиохирургического стационара, обладали устойчивостью к оксациллину ($\geq 70\%$ изолятов). Вместе с тем данные изоляты обладали перекрёстной устойчивостью к антибиотикам из других групп: аминогликозидам, макролидам и фторхинолонам, но были чувствительны к ванкомицину, линезолиду, даптомицину и тигециклину. Однако среди этих штаммов присутствовал изолят *S. warneri* с МИК ванкомицина ≥ 32 мкг/мл, устойчивый ко всем исследованным антибиотикам, кроме тигециклина [24].

Стафилококки с пониженной чувствительностью к гликопептидным антибиотикам, как правило, обладают

устойчивостью к нескольким антибактериальным препаратам [25]. Метициллинрезистентные стафилококки обладают пониженной чувствительностью к гликопептидным антибиотикам [26, 27]. В связи с этим, перед исследователями перманентно стоит задача по разработке стратегий подавления стафилококковых инфекций. Для этого проводится разработка новых антибиотических препаратов [28–30] и поиск комбинаций антибиотиков, действующих бактерицидно на клетки полирезистентных микроорганизмов [31].

Одним из перспективных направлений решения проблемы антибиотикорезистентности является стратегия воздействия на ключевые факторы вирулентности бактерий. Одним из таких факторов является белок MprF (multiple peptide resistance factor) [32]. Это интегральный белок, осуществляющий две функции в клетках *S. aureus*: синтез лизил-ФГ посредством переноса положительно заряженной аминокислоты лизина с т-РНК на ФГ внутренней стороны клеточной мембраны, а также перенос зрелого лизил-ФГ на её внешнюю сторону. Благодаря этому процессу происходит «разбавление» общего отрицательного заряда бактериальной клетки, способствующего снижению сродства бактериальной поверхности к амфипатическим катионным антибактериальным соединениям. Подобные MprF белки, обнаруженные в широком ряду грамположительных и грамотрицательных бактерий, также участвуют в синтезе аминоацилированных производных фосфатидилглицерина, что обеспечивает им устойчивость в стрессовых условиях [33].

В нашем исследовании также показано абсолютное преобладание среди изученных клинических стафилококков бактерий, имеющих лизил-ФГ в клеточных мембранах. Для этих штаммов КНС установлено очевидное увеличение диапазонов МИК в сторону повышения для всех использованных в работе антибактериальных препаратов по сравнению с МИК антибиотиков для штаммов, не обладающих этим фосфолипидом. Более того, нами было выявлено увеличение уровня лизил-ФГ в клетках штамма *S. haemolyticus* 18 при его

адаптации к росту на средах с повышающимися концентрациями ванкомицина. Это в очередной раз доказывает роль лизил-ФГ в формировании особых свойств поверхности бактерий, способствующих снижению общего отрицательного заряда. Вследствие этого возникает устойчивость бактерий к катионным антибактериальным соединениям, как это показано для золотистых стафилококков [34].

Выявление клинических штаммов стафилококков со сниженной чувствительностью к ванкомицину представляет определённую трудность в связи с тем, что обычные методы определения чувствительности к этому антибиотику (диффузионный, разведений в агаре или бульоне) не способны обнаружить малочисленные субпопуляции резистентных к нему клеток [35, 36]. Однако использование инокулятов с большей концентрацией клеток, богатых питательных сред и более длительного времени культивирования для тестирования чувствительности к ванкомицину приводит к выявлению в бактериальных популяциях гетерорезистентности по данному признаку. Надёжными для выявления *S. aureus* (но не КНС) со сниженной чувствительностью к ванкомицину методами, являются скрининг на ВНИ агаре с 4 [4] и 6 мкг/мл ванкомицина [17], а также градиент его концентраций в геле, Е-тест [37] и популяционный анализ. Для повышения степени воспроизводимости результатов популяционного анализа предложены некоторые его вариации, заключающиеся в использовании автоматических устройств для инокулирования и последующего подсчёта колоний [18]. Модификацией дискдиффузионного метода для обнаружения гетерогенного фенотипа чувствительности стафилококков к ванкомицину является снижение количества ванкомицина в диске, что способствует увеличению чувствительности и специфичности метода по сравнению с использованием стандартных дисков [38]. Также целесообразно определение способности стафилококков к продукции δ -гемолизина, поскольку они являются маркерной характеристикой стафилококков, обладающих сниженной чувствительностью к ванкомицину [39]. Интерпретация результатов всех перечисленных методов должна производиться на основании характеристик штаммов *S. aureus* Mu 3 и Mu 50, которые являются образцами гетерогенного (h-VRSA) и интермедиатного фенотипа (VISA) соответственно [4].

Ввиду отсутствия разработанных критериев для определения гетерогенной природы устойчивости бактерий КНС к ванкомицину, метод популяционного анализа, несмотря на его трудоёмкость, является наиболее демонстративным. Выявленные в настоящей работе резистентные к ванкомицину субпопуляции нескольких штаммов КНС позволяют предположить, что гетерорезистентность к ванкомицину среди стафилококков является распространённым феноменом. Однако данное заключение требует проведения аналогичного популяционного анализа на более обширных выборках клинических изолятов КНС и разработки алгоритма детекции гетерогенных по чувствительности к ванкомицину штаммов КНС.

Финансирование

Работа выполнена в рамках государственного задания «Молекулярные механизмы адаптации микроорганизмов к факторам среды», регистрационный номер НИОКТР АААА-А19-119112290009-1.

Конфликт интересов

Авторы данной статьи заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Благодарность

Авторы выражают признательность старшему научному сотруднику лаборатории биохимии развития микроорганизмов «ИЭГМ УрО РАН», к.б.н. Полудовой Татьяне Вячеславовне за помощь в написании статьи.

ЛИТЕРАТУРА

1. Дехнич А.В., Никулин А.А., Рябкова Е.Л., Кречикова О.И., Сухорукова М.В., Козлов Р.С. и др. Эпидемиология резистентности штаммов *S. aureus*, выделенных от пациентов в ОПИТ российских стационаров: результаты многоцентрового исследования. *Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия*. 2008; 10(4): 333-344.
2. Романов А.В., Дехнич А.В., Сухорукова М.В., Скленова Е.Ю., Иванчик Н.В., Эйдельштейн М.В. и др. Антибиотикорезистентность нозокомиальных штаммов *Staphylococcus aureus* в стационарах России: результаты многоцентрового эпидемиологического исследования «Марафон» в 2013–2014. *Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия*. 2017; 19(1): 57-62.
3. Зайцев А.А., Карпов О.И., Сидоренко С.В. Стафилококки и ванкомицин: тенденции противостояния. *Антибиотики и химиотерапия*. 2003; 48(6): 20-26.
4. Hiramoto K, Aritaka N, Hanaki H, Kawasaki S, Hosoda Y, Hori S, et al. Dissemination in Japanese hospitals of strains of *Staphylococcus aureus* heterogeneously resistant to vancomycin. *Lancet*. 1997; 350(9092): 1670-1673. doi: 10.1016/S0140-6736(97)07324-8
5. Center KJ, Reboli AC, Hubler R, Rodgers GL, Long SS. Decreased vancomycin susceptibility of coagulase-negative staphylococci in a neonatal intensive care unit: Evidence of spread of *Staphylococcus warneri*. *J Clin Microbiol*. 2003; 41(10): 4660-4665. doi: 10.1128/JCM.41.10.4660-4665.2003
6. Cremniter J, Slassi A, Quincampoix JC, Sivadon-Tardy V, Bauer T, Porcher R, et al. Decreased susceptibility to teicoplanin and vancomycin in coagulase-negative staphylococci isolated from orthopedic-device-associated infections. *J Clin Microbiol*. 2010; 48(4): 1428-14231. doi: 10.1128/JCM.02098-09
7. Jones T, Yeaman MR, Sakoulas G, Yang SJ, Proctor RA, Sahl HG, et al. Failures in clinical treatment of *Staphylococcus aureus* infection with daptomycin are associated with alterations in surface charge, membrane phospholipid asymmetry, and drug binding. *Antimicrob Agents Chemother*. 2008; 52(1): 269-278. doi: 10.1128/AAC.00719-07
8. Oku Y, Kurokawa K, Ichihashi N, Sekimizu K. Characterization of the *Staphylococcus aureus* mprF gene, involved in lysinylation of phosphatidylglycerol. *Microbiology (Reading)*. 2004; 150(1): 45-51. doi: 10.1099/mic.0.26706-0

9. World Health Organization, Antimicrobial Resistance Division. *2020 antibacterial agents in clinical and preclinical development: An overview and analysis*. Geneva, Switzerland; 2021. URL: <https://www.who.int/publications/i/item/9789240021303> [date of access: 11.05.2022].
10. Сабирова Е.В., Гординская Н.А., Абрамова Н.В., Некаева Е.С. Антибиотикорезистентность нозокомиальных штаммов *Staphylococcus* spp., выделенных в ожоговом центре в 2002–2008 гг. *Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия*. 2010; 12(1): 77-81.
11. Becker K, Heilmann C, Peters G. Coagulase-negative staphylococci. *Clin Microbiol Rev*. 2014; 27(4): 870-926. doi: 10.1128/CMR.00109-13
12. Clinical and laboratory standards institute (CLSI). *Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; twenty-fourth informational supplement*. 2014: 34(1).
13. Полюдова Т.В., Лемкина Л.М., Лихацкая Г.Н., Коробов В.П. Оптимизация условий получения и моделирование 3D-структуры нового антибактериального пептида семейства лантибиотиков. *Прикладная биохимия и микробиология*. 2017; 53(1): 47-54. doi: 10.7868/S0555109917010147
14. Кононова Л.И., Коробов В.П. Физиологические особенности устойчивого к ванкомицину штамма *Staphylococcus epidermidis* 33 GISK VAN R. *Микробиология*. 2015; 84(1): 58-67. doi: 10.7868/S0026365615010061
15. Коробов В.П., Лемкина Л.М., Полюдова Т.В., Акименко В.К. Выделение и характеристика нового низкомолекулярного антибактериального пептида семейства лантибиотиков. *Микробиология*. 2010; 79(2): 228-238.
16. Коробов В.П., Лемкина Л.М., Полюдова Т.В. *Антибактериальный пептид хоминин KLP-1 широкого спектра действия*: Патент № 2528055 Рос. Федерация; МПК С07К 14/31 (2006.01), А61К 38/16 (2006.01), С12R 1/44 (2006.01); заявитель и патентообладатель Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт экологии и генетики микроорганизмов Уральского отделения Российской академии наук. № 2012125512/10; заявл. 19.06.2012; опубл. 10.09.2014. 2014; (25).
17. Clinical and laboratory standards institute (CLSI). *Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically. Approved standard; 9th edition*. 2012: 32(2).
18. Wootton M, Howe RA, Hillman R, Walsh TR, Bennett PM, MacGowan AP. A modified population analysis profile (PAP) method to detect hetero-resistance to vancomycin in *Staphylococcus aureus* in a UK hospital. *J Antimicrob Chemother*. 2001; 47(4): 399-403. doi: 10.1093/jac/47.4.399
19. Hanaki H, Hiramatsu K. Detection methods of glycopeptideresistant *Staphylococcus aureus* I: Susceptibility testing. *Antibiotic Resistance. Methods in Molecular Medicine™*. Ed. SH Gillespie. Humana Press; 2001; 48: 85-92. doi: 10.1385/1-59259-077-2:85
20. Sieradzki K, Roberts RB, Haber SW, Tomasz A. The development of vancomycin resistance in a patient with methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection. *New Engl J Med*. 1999; 340(7): 517-523. doi: 10.1056/NEJM199902183400704
21. Bligh EG, Dyer WJ. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can J Biochem Physiol*. 1959; 37(8): 911-917. doi: 10.1139/o59-099
22. Fewster ME, Burns BJ, Mead JF. Quantitative densitometric thin-layer chromatography of lipids using copper acetate reagent. *J Chromatogr*. 1969; 43(1): 120-126. doi: 10.1016/s0021-9673(00)99173-8
23. Кейтс М. *Техника липидологии. Выделение, анализ и идентификация липидов*. М.: Мир; 1975.
24. Граничная Н.В., Зайцева Е.А., Переломова О.В. Резистентность коагулазонегативных стафилококков, выделенных из различного биоматериала у пациентов кардиохирургического профиля. *Тихоокеанский медицинский журнал*. 2019; 2(76): 38-42. doi: 10.17238/PmJ1609-1175.2019.2.28-42
25. Kelley PG, Gao W, Ward PB, Howden BP. Daptomycin non-susceptibility in vancomycin-intermediate *Staphylococcus aureus* (VISA) and heterogeneous-VISA (hVISA): Implications for therapy after vancomycin treatment failure. *J Antimicrob Chemother*. 2011; 66(5): 1057-1060. doi: 10.1093/jac/dkr066
26. Howden BP, Johnson PDR, Ward PB, Stinear TP, Davies JK. Isolates with low-level vancomycin resistance associated with persistent methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* bacteremia. *Antimicrob Agents Chemother*. 2006; 50(9): 3039-3047. doi: 10.1128/AAC.00422-06
27. Pinheiro L, Brito CI, Pereira VC, de Oliveira A, Camargo CH, Cunha M de L. Reduced susceptibility to vancomycin and biofilm formation in methicillin-resistant *Staphylococcus epidermidis* isolated from blood cultures. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2014; 109(7): 871-878. doi: 10.1590/0074-0276140120
28. Barber KE, Werth BJ, Ireland CE, Stone NE, Nonejuie P, Sakoulas G, et al. Potent synergy of ceftobiprole plus daptomycin against multiple strains of *Staphylococcus aureus* with various resistance phenotypes. *J Antimicrob Chemother*. 2014; 69(11): 3006-3010. doi: 10.1093/jac/dku236
29. Chopra L, Singh G, Taggar R, Dwivedi A, Nandal J, Kumar P, et al. Antimicrobial peptides from bacterial origin: Potential alternative to conventional antibiotics. *High Value Fermentation Products*; ed. by S. Saran, V. Babu, A. Chuabey. Scrivener; 2019: 193-204. doi: 10.1002/9781119460053.ch8
30. Werth BJ, Vidailac C, Murray KP, Newton KL, Sakoulas G, Nonejuie P, et al. Novel combinations of vancomycin plus ceftaroline or oxacillin against methicillin-resistant vancomycin-intermediate *Staphylococcus aureus* (VISA) and heterogeneous VISA. *Antimicrob Agents Chemother*. 2013; 57(5): 2376-2379. doi: 10.1128/AAC.02354-12
31. Mun S-H, Kang O-H, Joung D-K, Kim S-B, Choi J-G, Shin D-W, et al. In vitro anti-MRSA activity of carvone with gentamicin. *Exp Ther Med*. 2014; 7(4): 891-896. doi: 10.3892/etm.2014.1498
32. Ernst CM, Peschel A. Broad-spectrum antimicrobial peptide resistance by MprF-mediated aminoacylation and flipping of phospholipids. *Mol Microbiol*. 2011; 80(2): 290-299. doi: 10.1111/j.1365-2958.2011.07576.x
33. Geiger O, González-Silva N, López-Lara IM, Sohlenkamp C. Amino acid-containing membrane lipids in bacteria. *Prog Lipid Res*. 2010; 49(1): 46-60. doi: 10.1016/j.plipres.2009.08.002
34. Peschel A, Jack RW, Otto M, Collins LV, Staubitz P, Nicholson G, et al. *Staphylococcus aureus* resistance to human defensins and evasion of neutrophil killing via the novel virulence factor MprF is based on modification of membrane lipids with L-lysine. *J Exp Med*. 2001; 193(9): 1067-1076. doi: 10.1084/jem.193.9.1067
35. Satola SW, Farley MM, Anderson KF, Patel JB. Comparison of detection methods for heteroresistant vancomycin-intermediate *Staphylococcus aureus*, with the population analysis profile method as the reference method. *J Clin Microbiol*. 2011; 49(1): 177-183. doi: 10.1128/JCM.01128-10

36. Sieradzki K, Villari P, Tomasz A. Decreased susceptibilities to teicoplanin and vancomycin among coagulase-negative methicillin-resistant clinical isolates of staphylococci. *Antimicrob Agents Chemother.* 1998; 42(1): 100-107. doi: 10.1128/AAC.42.1.100

37. Walsh TR, Bolmstrom A, Qvarnstrom A, Ho P, Wootton M, Howe RA, et al. Evaluation of current methods for detection of staphylococci with reduced susceptibility to glycopeptides. *J Clin Microbiol.* 2001; 39(7): 2439-2444. doi: 10.1128/JCM.39.7.2439-2444.2001

38. Lulitanond A, Chanawong A, Sribenjalux P, Kaewkes W, Vorachit M, Chongtrakool P, et al. Detection of heterogeneous, intermediate-vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* (hVISA) using low-concentration vancomycin disks. *Southeast Asian J Trop Med Public Health.* 2006; 37(4): 761-767.

39. Cafiso V, Bertuccio T, Spina D, Purrello S, Campanile F, Di Pietro C, et al. Modulating activity of vancomycin and daptomycin on the expression of autolysis cell-wall turnover and membrane charge genes in hVISA and VISA strains. *PLoS One.* 2012; 7(1): e29573. doi: 10.1371/journal.pone.0029573

REFERENCES

1. Dekhnich AV, Nikulin AA, Rjabkova EL, Krechikova OI, Suhorukova MV, Kozlov RS, et al. Epidemiology of antimicrobial resistance of *S. aureus* isolated from ICU patients in Russia: Results of prospective multicenter study. *Clinical Microbiology and Antimicrobial Chemotherapy.* 2008; 10(4): 333-344. (In Russ.).

2. Romanov AV, Dekhnich AV, Sukhorukova MV, Skleeno-va EYu, Ivanchik NV, Edelstein MV, et al. Antimicrobial resistance of nosocomial *Staphylococcus aureus* isolates in Russia: Results of multicenter epidemiological study «MARATHON» 2013-2014. *Clinical Microbiology and Antimicrobial Chemotherapy.* 2017; 19(1): 57-62. (In Russ.).

3. Zaitsev AA, Karpov OI, Sidorenko SV. Staphylococci and vancomycin: Trends in confrontation. *Antibiotics and Chemotherapy.* 2003; 48(6): 20-26. (In Russ.).

4. Hiramatsu K, Aritaka N, Hanaki H, Kawasaki S, Hosoda Y, Hori S, et al. Dissemination in Japanese hospitals of strains of *Staphylococcus aureus* heterogeneously resistant to vancomycin. *Lancet.* 1997; 350(9092): 1670-1673. doi: 10.1016/S0140-6736(97)07324-8

5. Center KJ, Reboli AC, Hubler R, Rodgers GL, Long SS. Decreased vancomycin susceptibility of coagulase-negative staphylococci in a neonatal intensive care unit: evidence of spread of *Staphylococcus warneri*. *J Clin Microbiol.* 2003; 41(10): 4660-4665. doi: 10.1128/JCM.41.10.4660-4665.2003

6. Cremniter J, Slassi A, Quincampoix JC, Sivadon-Tardy V, Bauer T, Porcher R, et al. Decreased susceptibility to teicoplanin and vancomycin in coagulase-negative staphylococci isolated from orthopedic-device-associated infections. *J Clin Microbiol.* 2010; 48(4): 1428-14231. doi: 10.1128/JCM.02098-09

7. Jones T, Yeaman MR, Sakoulas G, Yang SJ, Proctor RA, Sahl HG, et al. Failures in clinical treatment of *Staphylococcus aureus* infection with daptomycin are associated with alterations in surface charge, membrane phospholipid asymmetry, and drug binding. *Antimicrob Agents Chemother.* 2008; 52(1): 269-278. doi: 10.1128/AAC.00719-07

8. Oku Y, Kurokawa K, Ichihashi N, Sekimizu K. Characterization of the *Staphylococcus aureus* mprF gene, involved in lysinyla-

tion of phosphatidylglycerol. *Microbiology (Reading).* 2004; 150(1): 45-51. doi: 10.1099/mic.0.26706-0

9. World Health Organization, Antimicrobial Resistance Division. *2020 antibacterial agents in clinical and preclinical development: An overview and analysis.* Geneva, Switzerland; 2021. URL: <https://www.who.int/publications/i/item/9789240021303> [date of access: 11.05.2022].

10. Sabirova EV, Gordinskaya NA, Abramova NV, Nekaeva ES. Antimicrobial resistance of nosocomial staphylococci isolated from burn center patients in 2002-2008. *Clinical Microbiology and Antimicrobial Chemotherapy.* 2010; 12(1): 77-81. (In Russ.).

11. Becker K, Heilmann C, Peters G. Coagulase-negative staphylococci. *Clin Microbiol Rev.* 2014; 27(4): 870-926. doi: 10.1128/CMR.00109-13

12. Clinical and laboratory standards institute (CLSI). *Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; twenty-fourth informational supplement.* 2014: 34(1).

13. Polyudova TV, Lemkina LM, Korobov VP, Likhatskaya GN. Optimization of production conditions and 3D-structure modeling of novel antibacterial peptide of lantibiotic family. *Prikladnaya biokhimiya i mikrobiologiya.* 2017; 53(1): 40-46. (In Russ.). doi: 10.1134/S0003683817010148

14. Kononova LI, Korobov VP. Physiological properties of the vancomycin-resistant strain *Staphylococcus epidermidis* 33 GISK VANR. *Microbiology (Mikrobiologiya).* 2015; 84(1): 41-48. (In Russ.). doi: 10.7868/S0026365615010061

15. Korobov VP, Lemkina LM, Polyudova TV, Akimenko VK. Isolation and characterization of a new low-molecular antibacterial peptide of the lantibiotics family. *Microbiology (Mikrobiologiya).* 2010; 79(2): 206-215. (In Russ.).

16. Korobov VP, Lemkina LM, Polyudova TV. Broad spectrum antibacterial peptide hominin KLP-1: Patent N 2528055 of the Russian Federation. 2014; (25). (In Russ.).

17. Clinical and laboratory standards institute (CLSI). *Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically. Approved standard; 9th edition.* 2012: 32(2).

18. Wootton M, Howe RA, Hillman R, Walsh TR, Bennett PM, MacGowan AP. A modified population analysis profile (PAP) method to detect hetero-resistance to vancomycin in *Staphylococcus aureus* in a UK hospital. *J Antimicrob Chemother.* 2001; 47(4): 399-403. doi: 10.1093/jac/47.4.399

19. Hanaki H, Hiramatsu K. Detection methods of glycopeptideresistant *Staphylococcus aureus* I: Susceptibility testing. *Antibiotic Resistance. Methods in Molecular Medicine™.* Ed. SH Gillespie. Humana Press; 2001; 48: 85-92. doi: 10.1385/1-59259-077-2:85

20. Sieradzki K, Roberts RB, Haber SW, Tomasz A. The development of vancomycin resistance in a patient with methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection. *New Engl J Med.* 1999; 340(7): 517-523. doi: 10.1056/NEJM199902183400704

21. Bligh EG, Dyer WJ. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can J Biochem Physiol.* 1959; 37(8): 911-917. doi: 10.1139/o59-099

22. Fewster ME, Burns BJ, Mead JF. Quantitative densitometric thin-layer chromatography of lipids using copper acetate reagent. *J Chromatogr.* 1969; 43(1): 120-126. doi: 10.1016/s0021-9673(00)99173-8

23. Kates M. *Techniques of lipidology. Isolation, analysis and identification of lipids.* Moscow: Mir Publishing House; 1975. (In Russ.).

24. Granichnaya NV, Zaytseva EA, Perelomova OV. Resistance of coagulase negative staphylococci recovered from different bio-materials in cardiac patients. *Pacific Medical Journal*. 2019; 2(76): 38-42. (In Russ.). doi: 10.17238/PmJ1609-1175.2019.2.28-42
25. Kelley PG, Gao W, Ward PB, Howden BP. Daptomycin non-susceptibility in vancomycin-intermediate *Staphylococcus aureus* (VISA) and heterogeneous-VISA (hVISA): Implications for therapy after vancomycin treatment failure. *J Antimicrob Chemother*. 2011; 66(5): 1057-1060. doi: 10.1093/jac/dkr066
26. Howden BP, Johnson PDR, Ward PB, Stinear TP, Davies JK. Isolates with low-level vancomycin resistance associated with persistent methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* bacteremia. *Antimicrob Agents Chemother*. 2006; 50(9): 3039-3047. doi: 10.1128/AAC.00422-06
27. Pinheiro L, Brito CI, Pereira VC, de Oliveira A, Camargo CH, Cunha M de L. Reduced susceptibility to vancomycin and biofilm formation in methicillin-resistant *Staphylococcus epidermidis* isolated from blood cultures. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2014; 109(7): 871-878. doi: 10.1590/0074-0276140120
28. Barber KE, Werth BJ, Ireland CE, Stone NE, Nonejuie P, Sakoulas G, et al. Potent synergy of ceftobiprole plus daptomycin against multiple strains of *Staphylococcus aureus* with various resistance phenotypes. *J Antimicrob Chemother*. 2014; 69(11): 3006-3010. doi: 10.1093/jac/dku236
29. Chopra L, Singh G, Taggar R, Dwivedi A, Nandal J, Kumar P, et al. Antimicrobial peptides from bacterial origin: Potential alternative to conventional antibiotics. *High Value Fermentation Products*; ed. by S. Saran, V. Babu, A. Chuabey. Scrivener; 2019: 193-204. doi: 10.1002/9781119460053.ch8
30. Werth BJ, Vidailac C, Murray KP, Newton KL, Sakoulas G, Nonejuie P, et al. Novel combinations of vancomycin plus ceftaroline or oxacillin against methicillin-resistant vancomycin-intermediate *Staphylococcus aureus* (VISA) and heterogeneous VISA. *Antimicrob Agents Chemother*. 2013; 57(5): 2376-2379. doi: 10.1128/AAC.02354-12
31. Mun S-H, Kang O-H, Joung D-K, Kim S-B, Choi J-G, Shin D-W, et al. In vitro anti-MRSA activity of carvone with gentamicin. *Exp Ther Med*. 2014; 7(4): 891-896. doi: 10.3892/etm.2014.1498
32. Ernst CM, Peschel A. Broad-spectrum antimicrobial peptide resistance by MprF-mediated aminoacylation and flipping of phospholipids. *Mol Microbiol*. 2011; 80(2): 290-299. doi: 10.1111/j.1365-2958.2011.07576.x
33. Geiger O, González-Silva N, López-Lara IM, Sohlenkamp C. Amino acid-containing membrane lipids in bacteria. *Prog Lipid Res*. 2010; 49(1): 46-60. doi: 10.1016/j.plipres.2009.08.002
34. Peschel A, Jack RW, Otto M, Collins LV, Staubitz P, Nicholson G, et al. *Staphylococcus aureus* resistance to human defensins and evasion of neutrophil killing via the novel virulence factor MprF is based on modification of membrane lipids with L-lysine. *J Exp Med*. 2001; 193(9): 1067-1076. doi: 10.1084/jem.193.9.1067
35. Satola SW, Farley MM, Anderson KF, Patel JB. Comparison of detection methods for heteroresistant vancomycin-intermediate *Staphylococcus aureus*, with the population analysis profile method as the reference method. *J Clin Microbiol*. 2011; 49(1): 177-183. doi: 10.1128/JCM.01128-10
36. Sieradzki K, Villari P, Tomasz A. Decreased susceptibilities to teicoplanin and vancomycin among coagulase-negative methicillin-resistant clinical isolates of staphylococci. *Antimicrob Agents Chemother*. 1998; 42(1): 100-107. doi: 10.1128/AAC.42.1.100
37. Walsh TR, Bolmstrom A, Qwarnstrom A, Ho P, Wootton M, Howe RA, et al. Evaluation of current methods for detection of staphylococci with reduced susceptibility to glycopeptides. *J Clin Microbiol*. 2001; 39(7): 2439-2444. doi: 10.1128/JCM.39.7.2439-2444.2001
38. Lulitanond A, Chanawong A, Sribenjalux P, Kaewkes W, Vorachit M, Chongtrakool P, et al. Detection of heterogeneous, intermediate-vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* (hVISA) using low-concentration vancomycin disks. *Southeast Asian J Trop Med Public Health*. 2006; 37(4): 761-767.
39. Cafiso V, Bertuccio T, Spina D, Purrello S, Campanile F, Di Pietro C, et al. Modulating activity of vancomycin and daptomycin on the expression of autolysis cell-wall turnover and membrane charge genes in hVISA and VISA strains. *PLoS One*. 2012; 7(1): e29573. doi: 10.1371/journal.pone.0029573

Сведения об авторах

Коновова Людмила Ивановна – ведущий инженер лаборатории биохимии развития микроорганизмов, Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН – филиал ФГБУН Пермского федерального исследовательского центра УрО РАН, e-mail: kononova_l@iegm.ru, <https://orcid.org/0000-0002-5056-8177>

Лемкина Лариса Марковна – старший научный сотрудник лаборатории биохимии развития микроорганизмов, Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН – филиал ФГБУН Пермского федерального исследовательского центра УрО РАН, e-mail: l.lemkina@iegm.ru, <https://orcid.org/0000-0001-8473-771X>

Коробов Владимир Павлович – кандидат медицинских наук, доцент кафедры химии и биотехнологии, ФGAOU BO «Пермский национальный исследовательский политехнический университет»; заведующий лабораторией биохимии развития микроорганизмов, «Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН» – филиал ФГБУН Пермского федерального исследовательского центра УрО РАН, e-mail: korobov@iegm.ru, <https://orcid.org/0000-0003-3475-8285>

Information about the authors

Ljudmila I. Kononova – Leading Engineer at the Laboratory of Biochemistry of Microbial Development, Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms, Ural Branch Russian Academy of Sciences, e-mail: kononova_l@iegm.ru, <https://orcid.org/0000-0002-5056-8177>

Larisa M. Lemkina – Senior Research Officer at the Laboratory of Biochemistry of Microbial Development, Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms, Ural Branch Russian Academy of Sciences, e-mail: l.lemkina@iegm.ru, <https://orcid.org/0000-0001-8473-771X>

Vladimir P. Korobov – Cand. Sc. (Med.), Associate Professor at the Department of Chemistry and Biotechnology, Perm National Research Polytechnic University; Head of the Laboratory of Biochemistry of the Development of Microorganisms, Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms, Ural Branch Russian Academy of Sciences, e-mail: korobov@iegm.ru, <https://orcid.org/0000-0003-3475-8285>

Статья опубликована в рамках Второй Всероссийской научной конференции с международным участием «Механизмы адаптации микроорганизмов к различным условиям среды обитания».