DOI: <https://doi.org/10.34883/Pl.2021.10.4.008>
УДК 616.5-001.47-079:579.861.2

Ярец Ю.И.¹, Шевченко Н.И.¹, Еремин В.Ф.²

¹ Республиканский научно-практический центр радиационной медицины и экологии человека, Гомель, Беларусь

² Республиканский научно-практический центр трансфузиологии и медицинских биотехнологий, Минск, Беларусь

Yarets Y.¹, Shevchenko N.¹, Eremin V.²

¹ Republican Scientific and Practical Center for Radiation Medicine and Human Ecology, Gomel, Belarus

² Republican Scientific and Practical Center for Transfusiology and Medical Biotechnologies, Minsk, Belarus

Патогенный и персистентный биопрофили клинических изолятов *Staphylococcus aureus*, выделенных из ран: визуализация комплекса признаков методами многомерного разведочного анализа

Pathogenic and Persistent Bioprofiles of Clinical Isolates of *Staphylococcus Aureus* Isolated from Wounds: Visualization of a Complex of Features Using Multivariate Exploratory Data Analysis

Резюме

Введение. Течение и прогноз инфекционного процесса зависят от патогенного потенциала условно-патогенных бактерий, а также способности иммунных защитных сил организма противостоять их влиянию. Последние реализуются за счет персистентных механизмов – формирования биопленки и действия антифакторов. Оценка биологических свойств клинических изолятов существенно расширит информативность микробиологического анализа, а использование адекватных методов многомерной статистики даст возможность определить критерии, характеризующие патогенный и персистентный биопрофили.

Цель. Оценить основные микробиологические признаки клинических штаммов *S. aureus* и определить комплексы лабораторных критериев, соответствующих патогенному или персистентному биопрофилю изолята.

Материалы и методы. Выполнен анализ основных свойств каждого из 248 изолятов *S. aureus*, выделенных из раневого отделяемого пациентов. Оценивали лецитиназную (ЛВ), гемолитическую (ГЕМ), протеолитическую (ПР), фибринолитическую (ФЛ) активность, ферментацию маннита (М), адгезивную (АА), антикомплементарную (АКА), антилизотимную (АЛА), антиинтерфероновую (АИА) активность и др. Определяли гены формирования биопленки (*icaAD*, *icaBC*, *icaR*); степень продукции биопленки оценивали спектрофотометрически. Чувствительность к антибактериальным средствам *S. aureus* анализировалась фенотипическими методами.

Для статистической обработки результатов использовали иерархический кластерный анализ и канонический анализ соответствий.

Результаты. Персистентный биопротип клинических изолятов *S. aureus* (ica+, ica-) определялся активным образованием биопленки, средним или высоким уровнями антикомплемента, антилизотической, антиинтерфероновой и фибринолитической активностью. Изоляты обладали низкой адгезивной активностью, могли не проявлять 1–2 из идентификационных признаков, характеризовались резистентностью, выделялись в составе ассоциации, а также после использования среды обогащения. Персистентные *S. aureus* обнаруживались в хронических локальных ранах и обширных ожоговых ранах. Патогенный биопротип был характерен для ica+ *S. aureus*, неактивно образующих биопленку, проявляющих низкий уровень АКА, АЛА, АИА, проявляющих чувствительность к антибиотикам. Такие *S. aureus*, обнаруживаемые в монокультуре с первичного посева, являлись ГЕМ+, ЛВ+, ПР+, М+, показывали высокую АА и были характерны для острых локальных ран сроком до 3 недель.

Заключение. Выявлена зависимость проявления свойств *S. aureus* от клинических особенностей раны, определены сочетания критериев, характеризующие патогенный и персистентный биопротипы. Практическое значение выполненного исследования заключается в расширении диагностических возможностей микробиологического анализа, оптимизации интерпретации результатов посева, оценки этиологической значимости.

Ключевые слова: *Staphylococcus aureus*, раны, патогенный биопротип, персистентный биопротип, ассоциативные бактерии.

Abstract

Introduction. The course and prognosis of the infectious process depends on the pathogenic potential of opportunistic bacteria and the ability to resist the protective mechanisms of immunity. The latter are overcome due to persistent signs – the formation of biofilms and the action of anti-factors. Assessment of the biological properties of clinical isolates will significantly expand the information content of microbiological analysis, and the use of adequate methods of multivariate statistics will make it possible to determine the criteria that determine the pathogenic and persistent potential.

Purpose. To assess the main microbiological signs of clinical strains of *S. aureus* and to determine the complexes of laboratory criteria corresponding to the pathogenic or persistent bioprofile of the isolate.

Materials and methods. The analysis of the main biological properties in 248 *S. aureus* strains isolated from the wound swabs of patients was carried out. Lecithinase (LV), hemolytic (HEM), proteolytic (PR), fibrinolytic (FL) activity, mannitol fermentation (M), adhesive (AA), anti-complementary (ACA), antilysozyme (ALA), anti-interferon (AIA) activity, etc. were determined. biofilm formation genes (icaAD, icaBC, icaR), the phenotypic degree of biofilm production was assessed using spectrophotometric detection. The antibiotic sensitivity of *S. aureus* was assessed by phenotypic methods. For statistical processing of the results, hierarchical cluster analysis and canonical correspondence analysis were used.

Results. The persistent bioprofile of *S. aureus* (ica+, ica-) was determined by active biofilm formation, medium or high levels of ACA, ALA, AIA, and FL activity. Isolates had a low AA, could not show 1–2 of the identification characters, were characterized by resistance, were isolated within the association, and also after using the enrichment medium. Persistent *S. aureus* has been found in chronic localized wounds and extensive burn wounds. The pathogenic bioprofile was typical for ica+ *S. aureus*, inactively forming a biofilm, exhibiting low levels of ACA, ALA, and AIA, and exhibiting sensitivity to antibiotics. Such *S. aureus* found in monoculture from the primary culture were HEM+, LV+, PR+, M+, showed high AA and were typical for acute local wounds up to 3 weeks.

Conclusion. The dependence of the manifestation of the properties of *S. aureus* on the clinical features of the wound was revealed; combinations of criteria characterizing the pathogenic and persistent bioprofile were determined. The practical value lies in expanding the diagnostic capabilities of microbiological analysis, optimizing the interpretation of inoculation results, and assessing the etiological significance.

Keywords: *Staphylococcus aureus*, wounds, pathogenic bioprofile, persistent bioprofile, associative bacteria.

■ ВВЕДЕНИЕ

Staphylococcus aureus относится к потенциальным патогенам, вызывающим множество инфекционных заболеваний, среди которых наиболее актуальными являются инфекции кожи и мягких тканей. Особое внимание к исследованию патогенного потенциала *S. aureus* проявляется сотрудниками отделений хирургического профиля, и прежде всего – реанимации и интенсивной терапии, ожоговой травмы [1].

Патогенный потенциал *S. aureus* обусловлен скоординированной деятельностью ряда выделяемых им токсинов и ферментов, а также белков на бактериальной поверхности, которые связывают внеклеточные матричные и плазмменные белки организма человека. *S. aureus* проявляет адгезивную активность к кожному покрову, для колонизации и инвазии использует гемолизины, лецитиназу, фибринолизин, плазмокоагулазу, ДНК-азу и другие факторы. Особое значение имеет способность *S. aureus* к синтезу β -лактамаз, которые разрушают структуру β -лактамовых антибиотиков [2, 3].

Выделение микроорганизма в диагностическом титре $>10^5$ КОЕ/мл на фоне характерной клинической картины острого гнойного процесса (отек мягких тканей, гиперемия, боль, повышение местной температуры, нарушение функции) не вызывает сомнений в этиологической значимости микробного фактора. С другой стороны, при нечеткой клинической картине в случаях хронизации воспаления и нарушения процесса заживления раны интерпретация результатов микробиологического исследования может представлять трудности [4, 5].

В настоящее время большое внимание уделяется изучению механизмов формирования патогенных адаптационно измененных бактериальных возбудителей инфекций в условиях пребывания организма в состоянии стресса (вызываемого, например, действием антибактериальных средств (АБС), физических методов лечения), при которых бактерии изменяют свою метаболическую активность и приобретают персистентные свойства. Такие бактерии обычно выявляются при хронических инфекциях и, как правило, присутствуют в биопленках. Другими их характеристиками является измененная адгезивная активность и экспрессия генов вирулентности, а также продукция протеаз, которые обуславливают антилизоцимные, антикомплемментарные, антиинтерфероновые свойства [2]. В ряде случаев нарушаются культуральные характеристики, поэтому такие бактерии могут не давать роста при первичном диагностическом посеве. При попадании в благоприятные условия роста, в том числе в среде обогащения, персистентные формы

бактерий быстро рекультивируются с восстановлением (реверсией) своей вирулентности [6, 7]. В таких случаях переоценка отрицательных результатов первичного диагностического посева клинического материала может обусловить неправильную тактику лечения, а также создать условия для внутрибольничного распространения рекультивированных бактерий.

Полученные в течение последних десятилетий данные об адаптационных механизмах возбудителей инфекций, обуславливающих мобильность биологических свойств, актуализировали научный и практический интерес к разработке методов обнаружения персистентных форм бактерий. Специальные флуоресцентные зонды для исследования метаболической активности и мониторинга жизнеспособности бактерий, молекулярно-генетические методы, технология MALDI-ToF/MS используются в ходе выполнения научных исследований по выявлению вегетативных и персистентных клеточных форм. Однако для широкого практического применения в клинической микробиологии весьма важным является поиск доступных методов детекции, основанных на фенотипических проявлениях адаптивной изменчивости бактерий в стрессовых условиях.

■ ЦЕЛЬ ИССЛЕДОВАНИЯ

Оценить основные микробиологические признаки клинических штаммов *S. aureus* и определить комплексы лабораторных критериев, соответствующих патогенному или персистентному биопрофилю изолята.

■ МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объектом исследования явились 248 изолятов *S. aureus*, выделенных из раневого отделяемого пациентов ожогового отделения и отделения ожоговой реанимации ГУЗ «Гомельская городская клиническая больница № 1» г. Гомеля в период 2011–2020 гг. Анализировали изоляты *S. aureus* (n=71), полученные в динамике из обширных ран пациентов с ожоговой болезнью (ОБ) (n=33), изоляты *S. aureus* (n=72), полученные из острых локальных ран (срок раны до 3 недель), и изоляты *S. aureus* (n=105) хронических локальных ран (срок раны более 3 недель).

При представлении количества *S. aureus* объединяли изоляты, полученные в количестве $\leq 10^5$ КОЕ/мл (КОЕ 3) и $> 10^5$ КОЕ/мл (КОЕ 2). В результате посева также учитывались изоляты *S. aureus*, выделенные со среды обогащения – триптиказо-соевого бульона (КОЕ 1). У изолятов *S. aureus* оценивали основные свойства [8]: каталазную, лецитиназную (ЛВ), гемолитическую (ГЕМ), ДНК-азную, протеолитическую (ПР), фибринолитическую активность (ФЛ), реакцию плазмокоагуляции, ферментации маннита (М) (применяли солевой агар с маннитом с добавлением эмульсии яичного желтка). При интерпретации результатов оценки адгезивной активности (АА) использовали индекс адгезивности микроорганизмов (ИАМ) – среднее количество микробных клеток на эритроците. При ИАМ $\leq 1,75$ штаммы *S. aureus* считали неадгезивными (АА 0), при ИАМ в диапазоне от 1,76 до 2,5 – низкоадгезивными (АА 1), при ИАМ от 2,51 до 4,0 – среднеадгезивными (АА 2), при ИАМ $\geq 4,1$ – высокоадгезивными (АА 3) [9]. Исследование антикомплементарной

активности (АКА) и антилизоцимной активности (АЛА) проводили по общепринятым методам. Для определения АКА в качестве индикаторной культуры использовали штамм *Escherichia coli*, для определения АЛА – штамм *Microsoccus luteus*. При интерпретации результатов определения АКА штаммы считали активными при инактивации комплемента в концентрации 50 ЕД/мл (АКА 3), умеренно активными – в концентрации 25 ЕД/мл (АКА 2), низкоактивными – в концентрации 12,5 ЕД/мл (АКА 1), неактивными (АКА 0) [10]. За уровень АЛА исследуемых культур принимали максимальное значение концентрации лизоцима в среде, при которой еще наблюдается рост индикаторного штамма. Для интерпретации результатов исследования использовали следующие критерии оценки: отсутствие активности (АЛА 0); низкая: 1–2 (АЛА 1) мкг/мл; умеренная: 3–5 мкг/мл (АЛА 2); выраженная: более 5 мкг/мл (АЛА 3) [11]. Для исследования антиинтерфероновой активности (АИА) определялась антагонистическая активность исследуемого штамма по отношению к индикаторному штамму *Corynebacterium xerosis* при росте в питательном агаре, содержащем препарат человеческого лейкоцитарного интерферона [12]. При этом АИА исследуемого штамма считали высокой при инактивации интерферона в концентрации более 2 ед. (АИА 3), средней – от 1,1–2 ед. (АИА 2) и низкой – 1 ед. (АИА 1), отсутствует (АИА 0).

В изолятах *S. aureus* методом ПЦР определяли гены *ica* оперона, ответственного за синтез биопленки – *icaAD*, *icaBC*, гена-репрессора *icaR* (праймеры производства «Праймтех», Республика Беларусь) (табл. 1).

Оценку фенотипической способности штаммов *S. aureus* формировать биопленку выполняли методом спектрофотометрической детекции с использованием иммуноферментного ридера Sirio, Seac Radium Group (Италия) [16]. Для окраски основного вещества (ОВ) биопленки использовали Конго красный, для окраски биомассы (БМ) – генцианвиолет. Результат выражали в единицах оптической плотности (ОД). Контролем (ОДк) служили лунки, в которые добавляли только жидкую питательную среду без бактерий. Отсутствию способности к образованию ОВ (ОВ 0) или накоплению БМ (БМ 0) соответствовали значения $OD \leq 0,115$ ед. для экстрактов Конго красный / этанол и генцианвиолет/ этанол соответственно. Низкая способность (ОВ 1, БМ 1) определялась пределами ОД от 0,115 до 0,230 ед., умеренная (ОВ 2, БМ 2) – 0,230 до 0,460 ед., выраженная (ОВ 3, БМ 3) – $>0,460$ ед. [17].

Таблица 1
Характеристики праймеров для проведения ПЦР

Table 1
Characteristics of primers for PCR

Название / Title	Последовательность / Subsequence	Температура отжига / Annealing temperature	Источник литературы / References
icaAD F	5'TATTCAATTTACAGTCGCAC 3'	55°C	[13]
icaAD R	5' GATTCTCTCCCTCTTGCCA 3'		
icaBC F	5' GCCTATCCTTATGGCTTGA 3'	55°C	[14]
icaBC R	5'TGGAATCCGTCCCATCTC 3'		
icaR F	5'TACTGTCTCCTAATAATCCCGAA 3'	53°C	[15]
icaR R	5'GGTACGATGGTACTACACTTGATG 3'		

Определение чувствительности *S. aureus* к АБС проводилось фенотипическими методами: диско-диффузионным на среде Мюллера – Хинтона с использованием анализаторов VITEK 2 Compact и miniApi (BioMérieux, Франция). При выборе панели АБС, проведении исследования и интерпретации результатов определения чувствительности руководствовались клиническими рекомендациями [18] и стандартами EUCAST 10.0 [19]. В панель чувствительности *S. aureus* включали 11 АБС: ванкомицин, линезолид, тигециклин, тейкопланин, фузидиевая кислота (FUS), рифампицин (RIF), норфлоксацин (10 мкг) (NOR), левофлоксацин (LEV), гентамицин (30 мкг) (GEN), эритромицин (ERY), цефокситин (30 мкг) (CXT/OXA). Использовали следующие категории чувствительности: Ч – чувствительный при стандартном режиме дозирования; У – чувствительный при увеличенной экспозиции; Р – резистентный [18, 19]. Для интегральной оценки резистентности для каждого изолята рассчитывали коэффициент резистентности (КР) по формуле [20]:

$$КР = R/N,$$

где КР – коэффициент резистентности,

Р – число АБС, к которым исследуемый штамм резистентен,

Н – общее количество тестируемых АБС для данного штамма.

Исследования выполняли в клинко-диагностической лаборатории, лаборатории клеточных технологий и лаборатории молекулярной генетики ГУ «РНПЦ РМиЭЧ».

При статистическом описании результатов встречаемость микробиологических признаков выражали в относительных частотах (%). Частотный анализ в таблицах сопряженности проводили с использованием критерия χ^2 и точного двустороннего критерия Фишера. Для нахождения сходных по сочетанию частот признаков использовали иерархический кластерный анализ (КА), который проводили методом невзвешенного попарного среднего. В качестве меры близости использовали коэффициент корреляции Спирмена. Для определения причин изменчивости встречаемости и выраженности патогенных свойств *S. aureus* использовали метод канонического анализа соответствий (КАС). Расчеты и графические построения выполняли в пакетах PAST (version 3.19) [21] и TrX (version 1.5).

■ РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Все выделенные штаммы *S. aureus* характеризовались положительными результатами каталазного теста, реакциями плазмокоагулазы и ДНК-азы. Чувствительность изолятов *S. aureus* к линезолиду, тигециклину, ванкомицину составляла 100%, поэтому при графическом представлении профилей резистентности указанные антибиотики были исключены. Метициллинорезистентность (диск с цефокситином, 30 мкг) у *S. aureus* встречалась наиболее часто и была выявлена у 54% (134) изолятов. Из них 39,5% (53) *S. aureus* проявляли резистентность только к цефокситину (КР=0,1). У 60,5% (81) метициллинорезистентных штаммов *S. aureus* наблюдалась устойчивость к другим антибиотикам (КР>0,1). Встречающиеся варианты комбинаций (фенотипы У и Р) представлены на рис. 1.

	CXT/OXA	ERY	GEN	LEV	NOR	RIF	FUS
53 (39,5%)							
17 (21%)							
13 (16,1%)							
9 (11,1%)							
6 (7,4%)							
1 (1,2%)							
4 (5%)							
1 (1,2%)							
1 (1,2%)							
1 (1,2%)							
1 (1,2%)							
4 (5%)							
7 (8,6%)							
4 (5%)							
3 (3,7%)							
3 (3,7%)							
2 (2,5%)							
2 (2,5%)							
1 (1,2%)							
1 (1,2%)							

Рис. 1. Профили резистентности метициллинорезистентных штаммов *S. aureus*

Примечания: CXT/OXA – цефокситин/оксациллин (30 мкг); ERY – эритромицин; GEN – гентамицин (30 мкг); LEV – левофлоксацин; NOR – норфлоксацин (10 мкг); RIF – рифампицин; FUS – фузидиевая кислота; черная заливка – устойчивость к АБС; нет заливки – чувствительность.

Fig. 1. Resistance profiles of methicillin-resistant *S. aureus* strains

Notes: CXT/OXA – cefoxitin/oxacillin (30 µg); ERY – erythromycin; GEN – gentamicin (30 µg); LEV – levofloxacin; NOR – norfloxacin (10 µg); RIF – rifampicin; FUS – fusidic acid; black fill – resistance; no fill – sensitivity.

Всего было выявлено 19 вариантов комбинаций устойчивости, которые включали 2–7 антибиотиков. Наиболее частыми фенотипами устойчивости были CXT/OXA-ERY (21%, 17), KP=0,18; CXT/OXA-ERY-GEN (16,1%, 13), KP=0,27. Фенотипы CXT/OXA-ERY-GEN-LEV-NOR и CXT/OXA-ERY-GEN-LEV-NOR-RIF, CXT/OXA-GEN встречались в 11,1% (9), 7,4% (6) и 8,6% (7) случаев (KP=0,45; KP=0,54; KP=0,18). Частота обнаружения других вариантов сочетаний устойчивости к антибиотикам составляла 1–4%. Чувствительные к метициллину *S. aureus* характеризовались также чувствительностью к другим анализируемым АБС.

Описательный статистический анализ микробиологических признаков, характеризующих клинические изоляты *S. aureus*, показал вариабельность частот встречаемости на разных сроках существования ран (для локальных ран) и пребывания в отделении реанимации (для пациентов с ОБ) (табл. 2).

Монокультуры *S. aureus* преимущественно обнаруживались в свежих ранах с давностью до 1 суток. С увеличением сроков ран *S. aureus* чаще входил в состав микробных ассоциаций, а в ожоговых ранах

Таблица 2
Частота встречаемости признаков, характеризующих анализируемые изоляты *S. aureus*

Table 2
Frequency of occurrence of traits characterizing the analyzed isolates of *S. aureus*

Признак <i>S. aureus</i>	Пациенты с острыми и хроническими локальными ранами различных сроков существования										Пациенты с обширными ожоговыми ранами		
	До 1 сут.	2–4 сут.	5–10 сут.	11–21 сут.	До 4 нед.	4–6 нед.	6–8 нед.	8 нед. – 3 мес.	3–6 мес.	>6 мес.	До 7 сут.	7–14 сут.	>14 сут.
	Количество изолятов <i>S. aureus</i> , n												
	21	14	13	24	20	19	11	20	16	19	47	9	15
	Частота встречаемости признака, %												
Моно	67	50	54	62,5	50	52,6	45,5	35	56,3	36,8	30	33,3	6,7
Микст	33	50	46	37,5	50	47,4	54,5	65	43,7	63,2	70	66,7	93,3
КР 0	33	43	61,5	37,5	45	52,6	63,6	55	43,7	47,4	23,4	44,5	26,7
КР 0,1–0,18	57	43	23	62,5	30	31,6	27,3	20	37,5	31,6	36,2	33,3	40
КР 0,27–0,36	10	14	38,5	0	20	10,5	9,1	20	18,8	10,5	12,8	11,1	13,3
КР >0,36	0	0	0	0	5	5,3	0	5	0	10,5	27,7	11,1	20
Cefoxitin s	43	50	69	41,6	60	57,9	63,6	60	50	47,4	25,5	44,5	26,7
Cefoxitin r	57	50	31	58,4	40	42,1	36,4	40	50	52,6	74,5	55,5	73,3
ОВ 0, 1	95	86	54	29	80	10,5	9,1	0	0	0	30	22,2	0
ОВ 2, 3	5	14	46	71	20	89,5	90,9	100	100	100	60	77,8	100
БМ 0, 1	0	0	7	8	5	21	100	5	12,5	5,3	8,5	0	6,7
БМ 2, 3	100	100	93	92	95	79	0	95	87,5	94,7	91,5	100	93,3
ica+	100	100	100	83,4	95	89,5	100	80	87,5	68,4	85,1	88,9	73,3
ica–	0	0	0	16,6	5	10,5	0	20	12,5	31,6	14,9	11,1	26,7
ГЕМ+	100	100	93	54,2	100	84,1	54,5	85	68,7	63,2	80,8	66,7	73,3
ГЕМ–	0	0	7	45,8	0	15,9	45,5	15	31,3	36,8	19,2	33,3	26,7
ЛВ+	95	93	93	87,5	90	100	72,7	75	75	73,7	76,6	100	93,3
ЛВ–	5	7	7	12,5	10	0	27,3	25	25	26,3	23,4	0	6,7
М+	95	100	67	100	100	94,7	100	100	75	89,5	87,2	77,8	70
М–	5	0	23	0	0	5,3	0	0	25	10,5	12,8	22,2	20
ФЛ+	0	0	7	21	0	10,5	0	20	37,5	73,7	14,9	77,8	6,7
ФЛ–	100	100	93	79	100	89,5	100	80	62,5	26,3	85,1	22,2	93,3
ПР+	95	100	93	50	90	89,5	72,7	100	81,2	57,5	74,5	88,9	73,3
ПР–	5	0	7	50	10	10,5	27,3	25	18,8	42,5	25,5	11,1	26,7
АКА 0,1	71,5	78,5	38	33,3	80	26,3	9,1	0	18,8	10,5	30	77,8	0
АКА 2, 3	28,5	21,5	62	66,7	20	73,7	90,9	100	81,2	89,5	70	22,2	100
АА 0,1	33	28,5	31	33,3	20	31,6	27,3	30	0	36,8	55,3	44,4	53,3
АА 2, 3	77	71,5	69	66,7	80	68,4	72,7	70	100	63,2	44,7	55,6	46,7
АЛА 0,1	100	100	93	79	70	47,4	36,4	45	18,8	15,8	40,4	44,4	0
АЛА 2, 3	0	0	7	21	30	52,6	63,6	55	81,2	84,2	59,6	55,6	100
АИА 0, 1	90,5	86	69	54,2	70	26,3	27,3	5	12,5	5,3	38,3	33,3	13,3
АИА 2, 3	9,5	14	31	45,8	30	73,7	72,7	95	87,5	94,7	61,7	66,7	86,7
КОЕ 1	34	42,9	23	29,2	15	31,6	27,3	35	12,5	5,3	53,2	44,4	60

Окончание таблицы 2

Признак <i>S. aureus</i>	Пациенты с острыми и хроническими локальными ранами различных сроков существования										Пациенты с обширными ожоговыми ранами		
	До 1 сут.	2-4 сут.	5-10 сут.	11-21 сут.	До 4 нед.	4-6 нед.	6-8 нед.	8 нед. – 3 мес.	3-6 мес.	>6 мес.	До 7 сут.	7-14 сут.	>14 сут.
	Количество изолятов <i>S. aureus</i> , n												
	21	14	13	24	20	19	11	20	16	19	47	9	15
	Частота встречаемости признака, %												
КОЕ 2	33	14,1	31	21	40	26,3	45,4	5	31,3	26,3	23,4	44,4	20
КОЕ 3	33	43	46	49,8	45	42,1	27,3	60	56,2	68,4	23,4	11,2	20

Примечания: моно – монокультура *S. aureus*; микст – *S. aureus*, обнаруженные в составе ассоциаций; КР – коэффициент резистентности; ОБ – основное вещество; БМ – биомасса; ГЕМ – реакция гемолиза; ЛВ – лецитиназа; М – маннит; ФЛ – фибринолизин; ПР – протеаза; АКА, АА, АЛА, АИА – антикомплемментарная, адгезивная, антилизозимная, антиинтерфероновая активность соответственно; «+», «–» – наличие/отсутствие признака; 0, 1, 2, 3 – степень выраженности признака; КОЕ 1 – изоляты, полученные со среды обогащения; КОЕ 2 – изоляты в количестве $\leq 10^5$ КОЕ/мл; КОЕ 3 – изоляты в количестве $> 10^5$ КОЕ/мл.

Notes: mono – monoculture of *S. aureus*; mixed – *S. aureus* found in associations; CR – coefficient of resistance; MS – main substance; BM – biomass; HEM – hemolysis reaction; LV – lecithinase; M – mannitol; FL – fibrinolysin; PR – protease; ACA, AA, ALA, AIA – anti-complementary, adhesive, anti-lysozyme, anti-interferon activity, respectively; “+”, “–” – presence/absence of a feature; 0, 1, 2, 3 – the severity of the sign; CFU 1 – isolates obtained from the enrichment broth; CFU 2 – isolates in the amount of $\leq 10^5$ CFU/ml; CFU 3 – isolates $> 10^5$ CFU/ml.

у пациентов с ОБ редко встречался в монокультуре. В этих же ранах наблюдались *S. aureus* с КР $> 0,36$, что соответствовало резистентности к 4 и более АБС. Чувствительные изоляты *S. aureus* либо резистентные только к 1–2 АБС (КР от 0,1 до 0,18) чаще обнаруживались в острых ранах давностью до 21 сут.

Изоляты *S. aureus* в 87,5% случаев (n=217) характеризовались наличием генов *ica* оперона (*ica*+), 12,5% штаммов (n=31) были *ica*-негативными (*ica*-). В острых ранах сроком до 10 суток встречались только *ica*+ изоляты *S. aureus*. В хронических ранах, а также в обширных ожоговых ранах наряду с *ica*+ обнаруживались *ica*- *S. aureus*. Степень фенотипической экспрессии образования биопленки в виде продукции ОБ и накопления БМ варьировала. В острых ранах, особенно на ранних сроках (до 4-х суток), преобладали *S. aureus* с высоким уровнем накопления БМ (БМ 2, 3), но низким уровнем образования ОБ (ОБ 0, 1). В ранах, существующих более 3 недель, а также в обширных ожоговых ранах чаще встречались изоляты *S. aureus* с умеренной и выраженной продукцией ОБ (ОБ 2, 3).

Выявлено непостоянство проявления некоторых идентификационных видовых признаков *S. aureus*, которые в то же время являются факторами его патогенности. С различной частотой встречались изоляты, не проявляющие гемолитической (ГЕМ-) либо лецитиназной активности (ЛВ-), ферментации маннита (М-). Факторы персистенции (АЛА, АИА, АКА), а также другие дополнительные факторы патогенности *S. aureus* – АА, протеазная (ПР) и фибринолитическая (ФЛ) активности

также характеризовались вариабельностью проявления в зависимости от сроков давности локальных ран и обширных ожоговых ран. *S. aureus* обнаруживались в ранах в количестве $\leq 10^5$ КОЕ/мл (КОЕ 2), $>10^5$ КОЕ/мл (КОЕ 3) либо выделялись только после культивирования в среде обогащения (КОЕ 1) (табл. 2).

Учитывая вариабельность частот встречаемости микробиологических признаков, для определения их соотношений и выделения наиболее сходных групп, характеризующих клинические изоляты *S. aureus*, проведены многомерные методы анализа данных (КА и КАС). Результаты кластерного анализа представлены на рис. 2.

Коэффициент кофенетической корреляции составлял 0,73, что указывало на достаточно полное отражение парных мер сходства/различий свойств *S. aureus* на разных сроках существования ран. Анализ дендрограммы показал, что наиболее сходными признаками были способность *S. aureus* продуцировать ОБ биопленки и выраженность персистентных свойств. Так, на дендрограмме был сформирован кластер, представленный неактивными продуцентами ОБ биопленки (ОБ 0, 1) с низким персистентным потенциалом (АИА 0, 1; АКА 0, 1; АЛА 0, 1; уровень сходства $\rho=0,79$). Наиболее близким с этим кластером признаком было наличие генов *ica* оперона (*ica+*) ($\rho=0,67$). В правой части дендрограммы определялся кластер, в который вошли умеренная и высокая способности *S. aureus* к образованию ОБ биопленки и к персистенции (ОБ 2, 3; АИА 2, 3; АКА 2, 3; АЛА 2, 3; уровень сходства $\rho=0,79$). Указанные признаки были близки к *ica-* (гены *ica* оперона не обнаружены). В этот же кластер объединились изоляты, характеризующиеся отсутствием реакции гемолиза (ГЕМ-) и протеазной активности (ПР-) ($\rho=0,64$).

Рис. 2. Дендрограмма частот встречаемости признаков *S. aureus* и выделение кластеров

Fig. 2. Dendrogram of the frequency of occurrence of *S. aureus* signs and identification of clusters

Остальные кластеры были представлены 2–3 признаками. Высокий уровень сходства показывали *S. aureus*, выделенные в составе ассоциаций, с КР более 0,36 ($p=0,83$). При этом для таких *S. aureus* был характерен низкий уровень АА (АА 0, 1). В то же время монокультуры *S. aureus* определяли высокую АА (АА 2, 3) ($p=0,63$). Штаммы *S. aureus*, резистентные к 3–4 АБС (КР от 0,27 до 0,36), проявляли гемолитическую и протеазную активность (ГЕМ+ и ПР+) ($p=0,59$). КР от 0,1 до 0,18 (1–2 АБС) с высоким уровнем сходства соответствовал *S. aureus*, резистентным к метициллину (cefoxitin r) ($p=0,77$), что подтверждало результаты описательной статистики (рис. 1).

Таким образом, по соотношению частот встречаемости микробиологических признаков у изолятов *S. aureus*, выделенных из ран различных сроков давности, были определены ассоциации, группируемые по фенотипической способности к образованию ОБ биопленки. Дополнительные кластеры формировались на основании особенностей выделения *S. aureus* из раневого отделяемого – в составе монокультур или ассоциаций.

Для объяснения посредством выявленных переменных изменчивости большого количества микробиологических признаков, характеризующих *S. aureus*, на следующем этапе выполнен КАС. Анализ проводился отдельно для *S. aureus*, выделенных из различных клинических категорий ран: острых и хронических локальных и обширных ожоговых ран.

На рис. 3 представлена ординационная диаграмма с нанесенными на нее векторами клинических и микробиологических признаков. Показатели, характеризующие проявление патогенного и персистентного потенциала *S. aureus*, отмечены в виде точек. Интерпретация результатов выполнялась по проекциям векторов, максимальных для данной оси.

В ходе анализа было получено 6 канонических осей. Мерой качества полученного решения выступает процент инерции, объясненной двумя осями. Первые две размерности почти полностью (на 86,7%) объясняли изменчивость (инерцию) встречаемости и выраженности свойств *S. aureus*, обусловленную фенотипической способностью к образованию биопленки, обнаружением изолята в монокультуре или ассоциации, клиническими особенностями раны ($p=0,007$). В подтверждение результатов КА ось 1 определяла различия по *S. aureus*, относящимся к категориям «ОБ 0, 1» и «ОБ 2, 3». Для категории «ОБ 2, 3» были наиболее свойственны персистентный фенотип (АКА 3, АЛА 3, АИА 3) и наличие фибринолитической активности (ФЛ+). В то же время при микробиологическом исследовании такие изоляты *S. aureus* могли не проявлять 1–2 идентификационных признака, являющихся факторами патогенности, например, реакции гемолиза (ГЕМ–), лецитиназной (ЛВ–), протеазной активности (ПР–), ферментации маннита (М–) на соответствующих плотных питательных средах. Все обнаруженные *ica*– *S. aureus* по степени образования биопленки относились к категории «ОБ 2, 3». Изоляты *S. aureus*, не образующие матрикс биопленки (вектор «ОБ 0, 1»), характеризовались выраженной способностью к накоплению БМ биопленки (БМ 3), низкими персистентными свойствами (АКА 0, 1; АИА 0, 1, АЛА 0). При этом основные идентификационные тесты для таких изолятов *S. aureus* были положительные (ГЕМ+, ЛВ+, ПР+, М+).

Примечания: моно – монокультура *S. aureus*; микст – *S. aureus*, обнаруженные в составе ассоциаций; КР – коэффициент резистентности; ОВ – основное вещество; БМ – биомасса; ГЕМ – реакция гемолиза; ЛВ – лецитиназа; М – маннит; ФЛ – фибринолизин; ПР – протеаза; АКА, АА, АЛА, АИА – антикомплемментарная, адгезивная, антилизоцимная, антиинтерфероновая активность соответственно; 0, 1, 2, 3 – степень выраженности признака; КОЕ 1 – изоляты, полученные со среды обогащения; КОЕ 2 – изоляты в количестве $\leq 10^5$ КОЕ/мл; КОЕ 3 – изоляты в количестве $> 10^5$ КОЕ/мл; ОР – острые раны; ХР – хронические раны.

Notes: mono – monoculture of *S. aureus*; mixed – *S. aureus* found in associations; CR – coefficient of resistance; MS – main substance; BM – biomass; HEM – hemolysis reaction; LV – lecithinase; M – mannitol; FL – fibrinolysin; PR – protease; ACA, AA, ALA, AIA – anti-complementary, adhesive, anti-lysozyme, anti-interferon activity, respectively; 0, 1, 2, 3 – the severity of the sign; CFU 1 – isolates obtained from the enrichment broth; CFU 2 – isolates in the amount of $\leq 10^5$ CFU/ml; CFU 3 – isolates $> 10^5$ CFU/ml; AW – acute wounds; CW – chronic wounds.

Количественные характеристики выделенных изолятов *S. aureus* слабо влияли на частоту встречаемости и выраженность проявления микробиологических признаков. Это было видно по расположению

Рис. 4. Изменчивость встречаемости и выраженности патогенных и персистентных свойств *S. aureus* в обширных ожоговых ранах, полученная по результату КАС

Примечания: моно – монокультура *S. aureus*; микст – *S. aureus*, обнаруженные в составе ассоциаций; КР – коэффициент резистентности; ОВ – основное вещество; БМ – биомасса; ГЕМ – реакция гемолиза; ЛВ – лецитиназа; М – маннит; ФЛ – фибринолизин; ПР – протеаза; АКА, АА, АЛА, АИА – антикомплемментарная, адгезивная, антилизосимная, антиинтерфероновая активность соответственно; 0, 1, 2, 3 – степень выраженности признака; КОЕ 1 – изоляты, полученные со среды обогащения; КОЕ 2 – изоляты в количестве $\leq 10^5$ КОЕ/мл; КОЕ 3 – изоляты в количестве $> 10^5$ КОЕ/мл.

Fig. 4. Variation in the occurrence and severity of pathogenic and persistent properties of *S. aureus* in extensive burn wounds, obtained from the CCA

Notes: mono – monoculture of *S. aureus*; mixed – *S. aureus* found in associations; CR – coefficient of resistance; MS – main substance; BM – biomass; HEM – hemolysis reaction; LV – lecithinase; M – mannitol; FL – fibrinolysin; PR – protease; ACA, AA, ALA, AIA – anti-complementary, adhesive, anti-lysozyme, anti-interferon activity, respectively; 0, 1, 2, 3 – the severity of the sign; CFU 1 – isolates obtained from the enrichment broth; CFU 2 – isolates in the amount of $\leq 10^5$ CFU/ml; CFU 3 – isolates $> 10^5$ CFU/ml.

точек КОЕ 1 (*S. aureus* со среды обогащения), КОЕ 2 (*S. aureus* в количестве $\leq 10^5$ КОЕ/мл), КОЕ 3 (*S. aureus* в количестве $> 10^5$ КОЕ/мл) вблизи точки начала координат.

На современном этапе в клинической микробиологии активно развивается новое направление – инфекционная симбиология, изучающая взаимодействия микросимбионтов с хозяином при инфекции в условиях их биокommunikативных взаимоотношений. Течение и прогноз инфекционного процесса, вызываемого условно-патогенными бактериями (ассоциативными микросимбионтами), зависит от патогенного потенциала и способности противостоять защитным механизмам врожденного иммунитета. Последние преодолеваются ассоциантами за счет способности формировать биопленку и приобретения антифакторов (АЛА, АИА, АКА и др.), которые способствуют выживанию бактерий при инфекции и составляют их персистентный потенциал [22]. Спектр биологических свойств микроорганизмов, инициирующих воспалительный процесс, имеет диагностическое значение, что показано на обширном

фактическом материале [23]. Так, обоснована возможность использования результатов оценки тестов бактериальной персистенции для оценки тяжести течения венозно-трофических язв нижних конечностей [24]. Выявлена прямая взаимосвязь высокой степени экспрессии АИА, АКА, АЛА *S. aureus* с затяжным течением гнойного воспалительного процесса у пациентов с постинъекционными абсцессами [25]. Выделение из очагов острой хирургической инфекции мягких тканей бактериальных ассоциаций, представители которых характеризовались резистентностью к АБС в сочетании с высокими значениями АЛА, сопровождало длительное течение процесса и развитие гнойно-септических осложнений [26]. С другой стороны, показано, что бактерии с выраженными вирулентными характеристиками вызывают острое течение инфекции [27].

Учитывая имеющиеся данные, можно утверждать, что оценка биологических свойств изолятов, выделенных из клинического материала пациентов, существенно расширит информативность микробиологического исследования, а использование адекватных методов многомерной статистики даст возможность определить комплекс критериев, относящихся к патогенному и персистентному потенциалу. Так, анализируя данные, полученные при использовании описательной статистики, КА и КАС, можно сделать следующие выводы:

1. Персистентный биопротип клинических изолятов *S. aureus* определялся умеренной и выраженной способностью формировать ОБ биопленки, средними или высокими уровнями АКА, АЛА, АИА, присутствием ФЛ активности. Изоляты характеризовались как наличием, так и отсутствием генетических детерминант образования биопленки (*ica+*, *ica-*), обладали низкой АА, а также могли не проявлять 1–2 из идентификационных признаков – ЛВ, ГЕМ, М, ПР. Дополнительными признаками персистентного фенотипа *S. aureus* являлись высокий уровень резистентности к АБС (КР>0,36, наиболее частые фенотипы – CXT/OXA-ERY-GEN-LEV-NOR и CXT/OXA-ERY-GEN-LEV-NOR-RIF), выделение в составе ассоциации, а также его обнаружение только после использования среды обогащения. Персистентные *S. aureus* выделялись из хронических локальных ран сроком более 3 недель и обширных ожоговых ран.
2. Патогенный биопротип был характерен для *ica+* *S. aureus*, неактивно образующих ОБ биопленки и проявляющих низкий уровень персистентных свойств (АКА, АЛА, АИА). Такие *S. aureus*, обнаруживаемые преимущественно в монокультуре с первичного посева, при идентификации являлись ГЕМ+, ЛВ+, ПР+, М+, показывали высокую АА и активно накапливали БМ биопленки. *S. aureus*, обладающие колонизационными (АА 2, 3), инвазивными и цитотоксическими (ГЕМ+, ЛВ+, ПР+) свойствами, были наиболее характерны для острых локальных ран сроком до 3 недель. Потенциально патогенные *S. aureus* проявляли чувствительность к АБС либо были резистентны к 1–2 АБС (КР от 0,1 до 0,18, наиболее частые фенотипы CXT/OXA, CXT/OXA-ERY, CXT/OXA-GEN).

■ ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Представленные результаты отражают зависимость проявления биологических свойств *S. aureus* от клинических особенностей раневого

дефекта, а также выявляют взаимосвязанные сочетания критериев, характеризующие патогенный или персистентный биофиль клинического изолята. Возможность дифференциации клинически значимых изолятов и контаминантов позволит, с одной стороны, оптимизировать интерпретацию результатов посева и оценку этиологической и эпидемиологической значимости, а с другой – разработать лабораторные микробиологические критерии прогнозирования хронического течения воспалительного процесса или развития его осложнений.

Исследование выполнено в рамках финансируемого задания государственной программы научных исследований на 2021–2025 гг. ГПНИ 4 «Трансляционная медицина», подпрограмма 4.2 «Фундаментальные аспекты медицинской науки» по теме «3.20 Изучение патогенного потенциала клинически значимых штаммов бактерий для повышения эффективности системы инфекционного контроля в стационаре».

Вклад авторов: Ярец Ю.И. – идея исследования, концепция и планирование исследований, сбор материала и техническое выполнение исследований, анализ и статистическая обработка результатов и их изложение, обсуждение и выводы, библиография; Шевченко Н.И. – идея исследования, методология микробиологических исследований, редактирование текста; Еремин В.Ф. – общее руководство и концепция исследования, общее редактирование.

Authors' contribution: Yarets Y. – research idea, research concept and planning, collection of material and technical implementation of research, analysis and statistical processing of results and their presentation, discussion and conclusions, bibliography; Shevchenko N. – idea of research, methodology of microbiological research, text editing; Eremin V. – general guidance and research concept, general editing.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

■ ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

1. Gelfand B.R., Kozlov R., Kubyshkin V., Khachatryan N. (eds.) (2015) *Surgical infections of the skin and soft tissues. Russian national recommendations. 2nd ed., rev. M.*, 109 p. (in Russian).
2. Ponomarenko S. (2013) Microbiological aspects of Staphylococcal infections today (review). *Annals of Mechnikov Institute*, no 3, pp. 13–17.
3. (2014) *Epidemiology and epidemiological monitoring of infections caused by methicillin-resistant strains of Staphylococcus aureus. Federal clinical guidelines.* M., 50 p. (in Russian).
4. Rodin A. (2019) Choice of local antiseptic for treatment and prevention of wound infection. *Hospital-replacing technologies: Ambulatory surgery*, no 3–4, pp. 47–56. Available at: <https://doi.org/10.21518/1995-1477-2019-3-4-47-56>
5. Kallstrom G. (2014) Are Quantitative Bacterial Wound Cultures Useful? *Journal of Clinical Microbiology*, vol. 8, no 52, pp. 2753–2756. Available at: <http://doi.org/10.1128/JCM.00522-14>
6. Somova L., Andryukov B., Lyapun I. (2020) Heteromorphism of persistence of sapronosis causative agents in cells in various environmental conditions. *Journal of microbiology, epidemiology and immunobiology*, vol. 97, no 1, pp. 62–71. Available at: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-2020-97-1-62-71>
7. Andryukov B., Somova L., Matosova E., Lyapun I. (2019) Phenotypic plasticity as a strategy of bacterial resistance and an object of advanced antimicrobial technologies (review). *Sovremennye tehnologii v medicine*, vol. 11, no 2, pp. 164–182. Available at: <https://doi.org/10.17691/stm2019.11.2.22>
8. Kolomiec N., Tonko O., Serookaya T., Marejko A., Litunovskaya L., Ermakova T. (2010) *Instructions for use: «Microbiological methods for the study of biological samples»: approved by the Ministry of Health of the Republic of Belarus. 19.03.2010 № 075-0210.* Minsk, 75 p. (in Russian).

9. Shipitsyna I., Osipova E., Godovykh N. (2014) The evaluation of adhesive activity of bacteria extracted from patients with infected endoprostheses of large joints. *Clinical Laboratory Diagnostics*, no 6, pp. 59–61.
10. Buharin O. (1992) Study of the anti-complementary activity of staphylococci. *Clinical Laboratory Diagnostics*, no 3, pp. 43–46.
11. Buharin O., Valyshev A., Elagina N. (2000) Antilysozyme activity of anaerobic bacteria of human fecal microflora. *Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology*, no 5, pp. 20–22.
12. Nezhvinskaja O., Tonko O., Dudchik N., Kolomeiec N. (2015) Instructions for use: «Methods for assessing the epidemiological significance of pathogenic and opportunistic microorganisms»: approved by the Ministry of Health of the Republic of Belarus. 18.06.2015 № 005-0515. Minsk, 30 p. (in Russian).
13. Yazdani R., Oshaghi M., Havayi A., Pishva E., Salehi R., Sadeghizadeh M., Foroohesh H. (2006) Detection of icaAD gene and biofilm formation in *Staphylococcus aureus* isolates from wound Infections. *Iranian J Publ Health*, vol. 35, no 2, pp. 25–28.
14. Sharma V., Sharma S., Dahiya K.D., Khan A., Mathur M., Sharma A. (2017) Coagulase gene polymorphism, enterotoxigenicity, biofilm production, and antibiotic resistance in *Staphylococcus aureus* isolated from bovine raw milk in North West India. *Ann Clin Microbiol Antimicrob*, vol. 16, p. 65. Available at: <https://doi.org/10.1186/s12941-017-0242-9>
15. Cafso V., Bertuccio T., Santagati M., Campanile F., Amicosante G., Perilli M.G., Selan L., Artini M., Nicoletti G., Stefani S. (2004) Presence of the ica operon in clinical isolates of *Staphylococcus epidermidis* and its role in biofilm production. *Clin Microbiol Infect*, vol. 10, pp. 1081–1088. Available at: <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2004.01024.x>
16. Yarets Y., Shevchenko N., Novikova I. (2016) Method for assessing the ability of bacteria to form biofilm: invention patent BY 20326 MPK S12Q1/02. Applicant: State Institution «Republican Scientific and Practical Center for Radiation Medicine and Human Ecology». № a 20130260. 01.03.2013, published 30.10.2014. *Official Bulletin. National Center for Intellectual Property*, Minsk, vol. 111, no 4, pp. 137–138.
17. Rozhko A., Yarets Y., Shevchenko N. (2015) Instructions for use: «Diagnostic method for post-traumatic wound infection»: approved by the Ministry of Health of the Republic of Belarus. 30.06.2016, Gomel, pp. 4–7. (in Russian).
18. (2015) *Clinical recommendations. Susceptibility testing of microorganisms to antimicrobial agents*. Available at: <http://www.antibiotic.ru/minzdrav/files/docs/clrec-dsma2018.pdf>. (accessed 20.09.2021). (in Russian).
19. (2020) *The European Committee on antimicrobial susceptibility testing. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 10.0*. Available at: <http://www.eucast.org> (accessed 20.09.2021). (in Russian).
20. Gostev V., Naumenko Z., Martel I. (2010) Open fracture wound microflora resistance to antibiotics (II report). *Traumatology and Orthopedics of Russia*, vol. 55, no 1, pp. 33–37.
21. Hammer O., Harper D.A.T., Ryan P.D. (2001) PAST: Paleontological Statistics Software Package for Education and Data Analysis. *Palaeontologia Electronica*, vol. 4, no 1, pp. 1–9.
22. Bukharin O. (2015) Infection symbiology. *Journal of Microbiology (Moscow)*, no 4, pp. 4–9.
23. Popova L. (2017) Use of secreted factors of persistency microorganisms for forecasting duration and heavy of infectious inflammatory diseases of the person (review). *Bulletin of the Orenburg Scientific Center of the Ural Association of the Russian Academy of Sciences (e-journal)*, no 4, 6 p. Available at: <http://elmag.uran.ru:9673/magazine/Numbers/2017-4/Articles/PLP-2017-4.pdf>. (accessed 20.09.2021).
24. Gandybin E., Abramzon O., Kartashova O. (2007) Microbiological characteristics of venous-trophic ulcers of the lower extremities. *Breast and cardiovascular surgery*, vol. 2, pp. 55–57.
25. Kurlaev P., Derjabin D., Buharin O. (1996) Relationship between the duration of the course of post-injection abscesses with the biological characteristics of the microorganisms causing them. *Grekov's Bulletin of Surgery*, no 3, pp. 54–56.
26. Perunova N., Fadeev S., Paromova Ja., Timohina T., Galjan S., Buharin O. (2008) Daily biorhythms of antibiotic resistance, plasma-coagulating and antilysozyme activities of *Staphylococcus aureus*. *Journal of microbiology, epidemiology and immunobiology*, no 5, pp. 35–38.
27. Kartashova O., Boklin A., Kirgizova S. (2005) Characteristics of the biological properties of causative agents of chronic sinusitis. *Russian Rhinology*, no 2, pp. 71.

Подана/Submitted: 04.10.2021

Принята/Accepted: 01.12.2021

Контакты/Contacts: artyut@mail.ru