

Детушева Е.В., Скрыбин Ю.П., Богун А.Г., Кисличкина А.А., Кадникова Л.А., Фурсова Н.К.

ИЗУЧЕНИЕ ЗАКОНОМЕРНОСТЕЙ ФОРМИРОВАНИЯ УСТОЙЧИВОСТИ STAPHYLOCOCCUS AUREUS К ТРИКЛОЗАНУ

ФБУН «ГНЦ прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора, 142279, г. Оболensk, Московская обл., Россия

Изучены молекулярно-генетические механизмы формирования устойчивости к антисептику триклозану у штамма Staphylococcus aureus ATCC25923. Получены варианты штамма S. aureus ATCC25923 (Tr1, Tr2, Tr1C и Tr2C), устойчивые к 64 мг/л триклозана, стабильно сохраняющие данное свойство при культивировании в отсутствие селективного давления. Штамм S. aureus Tr1 характеризовался несколько замедленным ростом, а штамм S. aureus Tr2 имел скорость роста, сопоставимую с исходным штаммом. В триклозан-устойчивых штаммах выявлена мутация C284T в гене fabI, приводящая к аминокислотной замене A95V в ферменте эноил-ацил редуктазе FabI, мишени триклозана. Кроме того, в этих штаммах обнаружены стабильно наследующиеся мутации в генах, ассоциированных с транспортом веществ в клетке: гипотетического транспортного белка HlyC/CorC family transporter, белка-антипортера ионов Na⁺, K⁺, Li⁺ и щелочей Na⁺/H⁺ antiporter subunit F, мембранного гипотетического белка и АТФ-связывающего белка ATP-binding protein. Показано, что устойчивость к триклозану у стафилококков ассоциирована с приобретением точечных мутаций в генах эноил-ацил редуктазы, а также в других генах, связанных с транспортом веществ в бактериальной клетке.

Ключевые слова: Staphylococcus aureus; антисептик; бактериальная устойчивость; триклозан; fabI.

Для цитирования: Детушева Е.В., Скрыбин Ю.П., Богун А.Г., Кисличкина А.А., Кадникова Л.А., Фурсова Н.К. Изучение закономерностей формирования устойчивости staphylococcus aureus к триклозану. Клиническая лабораторная диагностика. 2018; 63(1): 60-64. DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2018-63-1-60-64>

Detusheva E.V., Skryabin Yu.P., Bogun A.G., Kislichkina A.A., Kadnikova L.A., Fursova N.K.

THE STUDY OF PATTERNS OF DEVELOPMENT OF RESISTANCE OF STAPHYLOCOCCUS AUREUS TO TRICLOSAN

The Federal budget institution of science "The state scientific center of applied microbiology and biotechnology" of the Rospotrebnadzor, 142279 Obolensk, Moscow oblast, Russia

The article presents the results of studying molecular genetic mechanisms of development of resistance to antiseptic Triclosan in strain Staphylococcus aureus ATCC25923. The modifications of strain S. aureus ATCC25923 (Tr1, Tr2, Tr1C u Tr2C) are obtained resistant to 64 mg/l of Triclosan and stably preserving the given characteristic under cultivation in absence of selective pressure. The strain S. aureus Tr1 was characterized by slightly delayed growth and the strain S. aureus Tr2 was characterized by growth velocity comparable with initial strain. In the Triclosan-resistant strains a mutation C284T in gene fabI was detected resulting in amino-acid replacement A95V in enzyme enoyl-acyl protein reductase FabI, triclosan target. Besides, in these strains a stably inheriting mutation was detected in genes associated with transport of substances in cell: hypothetical transport protein HlyC/CorC family transporter; protein-transporter of ions of Na⁺, K⁺, Li⁺ and alkali of Na⁺/H⁺ antiporter subunit F, membrane hypothetical protein and ATP-binding protein. It is demonstrated that resistance to triclosan in staphylococci is associated with acquirement of point mutations in genes of enoyl-acyl protein reductase and also in other genes related to transport of substances in bacterial cell.

Key words: Staphylococcus aureus; antiseptic; bacterial resistance; triclosan; fabI.

For citation: Detusheva E.V., Skryabin Yu.P., Bogun A.G., Kislichkina A.A., Kadnikova L.A., Fursova N.K. The study of patterns of development of resistance of Staphylococcus aureus to triclosan. Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostic) 2018; 63 (1) 60-64. (in Russ.). DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2018-63-1-60-64>

For correspondence: Detusheva E.V., candidate of biological sciences, researcher of the department of collection cultures of the Federal budget institution of science "The state scientific center of applied microbiology and biotechnology". e-mail: klub@bk.ru

Conflict of interests. The authors declare absence of conflict of interests.

Acknowledgment. The study was implemented within the framework of the Federal scientific research of the Rospotrebnadzor № 049 "The monitoring and studying of characteristics of agents of alimentary and hospital infections, development of means of their diagnostic" and № 062 "The genome, proteome and metagenome analysis of strains deposited in the State collection of pathogenic microorganisms and cell cultures (SCAMB, Obolensk)".

Received 29.08.2017
Accepted 31.08.2017

Для корреспонденции: Детушева Елена Владимировна, канд. биологических наук, научный сотрудник отдела коллекционных культур ФБУН «ГНЦ прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора, e-mail: klub@bk.ru

Введение. Устойчивость микроорганизмов к антибактериальным препаратам — антибиотикам, антисептикам и дезинфектантам — серьёзная проблема современной медицины [1]. Устойчивые к антисептикам и дезинфектантам бактерии выделяются от пациентов лечебных

учреждений и из объектов госпитальной среды [2, 3]. Повсеместно отмечают снижение эффективности антибактериальных препаратов по отношению к современным госпитальным штаммам бактерий [4, 5]. Описано явление перекрестной резистентности бактериальных патогенов к антибиотикам, антисептикам и дезинфектантам [6, 7]. Одна из причин нарастающей резистентности к антибактериальным препаратам — неадекватное использование антибактериальных препаратов, в том числе в сублетальных концентрациях, когда устойчивые линии получают преимущество над чувствительными и вытесняют их из популяции [8, 9].

Одним из широко применяемых в клинической практике антисептиков является триклозан, препарат, имеющий химическую структуру замещенного дифенилового эфира. Этот антисептик активен преимущественно в отношении грамположительных бактерий, что связано с подавлением синтеза бактериальных жирных кислот в результате образования комплекса молекул триклозана с NAD^+ -зависимым ферментом эноил-ацил редуктазой. Молекулярная мишень триклозана в клетках *Staphylococcus aureus* — консервативный фермент эноил-ацил-протеин редуктаза (FabI), катализирующий завершающий этап синтеза длинноцепочечных жирных кислот, кодируемый геном *fabI*. Показано, что резистентность *S. aureus* к триклозану обусловлена мутациями в гене *fabI* [10]. Накопление таких мутаций может происходить в присутствии субингибирующих концентраций триклозана [11]. Эти исследования подтверждают вероятность распространения резистентности к триклозану в связи с его широким использованием [4].

Цель работы — изучение молекулярно-генетических механизмов устойчивости к триклозану на модели референс-штамма *S. aureus* ATCC25913.

Материал и методы. Штамм *S. aureus* ATCC25923 получен из Государственной коллекции патогенных микроорганизмов «ГКПМ-Оболensk». Для культивирования бактерий использовали питательные среды Nutrient Broth, Nutrient Agar (Himedia, Индия) и «ГРМ» (Оболensk, Россия). Культивирование проводили в течение 18—20 ч при температуре 37°C.

В работе применяли препарат Irgasan (Sigma-Aldrich Chemie, Германия), содержащий действующее вещество триклозан с 97% степени очистки.

Селекцию устойчивых к триклозану вариантов штамма *S. aureus* ATCC 25923 осуществляли путём последовательных пересевов бактериальной культуры в питательном бульоне, содержащем ступенчато повышающиеся (с 0,13 до 64 мг/л) концентрации триклозана, в течение 40 дней. Стабильность наследования приобретённой устойчивости к триклозану у полученных вариантов штамма *S. aureus* ATCC 2592 определяли с помощью культивирования на питательном агаре, не содержащем триклозана, в течение 26 мес.

Чувствительность к антисептику триклозану у исходного штамма и штаммов, полученных в результате селективного отбора, определяли методом серийных разведений в бульоне¹.

Для выявления параметров роста (бактериального фитнеса) изучаемых штаммов 100 мкл суспензии суточ-

ной бактериальной культуры ($\sim 1,5 \cdot 10^3$ КОЕ/мл) засекали газомом на чашку Петри с питательной средой ГРМ (Оболensk, Россия), культивировали в течение 10—14 ч при температуре 37°C. Измеряли диаметр 10 изолированных колоний, видимых невооружённым глазом, повторяя каждое измерение 8 раз с интервалом времени 1—1,5 ч, с помощью микроскопа ЛОМО МИКМЕД Д-2 (ЛОМО, ОАО СПб, Россия). Расчёт математических показателей G_T (мин) — времени одной генерации, K_D (мм/ч) — скорости линейного роста диаметра колоний, t_{1mm} (ч) — времени достижения колониями диаметра 1 мм проводили по упрощённой модели роста диаметра колоний одноклеточных микроорганизмов [12].

Выделяли бактериальную ДНК СТАВ-методом [13], её количество определяли спектрофотометрически на приборе UV-1700 (Zhimadzu, Япония) при длине волны 260 нм.

Для амплификации фрагмента гена *fabI* *S. aureus* использовали специфичные олигонуклеотидные праймеры: *fabI*-f 5'-ggccsaacaagaacgt-3' и *fabI*-R 5'-gttccassaactgggtgac-3' [10]. Амплификацию проводили в термоциклере DNA Engine Dyad (Bio-Rad, США) при следующем режиме: начальная денатурация при 95°C — 4 мин, затем 25 циклов, включающих денатурацию при 95°C — 30 с, отжиг — 30 с и элонгацию при температуре 72°C — 80 с, в реакционной смеси, содержащей буфер для ПЦР с 15 мМ MgCl₂ (Termo Fisher Scientific, Европа), по 200 мкМ dATP, dCTP, dGTP и dUTP, 10 пмоль каждого праймера, 2,5 ед. *Taq*-полимеразы и 10 нг ДНК. Наличие ПЦР-продукта детектировали с помощью электрофореза в 1% агарозном геле (Amersham Biosciences, Великобритания) с последующей визуализацией ДНК окраской 10% бромистым этидием. Очищали ПЦР-продукты с помощью набора реактивов Dye Terminator CycleS sequencing (Amersham Biosciences, Великобритания), согласно инструкции фирмы-изготовителя. Амплифицированный фрагмент гена секвенировали, используя протокол для автоматического секвенатора MegaBase 750 (Amersham Biosciences, Великобритания).

Полногеномное секвенирование штаммов *S. aureus* осуществляли в системе Ion Torrent PGM (Life Technologies, США). Геномные библиотеки готовили с помощью набора реагентов Ion Plus Fragment Library Kit (Life Technologies, США). Секвенировали ДНК с использованием генетического анализатора IonTorrentPGM, набора реагентов Ion PGM 400 Sequencing Kit и чипа для секвенирования Ion 318 Chip Kit (Life Technologies, США).

Биоинформационный анализ секвенированных последовательностей ДНК проводили с помощью программ Vector NTI9 (Invitrogen, США), CHROMAS (Technelysium Pty Ltd, Австралия) и веб-ресурса BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Полученные в результате полногеномного секвенирования данные собирали с помощью ассемблера Newbler 2.9, биоинформационный анализ осуществляли с применением программ Vector NTI10 (Invitrogen, США), Mauve (<http://darlinglab.org/mauve/mauve.html>), LaserGene 11 (DNASTAR, США) и веб-ресурса BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

Штаммы бактерий, депонированные в Государственной коллекции патогенных микроорганизмов «ГКПМ-Оболensk»: *S. aureus* Tr1 (B-7890), *S. aureus* Tr2 (B-7891), *S. aureus* Tr1C (B-7921) и *S. aureus* Tr2C (B-7922).

Нуклеотидные последовательности ДНК, размещённые в международной базе данных GenBank: KP100446.1 и KP100447.1

¹МУ 4.2.1890—0.4 Определение чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препаратам: методические указания. М.: 2004.

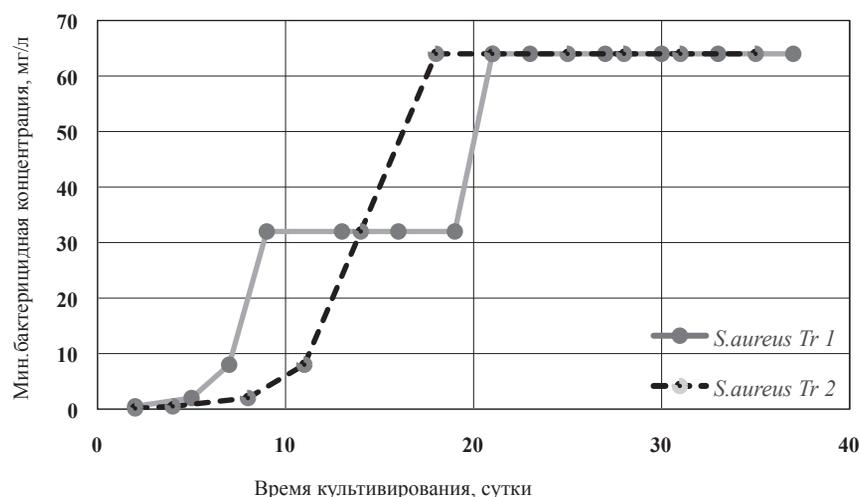


Рис. 1. Формирование устойчивости штамма *S. aureus* ATCC25923 к триклозану в жидкой питательной среде.

Результаты. В результате селективного отбора клеток штамма *S. aureus* ATCC 25923 в условиях ступенчато возрастающих концентраций триклозана в течение 40 сут (13 пассажей) были получены две субкультуры — *S. aureus* Tr1 и Tr2, которые были устойчивы к триклозану с минимальной подавляющей концентрацией (МПК) 64 мг/л, что в 128 раз выше аналогичного показателя исходной культуры. Интересно отметить, что динамика формирования двух триклозан-устойчивых штаммов отличалась — у штамма *S. aureus* Tr1 устойчивость сформировалась в интервале между 2-м и 8-м пассажами, а у штамма *S. aureus* Tr2 — между 3-м и 6-м пассажами (рис. 1).

Показано, что приобретённая устойчивость к триклозану стабильно наследовалась у обоих штаммов: при пересевах на плотной питательной среде, не содержащей триклозана, в течение 26 мес штаммы *S. aureus* Tr1 и Tr2 сохраняли устойчивость к триклозану на прежнем уровне (МПК = 64 мг/л). Полученные в результате культивирования без селективного давления триклозана штаммы обозначены *S. aureus* Tr1С и Tr2С.

Параметры роста (бактериальный фитнес) резистентных к триклозану вариантов штамма *S. aureus* ATCC25923 — Tr1, Tr2, Tr1С и Tr2С сравнивали по трем показателям: время одной генерации (G_T), скорость линейного роста диаметра колоний (K_D) и время достижения колониями диаметра 1 мм (t_{1mm}). Интересно, что, по сравнению с исходным штаммом *S. aureus* ATCC25923 триклозан-устойчивый штамм *S. aureus* Tr1 отличался

несколько замедленным ростом (увеличены показатели G_T и t_{1mm}), а триклозан-устойчивый штамм *S. aureus* Tr2 имел скорость роста, сопоставимую с исходным штаммом (см. таблицу). Характерные параметры роста триклозан-устойчивых штаммов стабильно наследовались при длительном культивировании в отсутствие

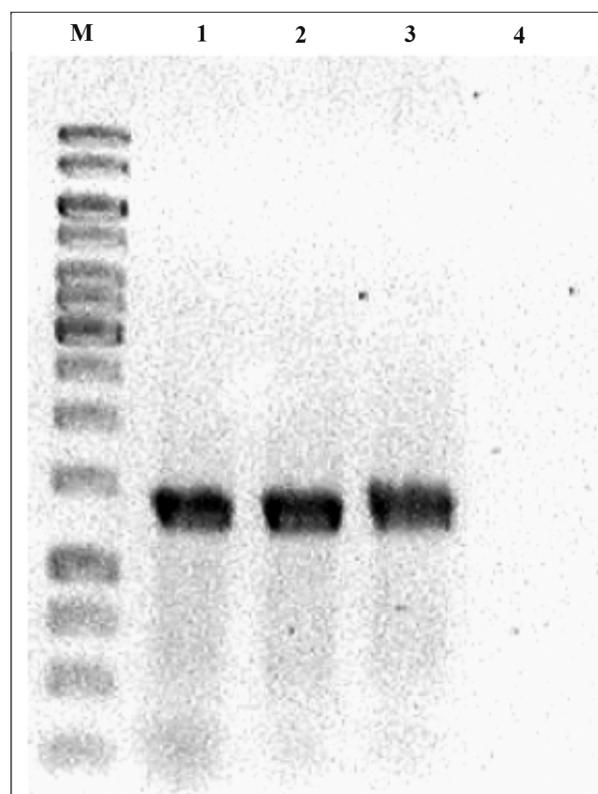


Рис. 2. Электрофореграмма ПЦР-продуктов гена *fabI*.

М — маркер молекулярных масс ДНК O'GeneRuler 1 kb DNA Ladder (250, 500, 750, 1000, 1500, 2000, 2500, 3000, 3500, 4000, 5000, 6000, 8000, 10000 п.н.) (Thermo Scientific, Россия); 1 — *S. aureus* ATCC25923; 2 — *S. aureus* Tr1; 3 — *S. aureus* Tr2; 4 — отрицательный контроль (H_2O).

Параметры роста изучаемых штаммов *S. aureus*

Штамм	G_T , мин	K_D , мм/ч	t_{1mm} , ч
<i>S. aureus</i> ATCC 625923	29 ± 2	0,10 ± 0,01	15 ± 2
<i>S. aureus</i> Tr1	34 ± 1	0,06 ± 0,02	23 ± 2
<i>S. aureus</i> Tr1С	35 ± 2	0,06 ± 0,02	23 ± 2
<i>S. aureus</i> Tr2	30 ± 1	0,10 ± 0,01	17 ± 2
<i>S. aureus</i> Tr2С	29 ± 1	0,09 ± 0,01	16 ± 1

Примечание. G_T — время одной генерации, K_D — скорость линейного роста диаметра колоний, t_{1mm} — время достижения колониями диаметра 1 мм.

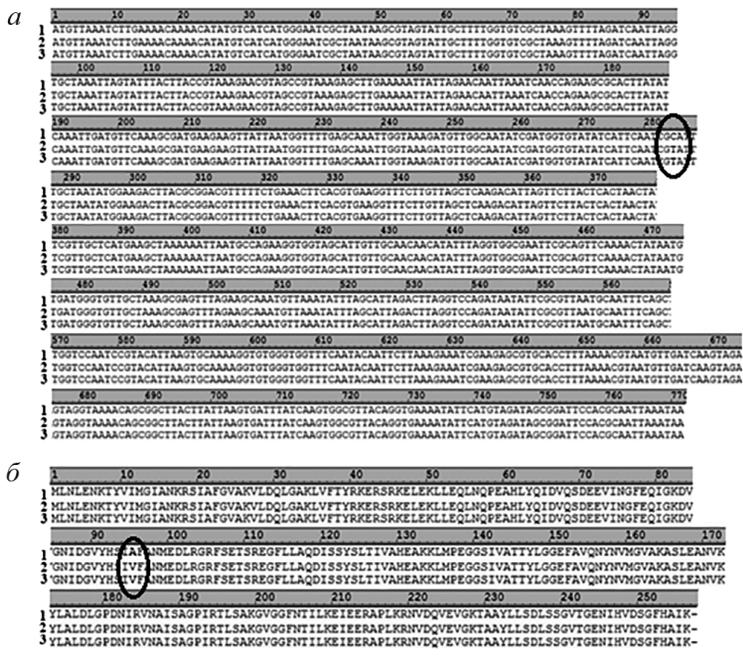


Рис. 3. Выравнивание нуклеотидных последовательностей гена *fabI* (а) и аминокислотных последовательностей белка *FabI* (б) штаммов *S. aureus* ATCC25923 (1), *S. aureus* Tr1 (2) и *S. aureus* Tr2 (3).

селективного давления: штамм *S. aureus* Tr1C сохранил параметры роста, характерные для штамма *S. aureus* Tr1, а штамм *S. aureus* Tr2C — для штамма *S. aureus* Tr2 (см. таблицу).

С целью изучения молекулярного механизма резистентности к триклозану у мутантных штаммов *S. aureus* Tr1 и Tr2 проведен анализ первичной структуры гена, кодирующего еноил-ацил редуктазу FabI, которая, как известно из опубликованных ранее литературных данных, является мишенью действия триклозана [10]. С помощью специфичных праймеров амплифицированы фрагменты гена *fabI* размером 1358 п.н. из мутантных штаммов и исходного штамма *S. aureus* ATCC25923 (рис. 2). Секвенирование амплифицированных фрагментов гена *fabI* и биоинформационный анализ последовательностей ДНК показали, что в штаммах *S. aureus* Tr1 и Tr2 присутствуют идентичные нуклеотидные замены C284T, по сравнению с аналогичной последовательностью исходного штамма *S. aureus* ATCC25923, приводящие к аминокислотной замене A95V в продукте гена (рис. 3). Данная мутация описана ранее в исследовании, посвященном изучению механизмов резистентности к триклозану при мультиступенчатой и одноступенчатой *in vitro* селекции штаммов *S. aureus* в присутствии триклозана [14]. В работе Ciusa M.L. и соавт. (2012) наличие аминокислотной замены A95V приводило к повышению МПК с 0,12 мг/л у исходного до 4—8 мг/л у мутантного штамма (в 67 раз). В нашем исследовании чувствительность к триклозану у триклозан-устойчивых штаммов увеличилась с 0,5 до 64 мг/л (в 128 раз).

Полногеномное секвенирование 4-х триклозан-устойчивых вариантов и исходного штамма *S. aureus* ATCC25923 подтвердило наличие точечной нуклеотидной замены C284T в гене *fabI*. Кроме того, в штамме *S. aureus* Tr1 дополнительно выявлены две неописанные ранее в научной литературе мутации: 1) мутация G491A

в гене гипотетического транспортного белка HlyC/CorC family transporter, которая приводит к аминокислотной замене аргинина на гистидин R164H; 2) мутация C137T в гене белка-антипортера Na⁺/H⁺ antiporter subunit F, связанного с устойчивостью к высоким концентрациям ионов Na⁺, K⁺, Li⁺ и щелочам, приводящая к аминокислотной замене метионина на изолейцин M46I. В штамме *S. aureus* Tr2, помимо мутации C284T, идентифицированы ещё две неописанные ранее мутации: 1) мутация A545G в гене мембранного гипотетического белка, приводящая к аминокислотной замене изолейцина на валин — I82V, и 2) мутация G857T в гене АТФ-связывающего белка АТФ-binding protein, которая влечёт образование стоп-кодона вместо триплета, кодирующего глутаминовую кислоту — E86I. Интересно, что мутация C284T в гене еноил-ацил редуктазы, а также описанные дополнительные мутации в генах гипотетического транспортного белка (G491A), белка-антипортера (C137T), мембранного белка (A545G) и АТФ-связывающего белка (G857T) стабильно наследовались при культивировании бактерий в отсутствие селективного давления триклозана (рис. 4). Все описанные мутации локализованы в генах, ассоциированных с транспортом веществ в клетке. Это ещё раз подтверждает важность транспортной функции бактериальной клетки при формировании устойчивости к триклозану.

Обсуждение. Проведённое исследование продемонстрировало возможность селекции устойчивых к

Позиция	S. aureus ATCC 25923			Аминокислотная замена	«Гипотетический» транспортный белок	Позиция	S. aureus ATCC 25923			Аминокислотная замена
	Нуклеотид	Нуклеотид	Нуклеотид				Нуклеотид	Нуклеотид	Нуклеотид	
673033	G	G	G		«Гипотетический» транспортный белок	673033	G	G	C	«Гипотетический» транспортный белок
691206	G	G	G			691206	G	G	A	
692033	A	A	A			692033	A	A	G	
718642	G	A	A	R164H		718642	G	G	G	
872262	C	T	T	M46I		872262	C	C	C	
901066	A	A	A			901066	A	T	A	
901548	G	G	G			901548	G	G	A	
902254	C	C	C			902254	C	C	A	
915623	T	T	T			915623	T	C	C	
934170	C	T	C			934170	C	C	C	
935080	C	T	C		935080	C	C	C		
949765	C	C	C		949765	C	T	C		
949792	A	A	G	A95V	949792	A	A	A	fabI	
959082	C	T	T		959082	C	T	T		
965576	C	T	C		965576	C	C	C		
965577	T	A	T		965577	T	T	T		
995823	A	T	A		995823	A	A	A		
995827	A	T	A		995827	A	A	A		
995830	T	A	T		995830	T	T	T		
1031907	T	A	T		1031907	T	T	T		
1358035	A	T	A		1358035	A	A	A		
1626577	G	G	C		1626577	G	G	G		
1628017	G	G	G		1628017	G	A	G	Мембранный белок	
1716398	T	C	T		1716398	T	T	T		
1862440	A	A	A		1862440	A	G	G		
2062764	G	A	G		2062764	G	G	G		
2063041	G	G	G		2063041	G	T	T	E286	
2230517	C	T	C		2230517	C	C	C		

Рис. 4. Нуклеотидные и аминокислотные замены, выявленные в триклозан-устойчивых штаммах, в сравнении с исходным штаммом *S. aureus* ATCC25923.

триклозану вариантов *S. aureus* при культивировании в присутствии субингибиторных концентраций данного антисептика. Настораживает тот факт, что триклозан-устойчивые штаммы стафилококков формируются относительно быстро — в течение 40 сут культивирования, или 13 пассажей, а также что уровень приобретаемой устойчивости достаточно высок — в 128 раз от исходного уровня. Молекулярный механизм устойчивости штаммов *S. aureus* к триклозану был ассоциирован с приобретением точечных мутаций в ряде генов, описанных ранее в литературе (*fabI*), и новых, ранее не описанных (связанных с мембранным транспортом бактериальной клетки). Полногеномное секвенирование триклозан-устойчивых штаммов *S. aureus* Tr1, Tr2, Tr1C и Tr2C позволило выявить различия в наборах мутаций у двух линий штаммов: в штамме *S. aureus* Tr1 были выявлены стабильно наследуемые мутации в генах гипотетического транспортного белка HlyC/CorC family transporter и белка-антипортера Na⁺/H⁺ antiporter subunit F, а в штамме *S. aureus* Tr2 — мутаций в генах мембранного гипотетического белка и АТФ-связывающего белка АТР-binding protein.

Полученные данные представляют теоретический интерес — с точки зрения понимания молекулярных механизмов эволюции бактерий, устойчивых к антибактериальным препаратам, а также имеют практическое значение для клиницистов и эпидемиологов — для выбора адекватных режимов применения антисептиков и оценки эффективности препаратов биоцидов.

Финансирование. Исследование выполнено в рамках Федеральных НИР Роспотребнадзора № 049 «Мониторинг и изучение свойств возбудителей пищевых и госпитальных инфекций, разработка средств их диагностики» и № 062 «Геномный, протеомный и метагеномный анализ штаммов, депонированных в Государственной коллекции патогенных микроорганизмов и клеточных культур («ГКПМ-Оболensk»)».

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА (пп. 2—11, 13, 14
см. REFERENCES)

1. Попова А.Ю., Ежлова Е.Б., Игонина Е.И. Надзор за соблюдением санитарно-эпидемиологического законодательства при оказании медицинской помощи в целях обеспечения ее качества и безопасности. *Вестник Росздравнадзора*. 2016; 1: 74—80.
12. Родин В.Б., Паников Н.С., Кобелев В.С., Акимова Н.А., Холоденко В.П. Упрощенная модель роста колоний одноклеточных микроорганизмов и ее использование для оценки воздействия биоцидов на микробные клетки. *Прикладная биохимия и микробиология*. 1998; 34: 403—9.

REFERENCES

1. Popova A.Y., Yezhlova E.B., Igonina E.I. Supervision of compliance with the sanitary and epidemiological legislation in the provision of medical care in order to ensure its quality and safety. *Vestnik Roszdravnadzora*. 2016; 1: 74—80. (in Russian)
2. Lax S., Gilbert J.A. Hospital-associated microbiota and implications for nosocomial infections. *Trends Mol. Med.* 2015; 21(7): 427—32.
3. Williams M.M., Armbruster C.R., Arduino M.J. Plumbing of hospital premises is a reservoir for opportunistically pathogenic microorganisms: a review. *Biofouling*. 2013; 29(2): 147—62.
4. Skovgaard S., Nielsen L.N., Larsen M.H., Skov R.L., Ingmer H., Westh H. Staphylococcus epidermidis isolated in 1965 are more susceptible to triclosan than current isolates. *PLoS One*. 2013; 8(4).
5. Ortega Morente E., Fernández-Fuentes M.A., Grande Burgos M.J., Abriouel H., Pérez Pulido R., Gálvez A. Biocide tolerance in bacteria. *Int. J. Food Microbiol.* 2013; 162(1): 13—25.
6. Pal C., Bengtsson-Palme J., Kristiansson E., Larsson D.G.J. Co-occurrence of resistance genes to antibiotics, biocides and metals reveals novel insights into their co-selection potential. *BMC Genomics*. 2015; 16: 964.
7. Schwaiger K., Harms K.S., Bischoff M., Preikschat P., Mölle G., Bauer-Unkauf I., Lindorfer S., Thalhammer S., Bauer J., Hölzel C.S. Insusceptibility to disinfectants in bacteria from animals, food and humans—is there a link to antimicrobial resistance? *Front Microbiol.* 2014; 5: 88.
8. Capita R., Alonso-Calleja C. Antibiotic-resistant bacteria: a challenge for the food industry. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 2013; 53(1): 11—48.
9. Kampf G., Degenhardt S., Lackner S., Jesse K., Baum H., Ostermeyer C. Poorly processed reusable surface disinfection tissue dispensers may be a source of infection. *BMC Infect. Dis.* 2014; 14: 37.
10. Norby Nielsen L. Staphylococcus aureus but not Listeria monocytogenes adapt to triclosan and adaptation correlates with increased *fabI* expression and *agr* deficiency / L. Norby Nielsen, Marianne Halberg Larsen, Sissel Skovgaard, Vicky Kastbjerg, Henrik Westh, Lone Gram, and Hanne Ingmer. *BMC Microbiol.* 2013; 13: 177.
12. Rodin V.B., Panikov N.S., Koblelev V.S., Akimova N.A., Kholodenko V.P. A simplified model for the growth of colonies of unicellular microorganisms and its use for assessing the effect of biocides on microbial cells. *Prikladnaya biokhimiya i microbiologiya*. 1998; 34: 403—9. (in Russian)
11. Forbes S., Latimer J., Bazaid A., McBain A.J. Altered competitive fitness, antimicrobial susceptibility, and cellular morphology in a triclosan-induced small-colony variant of *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2015; 59(8): 4809—16.
13. Thomas J.C., Khoury R., Neeley C.K., Akroush A.M., Davies E.C. Fast CTAB method of human DNA isolation for polymerase chain reaction applications. *Biochem.* 1997; 25(4): 233—5.
14. Ciusa M.L., Furi, Knight D., Decorosi F., Fondi M., Raggi C. et al. A novel resistance mechanism to triclosan that suggests horizontal gene transfer and demonstrates a potential selective pressure for reduced biocide susceptibility in clinical strains of *Staphylococcus aureus*. *Int. J. of Antimicrob. Agents.* 2012; 40: 210—20.

Поступила 29.08.17
Принята к печати 31.08.17