

Генетическая и биохимическая характеристика стафилококков, встречающихся в Новосибирске

Ю.Н. Козлова¹, Н.В. Фоменко², В.В. Морозова¹, И.В. Саранина¹, А.Ю. Тикун¹, Д.А. Ганичев³, А.Г. Самохин⁴,
В.В. Павлов⁴, О.М. Рожнова⁴, И.А. Бондарь⁵, Е.В. Зенкова⁵, В.В. Нимаев⁶, В.В. Климонтов⁶, Н.В. Тикун¹✉

¹ Институт химической биологии и фундаментальной медицины Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия

² АО Вектор-Бест, Новосибирск, Россия

³ Негосударственное учреждение здравоохранения Дорожная клиническая больница на ст. Новосибирск-Главный ОАО «Российские железные дороги», Новосибирск, Россия

⁴ Новосибирский научно-исследовательский институт травматологии и ортопедии им. Я.Л. Цивьяна Министерства здравоохранения Российской Федерации, Новосибирск, Россия

⁵ Новосибирский медицинский университет Министерства здравоохранения Российской Федерации, Новосибирск, Россия

⁶ Научно-исследовательский институт клинической и экспериментальной лимфологии – филиал Федерального исследовательского центра Института цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия

Стафилококки способны поражать практически любые органы и ткани организма человека, вызывая поверхностные и глубокие гнойные инфекции, поражения дыхательных и мочевыводящих путей, а также провоцировать пищевые отравления и интоксикации. В последние годы участились случаи заболеваний, возбудителями которых оказываются коагулазонегативные стафилококки. Такие виды, как *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus haemolyticus* и *Staphylococcus hominis* значительно чаще выявляются при внутрибольничных инфекциях. Особая опасность этих патогенов заключается в повышенной вирулентности и патогенности штаммов, а также в их частой устойчивости к различным антибиотикам. Особенно трудно поддаются лечению заболевания, вызванные метициллин-резистентными стафилококками. Правильная идентификация стафилококков и их чувствительности к антибиотикам важна для постановки клинического диагноза и назначения адекватной лекарственной терапии. В связи с этим востребованы методы быстрого и точного определения видов стафилококков для оценки их патогенных свойств и наличия метициллин-резистентности. Целью данного исследования – характеристика стафилококков, в том числе и по устойчивости к антибиотикам, изолированных в г. Новосибирске из образцов, полученных от людей, животных и из окружающей среды. Проанализирована коллекция из 100 штаммов стафилококков. Видовая идентификация стафилококков проведена по результатам секвенирования гена 16S рРНК. Выявлено 11 видов стафилококков. Среди штаммов, полученных от больных из стационаров, доминировали *Staphylococcus aureus* (79.1 %), *Staphylococcus epidermidis* составили около 12.5 %. Среди внебольничных штаммов *S. aureus* и *S. epidermidis* выделены примерно в равных соотношениях. Обнаружение коагулазоположительных видов проводили стандартным биохимическим методом и выявлением гена *coa* методом ПЦР в реальном времени. Для штаммов *S. aureus* показано 100 % совпадение результатов между наличием гена *coa* и присутствием коагулазной активности, что свидетельствует о том, что выявление гена *coa* может служить точным методом идентификации *S. aureus*. Получен высокий уровень совпадения (99 %) между наличием в клетках стафилококков гена *tesA* и фенотипической устойчивостью к оксациллину. Исследование стафилококков на присутствие гена *tesA* может рассматриваться как альтернатива фенотипическому методу обнаружения метициллин-резистентных штаммов стафилококков.

Ключевые слова: *Staphylococcus*; коагулазонегативные стафилококки; метициллин-резистентные стафилококки (MRS); *tesA*; *coa*; диагностика стафилококковой инфекции.

Genetic and biochemical characterization of staphylococci occurring in Novosibirsk, Russia

Y.N. Kozlova¹, N.V. Fomenko², V.V. Morozova¹,
I.V. Saranina¹, A.Yu. Tikunov¹, D.A. Ganichev³,
A.G. Samokhin⁴, V.V. Pavlov⁴, O.M. Rozhnova⁴,
I.A. Bondar⁵, E.V. Zenkova⁵, V.V. Nimaev⁶,
V.V. Klimontov⁶, N.V. Tikunov¹✉

¹ Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine SB RAS, Novosibirsk, Russia

² Joint-Stock Company Vector-Best, Novosibirsk, Russia

³ Railway Clinical Hospital on the station Novosibirsk-Glavnyy, Novosibirsk, Russia

⁴ Novosibirsk Research Institute of Traumatology and Orthopaedics n. a. L.A. Tsivyan of Ministry of Health of the Russian Federation, Novosibirsk, Russia

⁵ Novosibirsk State Medical University of Ministry of Health of the Russian Federation, Novosibirsk, Russia

⁶ Scientific Institute of Clinical and Experimental Lymphology – Branch of Federal Scientific Center Institute of Cytology and Genetics SB RAS, Novosibirsk, Russia

Staphylococci are capable of penetrating many human tissues and organs, causing superficial and deep purulent infections, respiratory and urinary tract infections, food poisoning and intoxication. Last years, coagulase-negative staphylococci were the cause of infection in many cases. Infectious agents, namely *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus haemolyticus*, and *Staphylococcus hominis*, were detected more often as nosocomial infections. A particular danger of these infections is a high virulence and pathogenicity of bacterial strains and their resistance to various antibiotics. Methicillin-resistant staphylococci are especially difficult to treat. The correct identification of staphylococci and their sensitivity to antibiotics are important for clinical diagnosis and appointment of adequate drug therapy. Rapid and accurate identification of *Staphylococcus* species and detection of their sensitivity to antibiotics is quite important. The aim of this study was to study staphylococci isolated in Novosibirsk from human, animal and environmental samples. A collection of 100 staphylococcus strains was analyzed. *Staphylococcus* species were identified by sequencing the 16S rRNA gene. Eleven staphylococcus species were identified. Among the strains obtained from hospitalized patients, *Staphylococcus aureus* do-

minated (79.1 %), *Staphylococcus epidermidis* amounted to about 12.5 %. However, *S. aureus* and *S. epidermidis* strains were isolated in an approximately equal proportion from community-associated samples. Identification of coagulase positive strains was performed using a standard biochemical method and by real-time PCR of the *coa* gene. 100 % coincidence between the presence of the gene and coagulase activity for *S. aureus* strains was recorded, which suggests that detection of the *coa* gene can be used as a correct method for *S. aureus* identification. A high coincidence rate (99 %) was revealed between the phenotypic resistance to oxacillin and the presence of the staphylococcal *mecA* gene. The study of staphylococci for the presence of the *mecA* gene can be considered as an alternative to the phenotypic method for identification of methicillin-resistant strains of staphylococci.

Key words: *Staphylococcus*; coagulase-negative staphylococci; methicillin-resistant staphylococcus strains (MRS); *mecA*; *coa*; diagnostics of staphylococcal infection.

КАК ЦИТИРОВАТЬ ЭТУ СТАТЬЮ:

Козлова Ю.Н., Фоменко Н.В., Морозова В.В., Саранина И.В., Тикунов А.Ю., Ганичев Д.А., Самохин А.Г., Павлов В.В., Рожнова О.М., Бондарь И.А., Зенкова Е.В., Нимаев В.В., Климонтов В.В., Тикунова Н.В. Генетическая и биохимическая характеристика стафилококков, встречающихся в Новосибирске. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2017;21(8):952-958. DOI 10.18699/VJ17.318

HOW TO CITE THIS ARTICLE:

Kozlova Y.N., Fomenko N.V., Morozova V.V., Saranina I.V., Tikunov A.Yu., Ganichev D.A., Samokhin A.G., Pavlov V.V., Rozhnova O.M., Bondar' I.A., Zenkova E.V., Nimaev V.V., Klimontov V.V., Tikunova N.V. Genetic and biochemical characterization of staphylococci occurring in Novosibirsk, Russia. Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selekcii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2017;21(8):952-958. DOI 10.18699/VJ17.318 (in Russian)

Стафилококки – грамположительные факультативно-анаэробные малоподвижные бактерии, не образующие спор. К настоящему времени описано более 40 видов, входящих в род *Staphylococcus* (Ghebremedhin et al., 2008). Большинство бактерий из этого рода в норме обитают на коже и слизистых человека и животных, а также являются частью почвенных микробных сообществ (Madigan, Martinko, 2005). В зависимости от способности к продукции коагулазы, отвечающей за превращение фибриногена в фибрин и вызывающей свертывание крови, стафилококки подразделяются на коагулазопозитивные и коагулазонегативные. К первым относятся пять видов стафилококков, из которых только *Staphylococcus aureus* играет важную роль в патологии человека. Коагулазопозитивные стафилококки – *Staphylococcus pseudintermedius* и *Staphylococcus intermedius* – возбудители самых распространенных и опасных стафилококковых инфекций в ветеринарии, при тесном контакте с животными способны также передаваться человеку (Bond, Loeffler, 2012). Большинство представителей рода *Staphylococcus* являются коагулазонегативными и считаются менее вирулентными (Götz et al., 2006).

Стафилококки способны поражать практически любые органы и ткани организма человека, вызывая поверхностные и глубокие гнойные абсцессы, инфекции дыхательных и мочевыводящих путей, гнойно-некротические процессы в послеоперационных ранах, а также провоцировать пищевые отравления и интоксикации. Считается, что более 85 % всех стафилококковых инфекций человека вызваны *S. aureus* (Карпов, Качанко, 2006; Sievert et al., 2013). В последние годы участились случаи гнойно-септических инфекций у людей, возбудителями которых являются коагулазонегативные стафилококки *Staphylococcus*

epidermidis, *Staphylococcus saprophyticus*, *Staphylococcus haemolyticus* и *Staphylococcus hominis*. Они значительно чаще стали регистрироваться при нозокомиальных инфекциях, особенно у больших в отделениях интенсивной терапии и хирургических отделениях. Какое-то время эти инфекции могут протекать в виде бессимптомной бактериемии, не переходя в классические манифестные формы гнойной инфекции, в то же время резко истощая компенсаторные механизмы больного и повышая риск неблагоприятных исходов (Черный и др., 2010). Особая опасность внутрибольничных стафилококковых инфекций заключается в повышенной вирулентности и патогенности таких штаммов, а также в их частой устойчивости к различным антибиотикам. Особенно трудно поддаются лечению заболевания, вызванные метициллин-резистентными стафилококками (MRS), обладающими устойчивостью к бета-лактамам – группе антибиотиков, включающей метициллин, оксациллин, цефалоспорины и пр. Правильная идентификация стафилококков важна для постановки клинического диагноза и назначения адекватной лекарственной терапии, однако принятые процедуры лабораторного тестирования клинических изолятов (исследование способности к ферментации маннита, коагулазной и гемолитической активностей и др.) в ряде случаев сопровождаются ошибками и нуждаются в перепроверке другими методами. В связи с этим востребована быстрая и точная идентификация видов стафилококков для оценки их патогенных свойств и наличия метициллин-резистентности.

Цель данного исследования – характеристика стафилококков, в том числе и по устойчивости к антибиотикам, изолированных в г. Новосибирске из образцов, полученных от людей, животных и из окружающей среды.

Таблица 1. Синтетические олигонуклеотиды, использованные для анализа генов *tesA* и *coa*

| Ген | Олигонуклеотид | Нуклеотидная последовательность олигонуклеотида |
|-------------|----------------|--|
| <i>tesA</i> | Fmec | 5'-AGGGACTCGAAAACTTTACGAT-3' |
| | Rmec | 5'-ATTAATGTATGTGCGATTGTATTGC-3' |
| | Zmec | 5'-(HEX)-GCTCCAACATGAAGATGGCTATCGTGTACAATCGT-(BHQ1)-3' |
| <i>coa</i> | Fco | 5'-ACTCAAGGAGAATCAAGTGATATTGA-3' |
| | Rco | 5'-GAATCTGGTCTCGCTTCATATC-3' |
| | Zco | 5'-(HEX)-TCGTGTATTACGGATACCTGTACCAGCATCTC-(T-BHQ1)-3' |

Материалы и методы

Бактериальные штаммы. Исследовали 100 штаммов бактерий рода *Staphylococcus*, выделенных из образцов, взятых от людей, животных и из окружающей среды. Забор материала производили стерильным ватным тампоном. Бактериальные клетки смывали с тампона стерильным 0.9 % раствором NaCl, затем 10-кратные разведения полученной клеточной суспензии высевали на маннит-солевой агар и агар CLED (Laboratorios Conda S.A., Испания). Чистые культуры бактерий получали путем трехкратного пересева; принадлежность к роду *Staphylococcus* определяли по культурально-морфологическим признакам. Чистые культуры стафилококков были депонированы в коллекции экстремофильных микроорганизмов и типовых культур (КЭМТК) Института химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН (ИХБФМ СО РАН).

Определение вида бактерий. Видовую принадлежность стафилококков определяли путем секвенирования последовательностей гена 16S рРНК. В качестве матрицы для амплификации гена 16S рРНК использовали бактериальные лизаты. ПЦР проводили с универсальными олигонуклеотидов 16s-8-f-b 5'-AGRGTTTGATCCTGGCTCA-3' и 16s-1350-r-b 5'-ACGGGCGGTGTGTACAAG-3', описанных ранее (Wang, Qian, 2009). В результате ПЦР получали фрагменты ДНК длиной 1342 н.п. Секвенирование полученных ПЦР-фрагментов осуществляли в обоих направлениях с применением тех же праймеров и набора BigDye™ Terminator v.3.1 (Applied Biosystems, США) по протоколам производителя. Капиллярный электрофорез продуктов реакции проводили на анализаторе ABI 3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, США). Нуклеотидные последовательности верифицировали с помощью программы Sequencher v.4.0.5. и анализировали с использованием базы данных GenBank Database. Для определения вида сопоставляли полученную последовательность с наиболее близкими последовательностями рода *Staphylococcus*, присутствующими в базе данных GenBank Database (при уровне сходства последовательностей не менее 99 %). Видовую идентификацию в ряде случаев подтверждали на биохимическом анализаторе Gene III OmniLog System (BioLog, США).

Анализ биохимических свойств. Биохимические свойства выделенных бактерий проверяли стандартными методами: а) выявлением гемолитической активности на агаризованной среде с добавлением до 10 % крови кролика; б) выявлением наличия коагулазы пробирочным методом с плазмой кролика (Лебедева, 1973). Чувствительность к антибиотикам (бензилпенициллин, окса-

циллин, гентамицин, эритромицин, ципрофлоксацин, левофлоксацин, клиндамицин, ванкомицин) выделенных штаммов *Staphylococcus* spp. определяли диско-диффузионным методом, согласно МУК 4.2.1890-04 «Определение чувствительности к антибактериальным препаратам», с использованием агара Мюллера–Хинтона. Штаммы MRS идентифицировали на основании чувствительности к оксациллину.

Генетический анализ. Наличие генов *coa* и *tesA* в геномах исследуемых штаммов стафилококков подтверждали методом ПЦР в реальном времени (ПЦР-рв). Для этого из 100 мкл бактериальной суспензии выделяли ДНК с использованием набора реагентов «РеалБест ДНК-экспресс» (АО «Вектор-Бест», Россия). В качестве положительного контроля ПЦР использовали ДНК внутреннего контрольного образца, входящего в состав набора для выделения. ПЦР-рв проводили с использованием соответствующих праймеров и зондов, представленных в табл. 1, на амплификаторе с детекцией в режиме реального времени CFX96 Touch™ (Bio-Rad, США). Количественную оценку ДНК осуществляли по калибровочным кривым, построенным по результатам анализа серии разведений стандартного образца. Стандартным образцом являлась очищенная ДНК *S. aureus*, штамм КЭМТК 707, концентрация которой определена спектрофотометрически. В качестве контрольных штаммов для фенотипических тестов и генотипирования были взяты чувствительные к метициллину штаммы *S. aureus* ATCC 25923 и *S. aureus* ATCC 29213 и резистентный штамм *S. aureus* ATCC 43300. В ряде случаев полученные ПЦР-фрагменты секвенировали с применением тех же праймеров (см. табл. 1). Секвенирование и анализ последовательностей осуществляли аналогично описанному выше.

Результаты и обсуждение

Анализ видового разнообразия исследуемых штаммов стафилококков. В 2010–2014 гг. из различных образцов, взятых от людей, животных и из окружающей среды выделены 100 штаммов стафилококков, которые были депонированы в КЭМТК ИХБФМ СО РАН. Из 100 штаммов 85 изолированы от здоровых и больных людей, 48 штаммов – от пациентов, находившихся на стационарном лечении с торпидными трофическими язвами, парапротезной инфекцией и инфекцией мягких тканей, в том числе на фоне сахарного диабета (образцы из стационаров получены из Дорожной клинической больницы на станции Новосибирск-Главный ОАО «РЖД»; Новосибирского научно-исследовательского института травматологии и

Таблица 2. Идентификация выявленных штаммов стафилококков

| № | Вид стафилококка | Штаммы, шт. | | | | |
|-------|----------------------------|-------------|---------------------------|---------------|--|-----------------------------------|
| | | всего | от больных из стационаров | внебольничные | от условно здоровых людей и амбулаторных больных | от животных и из окружающей среды |
| 1 | <i>S. aureus</i> | 56 | 38 | 18 | 15 | 3 |
| 2 | <i>S. capitis</i> | 2 | 0 | 2 | 2 | 0 |
| 3 | <i>S. epidermidis</i> | 24 | 6 | 18 | 13 | 5 |
| 4 | <i>S. equorum</i> | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 |
| 5 | <i>S. haemolyticus</i> | 2 | 1 | 1 | 1 | 0 |
| 6 | <i>S. hominis</i> | 4 | 1 | 3 | 3 | 0 |
| 7 | <i>S. intermedius</i> | 1 | 0 | 1 | 0 | 1 |
| 8 | <i>S. lentus</i> | 1 | 0 | 1 | 0 | 1 |
| 9 | <i>S. pseudintermedius</i> | 4 | 0 | 4 | 0 | 4 |
| 10 | <i>S. simulans</i> | 2 | 1 | 1 | 1 | 0 |
| 11 | <i>S. warneri</i> | 3 | 1 | 2 | 1 | 1 |
| Итого | | 100 | 48 | 52 | 37 | 15 |

ортопедии им. Я.Л. Цивьяна Минздрава России; Научно-исследовательского института клинической и экспериментальной лимфологии; Государственной Новосибирской областной клинической больницы Минздрава РФ), 37 – от условно здоровых лиц и амбулаторных больных. От животных и из окружающей среды изолировано 15 штаммов (табл. 2).

По результатам секвенирования гена 16S рПНК определена видовая принадлежность выделенных штаммов стафилококков (см. табл. 2). Более половины штаммов составили штаммы *S. aureus*, около 1/3 – *S. epidermidis* (см. табл. 2). Видовое разнообразие внебольничных штаммов отличалось от такового у штаммов, выделенных из стационаров (см. табл. 2). Так, среди штаммов, полученных от больных из стационаров, доминировали *S. aureus* (79.1 %), *S. epidermidis* составили около 12.5 %, а *S. haemolyticus*, *S. simulans*, *S. hominis* и *S. warneri* встретились в единичных случаях. Среди внебольничных штаммов *S. aureus* и *S. epidermidis* выделены в примерно равных соотношениях, кроме того, у условно здоровых и амбулаторных больных спектр выявленных видов стафилококков шире, и, помимо вышеперечисленных видов, обнаружены *S. capitis* и *S. equorum* (см. табл. 2). *S. lentus*, *S. intermedius* и *S. pseudintermedius* были изолированы только из образцов от животных (см. табл. 2).

Идентификация стафилококков с использованием биохимических маркеров. Наличие у стафилококков ряда биохимических свойств, в частности гемолитической и коагулазной активности, во многом обуславливает их патогенность и клиническую значимость. Исследуемые штаммы стафилококков протестированы на наличие некоторых биохимических свойств методами классической микробиологии. Анализ выявленных штаммов на наличие гемолитической активности показал, что 72 % проанализированных штаммов стафилококков обладали этой активностью, причем гемолитические свойства присутствовали как у штаммов *S. aureus*, так и у других видов стафилококков (табл. 3).

Считается, что одна из основных биохимических характеристик *S. aureus* – способность разлагать маннит до кислоты в маннит-солевом агаре, поэтому тест на ферментацию маннита используется для идентификации штаммов *S. aureus* (Нетрусов и др., 2005). В ходе исследования выявлено, что расщеплять маннит могут не только *S. aureus*, но и бактерии других видов стафилококков: *S. haemolyticus*, *S. warneri*, *S. capitis*, *S. lentus*, *S. equorum*, *S. hominis* и *S. intermedius* (см. табл. 3). Полученные результаты подтвердили, что тест на способность к ферментации маннита не позволяет точно выявлять *S. aureus* и требуется дополнительная идентификация.

Тесты на наличие коагулазы также используются для межвидовой диагностики стафилококков и выявления *S. aureus* (Нетрусов и др., 2005). Сравнение результатов выявления этого маркера у стафилококков фенотипическим и генетическим методами продемонстрировало 100 % совпадение только для штаммов *S. aureus*, включая тест-штаммы (см. табл. 3). У других коагулазопозитивных стафилококков (*S. intermedius* и *S. pseudintermedius*) соответствующий ПЦР-фрагмент не обнаружен (см. табл. 3). Таким образом, разработанная система детекции гена *coa* является высокоспецифичной в отношении штаммов *S. aureus* и может быть использована для идентификации бактерий этого вида.

Детекция резистентных к антибиотикам стафилококков, включая MRS. Исследование чувствительности штаммов стафилококков к антибиотикам показало, что большинство исследованных штаммов устойчиво к эритромицину (более 75 % штаммов) и бензилпенициллину (86 % резистентных штаммов среди *S. aureus*, 96 % – среди *S. epidermidis*). Вместе с тем все протестированные штаммы чувствительны к ванкомицину и более 65 % – к оксациллину и гентамицину (табл. 4).

Маркером чувствительности стафилококков к β-лактамам антибиотикам считается оксациллин. Если стафилококк обладает резистентностью к оксациллину, то и другие β-лактамы антибиотиками (метициллин, пеницил-

Таблица 3. Выявление свойств исследуемых стафилококков биохимическими и генетическими методами

| Видовая принадлежность штамма | Всего штаммов, шт. | Кол-во штаммов, обладающих активностью | | | Выявление гена <i>coa</i> ² |
|-------------------------------|--------------------|--|-----------------------|-------------|--|
| | | гемолитической ¹ | маннит-ферментирующей | коагулазной | |
| <i>S. aureus</i> | 56 | 44 | 56 | 56 | 56 |
| <i>S. capitis</i> | 2 | 1 | 2 | 0 | 0 |
| <i>S. epidermidis</i> | 24 | 14 | 0 | 0 | 0 |
| <i>S. equorum</i> | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 |
| <i>S. haemolyticus</i> | 2 | 2 | 2 | 0 | 0 |
| <i>S. hominis</i> | 4 | 1 | 1 | 0 | 0 |
| <i>S. intermedius</i> | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 |
| <i>S. lentus</i> | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 |
| <i>S. pseudintermedius</i> | 4 | 3 | 0 | 3 | 0 |
| <i>S. simulans</i> | 2 | 2 | 0 | 0 | 0 |
| <i>S. warneri</i> | 3 | 2 | 3 | 0 | 0 |
| Итого | 100 | 72 | 67 | 60 | 56 |

¹ Гемолитическую активность определяли через 20 ч инкубации штаммов на агаризованной среде с добавлением до 10 % крови кролика; ² коагулазная активность и присутствие гена *coa* выявлены также у контрольных тест-штаммов *S. aureus* ATCC 25923, ATCC 29213 и ATCC 43300.

Таблица 4. Чувствительность штаммов стафилококков к антибиотикам

| Антибиотики | | Кол-во штаммов, шт. (% от общего числа штаммов) | | | | | | | | |
|-------------------------------|-------------------------|---|---------------|------------|-----------------------|---------------|------------|------------------------|---------------|------------|
| Группа | Концентрация | <i>S. aureus</i> | | | <i>S. epidermidis</i> | | | Остальные стафилококки | | |
| | | Чувствительные | Промежуточные | Устойчивые | Чувствительные | Промежуточные | Устойчивые | Чувствительные | Промежуточные | Устойчивые |
| Пенициллины | Бензилпенициллин, 10 ЕД | 8 (14) | 0 | 48 (86) | 1 (4) | 0 | 23 (96) | 10 (50) | 0 | 10 (50) |
| Полусинтетические пенициллины | Оксациллин, 1 мкг | 45 (81) | 0 | 11 (19) | 17 (71) | 1 (4) | 6 (25) | 19 (95) | 0 | 1 (5) |
| Аминогликозид II поколения | Гентамицин, 10 мкг | 37 (67) | 7 (12) | 12 (21) | 19 (79) | 1 (4) | 4 (17) | 18 (90) | 0 | 2 (10) |
| Макролид | Эритромицин, 15 мкг | 8 (14) | 35 (63) | 13 (23) | 5 (21) | 9 (38) | 10 (42) | 3 (15) | 10 (50) | 7 (35) |
| Фторхинолоны I поколения | Ципрофлоксацин, 5 мкг | 13 (22) | 21 (39) | 22 (39) | 14 (58) | 2 (8) | 8 (34) | 16 (80) | 1 (5) | 3 (15) |
| Фторхинолоны III поколения | Левифлоксацин, 5 мкг | 39 (70) | 7 (12) | 10 (18) | 14 (58) | 7 (29) | 3 (13) | 14 (70) | 2 (10) | 4 (20) |
| Полусинтетический линкозамид | Клиндамицин, 2 мкг | 28 (49) | 12 (23) | 16 (28) | 13 (54) | 2 (8) | 9 (38) | 14 (70) | 4 (20) | 2 (10) |
| Гликопептид | Ванкомицин, 30 мкг | 56 (100) | 0 | 0 | 24 (100) | 0 | 0 | 18 (90) | 0 | 0 |

Примечание. Устойчивы к двум и более классам антибиотиков: 33 штамма *S. aureus*; 13 штаммов *S. epidermidis*; 6 штаммов остальных стафилококков.

лины, ингибитор-защищенные аминопенициллины, цефалоспорины всех поколений, карбапенемы) будут неэффективны (Сидоренко, Тишков, 2004; Карпов, Качанко, 2006; Черный и др., 2010). Чувствительность стафилококков к β -лактамам антибиотикам обусловлена способностью β -лактамов необратимо связываться с серин-содержащим активным центром так называемых пенициллин-связывающих белков (ПСБ), необходимых для построения клеточной стенки стафилококка, что приводит к гибели бактерии.

Различают, по крайней мере, пять различных ПСБ, из которых ПСБ2а, кодируемый геном *mecA*, обладает почти в 1000 раз меньшим аффинитетом к β -лактамам. Поэтому стафилококк, носитель гена *mecA*, способен выдерживать воздействие этих антибиотиков (Сидоренко, Тишков, 2004). Ген *mecA* располагается в крупном мобильном генетическом элементе *SCCmec*. Метициллин-резистентные штаммы *S. aureus* (MRSA) часто обладают устойчивостью и ко многим другим антибиотикам, поскольку *SCCmec*

Таблица 5. Определение антибиотикорезистентности штаммов MRS

| № | Штамм | Выявление гена <i>mecA</i> методом ПЦР-рт | Резистентность, выявленная диско-диффузионным методом | | Происхождение штамма |
|------------------------|------------|---|---|------------------------------------|--|
| | | | к оксациллину ¹ | к другим антибиотикам ² | |
| <i>S. aureus</i> | | | | | |
| 1 | КЭМТК 675 | + | R | PEN, GEN, ERY, CLI, CIP, LEV | Отделяемое послеоперационного свища |
| 2 | КЭМТК 707 | + | R | PEN, ERY, CLI, CIP, LEV | Биоптат из области некроза тканей после хирургического вмешательства |
| 3 | КЭМТК 1639 | + | R | PEN, GEN, ERY, CLI, CIP, LEV | Отделяемое из гнойной раны при СДС |
| 4 | КЭМТК 1695 | + | R | PEN, GEN, CIP, LEV | » |
| 5 | КЭМТК 1732 | + | R | PEN, GEN, CIP | » |
| 6 | КЭМТК 1733 | + | R | PEN, CIP, LEV | Отделяемое послеоперационного свища |
| 7 | КЭМТК 1850 | + | R | PEN, GEN, ERY, CLI, CIP, LEV | Отделяемое из гнойной раны при СДС |
| 8 | КЭМТК 2077 | + | R | PEN, GEN, ERY, CLI, CIP, LEV | » |
| 9 | КЭМТК 2078 | + | R | PEN, GEN, ERY, CLI, CIP, LEV | » |
| 10 | КЭМТК 2105 | + | R | PEN, GEN, ERY, CLI, CIP | » |
| 11 | КЭМТК 2125 | + | R | PEN, GEN, CIP | Биоптат и раневое отделяемое из области хирургического вмешательства |
| 12 | АТСС 43300 | + | R | PEN, GEN, ERY, CLI | Тест-штамм |
| 13 | АТСС 25923 | - | S | S | » |
| 14 | АТСС29213 | - | S | PEN | » |
| <i>S. epidermidis</i> | | | | | |
| 1 | КЭМТК 1547 | + | R | PEN, ERY, CIP, LEV | Отделяемое из гнойной раны при СДС |
| 2 | КЭМТК 1548 | + | R | PEN, ERY | » |
| 3 | КЭМТК 1734 | + | R | PEN, GEN | Отделяемое послеоперационного свища |
| 4 | КЭМТК 1827 | + | R | PEN, GEN, ERY, CLI | Отделяемое из гнойной раны при СДС |
| 5 | КЭМТК 1833 | + | R | PEN, GEN, ERY, CLI, CIP | Отделяемое послеоперационного свища |
| 6 | КЭМТК 2034 | + | I | PEN, CIP | Мазок из носа при хроническом синусите |
| 7 | КЭМТК 2079 | + | R | PEN, ERY | Отделяемое из гнойной раны при СДС |
| <i>S. haemolyticus</i> | | | | | |
| 1 | КЭМТК 1700 | + | R | PEN, GEN, ERY, CIP, LEV | Отделяемое из гнойной раны при СДС |

Примечание. ¹ R – резистентный; S – чувствительный; I – промежуточный. ² PEN – бензилпенициллин; GEN – гентамицин; ERY – эритромицин; CLI – клиндамицин; CIP – ципрофлоксацин; LEV – левофлоксацин. Все штаммы (за исключением КЭМТК 2034) получены из образцов, взятых от пациентов, находящихся на лечении в стационаре. СДС – синдром диабетической стопы.

может содержать множественные локусы устойчивости (Сидоренко, Тишков, 2004), что существенно осложняет лечение. В связи с этим необходима идентификация MRSA и других MRS.

Фенотипическое тестирование штаммов стафилококков из Новосибирска на устойчивость к оксациллину выявило 18 штаммов MRS, 11 из которых – *S. aureus*, 6 – *S. epidermidis*, 1 – *S. haemolyticus* (табл. 5). Доля MRSA составила 19.6 % (11 из 56), метициллин-резистентных *S. epidermidis* (MRSE) – 25.0 % (6 из 24), а доля MRS среди остальных стафилококков – 5.0 % (1 из 20).

Штаммы MRS составили 38 % (18 из 48) из всех штаммов стафилококков, выделенных в условиях стационара, при этом половина штаммов MRS была устойчива к пяти и более антибиотикам (см. табл. 5). В то же время среди 52 внебольничных штаммов выявлен лишь один штамм *S. epidermidis*, КЭМТК 2034, обладающий промежуточной

устойчивостью к метициллину из образца от пациента, находящегося на амбулаторном лечении.

Одним из методов выявления MRS, включая MRSA, может быть генетический анализ на присутствие гена *mecA*. Все штаммы стафилококков были протестированы на присутствие гена *mecA* методом ПЦР-рв. Данные по встречаемости гена *mecA* у фенотипически выявленных штаммов MRS представлены в табл. 5. Оба вида анализа показали высокую степень соответствия (99 %). Только один из штаммов *S. epidermidis* КЭМТК 2034 обладал промежуточной устойчивостью к оксациллину, при этом выявление гена *mecA* подтвердило его принадлежность к MRSE. Среди штаммов, фенотипически чувствительных к оксациллину, ген *mecA* не выявлен.

Таким образом, детекция гена *mecA* методом ПЦР в реальном времени является специфичным методом, превосходит фенотипический метод по чувствительности и

быстроте анализа. Выявление гена *tecA* у стафилококков может рассматриваться как альтернатива фенотипическому выявлению штаммов MRS.

Распространение штаммов MRS в Российской Федерации существенно различается в зависимости от года, профиля учреждения и региона, при этом данные собраны преимущественно в европейской части страны (Сидоренко и др., 1998; Мурашкин и др., 2012; Бо и др., 2014). Опубликованы результаты двух многоцентровых исследований по эпидемиологии нозокомиальных штаммов *S. aureus* в Российской Федерации, включивших в том числе и штаммы, выделенные в стационарах Новосибирска и других городов Сибири (Дехнич и др., 2002, 2008). Результаты исследования 2002 г. показали, что штаммы MRSA составили 33.5 % от общего количества *S. aureus*, выявленных в стационарах России. При этом доля MRSA варьировала в различных отделениях стационаров от 0 до 89.5 % и в основном зависела от профиля отделения (Дехнич и др., 2002). В работе (Дехнич и др., 2008) исследована антибиотикорезистентность штаммов *S. aureus* в отделениях реанимации и интенсивной терапии: в среднем по России встречаемость MRSA составила 49.9 %, в Новосибирске – 72.1 %. В нашем исследовании доля MRSA составила 29 % от общего количества штаммов *S. aureus*, выделенных от госпитализированных пациентов, что приблизительно соответствует ранее полученным данным для стационаров России (Дехнич и др., 2002).

Заключение

Определена видовая принадлежность 100 штаммов стафилококков, выделенных в Новосибирске от больных и здоровых людей, от животных и из окружающей среды, и показано, что среди штаммов, полученных от больных из стационаров, доминировали *S. aureus* (79.1 %), *S. epidermidis* составили около 12.5 %, стафилококки других видов обнаружены в единичных случаях. Среди внебольничных штаммов спектр видов шире, а *S. aureus* и *S. epidermidis* встречаются примерно в равных соотношениях. Анализ наличия гена *coa* в отличие от биохимического теста на коагулазную активность позволил точно идентифицировать *S. aureus*. Выявлен высокий уровень совпадения между наличием в клетках стафилококков гена *tecA* и фенотипической устойчивостью к оксациллину. Исследование стафилококков на присутствие гена *tecA* можно использовать как альтернативу фенотипическому методу идентификации метициллин-резистентных штаммов стафилококков.

Благодарности

Исследование поддержано Программой фундаментальных исследований Президиума РАН (проект № 2014-155); штаммы для исследования взяты из Коллекции экстремофильных микроорганизмов и типовых культур ИХБФМ СО РАН, поддержанной проектом № 0309-2017-0008 Программы биоресурсных коллекций ФАНО России.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Список литературы

- Бо Л., Тихилов Р.М., Шубняков И.И., Божкова С.А., Артюх В.А., Денисов А.О. Анализ эффективности санирующих операций при паразитопротезной инфекции. Травматология и ортопедия России. 2014;2(72):22-29.
- Дехнич А.В., Никулин А.А., Рябкова Е.Л., Кречикова О.И., Сухорукова М.В., Козлов Р.С., исследовательская группа РОСНЕТ. Эпидемиология резистентности штаммов *S. aureus*, выделенных от пациентов в ОРИТ российских стационаров: результаты многоцентрового исследования. Клини. микробиол. антимикроб. химиотер. 2008;10(4):333-345.
- Дехнич А.В., Эйдельштейн И.А., Нарезкина А.Д., Афиногенов Г.Е., Ахметова Л.И., Боронина Л.Г., Гугуцидзе Е.Н., Гудкова Л.В., Здитовецкий Д.Э., Ильина В.Н., Кречикова О.И., Марусина Н.Е., Мултых И.Г., Пылаева С.И., Смирнов И.В., Суворова Т.Н., Тарабан В.К., Фурлетова Н.М., Хасанова С.Г., Щетинин Е.В., Страчунский Л.С. Эпидемиология антибиотикорезистентности нозокомиальных штаммов *Staphylococcus aureus* в России: результаты многоцентрового исследования. Клини. микробиол. антимикроб. химиотер. 2002;4(4):325-337.
- Карпов И.А., Качанко Е.Ф. Внебольничные инфекции, обусловленные метициллинрезистентным стафилококком (MRSA): подходы к антибактериальной терапии. Медицинские новости. 2006; 10:28-32.
- Лебедева М.Н. Руководство к практическим занятиям по медицинской микробиологии. М.: Медицина, 1973.
- Мурашкин Н.Н., Глузмин М.И., Скобликов Н.Э., Бакулев А.Л., Материкин А.И., Глузмина М.М., Хотко А.А. Роль метициллин-резистентных штаммов золотистого стафилококка в патогенезе тяжелых форм атопического дерматита в детском возрасте. Пути достижения ремиссии. Вестн. дерматологии и венерологии. 2012;1:66-74.
- Нетрусов А.И., Егорова М.А., Захарчук Л.М., Колотилова Н.Н. Практикум по микробиологии. М.: Академия, 2005.
- Сидоренко С.В., Резван С.П., Грудинина С.А., Кротова Л.А., Стерхова Г.В. Результаты многоцентрового исследования чувствительности стафилококков к антибиотикам в Москве и Санкт-Петербурге. Антибиотики и химиотерапия. 1998;7:15-25.
- Сидоренко С.В., Тишков В.И. Молекулярные основы резистентности к антибиотикам. Усп. биол. химии. 2004;44:263-306.
- Черный В.И., Колесников А.Н., Кузнецова И.В. Антибактериальная терапия в медицине критических состояний. Донецк: Изд. дом «Заславский», 2010.
- Bond R., Loeffler A. What's happened to *Staphylococcus intermedius*? Taxonomic revision and emergence of multi-drug resistance. J. Small Anim. Pract. 2012;53(3): 147-154. DOI 10.1111/j.1748-5827.2011.01165.x.
- Ghebremedhin B., Layer F., König W., König B. Genetic classification and distinguishing of *Staphylococcus* species based on different partial gap, 16S rRNA, hsp60, rpoB, sodA, and tuf gene sequences. J. Clin. Microbiol. 2008;46(3):1019-1025.
- Götz F., Bannerman T., Schleifer K-H. The Genera *Staphylococcus* and *Micrococcus*. The Prokaryotes. N. Y.: Springer, USA, 2006;5-75.
- Madigan M., Martinko J. Brock Biology of Microorganisms. N. Y.: Prentice Hall, 2005.
- Sievert D.M., Ricks P., Edwards J.R., Schneider A., Patel J., Srinivasan A., Kallen A., Limbago B., Fridkin S. Antimicrobial-resistant pathogens associated with healthcare-associated infections: summary of data reported to the National Healthcare Safety Network at the Centers for Disease Control and Prevention, 2009-2010. Infect. Control Hosp. Epidemiol. 2013;34(1):1-14. DOI 10.1086/668770.
- Wang Y., Qian P.Y. Conservative fragments in bacterial 16S rRNA genes and primer design for 16S ribosomal DNA amplicons in metagenomic studies. PLoS One. 2009;4(10): e7401. DOI 10.1371/journal.pone.0007401.