



УДК: 579.252.5:579.861.2

В.А. Шаркова¹, Е.Ф. Лайман²

ГЕНЕТИЧЕСКИЕ МАРКЕРЫ ПАТОГЕННОСТИ И АНТИБИОТИКОРЕЗИСТЕНТНОСТИ ШТАММОВ *S. EPIDERMIDIS* И *S. AUREUS*, ИЗОЛИРОВАННЫХ ИЗ РАЗЛИЧНЫХ БИОТОПОВ

¹Тихоокеанский государственный медицинский университет, 690950, пр. Острякова, 2,
e-mail: vgmi@mail.ru, г. Владивосток;

²Филиал ФГБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в Приморском крае в городе Лесозаводске», 692091,
ул. Колхозная, 17, e-mail: kirovka@fguzpk.ru, п. Кировский Приморского края

Резюме

Настоящее исследование посвящено мониторингированию штаммов *Staphylococcus* spp (*S. epidermidis* – 51 штамм и *S. aureus* – 48), изолированных из различных биотопов на присутствие генетических детерминант (*fnbpA*, *fnbpB*, *luc PVS*, *mecA*). В динамике исследования отмечен рост частоты обнаружения генов патогенности и сочетаний геновариантов. У штаммов *S. aureus* патогенность генетически детерминирована в 81,8 % случаев, *S. epidermidis* – 4 % (изолированы из операционных ран). Штаммы *S. epidermidis*, выделенные из микрофлоры медицинского персонала отделений хирургического профиля, обнаруживали гены патогенности в 14,3 % случаев (геновариант *fnbpB*, *luc PVS*), *S. aureus* – 85 %, с сочетанием геновариантов (*fnbpA*, *fnbpB*) в 100 %, как и штаммы из операционных ран, но в отличие от последних не обнаруживали ген *luc PVS*. В послеоперационных ранах генетические детерминанты обнаружены с меньшей частотой (по 50 % у обоих видов). В микрофлоре внешней среды обнаружены гены патогенности лишь у *S. epidermidis* (11,1 %). Ген метициллинрезистентности обнаружен у штаммов *S. aureus* и *S. epidermidis*, изолированных из различных биотопов. Анализ распространенности генетических детерминант патогенности подтверждает рост патогенности клинических изолятов в динамике изучения раневых инфекций, позволяет судить о горизонтальном переносе *luc PVS*. Амплификация *fnbpA*, *fnbpB*, *luc PVS*, *mecA* служит объективным критерием при оценке эпидемиологического значения выявления изолятов различных видов рода *Staphylococcus*.

Ключевые слова: гены патогенности, генетические детерминанты, метициллинрезистентность.

V.A. Sharkova¹, E.F. Laiman²

PATHOGENESIS GENETIC MARKERS AND ANTIBIOTIC-RESISTANCE OF *S. EPIDERMIDIS* AND *S. AUREUS* ISOLATED FROM DIFFERENT BIOTOPES

¹Pacific State Medical University;

²Lesozavodsk filiation FSOH «Center of hygiene and epidemiology in Primorsky region», s. Kirovsky

Summary

The present study is devoted to monitoring the strain of *Staphylococcus* spp (*S. epidermidis* – 51 strain and *S. aureus* – 48), isolated from different biotopes to define the genetic determinants (*fnbpA*, *fnbpB*, *luc PVS*, *mecA*). In the process of investigation we observed the growth of pathogenicity genes occurrence and genovariant combinations. The strain *S. aureus* has genetically determinated pathogenicity in 81,8 % cases, *S. epidermidis* – 4 % (isolated from operative wounds). The strains *S. epidermidis*, isolated from the micro flora of surgery departments' medical personnel, contained pathogenicity genes in 14,3 %> cases (genovariant *fnbpB*, *luc PVS*), *S. aureus* – 85 %, in combination with genovariants (*fnbpA*, *fnbpB*) in 100 %, as well as the strains from operative wounds, but in contrast to the latter, they didn't reveal the *luc PVS* gene. In postoperative wounds genetic determinants are found with less occurrence (50 %> each species)/ In the micro flora of the environment there are pathogenicity genes only within *S. epidermidis* (11,1 %). The gene of methicillin resistance is found only within the strains *S. aureus* and *S. epidermidis*, isolated from different biotopes. The analysis of pathogenicity of genetic determinants proves the growth of pathogenicity of clinical isolates in the process of wound infection investigation, it helps to make a conclusion about horizontal shift of *luc PVS*. The amplification of *fnbpA*, *fnbpB*, *luc PVS*, *mecA* serves an objective criterion for the assessment of epidemiological significance of detected isolates of different types within the species of *Staphylococcus*.

Key words: pathogenicity genes, genetic determinants, methicillin resistance.

Актуальность проблемы инфекций, вызванных грамположительными микроорганизмами, во всем мире неуклонно возрастает. Стафилококки являются возбудителями значительной части внебольничных и нозокомиальных бактериемий, пневмоний, инфекций кожи и мягких тканей, костей и суставов. Стафилококковые бактериемии у госпитализированных пациентов, развивающиеся при проникновении *S. aureus* через катетеры из ран или очагов кожных поражений, – главный фактор патогенеза широкого спектра поражений [1, 2, 5, 6]. Распространение стафилококков в лечебных учреждениях приводит к гнойно-септическим осложнениям в хирургических стационарах, нередко сводя на нет результат прекрасно выполненной операции [10]. Стафилококки – представители нормальной микрофлоры кожи человека, дыхательных путей и пищеварительного тракта, их также постоянно обнаруживают в воздухе и окружающей среде [7]. Типичными для эпидермального стафилококка считаются поражения, обусловленные колонизацией *S. epidermidis* различных протезов, катетеров, дренажей или диссеминарованием возбудителя после хирургических вмешательств [4]. Патогенность стафилококков является результатом скоординированной деятельности нескольких выделяемых ими токсинов и ферментов, а также большого количества белков на бактериальной поверхности, которые связывают внеклеточные матричные и плазмменные белки организма человека. Обращает на себя внимание, что скоординированное действие этих факторов является экологическим показателем и для проявления их действия на макроуровне, изолят с большой долей вероятности будет экспрессировать представителей всех групп факторов патогенности [9]. Обычно адгезивный потенциал *S. aureus* связывают со специфическими адгезинами (FnbpA и – B), которые у данного вида сгруппированы в так называемое семейство адгезивных матричных молекул (MSCRAMMs). У другого вида стафилококков (*S. epidermidis*) он обусловлен полисахаридными адгезинами (PIA), обеспечивающими адгезивные свойства этих штаммов к эукариотическим клеткам [9, 11].

Особое значение имеет распространение стафилококков, резистентных к метициллину (или к оксациллину) [10, 12]. Эти особенности стафилококков служат причиной существенного ограничения выбора антибактериальных препаратов для лечения инфекций, вызванных данными микроорганизмами [4]. Большинство исследований указывает на наличие резистентности у 25 % *S. aureus* и более чем у 50 % коагулазонегативных стафилококков. Резистентность стафилококка связана с наличием гена *mec A*, кодирующего белок ПСБ2а, который обладает низкой аффинностью к β-лактамам [3]. Стафилококки, несущие модифицированные пенициллинсвязывающие белки, обозначаются как метициллин (оксациллин)-резистентные *S. aureus* (MRSA) и *S. epidermidis* (MRSE) [4]. Из многих штаммов *S. aureus*, устойчивых к метициллину, самый опасный – MW2 (возник из чувствительного к метициллину MRSA), провоцирующий многие заболевания. Составляющие ДНК MW2, в свою очередь, приводят к появлению генов, кодирующих три эндотоксина, включая PVL или (Panton-Valentine leukocidin). Лейкоцидин Пантона-

Валентайна представляет собой двухкомпонентный лейкоцитный токсин, который имеет отношение как к патофизиологии инфекции кожи, так и к некротической пневмонии и представляет собой основную угрозу здоровым людям всех возрастов по всему миру. PVL произведен из генетического материала бактериофага, который заражает *S. aureus*, делая его более вирулентным [13].

Таким образом, определение патогенного и антибиотикорезистентного потенциала стафилококка является актуальным в терапии, профилактике и диагностике инфекционного, в том числе раневого, процесса.

Целью нашей работы явилось определение генов патогенности и антибиотикорезистентности штаммов *S. epidermidis* и *S. aureus*, выделенных из различных биотопов: операционных и послеоперационных ран, окружающей среды отделений хирургического профиля, медицинского персонала.

Материалы и методы

На присутствие генетических детерминант исследовались *S. aureus* и *S. epidermidis*, у которых определяли маркеры вирулентности методом ПЦР – РВ (ООО «Синтол») с наборами специфических праймеров к 3 генам патогенности: *fnbpA*, *fnbpB*, кодирующих поверхностные фибронектин-связывающие белки, играющие важную роль в способности стафилококков колонизировать ткани организма человека и образовании биопленок, лейкоцидин *Que PVS*), обуславливающий цитотоксическое действие на полиморфноядерные лейкоциты и гену *tec A*, кодирующий дополнительный пенициллинсвязывающий белок и обеспечивающий устойчивость к бета-лактамам антибиотикам [3, 4, 8].

Для проведения исследований использовали прибор с системной детекцией флуоресцентного сигнала в режиме «реального времени» «Rotor-Gene» 6 000. Амплификацию вели согласно схеме, воспроизведенной в инструкции к набору реагентов.

Результаты и обсуждение

Исследовано 48 штаммов *S. aureus* и 51 штамм *S. epidermidis*, изолированных из операционных и послеоперационных ран, верхних дыхательных путей медперсонала, внешней среды. Гены патогенности обнаружены в 81,8 % штаммов *S. aureus*, 4 % *S. epidermidis*, изолированных из операционных ран. *S. aureus*, выделенный из «условно чистых» и «грязных ран», обнаруживал гены *fnbpA* и *fnbpB* с одинаковой частотой (по 81,8 %), ген *luc PVS* – 5,2 %. Последний выявлялся реже, но является маркерным событием для повышения патогенности штаммов микроба и соответственно для развития инфекционного процесса в ране. Из 25 штаммов *S. epidermidis*, выделенного из «условно чистой раны», ген патогенности *fnbpA* обнаружен у одного штамма. Возможно, данное представительство связано с мутацией соответствующего участка в силу воздействия селективных факторов. Штаммы *S. aureus* имели только сочетания генов по два (*fnbpA*, *fnbpB*) или три (*fnbpA*, *fnbpB*, *luc PVS*) (88,9 % и 11,1 %, соответственно). В послеоперационных ранах генетические детерминанты обнаружены с меньшей частотой

(по 50 % штаммов у обоих исследованных видов). Все маркеры патогенности, выявленные из послеоперационных ран находились в сочетаниях по два (*fnbpA*, *fnbpB*; *fnbpB*, *luc PVS*) или три (*fnbpA*, *fnbpB*, *luc PVS*) с преобладанием (*fnbpA*, *fnbpB*) у *S. epidermidis* в 80 %. Прочие 20 % штаммов эпидермального стафилококка носили сочетания детерминант (*fnbpA*, *fnbpB*, *luc PVS*). Единственный штамм золотистого стафилококка, изолированный из послеоперационной раны носил сочетания маркеров патогенности (*fnbpB*, *luc PVS*).

Штаммы *S. aureus*, выделенные из микрофлоры медицинского персонала отделений хирургического профиля, содержали гены патогенности в 85 % случаев, с сочетанием геновариантов (*fnbpA*, *fnbpB*) в 100 %, как и штаммы из операционных ран, но в отличие от последних не обнаруживали ген *luc PVS*. *S. epidermidis* обнаруживал гены патогенности у медицинского персонала в 14,3 % случаев (геновариант *fnbpB*, *luc PVS*).

В микрофлоре внешней среды стационаров хирургического профиля гены патогенности у *S. aureus* не обнаружены, у *S. Epidermidis* – 11,1 %. Один штамм *S. epidermidis*, обнаруженный в воздухе, из 24 исследованных стафилококков, содержал ген *fnbpA*, который не был отмечен у микроорганизмов, изолированных со слизистых медперсонала.

Ген метициллинрезистентности обнаружен у 18,2 % штаммов *S. aureus*, 24 % штаммов *S. epidermidis*, изолированных из операционных ран. В послеоперационных ранах генетические детерминанты антибиотикорезистентности обнаружены в 10 % штаммов только *S. epidermidis*.

Штаммы *S. aureus*., выделенные из микрофлоры медицинского персонала содержали ген *tec-A* в 10 % случаев. При этом *S. epidermidis* обнаруживал ген *tec-A* у медицинского персонала в 4 раза чаще (42,9 %). Обнаружение генов метициллинрезистентности в микрофлоре внешней среды стационаров хирургического профиля составило по 33,3 % у штаммов *S. epidermidis* и 40 % – *S. aureus*.

Стафилококки – распространенное семейство бактерий. Они присутствуют у большинства людей и являются частью нормальной микрофлоры кожных покровов, слизистых оболочек и нижнего отдела кишечника. Носительство стафилококка чаще наблюдается у медицинского персонала. Заражение стафилококком в больницах и роддомах происходит воздушно-капельным путем и через загрязненные руки медицинского персонала. Возможна передача инфекции с инструментами, катетерами, перевязочным материалом, предметами ухода, а также пищей. В наших исследованиях в отношении *S. aureus* прослеживается влияние на операционную рану микрофлоры медицинского персонала. Удельный вес обнаруженных в операционной ране и во внешней среде сочетаний генов патогенности (*fnbpA*, *fnbpB*) практически одинаков 81,8 % и 85 % соответственно. В отношении *S. epidermidis* прослеживается влияние на операционную рану микрофлоры внешней среды. Причем в изолятах внешней среды маркер гена *fnbpA* выявлен с удельным весом в 2,8 раза большим, чем из операционных ран. У штаммов

S. epidermidis обнаружили сочетания *fnbpB* и *luc PVS*, обеспечивающие микроорганизмы наибольшим патогенным потенциалом, как у изолированных из послеоперационных ран, так и от медперсонала (10 %) и 14,3 %, соответственно), свидетельствующие о возможном внебольничном происхождении штаммов, но не исключающие большую опасность *S. epidermidis* [4, 13]. В целом маркер лейкоцидина обнаруживался у обоих видов (*S. aureus* и *S. epidermidis*) с практически одинаковой частотой 4,2 % и 3,9 % (соответственно), что может свидетельствовать о его горизонтальном переносе среди родственных видов.

С конца 90-х годов прошлого века в стационарах России отмечается рост частоты выделения MRSA, которая в ряде больниц достигла 30-70 %, что делает неэффективным использование многих антимикробных препаратов и существенно ухудшает качество оказания медицинской помощи населению. В этих условиях совершенствование методов эпидемиологического и микробиологического мониторинга, направленных на выявление эпидемически значимых штаммов, приобретает все более актуальное значение. В целом обнаруженный нами удельный вес MRSA в хирургическом стационаре составил 20,8 %, MRSE – 25 %, что подчеркивает превалирование метициллинрезистентности у штаммов эпидермального стафилококка как резервуара генов резистентности для *S. aureus* [4].

Выводы

Гены факторов патогенности штаммов *Staphylococcus spp.*, выделенных из операционных, послеоперационных ран обнаруживаются (по данным мониторинга) в последние годы с высокой частотой, в особенности гены адгезии, играющие в инфекционном процессе ключевую роль. Настораживает обнаружение у изолятов биоматериала генетических детерминант лейкоцидина, являющихся маркерами тяжелых инфекционных процессов. В связи с этим, амплификация (*fnbpA*, *fnbpB*, *luc PVS*) может использоваться для подтверждения патогенности клинических изолятов, а также служить объективным критерием при оценке эпидемиологического значения изолятов различных видов рода *Staphylococcus*.

Анализ распространенности генетических детерминант патогенности подтверждает рост патогенности клинических изолятов *S. epidermidis* и *S. aureus* в динамике изучения раневых инфекций, позволяет использовать их в качестве маркеров *S. aureus* в микробиологическом мониторинге микробиоценоза операционной раны, позволяет судить о горизонтальном переносе *luc PVS*. Очевиден факт, что существующие различия факторов патогенности у различных штаммов, обуславливают изменения в патогенезе инфекционного процесса, вызванного стафилококками.

Гены устойчивости к метициллину у штаммов *S. epidermidis*, обнаруживались несколько чаще, особенно у изолированных из биопроб, что свидетельствует о роли эпидермального стафилококка в передаче подвижного генетического элемента *tec A* золотистому стафилококку.

Литература

1. Абаев Ю.К., Гудкова Е.И., Адарченко А.А., Ласточкина Т.М. Возбудители хирургической инфекции у детей: устойчивость к антибиотикам и ее динамика // *Детская хирургия*. – 2006. – С. 21–24.
2. Бухарин О.В., Усвятцов Б.Я., Карташова О.Л. Биология патогенных кокков. – М. : Медицина; Екатеринбург : УрО РАН, 2002. – 281 с.
3. Зайцев А.А., Карпов О.И., Сидоренко С.В. Стафилококки и ванкомицин: тенденции и противостояния // *Антибиот. и химиотер.* – 2003. – № 6. – С. 20–26.
4. Карпов И.А., Качанко Е.Ф. Стафилококковая инфекция: клинические аспекты и перспективы терапии // *Медицинские новости*. – 2005. – № 9. – С. 53–56.
5. Кунда М.С., Воронина О.Л., Дмитренко О.А., Луний В.Г. Молекулярно-генетический подход в анализе внутрибольничной стафилококковой инфекции, вызванной КОС в учреждениях родовспоможения // *Молекулярная диагностика: сборник трудов всероссийской научно-практической конференции с международным участием / колл. авт., под ред. В.И. Покровского*. – Т. 2. – М., 2010. – С. 410–413.
6. Лайман Е.Ф., Шаркова В.А., Баранова Н.А и др. Случай обнаружения *S. enteritidis* в послеоперационной ране // *Дальневосточный медицинский журнал*. – 2011. – № 4. – С. 104–109.
7. Рахманова С.Н., Шаркова В.А., Юцковский А.Д. Структура и иерархия таксономических групп микрофлоры кожи больных УБ в Приморском крае // *Тихоокеанский медицинский журнал*. – 2011. – № 3. – С. 34–36.
8. Скачкова Т.С., Черневская Е.А., Дмитриева И.Б. и др. Разработка и апробация методики выявления и количественного определения метициллинезистентным методом ПЦР с гибридизационно-флуоресцентной детекцией продуктов амплификации // *Молекулярная диагностика*. – 2010 (сборник трудов всероссийской научно-практической конференции с международным участием), Москва. – 2010. – Т. 2. – С. 424–430.
9. Тюрин Ю.А., Долбин Д.А. Роль факторов патогенности золотистых стафилококков в развитии атопического дерматита // *Журнал микробиол.* – 2008. – № 4. – С. 105–110.
10. Шаркова В.А., Лайман Е.Ф., Мазур М.Е. и др. Молекулярно-генетический мониторинг метициллин-устойчивых штаммов *Staphylococcus spp* // *КМАХ-2012*.
11. Шаркова В.А., Лайман Е.Ф., Мазур М.Е. и др. Молекулярно-генетическая характеристика патогенности штаммов *Staphylococcus spp.*, изолированных из операционных ран // *Международный журнал экспериментального образования*. – 2012. – № 7. – С. 69.
12. Bootsma M.C., Diekmann O., Bonten M.J. Controlling methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* quantifying the effects of interventions and rapid diagnostic testing. *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 2006; 103(14):5620–5625.
13. Moellering R.C, Abbott G.F., Ferraro M.J. Case 2-2011 – A 30-Year-Old Woman with Shock after Treatment of a Furuncle. *N. Engl. J. Med.* 2011;364:266–275.

Координаты для связи с авторами: Лайман Елена Федоровна – зав. микробиологической лабораторией, врач-бактериолог Лесозаводского филиала ФБУЗ «Центр гигиены эпидемиологии в Приморском крае», аспирант кафедры микробиологии и вирусологии ТГМУ, тел.: 8-(42354)-21-254, +7-914-712-40-97, e-mail: laimanss@ftail.ru; Шаркова Валентина Александровна – д-р мед. наук, профессор, зав. кафедрой микробиологии и вирусологии ТГМУ, тел. +7-964-437-70-55, e-mail: valexsh@mail.ru.

