

недостаточно оцениваемая биологическая угроза южным регионам России. Журнал инфектологии. 2011, 1 (3): 59-63.

7. European Centre for Disease Prevention and Control. Update on autochthonous dengue cases in Madeira, Portugal. Stockholm; 2013 (<http://ecdc.europa.eu/eu/publications/Publications/dengue-madeira-risk-assessment-update.pdf>, accessed 11 March 2016).

Поступила 29.03.17

Контактная информация: Малецкая Ольга Викторовна, д.м.н., проф., 355035, Ставрополь, ул. Советская, 13-15, р.т. (8652)26-03-83

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2017

*О.Е.Хохлова<sup>1,2</sup>, О.В.Перьянова<sup>1,2</sup>, О.П.Боброва<sup>3</sup>, В.В.Сергеева<sup>3</sup>, А.А.Модестов<sup>3</sup>, О.Г.Еремеева<sup>3</sup>, Н.К.Поткина<sup>2</sup>, Д.Н.Капшук<sup>1</sup>, А.В.Алабушева<sup>1</sup>, Т.Ямамото<sup>2,4</sup>*

## **МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ МЕТИЦИЛЛИН-РЕЗИСТЕНТНЫХ STAPHYLOCOCCUS AUREUS (MRSA) — ВОЗБУДИТЕЛЕЙ ГНОЙНО-ВОСПАЛИТЕЛЬНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ У ОНКОЛОГИЧЕСКИХ БОЛЬНЫХ**

<sup>1</sup>Красноярский государственный медицинский университет; <sup>2</sup>Российско-японский центр микробиологии, метагеномики и инфекционных заболеваний, Красноярск; <sup>3</sup>Красноярский краевой клинический онкологический диспансер, Россия; <sup>4</sup>Международный медицинский образовательно-исследовательский центр, Ниигата, Япония

*Цель.* Изучение молекулярно-генетических особенностей MRSA, вызывающих гнойно-воспалительные осложнения у онкологических больных. *Материалы и методы.* В работе использованы бактериологический метод, молекулярно-генетические методы — ПЦР, М-ПЦР, секвенирование. *Результаты.* Доля MRSA среди стафилококковых инфекций у онкологических больных в 2003 — 2007 гг. составила 37,6%, а в 2010 — 2015 гг. возросла до 51,3%. При исследовании молекулярно-генетических особенностей выделенных штаммов MRSA установили наличие двух основных клонов: ST239/spa3(t037)/SCCmecIIIa и ST8/spa1(t008)/SCCmecIVc. Представители клонов отличались уровнем резистентности к антибактериальным препаратам. *Заключение.* У онкологических больных в Красноярске выявлено распространение двух вариантов MRSA — ST239<sub>Kras</sub> и ST8<sub>Kras</sub>, соответствующих вариантам, распространенным в Красноярском крае.

Журн. микробиол., 2017, № 6, С. 15—20

Ключевые слова: MRSA, генотипирование, антибиотикорезистентность, онкологические больные

*O.E. Khokhlova<sup>1,2</sup>, O.V. Peryanova<sup>1,2</sup>, O.P. Bobrova<sup>3</sup>, V.V. Sergeeva<sup>3</sup>, A.A. Modestov<sup>3</sup>, O.G. Eremeeva<sup>3</sup>, N.K. Potkina<sup>2</sup>, D.N. Kapshuk<sup>1</sup>, A.V. Alabusheva<sup>1</sup>, T. Yamamoto<sup>2,4</sup>*

## **MOLECULAR AND GENETIC FEATURES OF THE METHICILLIN-RESISTANT STAPHYLOCOCCUS AUREUS (MRSA) — CAUSATIVE AGENTS OF PURULENT DISEASES AT CANCER PATIENTS**

<sup>1</sup>Krasnoyarsk State Medical University; <sup>2</sup>Russia-Japan Center of Microbiology, Metagenomics and Infectious Diseases; <sup>3</sup>Krasnoyarsk Regional Clinical Oncology Center, Russia; <sup>4</sup>International Medical Education and Research Center, Niigata, Japan

*Aim.* Study of the molecular and genetic features of the MRSA, causative agents of purulent diseases at cancer patients. *Materials and methods.* In the work were used — bacteriological method, molecular genetic methods (PCR, M-PCR, sequencing). *Results.* MRSA share among staphylococcal infections at cancer patients in 2003 — 2007 has made 37,6%, and in 2010 — 2015

has increased up to 51,3%. At a research of molecular and genetic features of the allocated MRSA strains, have established, existence of two main clones: ST239/spa3(t037)/SCCmecIIIa and ST8/spa1(t008)/SCCmecIVc. Representatives of clones differed in resistance level to antibiotics. *Conclusion.* In cancer patients in Krasnoyarsk, the distribution of two variants of MRSA — ST239<sub>Kras</sub> and ST8<sub>Kras</sub>, corresponding to the variants common in the Krasnoyarsk region, was revealed.

Zh. Mikrobiol. (Moscow), 2017, No. 6, P. 15—20

Key words: MRSA, genotyping, resistance, cancer patients

## ВВЕДЕНИЕ

Устойчивый к метициллину *Staphylococcus aureus* (MRSA) является одним из основных возбудителей, характеризующихся множественной лекарственной устойчивостью с начала 1960-х годов и вызывающий инфекции различной степени тяжести от абсцессов кожи и раневой инфекции до сепсиса, пневмонии, синдрома септического шока и других [7]. MRSA вызывают приблизительно 50% всех стафилококковых инфекций в стационарах России [2]. Традиционно MRSA являются причиной госпитальных инфекций (HA-MRSA). Другой класс MRSA, резистентность которого сформировалась во внебольничных условиях, выявлен в конце 1990-х годов (CA-MRSA) [3]. Молекулярные эпидемиологические исследования показали распространение нескольких основных госпитальных и внебольничных клонов MRSA в мире, различающихся по уровню вирулентности и антибиотикорезистентности [7].

Особой категорией пациентов являются онкологические больные, так как для них характерно снижение иммунологического ответа, наличие серьезных сопутствующих заболеваний, нарушение многих видов обмена [5]. Таким образом, риск развития инфекции, вызванной MRSA, у онкологических больных значительно повышен. Проведение рациональной терапии и профилактики невозможно без современных знаний об этиологии, молекулярно-генетических особенностях и антибиотикорезистентности возбудителей.

Целью работы явилось изучение молекулярно-генетических особенностей MRSA, вызывающих гнойно-воспалительные осложнения у онкологических больных.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследовано 4209 образцов от больных отделения анестезиологии-реанимации, торакального и хирургического отделений №1 Красноярского краевого клинического онкологического диспансера, прооперированных по поводу злокачественных новообразований желудочно-кишечного тракта (рак желудка, пищевода, поджелудочной железы, ободочной и прямой кишки) и рака легкого за период 2003 — 2015 гг. Материалом для исследования являлись бронхоальвеолярное содержимое и раневое отделяемое. Отбор материала производился объемно шприцем либо стандартным тампоном промышленного производства с использованием транспортной среды.

Посев бронхоальвеолярного содержимого, раневого отделяемого производили по методу Gould для оценки этиологической роли выделенных микроорганизмов на комплекс питательных сред — кровяной агар, желточно-солевой агар, хром-агар. Идентификацию исследуемых культур проводили на основании морфо-тинкториальных, культуральных и биохимических свойств,

используя помимо рутинных методов тест-системы Remel (США) для идентификации микроорганизмов.

Чувствительность микроорганизмов к антибиотикам определяли диско-диффузионным методом на агаре Мюллера-Хинтона с использованием дисков OXOID (Великобритания). Чувствительность стафилококков к оксациллину (Sigma-Aldrich, США) проводили методом скрининга в соответствии с международными рекомендациями CLSI.

Для внутрилабораторного контроля определения антибиотикочувствительности и метициллинорезистентности использовали референс-штаммы из коллекции ATCC (*Staphylococcus aureus* ATCC 25923). Обработку результатов проводили с использованием компьютерной программы WHONET (ВОЗ).

Для генетических исследований MRSA микроорганизмы культивировали в бульоне LB (Difco, Detroit, MI) при температуре 37°C до фазы логарифмического роста.

Для определения принадлежности к MRSA исследовали гены *nuc* и *meaA* с помощью ПЦР. Праймеры для выявления гена *nuc* необходимы для дифференциации MRSA и MSSA от коагулазонегативных стафилококков. Режим амплификации включал начальный цикл 94°C 3 мин. Следующие этапы амплификации включали денатурацию ДНК при 94°C в течение 90 сек.; отжиг при 55°C в течение 60 сек.; синтез в течение 60 сек при 72°C (30 циклов) и завершающий цикл в течение 10 минут при 72°C. Детекцию продуктов амплификации ПЦР проводили с помощью электрофореза в 2% агарозном геле с использованием бромистого этидия. В качестве контроля молекулярной массы использовали 100 bp DNA ladder (Sigma-Aldrich, Япония) и KAPA Universal DNA ladder (KAPA, США).

С помощью ПЦР исследовали 47 генов патогенности: 3 лейкоцидина; 4 гемолизина; 2 белковых цитолизина (*psma*, *hld*); 19 генов стафилококковых энтеротоксинов (SE): *tst*, *sea*, *seb*, *sec*, *sed*, *see*, *seg*, *seh*, *sei*, *sej*, *sek*, *sel*, *sem*, *sen*, *seo*, *sep*, *seq*, *seu*; 3 эксфолиатина; *set*, *edin*, *ssl*; 14 генов адгезии; ACME-*arcA* и *—opp-3C* [9].

Молекулярное типирование штаммов MRSA проводили в соответствии с международными стандартами [9]. MLST типирование основано на изучении семи «генов домашнего хозяйства» и определения аллельного профиля (аллельный номер) с использованием вебсайта (<http://www.mlst.net/>). Данные были проанализированы с помощью программного обеспечения eBURST. Spa типирование проводили путем секвенирования с последующим анализом с использованием базы данных eGenomics (<http://tools.egenomics.com/>) или Ridom SpaServer (<http://spaserver.ridom.de/>). SCCmec типирование (I — V типы) — с применением ПЦР, М-ПЦР. Субтипирование SCCmec проводили в соответствии с рекомендациями [4, 8] (<http://www.staphylococcus.net/>).

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

У больных с опухолями ЖКТ и раком легкого при посеве промывных вод бронхов в 2003 — 2007 гг. и 2010 — 2015 гг. рост был получен в 64,1% и 82,7% соответственно, а при посеве раневого отделяемого в 2003 — 2007 гг. и 2010 — 2015 гг. — в 70,8% и в 74,5% случаев соответственно. Доля ассоциаций микроорганизмов в бронхоальвеолярном лаваже в 2003 — 2007 гг. и 2010 — 2015 гг. составила 40,2% и 65,1% соответственно. Доля ассоциаций микроорганизмов в раневом отделяемом в 2003 — 2007 гг. и 2010 — 2015 гг. составила 38,3% и 63,7% соответственно.

При исследовании патологических материалов у онкологических больных в 2003 — 2007 гг. в отделении анестезиологии-реанимации и торакальном отделении в составе микрофлоры преобладали грамположительные микроорганизмы, выделенные в 34,6 и 50,9% случаев соответственно и представленные *Staphylococcus spp.*, *Streptococcus spp.* и *Enterococcus spp.* В хирургическом отделении в ранах доминировали представители семейства *Enterobacteriaceae* (45,5%), представленные в основном *Escherichia coli*.

В 2010 — 2015 гг. доминирующей микрофлорой ран в отделении анестезиологии-реанимации, торакальном и хирургическом отделениях являются грамположительные микроорганизмы, выделенные в 34,8%; 31,3% и 42,3% соответственно.

При исследовании раневого отделяемого и отделяемого дыхательных путей у онкологических больных в 2003 — 2007 гг. в отделении анестезиологии-реанимации доля MRSA составила 52,7%, а в 2010 — 2015 гг. — возросла до 61,3%. В торакальном отделении доля MRSA в 2003 — 2007 гг. составила 24,9%, в 2010 — 2015 гг. — 43,3%. В хирургическом отделении доля MRSA в 2003 — 2007 гг. составила 35,1%, а в 2010 — 2015 гг. — 49,4%.

У 4 штаммов MRSA, выделенных от разных онкологических больных в 2013 — 2015 гг., изучили молекулярно-генетические особенности (табл.). Все выделенные штаммы MRSA были PVL-негативными.

Выявлено наличие двух клонов MRSA, распространенных у онкобольных.

Три штамма MRSA (75%) относились к варианту ST239/spa3(t037)/SCCmecIIIA, имели гены *lukED*, гены, кодирующие адгезины, гемолизины и ген TSST-1, кодирующий токсин синдрома токсического шока, а также гены *sek seq*, кодирующие энтеротоксины (табл., рис.). У данных штаммов выявлена уникальная для Бразильского клона комбинация генов *tst*, *sek*, *sep*, *spa*. Токсин синдрома токсического шока (TSST-1) относится к суперантигенам, т.е. вызывает неспецифическую активацию Т-лимфоцитов, что значительно утяжеляет течение заболевания.

Характеристика MRSA, выделенных от онкологических больных в 2013 — 2015 гг.

Молекулярно-генетические характеристики	Определяемые вирулентности	Штаммы MRSA, изолированные от разных онкобольных	
		(n=1)	(n=3)
CC-		8	8
ST"		8	239
spa		1 (t008)	3 (t037)
SCCmec*		IV.3.1.1 (IVc)	III.1.1.2 (IIIa)
	Токсины:		
	Лейкоцидины	—	—
	<i>luk<sub>py</sub>SF</i>	+	+
	<i>lukE-lukD</i>	—	—
	<i>lukM</i>		
	Гемолизины	+	+
	<i>hla</i> , <i>hlg</i> , <i>hlg-v</i>	(+)	(+)
	<i>hly</i> (split)		
	Белковые цитоллизины	+	+
	<i>psm<math>\alpha</math></i> , <i>hld</i>		
	Энтеротоксины	+	—
	<i>sea</i>	—	+
	<i>tst</i>	—	—
	<i>sec</i> , <i>sep</i>	—	—
	<i>seb</i> , <i>sed</i> , <i>see</i> , <i>seh</i> , <i>set</i>	—	+
	<i>SapI5</i> ( <i>sek</i> , <i>seq</i> )	—	—
	<i>sej</i> , <i>seu</i>	—	—
	<i>egc</i> *		
	Эксфолиатины	—	—
	<i>eta</i> , <i>etb</i> , <i>etd</i>		
	Адгезины:	+	+
	<i>c12ag</i> '	—	+
	<i>сна</i>	—	—

Примечание. n=1 и n=3 — число штаммов, выделенных от разных онкобольных, CC- — клональный комплекс, ST" — сиквенс тип, SCCmec\* — тип стафилококковой хромосомной кассеты, *egc*\* — кластер генов *seg*, *sei*, *sem*, *sen*, *seo*, кодирующих синтез энтеротоксинов, *c12ag*' — кластер генов *icaA*, *icaD*, *eno*, *fnbA*, *fnbB*, *ebpS*, *clfA*, *clfB*, *fib*, *sdrC*, *sdrD*, *sdrE*, кодирующих синтез адгезинов.

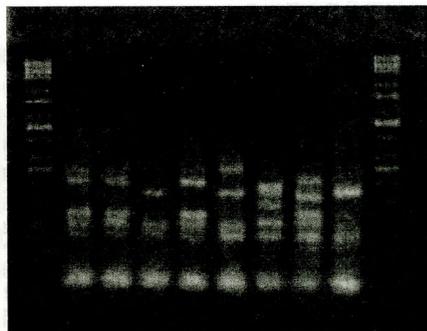
Бразильский клон, относящийся к генотипу ST239 MRSA, широко распространен во всем мире, но обычно не имеет *tst*-гена. В отличие от других ST239 вариантов штаммы, изолированные в Красноярске, продуцировали токсин синдрома токсического шока.

Один штамм MRSA (25%) относился к варианту ST8/*spa1*(t008)/SCCmecIVc, у таких штаммов установлено наличие генов *lukED*, генов, кодирующих адгезины, гемолизины, и они были положительными для гена *sea*, кодирующего энтеротоксин (табл., рис.).

По результатам исследования антибиотикорезистентности установили, что представители варианта SCCmecIII отличались множественной лекарственной устойчивостью, в т.ч. в 100% случаев резистентны к аминогликозидам, макролидам, линкозамидам, фторхинолонам, сульфаметоксазолу, рифампицину, тетрациклину и в 66,7% случаев к хлорамфениколу. В 100% случаев чувствительны к ванкомицину, линезолиду. Представители клона MRSA SCCmecIVc в 100% случаев резистентны к аминогликозидам, тетрациклинам, макролидам, линкозамидам, хлорамфениколу. В 100% случаев чувствительны к фторхинолонам, сульфаметаксазолу, рифампицину, ванкомицину, линезолиду.

Доминирующими клонами MRSA в России являются ST239/*spa3*(t037)/SCCmecIII, ST239/*spa351*(t030)/SCCmecIII и ST8/*spa1*(t008)/SCCmecIV [1, 6]. В европейской части России (Москва, Санкт-Петербург), в Кургане, на Дальнем Востоке России (Владивосток) более распространен вариант ST239/*spa351*(t030)/SCCmecIII.1.1.4 [11]. В Красноярске распространенным вариантом линии ST239 является уникальный вариант ST239<sub>Kras</sub>, характеризующийся наличием гена *tst*, кодирующего токсин синдрома токсического шока [6]. Второй клональной линией MRSA, распространенной в России и Красноярском крае, является линия MRSA ST8 [10]. В Красноярске выявлено распространение уникального клона MRSA ST8<sub>Kras</sub>, у которого *sra* тип (*spa1*[t008]) соответствовал *sra* типу ST8 варианта, выявленного ранее в других регионах России, но отличался от штаммов, выделенных во Владивостоке (ST8*spa826*[t:unknown]). У вариантов ST8<sub>Kras</sub>, выделенных в Красноярском крае, и ST8, выделенных во Владивостоке, выявлены SCCmecIV.3.1.1(IVc) и имеется ген *sea* [11].

Таким образом, установлено увеличение доли MRSA среди *S. aureus*, вызывающих инфекционные осложнения у онкологических больных с 32,7% в 2003 — 2007 гг. до 52,5% в 2010 — 2015 гг. У онкологических больных в Красноярске выявлено распространение двух вариантов MRSA — ST239<sub>Kras</sub> и ST8<sub>Kras</sub>, различающихся чувствительностью к антибиотикам, что важно при подборе антибактериальной терапии. Варианты MRSA, выделенные от онкологических больных, соответствовали вариантам, распространенным в Красноярском крае.



Результаты типирования SCCmec у штаммов MRSA, выделенных от онкологических больных.

Примечание: М — маркер ДНК (100, 150, 200, 300, 400, 500, 600, 800, 1000, 1200, 1600, 2000, 3000, 4000, 5000 п.н.); 1—4 — штаммы MRSA, выделенные от 4 разных онкобольных; I—IV — контрольные штаммы, в т.ч. I — тип SCCmecI (MRSA NCTC10442), II — тип SCCmecII (MRSA N315), III — тип SCCmecIII (MRSA 85/2082), IV — тип SCCmecIV (MRSA JCSC4788).

## ЛИТЕРАТУРА

1. Романов А.В., Чернов Е.А., Эйдельштейн М.В. Молекулярная эпидемиология внутрибольничных золотистых стафилококков в стационарах различных регионов России. Молекулярная медицина 2013, 4: 55-64.
2. Сухорукова М.В., Склеенова Е.Ю., Иванчик Н.В., Тимохова А.В., Эйдельштейн М.В., Дехнич А.В., Козлов Р.С. Антибиотикорезистентность нозокомиальных штаммов *Staphylococcus aureus* в стационарах России: результаты многоцентрового эпидемиологического исследования МАРАФОН в 2011–2012 гг. Клин. микробиол. антимикроб. химиотер. 2014, 16 (4): 280-286.
3. DeLeo F.R., Otto M., Kreiswirth B.N. et al. Community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Lancet*. 2010, 375: 1557-1568.
4. International working group on the classification of staphylococcal cassette chromosome elements (IWG-SCC). Classification of staphylococcal cassette chromosome mec (SCCmec): guidelines for reporting novel SCCmec elements. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2009, 53: 4961-4967.
5. Kenneth V. I. et al. Tarrand current microbiology of surgical site infections in patients with cancer: a retrospective review. *Infect. Dis. Ther.* 2014, 3: 245–256
6. Khokhlova O.E., Hung W.-C., Wan T.-W. et al. Healthcare- and community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) and fatal pneumonia with pediatric deaths in Krasnoyarsk, Siberian Russia: Unique MRSA's multiple virulence factors, genome, and stepwise evolution. *PLoS One*. 2015, 1: 1-30.
7. Klevens R.M., Morrison M.A., Nadle J. et al. Invasive methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections in the United States. *JAMA*. 2007, 298: 1763-1771.
8. Kondo Y., Ito T., Ma X.X. Combination of multiplex PCRs for staphylococcal cassette chromosome mec type assignment: rapid identification system for mec, ccr, and major differences in junkyard regions. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2007, 51: 264-274.
9. Takano T., Hung W.C., Shibuya M. et al. A new local variant (ST764) of the globally disseminated ST5 lineage of hospital-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) carrying the virulence determinants of community-associated MRSA. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2013, 57: 1589-1595.
10. Wan T.-W., Khokhlova O.E., Iwao Y. et al. Complete circular genome sequence of successful ST8/SCCmecIV community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (OC8) in Russia: One-megabase genomic inversion, IS256's spread, and evolution of Russia ST8-IV. *PLoS One*. 2016, 11 (10): 1-25.
11. Yamamoto T., Takano T., Higuchi W. et al. Comparative genomics and drug resistance of a geographic variant of ST239 methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* emerged in Russia. *PLoS One*. 2012, 7: e29187.

*Поступила 20.03.17*

Контактная информация: Хохлова Ольга Евгеньевна, к.б.н.,  
660022, ул. Партизана Железняка, 1, р.т. (391)220-13-61

---