

УДК: 579.861.2:577.2

## ГЕНЕТИЧЕСКИ ОБУСЛОВЛЕННАЯ ПАТОГЕННОСТЬ И АНТИБИОТИКОРЕЗИСТЕНТНОСТЬ ШТАММОВ *STAPHYLOCOCCUS* SPP.

В.А. Шаркова<sup>1</sup>, Е.Ф. Лайман<sup>2</sup>, М.Е. Мазур<sup>2</sup><sup>1</sup> Тихоокеанский государственный медицинский университет (690950, г. Владивосток, пр-т Острякова, 2),<sup>2</sup> Центр гигиены и эпидемиологии в Приморском крае (692000, г. Владивосток, ул. Уткинская, 36)

**Ключевые слова:** *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus aureus*, факторы патогенности, генетические детерминанты.

### GENETICALLY CAUSED PATHOGENICITY AND ANTIBIOTIC RESISTANCE OF THE *STAPHYLOCOCCUS* SPP. STRAINS

V.A. Sharkova<sup>1</sup>, E.F. Layman<sup>2</sup>, M.E. Mazur<sup>2</sup><sup>1</sup> Pacific State Medical University (2 Ostryakova Ave. Vladivostok 690950 Russian Federation), <sup>2</sup> Center of Hygiene and Epidemiology in Primorsky Krai (36 Utkinskaya St. Vladivostok 692000 Russian Federation)

**Background.** The urgency of a problem of the infections caused by Gram-positive microorganisms all over the world constantly increases. *Staphylococcus* cause the considerable part of the outpatient and nosocomial bacteremia, pneumonia, infections of skin, soft tissues, bones and joints.

**Methods.** 48 strains of *Staphylococcus aureus* and 51 strains of *Staphylococcus epidermidis* isolated from operation and postoperative wounds, the upper respiratory ways of medical staff and an environment of surgical units were studied. The method of polymerase chain reaction in a mode of "real time" was used to define the virulence markers with the sets of specific primers to three genes of pathogenicity (*fnpA*, *fnpB* and *Luc PVS*) and to the meticillin-resistant gene (*mecA*).

**Results.** In dynamics the increase of frequency of detection of pathogenicity genes and geneovariant combinations is noted. At *S. aureus* spp. pathogenicity has been genetically determined in 81.8 %, at *S. epidermidis* spp. – in 4 % of cases (isolated from operation wounds). *S. epidermidis* spp. isolated from surgical medical staff had pathogenicity genes in 14.3 %, and *S. aureus* spp. – in 85 % of cases. In postoperative wounds genetic determinants were found with less frequency. In microflora of the environment of surgical hospitals pathogenicity genes are allocated only in 11.1 % of *S. epidermidis* spp. The meticillin-resistance gene is found out at both kinds of *Staphylococcus* isolated from various biotops.

**Conclusion.** The analysis of prevalence of genetic determinants confirms the growth of pathogenicity of the clinical isolates of *S. epidermidis* and *S. aureus* in the course of the wound infections and also confirms the fact of horizontal transfer of gene *Luc PVS*. Stability genes to meticillin at *S. epidermidis* spp. were found more often, especially at strains isolated of biotests that confirms the role of *S. epidermidis* in transfer of the mobile genetic element *mecA* of *S. aureus*.

**Keywords:** *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus aureus*, pathogenicity factors, genetic determinants.

Pacific Medical Journal, 2014, No. 3, p. 46–49.

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. Бактериемии у госпитализированных пациентов, развивающиеся

при проникновении *Staphylococcus aureus* через катетеры из ран или очагов кожных поражений, – главный фактор патогенеза широкого спектра поражений [1, 2, 5]. Типичными для *Staphylococcus epidermidis* считаются поражения, обусловленные колонизацией им различных протезов, катетеров, дренажей или диссеминацией микроорганизма после хирургических вмешательств [4].

Патогенность стафилококков – результат 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 действие этих факторов является экологическим показателем, и для его проявления на макроуровне изолят с большой долей вероятности будет экспрессировать все факторы патогенности [8].

Клеточная стенка стафилококков на 50 % по весу состоит из пептидогликана. Ее компоненты не только принимают участие в адгезии и распространении микроорганизма по тканям, но и являются ответственными за такие клинические проявления, как анафилаксия, феномен Артюса, угнетение активности фагоцитов и др. Обычно адгезивный потенциал *S. aureus* связывают со специфическими адгезинами, которые у данного вида сгруппированы в так называемое семейство адгезивных матричных молекул. У другого вида – *S. epidermidis* – этот потенциал обусловлен полисахаридными адгезинами, обеспечивающими прикрепление к эукариотическим клеткам [8, 10].

Особое значение имеет распространение стафилококков, резистентных к метициллину (или к оксациллину) [9, 11]. Эти особенности возбудителя существенно ограничивают выбор антибактериальных препаратов [4]. Штаммы стафилококков со сниженной чувствительностью к оксациллину выявляются со всевозрастающей частотой. Большинство исследований указывает на наличие резистентности у 25 % *S. aureus* и более чем у 50 % коагулазонегативных стафилококков. Резистентность стафилококков связана с наличием гена *mecA*, кодирующего пенициллинсвязывающий белок 2a, который обладает низкой аффинностью к β-лактамам [3]. Наличие этого белка указывает на устойчивость ко всем β-лактамам антибиотикам (пенициллины, цефалоспорины, карбапенемы и монобактамы) и непредсказуемую клиническую эффективность

этого класса препаратов. Стафилококки, несущие модифицированные пенициллинсвязывающие белки, обозначаются как метициллин-резистентные *S. aureus* (MRSA) и метициллин-резистентные *S. epidermidis* (MRSE) [4]. Из многих штаммов *S. aureus*, устойчивых к метициллину, самый опасный – MW2 (возник из чувствительного к метициллину MRSA) – провоцирует многие заболевания. Составляющие ДНК MW2, в свою очередь, приводят к появлению генов, кодирующих три эндотоксина, включая лейкоцидин Pantон–Valentine, который представляет собой двухкомпонентный лейкоцитный токсин, имеющий отношение как к инфекциям кожи, так и к некротической пневмонии. Этот лейкоцидин вырабатывается из генетического материала бактериофага, который заражает *S. aureus*, делая его более вирулентным [12].

Целью нашей работы стало определение динамики детерминации генов патогенности штаммов *Staphylococcus* spp. (*S. epidermidis* и *S. aureus*), выделенных из различных биотопов.

**Материал и методы.** Исследовано 48 штаммов *S. aureus* и 51 штамм *S. epidermidis*, изолированных из операционных и послеоперационных ран, верхних дыхательных путей медперсонала и внешней среды отделений хирургического профиля. Маркеры вирулентности определяли методом полимеразной цепной реакции в режиме «реального времени» (ООО «Синтол») с наборами специфических праймеров к трем генам патогенности (*fnbpA*, *fnbpB* и *Luc PVS*) и гену метициллинрезистентности (*mecA*). Гены *fnbpA* и *fnbpB* кодируют поверхностные фибронектин-связывающие белки, которые играют важную роль в колонизации стафилококком ткани организма и образовании биопленок. Ген *Luc PVS* «ответствен» за выработку лейкоцидина Pantон–Valentine, а ген *mecA* кодирует дополнительный пенициллинсвязывающий белок, обеспечивающий устойчивость к  $\beta$ -лактамам антибиотикам [3, 4, 7].

Использовали прибор Rotor-Gene 6000 с системной детекцией флуоресцентного сигнала в режиме «реального времени». Амплификацию вели согласно схеме, воспроизведенной в инструкции к набору реагентов. Результат полимеразной цепной реакции учитывали при получении правильных ответов для положительного и отрицательного контролей амплификации и отрицательного контроля экстракции ДНК.

**Результаты исследования.** Гены патогенности обнаружены у 81,8 % штаммов *S. aureus* и в 4 % штаммов *S. epidermidis*, изолированных из операционных ран. *S. aureus*, выделенный из «условно-чистых» и «грязных» ран, демонстрировал гены *fnbpA* и *fnbpB* с одинаковой частотой (по 81,8 %), а ген *Luc PVS* – в 5,2 % случаев. Последний ген является маркером повышенной патогенности штаммов и, соответственно, – развития инфекционного процесса в ране. Из 25 штаммов *S. epidermidis*, выделенных из «условно-чистых» ран, ген патогенности *fnbpA* обнаружен у одного. Возможно, данное представительство связано с мутацией соответствующего участка в силу воздей-

ствия 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 (рис. 1).

В материале из послеоперационных ран генетические детерминанты обнаруживались с меньшей частотой: по 50 % штаммов у обоих исследованных видов. Все маркеры патогенности, выделенные из послеоперационных ран, сочетались по два (*fnbpA* и *fnbpB* или *fnbpB* и *Luc PVS*) или по три (*fnbpA*, *fnbpB*, *Luc PVS*) с преобладанием сочетания *fnbpA* и *fnbpB* у *S. epidermidis* в 80 % случаев. Прочие 20 % штаммов эпидермального стафилококка имели сочетания детерминант: *fnbpA*, *fnbpB* и *Luc PVS*. Единственный штамм золотистого стафилококка, изолированный из послеоперационной раны, нес сочетания маркеров *fnbpB* и *Luc PVS*.

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

У штаммов *S. aureus* из внешней среды стационаров гены патогенности не найдены, а у штаммов *S. epidermidis* – определены в 11,1 % случаев. Один из 24 штаммов *S. epidermidis*, выделенных из воздуха, содержал ген *fnbpA*, который не был зарегистрирован у микроорганизмов, изолированных со слизистых оболочек медперсонала.

При мониторинге патогенности стафилококков (в динамике четырех лет исследования), оказалось, что все вышеуказанные детерминанты обнаруживались с 2010 г. (штаммы *S. epidermidis* и *S. aureus*, выделенные с 2008 по 2010 г. из операционных и послеоперационных ран, окружающей среды отделений хирургического профиля и от медицинского персонала, изучались на присутствие *mecA*-ДНК методом полимеразной цепной реакции).

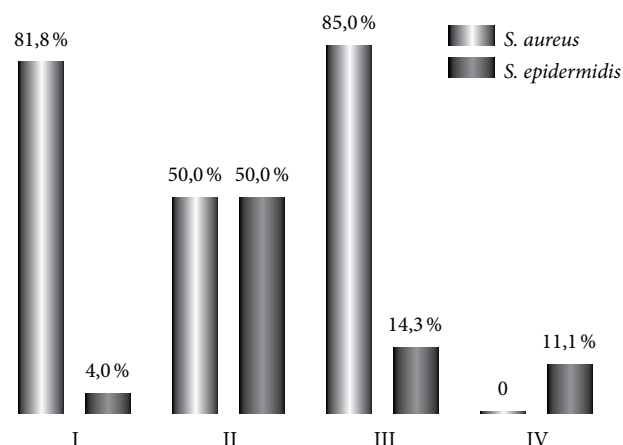


Рис. 1. Частота обнаружения генов патогенности у штаммов *S. aureus* и *S. epidermidis*, изолированных из различных биотопов: I – операционные раны, II – послеоперационные раны, III – медицинский персонал, IV – внешняя среда.

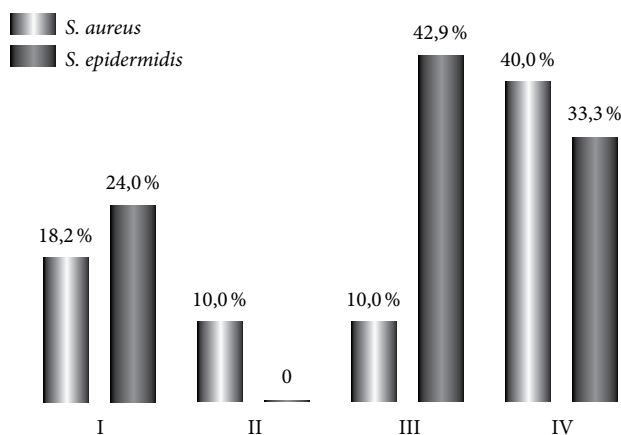


Рис. 2. Частота обнаружения гена *mecA* у штаммов *S. aureus* и *S. epidermidis*, изолированных из различных биотопов:

I – операционные раны, II – послеоперационные раны, III – медицинский персонал, IV – внешняя среда.

Ген метициллинрезистентности выявлен у 18,2 % штаммов *S. aureus* и 24 % штаммов *S. epidermidis*, изолированных из операционных ран. В послеоперационных ранах генетические детерминанты антибиотикорезистентности обнаружены у 10 % штаммов – только *S. epidermidis* (рис. 2).

Штаммы *S. aureus*, выделенные из микрофлоры медицинского персонала содержали ген *mecA* в 10 % случаев, а штаммы *S. epidermidis* из того же материала – в 4 раза чаще (42,9 % случаев). Частота регистрации генов метициллинрезистентности в микрофлоре внешней среды стационаров хирургического профиля составила по 33,3 % для штаммов *S. epidermidis* и 40 % – для штаммов *S. aureus*.

**Обсуждение полученных данных.** Стафилококки – представители нормальной микрофлоры кожи человека, дыхательных путей и пищеварительного тракта, их также постоянно находят в воздухе и окружающей среде [6]. Носительство патогенного стафилококка чаще наблюдается у медицинского персонала. Заражение стафилококком в больницах и роддомах происходит воздушно-капельным путем и через загрязненные руки медработников. Возможна передача инфекции с инструментами, катетерами, перевязочным материалом, предметами ухода, а также с пищей. Распространение стафилококков обуславливает гнойно-септические осложнения в хирургических стационарах, нередко сводя на нет результат прекрасно выполненной операции [9].

В нашем исследовании в отношении *S. aureus* прослеживалось влияние на операционную рану микрофлоры медицинского персонала. Частота обнаружения в операционной ране и во внешней среде возбудителей с сочетанием генов *fnbpA* и *fnbpB* практически одинакова – 81,8 % и 85 %, соответственно. В отношении *S. epidermidis* прослеживается влияние на операционную рану микрофлоры внешней среды. Причем в изолятах из внешней среды маркер гена *fnbpA* выявлен в 2,8 раза чаще, чем в изолятах из операционных ран. У штаммов *S. epidermidis*, изолированных как из

послеоперационных ран, так и от медперсонала, в 10 и 14,3 % случаев, соответственно, обнаружались сочетания генов *fnbpB* и *Luc PVS*, обеспечивающие наибольший патогенный потенциал и свидетельствующие о возможном внебольничном происхождении штаммов, но не исключающие большую опасность *S. epidermidis* [4]. В целом маркер лейкоцидина регистрировался у *S. aureus* и *S. epidermidis* с примерно 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, все более актуальна. В целом обнаруженный нами удельный вес MRSA в хирургическом стационаре составил 20,8 %, а 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 и послеоперационных ран, обнаруживаются в последние годы с высокой частотой, что в особенности касается генов адгезии, играющих 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* и *Luc PVS* может использоваться для подтверждения патогенности клинических изолятов, а также служить объективным критерием эпидемиологического значения изолятов различных видов рода *Staphylococcus*.

Анализ распространенности генетических детерминант подтверждает рост патогенности клинических изолятов *S. epidermidis* и *S. aureus* в динамике изучения раневых инфекций и позволяет использовать их в качестве маркеров *S. aureus* в мониторинге микробиоценоза операционной раны, а также судить о горизонтальном переносе гена *Luc PVS*. Очевидно, 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 чаще, особенно у штаммов, изолированных из биопроб, что свидетельствует о роли эпидермального стафилококка в передаче подвижного генетического элемента *mecA* золотистому стафилококку.

## Литература

- Абаев Ю.К., Гудкова Е.И., Адарченко А.А., Ласточкина Т.М. Возбудители хирургической инфекции у детей: устойчивость к антисептикам и ее динамика // Детская хирургия. 2006. № 3. С. 30–33.
- Бухарин О.В., Усвятцов Б.Я., Карташова О.Л. Биология патогенных кокков. М.: Медицина, 2002. 287 с.
- Зайцев А.А., Карпов О.И., Сидоренко С.В. Стафилококки и ванкомицин: тенденции и противостояния // Антибиотики и химиотерапия. 2003. Т. 48, № 6. С. 20–26.
- Карпов И.А., Качанко Е.Ф. Стафилококковая инфекция: клинические аспекты и перспективы терапии // Медицинские новости. 2005. № 9. С. 53–56.
- Кунда М.С., Воронина О.Л., Дмитренко О.А., Лукин В.Г. Молекулярно-генетический подход в анализе внутрибольничной стафилококковой инфекции, вызванной КОС в учреждениях родовспоможения // Молекулярная диагностика: сб. трудов всерос. науч.-практ. конф. М., 2010. Т. II. С. 410–413.
- Рахманова С.Н., Шаркова В.А., Юцковский А.Д. Структура и иерархия таксономических групп микрофлоры кожи больных угревой болезнью в Приморском крае // Тихоокеанский медицинский журнал. 2011. № 3. С. 34–36.
- Скачкова Т.С., Черневская Е.А., Дмитриева И.Б. [и др.] Разработка и апробация методики выявления и количественного определения метициллинрезистентности методом ПЦР с гибридизационно-флуоресцентной детекцией продуктов амплификации // Молекулярная диагностика: сб. трудов Всероссийской научно-практической конференции с международным участием. М., 2010. Т. II. С. 424–430.
- Тюрин Ю.А., Долбин Д.А. Роль факторов патогенности золотистых стафилококков в развитии атопического дерматита // Журнал микробиол. 2008. № 4. С. 105–110.
- Шаркова В.А., Лайман Е.Ф., Мазур М.Е., Просяникова М.Н. Молекулярно-генетический мониторинг метициллинустойчивых штаммов *Staphylococcus* spp. // Клиническая микробиология и антимикробная терапия. 2012. Т. 14, № 2. Прил. 1: тезисы XIV Международного конгресса МАКМАХ по антимикробной терапии. С. 57.
- Шаркова В.А., Лайман Е.Ф., Мазур М.Е. [и др.] Молекулярно-генетическая характеристика патогенности штаммов *Staphylococcus* spp., изолированных из операционных ран // Междунар. журн. эксперимент. образования. 2012. № 7. С. 69.
- 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. Vol. 103, No. 14. P. 5620–5625.
- Moellering R.C. Jr., Abbott G.F., Ferraro M.J. A 30-year-old woman with shock after treatment of a furuncle // N. Engl. J. Med. 2011. Vol. 364. P. 266–275.

Поступила в редакцию 14.06.2012.

#### Генетически обусловленная патогенность и антибиотикорезистентность штаммов *Staphylococcus* spp.

В.А. Шаркова<sup>1</sup>, Е.Ф. Лайман<sup>2</sup>, М.Е. Мазур<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Тихоокеанский государственный медицинский университет (690950, г. Владивосток, пр-т Острякова, 2), <sup>2</sup> Центр гигиены и эпидемиологии в Приморском крае (692000, г. Владивосток, ул. Уткинская, 36)

**Резюме.** Выполнен мониторинг штаммов *Staphylococcus epidermidis* и *Staphylococcus aureus*, изолированных из различных биотопов, на присутствие генетических детерминант *fnbA*, *fnbB*, *Luc PVS* и *tesA*. В динамике отмечен рост частоты обнаружения генов патогенности и сочетаний геновариантов. У штаммов *S. aureus* патогенность была генетически детерминирована в 81,8%, у штаммов *S. epidermidis* – в 4% случаев (изолированы из операционных ран). Штаммы *S. epidermidis*, выделенные от медперсонала отделений хирургического профиля, обнаруживали гены патогенности в 14,3%, а штаммы *S. aureus* – в 85% случаев. В послеоперационных ранах генетические детерминанты обнаруживались с меньшей частотой. В микрофлоре внешней среды хирургических стационаров гены патогенности выделены лишь 11,1% штаммов *S. epidermidis*. Ген метициллинрезистентности обнаружен у штаммов стафилококков обоих видов, изолированных из различных биотопов.

**Ключевые слова:** *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus aureus*, факторы патогенности, генетические детерминанты.

УДК 611.716.4

## РАЗМЕРНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ ФРОНТАЛЬНОГО ОТДЕЛА НИЖНЕЙ ЧЕЛЮСТИ

Е.Ю. Ефимова<sup>1</sup>, А.И. Краюшкин<sup>1</sup>, Ю.В. Ефимов<sup>1</sup>, Н.В. Шабанова<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Волгоградский государственный медицинский университет (400131, г. Волгоград, пл. Павших Борцов, 1),

<sup>2</sup> Медицинский институт Пензенского государственного университета (440026, г. Пенза, ул. Красная, 40)

**Ключевые слова:** зубочелюстной сегмент, резцы, морфометрия.

#### DIMENSIONAL CHARACTERISTICS OF THE FRONTAL MANDIBULAR PART

E.Yu. Yefimova<sup>1</sup>, A.I. Krayushkin<sup>1</sup>, Yu.V. Efimov<sup>1</sup>, N.V. Shabanova<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Volgograd State Medical University (1 Pavshih Bortsov Sq. Volgograd 400131 Russian Federation), <sup>2</sup> Medical Institute of the Penza State University (40 Krasnaya St. Penza 440026 Russian Federation)

**Background.** A research objective: the analysis of the morphometric laws of the bone tissue of the dental-mandibular segments of incisors.

**Methods.** 174 anatomic mandibular preparations of people of mature age of both sexes with physiological occlusion were studied. Preparations were sawed on 14 segments on intertooth septs in vestibular-lingual direction. Each segment on identical distance from the object was photographed in medial and distal norms. Increase necessary for the subsequent mathematical calculations was

defined by the comparison of the sizes of the marked sites on the sample and in a photo.

**Results.** The height of dental-mandibular segments from the alveolar crest to the basis was  $36.27 \pm 0.64$  mm. The height of the alveolar part of every dental-mandibular segment corresponded to the length of the same named tooth root and varied in a wide range. The areas of the dental-mandibular segments, and also the area of spongy and compact substances of medial and lateral incisors did not differ reliably.

**Conclusions.** The areas of dental-mandibular segments as well as the areas of separate structures of the bone tissue have no reliable difference. The thickness of compact substance reliably increases from the top part of dental-mandibular segments in a direction to their basis. The greatest thickness of spongy substance is observed in the bottom part of the vestibular part of dental-mandibular segments that is connected with the presence of mental ledge.

**Keywords:** dental-mandibular segment, incisors, morphometry.

Ефимова Евгения Юрьевна – канд. мед. наук, доцент кафедры анатомии человека ВолГМУ; e-mail: evgenia\_ey@mail.ru

Pacific Medical Journal, 2014, No7 3, p. 49–51.