

- Bengoufa D., Feuillard J., Lavergne A., Gordon J.I., Berche P., Guillemin L., Lortholary O. Immunoproliferative small intestinal disease associated with *Campylobacter jejuni*. *N. Engl. J. Med.* 2004; 350: 239—48.
19. Isaacson P.G. Gastrointestinal lymphoma. *Hum. Patol.* 1994; 25: 1020—9.
20. Kassan S.S., Thomas T.L., Moutsopoulos H.M., Hoover R., Kimberly R.P., Budman D.R., Costa J., Decker J.L., Chused T.M. Increased risk of lymphoma in sicca syndrome. *Ann. Intern. Med.* 1978; 89: 888—92.
21. Aozasa K. Hashimoto's thyroiditis as a risk factor of thyroid lymphoma. *Acta Pathol. Jpn.* 1990; 40: 459—68.
22. Radaszkiewicz T., Dragosics B., Bauer P. Gastrointestinal malignant lymphomas of the mucosa-associated lymphoid tissue: factors relevant to prognosis. *Gastroenterology* 1992; 102: 1628—38.
23. Thieblemont C., Bastion Y., Berger F., Rieux C., Salles G., Dumontet C., Felman P., Coiffier B. Mucosa-associated lymphoid tissue gastrointestinal and nongastrointestinal lymphoma behavior: analysis 108 patients. *Blood.* 1997; 95: 802—6.
24. Raderer M., Streubel B., Woehrer S., Poespoeck A., Jaeger U., Formanek M., Chott A. High relapse rate in patients with MALT lymphoma warrants lifelong follow-up. *Clin. Cancer Res.* 2005; 11: 3349—52.
25. Woehrer S., Steubel B., Bartsch R., Chott A., Raderer M. Monoclonal immunoglobulin production is a frequent event in patients with mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma. *Clin. Cancer Res.* 2004; 10: 7179—81.
26. Price S.K., Immunoproliferative small intestinal disease: a study of 13 cases with alpha heavy-chain disease. *Histopathology.* 1990; 17: 7—17.
27. Berger F., Felman P., Thieblemont C., Pradier T., Baseggio L., Bryon P.A., Salles G., Callet-Bauchu E., Coiffier B. Non-MALT marginal zone B-cell lymphomas: a description of clinical presentation and outcome in 124 patients. *Blood.* 2000; 95: 1950—6.
28. Arcaini L., Paulli M., Burcheri S., Rossi A., Spina M., Passamonti F., Lucioni M., Motta T., Canzonieri V., Montanari M., Bonoldi E., Gallamini A., Uziel L., Crugnola M., Ramponi A., Montanari F., Pascutto C., Morra E., Lazzarino M. Primary nodal marginal zone B-cell lymphoma: clinical features and prognostic assessment of rare disease. *Br. J. Haematol.* 2007; 136: 301—4.
29. Tadesse-Heath L., Pittaluga S., Sorbara L., Bussey M., Raffeld M., Jaffe E.S. Marginal zone B-cell lymphoma in children and young adults. *Am. J. Surg. Pathol.* 2003; 27: 522—531.

Поступила 30.03.17

Принята к печати 15.04.17

МИКРОБИОЛОГИЯ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2017

УДК 579.861.2.083.18

Балбуцкая А.А.¹, Дмитренко О.А.², Скворцов В.Н.¹

СОВРЕМЕННЫЕ ОСОБЕННОСТИ ВИДОВОЙ ИДЕНТИФИКАЦИИ КОАГУЛАЗОПОЛОЖИТЕЛЬНЫХ БАКТЕРИЙ РОДА *STAPHYLOCOCCUS*

¹ Белгородский филиал ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт экспериментальной ветеринарии им. Я.Р. Коваленко», 308002, Белгород, Российская Федерация;

² ФГБУ «Научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. почетного акад. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава РФ, 123098, Москва, Российская Федерация

Развитие молекулярных методов исследований в конце XX века позволило расширить номенклатуру видов, образующих род *Staphylococcus*, который в настоящее время насчитывает 51 вид и 27 подвидов. Патогенные виды рода обладают способностью коагулировать плазму крови млекопитающих, образуя группу коагулазопозитивных стафилококков (КПС), включающую 7 видов: *S. aureus*, *S. delphini*, *S. intermedius*, *S. pseudintermedius*, *S. lutrae*, *S. schleiferi* ssp. *coagulans*, *S. hyicus*. В клинической практике наиболее вирулентным среди стафилококков считается *S. aureus*. Накопленные данные свидетельствуют о возрастающей этиологической значимости в инфекционной патологии человека и животных других представителей группы КПС. Пристального внимания заслуживают *Staphylococcus intermedius* группы (SIG), объединяющей три близкородственных вида: *S. pseudintermedius*, *S. intermedius*, *S. delphini*, среди которых наиболее широкое распространение получили метициллинустойчивые клоны *S. pseudintermedius*, способные вызывать различные гнойно-воспалительные заболевания у человека. Лабораторные методы, основанные на фенотипических тестах, не позволяют дифференцировать КПС из-за значительного сходства фенотипических свойств у некоторых представителей этой группы. Проведён сравнительный анализ эффективности различных методов видовой идентификации КПС: биохимического, молекулярно-генетических (мультипраймерная ПЦР (М-ПЦР) для идентификации различий структуры гена термонуклеазы, анализ полиморфизма длин рестрикционных фрагментов (ПДРФ) гена каталазы и их секвенирование), матрично-активированная лазерная десорбционная/ионизационная времяпролетная масс-спектрометрия (MALDI-ToF MS) с различными способами пробоподготовки. Исследовано 117 изолятов представителей SIG, выделенных от больных и здоровых особей мелких домашних животных, клинические изоляты от пациентов стационаров. М-ПЦР позволила идентифицировать 97% изолятов, ПДРФ-анализ — 100% изолятов, что подтверждает эффективность молекулярно-генетических методов исследования. MALDI-ToF MS требует пополнения базы данных масс-спектрометра и использование способа предварительной белковой экстракции проб для повышения эффективности видовой идентификации КПС.

Ключевые слова: коагулазоположительные стафилококки; *Staphylococcus intermedius* group (SIG); видовой идентификация, молекулярно-генетические методы; *nuc* ген; *kata* ген; времяпролетная MALDI масс-спектрометрия.

Для цитирования: Балбуцкая А.А., Дмитренко О.А., Скворцов В.Н. Современные особенности видовой идентификации коагулазоположительных бактерий рода *Staphylococcus*. *Клиническая лабораторная диагностика.* 2017; 62 (8): 497-502. DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2017-62-8-497-502>

Для корреспонденции: Балбуцкая Анна Александровна, канд. биол. наук, вед. науч. сотр. Белгородского филиала ФГБНУ «Всероссийский НИИ экспериментальной ветеринарии им. Я.Р. Коваленко», e-mail: negra-2007@mail.ru

Balbutskaya A.A.¹, Dmitrenko O.A.², Skvortsov V.N.¹

THE MODERN CHARACTERISTICS OF SPECIES IDENTIFICATION OF COAGULASE-POSITIVE BACTERIA OF GENUS

¹The Belgorodskii branch of the Ya.R. Kovalenko All-Russian research institute of experimental veterinary medicine, 308002 Belgorod, Russia

²The academician N.F. Gamaleia research institute of epidemiology and microbiology of Minzdrav of Russia, 123098 Moscow, Russia

The development of molecular techniques of research in the end of XX century permitted to broaden nomenclature of species forming genus *Staphylococcus* that nowadays numbers 51 species and 27 sub-species. The pathogenic species of genus have a capacity to coagulate blood plasma of mammals forming group of coagulase-positive staphylococci including 7 species: *S. aureus*, *S. delphini*, *S. intermedius*, *S. pseudintermedius*, *S. lutrae*, *S. schleiferi* ssp. *coagulans*, *S. hyicus*. In clinical practice, *S. aureus* is considered as the most virulent among staphylococci. The cumulated data testifies increasing etiologic significance of other representatives of group of coagulase-positive staphylococci in human and animal infection pathology. The keen attention is needed to be paid to *Staphylococcus intermedius* of group (SIG), uniting three close kindred species: *S. pseudintermedius*, *S. intermedius*, *S. delphini*. Among them the most broadly prevailed are methicillin-resistant clones of *S. pseudintermedius*, capable to bring on in patient various pyoinflammatory diseases. The laboratory methods based on phenotype tests, provide no opportunity to differentiate coagulase-positive staphylococci because of significant similarity of phenotype characteristics in certain representatives of this group. The comparative analysis was implemented concerning efficiency of various methods of species identification of coagulase-positive staphylococci: biochemical, molecular genetic (multi-primer polymerase chain reaction for identifying differences in gene structure of thermonuclease, analysis of polymorphism of lengths of restricting fragments of catalase gene and their sequencing), matrix-activated laser desorption/ionizing time-of-flight mass-spectrometry (MALDI-ToF MS) with various modes of probe preparation. The analysis was applied to 117 isolates of representatives of SIG, separated from ill and healthy individuals of small domestic animals, clinical isolates from patients of hospitals. The multi-primer polymerase chain reaction permitted to identify 97% of isolates, analysis of polymorphism of lengths of restricting fragments of catalase gene - 100% of isolates that confirms efficiency of molecular genetic methods of analysis. The MALDI-ToF MS requires replenishment data base of mass-spectrometer and application of the mode of preliminary protein extraction of samples for increasing efficiency of species identification of coagulase-positive staphylococci.

Key words: coagulase-positive staphylococci; *Staphylococcus intermedius* group; species identification; molecular genetic methods; *nuc* gene; *kata* gene; matrix-activated laser desorption/ionizing time-of-flight mass-spectrometry

For citation: Balbutskaya A.A., Dmitrenko O.A., Skvortsov V.N. The modern characteristics of species identification of coagulase-positive bacteria of *Staphylococcus* genus. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)* 2017; 62 (8): 497-502. (in Russ.). DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2017-62-8-497-502>

For correspondence: Balbutskaya A.A., candidate of biological sciences, leading researcher. e-mail: nerpa-2007@mail.ru

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

Acknowledgment. The study had no sponsor support.

Received 28.03.2017
Accepted 03.04.2017

Введение. В зависимости от способности коагулировать плазму крови млекопитающих бактерии рода *Staphylococcus* делят на 2 кластера: коагулазоположительные (КПС) и коагулазоотрицательные (КОС). На протяжении десятилетий наиболее вирулентными для человека в клинической практике считали единственный коагулазоположительный вид *S. aureus* и ограниченное число видов КОС, в том числе *S. epidermidis*, *S. haemolyticus*, *S. warneri*, *S. capitis*, *S. lugdunensis* и некоторые др. Согласно данным многочисленных исследований, *S. aureus* является одним из ведущих этиологических агентов, вызывающих развитие инфекций кожи и мягких тканей, пневмонии, септицемии, эндокардита, токсического шока, девайс-ассоциированных инфекций и многих других заболеваний человека и животных [1]. Появление и последующее широкое распространение эпидемических штаммов, устойчивых к метициллину/оксациллину и другим антимикробным агентам (MRSA), существенно осложняет лечение стафилококковой инфекции, требует строгого соблюдения мер инфекционного контроля и делает неотложной необходимость правильной видовой идентификации и определения чувствительности возбудителя к антимикробным препаратам [2]. Интенсивное изучение экологии *S. aureus*, предпринятое с конца 70-х годов прошлого века, и применение в дальнейшем молекулярных методов исследований позволило выделить в самостоятельные таксоны: *S. intermedius*, *S. delphini*, *S. pseudintermedius*, *S. schleiferi* ssp. *coagulans*, *S. lutrae*, *S. hyicus*, естественными хозяевами которых являются животные [3—8]. Из-за сходства биохимических свойств в отдельную группу — *Staphylococcus intermedius* group (SIG)

— объединены три близкородственных вида: *S. intermedius*, *S. delphini*, *S. pseudintermedius* [9]. Накапливается всё больше данных, согласно которым неуклонно растёт этиологическая значимость микроорганизмов SIG в инфекционной патологии человека, в частности у людей со сниженным иммунитетом [10, 11]. Зарегистрированы гнойно-воспалительные заболевания, связанные с укусами животных, случаи бактериемий, инфекционного эндокардита, остеомиелита, инфекции мочевыводительной системы, синусита, отита, мастоидита, случаи инфекций кожи и мягких тканей. Для человека источником возбудителей служат животные, находящиеся с ним в тесном контакте, в том числе животные-компаньоны [12—14]. Доказано, что представители SIG могут передаваться и от человека человеку [15]. *S. (pseud) intermedius* может быть этиологическим агентом пищевых отравлений. Представители вида вызвали вспышку стафилококковой токсикоинфекции в США, охватившую более 250 человек. Все изоляты продуцировали энтеротоксин А, в отличие от типовых штаммов *S. intermedius* [16]. Опубликован случай выделения мультирезистентных изолятов *S. intermedius*, в том числе устойчивых к ванкомицину, из охлаждённого мяса кур. Выделенные изоляты содержали не менее одного гена энтеротоксинов *S. aureus* [17]. Известен случай выделения MRSP из мяса верблюда [18].

Имеются лишь единичные сообщения о выделении представителей группы SIG от человека в России. При изучении этиологической структуры гнойно-септических осложнений в условиях ожогового стационара из патологического материала выделен *S. intermedius* у 9,09% больных в каче-

стве моно возбу́дителя, у 3,76% он обнаружен в составе ассоциаций. Данный микроорганизм был вторым по частоте выделения среди КПС после *S. aureus*, и, более того, от ожоговых больных *S. intermedius* изолировали чаще, чем КОС. Для идентификации возбу́дителей применяли общепринятые бактериологические методы [19]. *S. intermedius* обнаружены на предметах больничной обстановки хирургического отделения стационара и родильного дома [20], при обследовании птицефабрики — в патологическом материале птиц, у здоровых носителей из числа сотрудников птицефабрики и студентов, проходивших там практику [21]. В обоих исследованиях идентификацию проводили на основании биохимических тестов.

В отличие от КОС представители SIG, как правило, обладают большим набором факторов патогенности, включая специфические токсины (гемолизины, лейкоцидин, эксфолиативные и энтеротоксины), наличие таких ферментов, как коагулаза, протеаза, ДНК-аза, термонуклеаза, липаза и некоторых других, не позволяющих отличить эту группу микроорганизмов от *S. aureus* при использовании рутинных лабораторных тестов [10, 22]. Представители SIG, в частности эпидемические клоны *S. pseudintermedius*, способны быстро приобретать гены резистентности ко многим антимикробным средствам различных классов, используемых в медицинской практике [23]. Их устойчивость к β-лактамам антибиотикам, как и у других представителей рода, обусловлена наличием стафилококковых хромосомных кассет *mec*, однако критерии оценки чувствительности к оксациллину/метициллину у *S. aureus* и представителей SIG различны [24]. Дифференциация КПС невозможна с помощью коммерческих биохимических тест-систем и автоматических бактериологических анализаторов, так как их базы данных не содержат всего спектра представителей SIG. Из-за отсутствия характерного пигмента бактериологи ошибочно идентифицируют микроорганизмы SIG как непигментированный *S. aureus*. Сложности возникают и при идентификации нетипичных представителей SIG и *S. aureus*, обладающих замедленной реакцией плазмокоагуляции, в результате чего они могут быть отнесены к КОС.

Ведётся активный поиск генетических мишеней, позволяющих дифференцировать представителей вышеназванной группы, но исследователи так и не пришли к единому мнению об их эффективности из-за значительной степени гомологии отдельных генов у SIG и некоторых других видов стафилококка или ограниченности выборки изолятов КПС, использованных в исследованиях. Для идентификации бактерий рода *Staphylococcus*, в том числе КПС, в качестве быстрой, точной и экономически выгодной альтернативы перечисленным выше способам диагностики предложен метод матрично-активированной лазерной десорбции/ионизации с использованием времяпролетной масс-спектрометрии (MALDI-ToF MS).

Цель работы — сравнить дифференцирующие возможности различных молекулярно-генетических методов и MALDI-ToF масс-спектрометрии для видовой идентификации КПС.

Материал и методы. В виду сложностей идентификации в клинических лабораториях представителей SIG — возбу́дителей заболеваний человека данное исследование выполнили на коллекции SIG, изолированных от животных-компаньонов. 112 изолятов *S. intermedius* и 5 изолятов *S. schleiferi* ssp. *coagulans*, выделенные от мелких домашних животных с различными гнойно-воспалительными заболеваниями, здоровых особей в Центральном регионе России, которые идентифицированы до вида с помощью биохимической тест-системы STAPHYtest 24 (PLIVA-Lachema a.s., Чехия); 4 клинических изолята *S. intermedius*, выделенные от больного гангреной дистальных отделов конечностей и от ожоговых больных в больницах Белгорода; от пациента с остеомиелитом в Центральном институте травматологии и ортопедии им. Приорова (Москва). В качестве контрольных

использованы референтные штаммы *S. aureus* NCTC 8325, *S. intermedius* DSM 20373^T, *S. pseudintermedius* LMG 22219^T, *S. delphini* DSM 20771^T и *S. hyicus* DSM 20249^T.

Дальнейшую идентификацию выполнили с помощью мультипраймерной ПЦР (М-ПЦР) для идентификации различий структуры гена термонуклеазы (*nuc*) [25], а также метода анализа полиморфизма длин рестриционных фрагментов (ПДРФ) гена каталазы (*katA*) [26]. Компьютерное моделирование ПДРФ-анализа выполнили с помощью программы GENTle V1.9.4. Исследование нуклеотидной последовательности *katA* гена проводили методом секвенирования. Секвенирование ДНК проводили с помощью набора реактивов ABI PRISM BigDye Terminator v. 3.1 с последующим анализом продуктов реакции на автоматическом секвенаторе Applied Biosystems 3730 DNA Analyzer. Изоляты идентифицированы методом MALDI-ToF MS анализа на масс-спектрометре AutoflexIII (Bruker Daltonics, Германия). Белковые спектры анализировали с помощью MALDI Biotyper (версия 3.0, Bruker Daltonics, Германия).

Экстракцию ДНК бактерий проводили согласно разработанной методике [27]. При постановке ПЦР использовали: Taq-полимеразу «Силекс» (Россия), праймеры синтезированы фирмой «Евроген». Рестрикцию амплифицированного фрагмента *katA* гена осуществляли эндонуклеазой TaqI (Promega, США). Детекцию продуктов амплификации и рестрикции осуществляли методом гель-электрофореза в 1,5% агарозном геле с использованием гель-документирующей системы DNA Analyzer (Россия).

Результаты. Молекулярно-генетическая идентификация. По результатам амплификации гена *nuc* методом М-ПЦР с видоспецифичными праймерами 117 изолятов коллекции разделены на 4 вида КПС: 107 изолятов *S. pseudintermedius*, 2 — *S. delphini*, 1 — *S. intermedius*, 4 — *S. schleiferi* ssp. *coagulans*, 3 штамма идентифицировать не удалось (рис. 1).

Для подтверждения достоверности результатов видовой идентификации, полученных при использовании амплификации фрагмента *nuc* гена, использован метод ПДРФ-анализа гена амплифицированного фрагмента *katA*. Для оценки дифференцирующей способности этого метода в исследовании включены 6 видов КПС, 31 изолят SIG, 4 *S. schleiferi* ssp. *coagulans*, референтные штаммы *S. aureus* и *S. hyicus*, 3 изолята неидентифицированные с помощью М-ПЦР.

Использование эндонуклеазы *TaqI* позволило дифференцировать изоляты SIG и другие КПС. Все типовые культуры SIG и взятые в качестве контрольных ДНК изолятов *S. aureus*, *S. schleiferi* ssp. *coagulans* и *S. hyicus* имели специфические сайты рестрикции, которые показаны на рис. 2. Сравнивая полученные результаты с данными компьютерного моделирования рестрикции фрагмента *katA* гена с помощью эндонуклеазы *TaqI*, обнаружили соответствие в количестве и длине фрагментов рестрикции во всех секвенированных последовательностях, за исключением ДНК изолятов *S. hyicus*, которые в позиции 895 содержали одну нуклеотидную замену А на G, что вело к появлению нового дополнительного сайта рестрикции. Метод ПДРФ гена *katA* подтвердил результаты М-ПЦР, за исключением одного изолята. Изолят, идентифицированный в М-ПЦР как *S. intermedius*, отнесён к виду *S. schleiferi* ssp. *coagulans*. С помощью ПДРФ-анализа удалось идентифицировать изоляты, которые не образовали ампликоны в М-ПЦР. Два из трёх имели сайты рестрикции, специфичные для *S. pseudintermedius*, третий не имел сайтов рестрикции. Результаты секвенирования показали, что все участки *katA* гена КПС гомологичны соответствующему виду на 98—99%, а изолят, который не имел сайтов рестрикции, на 100% гомологичен *katA* гену *S. warneri*. Нуклеотидные последовательности участка гена *katA* исследованных изолятов добавлены в генный банк международной базы данных NCBI (KU641394—KU641400).

Изоляты *S. intermedius*, выделенные от людей, исследованы молекулярно-генетическими методами. 2 из 4 изолятов сфор-

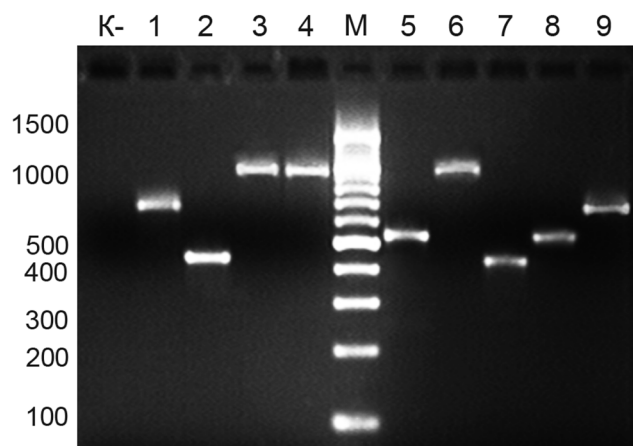


Рис. 1. Электрофореграмма М-ПЦР продуктов амплификации фрагментов нис генов различных видов коагулазоположительных стафилококков в агарозном геле.

Здесь и на рис. 2: М — ДНК-маркер (пар нуклеотидов); (К-) — отрицательный контроль.

1) *S. delphini*; 2) *S. intermedius* DSM 20373^T; 3) *S. pseudintermedius*; 4) *S. pseudintermedius* LMG 22219^T; 5) *S. schleiferi* ssp. *coagulans*; 6) *S. pseudintermedius*; 7) *S. intermedius*; 8) *S. schleiferi* ssp. *coagulans*; 9) *S. delphini* DSM 20771^T.

мировали ампликоны с видоспецифическими праймерами для *S. aureus* в М-ПЦР, другие 2 не идентифицированы. Анализ *katA* гена этих изолятов методом секвенирования показал гомологичность нуклеотидных последовательностей видам *S. pseudintermedius* на 99% и *S. simulans* на 95% соответственно.

MALDI-ToF MS анализ. Тестирование 117 изолятов коллекции методом MALDI-ToF масс-спектрометрии с использованием оригинальной базы данных прибора не позволило достоверно идентифицировать до вида ни один из микроорганизмов с критерием достоверности (score) от 2 до 2,3. Способом прямого нанесения образца на пластину до ро-

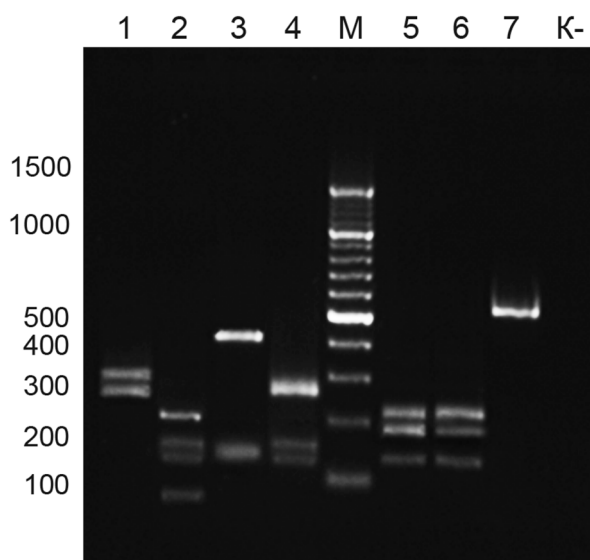


Рис. 2. *TaqI* ПДФ-анализ гена *katA* коагулазоположительных видов стафилококка. М — 1) *S. aureus*; 2) *S. hyicus*; 3) *S. intermedius* DSM 20373^T; 4) *S. delphini* DSM 20771^T; 5) *S. pseudintermedius* LMG 22219^T; 6) *S. pseudintermedius*; 7) *S. schleiferi* ssp. *coagulans*.

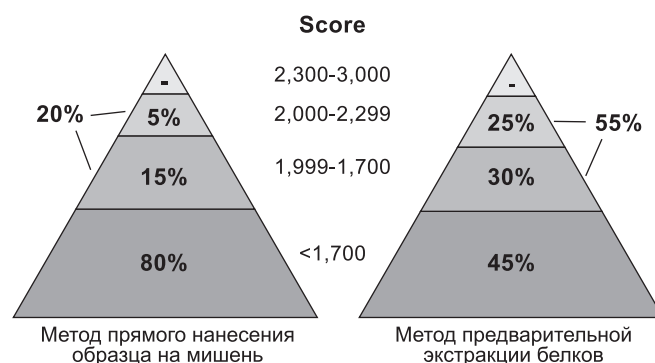


Рис. 3. Идентификация изучаемых стафилококков методом MALDI—TOF—MS.

Здесь и на рис. 4: значения score соответствуют: 2,3—3 — высокой достоверности идентификации вида; 2—2,299 — достоверной идентификации рода микроорганизма и вероятной идентификации вида; 1,999—1,7 — вероятной идентификации вида; <1,7 — отсутствие достоверной идентификации.

да идентифицировано 20% изолятов, из них только 5% до уровня вида с низкой степенью достоверности (score от 2 до 2,299). Способ предварительной экстракции белков позволил идентифицировать до рода 55% изолятов, но только 25% из них до вида со значением score от 2 до 2,299 (рис. 3). Большинство изолятов идентифицированы как *S. intermedius*, 2 изолята идентифицированы как *S. schleiferi* ssp. *coagulans* со score 2,003 и 2,293. 2 изолята — *S. delphini* со score 2,106 и 1,967. При анализе двух образцов одного изолята, включая референтные штаммы, микроорганизм мог быть отнесён с наибольшей вероятностью и к *S. pseudintermedius*, и к *S. intermedius* со score от 1,8 до 2,299.

Дифференцирующие возможности метода MALDI-ToF MS определены для 24 случайно выбранных изолятов в лаборатории микробиологии Центральной ветеринарной лаборатории земли Гессен, г. Гиссен, Германия. Идентификацию проводили с использованием внутрिलाбораторной базы данных прибора, которая, в отличие от оригинальной, содержала дополнительные масс-спектры генетически охарактеризованных изолятов SIG. Способом прямого нанесения образца на мишень удалось идентифицировать до рода 87,5% изолятов, из них только 2 изолята (8,3%) идентифицированы до вида с высоким критерием достоверности, один из которых идентифицирован как *S. schleiferi* ssp. *coagulans*, другой отнесён к *S. lugdunensis*. Метод предварительной экстракции белков позволил идентифицировать до рода 100% образцов, при этом 50% идентифицированы до вида с низкой степенью достоверности со score от 2 до 2,29. Видовая принадлежность остальных 50% образцов определена с высокой степенью достоверности — значения score составляли 2,3—3 (рис. 4). Большинство изолятов (33,3%) идентифицированы как *S. pseudintermedius*, 8,3% — *S. schleiferi* ssp. *coagulans*, 4,2 — *S. intermedius*, 4,2% — *S. lugdunensis*. Результаты идентификации, полученные способом предварительной белковой экстракции, соответствовали данным молекулярной идентификации за исключением одного изолята. Изолят *S. pseudintermedius* ошибочно идентифицирован как *S. lugdunensis* при использовании обоих способов подготовки проб.

Сравнительная оценка двух способов пробоподготовки выявила необходимость использования метода предварительной экстракции белков с добавлением муравьиной кислоты и ацетонитрила. Даже применение этого способа подготовки проб может привести не только к ошибочной дифференциации внутри группы КПС, но к идентификации некоторых коагулазоположительных видов, как КОС.

Обсуждение. В последнее десятилетие для дифференциации КПС предложено большое количество генетических мише-

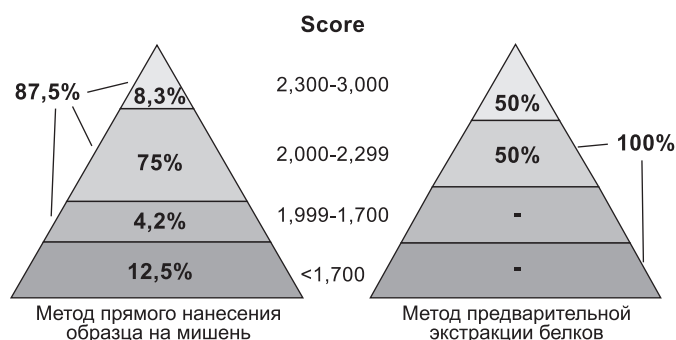


Рис. 4. Идентификация изучаемых стафилококков методом MALDI—TOF-MS с использованием внутрिलाбораторной базы данных масс-спектров.

ней, эффективность которых так и не подтвердилась. Секвенирование гена *16S рДНК* позволяет идентифицировать только 2% представителей рода *Staphylococcus* из-за высокой степени гомологии нуклеотидных последовательностей этого гена среди различных видов стафилококка [28]. Секвенирование некоторых генов домашнего хозяйства по отдельности (*hsp60*, *tuf*, *pta* и др.) не позволяет установить видовую принадлежность всех видов КПС по той же причине [9; 25]. Исследования по изучению возможности использования других генетических мишеней (*gap*, *nuc*, *kat* и др.) либо выполнены на ограниченной выборке, в том числе изолятов SIG, либо не включали всех видов КПС [26, 29]. По результатам данной работы удалось установить, что оба исследованных гена: *nuc* и *kataA* являются эффективными мишенями для идентификации КПС и их дифференциации от прочих видов стафилококка. Метод М-ПЦР для идентификации структурных различий *nuc* гена обладает высокой дифференцирующей способностью (97%), легко воспроизводим, позволяет получать надёжные результаты в короткие сроки. ПДРФ-анализ *kataA* гена с помощью эндонуклеазы *TaqI* наиболее эффективный для дифференциации представителей группы *S. intermedius* и других КПС, он позволяет безошибочно идентифицировать 100% изолятов, однако является более трудоёмким по сравнению с М-ПЦР. Оба метода могут быть рекомендованы для использования в клинических и научных лабораториях при диагностике стафилококковой инфекции.

Невысокая результативность способа прямого нанесения на мишень и невозможность использования стандартной базы данных масс-спектрометра MALDI Biotyper (версия 3.0, Bruker Daltonics, Германия) для идентификации микроорганизмов группы SIG подтверждены результатами других учёных, проводивших подобные исследования [30].

Накопленные данные о формировании множественной антибиотикорезистентности и приобретении детерминант патогенности представителями SIG, эпидемическое распространение определённых клонов *S. pseudintermedius* на территории целого ряда европейских государств и стран Северной Америки, способность вызывать заболевания не только у широкого круга млекопитающих, но и человека, делают неотложной необходимость внедрять молекулярно-генетические методы видовой идентификации КПС в работу бактериологических лабораторий. Особенно важно их использовать в случае выделения от пациентов нетипичных *S. aureus* от больных, страдающих вторичными иммунодефицитами и имеющих в анамнезе контакт с животными-компаньонами.

Выводы. 1. Точная идентификация коагулазоположительных видов стафилококков и их дифференциация от прочих видов возможна только при обязательном использовании молекулярно-генетических методов диагностики. Эффективными генетическими мишенями являются гены термонуклеазы (*nuc*) и каталазы (*kat*), которые позволяют дифференцировать 97—100% изолятов.

2. Для повышения качества идентификации представителей SIG методом MALDI-ToF MS необходимо пополнение оригинальной базы данных прибора дополнительными масс-спектрами микроорганизмов SIG, выделенных на различных географических территориях и использование при пробоподготовке способа предварительной белковой экстракции.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА (пп. 1—9, 11—18, 22—26, 28—30 см. REFERENCES)

1. Дмитренко О.А., Балбуцкая А.А., Скворцов В.Н. Особенности экологии, патогенные свойства и роль представителей группы *Staphylococcus intermedius* в инфекционной патологии животных и человека. *Молекулярная генетика, микробиология и вирусология*. 2016; 34(3): 4—11.
2. Воробьева О.Н., Денисенко Л.И., Жилина Н.М. Этиология гнойно-септических процессов у ожоговых больных. *Бюллетень СО РАМН*. 2010; 30 (6): 57—63.
3. Аكوпова И.С., Коленчукова О.А. *Науки о человеке: Некоторые особенности внутрибольничных штаммов микроорганизмов рода Staphylococcus*. Томск: СГМУ; 2002: 4—5.
4. Гордина Е.М., Горовиц Э.С., Поспелова С.В., Афанасьевская Е.В. Видовой спектр и биологические свойства стафилококков, изолированных от птиц, в условиях крупной птицефабрики. *Медицинский альманах*. 2014; 2(32): 84—7.
5. Дмитренко О.А., Шагинян И.А., Гинцбург А.Л. Исследование полиморфизма *tes* ДНК у метициллинрезистентных штаммов золотистого стафилококка, выделенных в стационарах разных регионов России. *Молекулярная генетика, микробиология, и вирусология*. 2005; 3: 11—7.

REFERENCES

1. Lowy F.D. *Staphylococcus aureus* infections. *N. Engl. J. Med.* 1998; 339: 520—32.
2. Grundmann H., Aanensen D.M., van den Wijngaard C.C., Spratt B.G., Harmsen D., Friedrich A.W. et al. Geographic distribution of *Staphylococcus aureus* causing invasive infections in Europe: a molecular-epidemiological analysis. *PLoS Med.* 2010; 7(1): e1000215.
3. Hajek V. *Staphylococcus intermedius*, a new species isolated from animals. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 1976; 26(4): 401—8.
4. Valardo P.E., Kilpper-Baelz R., Biavasco F., Satta G., Schleifer K. *Staphylococcus delphini* sp. nov., a coagulase-positive species isolated from dolphins. *Int. J. of Syst. Bact.* 1988; 38: 436—9.
5. Devriese L.A., Hajek V., Oeding P., Meyer S.A., Schleifer K.H. *Staphylococcus hyicus* comb. nov. and *Staphylococcus hyicus* subsp. *chromogenes* subsp. nov. *Intern. J. Syst. Bacteriol.* 1978; 28: 482—90.
6. Igimi S., Takahashi E., Mitsuoka T. *Staphylococcus schleiferi* subsp. *coagulans* subsp. nov., isolated from the external auditory meatus of dogs with external ear otitis. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 1990; 40: 409—11.
7. Devriese L.A., Vancanneyt M., Baele M., Vaneechoutte M., De Graef E., Snauwaert C. et al. *Staphylococcus pseudintermedius* sp. nov., a coagulase-positive species from animals. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2005; 55: 1569—73.
8. Foster G., Ross H.M., Hutson R.A., Collins M.D. *Staphylococcus lutrae* sp. nov., a new coagulase-positive species isolated from otters. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 1997; 65: 1571—8.
9. Sasaki T., Takahashi N., Kamata S., Hiramoto K. Reclassification of phenotypically identified *Staphylococcus intermedius* strains. *J. Clin. Microbiol.* 2007; 45(9): 2770—8.
10. Dmitrenko O.A., Balbutskaya A.A., Skvortsov V.N. Ecological features, pathogenic properties, and role of *Staphylococcus intermedius* group representatives in animal and human infectious pathology. *Молекулярная Генетика, Микробиология и Вирусология*. 2016; 34(3): 4—11. (in Russian)
11. Starlander G., Börjesson S., Grönlund-Andersson U., Tellgren-Roth C., Melhus A. Cluster of infections caused by methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* in humans in a tertiary hospital. *J. Clin. Microbiol.* 2014; 52(8): 3118—20.
12. Durdik P., Fedor M., Jesenak M., Hamzikova J., Knotkova H., Banovcin P. *Staphylococcus intermedius* — rare pathogen of acute meningitis. *Int. J. Infect. Dis.* 2010; 14: 236—8.
13. Kelesidis T., Tsiodras S. *Staphylococcus intermedius* is not only a zoonot-

- ic pathogen, but may also cause skin abscesses in humans after exposure to saliva. *Int. J. Infect. Dis.* 2010; 14: 838—41.
14. Somayaji R., Priyantha M.A., Rubin J.E., Church D. Human infections due to *Staphylococcus pseudintermedius*, an emerging zoonosis of canine origin: report of 24 cases. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 2016; 85(4): 471—6.
 15. Guardabassi L., Loeber M.E., Jacobson A. Transmission of multiple antimicrobial-resistant *Staphylococcus intermedius* between dogs affected by deep pyoderma and their owners. *Veterinary Microbiology.* 2004; 98: 23—7.
 16. Khambarty F.M., Bennett R.W., Shah D.B. Application of pulsed-gel electrophoresis to the epidemiological characterization of *Staphylococcus intermedius* implicated in a food-related outbreak. *Epidemiol. Infect.* 1994; 113: 75—81.
 17. Martins P.D., de Almeida T.T., Basso A.P., de Moura T.M., Frazzon J., Tondo E.C. et al. Coagulase-positive *staphylococci* isolated from chicken meat: pathogenic potential and vancomycin resistance. *Foodborne Pathog. Dis.* 2013; 10: 771—6.
 18. Al-Tarazi Y.H., Albetar M.A., Alaboudi A.R. Biotyping and enterotoxigenicity of staphylococci isolated from fresh and frozen meat marketed in Jordan. *Food Research International.* 2009; 42: 374—9.
 19. Vorob'eva O.N., Denisenko L.I., Zhilina N.M. The etiology of septic processes in burn patients. *Byulleten' SO RAMN.* 2010; 30(6): 57—63. (in Russian)
 20. Akopova I.S., Kolenchukova O.A. Science of man: Some features of nosocomial microorganism strains of the *Staphylococcus* genus [Nauki o cheloveke: Nekotorye osobennosti vnutribol'nichnykh shtammov mikroorganizmov roda *Staphylococcus*]. Tomsk: SGMU; 2002. (in Russian)
 21. Gordina E.M., Gorovits E.S., Pospelova S.V., Afanasevskaya E.V. Species spectrum and biological properties of staphylococci isolated from birds in a large poultry farm. *Meditsinskiy almanakh.* 2014; 2(32): 84—7 (in Russian)
 22. Ben Zakour N.L., Beatson S.A., van den Broek A.H., Thoday K.L., Fitzgerald J.R. Comparative genomic study of the *Staphylococcus intermedius* group of animal pathogens. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology.* 2012; 2: 1—15.
 23. Perreten V., Kadlec K., Schwarz S., Grönlund Andersson U., Finn M., Greko C. et al. Clonal spread of methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* in Europe and North America: an international multi-centre study. *J. Antimicrob. Chemother.* 2010; 65(5): 1145—54.
 24. Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Tests for Bacteria Isolated From Animals: Approved Standard - Third Edition. CLSI document M31-A3. 2010; 28(8).
 25. Sasaki T., Tsubakishita S., Tanaka Y., Sakusabe A., Ohtsuka M., Hirota S. Multiplex-PCR method for species identification of coagulase-positive staphylococci. *J. Clin. Microbiol.* 2010; 48(3): 765—9.
 26. Blaiotta G., Fusco V., Ercolini D., Pepe O., Coppola S. Diversity of *Staphylococcus* species strains based on partial *kat* (catalase) gene sequences and design of a PCR-restriction fragment length polymorphism assay for identification and differentiation of coagulase-positive species (*S. aureus*, *S. delphini*, *S. hyicus*, *S. intermedius*, *S. pseudintermedius*, and *S. schleiferi* subsp. *coagulans*). *J. Clin. Microbiol.* 2010; 48(1): 192—201.
 27. Dmitrenko O.A., Shaginyan I.A., Gintsburg A.L. Study of *mec* DNA polymorphism in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains isolated in hospitals of different Russian regions. *Molecularnaya Genetika, Mikrobiologiya, i Virusologiya.* 2005; 3: 11—7. (in Russian)
 28. Woo P.C., Teng J.L., Wu J.K., Leung F.P., Tse H., Fung A.M. et al. Guidelines for interpretation of 16S rRNA gene sequence-based results for identification of medically important aerobic Gram-positive bacteria. *J. Med. Microbiol.* 2009; 58(8): 1030—6.
 29. Yugueros J., Temprano A., Berzal B., Sánchez M., Hernanz C., Luengo J.M. et al. Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase-encoding gene as a useful taxonomic tool for *Staphylococcus* spp. *J. Clin. Microbiol.* 2000; 38(12): 4351—5.
 30. Murugaiyan J., Walther B., Stamm I., Abou-Elnaga Y., Brueggemann-Schwarze S., Vincze S. et al. Species differentiation within the *Staphylococcus intermedius* group using a refined MALDI-ToF MS database. *Clin. Microbiol. Infect.* 2014; 20(10): 1007—15.

Поступила 28.03.17
Принята к печати 03.04.17

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2017

УДК 615.33:579.871.1.015.8

Харсеева Г.Г.¹, Воронина Н.А.¹, Гасретова Т.Д.¹, Тюкавкина С.Ю.¹, Сылка О.И.¹, Миронов А.Ю.²

ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ К АНТИБИОТИКАМ ШТАММОВ *CORYNEBACTERIUM NON DIPHTHERIAE*, ВЫДЕЛЕННЫХ В СТАЦИОНАРАХ РОСТОВА-НА-ДОНУ И РОСТОВСКОЙ ОБЛАСТИ

¹ ФГБОУ ВО «Ростовский государственный медицинский университет», 344022, Ростов-на-Дону;

² ФБУН Московский НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н. Габричевского Роспотребнадзора, 125212, Москва

Цель работы — изучение чувствительности к антибактериальным препаратам различных видов *Corynebacterium non diphtheriae*. Штаммы *C. non diphtheriae* выделены от больных с патологией респираторного и урогенитального тракта, а также людей, проходивших профилактическое обследование. Чувствительность к антибактериальным препаратам определяли методом серийных разведений в жидкой питательной среде на основании значений минимальной подавляющей концентрации (мг/л). Установлено, что наиболее эффективными антибактериальными препаратами в отношении штаммов *C. non diphtheriae*, в целом оказались ванкомицин, цефазолин и цефотаксим, а отдельных видов — *C. pseudodiphtheriticum* — цефазолин, цефотаксим, гентамицин; *C. pseudotuberculosis* — ванкомицин, цефазолин, цефотаксим, гентамицин; *C. xerosis* — цефотаксим; *C. striatum* — цефазолин и рифампицин. Наименьшую эффективность проявили для штаммов *C. non diphtheriae*, в целом бензилпенициллин и линкомицин, а отдельных видов — *C. pseudodiphtheriticum* и *C. pseudotuberculosis* — линкомицин и эритромицин; *C. xerosis* и *C. striatum* — бензилпенициллин, линкомицин и эритромицин. В качестве препаратов выбора в отношении различных видов *C. non diphtheriae* можно рекомендовать цефалоспорины (цефотаксим и цефазолин), резервных препаратов — гентамицин и ванкомицин.

Ключевые слова: *Corynebacterium non diphtheriae*; антибиотикоустойчивость; количество чувствительных и резистентных штаммов.

Для цитирования: Харсеева Г.Г., Воронина Н.А., Гасретова Т.Д., Тюкавкина С.Ю., Сылка О.И., Миронов А.Ю. Чувствительность к антибиотикам штаммов *Corynebacterium non diphtheriae*, выделенных в стационарах Ростова-на-Дону и Ростовской области. *Клиническая лабораторная диагностика.* 2017; 62 (8): 502-506. DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2017-62-8-502-506>

Для корреспонденции: Харсеева Галина Георгиевна, д-р мед. наук, проф., зав. каф. микробиологии и вирусологии № 2 ГБОУ ВПО «Ростовский государственный медицинский университет»; e-mail: galinagh@bk.ru