

УДК 615.33.015.8.07

SCCmec-типирование метициллинорезистентных штаммов *Staphylococcus aureus*, выделенных от госпитализированных и амбулаторных пациентов в Казани

Ю.А. Тюрин, Л.Т. Баязитова, О.Ф. Тюпкина, Р.С. Фассахов

ФБУН «Казанский НИИ эпидемиологии и микробиологии» Роспотребнадзора, Казань, Россия

Цель. Сравнение генотипов метициллинорезистентных *S. aureus* по SCCmec комплексу у различных по источнику выделения штаммов.

Материалы и методы. В исследование был включен 191 штамм *S. aureus*. Штаммы выделены в 2007–2011 гг. от амбулаторных и госпитализированных пациентов, проходивших лечение и обследование в условиях специализированной поликлиники ФБУН КНИИЭМ Роспотребнадзора и многопрофильного стационара г. Казани. Чувствительность к оксациллину определяли по стандартам NCCLS, МПК₉₀ оксациллина – по МУК 4.2.1890-04 «Определение чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препаратам». Генотипирование *S. aureus* проводили по протоколу, представленному в Методических рекомендациях Федерального центра гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2006. Идентификацию типов SCCmec осуществляли методом ПЦР-амплификации с использованием

12 пар праймеров (олигонуклеотидов), синтезированных в ЗАО «Синтол» (Москва).

Результаты. Из 166 выделенных от 56 амбулаторных пациентов штаммов *S. aureus* 27,1% составили метициллинорезистентные изоляты. Из 25 штаммов, выделенных от пациентов, госпитализированных в травматологическое отделение РКБ г. Казани, 56,0% идентифицированы как метициллинорезистентные. При генотипировании MRSA, выделенных от амбулаторных пациентов, во всех случаях выявлен IV тип SCCmec, а у штаммов, выделенных от пациентов травматологического отделения – II тип SCCmec.

Выводы. Выявлены генотипические различия по типу SCCmec между MRSA штаммами, выделенными от амбулаторных и госпитализированных пациентов.

Ключевые слова: нозокомиальные MRSA, внебольничные MRSA, генотипирование SCCmec.

Контактный адрес:
Юрий Александрович Тюрин
Эл. почта: immunolab@yandex.ru

SCCmec Typing of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Strains Isolated from Inpatients and Outpatients in Kazan

Yu.A. Tyurin, L.T. Bayazitova, O.F. Tyupkina, R.S. Fassakhov

Kazan Research Institute of Epidemiology and Microbiology, Kazan, Russia

Objective. To compare genotypes (by mec complex) of methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA) isolated from different patient populations.

Material and Methods. A total of 191 *S. aureus* strains were included in the study. These strains were isolated during the period of 2007–2011 from patients examined and treated in a specialized outpatient clinic and patients hospitalized to the Republic Teaching Hospital in Kazan. Susceptibility to oxacillin was determined according to NCCLS standards, and MIC90 for oxacillin was determined according to Guidance 4.2.1890-04 «Antimicrobial susceptibility testing». Genotyping of *S. aureus* was performed according to the Federal Center of Hygiene and Epidemiology guidelines (2006). SCCmec

types were identified by PCR assay using 12 pairs of primers («Sinto»), Moscow).

Results. Of 166 strains isolated from 56 outpatients, 27.1% were identified as MRSA. Of 25 strains isolated from hospitalized patients (trauma unit), 56.0% were identified as MRSA. Genotyping showed that MRSA strains obtained from outpatients harbored SCCmec type IV, and MRSA strains obtained from trauma unit patients harbored SCCmec type II.

Conclusions. There were found genotypic differences in SCCmec type between MRSA strains from outpatients and MRSA strains from hospitalized patients.

Key words: hospital-acquired MRSA, community-acquired MRSA, SCCmec typing.

Введение

Ежегодно в США почти у 2 млн госпитализированных пациентов развиваются различные внутрибольничные инфекции, в том числе вызванные MRSA [1]. В России при отсутствии систематического исследования распространённости внебольничных и госпитальных штаммов MRSA оценить истинные масштабы этого явления достаточно трудно. Необходимо отметить, что, начиная с 90-х годов прошлого века, одним из наиболее значимых возбудителей внутрибольничных инфекций является *S. aureus*. Золотистый стафилококк лидирует в этиологии хирургических инфекций в ожоговых и травматологических отделениях, а также занимает второе место среди возбудителей ангиогенных инфекций, развивающихся у пациентов в стационарах и во внебольничных условиях [2]. Не меньшую актуальность сегодня в ряде стран представляют инфекции, вызываемые внебольничными штаммами метициллинорезистентных стафилококков у амбулаторных пациентов.

Учитывая рост числа как госпитальных, так и внебольничных инфекций, вызванных метициллинорезистентными штаммами *S. aureus*, а также объективные трудности в эпидемиологическом плане при разграничении этих штаммов, исследования по генотипированию метициллинорезистентности у штаммов, циркулирующих среди различных групп пациентов в г. Казани, представляют практическую актуальность.

Цель выборочного исследования: сравнить генотипы SCCmec комплекса у различных по источнику

выделения MRSA штаммов для идентификации их происхождения.

Материалы и методы

В выборочное исследование был включен 191 клинический штамм *Staphylococcus aureus*. Штаммы выделены в 2007–2011 гг. от амбулаторных и стационарных пациентов, проходивших лечение и обследование в условиях специализированной поликлиники ФБУН КНИИЭМ Роспотребнадзора и многопрофильного стационара г. Казани. Первичную идентификацию *S. aureus* осуществляли морфологическими и биохимическими методами.

Штаммы MRSA, выделенные от амбулаторных пациентов, получены при исследовании биоматериала со слизистой и кожи пациентов, который получали со слизистой носа и носовых ходов на уровне нижней носовой раковины, участков гладкой кожи лица, верхних конечностей и туловища.

Штаммы MRSA, выделенные от госпитальных пациентов, отобраны с инфицированных ран и очагов поражения кожи больных с ожогами в многопрофильном стационаре г. Казани.

В качестве референс-штаммов использовали *Staphylococcus aureus* M307, *Staphylococcus aureus* M 258, *Staphylococcus aureus* 252, *Staphylococcus aureus* 720, *Staphylococcus aureus* E84/5528/1, *Staphylococcus aureus* И-78 (табл.1). Штаммы, использованные для контроля определения чувствительности к антибактериальным препаратам, и ген амплификации SCCmec были получены из ГКПМ ГИСК им. Л.А. Тарасевича (Москва, Россия).

Таблица 1. Референс-штаммы *Staphylococcus aureus*, использованные в исследовании

Штаммы	Характеристика
MRSA 252	SCCmec II, Tn554
<i>S. aureus</i> M307	SCCmec I
<i>S. aureus</i> II-78	SCCmec I
<i>S. aureus</i> E84/5528/1	SCCmec III
<i>S. aureus</i> M258	SCCmec IV

Чувствительность к оксацилину определяли в соответствии со стандартами NCCLS [3], а определение *минимальной подавляющей концентрации* (МПК) оксацилина – по Методическим указаниям 4.2.1890-04. «Определение чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препаратам» [4].

Генотипирование *Staphylococcus aureus* проводили по протоколу, представленному в методических рекомендациях Федерального центра гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора (2006) [5]. Экстракцию геномной ДНК из штаммов осуществляли по протоколам коммерческих наборов ZR Genomic DNA II Kit™. Идентификацию

типов *SCCmec* осуществляли методом ПЦР-амплификации с использованием 12 пар праймеров (олигонуклеотидов), синтезированных в ЗАО «Синтол», Москва (табл. 2). На первом этапе определяли специфичность набора генов, кодирующих синтез рекомбиназ (сcr-тип 1, 2, 3 и 5). Затем определяли набор генов, входящих в состав комплекса *mec* (класс А или класс В), с применением праймеров MecI и IS272 (см. табл. 2). Результаты амплификации, с определением этих наборов генов, позволили идентифицировать наличие SCCmec I, II и III типов. Для идентификации присутствия SCCmec IV a, b, c и d использовали праймеры IS272, а также T-IVa – T-IVd, при выявлении SCCmec V типа дополнительно использовали праймеры T-V и сcr-type 5 (см. табл. 2).

ПЦР проводили с использованием стандартного состава реакционной смеси, объем одной пробы составлял 20 мкл. Праймеры вносили в конечной концентрации 300 нмоль, концентрация ДНК-матрицы – до 10 нг. Детекцию праймер-специфических ампликонов проводили в 2% агарозном геле методом горизонтального электрофореза с использованием интеркалирующего красителя этидиум бромид и маркеров (Fermentas, DNA Ladder). Для визуализации результатов применя-

Таблица 2. Наборы праймеров, использованных для идентификации типов *SCCmec*

Название праймера	Тип идентифицируемого <i>SCCmec</i>	Нуклеотидная последовательность (5'-3')	Размер ампликона п. н.
T-IVa	SCCmecIVa	GCCTTATTCGAAGAACC CTACTCTTCTGAAAAGCGTCG	776
T-IVb	SCCmecIVb	TCTGGAATTACTTCAGCTGC AAACAATATTGCTCTCCCTC	493
T-IVc	SCCmecIVc	ACAATATTTGTATTATCGGAGAGC TTGGTATGAGGTATTGCTGG	200
T-IVd	SCCmecIVd	CTCAAAATACGGACCCCAATACA TGCTCCAGTAATTGCTAAAG	880
T-V	SCCmecV	GAACATTGTTACTTAAATGAGCG TGAAAAGTTGTACCCTTGACACC	330
MecA147	Ген <i>mecA</i>	GTGAAGATATACCAAGTGATT ATGCGCTATAGATTGAAAAGGAT	150
сcr-type 1	SCCmec I	ATTGCCTTGATAATAGCCTCT AACSTATATCATCAATCAGTACGT	700
сcr-type 2	SCCmec II	ATTGCCTTGATAATAGCCTCT TAAAGGCATCAATGCACAAACACT	1000
сcr-type 3	SCCmec III	ATTGCCTTGATAATAGCCTCT AGCTCAAAAAGCAAGCAATAGAAT	1600
MecI	Класс А <i>mec</i>	CAAGTGATTTGAAAACCGCCT CAAAAAGGACTGGACTGGAGTCCAAA	180
IS272	Класс В <i>mec</i>	ACCGCCACTCATAACATAAGGAA TATACCAACCCGACAAC	2000
сcr-type 5	SCCmecV	ATG-AAT TCAAAGAGGATGGC GATTTAGAATTGTCTCGTGATTGC	336

ли транслюминатор (Vilber Lourmat, SCX-15 M, Франция).

Результаты исследования

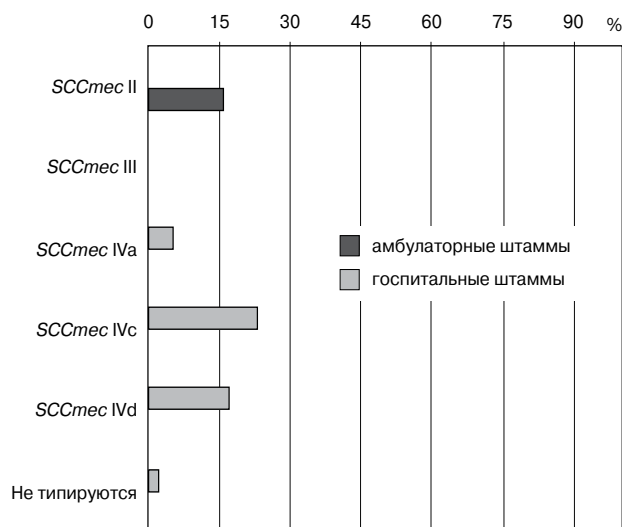
Распределение и характеристика штаммов *S. aureus*, выделенных от госпитализированных и амбулаторных пациентов, представлены в табл. 3.

У амбулаторных пациентов со слизистой носоглотки и кожи были выделены 166 штаммов *S. aureus*. Нозологическая структура амбулаторных пациентов, колонизированных золотистым стафилококком, включала в себя пациентов с атопическим дерматитом ($n=28$), аллергическим ринитом ($n=16$) и неаллергическим ринитом ($n=12$). В группе амбулаторных пациентов частота выявления MRSA, по данным фенотипической идентификации, составила 27,1% от всех исследованных штаммов (см. табл. 3). Характерной особенностью выделенных штаммов в данной группе пациентов было преобладание (72,9%) метициллиночувствительных штаммов (MSSA), по сравнению с группой госпитализированных пациентов (44,0%).

Штаммы *S. aureus*, выделенные с кожи и раневого отделяемого госпитализированных больных, характеризовались преобладанием метициллинорезистентных изолятов (56,0%). Примечательно, что некоторые штаммы, выделенные как от амбулаторных, так и госпитальных пациентов фенотипически были чувствительны к оксациллину, при этом молекулярно-генетический анализ ДНК выявил праймер-специфические ампликоны *mecA* гена: это отмечено в 30,1% случаев для амбулаторных и в 64,0% – для госпитальных изолятов (см. табл. 3).

На втором этапе исследования проведено молекулярно-генетическое типирование позитивных по *mecA* гену ДНК штаммов и установлены типы SCCmec кассет.

Изучение генотипа всех выделенных MRSA штаммов от пациентов амбулаторного и госпиталь-



Распределение типов SCCmec в геноме выделенных штаммов MRSA при выборочном исследовании пациентов

ного профиля при одномоментном исследовании позволило выявить существенные типовые различия (рисунок). Распределение типов SCCmec кассет показало, что штаммы, выделенные от амбулаторных пациентов, содержали в своем составе генетические элементы SCCmec IV a, c и d типов, тогда как в метициллинорезистентных штаммах, выделенных от пациентов госпитального профиля, были идентифицированы только SCCmec кассеты II типа.

При определении МПК₉₀ оксациллина для всех генотипированных MRSA штаммов нами установлено, что высокие показатели МПК₉₀ оксациллина были характерны только для штаммов, выделенных от госпитализированных пациентов (МПК₉₀ >0,256 мг/л), получавших интенсивную антибактериальную терапию с применением антибиотиков широкого спектра действия, тогда как низкие пока-

Таблица 3. Результаты определения чувствительности к оксациллину и идентификации *mecA* гена у штаммов, выделенных от пациентов двух групп

Группы пациентов	Штаммы, абс. ч (%)		
	фенотипические		генотипические
	MRSA	MSSA	ген <i>mecA</i> (+)
Амбулаторные ($n=56$)	45 (27,1)	121 (72,9)	49 (30,1)
Всего ...	166 (100,0)		
Госпитализированные (травматологическое отделение РКБ) ($n=28$)	14 (56,0)	11 (44,0)	16 (64,0)
Всего ...	25 (100,0)		

Таблица 4. МПК оксациллина для штаммов в зависимости от типа SCCmec

Тип мобильного SCCmec элемента	Штаммы <i>S. aureus</i> , абс. число (%)			
	амбулаторная группа		госпитальная группа	
	MRSA	МПК ₉₀ , мг/л	MRSA	МПК ₉₀ , мг/л
II <i>mec</i> -комплекс А	–	–	16	0,256
III <i>mec</i> -комплекс А	–	–	–	–
IVa <i>mec</i> -комплекс В	6	0,008	–	–
IVc <i>mec</i> -комплекс В	23	0,032	–	–
IVd <i>mec</i> -комплекс В	18	0,008–0,016	–	–
Не типизируемые	2	0,008	–	–
Всего ...	49 (100,0)		16 (100,0)	

затели МПК₉₀ (от 0,008 до 0,032 мг/л) выявлялись у штаммов, выделенных от пациентов амбулаторного профиля (табл. 4).

Обсуждение результатов

Генетической характеристикой всех MRSA и MRSE штаммов, независимо от генотипов SCCmec элемента, является наличие гена *mecA*, обуславливающего устойчивость данных штаммов к бета-лактамам антибиотикам, и генов *ccr*-комплекса, которые кодируют белки, осуществляющие эксцизию и сайт-специфическую интеграцию *mecA* в геном стафилококков [6]. Мобильные генетические элементы SCCmec, к которым относятся кассеты IV и V типов, могут переноситься от одних штаммов *S. aureus* к другим относительно свободно, по сравнению с SCCmec кассетами I, II и III типов, как правило, не обладающих мобильностью [7]. Необходимо отметить, что штаммы, содержащие SCCmec IV и V типов в составе своего генома, вследствие выраженной мобильности и способности к горизонтальному переносу, представляют большую эпидемиологическую опасность при распространении MRSA и передаче данного признака между стафилококками, колонизирующими организм человека.

Мобильные генетические элементы SCCmec I, II и III типов присутствуют, как правило, в госпитальных клонах метициллинорезистентных стафилококков (HA-MRSA) и характеризуются нали-

чием генов устойчивости к антибиотикам других групп (аминогликозидам, тетрациклинам, макролидам) [8].

В настоящее время молекулярно-генетическими методами установлено, что существует достаточно чёткая зависимость между принадлежностью MRSA к определённому генетическому «бэкграунду» и содержанием определённого типа SCCmec в ДНК [9]. Штаммы, содержащие SCCmec IV типа, относятся к наиболее многочисленной клональной группе CC8. Эта группа включает такие эпидемически родственные штаммы и клоны, как EMRSA-2, -6, -12, -13 и -14, распространённые в Великобритании, США, Германии, Франции и Нидерландах [10]. Необходимо отметить, что SCCmec IV типа нередко выявляются у *S. epidermidis*, являющихся представителями нормальных грамположительных колонизаторов кожи и слизистых человека, что предполагает возможность передачи данного мобильного элемента от *S. epidermidis* к *S. aureus* [11–13].

Таким образом, изоляты метициллинорезистентных штаммов золотистых стафилококков, выделенные от пациентов госпитального профиля, в составе своего генома содержали SCCmec кассеты II типа, характерные для госпитальных клонов MRSA, а у штаммов, выделенных от амбулаторных пациентов, идентифицирован IV тип SCCmec элемента, присутствующий у большинства изолятов так называемых внебольничных MRSA (CA-MRSA) [14].

Литература

1. Chambers H. The Changing epidemiology of *Staphylococcus aureus*? Emerg Inf Dis 2001; 7:178-82.
2. Сабирова Е.В., Гординская Н.А., Абрамова Н.В., Некаева Е.С. Антибиотикорезистентность нозокомиальных штаммов *Staphylococcus* spp., выделенных в

- ожеговом центре в 2002–2008 гг. Клин Микробиол Антимикроб Химиотер 2010; 12(1):77-81.
3. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Fourteenth Informational Supplement. NCCLS document M100-S14.2004.-24(1).
4. Определение чувствительности микроорганизмов к

- антибактериальным препаратам. Методические указания МУК 4.2.1890-04., Москва, Минздрав России.
5. Метициллинрезистентные *Staphylococcus aureus* - возбудители внутрибольничных инфекций: идентификация и генотипирование. Методические рекомендации – М.: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, Москва, 2006. 43 с.
 6. Katayama J., Ito T., Hiramatsu K. A new class of genetic element, staphylococcus cassette chromosome mec, encodes methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* 2000; 44:1549-55.
 7. Robinson D. A., Enright M.C. Evolutionary models of the emergence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* 2003; 47:3926-34.
 8. Palavecino E. Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections. *Clin Lab Med* 2004; 24:403-18.
 9. Fey P.D., Said-Salim B., Rupp M. E., et al. Comparative molecular analysis of community- or hospital-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* 2003; 47:196-203.
 10. Okuma K., Iwakawa K., Turnidge J. D., et al. Dissemination of new methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clones in the community. *J Clin Microbiol* 2002; 40:4289-94.
 11. Chambers H. F. Tracking the spread of CMRSA. *APUA Newsletter* 2003; 21(2):1.
 12. Wienders C. L., Brisse S., de Graaf-Miltenburg L. A, et al. *In-vivo* transfer of mecA DNA to *Staphylococcus aureus*. *Lancet* 2001; 357:1674-75.
 13. Hiramatsu K., Longzhu C., Kuroda M., Ito T. The emergence and evolution of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Trend Microbiol* 2001; 9:486-93.
 14. Страчунский Л.С., Белькова Ю.А., Дехнич А.В. Внебольничные MRSA – новая проблема антибиотикорезистентности. *Клин Микробиол Антимикроб Химиотер* 2005; 7(1):32-3.