

Молекулярная эпидемиология штаммов *Staphylococcus aureus* в детских стационарах России

А.В. Романов, А.В. Дехнич, М.В. Эйдельштейн

НИИ антимикробной химиотерапии Смоленской государственной медицинской академии, Смоленск, Россия

Цель. Установить молекулярные типы *S. aureus*, вызывающих нозокомиальные и внебольничные инфекции у детей в различных регионах России.

Материал и методы. В исследование было включено 575 штаммов (187 MRSA и 388 MSSA), выделенных от детей и подростков в ходе многоцентровых микробиологических исследований в 36 стационарах 24 городов России в 1997–2008 гг. Для молекулярного типирования было отобрано 186 изолятов, имеющих уникальный профиль резистентности в пределах одного отделения каждого участвовавшего центра. Для изучения клональной принадлежности штаммов *S. aureus* были использованы методы MLVA, spa, SCCmec и MLST типирования.

Результаты. На основании данных MLVA метициллиночувствительные штаммы ($n=117$) кластеризовались на 80 типов, которые можно объединить в 10 генетических групп, отличаю-

щихся не более чем на 1 VNTR локус, в то время как MRSA ($n=85$) расположились в пределах одной обособленной группы (за исключением 3 изолятов), состоящей из 17 MLVA типов. По данным SCCmec типирования, было выявлено только 2 типа кассет: SCCmec III и SCCmec I. По данным MLST, подавляющее большинство штаммов относилось к ST 239 и ST 8. Внебольничные MRSA имели такие же MLVA, spa и SCCmec типы, что и внутрибольничные: t008 SCCmec IV ($n=9$), t037 SCCmec III ($n=4$) и t030 SCCmec III ($n=3$).

Выводы. Доминирующими молекулярными типами были ST8, t008, SCCmec IV и ST239, t030 и t037 SCCmec III на протяжении всего периода наблюдения. Не установлено никаких молекулярно-генетических различий между внутри- и внебольничными MRSA.

Ключевые слова: MRSA, детские стационары, молекулярные методы типирования.

Molecular Epidemiology of *Staphylococcus aureus* in Russian Pediatric Hospitals

A.V. Romanov, A.V. Dekhnic, M.V. Edelstein

Institute of Antimicrobial Chemotherapy, Smolensk, Russia

Objective. To reveal molecular types of nosocomial and community-acquired strains of *S. aureus* in different regions of Russia.

Materials and methods. 575 (187 MRSA and 388 MSSA) strains, isolated from pediatric patients during

multicenter studies (1997–2008) from 36 medical institutions in 24 Russian cities were included in the study. For molecular typing 186 strains with unique resistance profile within each ward of each medical institution were selected. The following typing methods were used: MLVA, spa, SCCmec and MLST.

Results. According to MLVA, methicillin-susceptible strains ($n=117$) were clustered to 80 types, that could be placed into 10 genetic groups that differ in not more than 1 VNTR locus. At the same time the vast majority of MRSA

Контактный адрес:

Андрей Вячеславович Романов

Эл. почта: andrew.romanov@antibiotic.ru

strains ($n=85$) were represented by the only genetic group (with the exception of 3 isolates), consisted of 17 MLVA types. Only 2 types of SCCmec were detected (III and IV). According to MLST results the vast majority of strains belong to ST 239 and ST 8. Community-acquired MRSA had the same MLVA, spa and SCCmec types as nosocomial ones: t008 SCCmec IV ($n=9$), t037 SCCmec III ($n=4$) and t030 SCCmec III.

Введение

Золотистый стафилококк (*Staphylococcus aureus*) является повсеместно распространенным микроорганизмом, который вызывает широкий спектр заболеваний, таких как инфекции кожи и мягких тканей, инфекции костей и суставов, пневмония, сепсис, синдром токсического шока. Вместе с тем широко распространено бессимптомное носительство: 20–30% населения являются колонизированными этим микроорганизмом [1].

Резистентность стафилококка к β -лактамам обусловлена присутствием *mecA* гена, который кодирует *пенициллин-связывающий белок* (ПСБ) 2a (реже упоминается как ПСБ2'). Ген *mecA* расположен на мобильном генетическом элементе, называемом *стафилококковая хромосомная кассета* (SCCmec) [2]. Мировое распространение MRSA, в основном, обусловлено диссеминацией нескольких

Conclusion. In our study, independently of the geographic location, place of onset of infection, and time period, the dominating molecular types of MRSA were ST8, t008, SCCmec IV and ST239, t030 and t037 SCCmec III.

Key words: MRSA, pediatric hospitals, molecular typing.

клональных линий со специфической генетикой [3]. Каждая клональная линия имеет особенности патогенности и устойчивости к лекарственным препаратам, причем распространение некоторых из них принимает эпидемический характер [4]. Поскольку β -лактамы антибиотики являются наиболее часто применяемыми препаратами для стартовой эмпирической терапии большинства инфекций, то широкое распространение MRSA может значительно лимитировать терапевтические возможности.

В развитых странах регулярно проводятся исследования молекулярной эпидемиологии наиболее значимых микроорганизмов. Во многих стационарах молекулярное типирование штаммов осуществляется на рутинной основе. В России в настоящее время данные о молекулярной эпидемиологии золотистого стафилококка ограничиваются единичными исследованиями (табл.1).

Таблица 1. Краткие данные о проведенных исследованиях по изучению клональности MRSA в России

Авторы	Количество изолятов, годы и география исследования	Методы исследования	Результаты исследований
Дмитренко О.А. [4]	184 изолята за 1976–1990 гг., более 1500 изолятов за 1998–2002 гг. Различные регионы СССР и России	Фаготипирование, RFLP <i>coa</i> , SLST <i>coa</i> , SCCmec, spa, амплификация генов <i>sea</i> , <i>seb</i> , <i>sec</i>	Доминировали MRSA молекулярных типов t030, SCCmec III, <i>coa</i> IV и t037, SCCmec III, <i>coa</i> IV. Высказано предположение, что эпидемический клон со spa-типом t008 имеет происхождение, отличное от международного ST8-IV, так как имеет композитный элемент SCCmec(I+IV)
Vorobieva V., Bazhukova T., Hanssen A.M., et al. [5]	91 изолят за 2004 г. Архангельская область	PFGE, MLST, SCCmec, PVL	Среди 91 изолята – 16 MRSA (15%) молекулярных типов (ST) 239-III ($n=11$), ST1097-III ($n=1$) и ST8-IV ($n=3$), которые входят в состав клонального комплекса CC8, а также ST426-MRSA-IV/CC395 ($n=1$), который был описан впервые. Все MRSA были PVL отрицательными
Хохлова О.Е. и др. [6]	9 штаммов, относящихся к пандемическим MRSA клонам, Клинические штаммы MRSA из России	Амплификация 18 генов стафилококковых токсинов, MLST, SCCmec	Два клинических штамма из России были отнесены к венгерскому клону, так как принадлежали к группе ST239 (CCS) и типу SCCmecIII, продуцировали типичный для этого клона набор токсинов

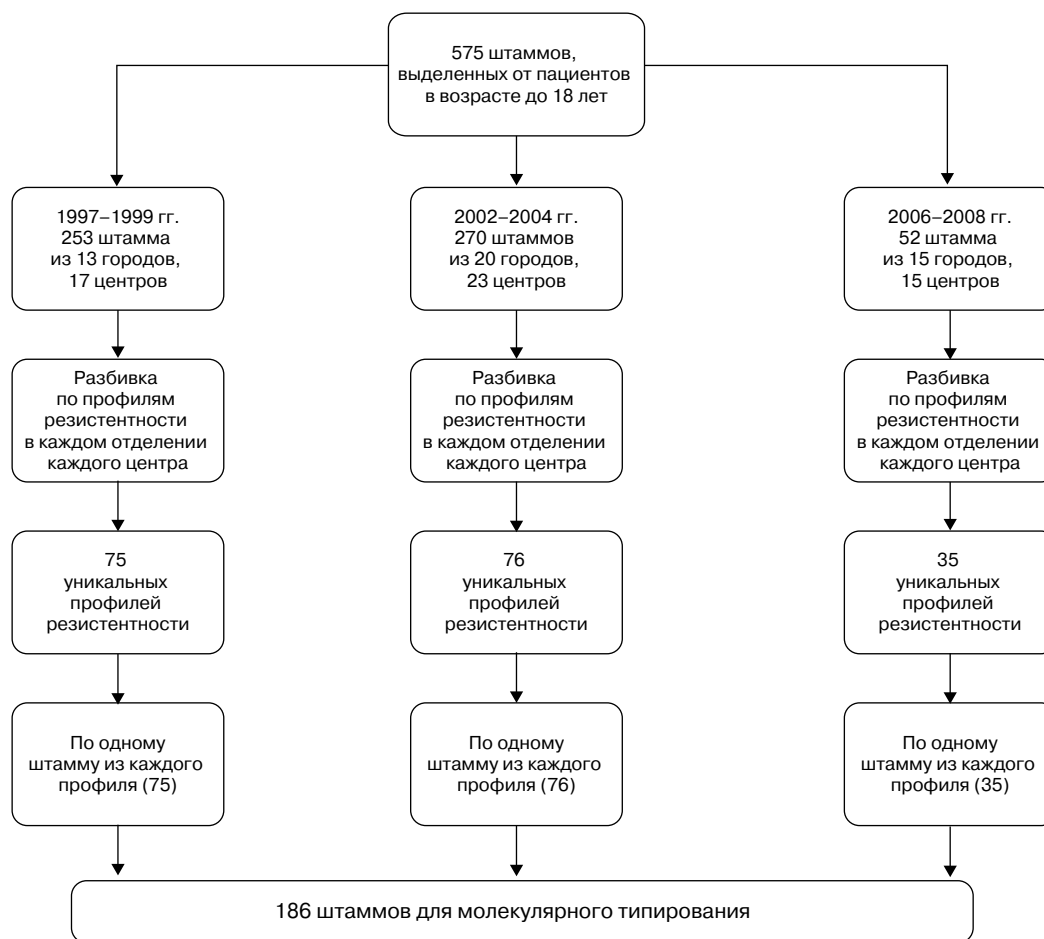


Рис. 1. Схема отбора изолятов нозокомиальных стафилококков для молекулярно типирования.

Таким образом, данных по молекулярной эпидемиологии *S. aureus* в РФ недостаточно. Полностью отсутствуют данные по молекулярным типам стафилококков, вызывающих заболевания у детей. Методы молекулярного типирования постоянно совершенствуются. Новые методы позволяют более объективно, быстро и с меньшими затратами установить молекулярные типы практически у всех поступивших изолятов. Очень перспективным выглядит применение метода MLVA (*мультилокусный анализ tandemных повторов с переменным числом звеньев*) для субвидового типирования стафилококков. В России исследований с применением данного метода не проводилось.

Цель настоящего исследования – установить молекулярные типы у *S. aureus*, вызывающих нозокомиальные и внебольничные инфекции у детей в различных регионах России.

Материал и методы

В исследование было включено 575 штаммов золотистого стафилококка (187 MRSA и 388

MSSA), выделенных от детей и подростков в ходе многоцентровых микробиологических исследований в 36 стационарах 24 городов РФ в 1997–2008 гг. Анализировался профиль резистентности к 6 антибиотикам: оксацилину, эритромицину, клиндамицину, гентамицину, ципрофлоксацину и ко-тримоксазолу. Для молекулярного типирования было отобрано 186 изолятов, имеющих уникальный профиль резистентности в пределах одного отделения каждого участвовавшего центра (рис 1).

Также в исследование были включены 16 внебольничных MRSA, собранных в ходе многоцентрового исследования в 2004–2006 гг. Такое небольшое количество обусловлено низким процентом метициллинорезистентных штаммов (менее 4% из более 600 штаммов).

Для субвидового типирования использовались следующие методы: MLVA, spa типирование (секвенирование гена стафилококкового протеина A), MLST (*мультилокусное секвенирование-типирование*) и определение типа стафилококковой хромосомной кассеты (SCC_{mec} типирование).

MLVA типирование штаммов осуществлено по 6 VNTR (*Variable Number Tandem Repeats*) локусам SIRU 01, SIRU 05, SIRU 07, SIRU 13, SIRU 15, SIRU 21, согласно методике, предложенной R. Ikawaty et al. [7]. Для увеличения производительности были сформированы 2 мультиплексные ПЦР по 3 локуса в каждой. Из расчета на минимальное перекрестное взаимодействие праймеров SIRU 01, SIRU 07 и SIRU 13 вошли в первый мультиплекс и соответственно SIRU 05, SIRU 15 и SIRU 21 – во второй мультиплекс. Один из праймеров каждой пары был помечен флуоресцентной меткой. Размер ПЦР продуктов определялся с помощью капиллярного электрофореза высокого разрешения с автоматической флуоресцентной детекцией. Данные MLVA анализировались в виде значений молекулярных масс ампликонов, ввиду встречаемости неполных повторов и изменчивости повторов в случае SIRU 21 [8]. Кластеризация выполнялась с помощью алгоритма минимальных дистанций по дискретным, приведенным к стандартным значениям молекулярных масс ампликонов.

Sra типирование выполнено в соответствии с общепринятыми рекомендациями, опубликованными на сайте www3.ridom.de [9].

SCCmec типирование проводилось по методике Po Liang Lu et al. (2008) [10].

Обработка данных осуществлена с помощью программного пакета BioNumerics v.6.5 (Applied Maths, Бельгия).

Результаты и обсуждение

На основании данных MLVA, метициллинчувствительные штаммы ($n=117$) кластеризовались на 80 типов, которые можно объединить в 10 генетических групп, отличающихся не более чем на 1 VNTR локус, в то время как MRSA ($n=85$) расположились в пределах одной обособленной группы (за исключением 3 изолятов), состоящей из 17 MLVA типов (рис. 2).

Sra типирование было выполнено для всех MRSA изолятов, для MSSA, имевших одинаковые MLVA профили с MRSA, а также MSSA, имевших MLVA профили, отличающиеся на один VNTR локус от MRSA (рис. 3). Распространенность sra-типов представлена в табл. 2.

По данным SCCmec типирования было выявлено только 2 типа кассет: SCCmec III ($n=36$) и SCCmec IV ($n=49$).

Для MLST типирования было отобрано по одному штамму MRSA из каждого MLVA профиля. По данным MLST, все протестированные штаммы, за исключением двух, относились к ST 239 и ST 8, принадлежащих к одному клональному комплексу CC8.

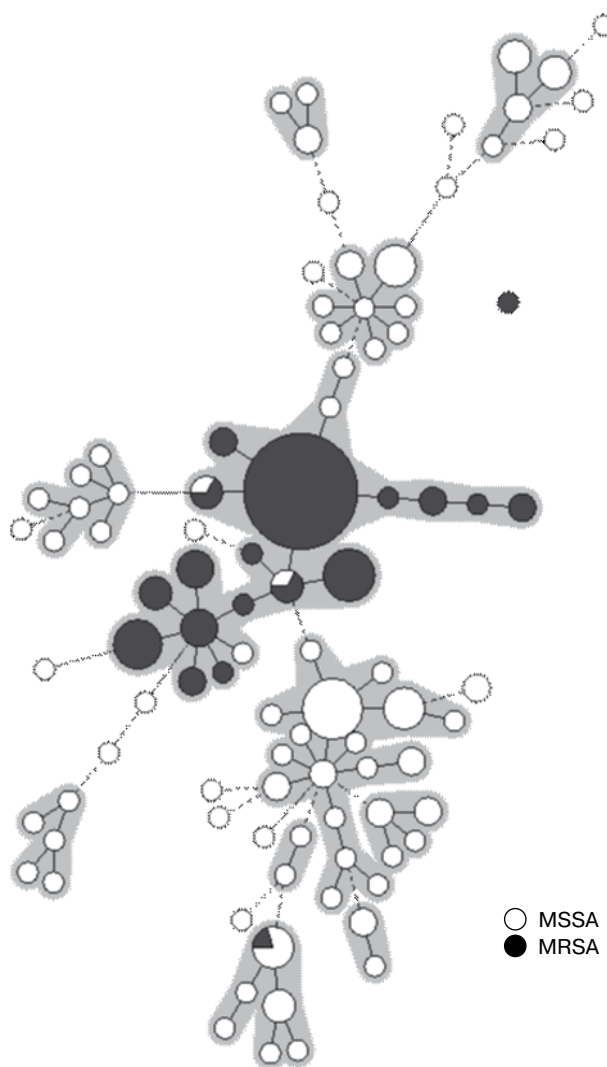


Рис. 2. Дендрограмма минимальных дистанций, построенная по данным MLVA типирования.

Один элемент – изоляты с одним MLVA типом, размер элемента пропорционален количеству изолятов с данным MLVA типом; короткая сплошная линия соответствует различию в 1 VNTR локус; прерывистая точками – в 2 VNTR локуса; прерывистая черточками – в 3 VNTR локуса; на сером фоне – группы изолятов, отличающиеся не более, чем на один VNTR локус.

В результате кластерного анализа данных MLVA получили типичную картину клональной популяционной структуры, т.е. ряд генетических линий, отличающихся внутри не более чем на 1 VNTR локус, но имеющих значительные отличия между собой (см. рис. 2). После добавления к дендрограмме данных sra типирования была обнаружена следующая корреляция между методами: все штаммы одного MLVA профиля всегда принадлежали одному sra типу, но один sra тип мог включать штаммы нескольких MLVA профилей.

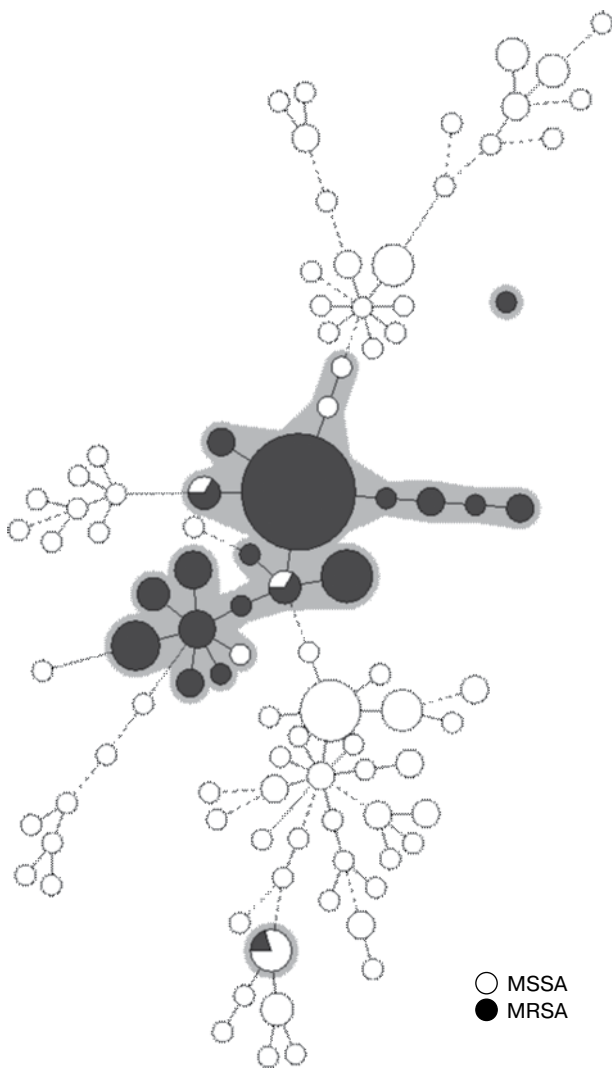


Рис. 3. Отбор штаммов для sra типирования: на сером фоне – группы штаммов, для которых выполнено sra типирование.

Родственные sra типы были также генетически сходны по данным MLVA типирования. Это подтверждает преимущество мультилокусного анализа перед однолокусным для изучения локальной эпидемиологии.

По сумме данных всех примененных методов были выявлены две доминирующие клональные

линии MRSA, представители которых выявлялись в географически удаленных центрах на территории всей России. К одной группе принадлежали изоляты молекулярного типа t008 SCCmec IV ($n=43$) и сходные с ним ($n=2$), к другой – t030 SCCmec III ($n=19$), t037 SCCmec III ($n=8$) и сходные с ними ($n=11$). Первые относились к ST8 по данным MLST, а вторые – к ST 239 (рис. 4).

В целом это согласуется с данными ранее проведенных исследований (см. табл. 1). На основе данных литературы, а также на основании прямого сравнения наших данных с международными базами данных spa server и mlst.net мы можем утверждать, что генетическая линия, имеющая sra типы t030 и t037, SCCmec III типа и относящаяся к ST 239, является бразильско-венгерским клоном (EMRSA-1), а t008 SCCmec IV ST 8 является клоном EMRSA-2/6 [11]. Единичные изоляты, имеющие отличающиеся sra и MLVA типы от классических клонов, но, тем не менее, очень близкие к ним, возможно, возникли путем быстрой эволюции VNTR локусов и также являются представителями данных клонов.

При просмотре дендрограммы, построенной на основании только данных MLVA (см. рис. 2), нельзя не заметить, что есть метициллиночувствительные изоляты, имеющие одинаковые или близкие (отличие в 1 VNTR локус) MLVA профили с метициллинорезистентными. После проведения sra типирования было установлено, что они также имеют и одинаковые sra типы. Данные результаты наглядно показывают мобильность SCCmec и, возможно, указывают на наличие метициллиночувствительного предка.

Наибольший интерес вызывает то, что внебольничные MRSA имели такие же MLVA, sra и SCCmec типы, что и внутрибольничные: t008 SCCmec IV ($n=9$), t037 SCCmec III ($n=4$) и t030 SCCmec III ($n=3$). Это позволяет предположить, что на территории России фактически нет значительного разделения на внутри- и внебольничные штаммы MRSA, а имеет место циркуляция одних и тех же клональных линий между стационарами и внебольничной средой (рис. 5). Для уточнения необходимо исследовать большее количество вне-

Таблица 2. Распространенность различных sra типов среди исследованных изолятов

Sra тип	t008	t037	t030	t127	t129	t024	t363	t3308	t118	t064	t078	t539	t425	t233	t306	t435	t667	t7576
MRSA	43	19	8	1	4	2	2		2				1	1			1	1
MSSA	1			4		1		2		1	1	1			1	1		

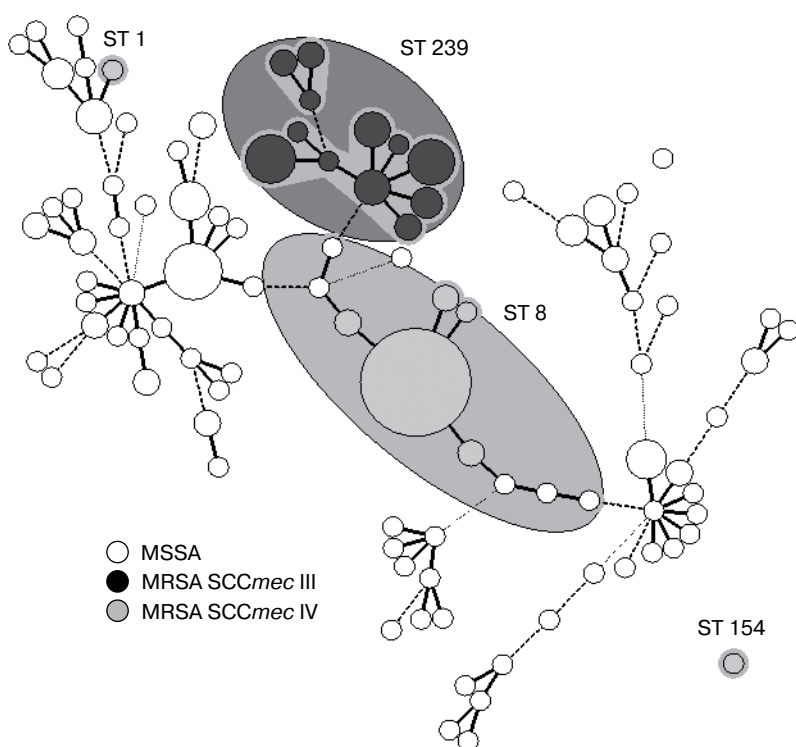


Рис. 4. Дендрограмма минимальных дистанций, построенная на основе композитного набора данных (6 VNTR локусов и тип *SCCmec* кассеты). На сером фоне – доминирующие клональные линии золотистого стафилококка в детских стационарах России.

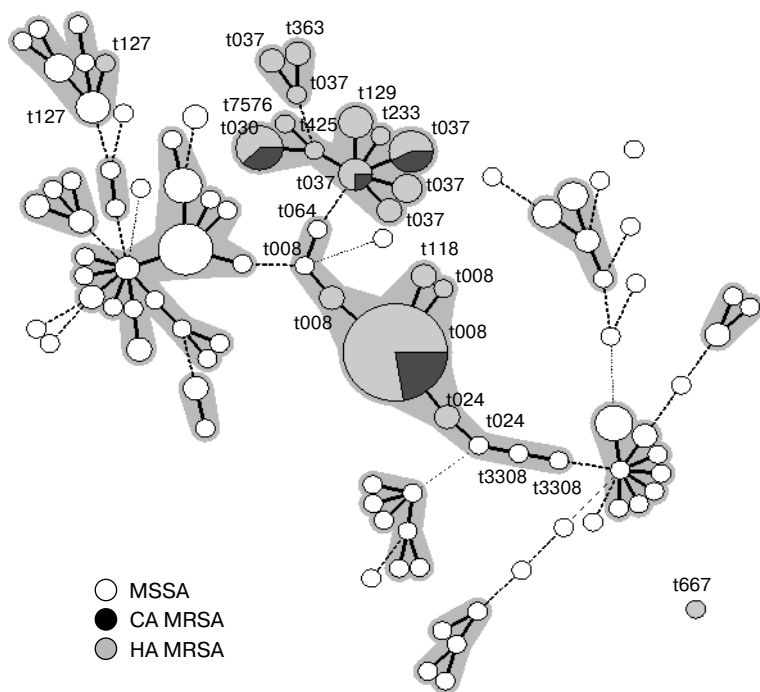


Рис. 5. Дендрограмма минимальных дистанций, построенная на основе композитного набора данных (6 VNTR локусов и тип *SCCmec* кассеты). Отдельно выделены внутри- и внебольничные MRSA, имеющие одинаковые MLVA профили и типы *SCCmec* кассет (занимают одни и те же кружки дендрограммы), следовательно являются генетически идентичными.

больничных MRSA. В нашем случае в ходе проекта собрано более 600 штаммов внебольничных стафилококков, но частота MRSA оказалась менее 4%.

Неоспоримым является факт, что стафилококки, выделяемые на территории России, принадлежат к международным эпидемическим клонам. Наиболее эволюционно успешным является клон ST-8, сра тип t008, который распространен во всем мире. Широко распространены как внутрибольничные, так и внебольничные клоны данной генетической линии, встречаются как метициллинчувствительные, так и метициллинрезистентные штаммы. К этой генетической линии относятся известный внебольничный клон USA-300, который отличается от внутрибольничных продукцией PVL, и внутрибольничный, такой как UK EMRSA-2/6. Данный клон широко распространен на территории России, начиная с 1997 года и на протяжении всего периода сбора штаммов. Как уже упоминалось, штаммы с близкими MLVA профилями и родственными сра типами (по данным BioNumerics spa typing plugin), по-видимому, тоже являются представителями данного клона, в то время как в некоторых публикациях они рассматриваются как самостоятельные клоны.

В нашем исследовании были обнаружены следующие близкородственные варианты этого клона: t024, t064, t3308 и t118, все они обладают IV типом *SCCmec* кассеты и принадлежат к ST8. Схожесть этих сра типов показана в табл. 3. По данным MLVA, они также отличаются не более, чем на 1 VNTR локус. Так как оба этих результата основаны на анализе переменных повторяющихся повторов, которые быстро эволюционируют, можно предположить, что это – тоже варианты клона ST8-t008-*SCCmec* IV.

Международный эпидемический клон ST239 *SCCmec* III в детских стационарах России, по нашим дан-

Таблица 3. **Сра типы, родственные t008 и последовательность повторов в них**

Сра-тип	Последовательность повторов
t008	11-19-12-21-----17-34-24-34-22-25
t3308	11-19-12-21-21-17-34-24-34-22-25
t024	11-----12-21-----17-34-24-34-22-25
t064	11-19-12-05-----17-34-24-34-22-25
t118	11-----25

ным, представлен сра типами t037, t030, которые являются основными, и некоторыми близкородственными, такими как t129, t363, t425, t233 и t7576, который был описан впервые (табл. 4).

Данный клон, который, по-видимому, является бразильско-венгерским, также широко распространен на протяжении всего периода наблюдения. К сожалению, количественных выводов о преобладании того или иного клона, из нашей работы сделать нельзя, так как проекты, в ходе которых собирались штаммы, отличались по дизайну, и способ отбора штаммов для молекулярного типирования не подходит для статистической обработки. Сводные данные по полученным молекулярным типам MRSA представлены в табл. 5.

Заключение

В настоящее время продолжают выявляться новые типы SCCmec кассет, что говорит о про-

Таблица 4. **Сра типы, родственные t037 и последовательность повторов в них**

Сра-тип	Последовательность повторов
t037	15-12-16-02-25-17-24
t425	15-12-16-02-25-17-25
t363	15-----16-02-25-17-24
t030	15-12-16-02-----24-24
t129	15-12-----24
t7576	15-12-16-----34-24
t233	15-12

должающейся эволюции этого элемента резистентности. В этих условиях первостепенное значение приобретает изучение эпидемиологической обстановки и контроль за распространением значимых клонов MRSA. Методы субвидового типирования в последние десятилетия шагнули далеко вперед и способны быстро получить объективную информацию, которой легко можно обмениваться с помощью современных систем коммуникации, а также создавать базы данных молекулярных типов. В сложившихся условиях крайне желательно мониторить не только антибиотикорезистентность, но и молекулярные типы возбудителей в каждом стационаре. В случае невозможности выполнения типирования на месте, можно пользоваться услугами крупных референтных центров.

Таблица 5. **Сводные данные по молекулярным типам MRSA, выделенных у детей и подростков в России на протяжении периода с 1997 по 2008 гг.**

ST тип	сра тип	SCCmec тип	Число изолятов
8	t008	IV	43
	t024	IV	2
	t118	IV	2
239	t037	III	19
	t030	III	8
	t129	III	4
	t363	III	2
	t425	III	1
	t7576	III	1
	t233	III	1
1	t127	IV	1
154	t667	IV	1

Литература

1. Bischoff W.E., Edmond M.B. *Staphylococcus aureus*. A Guide to Infection Control in the Hospital 2002.
2. Ito T., Katayama Y., Hiramatsu K. Cloning and nucleotide sequence determination of the entire *mec* DNA of pre-methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* N315. *Antimicrob Agents Chemother* 1999; 43(6):1449-58.
3. Feil E.J., Enright M.C. Analyses of clonality and the evolution of bacterial pathogens. *Curr Opin Microbiol* 2004; 7(3):308-13.
4. Дмитренко О.А. Молекулярно-генетические аспекты эпидемиологии внутрибольничных инфекций, вызванных представителями вида *Staphylococcus aureus*, устойчивыми к метициллину/оксациллину. Дисс доктора мед наук 2008.
5. Vorobieva V., Bazhukova T., Hanssen A.M., et al. Clinical isolates of *Staphylococcus aureus* from the Arkhangelsk region, Russia: antimicrobial susceptibility, molecular epidemiology, and distribution of Panton-Valentine leukocidin genes. *APMIS* 2008; 116(10):877-87.
6. Хохлова О.Е., Вей-Чун Хунг, Хигучи В. и др. Выявление венгерского пандемического клона MRSA в России. *Клин микроб антимикроб химиотер* 2011; 13(2):101-200.
7. Ikawaty R., Willems R.J., Box A.T., Verhoef J., Fluit A.C. Novel multiple-locus variable-number tandem-repeat analysis method for rapid molecular typing of human *Staphylococcus aureus*. *J Clin Microbiol* 2008; 46(9):3147-51.
8. Hardy K.J., Ussery D.W., Oppenheim B.A., Hawkey P.M. Distribution and characterization of staphylococcal interspersed repeat units (SIRUs) and potential use for strain differentiation. *Microbiology* 2004; 150(Pt 12):4045-52.
9. DNA Sequencing of the *spa* Gene (1.1). http://www.ridom.de/doc/Ridom_spa_sequencing.pdf.
10. Lu P.L., Chang J.C., Hsu H.T., et al. One tube multiplex PCR for simple screening of SCCmec I-V types of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J Chemother* 2008; 20(6):690-6.
11. Deurenberg R.H., Stobberingh E.E. The molecular evolution of hospital- and community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Curr Mol Med* 2009; 9(2):100-15.