

# Алгоритм идентификации атипичных форм стафилококков (SSCVs) — возбудителей хронических гнойно-воспалительных процессов у людей

Л. Н. ЧУРКИНА<sup>1</sup>, С. И. БИДНЕНКО<sup>2</sup>, МАРИО ВАНЕЧУТТЕ<sup>3</sup>, Л. В. АВДЕЕВА<sup>1</sup>,  
А. С. МАКУШЕНКО<sup>4</sup>, О. Б. ЛЮТКО<sup>2</sup>, Н. М. ОЗЕРЯНСКАЯ<sup>2</sup>, Н. Б. ПЕРУНОВА<sup>5</sup>

<sup>1</sup> Институт микробиологии и вирусологии НАН Украины, Киев

<sup>2</sup> Институт ортопедии и травматологии АМН Украины, Киев

<sup>3</sup> Гентский университет, Бельгия

<sup>4</sup> Институт эпидемиологии и инфекционных болезней АМН Украины, Киев

<sup>5</sup> Институт клеточного и внутриклеточного симбиоза УрО РАН, Оренбург, Российская Федерация

## Algorithm of Identification of Atypical Variants of Staphylococci, Pathogens of Chronic Pyo-Inflammatory Processes in Humans

L. N. CHURKINA, S. I. BIDNENKO, M. VANEECHOUTTE, L. V. AVDEEVA,  
A. S. MAKUSHENKO, O. B. LUTKO, N. M. OSERJANSKAJA, N. B. PERUNOVA

Institute of Microbiology and Virology, National Academy of Sciences of the Ukraine, Kiev

Institute of Traumatology and Orthopedics, Medical Academy of Sciences of the Ukraine, Kiev

Gent University, Gent, Belgium

Institute of Epidemiology and Infectious Diseases, Medical Academy of Sciences of the Ukraine, Kiev

Institute of Cellular and Intracellular Symbiosis, Urals Branch of Russian Academy of Sciences, Orenburg, Russian Federation

Стафилококки — возбудители таких хронических рецидивирующих инфекций, как кистозный фиброз лёгких и остеомиелит, характеризуются атипичной морфологией колоний (атипичные формы стафилококков) и представляют собой субпопуляцию в клинически важных стафилококках. В связи с утратой в процессе мутаций ряда важных для рода *Staphylococcus* фенотипических характеристик идентификация этих вариантов стафилококков усложнена, а иногда невозможна. Разработан алгоритм идентификации атипичных форм SCVs *S. aureus*, показаны преимущества молекулярных методов, в частности tRNA — PCR анализа, а также использования диагностического препарата Диастаф для корректной идентификации атипичных форм стафилококков.

**Ключевые слова:** атипичные формы стафилококков (SSCVs), идентификация, Диастаф.

Staphylococcal pathogens of chronic relapsing infections, such as cystic pneumosclerosis and osteomyelitis are characterized by atypical morphology of the colonies (atypical variants of staphylococci) and present a subpopulation in clinically significant staphylococci. Since the loss of some phenotypic characteristics important for the genus *Staphylococcus* due to mutations, identification of such staphylococcal variants is difficult and sometimes impossible. An algorithm of identification of atypical variants of *S. aureus* (SSCVs) was developed. The advantages of the molecular methods and in particular the tRNA-PCR analysis, as well as the use of the diagnostic preparation Diastaph for correct identification of *Staphylococcus* atypical variants were shown.

**Key words:** atypical variants of staphylococci (SSCVs), identification, algorithm, Diastaph.

## Введение

Инфекции, вызванные *Staphylococcus aureus*, обычно носят острый характер, это эндокардиты, пневмонии, сепсисы [1–3]. Однако существуют стафилококки, которые могут вызывать и хронические рецидивирующие инфекции, такие как остеомиелит, кистозный фиброз лёгких [4, 5], парапроктитную инфекцию [6]. Возбудителями таких инфекций являются атипичные формы *S. aureus* — small colony variants (SSCVs). Атипичные формы стафилококков могут быть изолированы непосред-

ственно с места локализации инфекционного процесса, или представлять субпопуляцию в клинических штаммах. Эти варианты медленно растут, в результате чего формируются очень маленькие непигментированные, негемолитические колонии. SCVs имеют и другие атипичные характеристики, которые не свойственны метаболически нормальным стафилококкам [7, 8]. Поэтому их легко можно пропустить, или не идентифицировать общепринятыми в клинических лабораториях методами.

Цель исследования — выявление SCVs в первичных культурах *S. aureus*, выделенных от больных хроническим остеомиелитом, изучение их физиолого-биохимических особенностей и разработка алгоритма их идентификации.

© Коллектив авторов, 2013

Адрес для корреспонденции:

E-mail: Churkina@imv.kiev.ua

Некоторые биохимические характеристики атипичных форм стафилококков (SCVs)

Характеристики	Штаммы SCVs																			
	<i>S. aureus</i> 238	<i>S. aureus</i> 302	<i>S. aureus</i> 302	<i>S. aureus</i> 322	<i>S. aureus</i> 338	<i>S. aureus</i> 338	<i>S. aureus</i> 339	<i>S. aureus</i> 340	<i>S. aureus</i> 364	<i>S. aureus</i> 384	<i>S. aureus</i> 385	<i>S. aureus</i> 784	<i>S. aureus</i> 810	<i>S. aureus</i> 830	<i>S. aureus</i> 851	<i>S. aureus</i> 900	<i>S. aureus</i> 936			
Диаметр колоний (мм)	<5	<5	<5	<5	<5	<5	<5	<5	<5	<5	<5	<5	<5	<5	<5	<5	<5			
Пигментация колоний	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+			
Аэробный рост	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+			
Каталаза	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+			
Оксидаза	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+			
Сахароза	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+			
Мальтоза	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+			
D-манит	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+			
D-манноза	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+			
D-трегалоза	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+			
α-лактоза	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+			
D-фруктоза	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+			
D-глюкоза	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+			
Восстановление нитрата	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+			
Фосфатаза	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+			
Уреаза	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+			
Коагулаза (кроличья плазма)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+			
Лецитиназа	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+			
Гемолиз	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+			

## Материал и методы

Биопсия костной и мышечной ткани у пациентов с остеомиелитом в Институте ортопедии и травматологии АМН Украины, г. Киев, была проведена как часть стандартного медицинского обследования, что было одобрено Комитетом по этике Института ортопедии и травматологии АМН Украины (Протокол №2 от 6 декабря 2011).

Кусочки костной и мышечной ткани культивировали на Columbia агаре с 5% отмытых овечьих эритроцитов. SSCVs (20 изолятов) были выявлены в популяции родительских штаммов как медленно растущие точечные колонии ((0,1–0,3 мм) после 24–48 ч инкубации при 37°C среди большого числа колоний с нормальной для *Staphylococcus* морфологией, рассматриваемых как родительские колонии.

Морфологию колоний и пигментацию исследовали методом W. E. Kloos et al. [9], образование кислот из углеводов и ферментативные активности (фосфатазная, уреазная, нитрат-редуктазная) были изучены с помощью API-Staph galleries (API System, Biomerieux, Франция), ферментация глюкозы была изучена с использованием метода R. Hugh и E. Leifson [10], каталазная активность была определена инокуляцией небольшого количества исследуемой культуры в капле 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Оксидазная активность была изучена по методу A. Faller и K. H. Schleifer [11]; коагулазная активность определялась по методу W. H. Sperber и S. R. Tatini [12]; определение лецитиназной активности проводили в соответствии с рекомендациями А. К. Акатова и В. С. Зуевой [13]; гемолитическая активность определялась на агаре с 5% отмытых кроличьих эритроцитов.

Для оценки аутокотрофности изоляты высевали на агар Мюллера–Хинтона с 2 мкг/диск и 10 мкг/диск гемина и менадиона соответственно [14].

Генотипическую идентификацию осуществляли методом tRNA-PCR анализа [15, 16].

## Результаты и обсуждение

Идентификация изолятов с нормальной морфологией колоний, выделенных из образцов тканей, показала их принадлежность к *S. aureus* (штаммы 238, 302, 322, 338, 339, 340, 364, 384, 385, 784, 810, 826, 830, 851, 887, 900, 909, 916, 920, 936). Пигментация родительских колоний *S. aureus* была типично желтой. Все 20 выделенных из них SSCVs вырастали в виде беспигментных, нередко каталазоотрицательных колоний а также демонстрировали ряд других характеристик, не свойственных метаболически нормальным стафилококкам: у них отсутствовала лецитиназная (за исключением штаммов *S. aureus* 338, 385, 810, 830), фосфатазная (кроме штаммов 302, 340, 784, 936) и гемолитическая активности. У SCVs *S. aureus* 302, 874, 900, 936 коагулазная активность была выражена слабо (таблица).

Несмотря на то, что коагулазный тест рассматривается как золотой стандарт при идентификации *S. aureus* [17], проведенные исследования показывают, что он является ненадежным при идентификации SSCVs, что является проблемой для лабо-

раторий, не имеющих возможности провести ДНК исследования. Кроме того, у изученных SSCVs стафилококков изменена модель потребления таких углеводов, как сахароза, лактоза, фруктоза (см. таблицу), что согласуется с данными литературы [7].

Выделение и идентификация атипичных форм осложняется ещё тем, что они являются ауксотрофами по гемину, аминокислотам, жирным кислотам. На богатых средах, содержащих в необходимых количествах эти компоненты, SSCVs достаточно быстро реверсируют в свое исходное состояние [8, 18]. Из изученных нами на ауксотрофность 15 штаммов 70% были ауксотрофами по гемину, 26% — по менадиону и 4% по тимидину. Следует отметить, что гемин и менадион вовлечены в формирование электронно-транспортной цепи в клетках атипичных стафилококков [7, 17].

Итак, все изученные SSCVs штаммы теряли ряд типичных для данного рода и вида свойств и характеризовались изменённой морфологией колоний, замедленным ростом, отсутствием пигментации, плазмокоагуляционной и лецитиназной активности, а также изменённой формой утилизации углеводов. Эти фенотипические характеристики микроорганизмов усложняют и во многих случаях делают невозможной их идентификацию общепринятыми в клинических лабораториях методами. Поэтому разработка алгоритма идентификации атипичных форм является важной задачей.

Алгоритм выделения и идентификации атипичных форм стафилококков имеет существенные особенности по сравнению с исследованием метаболически нормальных представителей этого рода (рис. 1).

Для выявления атипичных форм проводили высев клинического материала на Columbia agar с 5% отмытых овечьих эритроцитов и инкубировали от 24 до 72 ч. При этом SSCVs вырастали как субпопуляция в популяции родительских штаммов в виде очень маленьких непигментированных, негемолитических колоний. Микроскопически это были грамположительные полиморфные кокки, некоторые — каталазоположительные. На первом этапе диагностики это единственный критерий, ориентируясь на который можно допустить принадлежность бактерий к стафилококкам.

Если у бактериологов нет возможности провести ДНК исследования, а этот метод имеет преимущества перед фенотипическими методами идентификации в случае атипичных форм стафилококков, следует обратить внимание на способность SSCVs к реверсии и провести пассажи на 5% кровяном и триптозном агаре соответственно для ауксотрофов по гемину и менадиону. Через 2—3 пассажа на чаш-

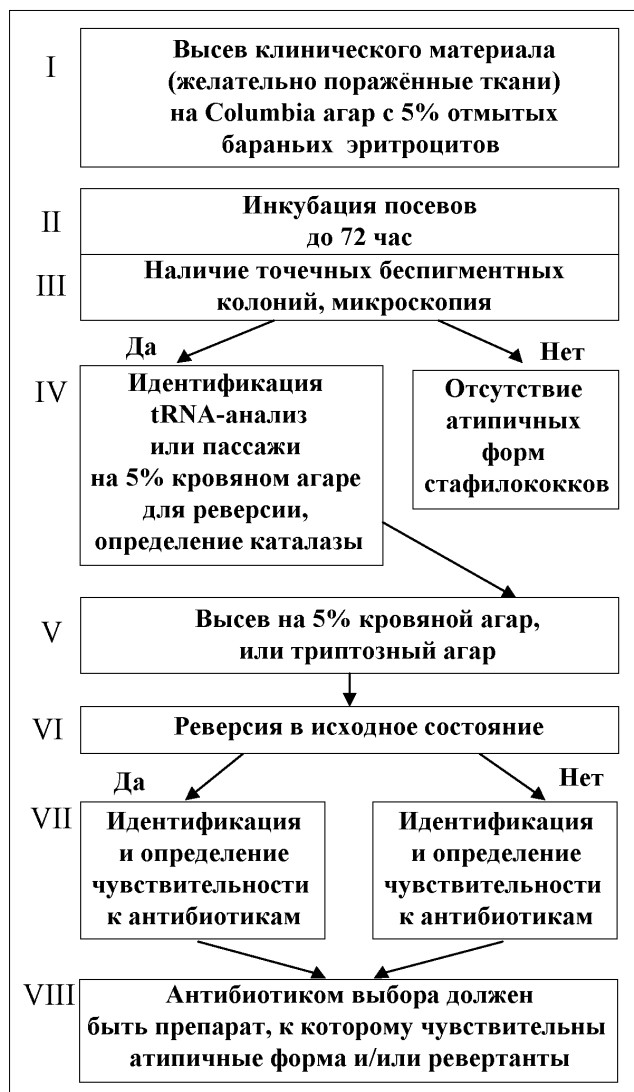
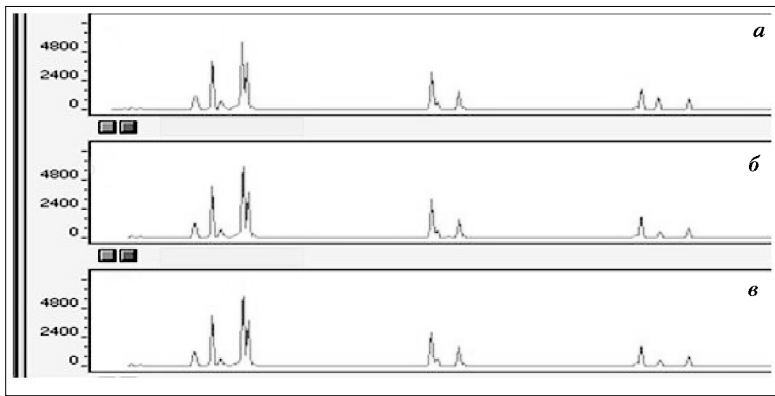


Рис. 1. Алгоритм идентификации атипичных форм стафилококков.

ках вырастают ревертанты, что и позволяет отнести выросшую субпопуляцию к SSCVs. По нашим данным, 90% SSCVs способны к реверсии. Затем проводится идентификация ревертантов общепринятыми для стафилококков методами и тестирование на чувствительность к антибиотикам (рис. 1).

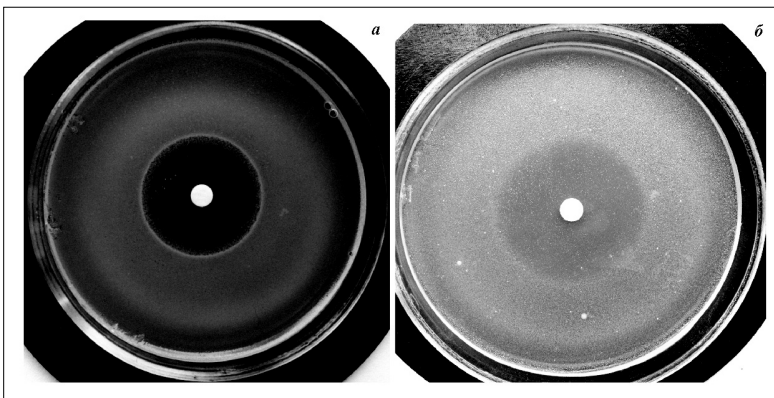
Идентификация атипичных форм стафилококков может также быть осуществлена с помощью генотипических методов. На рис. 2. представлены результаты идентификации SCVs штаммов *S.aureus* с использованием tRNA — анализа полиморфизма длины нуклеотидных последовательностей. Все исследуемые штаммы были идентифицированы как *S.aureus*. Однако, по данным W. J. Looney [17], даже методы молекулярной идентификации не всегда позволяют корректно идентифицировать эти микроорганизмы.

Полученные результаты свидетельствуют о том, что для атипичных форм стафилококков оп-



**Рис. 2. Результаты анализа tRNA-PCR отпечатков (размеры фрагментов от 50 до 100 т. п. н.) 3 штаммов SCVs *S.aureus*.**

Подписи: отпечатки сопоставлены; X – длина амплифицированного tRNA межгенной области; Y – интенсивность амплифицированных фрагментов в флуоресцентных единицах: а – SCVs *S.aureus* 238; б – SCVs *S.aureus* 810; в – SCVs *S.aureus* 900.



**Рис. 3. Идентификация метаболически нормального стафилококка и атипичных форм *S.aureus* (SCVs) с помощью препарата Диастаф.**

а – *S.aureus* 238 SA-SCVs 238 (зона задержки роста вокруг диска 30 мм); б – SA-SCVs 238 (зона задержки роста вокруг диска 35 мм).

тимальным подходом к идентификации является полифазный анализ.

Проведённые нами ранее исследования показали, что препарат «Диастаф» (бумажные диски, содержащие 5 мкг на диск антибиотика батумина) обеспечивает быструю и надёжную идентификацию микроорганизмов рода *Staphylococcus* с нормальной морфологией колоний. Было показано, что зоны задержки роста для *S.aureus*, *S.epidermidis*, *S.saprophyticus* и ряда других *Staphylococcus* spp. были 17–29 мм, тогда как все другие грамположительные микроорганизмы: *Demacoccus* spp. (5 изолятов), *Enterococcus faecalis* (84), *Kocuria* spp. (17), *Kytococcus* spp. (3), *Micrococcus* spp. (84), *Planococcus* spp. (1), *Streptococcus pyogenes* (36) и *Streptococcus viridans* (30) не образовывали зон задержки роста. Исключение составляли 10 изолятов

*Corynebacterium xerosis*, которые дали зону задержки роста диаметром 10 мм [19].

Представлялось интересным расширить знания о возможности применения препарата Диастаф для идентификации SSCVs. Присутствие зоны задержки роста вокруг диска с батумином от 17 и более мм говорит о том, что исследуемый изолят относится к роду *Staphylococcus* (рис. 3). Все 20 SSCVs дали зоны задержки роста вокруг диска с батумином диаметром 25 мм и более, что свидетельствует о том, что изученные штаммы принадлежат к роду *Staphylococcus*.

Надёжность идентификации SSCVs с помощью препарата «Диастаф» была подтверждена методом молекулярной идентификации с использованием tRNA-анализа полиморфизма длины нуклеотидных последовательностей.

Диски, пропитанные батумином надёжно идентифицировали SCVs *S.aureus*, хотя последние существенно отличались от родительских штаммов и трудно поддавались идентификации стандартными методами. Идентификация SSCVs с помощью дисков, пропитанных батумином, технически проста и может облегчить работу практических врачей.

## Заключение

Все изученные SCVs *S.aureus* по своим физиолого-биохимическим характеристикам существенно отличались от родительских штаммов и не соответствовали описанию рода *Staphylococcus*. Изоляты характеризовались изменённой морфологией колоний, замедленным ростом, отсутствием пигментации, плазмокоагулазной и лецитиназной активности, а также изменённой формой утилизации углеводов, поэтому их идентификация общепринятыми в клинических лабораториях методами затруднена, а во многих случаях невозможна.

Нами разработан алгоритм идентификации этого патогена, показаны преимущества молекулярных методов, в частности tRNA-PCR анализа, а также препарата «Диастаф». Диагностический препарат надёжно идентифицирует SCVs, которые принадлежат к роду *Staphylococcus*, о чём свидетельствуют зоны задержки роста культуры вокруг диска, пропитанного батумином, диаметром  $\geq 25$  мм.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Wei H.H., Wu K.G., Sy L.B., Chen C.J., Tang R.B. Infectious endocarditis in pediatric patients: analysis of 19 cases presenting at a medical center. *J Microbiol Immunol Infect* 2010; 43: 430–437.
2. Meyer E., Schwab F., Gastmeier P. Nosocomial methicillin resistant *Staphylococcus aureus* pneumonia — epidemiology and trends based on data of a network of 586 German ICUs (2005–2009). *Eur J Med Res* 2010; 15: 514–524.
3. van Hal S.J., Jensen S.O., Vaska V.L. et al. Predictors of mortality in *Staphylococcus aureus* bacteremia. *Clin Microbiol Rev* 2012; 25: 2: 362–386.
4. von Eiff C., Bettin D., Proctor R.A., Rolauffs B., Lindner N., Winkelmann W., Peters G. Recovery of small colony variants of *Staphylococcus aureus* following gentamicin bead placement for osteomyelitis. *Clin Infect Dis* 1997; 25: 1250–1251.
5. Kahl R., Herrmann M., Schulze Everding A., Koch H.G., Becker K., Harms E., Proctor R.A., Peters G. Persistent infection with small colony variants strains of *Staphylococcus aureus* in patients with cystic fibrosis. *J Infect Dis* 1998; 177: 1023–1029.
6. Бідненко С.І., Лютко О. Б., Озерянська Н. М., Чуркіна Л. М. Мікрофлора навколопротезних тканин за асептичної нестабільності ендопротезу кульшового суглоба та особливості її чутливості до антибіотиків. *Biomed Biosocial Anthropol* 2010; 15: 87–91.
7. McNamara P.J., Proctor R.A. *Staphylococcus aureus* small colony variants, electron transport and persistent infections. *Int J Antimicrob Agents* 2000; 14: 117–122.
8. Чуркіна Л.Н., Бідненко С.И., Марио Ванечутте и др. Характеристики атипичных форм стафилококков (SCVs), выделенных от больных остеомиелитом. *Антибиотики и химиотерапия* 2010; 55: 5–6: 36–40.
9. Kloos W.E., Schleifer K.H. *Genus I.V. Staphylococcus*. In: *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Volume 2 / Ed. Sneath P.H.A., Mair N.S., Sharpe M.E., Holt J.G. Baltimore, Williams & Wilkins; 1986; 1013–1035.
10. Hugh R., Leifson E. The taxonomic significance of fermentative versus oxidative Gram-negative bacteria. *J Bacteriol* 1953; 66: 24–26.
11. Faller A., Schleifer K.H. Modified oxidase and benzidine tests for separation of staphylococci. *J Clin Microbiol* 1981; 13: 1031–1035.
12. Sperber W.H., Tatini S.R. Interpretation of the tube coagulase test for identification of *Staphylococcus aureus*. *Appl Microbiol* 1975; 29: 502–505.
13. Акамов А. К., Зуева В. С. Стафилококки. Изд-во «Медицина», М.: 1983.
14. Proctor R.A., van Langevelde P., Kristjansson M. et al. Persistent and relapsing infections associated with small-colony variants of *Staphylococcus aureus*. *Clin Infect Dis* 1995; 20: 95–102.
15. Vanechoutte M., Boerlin P., Tichy H.-V. et al. Comparison of PCR-based DNA fingerprinting techniques for the identification of *Listeria* species and their use for atypical *Listeria* isolates. *Int J Syst Bacteriol* 1998; 48: 127–139.
16. Supre K., De Vlieghe S., Sampimon O.C., Zadoks R.N., Vanechoutte M., Baele M., De Graef E., Piepers S., Haesebrouck F. Use of tRNA-intergenic spacer PCR combined with capillary electrophoresis to identify coagulase-negative *Staphylococcus* species originating from bovine milk and teat apices. *J Dairy Sci* 2009; 92: 3204–3210.
17. Looney W.J. Small colony variants of *Staphylococcus aureus*. *Br J Biomed Sci* 2000; 57: 317–322.
18. Baumert N., von Eiff C., Schaaff F. et al. Physiology and antibiotic susceptibility of *Staphylococcus aureus* small colony variants. *Microb Drug Resist* 2002; 1: 253–260.
19. Churkina L., Kiprianova E., Bidnenko S. et al. Antibiotic batumin for diagnostics of staphylococci and treatment of *Staphylococcus aureus* nasal carriage. *Врачебное дело* 2009; 1–2: 55–61.