

Микробиологическая и молекулярно-генетическая характеристика коагулазонегативных стафилококков, выделенных у новорождённых отделения реанимации и интенсивной терапии

Л. А. ЛЮБАСОВСКАЯ¹, М. А. КОРНИЕНКО², Т. В. ПРИПУТНЕВИЧ¹, Е. Н. ИЛЫНА², А. И. ЩЕГОЛЕВ¹

¹ ФГБУ Научный центр акушерства, гинекологии и перинатологии им. В. И. Кулакова Минздрава РФ, Москва

² ФГБУНИИ физико-химической медицины ФМБА, Москва

Microbiological and Molecular Genetic Characteristics of Coagulase-Negative Staphylococcal Isolates from Neonates in Intensive Care Unit

L. A. LUBASOVSKAYA, M. A. KORNIENKO, T. V. PRIPUTNEVICH, E. N. ILYINA, A. I. SHCHEGOLEV

V. I. Kulakov Scientific Centre of Obstetrics, Gynecology and Perinatology, Moscow

Research Institute of Physico-Chemical Medicine, Moscow

В отделениях реанимации новорождённых всего мира проблема госпитальных инфекций, вызываемых коагулазонегативными стафилококками (CoNS), стоит на первом месте в течении последних 20 лет. Новорождённые с очень низкой и экстремально низкой массой тела при рождении являются особой группой риска по CoNS-инфекциям. Однако в России CoNS до сих пор часто воспринимают как контаминанты, а не как главные этиологические агенты пневмонии и сепсиса у глубоко недоношенных новорождённых. В данной работе показано, что в ОРИТ постоянно циркулируют госпитальные штаммы CoNS, способные вызывать фатальные инфекции у глубоко недоношенных новорождённых.

Ключевые слова: ОРИТ новорождённых, инфекции, коагулазонегативные стафилококки, факторы патогенности, клональность.

The problem of hospital-acquired infections due to coagulase-negative staphylococci (CoNS) in neonatal intensive care units is crucial over the last 20 years in the world. Neonates with very low or extremely low body weight belong to a special group of risks by the CoNS infection. However, in Russia CoNS up to now are frequently considered as contaminants and not as the main etiologic factors of pneumonia and sepsis in extremely premature infants. It was shown that hospital strains of CoNS causing fatal infections in extremely premature infants are always present in intensive care units.

Key words: neonatal intensive care units, infections, coagulase-negative staphylococci, pathogenicity factors, clonality.

С середины 80-х годов, коагулазонегативные стафилококки (*CoNS*) стали рассматриваться как группа этиологических агентов госпитальных инфекций в отделениях реанимации и интенсивной терапии (ОРИТ) новорождённых. Однако их видовой состав, антибиотикорезистентность, генетические и фенотипические характеристики до сих пор недостаточно изучены.

Поскольку глубоко недоношенные дети чаще подвергаются воздействию инвазивных процедур (интубация трахеи, катетеризация центральных вен, инфузия липидных растворов), вероятность заразиться внутрибольничной инфекцией у них

больше, чем у доношенных детей [1, 2]. Основными нозологическими формами *CoNS*-инфекций, как правило, являются пневмония и катетер-ассоциированный сепсис [1, 2], а по данным некоторых исследователей, менингит, причем иногда без клеточных или химических изменений в спинно-мозговой жидкости [3]. В единичных публикациях описаны случаи некротизирующего энтероколита [4], остеомиелита [29] и септического артрита, вызванного *CoNS* у новорождённых с очень низкой и экстремально низкой массой тела (ОНМТ и ЭНМТ) при отсутствии центрального венозного катетера (ЦВК) [5].

Абсолютное большинство госпитальных *CoNS* представлены метициллинорезистентными штаммами (*MRCoNS*), обладающими дополнительным пенициллинсвязывающим белком, ко-

© Коллектив авторов, 2013

Адрес для корреспонденции: 117513 Москва, ул. Академика Опарина, 4. МЦ АГ и П им. В. И. Кулакова

дируемым геном *tecA*, поэтому при лечении инфекций, вызванных *MRCoNS*, препаратом выбора чаще всего служит ванкомицин. Этот препарат являлся основным в терапии *CoNS*-инфекций в ОРИТ новорождённых, хотя в публикациях последних лет имеется много сообщений о том, что использование ванкомицина у пациентов с инфекциями, вызванными штаммами стафилококков с МПК между 1 и 2 мг/мл следует проводить с осторожностью, поскольку отсутствует его клиническая эффективность [6].

Патогенность как коагулазоположительных, так и коагулазоотрицательных стафилококков во многом обусловлена наличием широкого спектра различных факторов вирулентности, в том числе и продукция различных токсинов [7]. Основными токсинами стафилококков являются различные гемолизины, лейкоцидины, большой спектр энтеротоксинов, относящихся к нескольким серологическим типам А-Е, G, H, I, J, K-R, токсин синдрома токсического шока, эксфолиативные токсины А и В и др. [8]. *CoNS* по сравнению с *S.aureus* обладают значительно меньшим разнообразием токсинов [9] и из наиболее часто встречаемых у них являются некоторые энтеротоксины и токсин токсического шока [10, 11].

Способность к образованию биоплёнок является фактором, способствующим колонизации *CoNS* на поверхности синтетических имплантов — центральных венозных катетеров, интубационных трубок и т. д. Их формирование связано с поверхностными белками и межклеточными полисахаридными адгезинами (PIA). Помимо PIA, к факторам адгезии стафилококка относят клампинг фактор, кодируемый генами *clfA* и *clfB*, коллагенсвязывающий белок (ген *cna*), а также фибронектинсвязывающий белок (гены *fnbA*; *fnbB*) [12–16].

Синтез PIA регулируется *ica* опероном, в который входят следующие гены *icaA*, *icaB*, *icaC*, *icaD*. Функция белка, кодируемого геном *icaB*, заключается в деацетилировании поли-N-ацетилглюкозамина. Деацетилирование PIA требуется для его прикрепления к поверхности клетки и формирования биоплёнок [17]. Присутствие этих генов является прогностическим признаком образования биоплёнок у *CoNS*, что и может объяснить причину катетер-ассоциированных *CoNS*-сепсисов.

Способность к образованию биоплёнок и метициллинорезистентность, дают *CoNS* преимущество в борьбе за право населять особую экологическую нишу — госпитальную среду, вызывая инфекции у иммунокомпрометированного контингента больных, в частности у глубоко недоношенных новорождённых или новорождённых с тяжёлой неинфекционной патологией.

Таким образом, подробное изучение микробиологических и молекулярно-генетических

свойств коагулазонегативных стафилококков является важной и своевременной задачей. Определение частоты выделения отдельных видов *CoNS* у новорождённых, находящихся на выживании в ОРИТ, наличие или отсутствие у них основных факторов патогенности — маркёров антибиотикорезистентности (метициллинорезистентность и чувствительность к ванкомицину), а также выявление их принадлежности к определённым клональным группам явилось целью данного исследования.

Материал и методы

Бактериальные изоляты. При микробиологическом посеве клинического материала, полученного от новорождённых (кал, соскоб из зева, отделяемое трахеи, пупочной ранки, конъюнктивы, повреждения кожи, кровь, моча, ликвор, асцитическая и плевральная жидкость, аутопсийный материал) выделяли чистые культуры коагулазонегативных стафилококков, путём пересева их на питательную среду — 5% кровяной агар. Видовую идентификацию выделенных изолятов *CoNS* осуществляли через 24 часа по биохимическим свойствам с помощью автоматического бактериологического анализатора Vitek2Compact (BioMérieux, США) и методом масс-спектрометрического анализа с помощью масс-спектрометра AutoflexIII MALDI-TOF-MS (Bruker Daltonics, Германия) с программным обеспечением Biotyper (Bruker Daltonics, www.bdal.com).

Фенотипическая характеристика. Чувствительность к антибиотикам, (ампициллину, оксациллину, ванкомицину, линезолиду, гентамицину, линкомицину (клиндамицину), эритромицину, ципрофлоксацину, хлорамфениколу, тетрациклину) выделенных изолятов *CoNS*, определяли диско-диффузионным методом на агаре Мюллера-Хинтона (HiMedia) с использованием стандартизованных дисков (BioRad Inc.) или путём определения минимальной подавляющей концентрации (МПК) антибиотика на автоматическом анализаторе Vitek2Compact (BioMérieux, США). При интерпретации результатов тестирования руководствовались критериями CLSI [18].

Генетическая характеристика. Расширенная генетическая характеристика 70 клинических изолятов *CoNS*, выделенных от 28 новорождённых, включала:

- определение наличия гена *tecA* для подтверждения устойчивости к метициллину (оксациллину);
- тестирование геномной ДНК на наличие известных генов вирулентности и патогенности;
- типирование 41 штамма *S.haemolyticus* и 28 штаммов *S.epidermidis* на основании существующих схем мультилокусного секвенирования (MLST).

Выделение ДНК. Для выделения геномной ДНК стафилококков использовался набор «ДНК-экспресс» (ООО НПФ Литех, Россия) в соответствии с прилагаемыми инструкциями (ТУ-9398-450-17253567-03). Пробы ДНК хранились при температуре 20°C.

Проведение ПЦР. С помощью олигонуклеотидных праймеров, перечисленных в табл. 1, были амплифицированы фрагменты гена *tecA*, генов токсинов *hlgA*, *hlgA*, *hlgB*, *hlgC*, *sea*, *seb*, *sed*, *see*, *seg*, *seh*, *sei*, *sej*, *tsst*, факторов адгезии и колонизации *clfA*, *clfB*, *cna*, *fnbA*, *fnbB*, *icaA*, *icaB*, *icaC*, *icaD*. Реакция амплификации проводилась по стандартному протоколу: в 25 мкл реакционной смеси, содержащей 66 мМ Tris-HCl (pH 9,0), 16,6 мМ (NH₄)₂SO₄, 2,5 мМ MgCl₂, 250 мкМ каждого dNTP, 1 ед. *Taq* DNA полимеразы (ООО НПФ Литех, Россия) и по 10 пмоль праймеров для амплификации тестируемого гена. Реакцию ставили на TETRAD DNA ENGINE (MJ Research, Inc.) при температуре 94°C 2 минут, далее 35 циклов 94°C 30 секунд, ТПЦР 30 секунд и 72°C 30 секунд. Продукты

Таблица 1. ПЦР праймеры, используемые в данном исследовании для генетической характеристики *CoNS*

Ген	Название	5'-3' последовательность	Температура реакции, °C	Размер ампликона, бп
<i>mecA</i>	MecA-P4	tccagattacaacttcaccagg	56	160
	MecA-P7	ccacttcatacttctgaacg		
<i>hla</i>	hla1	atagagatacttggaaaccg	58	294
	hla2	tactgaagaacgatctgtcc		
<i>sea</i>	SEA-1	ggttatcaatgtgcgggtgg	60	195
	SEA-2	aagatcctactcctgaacag		
<i>seb</i>	SEB-1	aaactgtatgtatgggtgg	58	178
	SEB-2	ttttcagcaaatagtacgag		
<i>sed</i>	SED-1	ggtgaaatagataggactgc	58	193
	SED-2	aaatagcgacttgcctgtgc		
<i>see</i>	SEE-1	gaaatcaatgtgctggaggc	60	313
	SEE-2	tcataacttaccgtggaccc		
<i>sej</i>	SEJ-1	tactgattttctccctgacg	60	397
	SEJ-2	tcattccagtgttactccacc		
<i>sei</i>	SEI-1	agattgaaaaggcgtcacag	62	513
	SEI-2	ctacaggcagtcctatctcc		
<i>seg</i>	SEG-1	atctttatgtctccacctg	58	411
	SEG-2	ttagtgagccagtgcttgc		
<i>seh</i>	SEH-1	gctaattgttggtagatgg	58	195
	SEH-2	cgaatgagtaatctctaggag		
<i>tsst</i>	TSST-1	taagaccttgtgtgtgcg	62	247
	TSST-2	gggctataatcaggactcgg		
<i>hlgA</i>	hlgA1	tcaatcggagtcagtggtc	62	206
	hlgA2	tagtctcttgcgtggacc		
<i>hlgB</i>	hlgB1	gctatacatttgggtgac	58	262
	hlgB2	tatacactgcttgtctgcc		
<i>hlgC</i>	hlgC1	cttacttgcctcttctgcc	60	437
	hlgC2	tgatccattaccaccgagtg		
<i>icaA</i>	icaA1	gaggtaagccaacgcactc	62	485
	icaA2	tcgtgtcccccttgagccc		
<i>icaB</i>	icab1	gattaactttgatgatagg	52	516
	icab2	ttttcatggaatccgtccc		
<i>icaC</i>	icac1	tattaggtcaatggatggc	60	246
	icac2	ctaagaagaataaaaaatccatcc		
<i>icaD</i>	icad1	cagaggcaatatccaacgg	56	217
	icad2	caaacaaactcatccatcc		
<i>clfA</i>	clfa1	aagtgtgcctagaatgagagc	60	995
	clfa2	cgataccgtcaccagaacc		
<i>clfB</i>	clfb1	accactacaacagagccagc	62	300
	clfb2	gtacctttagcatcagcagc		
<i>fnbA</i>	fnba1	atcgttgttgggatgggac	56	334
	fnba2	actgtcttgcgtccgc		
<i>fnbB</i>	fnbb1	aagaagatacaaaaccagg	54	410
	fnbb2	taactacgatattgccacc		
<i>cna</i>	cna1	gaacagggtgggtcaagcag	58	245
	cna2	gtcgtatcttctggcagc		

амплификации анализировали в 2% агарозном геле с визуализацией бромистым этидием.

Мультилокусное типирование штаммов *S.haemolyticus* проводили в соответствии с методикой Ворониной О. Л. [19], мультилокусное типирование штаммов *S.epidermidis* проводили в соответствии со схемой, представленной на сайте <http://sepidermidis.mlst.net/>, используя рекомендованные праймеры и условия амплификации.

Секвенирование ДНК. Перед постановкой реакции секвенирования ампликоны, полученные в ходе стандартной ПЦР, обрабатывали щелочной фосфатазой арктических креветок и экзонуклеазой I *E.coli* (ExoI, производства Fermentas, Литва) для инактивации неизрасходованных нуклеотидов и деградации олигонуклеотидных праймеров. Для этого к полученным ампликонам добавляли по 5 мкл смеси, содержащей 66 мМ Tris-HCl pH 9,0; 16,6 мМ (NH₄)₂SO₄; 2,5 мМ MgCl₂; 5 ед. ExoI и 0,5 ед. щелочной фосфатазы арктических креветок. Инкубировали в течение 20 минут при температуре 37°C с последующей инак-

тивацией ферментов и прогреванием в течение 10 минут при 85°C.

Определение нуклеотидных последовательностей амплифицированных фрагментов ДНК проводили модифицированным методом Сенгера с использованием ABI Prism BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit и прибора ABI Prism 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, США) в соответствии с прилагаемыми инструкциями.

Анализ данных секвенирования. Анализ последовательностей и выравнивание выполняли с помощью программного обеспечения VECTOR NTI v. 9.0. Для филогенетического анализа использовали программу MEGA v. 4.0 (<http://www.mega-software.net>).

Результаты и обсуждение

В период с 2010 по 2012 годы из клинического материала от новорождённых детей, выделено

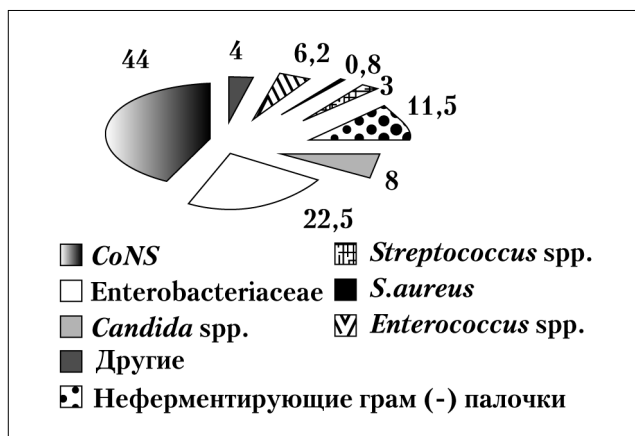


Рис. 1. Частота выделения различных групп микроорганизмов из клинического материала у новорождённых ОРИТ.

2867 изолятов микроорганизмов (рис. 1), из которых 1259 (43,9%) были отнесены к *CoNS*, и 672 из них идентифицированы до вида.

Видовой состав коагулазонегативных стафилококков был представлен в основном тремя видами: *S.epidermidis* (69,5%), *S.haemolyticus* (22%) и *S.hominis* (8%). Значительно реже, выделялись другие виды — *S.warneri*, *S.pasteuri*, *S.saprophyticus*, в общей сложности составившие 0,5% от всех идентифицированных *CoNS*. При сравнении видового состава изолятов *CoNS*, выделяемых при колонизации слизистых ЖКТ (кал и зев) и из очагов инфекций, было обнаружено, что в обоих случаях преобладает *S.epidermidis*, причём при инфекциях высеваемость *S.epidermidis* была выше (74%), чем при колонизации (65%). Вторым по частоте выделения был *S.haemolyticus* — 29% изолятов из кала и зева и 15% из очагов инфекций, *S.hominis* — 5,6 и 9,5 % соответственно (рис. 2).

Поскольку в ОРИТ новорождённых в качестве стартовой терапии чаще всего применяют комбинацию защищённого пенициллина (амоксциллина/клавуланата) с аминогликозидом (нетилимицин), а для этиотропной терапии инфекций, вызванных метициллинорезистентными стафилококками используют ванкомицин или линезолид, все выделенные в данном исследовании изоляты *CoNS* ($n=1259$) были протестированы на чувствительность к оксациллину, пенициллину, гентамицину, ванкомицину и линезолиду. Для группы изолятов, отобранных для углубленного генетического типирования ($n=70$), были получены расширенные антибиотикограммы, включающие линкомицин (клиндамицин), эритромицин, фузидин, ципрофлоксацин, хлорамфеникол, тетрациклин.

Абсолютное большинство выделенных изолятов *CoNS* были устойчивыми к метициллину 93% (1171/1259), метициллинорезистентность которых подтвердилась наличием гена *mecA* у 96% генотипированных изолятов. Вырабатывали пеницилли-

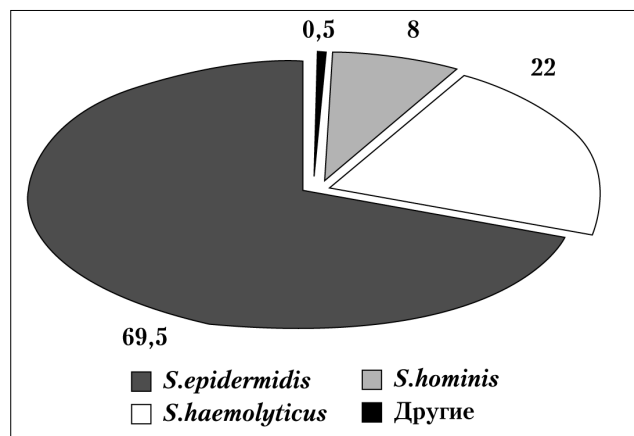


Рис. 2. Частота выделения различных видов *CoNS*.

назу 98% (1234/1259) и были устойчивы к гентамицину 91% (1145/1259) изолятов, а устойчивых к ванкомицину и линезолиду обнаружено не было.

Среди изолятов, для которых была сделана расширенная антибиотикограмма ($n=70$), устойчивы к тетрациклину были 18% (13/70), к хлорамфениколу — 41% (29/70), к линкомицину — 40% (28/70), к эритромицину — 77% (54/70), к фузидиевой кислоте — 34% (24/70), к ципрофлоксацину — 66% (46/70).

При анализе чувствительности 114 изолятов *MRCoNS* к ванкомицину с определением минимальной подавляющей концентрации у 6% МПК составила 0,5 мкг/мл; у 93% МПК 1—2 мкг/мл; МПК более 2 мкг/мл (4 мкг/мл) у 1% изолятов. Исходя из современных представлений о чувствительности стафилококков к ванкомицину, можно говорить лишь о 6% изолятов *CoNS*, в отношении которых этот антибактериальный препарат будет клинически эффективен.

Отдельно стоит сказать, что в ходе настоящего исследования проведён анализ клинического материала от 16 погибших глубококондоношенных новорождённых, для которых был подтвержден инфекционный диагноз. В 9 из 16 случаев (56%) в аутопсийном материале были обнаружены госпитальные микроорганизмы: в 7 случаях *MRCoNS* (77%), в 1 случае полирезистентный штамм *Enterobacter cloacae*, в 1 случае — *Candida famata*. Сроки пребывания этих новорождённых в ОРИТ превышали 72 часа. Вызывает особый интерес, что из 7 новорождённых, в аутопсийном материале которых обнаружены *MRCoNS*, 3 ребенка получали ванкомицин, но элиминации возбудителя при этом не произошло.

В рамках генетической характеристики ограниченной группы клинических изолятов *CoNS* ($n=70$) было проверено наличие следующих токсинов: гемолизинов α и γ , энтеротоксинов А, В, D, Е, G, H, I, J и токсина токсического шока. Гены, ответственные за синтез токсинов, указаны

Таблица 2. Наличие генов токсинов у 70 клинических изолятов CoNS

Вид	Гемолизин α <i>hla</i>	Энтеротоксин A <i>sea</i>	Энтеротоксин B <i>seb</i>	Энтеротоксин D <i>sed</i>	Энтеротоксин E <i>see</i>	Энтеротоксин G <i>seg</i>	Энтеротоксин H <i>seh</i>	Энтеротоксин I <i>sei</i>	Энтеротоксин J <i>sej</i>	Токсического шока tst	Гемолизин α <i>hlgA, hlgB, hlgC</i>
<i>S.haemolyticus</i> (n=38)	3 (8%)	0	0	0	2 (5,3%)	0	0	0	0	2 (5,3%)	0
<i>S.epidermidis</i> (n=25)	16 (64%)	0	7 (28%)	10 (40%)	1 (4%)	0	4 (16%)	0	0	4 (16%)	0
<i>S.hominis</i> (n=4)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1 (25%)	0
<i>S.warneri</i> (n=3)	0	0	0	0	0	0	1 (33,3%)	0	0	0	0

Таблица 3. Наличие генов основных факторов адгезии и колонизации у 70 клинических изолятов CoNS

Вид	Межклеточный полисахаридный адгезин				Кламппинг фактор		Коллаген- связывающий белок	Фибронектин- связывающий белок	
	<i>icaA</i>	<i>icaB</i>	<i>icaC</i>	<i>icaD</i>	<i>clfA</i>	<i>clfB</i>	<i>cna</i>	<i>fmbA</i>	<i>fmbB</i>
<i>S.haemolyticus</i> (n=38)	0	8 (21%)	3 (8%)	4 (10,5%)	3 (8%)	0	0	2 (5,3%)	0
<i>S.epidermidis</i> (n=25)	7 (28%)	10 (40%)	6(24%)	16 (64%)	0	0	0	0	1 (4%)
<i>S.hominis</i> (n=4)	0	1 (25%)	1 (25%)	0	0	0	0	0	1 (25%)
<i>S.warneri</i> (n=3)	0	0	0	1 (33.3%)	0	0	0	0	0

Таблица 4. Сиквенс-типы *S.haemolyticus* и профиль антибиотикорезистентности

Сиквенс-тип	Аллельный профиль <i>mvaK-rphE-iphK-gtr-arcC-tri-aroE</i>	Число штаммов	Резистентность к антибиотикам, %									
			OXA	GEN	TET	CL	LIN	ER	FA	CIP	LZ	VAN
1	1-1-2-1-1-1-1	1	100	100	0	100	100	100	0	100	0	0
5	3-1-1-1-1-3-1	20	100	100	5	5	95	100	5	100	0	0
7	3-2-2-1-2-2-1	1	100	100	0	0	100	100	0	0	0	0
19	3-1-1-1-1-1-1	18	100	100	39	17	17	100	0	100	0	0
20	3-1-1-3-1-1-1	1	100	100	0	0	0	100	0	0	0	0

в табл. 2. В табл. 3 представлены данные о наличии генов основных факторов адгезии и колонизации среди проанализированных 70 клинических изолятов. Всего гены гемолизина α были обнаружены у 19 изолятов CoNS (19/70; 27,1%), а ген токсического шока — у 7 изолятов (7/70; 10,0%). Наиболее часто из генов энтеротоксинов встречался ген энтеротоксина D (10/70; 14,3%), гены энтеротоксинов B, E и H найдены у 7 (7/70; 10,0%), 3 (3/70; 4,3%) и 5 (5/70; 7,1%) изолятов CoNS соответственно.

Наибольшее разнообразие генов токсинов было выявлено среди клинических изолятов *S.epidermidis* (n=25). Различные изоляты *S.epidermidis* имели гены гемолизина α (16/25; 64%), энтеротоксинов B (7/25; 28%), D (10/25; 40%), E (1/25; 4%), H (4/25; 16%), токсина токсического шока (4/25; 16%). У клинических изолятов *S.haemolyticus* (n=38) были обнаружены гены гемолизина α (3/38; 8%), энтеротоксина E (2/38; 5,3%), токсина токсического шока (2/38; 5,3%). Наличие генов токсинов у *S.hominis* и *S.warneri* было показано только для 2 клинических изолятов: клинический изолят *S.hominis* обладал токсинотоксическим шоком, а изолят *S.warneri* — энтеротоксином H.

Для определения способности к образованию биоплёнок были детектированы гены основных факторов адгезии и колонизации *clfA*, *clfB*, *cna*,

fmbA, *fmbB*, *icaA*, *icaB*, *icaC*, *icaD*. Генами *ica* оперона обладали *S.haemolyticus*, *S.epidermidis* и *S.hominis*. Ген *icaA* встречался у 7 (7/70; 10,0%) изолятов CoNS, *icaB* — у 19 (19/70; 27,1%) изолятов, *icaC* — у 10 (10/70; 14,3%) изолятов, *icaD* — у 21 (21/70; 30,0%) изолятов. Гены фибронектинсвязывающего белка *fmbA*, *fmbB* были найдены у клинических изолятов *S.haemolyticus* и *S.epidermidis* (*fmbA* — у 2 (2/70; 2,8%) и *fmbB* — у 2 (2/70; 2,8%) соответственно. Гена коллагенсвязывающего белка *cna* не было найдено ни у одного клинического изолята CoNS.

На основании результатов MLST типирования 41 изолят *S.haemolyticus*, выделенный от 26 новорождённых, был отнесён к 5 различным сиквенс-типам (табл. 4). Из 26 новорождённых, двое были доношенными, остальные — недоношенными (92%). Среди недоношенных очень низкую и экстремально низкую массу тела имели 16 (66%) новорождённых. Наиболее представлены сиквенс-типы 5 и 19, в состав которых входят соответственно 20 и 18 изолятов.

У доношенных новорождённых был обнаружен ST19, но клинические признаки госпитальной инфекции отсутствовали. В то же время три глубоко недоношенных ребенка имели клинические признаки инфекции, которая была ассоциирована с *S.haemolyticus* (CoNS-сепсис — 2 ребёнка и конъюнктивит — 1 ребёнок). При конъюнктивит

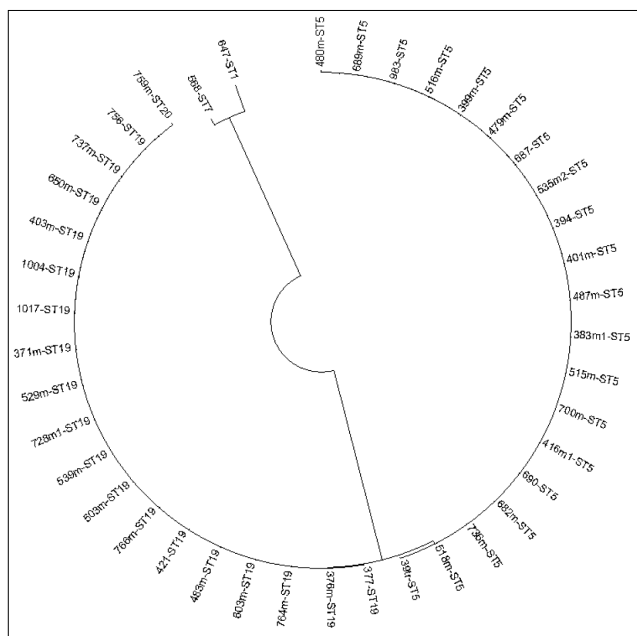


Рис. 3. Филогенетическое дерево штаммов *S.haemolyticus*, построенное на основании нуклеотидных последовательностей локусов *mvaK*, *rphE*, *tphK*, *gtr*, *arcC*, *tpi*, *aroE*, входящих в состав схемы MLST.

вите были обнаружены ST19, при *CoNS*-сепсисе — ST5.

Филогенетическое дерево штаммов *S.haemolyticus*, построенное на основании нуклеотидных последовательностей семи локусов, входящих в состав схемы MLST представлено на рис. 3, где видно, что наиболее представленный кластер (95%) образован близкородственными изолятами, входящими в сиквенс-типы 5, 19, 20.

Таким образом, все выделенные и проанализированные нами изоляты были близкородственными, что подтверждает их госпитальное происхождение. Несмотря на то, что одинаковые *CoNS* выделяли у всех новорождённых, проявления инфекций (пневмония и сепсис) отмечались только у глубоконедоношенных детей.

Помимо этого было проведено MLST типирование 28 изолятов *S.epidermidis*, выделенных от 19 новорождённых, из которых двое были доношенными, остальные — недоношенными (89,5%). Среди недоношенных очень низкую и экстремально низкую массу тела имели 11 (65%) новорождённых.

Изоляты на основании MLST схемы были отнесены к 7 различным сиквенс-типам (табл. 5). Наиболее представлены сиквенс-типы: ST2 (4 штамма), ST22 (12 штаммов), ST59 (6 штаммов).

От доношенных новорождённых был выделен ST22 без клинических признаков госпитальной инфекции. Клинические признаки инфекции, ассоциированной с *S.epidermidis*, имели три недоношенных ребёнка. Инфекции были представле-

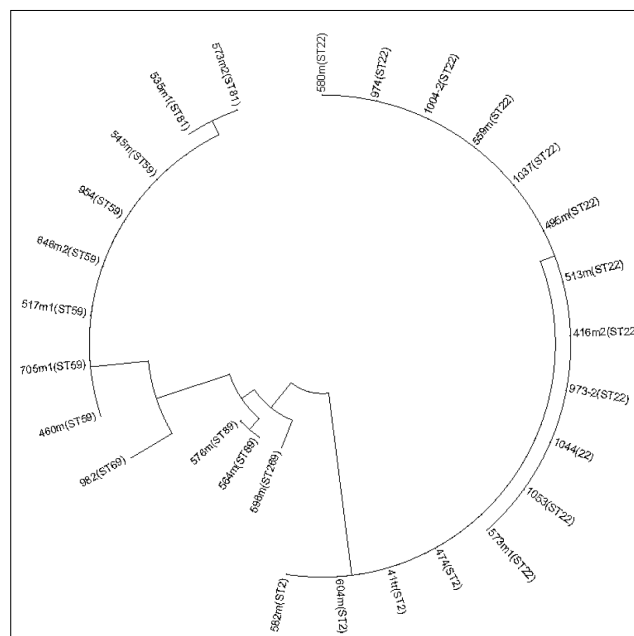


Рис. 4. Филогенетическое дерево штаммов *S.epidermidis*, построенное на основании нуклеотидных последовательностей локусов *arcC-aroE-gtr-mutS-pyr-tpi-yqiL*, входящих в состав схемы MLST (в скобках указан номер соответствующего сиквенс-типа).

ны следующими нозологическими формами: конъюнктивит, пневмония и сепсис. При конъюнктивите *S.epidermidis* был отнесен к ST59; из ткани лёгких при вскрытии выделен ST2; в третьем случае при вскрытии в крови из полости сердца обнаружен ST22.

Филогенетическое дерево штаммов *S.epidermidis*, построенное по данным MLST анализа, изображено на рис. 4. Наиболее представленный кластер, образован близкородственными штаммами, входящими в сиквенса-типы 2 и 22 (57%). Обращает на себя внимание, что конъюнктивит, вызванный *S.epidermidis*, был у ребёнка с массой тела более 2000 г, в то время как пневмония и сепсис были у глубоко недоношенных детей с массой тела при рождении менее 1500 г.

Изучая способность к длительной персистенции в условиях стационара, было отмечено, что изоляты с наиболее часто обнаруживаемыми сиквенс-типами встречались с постоянной частотой на протяжении 6 месяцев наблюдений.

Обсуждение

В этой работе было показано, что основную роль в патологии новорождённых, находящихся на выхаживании в ОРИТ, играют *MRCoNS*, что подтверждается данными зарубежных исследователей [1, 2, 19, 20, 29]. Поздний неонатальный сепсис (более 72 часов после рождения) с первичным очагом в лёгких или катетер-ассоциированный, встречается у 50% новорождённых с весом

Таблица 5. Сиквенс-типы *S.epidermidis* и профиль антибиотикорезистентности

Сиквенс-тип	Аллельный профиль <i>arcC-aroE-gtr-mutS- pyr-tpi-yqiL</i>	Число штаммов	Резистентность к антибиотикам, %									
			OXA	GEN	TET	C	LIN	ER	FA	CIP	LZ	VAN
2	7-1-2-2-4-1-1	4	100	100	0	25	0	100	100	100	0	0
22	7-1-2-2-4-7-1	12	100	100	25	100	0	17	75	17	0	0
59	2-1-1-1-2-1-1	6	100	100	0	67	17	83	67	17	0	0
69	1-18-6-2-2-1-1	1	100	100	100	100	100	100	0	100	0	0
81	2-17-1-1-2-1-1	2	100	100	100	50	0	100	50	0	0	0
89	1-1-2-1-2-1-1	2	100	100	0	50	50	0	50	0	0	0
269	1-1-2-2-28-16-1	1	100	100	0	0	0	0	0	0	0	0

при рождении менее 1500 г. [2]. Наиболее часто выделяемые из крови микроорганизмы — коагулазонегативные стафилококки (*CoNS*). Частота возникновения *CoNS*-сепсиса у новорождённых по различным данным от 30 до 40% [2].

В нашем исследовании было подтверждено, что у глубоко недоношенных новорождённых наиболее частыми нозологическими формами *CoNS*-инфекций являются сепсис и пневмония, реже встречаются локальные поражения (например, конъюнктивит).

Все изоляты, выделенные из очагов инфекций, были метициллинорезистентными и обладали множественной лекарственной устойчивостью. Во всех случаях препаратом выбора в терапии новорождённых служил ванкомицин, но не всегда происходила элиминация возбудителя при назначении терапевтических доз этого антибиотика, что возможно, связано с абсолютным преобладанием изолятов *CoNS* с МПК более 1 мкг/мл.

Количество видов *CoNS*, циркулирующих в ОРИТ ограничено: самым часто встречаемым является *S.epidermidis*, вторым по частоте выделения — *S.haemolyticus*, третьим — *S.hominis*. В связи с этим часто возникает проблема разделения контаминации от инфекции, ведь эти виды являются наиболее частыми комменсалами кожи и слизистых оболочек.

Патогенность стафилококков связана с большим количеством разнообразных факторов вирулентности и патогенности: образование биоплёнок, продукция токсинов, различных факторов, позволяющих избежать иммунного ответа, устойчивость к различным антибиотикам. Как известно, у *CoNS* значительно меньше факторов вирулентности, чем *S.aureus*. Однако среди клинических изолятов *CoNS* есть весьма патогенные изоляты, вызванные ими инфекции могут быть причиной смерти [21]. Патогенные штаммы *CoNS* могут содержать некоторые факторы вирулентности и патогенности *S.aureus*, так как многие из этих генов находятся в составе остовов патогенности и подвижных элементов [22]. В нашей работе были детектированы некоторые гены токсинов, основные факторы адгезии и колонизации у клинических изолятов *CoNS*. Представители *S.epidermidis* чаще

других видов несут гены энтеротоксинов, токсины токсического шока, плёнообразования, что, по-видимому, и определяет их ведущую роль в патологии новорождённых.

На основании полученных данных видно, что выделенные нами изоляты *CoNS* обладают значительно меньшим разнообразием токсинов, чем *S.aureus*, что подтверждается литературными данными [9]. При этом клинические изоляты *S.epidermidis* имеют наибольшее количество различных токсинов (гемолизин α , энтеротоксины В, D, Е, Н, токсин токсического шока).

Необходимо отметить, что наиболее часто в составе генома *CoNS* встречается ген гемолизина α . Для клинических изолятов *S.epidermidis* данный ген встречается у 64% изолятов, для изолятов *S.haemolyticus* — 8%. Возможно, это связано с тем, что гемолизин α обладает не только цитолитическими свойствами в отношении моноцитов, лимфоцитов, эритроцитов и тромбоцитов, но и необходим для образования биоплёнок и адгезии бактериальных клеток на поверхности клеток хозяина [7, 23]. В то время как образование биоплёнок является одним из основных факторов вирулентности и патогенности *CoNS*.

Одним из необходимых факторов для образования биоплёнок стафилококками является PIA. По полученным нами данным гены *ica* оперона присутствуют у многих клинических изолятов *CoNS*, но при этом гены *ica* оперона представлены не полностью. Возможно, нуклеотидные последовательности этих генов в *CoNS* сильно отличаются от аналогичных последовательностей *S.aureus*, что приводит к снижению эффективности используемых праймерных систем.

По данным MLST анализа, было установлено, что для ОРИТ нашего госпиталя характерны два основных сиквенс-типа *S.haemolyticus*: ST5 и ST19, выраженная клональность подтверждает их госпитальное происхождение. Основные сиквенс-типы являются генетически родственными, поскольку принадлежат к единому клональному комплексу. Ранее было показано, что генетическое родство штаммов *S.haemolyticus* характерно не только для штаммов одного стационара, но и для штаммов, выделенных в стационарах разных городов [24].

Кроме того, для ОРИТ нашего госпиталя наиболее характерны сиквенс-типы ST2, ST22, ST59 *S.epidermidis*. Несмотря на то, что сиквенс-типы ST2, ST22 и ST59, ST69, ST81 образуют два разных кластера на филогенетическом дереве, они принадлежат к одному клональному комплексу [25]. В данный комплекс входят госпитальные штаммы, выделенные в различных странах мира, а сиквенс-тип ST2 является комплексобразующим сиквенс-типом [25–27].

Таким образом, для каждого отделения и стационара эндемичными являются определённые родственные молекулярные типы *CoNS* [28]. В нашем исследовании не было выявлено определённой связи между принадлежностью к определённому сиквенс-типу и способностью вызывать инфекции у недоношенных новорождённых, этот вопрос требует проведения дальнейших клиничко-микробиологических исследований. Вероятнее всего первостепенную роль в развитии госпитальных *CoNS*-ассоциирован-

ных инфекций играют факторы риска, связанные с иммунодефицитным состоянием недоношенных новорождённых и инвазивностью методов лечения в ОРИТ. Повторное выделение основных сиквенс-типов *CoNS* на протяжении шести месяцев говорит о длительной персистенции определённых клонов в отделении, что также подтверждает их госпитальное происхождение [28].

Заключение

В заключении хотелось бы отметить, что незрелость органов и систем, следствием которой является иммунокомпрометированность глубоко недоношенных новорождённых и новорождённых с тяжёлой врождённой патологией позволяет микроорганизмам с низким патогенным потенциалом, в частности *CoNS*, преодолевать естественные барьеры и запускать патологические процессы, приводящие к полиорганной недостаточности.

ЛИТЕРАТУРА

1. Craft A., Finer N. Nosocomial coagulase negative staphylococcal (CoNS) catheter-related sepsis in preterm infants: definition, diagnosis, prophylaxis, and prevention. J Perinatol 2001; 26: 186–192.
2. Mohan P. V., Placencia F., Leonard E. W. Coagulase-negative staphylococcal infections in the neonate and child: an update. Semin Pediatr Infect Dis 2006; 17: 120–127.
3. Gruskay J., Harris M. C., Costarino A. T. et al. Neonatal *Staphylococcus epidermidis* meningitis with unremarkable CSF examination results. Am J Dis Child 1989; 143: 580–582.
4. Scheifele D. W., Gordean L. Bjornson Delta-like toxin produced by CoNS is associated with neonatal necrotizing enterocolitis. Infect Immun 1987; 2268–2273.
5. Eggink B. H., Rowen J. L. Primary osteomyelitis and suppurative arthritis caused by coagulase-negative staphylococci in a preterm neonate. Pediatr Infect Dis J 2003; 22: 572–573.
6. Haque N. Z., Zuniga L. C. et al. Relationship of vancomycin minimum inhibitory concentration to mortality in patients with methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* hospital-acquired, ventilator-associated, or health-care-associated pneumonia. Chest 2010; 138: 6: 1356–1362.
7. Plata K., Rosato A., Węgrzyn G. *Staphylococcus aureus* as an infectious agent: overview of biochemistry and molecular genetics of its pathogenicity. Acta Biochim Pol 2009; 56: 4: 594–612.
8. Dinges M., Orwin P. Schlievert exotoxins of *Staphylococcus aureus*. PClin Microbiol Rev 2000; 13: 1: 13–34.
9. Otto M. Molecular basis of *Staphylococcus epidermidis* infections. Semin Immunopathol 2012; 34: 2: 201–214.
10. Marin M., de la Rose M., Cornejo I. Enterotoxigenicity of *Staphylococcus* strains isolated from Spanish dry-cured hams. Appl Environ Microbiol 1992; 58: 3: 1067–1069.
11. Madhusoodanan J., Seo K., Remortel B., Park J., Hwang S., Fox L., Park Y., Deobald C. An Enterotoxin-bearing pathogenicity island in *Staphylococcus epidermidis*. J Bacteriol 2011; 193: 8: 1854–1862.
12. Biofilms, infection, and antimicrobial therapy / Ed by J. L. Pace, M. Rupp, and R. G. Finch. Published by CRC Press Taylor & Francis Group, USA, 2006.
13. Menzies B. E. The role of fibronectin binding proteins in the pathogenesis of *Staphylococcus aureus* infections. Curr Opin Infect Dis 2003; 16: 3: 225–229.
14. McDevitt D., Nanavaty T., House-Pompeo K., Bell E., Turner N., McIntire L., Foster T., Höök M. Characterization of the interaction between the *Staphylococcus aureus* clumping factor (ClfA) and fibrinogen. Eur J Biochem 1997; 247: 1: 416–424.
15. Ni Eidhin D., Perkins S., Francois P., Vaudaux P., Höök M., Foster T. J. Clumping factor B (ClfB), a new surface-located fibrinogen-binding adhesin of *Staphylococcus aureus*. Mol Microbiol 1998; 30: 2: 245–257.
16. Patti J. M., Jonsson H., Guss B., Switalski L. M., Wiberg K., Lindberg M., Höök M. Molecular characterization and expression of a gene encoding a *Staphylococcus aureus* collagen adhesin. J Biol Chem 1992; 267: 7: 4766–4772.
17. Vuong C., Kocianova S., Voyich J., Yao Y., Fischer E., DeLeo F., Otto M. A crucial role for exopolysaccharide modification in bacterial biofilm formation, immune evasion, and virulence. J Biol Chem 2004; 279: 52: 54881–54886.
18. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Eighteenth Informational Supplement. CLSI Document M100-S18. 2008.
19. Isaacs D. A ten-year multicentre study of coagulase negative staphylococcal infections in Australasian neonatal units. Arch Dis Child 2003; 88: F89–93.
20. Bansal S., Jain A., Agarwal J., Malik G. K. Significance of coagulase negative staphylococci in neonates with late onset septicemia. Indian J Pathol Microbiol 2004; 47: 586–588.
21. Piette A., Verschraegen G. Role of coagulase-negative staphylococci in human disease. Vet Microbiol 2009; 134: 45–54.
22. Malachowa N., DeLeo F. R. Mobile genetic elements of *Staphylococcus aureus*. Cell Mol Life Sci 2010; 67: 18: 3057–3071.
23. Caiazza N. C., O'Toole G. Alpha-toxin is required for biofilm formation by *Staphylococcus aureus*. J Bacteriol 2003; 185:10: 3214–3217.
24. Воронина О. Л., Кунда М. С., Дмитриенко О. А., Лушин В. Г., Гинцбург А. Л. Разработка схемы мультилокусного секвенирования *Staphylococcus haemolyticus* и ее применение для молекулярно-эпидемиологического анализа штаммов, выделенных в стационарах Российской Федерации в 2009–2010 гг. Журн микробиол 2011; 5: 62–67.
25. Miragaia M., Thomas J. C., Couto I., Enright M. C., de Lencastre H. Inferring a population structure for *Staphylococcus epidermidis* from multilocus sequence typing data. J Bacteriology 2007; 189: 6: 2540–2552.
26. Li M., Wang X., Gao Q., Lu Y. Molecular characterization of *Staphylococcus epidermidis* strains isolated from a teaching hospital in Shanghai, China. J Med Microbiol 2009; 58: 4: 456–461.
27. Mendes R. E., Deshpande L. M., Costello A. J., Farrell D. J. Molecular epidemiology of *Staphylococcus epidermidis* clinical isolates from U.S. hospitals. Antimicrob Agents Chemother 2012; 56: 9: 4656–4661.
28. Krediet T. G., Mascini E. M., van Rooij E., Vlooswijk J., Paauw A., Gerards L. J., Fleer A. Molecular epidemiology of coagulase-negative staphylococci causing sepsis in a neonatal intensive care unit over an 11-year period. J Clin Microbiol 2004; 42: 3: 992–995.
29. Guilbert J., Meau-Petit V., de Labriolle-Vaylet C., Vu-Thien H., Renolleau S. Coagulase-negative staphylococcal osteomyelitis in preterm infants: a proposal for a diagnostic procedure. Arch Pediatr 2010; 17: 10: 1473–1476.