

ФЕНОТИПИЧЕСКАЯ И ГЕНОТИПИЧЕСКАЯ УСТОЙЧИВОСТЬ ШТАММОВ STAPHYLOCOCCUS AUREUS К АМИНОГЛИКОЗИДАМ

Гурбанова Алла Бехрузовна

студентка, 4 курс, СПбГТИ(ТУ), Санкт-Петербург, Россия

Полякова Екатерина Михайловна

научный руководитель, к.б.н., с.н.с. научного отделения профилактики и лечения раневой инфекции РНИИТО им. Р.Р. Вредена

ВВЕДЕНИЕ

Staphylococcus aureus является одним из основных патогенов человека и животных, вызывающим широкий спектр заболеваний, а также различные осложнения, такие как инфекции области хирургического вмешательства (ИОХВ) и остеомиелит [2, 6, 8].

Одним из общепринятых способов лечения таких осложнений является локальная антимикробная терапия антибиотиками группы аминогликозидов, которые вводят в состав костного цемента, применяемого для фиксации эндопротеза и заполнения костных дефектов, образовавшихся в результате остеомиелита [5, 9, 13].

Устойчивость *S. aureus* к аминогликозидам обусловлена наличием генов, кодирующих аминогликозид-модифицирующие ферменты. Данные ферменты нарушают связывание молекул антибиотика с рибосомами бактериального возбудителя, что препятствует антибактериальному действию аминогликозидов. Несмотря на значительное число генов устойчивости к аминогликозидам, описанных для *S. aureus*, большая часть данных о распространенности этих генов относится к штаммам, выделенным в других странах [11, 12, 14, 16]. Кроме того, существует нехватка данных о корреляции фенотипической (бактериологический анализ) и генотипической (генетический анализ) устойчивости штаммов *S. aureus* к аминогликозидам.

Целью настоящего исследования является сравнительный анализ штаммов *S. aureus* по их фенотипической и генотипической устойчивости к гентамицину, тобрамицину и амикацину.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объектами исследования служили 119 штаммов *S. aureus* из них 29 MRSA и 90 MSSA, выделенных от пациентов от пациентов, проходивших лечение в РНИИТО им. Р.Р. Вредена с диагнозом ИОХВ после травм и ортопедических операций или остеомиелита.

Исследуемые штаммы выращивали на колумбийском агаре с 5% бараньей кровью (Биомедиа, РФ) и агаре Мюллера-Хинтона (Oxoid, Великобритания) в течение 18-20 часов при 37°C. Фенотипическую чувствительность штаммов к гентамицину (10 мкг), амикацину (30 мкг) и тобрамицину (10 мкг) определяли при помощи диско-диффузионного метода (ДДМ) в соответствии с МУК 4.2.1890-04 и международными стандартами EUCAST [3, 10] и применением дисков для определения чувствительности производства Oxoid (Великобритания). *S. aureus* ATCC 29213 был использован в качестве контрольного штамма.

Для генетического анализа бактериальных геномов и подбора праймеров использовали программы BLAST, PrimerBlast и PerlPrimerv1.1.21.

ДНК исследуемых штаммов выделяли при помощи коммерческого набора для выделения ДНК из бактериальных клеток (S-сорб, РФ). ПЦР-анализ проводили на амплификаторе cfx96 (Bio-Rad, США) с использованием праймеров, описанных ранее [4].

Условия реакции: 3 мин при 95,0°C; 33 цикла: 10 сек при 95,0°C; 15 сек при температуре отжига праймеров; 15 сек при 72°C. ПЦР-продукты визуализировали при помощи электрофореза в 1% агарозном геле и окраски бромистым этидием.

Статистический анализ сопряженности между наличием каждого из генов *aac(6')-Ie/aph(2'')*, *ant1*, *aac*, *ant(4')-Ia* и чувствительностью/устойчивостью штаммов к гентамицину, тобрамицину и амикацину проводили с помощью коэффициента сопряженности Пирсона, в программе Excel, Mathcad [7].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Фенотипическая чувствительность штаммов к гентамицину, тобрамицину и амикацину (ДДМ)

119 штаммов штамма *S. aureus* были исследованы на чувствительность к гентамицину (Gen), амикацину (Ami) и тобрамицину (Tob). 79,31% штаммов MRSA и 2,2% штаммов MSSA были резистентны к гентамицину и тобрамицину. 55,17% штаммов MRSA были резистентны к амикацину. Резистентных к амикацину штаммов MSSA выявлено не было (табл. 1). 21% всех штаммов был резистентен ко всем трем антибиотикам.

Таблица 1.

Распределение изученных штаммов *S. aureus* по их фенотипической устойчивости к аминогликозидам

	Число штаммов	Фенотип		
		Gen ⁺ , Ami ⁺ , Tob ⁺	Gen ⁻ , Ami ⁻ , Tob ⁻	Gen ⁺ , Ami ⁻ , Tob ⁺
MRSA	29	55,17%	24,14%	24,14%
MSSA	90	0	96,7%	0
Всего	119	13,4%	78,9%	5,9%
	Число штаммов	Фенотип		
		Gen ⁺	Ami ⁺	Tob ⁺
MRSA	29	79,31%	55,17%	79,31%
MSSA	90	2,22%	0	2,22%
Всего	119	21%	13,4%	21%

“Gen⁺”, “Ami⁺”, “Tob⁺” - устойчивость к гентамицину, амикацину и тобрамицину соответственно

“Gen⁻”, “Ami⁻”, “Tob⁻” - чувствительность к гентамицину, амикацину и тобрамицину соответственно.

Сходная распространенность гентамицин-резистентных штаммов MRSA описана для ряда других стран: 60,53% (Греция), 61,7% (Япония) и 90,2% (Турция) [12, 14, 16]. Также в Японии была показана большая устойчивость штаммов MRSA к тобрамицину (95,3%), чем к гентамицину (61,7%). В то время как в нашем исследовании % устойчивых к гентамицину и тобрамицину штаммов MRSA был одинаковым (79,31%) (табл.1).

Генотипическая устойчивость изученных штаммов к гентамицину, тобрамицину

и амикацину (ПЦР)

В ходе работы 119 штаммов *S. aureus* были изучены на наличие в их геноме генов устойчивости к аминогликозидам. Полученные результаты приведены в таблице 2.

Таблица 2.

Результаты ПЦР-анализа штаммов *S. aureus* на наличие генов устойчивости к аминогликозидам

Ген	<i>S. aureus</i> (n=119)		MRSA (n=29)		MSSA (n=90)	
	n	%	n	%	n	%
<i>aac(6')-Ie/aph(2'')</i>	24	20,2	22	18,5	2	1,7
<i>ant1</i>	20	16,8	13	5,9	7	10,9
<i>aac</i>	11	9,2	10	8,4	1	0,8
<i>ant(4')-Ia</i>	0	0	0	0	0	0

“n” – число штаммов; “%” – % штаммов

Среди изученных штаммов наиболее распространенным был ген *aac(6')-Ie/aph(2'')*, выявленный у 20,2% всех изученных штаммов (MRSA+MSSA). Гены *ant1* и *aac* присутствовали в геномах 16,8% и 9,2% штаммов, соответственно. Ген *ant(4')-Ia* среди изученных штаммов выявлен не был, хотя в ряде исследований он встречается у 26–84% штаммов в зависимости от их региона выделения [11, 12, 15].

Сопоставление результатов ДДМ и ПЦР

В результате проведенного исследования было показано, что в геноме всех изученных штаммов, резистентных к гентамицину и тобрамицину присутствовал ген *aac(6')-Ie/aph(2'')* (рис. 1). В тоже время данный ген не был выявлен ни у одного из штаммов, чувствительных к данным антибиотикам.

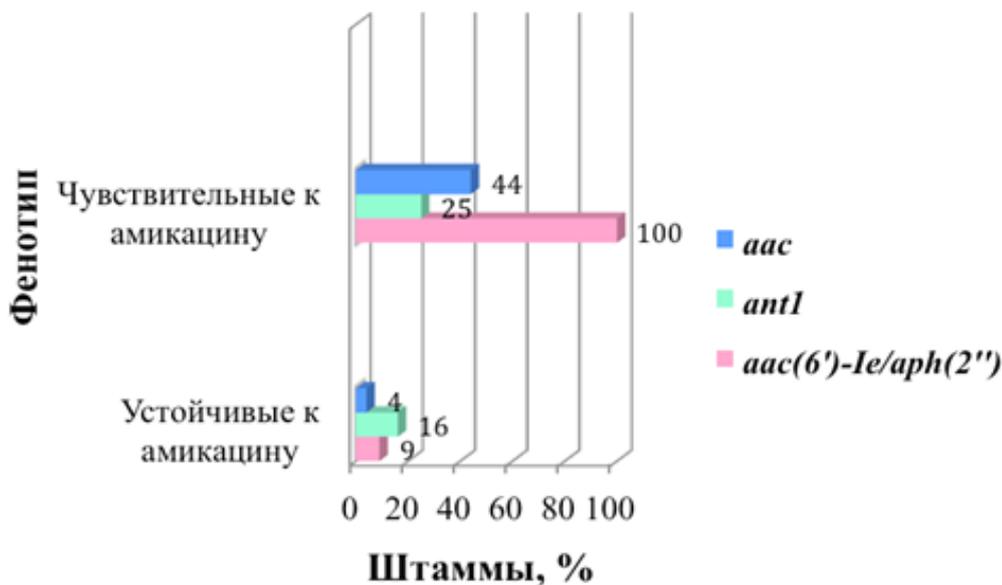


Рисунок 1. Присутствие в геноме штаммов генов *aac(6')-Ie/aph(2'')*, *ant1* и *aac* в зависимости от устойчивости/чувствительности штаммов к гентамицину и тобрамицину

Статистический анализ полученных данных при помощи коэффициента пирсона показал высокую степень сопряженности между наличием данного гена в геноме штаммов и их устойчивостью к гентамицину и тобрамицину (коэф.=1).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Принимая во внимание полученную высокую сопряженность между наличие гена *aac(6')-Ie/aph(2'')* у штаммов *S. aureus*, устойчивых к гентамицину и тобрамицину, а также высокую распространенность данного гена согласно публикациям других авторов [11, 12], данный ген может быть рекомендован качестве генетического маркера устойчивости штаммов *S. aureus* к гентамицину и тобрамицину.

Список литературы:

1. Божкова С.А. Профиль резистентности возбудителей как основа выбора эффективного антибиотика при стафилококковых инфекциях протезированных суставов // Клин. микробиол. антимикроб. химиотер. - 2013. Т. 15, №2. - С. 115-123.
2. Божкова С.А., Разоренов В.Л., Петрова Т.М. Микробиологический мониторинг - основа рациональной стратегии и тактики антибактериальной терапии инфекции костей и протезированных суставов // Тольяттинский медицинский консилиум. - 2011. - Т. 3-4. - С. 33-42.
3. МУК 4.2.1890-04. Методические указания определения чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препаратам. - введ. 04.03.2004 - Спб.: Клин. микробиол. антимикроб. химиотер. - 2004. - С. 324-325.
4. [Полякова Е.М.](#), Божкова С.А. Сравнительная характеристика фенотипической и генотипической устойчивости к аминогликозидам штаммов *Staphylococcus aureus*, выделенных в травматолого-ортопедическом стационаре // Клиническая лабораторная диагностика. - 2015. - Т. 60, № 11. - С. 50-53.

5. Привольнев В.В., Родин А.В., Каракулина Е.В. Местное применение антибиотиков в лечении инфекций костной ткани // Клин. микробиол. антимикроб. химиотер. - 2012. - Т.14, №2. - С. 118-131.
6. Розова Л.В., Годовых Н.В. Сравнительная характеристика видового состава микроорганизмов при хроническом посттравматическом и гематогенном остеомиелите // Гений Ортопедии. - 2014. - Т. 2. - С. 56-59.
7. Фёрстер Э., Рёнц Б. Методы корреляционного и регрессионного анализа. Руководство для экономистов // Финансы и статистика. - 1983. - С. 270-275.
8. Шаповал С.Д. Резистентные и полирезистентные возбудители гнойно-некротических осложнений синдрома диабетической стопы // Новости хирургии. - 2015. - Т. 23, №1. - С. 70-76.
9. Duffy R.K., Shafritz A.B. Bone cement // J Hand Surg Am. - 2011. - Vol. 36, № 6. - P. 1086-1088.
10. EUCAST Clinical Breakpoint Table v. 5.0 (2015). Available at: [http://www.eucast.org/ bles](http://www.eucast.org/bles).
11. Hauschild T. Aminoglycosides resistance in clinical isolates of Staphylococcus aureus from a University Hospital in Bialystok // Folia Histochem Cytobiol. - 2008. - Vol. 46, №2. - P. 225-228.
12. Ida T. Identification of Aminoglycoside-Modifying Enzymes by Susceptibility Testing: Epidemiology of Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus in Japan // J Clin Microbiol. - 2001. - Vol. 39, №9. - P. 3115-3121.
13. Jiranek W.A., Hanssen A.D., Greenwald A.S. Antibiotic-loaded bone cement for infection prophylaxis in total joint replacement // J Bone Joint Surg Am. - 2006. - Vol. 88, № 11. - P. 2487-2500.
14. Polyzou A. Predominance of methicillin-resistant staphylococcus aureus clone susceptible to erythromycin and several other non- β -lactam antibiotics in a Greek hospital // J Antimicrob Chemother. - 2001. - Vol. 48, № 2. - P. 231-234.
15. Schmitz F.J. The prevalence of aminoglycoside resistance and corresponding resistance genes in clinical isolates of staphylococci from 19 European hospitals // J Antimicrob Chemother. - 1999. - Vol. 43, № 2. - P. 253-259.
16. Yıldız Ö. Antimicrobial susceptibility and resistance mechanisms of methicillin resistant Staphylococcus aureus isolated from 12 Hospitals in Turkey // Ann Clin Microbiol Antimicrob. - 2014. - Vol. 13, № 1. - P. 44.