

Мониторинг метициллинрезистентных штаммов стафилококка в многопрофильном стационаре Москвы с помощью молекулярно-биологических методов

Т. С. Скачкова^{*1}, М. Н. Замятин², О. А. Орлова², Н. А. Юмцунова², Н. Н. Лашенкова², В. С. Фомина², В. Г. Гусаров², А. А. Шеленков¹, Ю. В. Михайлова¹, Е. Н. Головешкина¹, В. Г. Акимкин¹

¹ФБУН «ЦНИИ эпидемиологии» Роспотребнадзора, Москва, Россия

²ФГБУ «Национальный медико-хирургический центр им. Н.И. Пирогова» Минздрава России, Москва, Россия

Резюме

Актуальность. Стафилококки являются одними из самых распространенных патогенов в структуре этиологических агентов госпитальных инфекций. Метициллинрезистентные стафилококки характеризуются устойчивостью к основным группам современных антибиотиков и имеют высокий приоритет по угрозе для здоровья человека по оценкам Всемирной организации здравоохранения. Внедрение современных молекулярно-биологических методов при мониторинге метициллинрезистентных стафилококков необходимо для быстрой и точной идентификации микроорганизмов, контроля за эпидемиологической ситуацией и изучения необходимости проведения противоэпидемических мероприятий. **Цель исследования** – анализ результатов мониторинга метициллинрезистентных штаммов стафилококка с помощью молекулярно-биологических методов в многопрофильном стационаре Москвы в течение одного года. **Материалы и методы.** Одноцентровое обсервационное исследование с периодом наблюдения – один год (с декабря 2016 г. по декабрь 2017 г.). Исследовался биологический материал от 240 пациентов с признаками инфекции, смывов ($n = 250$) с объектов внутрибольничной среды стационара. Проведено полногеномное секвенирование 24 изолятов стафилококков, выделенных от больных и из смыва с объекта внутрибольничной среды. Выявление ДНК метициллинрезистентных штаммов выполняли с использованием набора реагентов «АмплиСенс®MRSA-скрин-титр-FL». Секвенирование проводилось на приборе Illumina HiSeq1500 с использованием наборов IlluminaHiSeq PE RapidClusterKit v2 и IlluminaHiSeqRapid SBS Kit v2. **Результаты.** Методом ПЦП ДНК метициллинрезистентных стафилококков была выявлена в 6,3% образцов крови от пациентов с признаками инфекции и в 42,4% образцов смывов с объектов внутрибольничной среды. Результаты ПЦП-исследования образцов смывов показали, что ДНК метициллинрезистентных коагулазонегативных стафилококков обнаруживалась гораздо чаще, чем ДНК MRSA ($p < 0,001$). ДНК метициллинрезистентных стафилококков выявляли чаще в отделениях реанимации и интенсивной терапии по сравнению с отделением гематологии и хирургическими отделениями ($p < 0,001$). Изученные изоляты *Staphylococcus aureus* относились к 6 различным сиквенс-типам (ST-5, ST-7, ST-8, ST-22, ST-30 и ST-5555) и 8 spa-типам (t008, t021, t091, t1062, t12437, t1544, t223, t4573). В результате мониторинга обнаружен изолят с новым аллельным профилем. На сегодня ему присвоен номер ST5555. Преобладающим типом стафилококковой кассеты *tes* была SCC_{tes}-кассета IV типа. **Заключение.** В связи с широким распространением метициллинрезистентных штаммов и выявлением эпидемиологически значимых генетических линий стафилококков важно проведение регулярного мониторинга с использованием современных молекулярно-биологических методов для их быстрой и точной идентификации.

Ключевые слова: метициллинрезистентный стафилококк, эпидемиологический мониторинг, секвенирование, MRSA, ПЦП
Конфликт интересов не заявлен.

Для цитирования: Скачкова Т. С., Замятин М. Н., Орлова О. А. и др. Мониторинг метициллинрезистентных штаммов стафилококка в многопрофильном стационаре Москвы с помощью молекулярно-биологических методов. Эпидемиология и Вакцинопрофилактика. 2021;20(1): 44–50. <https://doi.org/10.31631/2073-3046-2021-20-1-44-50>.

Monitoring Methicillin-Resistant *Staphylococcus* Strains in the Moscow Medical and Surgical Center using Molecular-Biological Methods

TS Skachkova^{*1}, MN Zamyatin², OA Orlova^{1,2}, NA Yumtsunova², NN Lashenkova², VS Fomina², VG Gusarov², AA Shelencov¹, YuV Mikhaylova¹, EN Goloveshkina¹, VG Akimkin¹

¹Central Research Institute of Epidemiology, Moscow, Russia

²National Medical and Surgical Center named after N.I. Pirogov, Moscow, Russia

^{*} Для переписки: Скачкова Татьяна Сергеевна, научный сотрудник Центрального НИИ эпидемиологии, 111123, Россия, г. Москва, ул. Новогиревская, дом 3а. +7(495) 974-96-46 (доб.2247), Skachkova@inbox.ru. ORCID: 0000-0003-1924-6521. ©Скачкова Т.С. и др.

^{**} For correspondence: Skachkova Tatyana S, researcher of Science "Central Research Institute of Epidemiology", 3a st. Novogireevskaya, Moscow, 111123, Russia. +7(495) 974-96-46 (доб.2247), Skachkova@inbox.ru. ORCID: 0000-0003-1924-6521. ©Skachkova TS et al.

Abstract

Relevance. Staphylococci are one of the most common pathogens in the etiological structure of nosocomial infections. Methicillin-resistant staphylococci are resistant to the main groups of antibiotics and are one of bacteria that pose the greatest threat to human health according to the World Health Organization. The introduction of modern molecular biological methods in the monitoring of methicillin-resistant staphylococci is necessary for the rapid and accurate identification of microorganisms, monitoring the epidemiological situation and studying the need for anti-epidemic measures. **Aims.** Analysis of the results of monitoring methicillin-resistant staphylococcus strains using molecular biological methods in a multidisciplinary hospital in Moscow for one year. **Materials and methods.** Single-center observational study with a one-year follow-up period (December 2016 to December 2017). The research included a molecular-biological analysis of biological material from 240 patients with signs of infection and washings samples (n=250) from the objects of the hospital environment. The whole genome sequencing was carried out for 24 samples, isolated from patients with different forms of staphylococcal infection and washings from a hospital environment. DNA detection of methicillin-resistant strains was performed using the «AmpliSens®MRSA-screen-titer-FL» reagent kit. Sequencing was performed on an Illumina HiSeq1500 instrument using the IlluminaHiSeq PE RapidClusterKit v2 and IlluminaHiSeqRapid SBS Kit v2. **Results.** DNA of methicillin-resistant staphylococci were detected in 6.3% of blood samples from patients with signs of infection and in 42.4% of washings from the objects of the hospital environment. The results of PCR of washing samples showed that DNA of methicillin-resistant coagulase-negative staphylococci were detected much more often than MRSA ($p < 0.001$). DNA of methicillin-resistant staphylococci were detected more often in the intensive care and intensive care units compared with the hematology and surgical departments ($p < 0.001$). The examine samples of *Staphylococcus aureus* belonged to 6 different sequence types (ST-5, ST-7, ST-8, ST-22, ST-30 and ST-5555) and 8 spa-types (t008, t021, t091, t1062, t12437, t1544, t223, t4573). As a result of monitoring, an isolate with a new allelic profile was found. Today it has been assigned the number ST5555. The predominant type of staphylococcal mec cassette was the type IV SCCmec cassette. **Conclusion.** Due to the widespread distribution of methicillin-resistant strains and the identification of epidemiologically significant genetic lines of staphylococci, it is necessary to conduct regular monitoring, take measures to limit the spread of such strains and introduce modern molecular biological methods for quick and accurate identification.

Key words: methicillin-resistant staphylococcus, epidemiological monitoring, sequencing, PCR, MRSA
No conflict of interest to declare.

For citation: Skachkova TS, Zamyatin MN, Orlova OA, et al. Monitoring methicillin-resistant staphylococcus strains in the Moscow medical and surgical center using molecular-biological methods. *Epidemiology and Vaccinal Prevention*. 2021;20(1): 44–50. (In Russ.). <https://doi.org/10.31631/2073-3046-2021-20-1-44-50>.

Метициллинрезистентные стафилококки являются частой причиной госпитальных инфекций и вызывают заболевания различной степени тяжести – от инфекций кожи и мягких тканей до пневмонии и сепсиса [1–6]. По материалам онлайн-платформы анализа данных резистентности к антимикробным препаратам в России «AMRmap», доля метициллинрезистентных стафилококков среди 3679 изолятов, выделенных при нозокомиальных инфекциях, составляет 45% [7]. Выделение стафилококка, устойчивого к метициллину (оксациллину), подразумевает его резистентность и к другим β-лактамам: пенициллинам, карбапенемам, цефалоспорином (кроме цефалоспоринов 5 поколения). Наблюдается также ассоциированная устойчивость к аминогликозидам, фторхинолонам, макролидам, линкозамидам и тетрациклинам. Поэтому заболевания, вызванные подобными штаммами, могут развиваться на фоне терапии антибиотиками. Множественная лекарственная устойчивость значительно усложняет лечение инфекции и увеличивает риск летального исхода.

В настоящее время для идентификации стафилококков широко используются традиционные микробиологические методы. Выделение, идентификация и определение лекарственной устойчивости с помощью бактериологических методов требуют не менее 2–5 дней, в то время

как полимеразная цепная реакция (ПЦР) позволяет выявить ДНК метициллинрезистентных стафилококков в течение нескольких часов. В целях совершенствования системы эпидемиологического мониторинга необходимо внедрение молекулярно-биологических методов не только для выявления, но и для внутривидового типирования стафилококков. Полногеномное секвенирование позволяет получить наиболее полную информацию о генетических особенностях изучаемых штаммов, включая наличие отдельных генов и мобильных генетических элементов, определяющих патогенный и эпидемический потенциал изучаемого штамма. Необходимость слежения за клональной структурой метициллинрезистентных стафилококков обусловлена необходимостью быстрого реагирования на эпидемические вспышки, обусловленные госпитальными штаммами, которые сформировались в стационарах, и штаммами, заносимыми в стационары из других медицинских организаций. Применение методов молекулярно-биологического анализа позволит сократить время, затрачиваемое на идентификацию эпидемически значимых штаммов микроорганизмов, и улучшить эпидемиологический мониторинг заболеваний, вызванных метициллинрезистентными стафилококками.

Целью работы был анализ результатов мониторинга метициллинрезистентных штаммов

стафилококка с помощью молекулярно-биологических методов в многопрофильном стационаре Москвы в течение одного года.

Материалы и методы

Мониторинг метициллинрезистентных штаммов стафилококка проводился в многопрофильном стационаре Москвы в течение одного года (с декабря 2016 по декабрь 2017) в отделениях реанимации и интенсивной терапии, гематологии и хирургических отделениях. Обследовано 240 пациентов с признаками инфекции. Среди них женщин – 95 (40%), мужчин – 145 (60%). Возраст больных от 18 до 96 лет (медиана 56). Показаниями к ПЦР-исследованию крови были: катетер-ассоциированный тромбоз; фебрильная нейтропения (у больных онкологическими заболеваниями); наличие у пациента двух или более признаков из следующих: гипотермия или лихорадка, лейкоцитоз, тахикардия, гипотензия. Биологический материал для исследования – кровь из периферической вены, взятая в вакуумные пробирки с ЭДТА. Исследовались смывы ($n = 250$) с объектов внутрибольничной среды стационара (63 смыва из отделений гематологии, 99 смывов из отделений реанимации и интенсивной терапии, 88 – из хирургических отделений). Экстракцию ДНК из образцов биоматериала и смывов с внутрибольничной среды проводили с помощью комплекта реагентов «РИБО-преп» (ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии). Количественное определение ДНК метициллинрезистентных штаммов выполняли с использованием набора реагентов «АмплиСенс®MRSA-скрин-титр-FL» (№ ФСР 2012/13998) (ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии). Амплификацию осуществляли на приборе с системой детекции флуоресцентного сигнала в режиме реального времени «Rotor-Gene Q» («Qiagen», Германия). Сбор, транспортирование, хранение и подготовка образцов материала осуществлялись в строгом соответствии с требованиями СП 1.2.036-95 «Порядок учета, хранения, передачи и транспортирования микроорганизмов I–IV групп патогенности» и методическими рекомендациями «Взятие, транспортировка, хранение клинического материала для ПЦР-диагностики» (Москва, 2012).

Проведено полногеномное секвенирование 19 изолятов *Staphylococcus aureus* (из них 15 метициллинрезистентных и 4 метициллинчувствительных) и 5 метициллинрезистентных изолятов *Staphylococcus epidermidis*, выделенных от пациентов стационара и из смыва с объекта внутрибольничной среды. Изоляты были получены при посевах из различных очагов инфекции в бактериологической лаборатории стационара. Выделение чистой культуры проводилось методом посева на твердые питательные среды с последующей видовой идентификацией и определением чувствительности к антибиотикам в автоматических бактериологических анализаторах с применением международных критериев EUCAST. Геномная ДНК бактерий полученных изолятов выделялась с использованием

набора QiagenDNeasyBlood&TissueKits (Qiagen) согласно протоколу производителя. Приготовление образцов ДНК для дальнейшего секвенирования осуществлялось с использованием IlluminaNextera DNA LibraryPrepKit и IlluminaNexteraIndexKit (Illumina). Секвенирование проводилось на приборе IlluminaHiSeq1500 (Illumina) с использованием наборов IlluminaHiSeq PE RapidClusterKit v2(Illumina) и IlluminaHiSeqRapid SBS Kit v2(Illumina).

Определение принадлежности штамма к сиквенстипу осуществлялось путем сравнения результатов секвенирования с последовательностями, приведенными в международной базе данных (<https://pubmlst.org/saureus>; <https://pubmlst.org/sepidermidis>). Метод MLST основан на сравнении нуклеотидных последовательностей фрагментов 7 стафилококковых генов: *arc*, *aro*, *glp*, *gmk*, *pta*, *tpi*, *yqi* для *Staphylococcus aureus* и 7 генов: *arc*, *aro*, *gtr*, *mut*, *pyr*, *tpi*, *yqi* для *Staphylococcus epidermidis*.

Поиск детерминант антибиотикорезистентности проводили с помощью ресурса ResFinder 3.0 [8]. Поиск плазмид выполняли с помощью ресурса PlasmidFinder 1.3 [9]. Поиск генов, ассоциированных с факторами патогенности стафилококков, осуществляли с помощью ресурса VirulenceFinder 2.0 (<https://cge.cbs.dtu.dk/services/VirulenceFinder/>). Анализ последовательностей варибельного участка гена стафилококкового белка A (*spa*) проводили с использованием международной базы данных (<http://spaServer.ridom.de>) и ресурса spaTyper 1.0 [10].

Материалы исследования были подвергнуты статистической обработке методами параметрического и непараметрического анализа. Накопление, корректировка, систематизация исходной информации и визуализация полученных результатов осуществлялись в электронных таблицах Microsoft Office Excel 2010. Сравнение номинальных данных проводилось при помощи критерия χ^2 Пирсона, позволяющего оценить значимость различий между фактическим количеством исходов или качественных характеристик выборки, попадающих в каждую категорию, и теоретическим количеством, которое можно ожидать в изучаемых группах при справедливости нулевой гипотезы. Значение критерия χ^2 сравнивалось с критическими значениями для $(r - 1) \times (c - 1)$ числа степеней свободы. В том случае, если полученное значение критерия χ^2 превышало критическое, делали вывод о наличии статистической взаимосвязи между изучаемым фактором риска и исходом при соответствующем уровне значимости.

Результаты и обсуждение

Обследование пациентов с признаками инфекции было направлено на выявление инфекций кровотока, вызванных метициллинрезистентными штаммами стафилококка. Методом ПЦР ДНК стафилококков была выявлена в крови 30 пациентов

(12,5%) в возрасте от 18 до 89 лет (медиана 54,5). ДНК метициллинрезистентных штаммов была обнаружена в 15 образцах (6,25%) пациентов в возрасте от 18 до 89 лет (медиана 58). У 10 из 15 пациентов были установлены внутрисосудистые катетеры, четверо находились на искусственной вентиляции легких. Из 15 образцов, в которых были обнаружены метициллинрезистентные стафилококки, только в четырех была обнаружена ДНК метициллинрезистентного *Staphylococcus aureus* (MRSA), в 11 образцах обнаружена ДНК метициллинрезистентных коагулазонегативных стафилококков. Данные молекулярно-биологического исследования показали, что в половине (50%) выявленных в образцах крови ДНК стафилококков был обнаружен ген *mecA*. Ген *mecS* ни в одном из образцов обнаружен не был.

Было проведено молекулярно-биологическое исследование смывов с медицинского оборудования, инструментария, инвентаря и объектов внутрибольничной среды отделений реанимации и интенсивной терапии, гематологии и хирургических отделений. Результаты ПЦР-исследования показали, что ДНК метициллинрезистентных коагулазонегативных стафилококков в образцах смывов выявлялись гораздо чаще, чем ДНК MRSA ($p < 0,001$). ДНК метициллинрезистентных стафилококков была выявлена в 106 (42,4 %) образцах смывов из 250 (из них только в 9 – ДНК MRSA, в 97 – ДНК метициллинрезистентных коагулазонегативных стафилококков). ДНК метициллинрезистентных стафилококков в смывах с объектов внутрибольничной среды выявляли чаще ($p < 0,001$) в отделениях реанимации и интенсивной терапии (в 57% образцов смывов) по сравнению с отделением гематологии (в 38% образцов смывов) и хирургическими отделениями (в 30% образцов смывов).

В рамках мониторинга было проведено полногеномное секвенирование 18 изолятов *Staphylococcus aureus* и 5 изолятов *Staphylococcus epidermidis*, выделенных от пациента стационара и одного изолята *Staphylococcus aureus* из смыва с объекта внутрибольничной среды. Сопоставление аллельных профилей исследуемых изолятов с известными профилями из международной базы данных показало, что штаммы *Staphylococcus aureus* относились к шести различным сиквенс-типам (ST-5, ST-7, ST-8, ST-22, ST-30 и ST-5555) (табл. 1). Один из штаммов имел новый аллельный профиль. На сегодня ему присвоен номер ST5555. Новый сиквенс-тип был выделен из раневого содержимого от пациента хирургического отделения с флегмоной и не содержал ген *mecA*. Изоляты *Staphylococcus epidermidis* относились к 4 сиквенс-типам (ST-2, ST-22; ST-59 и ST-786).

Среди изученных нами MRSA-штаммов были обнаружено 8 spa-типов: t008, t021, t091, t1062, t1544, t223, t4573, t12437. Spa-типирование

обладает большей разрешающей способностью по сравнению с MLST. На 22 марта 2020 г. международная база MLST насчитывает 5964 сиквенс-типов, а в базе spa-типов уже 19 316 вариантов. Внутри одного сиквенс-типа может быть несколько spa-типов. В нашей выборке из 19 изолятов *Staphylococcus aureus*, шесть относились к одному сиквенс-типу ST-22. Если ориентироваться только на MLST, то можно предположить наличие эпидемиологической связи между образцами. Однако эти шесть изолятов относились к трем различным spa-типам (t223, t4573 и t12437). Кроме того, они имели разный профиль генов, ассоциированных с факторами патогенности стафилококков, и разный плазмидный профиль. Таким образом, при изучении эпидемиологии стафилококков в пределах одного стационара ориентироваться только на данные MLST недостаточно. Необходимо использовать полногеномное секвенирование или комбинацию методов типирования. При этом MLST остается прекрасным инструментом для изучения эпидемиологии на глобальном уровне.

Наибольшее количество изученных изолятов *Staphylococcus aureus* относилось к восьмому сиквенс-типу, spa-типу t008 с SCCmec-кассетой IV типа. Определяющим признаком MRSA является стафилококковая кассета *mecS* (SCCmec), расположенная на хромосоме. Это мобильный генетический элемент, содержащий детерминанту устойчивости к β -лактамам, – ген *mecA*. Появление устойчивых к метициллину стафилококковых линий происходит из-за приобретения и вставки элемента SCCmec в хромосому восприимчивых штаммов. Элементы SCCmec очень разнообразны по своей структурной организации и генетическому содержанию и классифицированы по типам и подтипам. Для всех секвенированных MRSA-штаммов была определена SCCmec-кассета IV типа за исключением одного изолята, выделенного из содержимого абсцесса кожи. В этом случае была идентифицирована SCCmec-кассета V типа.

Важной мишенью для молекулярно-биологического мониторинга являются гены, ассоциированные с факторами патогенности стафилококков. Появление штаммов возбудителя, имеющих определенные острова патогенности, может быть ассоциировано с более тяжелыми эпидемиологическими последствиями. Выявленный в нашем исследовании спектр генов, ассоциированных с факторами патогенности стафилококков, представлен в таблице 1. Обнаружены изоляты с различными генами токсинов, в том числе семь образцов с геном белка токсического шока (tst). Выявлено 2 изолята с геном, кодирующим лейкоцидин Пантон-Валентина (PVL). Оба обнаруженных изолята были метициллинрезистентными.

Таким образом, в результате мониторинга метициллинрезистентных штаммов стафилококка с помощью молекулярно-биологических методов

Practical Aspects of Epidemiology and Vaccine Prevention

Таблица 1. Характеристики изолятов *Staphylococcus aureus*

Table 1. Characteristics of *Staphylococcus aureus* isolates

Сиквен-тип Sequence type	№ образца Item No.	Биологический материал/ источник Biological material/ source	Spa-типирование Spa-types	Гены, ассоциированные с факторами патогенности стафилококков Genes associated with pathogenic factors of staphylococci	Тип стафилококковой кассеты mec Types of Staphylococcal cassette mec
ST-8	1	Раневое отделяемое Wound fluid	t008	aur, hlgA, hlgB, hlgC, lukD, lukE, sak, scn, sea, splA, splB, splE	SCCmec type IV
	2				
	3	Содержимое абсцесса мягких тканей Soft tissue abscess content			
	4	Кровь из периферической вены Peripheral vein blood			
	5				
	6	Центральный венозный катетер Central venous catheter			
	7	Смыв с дверцы шкафа с расходным материалом Cabinet door swab sample			
	8	Мазок с эндопротеза тазобедренного сустава Hip implant swab sample			
ST22	9	Кровь из периферической вены Peripheral vein blood	t223	aur, hlgA, hlgB, hlgC, sak, scn, seg, sei, sem, sen, seo, seu, tst	
	10	Содержимое абсцесса мягких тканей Soft tissue abscess contents	t4573	aur, hlgA, hlgB, hlgC, lukF-PV, lukS-PV, sak, scn, seg, sei, sem, sen, seo, seu	
	11	Кровь Blood	t12437	aur, hlgA, hlgB, hlgC, sak, scn, seg, sei, sem, sen, seo, seu, tst	
	12	Отделяемое послеоперационной раны мягких тканей Postoperative soft tissue abscess	t12437		
	13	Мазок из носа Nasal swab	t223	aur, hlgA, hlgB, hlgC, lukD, lukE, sak, scn, sea, seg, sei, sem, sen, seo, seu, splA, splB, splE, tst	
	14	Мазок из зева Throat swab	t223		
ST-30	15	Содержимое абсцесса мягких тканей Soft tissue abscess contents	t021	aur, hlgA, hlgB, hlgC, lukF-PV, lukS-PV, sak, scn, seg, sei, sem, sen, seo, seu, splE	SCCmec type V
	16	Кал Feces	t021	aur, hlgA, hlgB, hlgC, sak, scn, sea, seg, sei, sem, sen, seo, seu, splE, tst	I
ST-5	17	Отделяемое послеоперационной раны мягких тканей Postoperative soft tissue abscess content	t1062	aur, hlgA, hlgB, hlgC, lukD, lukE, sak, scn, seg, sei, sem, sen, seo, sep, seu, splA, splB, tst	
ST7	18	Протез клапана митральный Mitral valve prosthesis	t091	aur, hlgA, hlgB, hlgC, lukD, lukE, sak, scn, sep, splA, splB, splE	
ST-5555	19	Содержимое флегмоны Cellulitis content	t1544	aur, hlgA, hlgB, hlgC, lukD, lukE, sak, scn, seb, seg, sei, sem, sen, seo, seu, splA, splE	

в многопрофильном стационаре Москвы в течение одного года получены следующие результаты:

1. ДНК метициллинрезистентных стафилококков выявлена в 6,3% образцов крови от пациентов с признаками инфекции и в 42,4% образцов смывов с объектов внутрибольничной среды. Из них ДНК MRSA только в 1,7% образцов крови от пациентов с признаками инфекции и в 3,6% образцов смывов.
2. Результаты ПЦР-исследования образцов смывов показали, что ДНК метициллинрезистентных стафилококков выявляли чаще в отделениях реанимации и интенсивной терапии по сравнению с отделением гематологии и хирургическими отделениями ($p < 0,001$).
3. Изученные изоляты *Staphylococcus aureus* относились к шести различным сиквенс-типам (ST-5, ST-7, ST-8, ST-22, ST-30 и ST-5555) и восьми spa-типам (t008, t021, t091, t1062, t12437, t1544, t223, t4573). В результате мониторинга обнаружен изолят с новым аллельным профилем. На сегодня ему присвоен номер ST5555. Изученные изоляты *Staphylococcus epidermidis* относились к 4 сиквенс-типам (ST-2, ST-22; ST-59 и ST-786).
4. Преобладающим типом стафилококковой кассеты mec была SCCmec-кассета IV типа.
5. Обнаружены изоляты с различным профилем генов стафилококковых энтеротоксинов, в том числе с генами белков, ассоциированных с синдромом токсического шока и некротизирующей пневмонией.

Изучение эпидемиологии стафилококков необходимо не только для эффективного инфекционного контроля, но и для наблюдения за эволюцией вида. Молекулярное типирование незаменимо в контроле распространения потенциально высокопатогенных и устойчивых клонов. С появлением секвенирования нового поколения повышенный интерес в клинической микробиологии вызывает типирование на основе полногеномного секвенирования.

В нашем исследовании наибольшее количество изученных изолятов *Staphylococcus aureus* относилось к восьмому сиквенс-типу, spa типу t008 с SCCmec-кассетой IV типа. Это согласуется с литературными данными. *Staphylococcus aureus* ST-8, spa тип t008 широко распространен в России и во всем мире [11]. Исследование 62 MRSA-изолятов в 2002–2006 гг., выделенных от хирургических больных клиник Москвы, показало, что более 80% изолятов относились к ST-8 с IV типом SCCmec кассеты [12]. Зарегистрирован случай смерти от внебольничного метициллинрезистентного *S. aureus* ST8/SCCmecIV [13].

Особое внимание вызывает анализ течения инфекционных осложнений, связанных с определенными сиквенс-типами, или наличием того или иного гена, ассоциированного с факторами патогенности. Известно, что PVL способен вызывать тканевый некроз и тяжелую некротизирующую пневмонию [14,15]. В нашем исследовании были обнаружены 2 изолята с геном, кодирующим PVL. Особое опасение вызывает тот факт, что эти штаммы являлись метициллинрезистентными. Учитывая данные об ассоциации штаммов PVL с некротизирующей пневмонией, необходимо проведение мероприятий, направленных на ограничение распространения подобных форм метициллинрезистентных стафилококков. Данных, полученных в результате наших экспериментов на сегодня, недостаточно для связи определенных сиквенс-типов метициллинрезистентных штаммов стафилококков или наличия определенных генов факторов патогенности с тяжестью течения инфекционных осложнений. Однако созданная база с данными по молекулярно-биологическим характеристикам выделенных штаммов может служить вспомогательным инструментом для проведения дальнейших эпидемиологических исследований.

Выводы

1. В исследуемый период мониторинга ДНК метициллинрезистентных коагулазонегативных стафилококков выявлялась чаще, чем ДНК MRSA.
2. В течение года в стационаре циркулировали как минимум 6 различных сиквенс-типов и 8 spa-типов *Staphylococcus aureus* и 4 сиквенс-типа *Staphylococcus epidermidis*, что говорит об отсутствии гомогенной эпидемиологической картины.
3. Обнаружены метициллинрезистентные золотистые стафилококки с генетическими детерминантами, являющимися маркером патогенности клинических изолятов.
4. При изучении эпидемиологии стафилококков в пределах одного стационара ориентироваться только на данные MLST недостаточно. Необходимо использовать полногеномное секвенирование или комбинацию методов для типирования.
5. В связи с высокой частотой обнаружения ДНК метициллинрезистентных штаммов и выявлением эпидемиологически значимых генетических линий стафилококков необходимо проведение регулярного мониторинга и внедрение современных молекулярно-биологических методов для быстрой и точной идентификации микроорганизмов в биологическом материале и смывах.

Литература

1. Yahav D., Shaked H., Goldberg E., et al. Time trends in *Staphylococcus aureus* bacteremia, 1988–2010, in a tertiary center with high methicillin resistance rates // *Infection*. 2017. 45. P. 51–57.
2. Olearo F., Albrich W.C., Vernaz N., et al. *Staphylococcus aureus* and methicillin resistance in Switzerland: regional differences and trends from 2004 to 2014 // *Swiss Med Wkly*. 2016. Sep 15; 146:w14339. eCollection 2016.

Practical Aspects of Epidemiology and Vaccine Prevention

3. Jaganath D., Jorakate P., Makprasert S., et al. *Staphylococcus aureus* Bacteremia Incidence and Methicillin Resistance in Rural Thailand, 2006–2014. // *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 2018. Vol. 99, Issue 1. P. 155–163.
4. Хохлова О.Е., Перянова О.В., Боброва О.П. и др. Молекулярно-генетические особенности метициллин-резистентных *Staphylococcus aureus* (MRSA) – возбудителей гнойно-воспалительных заболеваний у онкологических больных. // *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии (ЖМИЭБ)*. 2017. 6. С.15–20.
5. Романов А.В., Дехнич А.В., Сухорукова М.В. и др. Антибиотикорезистентность нозокомиальных штаммов *Staphylococcus aureus* в стационарах России: результаты многоцентрового эпидемиологического исследования «МАРАФОН» в 2013–2014. // *КМАХ*. 2017. № 1.
6. Дехнич А.В. Терапия нозокомиальных стафилококковых инфекций в России – время менять стереотипы. // *Врач*. 2010. 10. С. 18–22.
7. Кузьменков А. Ю., Трушин И. В., Авраменко А. А. и др. AMRmap: интернет-платформа мониторинга антибиотикорезистентности. // *Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия*. 2017. Т.19, №2. С. 84–90.
8. Zankari E., Hasman H., Cosentino S., et al. Identification of acquired antimicrobial resistance genes. // *J Antimicrob Chemother*. 2012. 67, 11. P. 2640–2644.
9. Carattoli A., Zankari E., Garcia-Fernandez A., et al. PlasmidFinder and pMLST: in silico detection and typing of plasmids. // *Antimicrob Agents Chemother*. 2014. 58, 7. P.3895–903.
10. Bartels M.D., Petersen A., Worning P., et al. Comparing whole-genome sequencing with Sanger sequencing for spa typing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. // *J. Clin. Microbiol*. 2014. 52, 12. P.4305–8.
11. Романов А. В., Дехнич А. В., Эйдельштейн М. В. Молекулярная эпидемиология штаммов *Staphylococcus aureus* в детских стационарах России // *КМАХ*. 2012. №3. – С.201–208.
12. Афанасьев М. В., Каракашев С. В., Ильина Е. Н., и др. Молекулярно-генетическая характеристика метициллиноустойчивых штаммов *Staphylococcus aureus*, выделенных в стационарах Москвы. // *Молекулярная генетика, микробиология и вирусология*. 2010.2.С.20–24.
13. Ishitobi N., Wan T.W., Khokhlova O.E., et al. Fatal case of ST8/SCCmecIV community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection in Japan. *New Microbes New Infect*. 2018. 26. P. 30–6.
14. Morgan M.S. Diagnosis and treatment of Pantón–Valentine leukocidin (PVL)-associated staphylococcal pneumonia. // *International Journal of Antimicrobial Agents*. 2007. Vol. 30, №4. P. 289–296.
15. Labandeira-Rey M., Couzon F., Boisset S. *Staphylococcus aureus* Pantón–Valentine Leukocidin Causes Necrotizing Pneumonia // *Science* 23. 2007. P. 1130–1133.

References

1. Yahav D., Shaked H., Goldberg E., et al. Time trends in *Staphylococcus aureus* bacteremia, 1988–2010, in a tertiary center with high methicillin resistance rates. *Infection*. 2017; 45: 51–57. doi: 10.1007/s15010-016-0919-6.
2. Olearo F., Albrich W.C., Vernaz N., et al. *Staphylococcus aureus* and methicillin resistance in Switzerland: regional differences and trends from 2004 to 2014. *Swiss Med Wkly*. 2016; Sep 15; 146:w14339. eCollection 2016. doi: 10.4414/SMW.2016.14339.
3. Jaganath D., Jorakate P., Makprasert S., et al. *Staphylococcus aureus* Bacteremia Incidence and Methicillin Resistance in Rural Thailand, 2006–2014. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 2018; 99 (1): 155–163. doi: https://doi.org/10.4269/ajtmh.17-0631.
4. Khokhlova O.E., Peryanova O.V., Bobrova O.P., et al. Molecular and genetic features of the methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) – causative agents of purulent diseases at cancer patients (ZHMEI). 2017; 6:15–20 (In Russ). doi:10.36233/0372-9311-2017-6-15-20.
5. Romanov A.V., Dekhnich A.V., Sukhorukova M.V., et al. Antimicrobial resistance of nosocomial *Staphylococcus aureus* isolates in Russia: results of multicenter epidemiological study «MARATHON» 2013–2014 CMAC. 2017; 1 (In Russ).
6. Dekhnich A. Therapy for nosocomial staphylococcal infections in Russia: it is time to change stereotypes *Vrach*. 2010; 10: 18–22.
7. Kuzmenkov A.Yu., Trushin I.V., Avramenko, et al. AMRmap: an online platform for monitoring antibiotic resistance CMAC. 2017; 19 (2): 84–90. (In Russ)
8. Zankari E., Hasman H., Cosentino S., et al. Identification of acquired antimicrobial resistance genes. *J Antimicrob Chemother*. 2012; 67(11):2640–2644. doi: 10.1093/jac/dks261.
9. Carattoli A., Zankari E., Garcia-Fernandez A., et al. Plasmid Finder and pMLST: in silico detection and typing of plasmids. *Antimicrob Agents Chemother*. 2014; 58(7):3895–903. doi: 10.1128/AAC.02412-14.
10. Bartels M.D., Petersen A., Worning P., et al. Comparing whole-genome sequencing with Sanger sequencing for spa typing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J. Clin. Microbiol*. 2014; 52(12):4305–8. doi: 10.1128/JCM.01979-14.
11. Romanov A.V., Dekhnich A.V., Edelstein M.V. Molecular epidemiology of *Staphylococcus aureus* in Russian pediatric hospitals CMAC 2012; 3: 201–208. (In Russ)
12. Afanasyev M.V., Karakashev S.V., Il'ina E.N., et al. Molecular genetic characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates recovered from Moscow clinics. *Molecular Genetics, Microbiology and Virology*. 2010; 2: 20–24 (In Russ).
13. Ishitobi N., Wan T.W., Khokhlova O.E., et al. Fatal case of ST8/SCCmecIV community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection in Japan. *New Microbes New Infect*. 2018; 26: 30–6. doi: 10.1016/j.nmni.2018.08.004.
14. Morgan M.S. Diagnosis and treatment of Pantón–Valentine leukocidin (PVL)-associated staphylococcal pneumonia. *International Journal of Antimicrobial Agents*. 2007;30(4):289–296. doi: 10.1016/j.ijantimicag.2007.04.019.
15. Labandeira-Rey M., Couzon F., Boisset S. *Staphylococcus aureus* Pantón–Valentine Leukocidin Causes Necrotizing Pneumonia. *Science* 23. 2007:1130–1133. doi: 10.1126/science.1137165.

Об авторах

- **Татьяна Сергеевна Скачкова** – научный сотрудник отдела молекулярной диагностики и эпидемиологии ЦНИИ эпидемиологии, 111123, Россия, Москва, ул. Новогиреевская, д. 3а. +7(495) 974-96-46 (доб.2247), skachkova@inbox.ru. ORCID: https://orcid.org/0000-0003-1924-6521.
- **Михаил Николаевич Замятин** – д. м. н., профессор, заведующий кафедрой анестезиологии и реаниматологии НМХЦ им. Н. И. Пирогова, Москва, Россия. ZamyatinMN@pirogov-center.ru. ORCID: https://orcid.org/0000-0002-2072-7798.
- **Оксана Анатольевна Орлова** – д. м. н., начальник отдела эпидемиологии, врач-эпидемиолог НМХЦ им. Н. И. Пирогова; ведущий научный сотрудник лаборатории инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи, ЦНИИ эпидемиологии. +7 (499) 464-03-03 (доб.2546), oksana_orlova@bk.ru. ORCID: https://orcid.org/0000-0002-0556-1822.
- **Наталья Александровна Юмцунова** – помощник врача-эпидемиолога НМХЦ им. Н. И. Пирогова. +7 (499) 464-03-03 (доб. 2111), nayum@mail.ru. ORCID: https://orcid.org/0000-0002-0910-2615.
- **Наталья Николаевна Лашенкова** – врач-бактериолог бактериологической лаборатории НМХЦ им. Н. И. Пирогова. lashenkovann@pirogov-center.ru.
- **Валерия Сергеевна Фомина** – к. м. н., начальник службы клинической лабораторной диагностики НМХЦ им. Н. И. Пирогова. FominaVS@pirogov-center.ru. ORCID: https://orcid.org/0000-0002-4248-5021.
- **Виталий Геннадьевич Гусаров** – к. м. н., заведующий отделением анестезиологии-реанимации (интенсивной терапии) НМХЦ им. Н. И. Пирогова. gusarov1974@mail.ru. ORCID: https://orcid.org/0000-0002-2900-1459.
- **Юлия Владимировна Михайлова** – заведующая лабораторией молекулярных механизмов антибиотикорезистентности ЦНИИ эпидемиологии, 111123, Россия, Москва, ул. Новогиреевская, д. 3а. yulka_ivashka@mail.ru.
- **Андрей Александрович Шеленков** – старший научный сотрудник лаборатории молекулярных механизмов антибиотикорезистентности ЦНИИ эпидемиологии, 111123, Россия, Москва, ул. Новогиреевская, д. 3а. fallandar@gmail.com. ORCID: https://orcid.org/0000-0002-7409-077X.
- **Елена Николаевна Головешкина** – к. б. н., заведующая лабораторией молекулярной диагностики и эпидемиологии инфекций органов репродукции ЦНИИ эпидемиологии, 111123, Россия, Москва, ул. Новогиреевская, д. 3а. goloveshkina@cmd.su. ORCID: https://orcid.org/0000-0002-0536-2874.
- **Василий Геннадьевич Акимкин** – академик РАН, д. м. н., профессор, директор ЦНИИ эпидемиологии, 111123, Россия, Москва, ул. Новогиреевская, д. 3а. ORCID: https://orcid.org/0000-0003-4228-9044.

Поступила: 18.11.2020. Принята к печати: 25.01.2021.

Контент доступен под лицензией CC BY 4.0.

About the Authors

- **Tatyana S. Skachkova** – researcher of Department of molecular diagnostics and epidemiology, Central Research Institute of Epidemiology, 3a st. Novogireevskaya, Moscow, 111123, Russia. +7 (495) 974-96-46 (доб. 2247), skachkova@inbox.ru. ORCID: https://orcid.org/0000-0003-1924-6521.
- **Mikhail N. Zamyatin** – Dr. Sci. (Med.), Professor of Department of Anesthesiology and Intensive Care Medicine, Pirogov National Medical and Surgical Center, Moscow, Russia. ZamyatinMN@pirogov-center.ru. ORCID: https://orcid.org/0000-0002-2072-7798.
- **Oksana A. Orlova** – Dr. Sci. (Med.), Head of the Epidemiology Department, Doctor-Epidemiologist, Pirogov National Medical and Surgical Center, Moscow, Russia; researcher, Laboratory of hospital infections, Central Research Institute of Epidemiology, Moscow, Russia. +7 (499) 464-03-03 (2546), oksana_orlova@bk.ru. ORCID: https://orcid.org/0000-0002-0556-1822.
- **Natalya A. Yumtsunova** – epidemiologist assistant, Pirogov National Medical and Surgical Center, Moscow, Russia. +7 (499) 464-03-03 (2111), nayum@mail.ru. ORCID: https://orcid.org/0000-0002-0910-2615
- **Natalya N. Lashenkova** – bacteriologist of the bacteriological laboratory, Pirogov National Medical and Surgical Center, Moscow, Russia. lashenkovann@pirogov-center.ru.
- **Valeria S. Fomina** – Cand. Sci. (Med.), Head of Clinical Laboratory Diagnostics Service, Pirogov National Medical and Surgical Center, Moscow, Russia. FominaVS@pirogov-center.ru. ORCID: https://orcid.org/0000-0002-4248-5021
- **Vitaliy G. Gusarov** – Cand. Sci. (Med.), Pirogov National Medical and Surgical Center, Moscow, Russia. gusarov1974@mail.ru. ORCID: https://orcid.org/0000-0002-2900-1459.
- **Yuliya V. Mikhaylova** – Head of laboratory of molecular mechanisms of antibiotic resistance, Central Research Institute of Epidemiology, Moscow, Russia. yulka_ivashka@mail.ru.
- **Andrey A. Shelonkov** – researcher, Laboratory of Molecular Mechanisms of Antibiotic Resistance of Central Research Institute of Epidemiology, Moscow, Russia. fallandar@gmail.com. ORCID: https://orcid.org/0000-0002-7409-077X.
- **Elena N. Goloveshkina** – Cand. Sci. (Biol.), Head of Laboratory for Molecular Diagnostic and Epidemiology of Reproductive Tract Infections of Central Research Institute of Epidemiology, Moscow, Russia. goloveshkina@cmd.su. ORCID: https://orcid.org/0000-0002-0536-2874.
- **Vasily G. Akimkin** – Dr. Sci. (Med.), Full Member of the Russian Academy of Sciences, Director of Central Research Institute for Epidemiology, Moscow, Russia.
- ORCID ID: https://orcid.org/0000-0003-4228-9044.

Received: 18.11.2020. Accepted: 25.01.2021.

Creative Commons Attribution CC BY 4.0.