



DOI: 10.24411/9999-007A-2019-10025

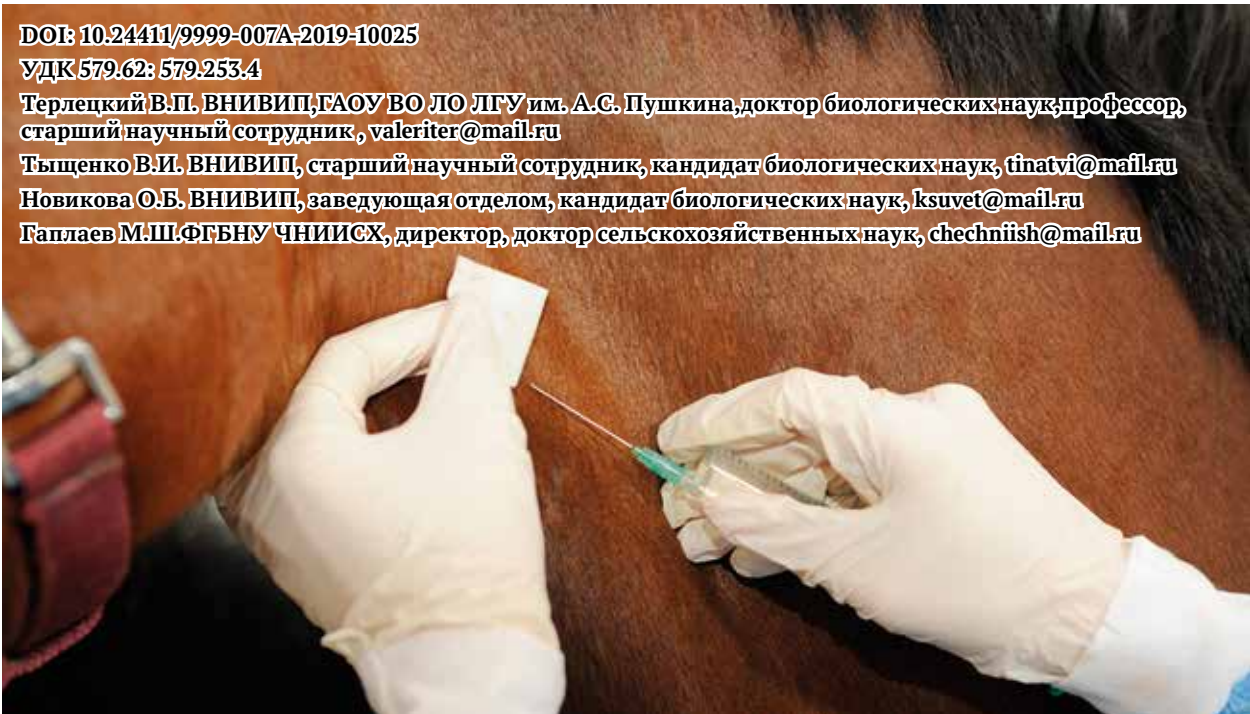
УДК 579.62: 579.253.4

Терлецкий В.П. ВНИВИП, ГАОУ ВО ЛО ЛГУ им. А.С. Пушкина, доктор биологических наук, профессор, старший научный сотрудник, valeriter@mail.ru

Тыщенко В.И. ВНИВИП, старший научный сотрудник, кандидат биологических наук, tinatvi@mail.ru

Новикова О.Б. ВНИВИП, заведующая отделом, кандидат биологических наук, ksuvet@mail.ru

Гаплаев М.Ш. ФГБНУ ЧНИИСХ, директор, доктор сельскохозяйственных наук, chechniish@mail.ru



ИДЕНТИФИКАЦИЯ ПАТОГЕННЫХ БАКТЕРИАЛЬНЫХ ШТАММОВ ЗОЛОТИСТОГО СТАФИЛОКОККА В СОВРЕМЕННОЙ ПРОФИЛАКТИЧЕСКОЙ ВЕТЕРИНАРИИ

Аннотация. Золотистый стафилококк является опасным патогеном, способным вызвать самые различные заболевания у животных и человека. В настоящее время появилось множество антибиотикорезистентных штаммов этого возбудителя. Быстрая идентификация на штаммовом уровне позволяет эффективнее проводить лечебные и профилактические мероприятия.

Ключевые слова: бактерия, золотистый стафилококк, генотипирование, молекулярная эпизоотология.

Annotation. *Staphylococcus aureus* is a dangerous pathogen that can cause diverse diseases in animals and humans. Currently, there are many antibiotic-resistant strains of this pathogen. Rapid identification at the strain level makes it possible to effectively carry out therapeutic and preventive measures.

Keywords: bacteria, *Staphylococcus aureus*, genotyping, molecular epizootology.

Введение. Вспышки инфекционных заболеваний до сих пор представляют серьёзную угрозу здоровью животных [1]. Несмотря на появление на рынке новых высокоэффективных вакцин, в ряде случаев полностью искоренить инфекционные заболевания не удастся. Более того, бесконтрольное использование в сельском хозяйстве и медицине антибиотиков привело к широкому распространению антибиотикорезистентных штаммов, в частности, золотистого стафилококка (*S.aureus*). Последний является причиной тяжелых патологических состояний, вызывая поражения кожи и внутренних органов у многих видов млекопитающих и птиц. Например, *S. aureus* является одним из основных возбудителей мастита у коров, микроорганизм выделяется более чем у 75% больных коров [2]. Таким образом, данный возбудитель приобрел печальную известность как этиологический агент многих трудноизлечимых заболеваний. В последние годы отдельные штаммы стафилококка стали резистентными одновременно к целому ряду используемых в лечении антибиотиков [3].

В этой связи быстрые методы идентификации бактериальных штаммов приобрели особую актуальность. Сравнение генетических профилей бактерий позволяет отличить эпидемические штаммы (все изоляты будут идентичными) от спорадических вспышек инфекции (изоляты отличаются). Этим же путем можно выявить пути передачи возбудителя, идентифицировать источник инфекции, что при планировании ветеринарно-санитарных мероприятий позволяет прервать эпизоотическую цепь и, таким образом, не допустить распространения заболевания. Важно также найти резистентные штаммы, чтобы подобрать эффективные антимикробные препараты.

Ранее нами была разработана методика генотипирования бактерий, основанная на двойном расщеплении и избирательном мечении фрагментов ДНК (ДРИМ). Методика была апробирована на большом количестве изолятов псевдомонад [4] в сравнении с методом пульс-гель электрофореза.

В настоящее время метод (ПГЭ) является «золотым стандартом» генотипирования в медицине для многих видов патогенов. Метод ПГЭ сравнивали

с ДРИМ, и оказалось, что последний не уступает ПГЭ по индексу дискриминации в отношении патогенных псевдомонад, но значительно быстрее и не требует дорогостоящего оборудования [1]. В рамках нашего исследования была поставлена задача сравнить ДРИМ и ПГЭ на двух группах изолятов золотистого стафилококка.

Методика

Золотистый стафилококк выращивали на дифференциально-диагностических средах, рассевали до получения отдельных колоний на чашках Петри с агаризованной средой (Рис. 1). В отдельных случаях проводили микроскопирование бактерий (Рис. 2). Отдельные колонии использовали для выращивания бактерий в жидкой среде (мясо-пептонный бульон) для последующего выделения геномной ДНК (Рис. 3).

В этом исследовании использовались два набора изолятов *S. aureus*. Первый набор включал 15 изолятов метициллинрезистентного золотистого стафилококка (MRSA), собранных в диагностической лаборатории Института микробиологии и инфекционных болезней Школы ветеринарной медицины (Ганновер, Германия) от домашних животных, поступивших в ветеринарную больницу для стационарного лечения [5]. Другой набор включал 62 изолята, полученные из образцов молока молочных коров, содержащихся в различных стадах южной Бразилии и страдающих от субклинического мастита.

Стафилококковую хромосомную ДНК экстрагировали из 1 мл ночных культур в жидкой культуральной среде. Бактериальный лизис осуществляли с помощью лизостафина и додецилсульфата натрия (SDS). Выделение ДНК основывалось на одном цикле обычной экстракции фенол-хлороформом с последующим осаждением изопропанолом.

Основная концепция ДРИМ заключается в том, что крупные макрорестрикционные фрагменты, которые продуцируются рестриктазой Cfr9I (изоизомер SmaI, который используется для типирования стафилококков в ПГЭ), могут быть уменьшены в размере путем одновременного расщепления вторым рестриктазой — NaeII, чтобы получить большое количество более мелких фрагментов, которые можно быстро отделить на обычном агарозном геле. Продукт этой реакции расщепления/мечения представляет собой характерный набор меченых фрагментов, пригодных для быстрого

электрофоретического разделения и выявления. В результате образуется своеобразный «штрих-код», который идентифицирует каждый бактериальный штамм и является ключом к быстрому эпидемиологическому анализу.

Одновременное расщепление и мечение бактериальной геномной ДНК (0,5–1 мкг) проводили с 5 единицами Cfr9I, 5 единицами NaeII, 0,2 единицы Taq-полимеразы и 0,2 мкМ биотинилированного dCTP (Bio-dCTP) в одной пробирке и буфере TangoTM. Реакционный объем доводят до 20 мкл дистиллированной водой. Время реакции составляло 60 мин, а температура инкубации составляла 37 °С.

Электрофоретические условия были следующими: 1xTAE, 20 см 0,8% агарозный гель, напряжение 5 В / см. Обычный «подводный» электрофорез в агарозном геле требовал приблизительно 3 часа для удовлетворительного разделения фрагментов ДНК по размеру.

После завершения электрофореза отделенные фрагменты непосредственно переносили на нейтральную нейлоновую мембрану. Перенос осуществляли в деонизированной воде с использованием вакуумного блоттера в течение 30 минут для последующей визуализации в цветной химической реакции.

Результаты и обсуждение

Типичный результат генотипирования группы изолятов золотистого стафилококка приведен на рисунке ДРИМ-анализ проведенный на 62 изолятах *S. aureus* с помощью ферментов Cfr9I/NaeII, выявил 38 различных бактериальных генотипов, с количеством фрагментов ДНК в диапазоне от 40 до 50 и имеющих размер приблизительно от 500 до 15 000 пар нуклеотидов.

Для сравнения, ПГЭ-типирование этих же изолятов привело к выявлению 33 генотипов, состоящим из 9–14 фрагментов в диапазоне размеров от 50 до 550 до тысяч пар нуклеотидов. 38 ДРИМ генотипов состояли из 28 уникальных генотипов, и десяти кластеров (два или более изолятов с идентичным набором фрагментов ДНК). Типирование ПГЭ, выполненное на 66 изолятах (те же 62 изолята плюс четыре дополнительных изолята), привело к детекции 21 уникального генотипа и 12 кластерам. Большой ПГЭ кластер, представляющий собой десять изолятов, делились при ДРИМ генотипировании еще на 6 групп: пять уникальных изолятов и одна группа из пяти идентичных штаммов. Значительное число изолятов были уникальными как при ПГЭ генотипировании, так и при ДРИМ генотипировании. Ин-

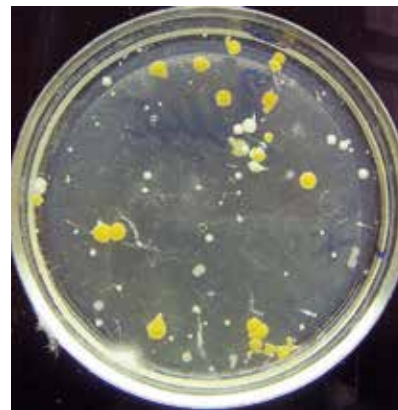


Рис. 1. Стафилококки золотистый, белый и лимонно-жёлтый в воздухе птичника — *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus citreus*, *Staphylococcus epidermidis*.

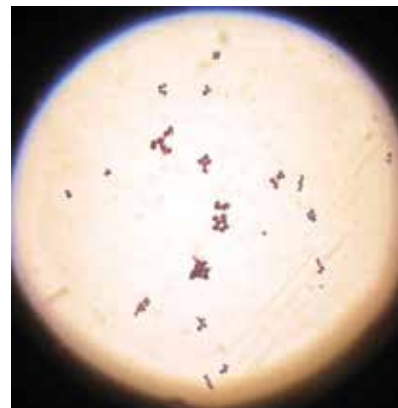


Рис. 2. Золотистый стафилококк под микроскопом.



Рис. 3. Рост золотистого стафилококка на мясопептонном бульоне МПБ с косичкой.

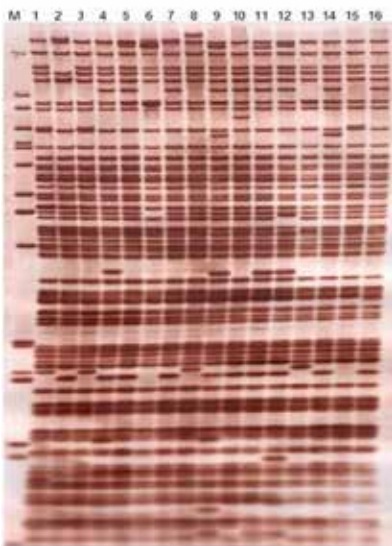


Рис. 4. Генотипирование 16 изолятов золотистого стафилококка методом ДРИМ (изоляты выделенные от кур: дорожки 1–8, изоляты, выделенные от индеек: дорожки 9–16). М — маркер молекулярных размеров фрагментов ДНК.

Таблица 1.

Сравнение ПГЭ и ДРИМ при генотипировании изолятов золотистого стафилококка

Номер штамма	ПГЭ генотипы	ДРИМ генотипы
04–3095	A1	A1
04–3097	A2	A2
04–3098	A1	A1
04–3099	A1	A3
04–3100	B2	B
04–3101	A2	A4
04–3103	A1	A3
04–3104	B1	A1
04–3105	A1	A1
04–3106	A1	A1
04–3108	A1	A1
04–3109	B1	A1
04–3110	A1	A1
04–3111	B1	A1
04–3112	A1	A1

декс дискриминации, основанный на индексе разнообразия Симпсона (<http://insilico.ehu.es/DDSLL>), рассчитанном по всем изолятам в исследовании обоими методами, составил 0,96.

Дальнейшая оценка типирования ДРИМ в сравнении с ПГЭ была проведена с использованием набора из 15 изолятов *S. aureus*, полученных от домашних животных (Таблица 1). В предыдущей работе [5] эти изоляты характеризова-

лись методом ПГЭ, при этом были определены два основных кластера (А и В) и четыре генотипа (А1 — А2 и В1 — В2).

Применение ДРИМ-типирования также выявило две группы (А и В) и пять генотипов (А1–С4 и уникальный изолят В). Четыре изолята, принадлежащие паттернам А1 и А2 PFGE (04–3098, 04–3099 и 04–3097, 04–3101 соответственно), были дополнительно разделены с помощью ДРИМ на генотипы А1, А3 и А2, А4, соответственно. Интересно, что ДРИМ-генотипирование, несмотря на более высокую дискриминационную способность, не различало ПГЭ генотипы разных кластеров А1 и В1 (изоляты 04–3104 и 04–3105).

Одним из объяснений различий между этими двумя методами идентификации бактериальных штаммов является то, что они не затрагивают одинаковые участки генома, соответственно, генетические изменения выявляются не одинаково. В этом смысле их можно рассматривать как дополнительные, а не конкурирующие методы.

Скрининг большого количества полос и, следовательно, большого количества нуклеотидных последовательностей может приводить к повышению разрешающей способности метода. В настоящем исследовании ДРИМ-типирование основывалось на 40–50 фрагментах, в отличие от 9–14 фрагментов, полученных методом ПГЭ.

Заключение. Методика генотипирования ДРИМ, ранее разработанная для псевдомонад, может успешно использоваться и в отношении патогенных штаммов золотистого стафилококка, имеющих ветеринарное значение. Сравнение генетических профилей штаммов позволяет выявить пути передачи возбудителя и найти источник инфекции.

Исследование выполнено при поддержке Государственного задания номер 160 «Усовершенствовать и разработать современные методы диагностики и создать новые препараты для контроля и профилактики болезней птиц бактериальной этиологии».

ЛИТЕРАТУРА

1. Терлецкий В.П., Тыщенко В.И., Новикова О.Б., Борисенкова А.Н., Белаш Д.Э., Яковлев А.Ф. Эффективный молекулярно-генетический метод идентификации штаммов сальмонеллы и протей // Доклады РАСХН. – 2013. – № 5. – С. 60–63.
2. Комаров В.Ю., Белкин Б.Л. Заболеваемость коров маститом и применение нового эффективного препарата для лечения его субклинической формы // Известия Оренбургского государственного аграрного университета. – 2015. – Т 3 (53). – С. 100–102.
3. Zhang L., Gao J., Barkema H.W., Ali T., Liu G., Deng Y., Naushad S., Kastelic J.P., Han B. Virulence gene profiles: alpha-hemolysin and clonal diversity in *Staphylococcus aureus* isolates from bovine clinical mastitis in China // BMC Vet. Res. – 2018. – Vol. 14. – No 1. – P. 63 doi: 10.1186/s12917-018-1374-7.
4. Terletskiy, V., G. Kuhn, P. Francioli, and D.S. Blanc. Application and evaluation of double digest selective label (DDSL) typing technique for *Pseudomonas aeruginosa* hospital isolates // J. Microbiol. Methods. – 2008. – Vol. 72. – P. 283–287.
5. Strommenger B., Kehrenberg C., Kettlitz C., Cuny C. Molecular characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains from pet animals and their relationship to human isolates // J. Antimicrob. Chemother. – 2006. – V. 57. – P. 461–465.

КАРБОСИЛ-Д

УНИВЕРСАЛЕН, КАК САМА ПРИРОДА

ООО научно-производственная фирма «ГЕОС»

НА ПРОТЯЖЕНИИ РЯДА ЛЕТ НАША ПРОДУКЦИЯ ПРИМЕНЯЕТСЯ МНОГИМИ С/Х ПРОИЗВОДИТЕЛЯМИ ДЛЯ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ В КАЧЕСТВЕ:

- минеральной сорбционной карбонатно-силикатной добавки при производстве комбикормов, премиксов и подкормки с/х животных и птицы;
- оболочки антисептической для обработки новорожденных поросят;
- наполнителя для производства ветеринарных препаратов;
- подстилки, которая создает благоприятный микроклимат в помещении при полном содержании с/х животных и птицы.

309 181, Белгородская область,
г. Губкин, ул. Мира, д. 20, оф. 301
Тел./факс (47241) 5-24-45, +7 (903) 642-84-82
E-mail: tchig1@yandex.ru

Продукция сертифицирована