

УДК 579.861.2

СРАВНИТЕЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА БИОЛОГИЧЕСКИХ СВОЙСТВ *S. AUREUS*, ВЫДЕЛЕННЫХ ОТ ЧЕЛОВЕКА И ПТИЦ

© 2015 г. Е. М. Гордина, Э. С. Горовиц

Пермский государственный медицинский университет имени академика Е. А. Вагнера, г. Пермь

Изучены в сравнительном аспекте биологические свойства штаммов *S. aureus*, изолированных от сотрудников птицефабрики, птиц и бактерионосителей. Показано, что независимо от источника выделения все штаммы обладали рядом факторов вирулентности. Все изоляты характеризовались способностью к биопленкообразованию. Несмотря на то, что индивидуальные значения толщины биопленки различных штаммов колебались в широких пределах, между средними значениями этих величин штаммов, изолированных из различных источников, статистически значимых различий не обнаружено. При изучении антибиотикочувствительности установлено, что культуры, изолированные от бактерионосителей, были чувствительны практически ко всем тестируемым препаратам. В то же время штаммы, изолированные от птиц, и ряд штаммов, выделенных от сотрудников, были устойчивы к антибиотикам, применяемым в птицеводстве. Практически все изоляты бактерионосителей лизировались типовыми бактериофагами набора «Ч» («человека»). Большая часть штаммов, выделенных от птиц, и треть штаммов, изолированных от сотрудников, не были чувствительны к действию данных бактериофагов. Культуры, изолированные от бактерионосителей, отнесены к экварианту А («человека»). К этому же экварианту отнесен ряд штаммов, изолированных от птиц и сотрудников птицефабрики, тогда как большинство «птичьих» культур *S. aureus* отнесены к экварианту В («куриный»). Таким образом, в условиях птицефабрики наблюдается обмен штаммами *S. aureus* между сотрудниками и птицами.

Ключевые слова: *S. aureus*, биологические свойства, источники выделения

COMPARATIVE CHARACTERISTICS OF BIOLOGICAL PROPERTIES OF *S. AUREUS* ISOLATED FROM HUMANS AND BIRDS

E. M. Gordina, E. S. Gorovitz

Perm State Medical University named after Academician E. A. Wagner, Russia

The purpose of this study was to investigate biological properties of *S. aureus* isolated from a poultry plant staff, birds and bacteria carriers. Almost all the isolates of *S. aureus* had a number of virulence factors. All strains of *S. aureus* were characterized by an ability to form biofilms. In spite of the fact that individual values of biofilm biomass of different strains varied widely, there were no significant statistical differences between the mean values of these strains isolated from various sources. The study of antibiotic susceptibility revealed that the cultures isolated from bacteria carriers were sensitive to a wide spectrum of antibacterial agents. At the same time, strains isolated from the birds and a number of strains isolated from the staff were resistant to antibacterial agents used in poultry keeping. Almost all the isolates of bacteria carriers were lysed by typical bacteriophages of the "H" set ("Human"). Most of the isolates from the birds and the third part of the staff-strains were not sensitive to bacteriophages. The cultures isolated from the bacteria carriers belonged to the Ekovar A ("Human"). Some strains isolated from the birds and the poultry farm staff also belonged to this Ekovar, while most of the "bird" *S. aureus* cultures belonged to the Ekovar B ("Chicken"). Thus at the poultry farm, there was observed an exchange of *S. aureus* strains among the staff and the birds.

Keywords: *S. aureus*, biological properties, sources of isolation

Библиографическая ссылка:

Гордина Е. М., Горовиц Э. С. Сравнительная характеристика биологических свойств *S. aureus*, выделенных от человека и птиц // Экология человека. 2015. № 5. С. 52–56.

Gordina E. M., Gorovitz E. S. Comparative Characteristics of Biological Properties of *S. Aureus* Isolated from Humans and Birds. *Ekologiya cheloveka* [Human Ecology]. 2015, 5, pp. 52-56.

Стафилококки являются одними из самых распространенных микроорганизмов. Они могут быть причиной различных заболеваний человека, начиная от банальных гнойничковых процессов и заканчивая инфекциями, связанными с оказанием медицинской помощи. Эти микроорганизмы, и прежде всего *S. aureus*, издавна служат объектом изучения различных исследований. Как следствие их биологические свойства, в том числе и факторы патогенности, описаны достаточно полно. В то же время биологические свойства *S. aureus*, колонизирующих птиц, изучены недостаточно. Тем не менее, по данным Andrea T. Febler et al. [5], различные виды стафило-

кокков широко циркулируют в условиях птицефабрики. Инфицированность метициллинрезистентными *S. aureus* выявлена в 25 % проб куриного мяса. Об особенностях колонизации и выживания стафилококков на всех этапах переработки мяса птицы сообщают Geert Huys et al. [6]. Представляется, что в условиях птицефабрики штаммы, изолированные от птиц, обладающие набором факторов вирулентности, могут инфицировать человека.

Цель настоящей работы — изучение в сравнительном аспекте биологических свойств *S. aureus*, изолированных от кур и сотрудников птицефабрики. Задачи исследования: определение частоты встреча-

емости *S. aureus* у сотрудников птицефабрик и птиц; определение частоты бактерионосительства *S. aureus* у практически здоровых лиц, не связанных в своей профессиональной деятельности с птицами; изучение в сравнительном аспекте основных биологических свойств штаммов *S. aureus*, изолированных от сотрудников птицефабрики, птиц и бактерионосителей.

Методы

Проведено бактериологическое обследование на стафилококковое бактерионосительство 47 сотрудников птицефабрики (группа изучения), непосредственно контактирующих с птицей, и 29 практически здоровых студентов Пермского медицинского университета (группа сравнения). Материал забирали стерильными ватными тампонами со слизистых носа и зева, исследовали также смывы с рук всех обследуемых лиц. Исследование проводили в соответствии со стандартами Хельсинкской декларации 1975 года и ее пересмотра 1983-го с положительным заключением комитета по этике при ГБОУ ВПО «Пермский государственный медицинский университет имени академика Е. А. Вагнера» (ПГМУ).

Выполнено также бактериологическое исследование 153 образцов внутренних органов птиц: печени, сердца, селезенки, легких. Материал получали от бройлеров различных возрастов (от 2 до 45 суток) в процессе санитарного забоя.

Посевы осуществляли традиционным методом с использованием желточно-солевого агара в соответствии с Приказом МЗ СССР № 535 [3].

Выделенные культуры стафилококков идентифицировали главным образом на основании изучения биохимических свойств, используя «Staphytest 24» (ERBA LACHEMA, Чехия). Оценку результатов осуществляли с помощью компьютерной программы «Микроб-2». Для изучения биологических свойств в исследование включены все выделенные штаммы *S. aureus* независимо от источника.

Гемолитическую активность выделенных культур определяли на кровяном агаре, лецитовителлазную (ЛВ) — на желточно-солевом [3]. Изучение ДНК-азной активности проводили на DNase Test Agar, производства Испании, в соответствии с инструкцией производителя.

Биопленкообразующую способность штаммов *S. aureus* изучали в 96-луночных полистироловых планшетах для иммуноферментного анализа (Мед-полимер, Россия). В 6 лунок каждого ряда планшета вносили по 100 мкл инокула определенного штамма *S. aureus*, содержащего 10^7 КОЕ/мл, после чего планшеты инкубировали в течение 24 часов в термостате (37 °С). Через сутки планктонную культуру из всех лунок удаляли, биопленки дважды аккуратно промывали 10 мМ фосфатным буфером (рН 7,2), затем окрашивали 0,1 % раствором генцианвиолета с последующей спиртовой экстракцией связавшегося красителя для оценки общей биомассы образовавшихся пленок. Детекцию окрашенных экстрактов

биопленок осуществляли на ридере Benchmark Plus (BioRad, США) при длине волны 570 нм (O'Toole G., 2011).

Антибиотикочувствительность изолированных штаммов определяли диско-диффузионным методом в соответствии с МУК 2004 года [2]. В качестве тестируемых использовали препараты, рекомендованные МУК для определения антибиотикочувствительности стафилококков, а также с учетом частоты их применения в лечебной практике и на предприятиях птицепрома: бета-лактамы препараты (оксациллин, цефокситин), тетрациклины (доксциклин), фторхинолоны (левофлоксацин), аминогликозиды (амикацин), линкозамиды (линкомицин).

Фаготипирование осуществляли с помощью международного набора «Стафилококковые бактериофаги типовые диагностические сухие» (набор «Ч»), производства Медгамал (филиал ГУ НИИЭМ им. Н. Ф. Гамалеи РАМН) в соответствии с прилагаемой инструкцией.

Определение эковариантов *S. aureus* проводили на среде с кристаллическим фиолетовым [1].

Для статистической обработки полученных данных использовали программу Statistica 6.0. Если количественные данные подчинялись закону нормального распределения, то рассчитывали среднее арифметическое значение признака (M), а также стандартное отклонение (SD) и выражали в виде $M \pm SD$.

Сравнение бинарных признаков осуществляли с помощью точного критерия Фишера однонаправленного (p) при построении четырехпольной таблицы сопряженности.

В случае, если распределение признака по критерию Шапиро — Уилкса не было нормальным, сравнение величин полученных значений проводили с помощью критерия Манна — Уитни (p). О статистически значимых различиях полученных результатов в сравниваемых группах судили по величине цифровых значений p . Критическим уровнем значимости принимался в данном исследовании 0,05.

Результаты

В результате бактериологического исследования 141 пробы биологического материала от сотрудников, 87 — от студентов и 612 образцов патматериала птиц всего было выделено 40 штаммов *S. aureus*, в том числе 10 от сотрудников, 13 от студентов (бактерионосителей) и 17 от птиц.

В серии специальных наблюдений изучены факторы вирулентности всех изолированных штаммов *S. aureus* (табл. 1).

Независимо от источника выделения изоляты обладали определенным набором факторов вирулентности. Практически все штаммы, изолированные от студентов, проявляли гемолитическую и ДНК-азную активность. Штаммы *S. aureus*, выделенные от сотрудников, и особенно от птиц, реже обуславливали гемолиз. Последние статистически значимо чаще обладали лецитовителлазной активностью. Большинство

Таблица 1

Факторы вирулентности штаммов *S. aureus*, выделенных из различных источников

Источник (количество штаммов)	Частота встречаемости признака					
	Гемолитическая активность		ЛВ активность		ДНК-азная активность	
	Абс. (%)	<i>p</i>	Абс. (%)	<i>p</i>	Абс. (%)	<i>p</i>
Птицы (<i>n</i> = 17)	5 (29,41 ± 7,13)	–	14 (82,35 ± 19,92)	–	14 (82,35 ± 19,92)	–
Сотрудники (<i>n</i> = 10)	6 (60,00 ± 16,04)	0,121	4 (40,00 ± 10,69)	0,032	8 (80,00 ± 21,38)	0,612
Студенты (<i>n</i> = 13)	12 (92,31 ± 25,60)	<0,001	5 (38,46 ± 10,67)	0,024	12 (92,31 ± 25,60)	0,432

Примечание. *p* – значимость различий со штаммами *S. aureus*, выделенными от птиц.

изолированных штаммов, независимо от источника получения, характеризовались наличием ДНК-азы.

В качестве одного из факторов персистенции исследовали био пленкообразующую способность стафилококков. Образование биопленок регистрировали у всех 40 штаммов *S. aureus* (табл. 2).

Таблица 2

Био пленкообразование штаммов *S. aureus*, выделенных из различных источников

Источник (количество штаммов)	Средние значения толщины биопленки, единицы оптической плотности	<i>p</i>
Птицы (<i>n</i> = 17)	0,525±0,127	–
Сотрудники (<i>n</i> = 10)	0,517±0,164	0,844
Студенты (<i>n</i> = 13)	0,416±0,034	0,171

Примечание. *p* – значимость различий со штаммами *S. aureus*, выделенными от птиц.

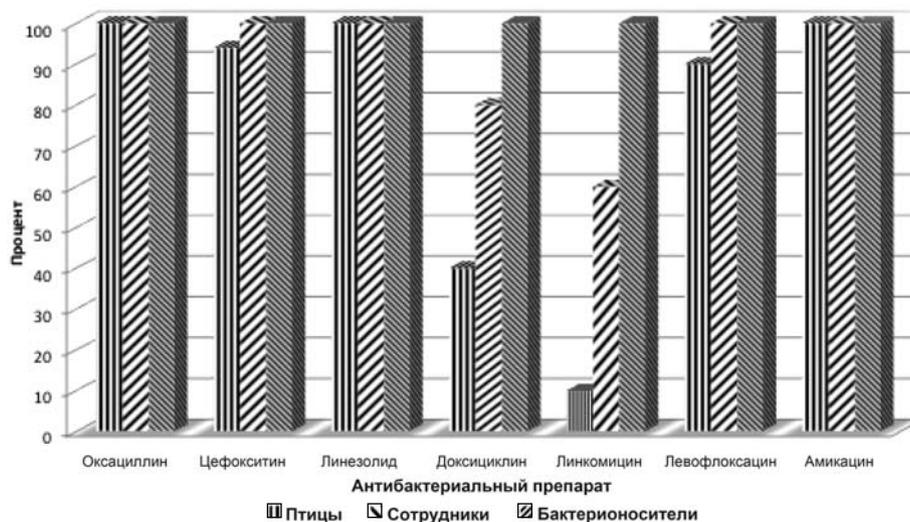
Спектр полученных значений у разных штаммов *S. aureus* варьировал в широких пределах от 0,167 до 0,994. При сопоставлении средних значений толщины биопленки установлено, что они были более выражены у «птичьих» штаммов *S. aureus*, однако различия между степенью выраженности биопленки штаммов из различных источников не были статистически значимы.

Изучена антибиотикочувствительность изолированных культур *S. aureus* (рисунок).

Независимо от источника выделения все штаммы были чувствительны к бета-лактамам антибиотикам, а также к аминогликозидам (амикацин). В то же время если все культуры, изолированные от сотрудников и студентов были чувствительны к фторхинолонам (левофлоксацин), то (10,00 ± 0,54) % штаммов птиц были к ним резистентны. Аналогичная закономерность выявлена в отношении чувствительности к тетрациклинам (доксициклин). Отмечен также высокий удельный вес резистентных штаммов *S. aureus* к линкозамидам, а именно к линкомицину (90,00 ± 4,87) % «птичьих» и (40,00 ± 3,27) % от сотрудников, тогда как все культуры *S. aureus*, выделенные от бактерионосителей, были к нему чувствительны.

Проведено фаготипирование выделенных штаммов *S. aureus* (табл. 3).

Из представленных данных следует, что практически 65 % культур птиц не были чувствительны к действию бактериофага, тогда как подавляющее число штаммов, изолированных от бактерионосителей, лизировались данными бактериофагами (II фагогруппа). Среди штаммов *S. aureus*, выделенных от птиц и от сотрудников птицефабрики, преобладали I и III фагогруппы. При этом чаще регистрировали I фагогруппу (30 % штаммов от сотрудников, 30 % «птичьих»).



Распределение штаммов *S. aureus*, выделенных из различных источников, по чувствительности к анализируемым антибактериальным препаратам

Таблица 3
Распределение штаммов *S. aureus*, выделенных из различных источников, по фагогруппам

Фаго-группа	Источники <i>S. aureus</i> , количество штаммов					
	Птицы (n = 17)		Сотрудники (n = 10)		Студенты (n = 13)	
	Абс	%	Абс	%	Абс	%
I	5	29,41 ± 7,13	3	30,00 ± 9,49	1	7,69 ± 2,13
II	–	–	–	–	9	69,23 ± 19,20
III	1	5,88 ± 1,43	2	20,00 ± 6,32	2	15,38 ± 4,27
IV	–	–	–	–	–	–
Нетипируемые	11	64,71 ± 15,69	5	50,00 ± 15,81	1	7,29 ± 2,13

В последующем определены эковарианты изолированных культур *S. aureus*. За основу были взяты результаты изучения гемолитической активности, способности коагулировать цитратную плазму кролика, отношение к бактериофагам и типы колоний на среде с кристаллическим фиолетовым (табл. 4).

Таблица 4
Эковарианты штаммов *S. aureus*, выделенных из различных источников

Эковариант	Источники <i>S. aureus</i> , количество штаммов					
	Птицы (n = 17)		Сотрудники (n = 10)		Студенты (n = 13)	
	Абс.	%	Абс.	%	Абс.	%
A	6	35,29 ± 8,56	5	50,00 ± 15,81	9	69,23 ± 19,20
B	9	52,94 ± 12,84	5	50,00 ± 15,81	–	–
C	–	–	–	–	–	–
D	2	11,76 ± 2,85	–	–	–	–
Прочие	–	–	–	–	4	30,77 ± 4,87

Как можно было ожидать, практически все штаммы, изолированные от бактерионосителей, относились к биотипу А («человеческий»); 50 % штаммов аналогичного типа было изолировано от сотрудников. Следует отметить, что более трети штаммов *S. aureus*, выделенных от птиц, также относились к этому биотипу. Более половины изолятов птиц принадлежали к эковарианту В («куриный»). К этому же эковарианту было отнесено и 50 % штаммов, изолированных от сотрудников.

Обсуждение результатов

Как уже указывалось, от сотрудников птицефабрики из различных локусов, главным образом полости носа и зева, было изолировано 10 штаммов *S. aureus* (инфицированность 21,3 %). Среди 29 практически здоровых лиц (студентов ПГМУ) выявлено 13 (инфицированность 44,8 %).

Пробы внутренних органов кур были контаминированы *S. aureus* в 11,1 % случаев.

Сравнительная характеристика основных факторов вирулентности у изолированных культур показала, что все изученные штаммы обладали этими свойствами. В то же время не было выявлено четких закономерностей в отношении наличия тех или иных факторов вирулентности в зависимости от источника получения *S. aureus*.

Что касается биопленкообразования, то, по существу, все изученные штаммы обладали этим признаком, причем различия между степенью его выраженности у штаммов, изолированных из различных источников, не были статистически значимы.

При изучении антибиотикочувствительности обнаружено, что большинство изолятов *S. aureus*, выделенных от сотрудников и птиц, по своей антибиотикограмме были близки друг к другу. На резистентность этих штаммов, особенно «птичьих», существенно влияло их перманентное использование в условиях птицефабрики. Так, линкомицин, к которому отмечена наибольшая устойчивость, входит в состав комбинированных препаратов, применяемых в птицеводстве (в частности, «Акваприм»). Полученные данные отражают причину формирования резистентности «птичьих» штаммов к данным антибактериальным препаратам. Следует также отметить, что у отдельных штаммов *S. aureus*, выделенных от сотрудников, регистрировали аналогичную антибиотикорезистентность, что свидетельствует о возможной контаминации сотрудников «птичьими» штаммами *S. aureus*.

Штаммы *S. aureus*, изолированные от бактерионосителей, были чувствительны к действию бактериофагов II группы. В то же время штаммы, изолированные от птиц, в основном были чувствительны к иным бактериофагам (I и III фагогруппы). К этим же группам бактериофагов была чувствительна часть штаммов, изолированных от сотрудников. В этой связи следует подчеркнуть, что использованный набор бактериофагов предназначен для типирования стафилококков, колонизирующих человека. Часть штаммов, как и следовало ожидать, были не чувствительны к действию данных бактериофагов.

В заключение были определены эковарианты выделенных штаммов *S. aureus*. Практически все изоляты от бактерионосителей отнесены к эковарианту А («человеческий»). К этому же эковару были отнесены и 35 % штаммов от птиц, тогда как их большая часть принадлежала к биовару В («куриный»). Среди штаммов, изолированных от сотрудников птицефабрики, встречались как эковариант А, так и эковариант В.

Следовательно, анализ изученных биологических свойств выделенных культур *S. aureus*, а также их антибиотикочувствительности, определение фаголизабельности и эковариантов показал, что в условиях птицефабрики между сотрудниками и птицами происходит обмен штаммами *S. aureus*. Наличие ряда факторов вирулентности у «птичьих» культур может представлять потенциальную угрозу для здоровья сотрудников. Особый интерес представляют данные,

указывающие на наличие у птиц штаммов, по своим характеристикам близких к штаммам человека.

Список литературы

1. Акатов А. К., Зуева В. С. Стафилококки. М.: Медицина, 1983. 256 с.
2. МУК 4.2.1890-04. Методы контроля. Биологические и микробиологические факторы. Определение чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препаратам. М.: Федеральный центр Госсанэпиднадзора МЗ России, 2004. 91 с.
3. Об унификации микробиологических методов исследования, применяемых в клинико-диагностических лабораториях лечебно-профилактических учреждениях: Приказ МЗ СССР № 535 от 22.04.1985 г.
4. Реброва О. Ю. Статистический анализ медицинских данных. Применение пакета прикладных программ. М.: МедиаСфера, 2002. 321 с.
5. Feßler A. T., Kadlec K., Hauschild M. H. T., Eidam Ch., Ehrlich R., Monecke S., Schwarz S. Characterization of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Isolates from Food and Food Products of Poultry Origin in Germany // *Applied and Environmental Microbiology*. 2011. Vol. 77. P. 7151–7157.
6. Huys G., D'Haene K., van Eldere J., von Holy A., Swings J. Molecular Diversity and Characterization of Tetracycline-Resistant *Staphylococcus aureus* Isolates from a Poultry Processing Plant // *Applied and Environmental Microbiology*. 2005. Vol. 71, N 1. P. 574–579.

References

1. Akatov A. K., Zueva V. S. *Stafilokokki* [Staphylococcus]. Moscow, Meditsina Publ., 1983. 256 p.
2. МУК 4.2.1890-04. *Metody kontrolya. Biologicheskie i mikrobiologicheskie faktory. Opredelenie chuvstvoitel'nosti*

mikroorganizmov k antibakterial'nym preparatam [Guidelines for Susceptibility Testing of Microorganisms to Antibacterial Agents]. Moscow, Federal'nyy tsentr Gossanepidnadzora MZ Rossii, 2004, 91 p.

3. *Ob unifikatsii mikrobiologicheskikh metodov issledovaniya, primenyaemykh v kliniko-diagnosticheskikh laboratoriyakh lechebno-profilakticheskikh uchrezhdeniy* [On the harmonization of microbiological (bacteriological) methods in clinical diagnostic laboratories health facilities]. Prikaz MZ SSSR no 535 ot 22.04.1985 g.

4. Rebrova O. Yu. *Statisticheskii analiz meditsinskih dannyh. Primenenie paketa prikladnyh program* [Statistical analysis of medical data. The use of the application package]. Moscow, MediaSfera Publ., 2002, 321 p.

5. Feßler A. T., Kadlec K., Hauschild M. H. T., Eidam Ch., Ehrlich R., Monecke S., Schwarz S. Characterization of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Isolates from Food and Food Products of Poultry Origin in Germany. *Applied and Environmental Microbiology*. 2011, 77, pp. 7151-7157.

6. Huys G., D'Haene K., van Eldere J., von Holy A., Swings J. Molecular Diversity and Characterization of Tetracycline-Resistant *Staphylococcus aureus* Isolates from a Poultry Processing Plant. *Applied and Environmental Microbiology*. 2005, 71 (1), pp. 574-579.

Контактная информация:

Гордина Екатерина Михайловна – аспирант кафедры микробиологии, вирусологии с курсом клинической лабораторной диагностики ГБОУ ВПО «Пермский государственный медицинский университет имени академика Е. А. Вагнера» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Адрес: 614000, г. Пермь, ул. Петропавловская, д. 26
E-mail: kate_alex.07@mail.ru