

С.С. Бакшеева

БИОЛОГИЧЕСКИЕ И ГЕНОТИПИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ КУЛЬТУР СТАФИЛОКОККА, ВЫДЕЛЕННЫХ ОТ ДЕТЕЙ, ПРОЖИВАЮЩИХ В ЭКОЛОГИЧЕСКИ НЕБЛАГОПОЛУЧНОМ РАЙОНЕ ГОРОДА КРАСНОЯРСКА

В статье представлен анализ генетического типирования с помощью RAPD-ПЦР культур стафилококка, выделенных от школьников младших классов, проживающих в экологически неблагоприятном районе г. Красноярск.

Ключевые слова: г. Красноярск, неблагоприятный район, генетическое типирование, RAPD-ПЦР культуры стафилококка, школьники младших классов.

S.S. Baksheeva

BIOLOGICAL AND GENOTYPIC PECULIARITIES OF THE STAPHYLOCOCCUS CULTURES ISOLATED FROM CHILDREN LIVING IN THE ECOLOGICALLY UNFAVORABLE AREA OF KRASNOYARSK CITY

The genetic typing analysis with the use of RAPD-PCR Staphylococcus cultures isolated from the junior class schoolchildren living in the ecologically unfavorable area of Krasnoyarsk city is presented in the article.

Key words: Krasnoyarsk, unfavorable area, genetic typing, RAPD-PCR Staphylococcus cultures, junior class schoolchildren.

Введение. В связи с техногенным загрязнением окружающей среды отмечается рост числа разных форм дисбиоза у человека. Одной из форм нарушения нормальной микрофлоры является стафилококковое бактерионосительство, которое следует рассматривать как одну из форм инфекционного процесса, с отсутствием клинически выраженных патологических изменений, но с развитием иммунопатологических реакций и антительного ответа [1, 2]. Носители патогенных стафилококков часто являются основным источником внутрибольничных инфекций. По данным О.В. Бухарина и др., широта стафилококкового носительства иллюстрируется эпидемиологическими наблюдениями, показывающими, что 20 % населения являются резидентными носителями, 70 % – транзиторными, и только у 10 % возбудитель постоянно отсутствует.

Детское население в большей степени подвержено воздействию неблагоприятных экологических факторов, причем наиболее чувствительным индикатором в отношении воздействия различных поллютантов, по мнению М.Я. Студеникина, являются дети 8–12 лет [4].

Цель работы. Генетическое типирование с помощью RAPD-ПЦР культур стафилококка, выделенных от школьников младших классов, проживающих в экологически неблагоприятном районе города Красноярск.

Материалы и методы. Было обследовано 59 учащихся, проживающих в экологически неблагоприятном районе города Красноярск. Уровень загрязнения воздушной среды техногенными факторами оценивали по материалам доклада о санитарно-эпидемиологической обстановке в Красноярском крае (2007 г.).

Обследуемые дети в возрасте 8–9 лет относились к 1-й и 2-й группам здоровья и проживали в данном районе города более 3 лет.

Выделение и идентификацию стафилококков проводили общепринятыми методами [5]. При определении видовой принадлежности штаммов использовали микротесты фирмы «Lachema» (Чехия).

При обследовании школьников на стафилококковый биоценоз исследуемый материал (клетки эпителия слизистой носа) засеивали на чашки с желточно-солевым агаром. После инкубировали при 37°C в течение 24–48 часов, затем производили количественную и качественную оценку выросших колоний, расчет показателя микробной обсемененности (ПМО).

Число микробных клеток 10^3 и более на тампон является показателем высокой обсемененности и свидетельствует о бактерионосительстве, представляющем эпидемическую опасность.

Тип стафилококкового бактерионосительства определяли по антилизоцимной активности (АЛА) штамма. При наличии у золотистых стафилококков АЛА-признака бактерионосителей относили к резидентным [3].

У выделенных штаммов стафилококков определяли факторы вирулентности и персистенции. Факторы вирулентности (гемолитическую активность, продукцию ферментов плазмакоагулазы, лецитоветиллазы) исследовали по общепринятым методикам [6]. Факторы персистенции – антилизоцимную активность определяли по методике О.В. Бухарина с соавт. Генотипирование выделенных культур золотистого стафилококка проводили методом RAPD-ПЦР со случайным олигонуклеотидным праймером, размером 10 нуклеотидов Sh1 (Short 1) – AATCGGGCTG [7]. Статистический анализ данных выполнялся на персональном компьютере Pentium IV с помощью пакета прикладных программ Statistica 6.0.

Результаты исследования. При бактериологическом исследовании смывов со слизистой носа обследуемых школьников было выделено и идентифицировано 39 культур стафилококков, 20 из них были идентифицированы как *S. aureus*.

Сравнительные данные по носительству школьниками штаммов *S. aureus* с факторами вирулентности и персистенции представлены в таблице, из которой следует, что все выделенные штаммы золотистого стафилококка обладали плазмакоагулазной и лецитоветиллазной активностью. У стафилококков наиболее характерным фактором вирулентности является продукция экзотоксина – гемолизина (β -гемолитическая активность) и у 85 % выделенных штаммов этот признак присутствует.

Что касается фактора персистенции – антилизоцимной активности, то АЛА характерна для 85 % изученных культур, причем штаммы, обладающие антилизоцимной активностью, являлись гемолитическими.

Характеристика биологических свойств *S. aureus*, выделенных от школьников, проживающих в экологически неблагоприятном районе г. Красноярск

Номер штамма	Класс, пол обследуемого	β -гемолитическая активность	Лецитоветиллаза	Плазмакоагулаза	АЛА
1	2 б, жен.	+	+	+	+
2	2 в, жен.	-	+	+	-
3	2 б, жен.	+	+	+	+
4	2 б, муж.	+	+	+	+
5	2 б, муж.	+	+	+	+
6	2 в, жен.	+	+	+	+
7	2 б, жен.	+	+	+	+
8	2 в, жен.	+	+	+	+
9	2 б, жен.	+	+	+	+
10	2 в, жен.	+	+	+	+
11	2 б, муж.	+	+	+	+
12	2 в, муж.	-	+	+	-
13	2 б, муж.	+	+	+	+
14	2 б, жен.	+	+	+	+
15	2 в, жен.	+	+	+	+
16	2 б, муж.	+	+	+	+
17	2 б, жен.	+	+	+	+
18	2 б, жен.	+	+	+	+
19	2 б, жен.	+	+	+	+
20	2 в, жен.	-	+	+	-

Следующим этапом нашей работы являлось генетическое типирование выделенных штаммов стафилококка.

В результате типирования была получена электрофоретическая картина RAPD-ПЦР 20 штаммов *S. aureus* (рис.1), на основе которых была построена дендрограмма (рис. 2) с помощью

программного обеспечения TreeCon. Установлено наличие 6 генотипов среди исследованных 20 штаммов *S.aureus*.

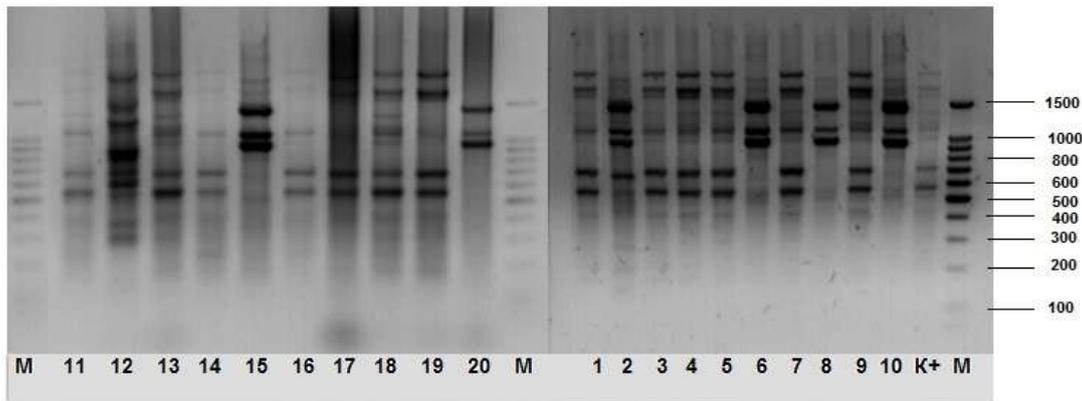


Рис. 1. Генетическое типирование штаммов золотистого стафилококка с помощью RAPD- ПЦР

Общепринято, что если показатель степени генетического родства равен 0,8 и выше, то это характеризует высокую степень генотипического сходства исследуемой выборки штаммов. Если 0,6–0,8 – умеренный; 0,4–0,6 – низкий; если сравниваемые штаммы имеют показатель ниже, чем 0,4, то фактически они являются генотипически неродственными.

В 1-й генотип входили 8 штаммов под № 13, 18, 7, 9, 5, 4, 3, 1 (индекс генетического сходства 1). В результате амплификации образовалось 9 ампликонов длиной от 300 до 1500 нп (нуклеотидные пары) и выше.

У штаммов, относящихся ко 2-му генотипу (№ 16, 17, 19, 11, 14), при изучении электрофоретических профилей выявлены 6 ампликонов длиной от 400 до 1500 нп и выше (гомология 100%).

В 6-й генотип входили 4 изолята (№ 6, 8, 10, 15), которые образовали по 6 ампликонов длиной от 500 до 1500 нп и выше.

Степень генетического родства у 1-го и 2-го генотипов составляет 85 % (т.е. высокая степень генетического родства). У 3-го генотипа степень генетического родства с 1-м и 2-м генотипами составляет 40 % (низкая степень родства).

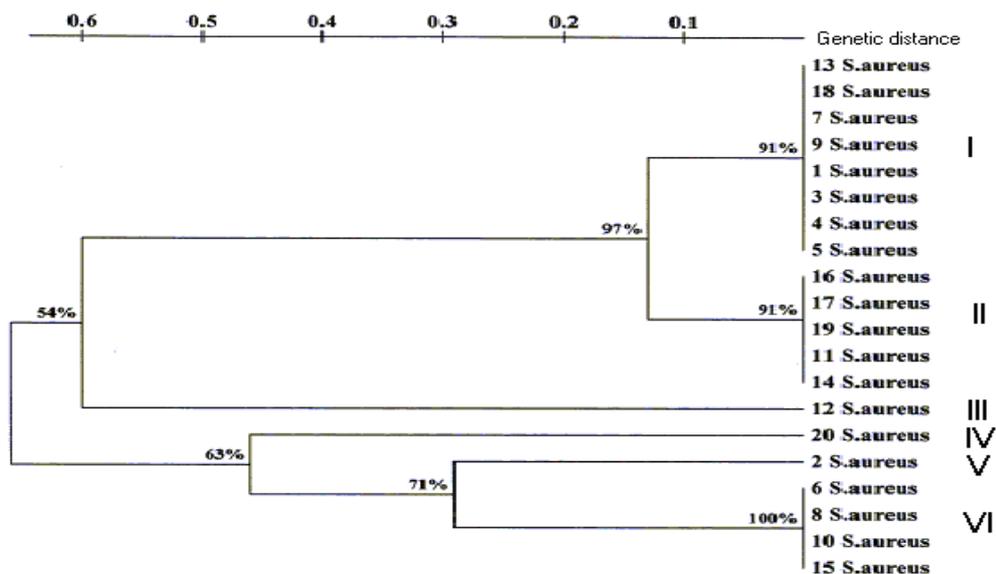


Рис. 2. Дендрограмма изолятов золотистых стафилококков, выделенных от учащихся младших классов, проживающих в экологически неблагополучном районе города Красноярска

Выводы. Таким образом, при анализе полученных результатов следует, что штаммы золотистого стафилококка, относящиеся к 1-му и 2-му генотипу, обладали высокой гемолитической и антилизоцимной активностью и при этом были выделены от учащихся одного класса.

Литература

1. Бухарин О.В., Усвяцов Б.Я. Бактерионосительство (медико-экологический аспект). – Екатеринбург: Изд-во УрО РАН, 1996. – С.13–19.
2. Бухарин О.В. Персистенция патогенных бактерий. – М.: Медицина, 1999.
3. Метод определения антилизоцимной активности микроорганизмов / О.В. Бухарин, Б.Я. Усвяцов, А.П. Малышкин [и др.] // ЖМЭИ. – 1984. – № 2. – С. 27–29.
4. Студеникин М.Я., Ефимова А.А., Лицева О.А. // Педиатрия – 1989. – № 8.– С. 5–9.
5. Справочник по микробиологическим и вирусологическим методам исследования // под ред. М.О. Биргера. – М., 1982.
6. Стафилококки и стафилококковая инфекция. – Саратов: Изд-во Саратов. ун-та, 1980. – С. 18–23.
7. Lee W.Riley. Molecular Epidemiology of Infectious Diseases. Principles and Practices. – ASM Press, 2004.

