АНАЛИЗ СМЕРТНОСТИ ОТ ПНЕВМОНИИ ОБЕЗЬЯН, СОДЕРЖАЩИХСЯ В УСЛОВИЯХ НЕВОЛИ, И МЕСТО МЕТИЦИЛЛИНЧУВСТВИТЕЛЬНОГО *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* (MRSA) В СПЕКТРЕ ВЫДЕЛЕННОЙ МИКРОФЛОРЫ

В. А. Калашникова¹, А. В. Демерчян²

¹ Ведущий научный сотрудник, кандидат биологических наук, ФГБНУ «НИИ МП», г. Сочи, Россия, e-mail: vikky.aw@gmail.com

² Младший научный сотрудник, ФГБНУ «НИИ МП», г. Сочи, Россия

РЕЗЮМЕ

Представлен анализ смертности обезьян различных видов, содержащихся в условиях неволи, от пневмонии за 2017 г. Показана частота гибели животных и сезонность. Смертность детенышей и старых обезьян от пневмонии превышает таковую среди подростков и взрослых животных. Максимальный показатель смертности обезьян от пневмонии отмечен в феврале, апреле и мае. Установлен спектр микроорганизмов, выделенных из легких погибших животных. Преобладающей бактериальной флорой, обнаруживаемой при пневмониях, оказались *Staphylococcus aureus* (43,1%) и *Escherichia coli* (34,9%), выявленные как в монокультуре, так и в ассоциациях. Одной из особенностей пневмоний у обезьян является наличие высокой частоты полимикробных ассоциаций. Наиболее часто *S. aureus* встречается в сочетаниях с *E. coli* (52,5%). Все выделенные культуры *S. aureus* были метициллинчувствительными и не имели в своем геноме гена *mecA*. При бактериологическом исследовании аутопсийного материала возможна контаминация образцов легочной ткани посторонней флорой, поэтому утвердительно говорить о роли тех или иных микроорганизмов как основных возбудителей заболевания достаточно трудно.

Ключевые слова: обезьяны, пневмония, *Staphylococcus aureus*, энтеробактерии, микробные ассоциации.

UDC 619:616.24-002:599.82

ANALYSIS OF PNEUMONIA- ASSOCIATED MORTALITY OF MONKEYS IN CAPTIVITY AND THE ROLE OF METHICILLIN-SENSITIVE *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* (MRSA) IN THE RECOVERED MICROFLORA SPECTRUM

V. A. Kalashnikova¹, A. V. Demerchyan²

¹ Leading Researcher, Candidate of Science (Biology), FSBSI "SRI MP", Sochi, Russia, e-mail: vikky.aw@gmail.com

² Junior Researcher, FSBSI "SRI MP", Sochi, Russia

SUMMARY

Pneumonia-associated mortality of different monkey species in captivity in 2017 has been analyzed. The animal death frequency and seasonality was demonstrated. Pneumonia-associated mortality in baby monkeys and old monkeys exceeds the mortality of infants and mature animals. The maximum pneumonia-mortality rate in monkeys was observed in February, April and May. The spectrum of microorganisms recovered from lungs of dead animals was identified. The prevailing bacterial flora detected in case of pneumonia was *Staphylococcus aureus* (43.1%) and *Escherichia coli* (34.9%), which were detected both in monoculture and communities. One of the peculiarities of pneumonia in monkeys is high occurrence of polymicrobial communities. Most frequently *S. aureus* is observed in combinations with *E. coli* (52.5%). All recovered *S. aureus* cultures were methicillin-sensitive and did not have gene *mecA* in their genome. During performance of bacteriological tests of autopsy material the lung tissue samples can get contaminated with the foreign flora that's why it's quite difficult to speak about the role of these and those microorganisms as major disease agents.

Key words: monkeys, pneumonia, *Staphylococcus aureus*, enterobacteria, microbial communities.

ВВЕДЕНИЕ

Пневмония – одно из самых распространенных в мире заболеваний, являющееся полиэтиологическим, преимущественно бактериальной, вирусной и вирусно-бактериальной природы. Способностью вызывать пневмонию обладает широкий спектр возбудителей как патогенных, так и условно-патогенных [1, 6]. Исследования последних десятилетий показывают, что у людей наиболее частыми возбудителями являются *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) [3, 5, 6, 8–10, 12]. Согласно литературным данным, в настоящее время *S. aureus*, в том числе метициллинустойчивый золотистый стафилококк (MRSA), продолжает оставаться одним из наиболее распространенных патогенных микроорганизмов, вызывающих опасные инвазивные инфекции у людей и животных [11]. Однако в последние годы в этиологии пневмоний отмечается возрастание роли грамотрицательных микроорганизмов, таких как *Escherichia coli* (*E. coli*), *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella oxytoca*, *Enterobacter* spp., *Pseudomonas aeruginosa* [5, 9]. Наряду с этими микроорганизмами возбудителями пневмоний могут являться такие агенты, как легионеллы, микоплазмы, хламидии. В то же время некоторыми авторами указывается, что до 50% пневмоний остаются этиологически не расшифрованными [6].

В ветеринарной практике проблема пневмоний малоизучена, но весьма актуальна вследствие их частой регистрируемости у млекопитающих животных (кошки, собаки, лошади) [3, 12]. Актуальность исследования возбудителей пневмонии у обезьян, содержащихся в условиях неволи, обусловлена высокой степенью заболеваемости, приводящей к гибели животных.

Обезьяны различных видов, составляющие наряду с человеком единый эволюционный отряд приматов, широко используются для экспериментального изучения важнейших проблем медицины и биологии [7]. В последние десятилетия, в связи с резким сокращением популяций обезьян в местах естественного обитания и запретом отлова, основным источником лабораторных приматов стали питомники обезьян. В России это Адлерский питомник при ФГБНУ «НИИ ПМ», находящийся в г. Сочи. Обезьяны подвержены почти всем бактериальным, вирусным и паразитарным заболеваниям, которыми болеют люди, некоторые животные и птицы [2, 4, 7], при этом пневмония занимает одно из ведущих мест в структуре причин гибели животных. Она регистрируется в качестве самостоятельного процесса, а также часто развивается как сопутствующее вторичное заболевание [4, 7]. В зарубежной литературе отсутствуют сведения о роли *S. aureus*, в том числе MRSA, и других бактериальных возбудителей в развитии спонтанных пневмоний у обезьян.

Цель работы – анализ гибели обезьян от пневмонии и частоты обнаружения *S. aureus* в микрофлоре легочной ткани.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

За 2017 г. было проведено исследование 293 погибших обезьян, у 133 из которых поставлен патоморфологический диагноз «пневмония». Погибшие от пневмонии обезьяны были семи видов: макак-резус ($n = 44$), макак яванский ($n = 32$), макак лапундер ($n = 5$), макак магот ($n = 1$), мартышка зеленая ($n = 5$), павиан анубис ($n = 14$), павиан гамадрил ($n = 32$). Среди возрастных

групп павших животных с пневмонией преобладали детеныши в возрасте до года – 72,7%, подростки составили 21,2%, молодые животные (3–10 лет) – 23,2%, обезьяны 10–15 лет – 41,9% и старые животные (15–35 лет) – 50%.

Материалом для исследования служили кусочки легких размером 2 × 2 см, взятые из очага воспаления, которые помещались в стерильную емкость и доставлялись в лабораторию. Бактериологические посевы осуществляли на стандартные питательные среды (Эндо, Плоскирева), 5%-й кровяной агар (для выявления гемолитических свойств), желточно-солевой агар (для определения лецитиназной активности). Посевы инкубировали в термостате при 37 °C в течение 24 ч. Чистые бактериальные культуры идентифицировали до вида по биохимическим признакам с использованием тест-систем «ММТ С» и «ММТ Е24» (ООО НПО «Иммунотекс», Россия), которые основаны на определении у микроорганизмов ферментных систем, действующих на соответствующие субстраты. У культур стафилококков также оценивались фенотипические характеристики: морфология колоний, их пигментации, окраска по Граму, наличие способности к плазмокоагуляции и лецитиназной активности. Серологическая идентификация проводилась с помощью набора латекс-агглютинации на *S. aureus* (MRSA) Dryspot Staphytect Plus (Oxoid, Великобритания), позволяющего идентифицировать *S. aureus* и MRSA.

Полученные культуры *S. aureus* были исследованы методом ПЦР в режиме реального времени. Выделение тотальной ДНК стафилококков осуществляли из бактериальных суспензий ($1,5 \times 10^8$ КОЕ/мл; эквивалентных значению 0,5 стандарта мутности МакФарланда), приготовленных из суточных агаровых культур *S. aureus* и суспендированных в 100 мкл NaCl с использованием набора реактивов «ДНК-сорб-В» («ИнтерЛабСервис», Россия) согласно рекомендации производителя. Постановку реакции амплификации осуществляли с использованием коммерческой тест-системы «АмплиСенс® MRSA-скрин-титр-FL» («ИнтерЛабСервис», Россия) на флуоресцентном детектирующем термодиске Rotor-Gene Q (Германия) согласно прилагаемой инструкции. Коммерческая тест-система позволяет идентифицировать *S. aureus* и детектировать генетические детерминанты резистентности бактерий, обуславливающие устойчивость к β-лактамам антибиотикам пенициллинового ряда у стафилококков (ген *mecA*).

Частоту встречаемости различных видов микроорганизмов рассматривали по показателю постоянства, вычисленному по формуле

$$C = \frac{p \times 100}{P},$$

где C – показатель постоянства;

p – число выборок, содержащих данный род (вид);

P – общее число взятых выборок.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

От пневмонии погибло 133 обезьяны, что составило 45,4% от общего числа погибших в 2017 г. особей, при этом у самцов пневмония зарегистрирована в 46,6% случаев, у самок – в 53,4%. Частота гибели от этого заболевания обезьян различных видов и возрастных групп представлена в таблице.

Таблица
Возрастные группы погибших обезьян различных видов

Виды обезьян	Возраст, годы (абсолютное кол-во/пневмония)					
	До 1	1–3	3–10	10–15	Старше 15	Всего
Макак-резус	34/21	8/2	31/5	26/7	19/10	118/44
Макак яванский	24/19	15/1	26/4	9/5	7/3	81/32
Макак лапундер	1/1	–	1/–	1/1	3/3	6/5
Макак магот	–	–	–	1/1	–	1/1
Мартышка зеленая	4/2	2/1	1/–	3/2	1/–	11/5
Павиан анубис	10/10	2/–	6/2	1/1	–	19/14
Павиан гамадрил	26/18	6/3	17/8	2/1	6/2	57/32
Всего	99/71	33/7	82/19	43/18	36/18	293/133

Как видно, наиболее высокий процент смертности был от пневмонии детенышей до 1 года (71,7%), а у подростков (до 3 лет) отмечен наиболее низкий процент – 21,2%. Наибольший процент пневмоний зарегистрирован у павианов анубисов (73,7%) и павианов гамадрилов (56,2%). Из шести погибших макак лапундеров у пяти поставлен диагноз «пневмония». У других видов частота гибели от пневмонии составила менее 50%.

Анализ смертности от пневмонии в течение года показал наличие сезонности (рис. 1).

Наиболее высока частота пневмоний в зимне-весенний период (49,7%). Летом гибель животных снижалась в 1,4 раза (35,1%). Пик гибели обезьян от пневмонии отмечен в феврале (61,9%), апреле (66,7%), мае (51,7%).

Чаще всего при пневмониях у обезьян воспалительный процесс охватывал сразу два легких (83,1%), в 16,9% случаев отмечалось одностороннее воспаление (правосторонняя пневмония – 59%, левосторонняя пневмония – 41%). Согласно данным, представленным на рисунке 2, у обезьян чаще регистрировалась двусторонняя очаговая пневмония (44,4%), двусторонняя полисегментарная пневмония морфологически определялась в 16,6% случаев. Пневмопатия новорожденных составила 2%.

Как известно, пневмонии имеют инфекционную природу, поэтому актуальность изучения спектра возбудителей имеет большое значение. При исследовании легких 133 обезьян, погибших от пневмонии, выделено 218 культур микроорганизмов, из них 49,1% – грам-

положительная флора (94 культуры – *S. aureus* (43,1%) и 13 культур – *Enterococcus* spp. (6%). Удельный вес грамотрицательной флоры составил 50,9%, при этом в 48,6% случаев были выделены энтеробактерии, в 2,3% – *Pseudomonas aeruginosa* (рис. 3). Первое место по частоте встречаемости среди энтеробактерий занимает *E. coli* – 76 культур (34,9%), в 11% случаев обнаружены представители рода *Proteus* (24 культуры). В единичных случаях выделены *Klebsiella* spp. (1,4%), *Citrobacter diversus* (0,9%), *Yersinia pseudotuberculosis* (0,4%). В 5,3% случаев рост микроорганизмов на питательных средах отсутствовал.

Выделенная микрофлора представлена как в монокультуре, так и в ассоциациях. В монокультуре выделены 46 видов микроорганизмов, из них 25 изолятов *S. aureus* (54,4%), 14 изолятов *E. coli* (30,4%), три изолята *Enterococcus* spp. (6,5%) и по одному изоляту *Proteus vulgaris*, *Proteus penneri* (2,2%), *Klebsiella pneumoniae*. В 63,5% случаев выделена смешанная флора. Микробные комбинации включали сочетание *S. aureus* с энтеробактериями, а также представителей семейства *Enterobacteriaceae* между собой. Сочетания *S. aureus* представлены в двух-, трех- и четырехкомпонентных ассоциациях. Наиболее часто встречается сочетание *S. aureus* + *E. coli* (52,5%). Частота обнаружения микроорганизмов в составе двух- и трехкомпонентных комбинаций невысока: *S. aureus* + *Proteus* spp. (10%), *S. aureus* + *Enterococcus* spp. (7,5%), *S. aureus* + *Pseudomonas aeruginosa* (2,5%); *S. aureus* + *E. coli* + *Proteus* spp. (6,3%), *S. aureus* + *E. coli* + *Enterococcus* spp. (2,5%), *S. aureus* + *E. coli* + *Pseudomonas aeruginosa* (1,1%).

Отмечено по одному случаю таких комбинаций золотистого стафилококка, как *S. aureus* + *E. coli* + *Citrobacter diversus* + *Proteus* spp.; *S. aureus* + *E. coli* + *Citrobacter diversus* + *Enterococcus* spp.; *S. aureus* + *E. coli* + *Klebsiella ozaenae* + *Proteus* spp. (1,3%).

Изоляты *S. aureus* были взяты для молекулярно-генетического исследования с целью детекции гена *mecA*, являющегося генетической детерминантой резистентности бактерий, обуславливающей устойчивость к β-лактамам антибиотикам пенициллинового ряда у стафилококков. Установлено, что все культуры

Рис. 1. Сезонность гибели обезьян от пневмонии

Рис. 2. Виды пневмоний по степени локализации патологического процесса и характеру воспаления легких у обезьян

S. aureus, выделенные из легких, не несли в своем геноме указанный ген, т. е. были метициллинчувствительные. Результаты ПЦР-диагностики полностью совпали с результатами теста латекс-агглютинации.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Бактериологическое исследование является одним из основных методов в установлении этиологии пневмонии. При анализе данных проведенного исследования становится ясно, что многие микроорганизмы, присутствующие моно или в комбинации, могут привести к развитию инфекционного процесса в легких обезьян. Выделение бактерий из очагов воспаления регистрируется чаще, чем их отсутствие. Результаты исследования показали, что пневмония у обезьян в большинстве случаев имеет полимикробную этиологию. Частота обнаружения *S. aureus* и *E. coli* значительно выше, чем других бактерий. Преобладание при пневмониях обезьян метициллинчувствительного *S. aureus* (43,1%) позволяет говорить о ведущем месте этого микроорганизма в этиологической структуре пневмоний у обезьян, содержащихся в неволе. Также как возможные возбудители заболевания могут оцениваться *E. coli*, *Proteus* spp., *Klebsiella* spp., *Pseudomonas aeruginosa*, выделенные из несвойственных им биотопов. Предположительно, это связано с низким иммунитетом, нарушением колонизационной резистентности бактерий, что влияет на характер течения инфекционного процесса. Как известно, бактерии семейства *Enterobacteriaceae* и рода *Staphylococcus*, выделенные в ассоциациях, чаще обладают различными факторами патогенности, чем изолированные в виде монокультур, что свидетельствует о реализации их патогенного потенциала в условиях симбиоза.

Анализируя частоту встречаемости отдельных микроорганизмов при пневмониях у обезьян, к постоянной микрофлоре отнесли *S. aureus* и *E. coli*, к добавочной – *Proteus* spp., к случайной – остальные бактерии. Выделение из легких таких бактерий, как *Enterococcus* spp., *Citrobacter* spp., *Enterobacter* spp.,

Рис. 3. Удельный вес микроорганизмов, выделенных из легких обезьян при пневмониях

Yersinia pseudotuberculosis, скорее свидетельствует о контаминации материала посторонней флорой, чем об этиологической значимости этих микроорганизмов.

Также обращают на себя внимание пневмонии нерасшифрованной этиологии. К сожалению, пока отсутствуют точные данные по детекции *Chlamydia pneumoniae*, *Mycoplasma pneumoniae* и вирусных патогенов из легких обезьян, хотя, по сведениям литературных источников, эти микроорганизмы также могут являться одним из этиологических факторов пневмонии. Проведенные ранее (2008–2010 гг.) исследования по диагностике хламидий показали наличие в тканях легких обезьян *C. trachomatis* (до 30%), иногда в сочетании с *C. pneumoniae*. Также, согласно неопубликованным данным лаборатории инфекционной патологии ФГБНУ «НИИ МП», детекция *Mycoplasma* spp. составляла 5%.

В то же время при бактериологическом исследовании аутопсийного материала возможна вероятность контаминации легочной ткани, поэтому утвердительно говорить о роли тех или иных микроорганизмов как основных возбудителей заболевания достаточно трудно.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Бова А. А., Крыжановский В. Л. Этиология пневмоний // Медицинские новости. – 2000. – № 7. – С. 31–36.
2. Калашникова В. А. Детекция *Campylobacter jejuni* и *Helicobacter pylori*, ассоциированных с заболеваниями ЖКТ у обезьян // Ветеринарная патология. – 2009. – № 4 (31). – С. 8–12.
3. Костылева О. А. Стафилококкозы собак и кошек (клиника, лечение) // Вестник Алтайского ГАУ. – 2005. – № 2 (18). – С. 49–52.
4. Крылова Р. И. Сравнительная характеристика нозологического профиля людей и обезьян разных видов // Лабораторные приматы для решения актуальных проблем медицины и биологии: материалы симпозиума, 20–21 октября 2004 г., Москва. – М.: Издательство РАМН. – 2004. – С. 18–21.
5. Микробиологические аспекты диагностики внебольничной пневмонии / В. А. Невзорова, В. Б. Туркутюков, И. М. Мартыненко [и др.] // Бюллетень физиологии и патологии дыхания. – 2004. – Вып. 18. – С. 15–17.
6. Новиков Ю. К. Роль грамотрицательных бактерий в патологии нижних дыхательных путей // Атмосфера. Пульмонология и аллергология. – 2007. – № 1. – С. 55–60.
7. Проблемы инфекционной патологии обезьян / Б. А. Лапин, Э. К. Джикидзе, Р. И. Крылова [и др.]. – М.: Издательство РАМН, 2004. – 140 с.
8. Холодок Г. Н. Этиология острых пневмоний и характеристика возбудителей // Бюллетень физиологии и патологии дыхания. – 2004. – Вып. 18. – С. 11–15.
9. Этиологическая структура внебольничной пневмонии / Н. Ф. Бруснигина, В. Н. Мазепа, Л. П. Самохина [и др.] // Медицинский альманах. – 2009. – № 2 (7). – С. 118–121.
10. Fatal *Streptococcus anginosus*-associated pneumonia in a captive Sumatran orangutan (*Pongo abelii*) / E. A. Ihms, J. B. Daniels, C. S. Koivisto [et al.] // J. Med. Primatol. – 2014. – Vol. 43, No. 1. – P. 48–51; doi: 10.1111/jmp.12085.
11. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* ST398 in human and animals, Central Europe / W. Witte, B. Strommenger, C. Stanek, C. Cuny // Emerg. Infect. Dis. – 2007. – Vol. 13, No. 2. – P. 255–258.
12. Pneumonia caused by *Klebsiella* spp. in 46 horses / K. E. Estell, A. Young, T. Kozikowski // J. Vet. Intern. Med. – 2016. – Vol. 30, No. 1. – P. 314–321; doi: 10.1111/jvim.13653.

REFERENCES

1. Bova A. A., Kryzhanovsky V. L. Pneumonia etiology. *Medicinskie novosti*. 2000; 7: 31–36 (in Russian).
2. Kalashnikova V. A. Detection of *Campylobacter jejuni* and *Helicobacter pylori*, associated with gastrointestinal diseases in monkeys. *Veterinary Pathology*. 2009; 4 (31): 8–12 (in Russian).
3. Kostyleva O. A. Staphylococcus infection in dogs and cats (clinical manifestations, treatment). *Vestnik Altajskogo GAU*. 2005; 2 (18): 49–52 (in Russian).
4. Krylova R. I. Comparative characteristics of human and primate nosological profile. Laboratory primates used to solve topical issues of medicine and biology: symposium materials, October 20–21, 2004, Moscow. M.: RAMS Publishing House; 2004: 18–21 (in Russian).
5. Microbiological aspects of community-acquired pneumonia. V. A. Nevzorova, V. B. Turkutukov, I. M. Martynenko [et al.]. *Bjulleten' fiziologii i patologii dyhanija*. 2004; 18: 15–17 (in Russian).
6. Novikov Yu. K. Role of gram-negative bacteria in pathology of low respiratory pathways. *Atmosfera. Pul'monologija i allergologija*. 2007; 1: 55–60 (in Russian).
7. Problems of primate infectious pathology. B. A. Lapin, E. K. Kikidze, R. I. Krylova [et al.]. M.: RAMS Public House, 2004 (in Russian).
8. Holodok G. N. Etiology of acute pneumonia and agent characteristics. *Bjulleten' fiziologii i patologii dyhanija*. 2004; 18: 11–15 (in Russian).
9. Etiological structure of community-acquired pneumonia. N. F. Brusnigina, V. N. Mazepa, L. P. Samokhina [et al.]. *Medicinskij al'manah*. 2009; 2 (7): 118–121 (in Russian).
10. Fatal *Streptococcus anginosus*-associated pneumonia in a captive Sumatran orangutan (*Pongo abelii*). E. A. Ihms, J. B. Daniels, C. S. Koivisto [et al.]. *J. Med. Primatol*. 2014; 43 (1): 48–51; doi: 10.1111/jmp.12085.
11. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* ST398 in human and animals, Central Europe. W. Witte, B. Strommenger, C. Stanek, C. Cuny. *Emerg. Infect. Dis*. 2007; 13 (2): 255–258.
12. Pneumonia caused by *Klebsiella* spp. in 46 horses. K. E. Estell, A. Young, T. Kozikowski. *J. Vet. Intern. Med*. 2016; 30 (1): 314–321; doi: 10.1111/jvim.13653.

Поступила 16.07.18
Принята в печать 16.08.18