

МОЛЕКУЛЯРНОЕ ТИПИРОВАНИЕ МЕТИЦИЛЛИН-ЧУВСТВИТЕЛЬНЫХ *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* (MSSA), ИЗОЛИРОВАННЫХ ОТ ОБЕЗЬЯН, НА ОСНОВЕ ПОЛИМОРФИЗМА КООГУЛАЗНОГО ГЕНА

В. А. Калашникова

Ведущий научный сотрудник, кандидат биологических наук, ФГБНУ «НИИ МП», г. Сочи, Россия, e-mail: vikky.aw@gmail.com; ORCID ID 0000-0002-1574-8674

РЕЗЮМЕ

Staphylococcus aureus – очень опасный микроорганизм, вызывающий более 100 нозологических форм заболеваний у человека и животных, включая пневмонии, инфекции кожи и мягких тканей, пищевые токсикоинфекции, нагноение ран и т. д. По генотипированию *Staphylococcus aureus*, выделенных от людей, из пищевых продуктов и при маститах у коров, проведено много исследований. Отсутствие сведений по генотипированию данных возбудителей, обнаруженных у обезьян, живущих в условиях неволи, побудило провести аналогичную работу, поскольку инфекции стафилококковой природы у приматов широко распространены. Настоящее исследование посвящено изучению полиморфизма варибельного участка коагулазного гена и типированию изолятов *Staphylococcus aureus*, выделенных от обезьян разных видов, проживающих в Адлерском питомнике. 115 изолятов *Staphylococcus aureus* изучали фенотипическими и молекулярно-генетическими методами. Генотипирование проводили с помощью ПЦР, ПЦР в реальном времени и ПЦР с последующим анализом полиморфизма длины рестриционных фрагментов. Исследование методом ПЦР в режиме реального времени позволило отнести все *Staphylococcus aureus* к метициллин-чувствительным стафилококкам (MSSA). При амплификации варибельного

участка коагулазного гена получено 4 вида ампликонов протяженностью 600, 700, 800 и 900 н. п. Эти данные указывают на существование структурных различий данного гена у исследованных изолятов. Преобладал коагулазный ген протяженностью 900 н. п. Использование эндонуклеазы *Cfo1* позволило выявить 23 различных профиля рестрикции *coa*-гена, однако только три из них доминировали. Бактерии *Staphylococcus aureus* с семью типами коагулазного гена были обнаружены только в легких обезьян, погибших от пневмонии, что позволяет сделать вывод о том, что данные изоляты имеют тропность к легочной ткани. Среди *Staphylococcus aureus*, обнаруженных при пневмониях, наиболее распространенными были изоляты с тремя типами *coa*-гена. К инвазивным изолятам можно отнести *Staphylococcus aureus* одиннадцати типов коагулазного гена, поскольку их удалось обнаружить при исследовании в тканях различных органов. Стафилококковая инфекция у обезьян, содержащихся в питомнике, обусловлена генотипически гетерогенной популяцией *Staphylococcus aureus*.

Ключевые слова: обезьяны, *Staphylococcus aureus*, коагулазный ген, ПЦР-ПДРФ, *coa*-тип, ПДРФ-паттерн.

UDC 579.861.2:599.82

MOLECULAR TYPING OF METHICILLIN-SUSCEPTIBLE *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* (MSSA), ISOLATED FROM MONKEYS, BASED ON COAGULASE GENE POLYMORPHISM

V. A. Kalashnikova

Leading Researcher, Candidate of Science (Biology), FSBSI "SRI MP", Sochi, Russia, e-mail: vikky.aw@gmail.com; ORCID ID 0000-0002-1574-8674

SUMMARY

Staphylococcus aureus is a very dangerous microorganism that causes more than 100 nosological forms of disease in humans and animals, including pneumonia, skin and soft tissue infections, food toxicoinfections, wound abscess, etc. Numerous studies on genotyping *Staphylococcus aureus*, isolated from humans, food and bovine mastitis have been carried out. The lack of information on the genotyping of these pathogens detected in monkeys living in captivity served as a stimulus to conduct a similar research, since staphylococcal infections in the primates are widespread. The present study is devoted to the study of the polymorphism of a variable region of the coagulase gene and to the typing of *Staphylococcus aureus* isolates from monkeys of different species kept at Adler monkey farm. 115 *Staphylococcus aureus* isolates were studied using phenotypic and molecular genetic methods. Genotyping was performed using PCR, real-time PCR and PCR with subsequent restriction fragment length polymorphism analysis (PCR-RFLP). A real-time PCR analysis allowed to classify all *Staphylococcus aureus* as methicillin-susceptible staphylococci (MSSA). After amplification of a variable region of the coagulase

gene, 4 types of amplicons of 600, 700, 800, and 900 bp were generated. This data demonstrates structural differences of this gene in the studied isolates. The coagulase gene of 900 bp prevailed. The use of the *Cfo1* endonuclease allowed to identify 23 different restriction profiles of the *coa* gene, but only three of them predominated. *Staphylococcus aureus* bacteria with seven types of coagulase gene were found only in the lungs of monkeys that died of pneumonia. The results obtained suggest that these isolates have tropism for lung tissue. Among *Staphylococcus aureus* isolated from pneumonia cases, isolates with three types of the *coa* gene prevailed. *Staphylococcus aureus* of eleven types of coagulase gene can be attributed to the invasive isolates, since they were detected in the tissues of various organs. Staphylococcal infection in monkeys kept at the monkey farm is caused by genotypically heterogeneous population of *Staphylococcus aureus*.

Key words: monkeys, *Staphylococcus aureus*, coagulase gene, PCR-RFLP, *coa* type, RFLP-pattern.

ВВЕДЕНИЕ

Staphylococcus aureus (*S. aureus*) представляет собой уникальный микроорганизм, являющийся одним из важнейших оппортунистических патогенов, играющих существенную роль в возникновении инфекционных процессов у животных. Этот микроб часто вызывает пневмонии, флегмоны, артриты, гнойные воспаления ран, поражение костей и суставов у домашних и диких животных (кошек, собак, коров, овец, лошадей, свиней, крыс, тюленей, морских свинок и др.) [6, 14]. Он же является возбудителем маститов, послеродового эндометрита у коров и свиноматок [1, 2, 9, 15]. Бактерия *S. aureus* выделялась при конъюнктивитах у кошек как сопутствующая хламидийная инфекция [4]. К тому же *S. aureus* может бессимптомно колонизировать животных. При этом бессимптомные носители, как правило, выступают в качестве резервуаров возбудителя инфекции во время вспышек, вызванных *S. aureus*, и являются предрасполагающим фактором для заражения. В настоящее время большое внимание уделяется изучению метициллин-резистентных золотистых стафилококков (MRSA), частота выявления которых в последнее десятилетие значительно выросла, а также их передаче от людей к животным и наоборот [6]. Из литературных данных известно, что потенциальным резервуаром для MRSA являются метициллин-чувствительные *S. aureus* (MSSA) [7]. Важный вирулентный фактор золотистого стафилококка – коагулаза, выявление которой используется в лабораторной практике как критерий отличия патогенных *S. aureus* от других видов стафилококков. Коагулаза представляет собой внеклеточный протеин, способный связываться с протромбином, образуя комплекс стафилотромбин, стимулирующий реакцию свертывания плазмы путем преобразования фибриногена в фибрин [16]. Коагулазный ген (*coa*), кодирующий коагулазный белок, высоко полиморфичен из-за вариабельных последовательностей, содержащих tandemные повторы в количестве 81 пары нуклеотидов на 3'-конце. Существует множество аллельных форм коагулазного гена, и каждый штамм *S. aureus* продуцирует одну или несколько таких форм [11]. Амплификация коагулазного гена зависит от гетерогенности области, содержащей tandemные повторы 81 н. п. в 3'-кодирующей области гена коагулазы, которая отличается как количеством этих tandemных повторов, так и расположением сайтов рестрикции для эндонуклеаз среди разных изолятов. Полиморфизм коагулазного гена используется как эпидемиологический маркер, его типирование осуществляется праймерами, гомологичными консервативному региону в пределах *coa*-гена [8]. С числом повторных последовательностей, отличающихся в пределах *coa*-гена, полученные ПЦР-продукты отдельных штаммов могут быть разной длины. Более простым и точным методом типирования *S. aureus* считается идентификация на основе полиморфизма длины ПЦР-рестриционного фрагмента коагулазного гена (ПДРФ). ДНК-фрагменты, разделенные в гель-электрофорезе, позволяют сравнить их длины (ПДРФ-паттерн). ПЦР-продукты различных штаммов показывают различные ПДРФ-паттерны коагулазного гена. Этот метод типирования помогает в изучении происхождения штаммов и генетических линий штаммов, выделенных из различных источников, а также получения эпидемиологической информации [9, 11].

В настоящее время диагностике и генетическому исследованию *S. aureus* у животных, а тем более

у приматов, уделяется мало внимания [3]. Молекулярно-генетическое типирование изолятов *S. aureus*, выделенных у низших обезьян, содержащихся в условиях неволи, за рубежом не проводится. Отсутствие данных по генетическому разнообразию и молекулярной эпидемиологии *S. aureus* у низших приматов побудило провести данное исследование. В настоящей работе использовали метод типирования коагулазного гена на основе ПЦР-ПДРФ для различия штаммов *S. aureus*, изолированных от обезьян различных видов.

Цель исследования – генотипировать изоляты *S. aureus*, выделенные от обезьян, путем молекулярного типирования гена коагулазы с использованием метода ПЦР-ПДРФ.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В исследовании использовано 115 изолятов *S. aureus*, выделенных от обезьян 6 видов, проживающих в Адлерском питомнике: макак-резус ($n = 42$), макак яванский ($n = 37$), макак лапундер ($n = 2$), мартышка зеленая ($n = 5$), павиан анубис ($n = 5$), павиан гамадрил ($n = 24$). При этом 79 изолятов *S. aureus* были выделены из легких животных, погибших от пневмонии; 32 изолята обнаружены в различных органах, таких как почка ($n = 5$), печень ($n = 10$), селезенка ($n = 6$), лимфоузел ($n = 8$), матка ($n = 1$), а также в паренхиматозной жидкости ($n = 2$). Четыре изолята *S. aureus* выделены при исследовании материала от живых обезьян: гной из раны ($n = 2$), глаза ($n = 1$), зев ($n = 1$).

Выделение и идентификация стафилококков. Для выделения стафилококков проводилось стандартное бактериологическое исследование, включающее посев на селективные и дифференциально-диагностические питательные среды (желточно-солевой агар, 5%-й кровяной агар), микроскопирование мазков, окрашенных по Граму, определение биохимических свойств выделенных культур. Посев материала на питательные среды производили общепринятыми в микробиологической практике методами. Идентификацию осуществляли на основании морфологических, тинкториальных, плазмокоагулирующих и биохимических свойств стафилококков и латекс-агглютинации. Видовую идентификацию проводили с помощью коммерческих тест-систем «Мультимикротесты для биохимической идентификации стафилококков (ММТ С)» (НПО «Иммунотэк», Россия). Серологическое исследование проводилось с помощью набора латекс-агглютинации Dryspot Staphytest Plus (Oxoid, Великобритания), позволяющего идентифицировать штаммы *S. aureus* по прилагаемой инструкции. Взятые для молекулярно-генетического исследования 115 штаммов *S. aureus* хранились при температуре минус 20 °С.

Экстракция геномной ДНК *S. aureus*. Выделение тотальной ДНК *S. aureus* 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» (ООО «ИнтерЛабСервис», Россия) согласно инструкции производителя.

ПЦР-детекция гена *tesA S. aureus*. Постановку реакции амплификации в режиме реального времени осуществляли с использованием коммерческой тест-системы «АмплиСенс MRSA-скрин-титр-FL» (ООО «ИнтерЛабСервис», Россия) на флюоресцентном

детектирующем термоциклере RotorGene (США) 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 *tesA*).

Детекция коагулазного гена *S. aureus*. ПЦР-амплификацию 3'-концевой области гена коагулазы проводили специфическими описанными в литературе [10] олигонуклеотидными праймерами, синтезированными фирмой ЗАО «Евроген» (Россия). Для ПЦР использовали готовые мастермиксы ScreenMix-HS (ЗАО «Евроген», Россия). Амплификацию геномной ДНК проводили в объеме 25 мкл реакционной смеси, включающей: 5 мкл амплификационной смеси ScreenMix-HS, 5 мкл праймеров, 5 мкл деионизированной воды и 10 мкл ДНК. Реакция амплификации шла в автоматическом программируемом термоциклере «Терцик» (ООО «НПО ДНК-технология», Россия) по следующей программе амплификации ДНК: предварительная денатурация – 94 °С в течение 2 мин (1 цикл); денатурация, отжиг, пролонгация – 94 °С 30 сек., 57 °С 30 сек., 72 °С 20 сек. (30 циклов); финальная пролонгация – 72 °С 5 мин (1 цикл).

ПЦР-ПДРФ. *Coa*-ПЦР-ПДРФ-анализ осуществляли по методике J. V. Hooley и соавт. [10] с использованием рестрикционной эндонуклеазы *Cfo1* (Promega, США) по прилагаемой инструкции. Дальнейший анализ проводили на основе определения размеров полученных ампликонов, количества и протяженности фрагментов рестрикции. *Coa*-ПЦР-ПДРФ-паттерны представляли в виде цифрового кода: первое число (до косой черты) соответствует размеру ПЦР-продукта, а затем (после косой черты) указаны размеры рестрикционных *Cfo1*-фрагментов.

Гель-электрофорез. Визуализацию продуктов амплификации осуществляли с помощью гель-электрофореза в Трис-ацетатном буфере (ТАЕ) с использованием 2%-го агарозного геля (агароза Sigma, США) в градиенте напряжения 150 В в течение 20 мин (электрофорез продуктов рестрикции при 80 В в течение 1 ч). Гель окрашивали раствором бромистого этидия (0,5 мкг/мл) и по окончании электрофореза просматривали его в ультрафиолетовом свете на трансиллюминаторе (длина волны 254 нм). Размер ампликонов определяли, используя ДНК-маркер 100–1200 н. п. (ЗАО «Евроген», Россия). Результаты реакции фотографировали в УФ-свете.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Все изученные культуры стафилококков характеризовались наличием лецитиназной и гемолитической активности, обладали плазмокоагулирующей способностью (способностью к свертыванию плазмы крови кролика) и ферментировали маннит в анаэробных условиях. В мазках, приготовленных из выросших на питательной среде культур, стафилококки имели вид характерных скоплений кокков (напоминающих гроздь винограда), окрашенных по Граму положительно. По результатам биохимической идентификации с помощью тест-систем «Мультимикротесты для биохимической идентификации стафилококков (ММТ С)» и латекс-агглютинации для молекулярно-генетического исследования были отобраны изоляты, прошедшие тестирование по всем признакам как *S. aureus*.

Исследование с целью детекции гена *tesA*, являющегося генетической детерминантой резистентности бактерий, обуславливающей устойчивость стафилококков к β -лактамам антибиотикам пенициллинового ряда, показало, что у всех культур *S. aureus* в геноме указанный ген отсутствовал, то есть культуры оказались метициллин-чувствительные (MSSA).

Как известно, коагулазу продуцируют все штаммы *S. aureus*. 115 изолятов *S. aureus* были исследованы на полиморфизм коагулазного гена и анализ полиморфизма длины рестрикционных фрагментов. В результате получили 4 ампликона различной длины – 600, 700, 800 и 900 н. п., что указывает на варибельность размеров ампликонов, а значит, на существование структурных различий коагулазного гена у исследуемых изолятов (табл. 1).

В исследуемой выборке преобладали изоляты *S. aureus*, у которых варибельный участок коагулазного гена имел протяженность 900 н. п. (46%). Вторым по частоте распространения, обнаруженным у 41 изолята, был ампликон 700 н. п. (36%). У 16 и 5 изолятов размер коагулазного гена составил 600 и 800 н. п. (14 и 4%) соответственно. Частота выявления *coa*-ампликонов у *S. aureus*, выделенных из различных органов, представлена в таблице 1.

Как видно из представленных в таблице данных, чаще у *S. aureus*, изолированных из легких погибших от пневмонии обезьян, обнаружены *coa*-ампликоны размером 900 н. п. (33 изолята) и 700 н. п. (30 изолятов). Ампликон размером 600 н. п. детектирован у 14 изолятов *S. aureus*, выделенных из легких, а также из печени и паренхиматозной жидкости.

Следующей задачей было проведение ПДРФ-типирования данных изолятов. ПЦР-продукты

Таблица 1
Частота обнаружения *coa*-ампликонов

Источник изоляции	Длина <i>coa</i> -ампликона, н. п.	Количество изолятов
Легкие (<i>n</i> = 79)	600	14
	700	30
	800	2
	900	33
Печень (<i>n</i> = 10)	600	1
	700	5
	900	4
Селезенка (<i>n</i> = 6)	800	1
	900	5
Почка (<i>n</i> = 5)	700	1
	900	4
Лимфоузел (<i>n</i> = 8)	700	3
	800	2
	900	3
Матка (<i>n</i> = 1)	700	1
Паренхиматозная жидкость (<i>n</i> = 2)	600	1
	900	1
Гной (<i>n</i> = 2)	900	2
Глаз (<i>n</i> = 1)	700	1
Зев (<i>n</i> = 1)	900	1
Всего		115

Таблица 2
ПЦР-ПДРФ коагулазного гена изолятов MSSA, выделенных от обезьян

Источник изоляции	Количество изолятов	Паттерны <i>coa</i> -ПЦР-ПДРФ	ПЦР-ПДРФ-тип
Лег. (n = 9)	9	600/150-250	I
Лег. (n = 3), печ. (n = 4)	7	600/80-150-300	II
Лег. (n = 13), сел. (n = 1)	14	700/80-150-180-300	III
Лег. (n = 5), печ. (n = 3), л/у (n = 2), поч. (n = 1), глаз (n = 1)	12	700/700	IV
Лег. (n = 4), л/у (n = 1)	5	700/150-450	V
Лег.	3	700/250-600	VI
Лег.	2	700/80-150-400	VII
Лег.	2	700/100-200-350	VIII
Лег., матка	2	700/200-500	IX
Печ.	1	700/150-550	X
Лег., сел.	2	800/80-180-300	XI
Лег., сел.	2	800/150-500	XII
Л/у	1	800/150-200-300	XIII
Поч. (n = 16), л/у (n = 2), сел. (n = 5), поч. (n = 2), печ. (n = 1), гной (n = 1), зев (n = 1)	28	900/80-250-300	XIV
Поч. (n = 1), лег. (n = 4), л/у (n = 1), гной (n = 1)	7	900/100-250-350	XV
Лег. (n = 4), паренх. жид. (n = 1)	5	900/80-140-300-500	XVI
Лег. (n = 2), печ. (n = 1)	3	900/100-250-500	XVII
Лег.	2	900/80-150-250-450	XVIII
Лег.	2	900/100-180-350	XIX
Лег.	2	900/140-300-500	XX
Печ.	1	900/80-220-480	XXI
Поч.	1	900/100-180-220-500	XXII
Печ.	1	900/250-500	XXIII

лег. – легкое, печ. – печень, сел. – селезенка, поч. – почка, л/у – лимфоузел, паренх. жид. – паренхиматозная жидкость.

коагулазного гена были исследованы рестрикционным анализом и разделены эндонуклеазой *Sfo1* на отдельные фрагменты. Число паттернов рестрикции варьировало от одного до четырех, а размер рестрикционных фрагментов колебался от 80 н. п. до 600 н. п. (табл. 2).

ПЦР-ПДРФ-анализ ампликонов показал наличие 23 типов коагулазного гена, следовательно, обнаружено 23 различных штамма *S. aureus*, циркулирующих у обезьян, содержащихся в питомнике. Изоляты каждой группы характеризовались одинаковым размером ампликонов и специфическими сайтами рестрикции. Отсутствие различий в размерах ампликонов свидетельствует об отсутствии различий в числе нуклеотидных повторов, а одинаковые сайты рестрикции указывают на структурное сходство этих повторов.

Среди изолятов, сформировавших ампликоны протяженностью 600 н. п., были выявлены 2 типа рестрикции с *Sfo1*. Ампликоны размером 700 н. п. дали 8 типов рестрикции. В данной выборке 12 изолятов не были расщеплены *Sfo1*, то есть не имели сайта рестрикции

для этой эндонуклеазы (паттерн 700/700 н. п.). Ампликоны протяженностью 800 н. п. дали 3 типа рестрикции. При ПДРФ-анализе ампликонов размером 900 н. п. получено 10 типов рестрикции.

Анализ ПДРФ-паттернов показал, что наиболее распространенным был паттерн 900/80-250-300 н. п. (XIV тип ПЦР-ПДРФ), выявленный у 28 *coa*-ампликонов. Вторая по численности группа (n = 14) представлена изолятами *S. aureus*, образовавшими ампликон протяженностью 700 н. п. и давшими 4 фрагмента рестрикции протяженностью 80-150-180-300 н. п. (III тип ПЦР-ПДРФ). У 9 *coa*-ампликонов обнаружены паттерны 600/150-250 н. п. (I тип *coa*-гена). *Coa*-паттерны 600/80-150-300 и 900/100-250-350 н. п. (II и XV *coa*-типы соответственно) выявлены у 7 ампликонов. Наиболее редкими были 13 ПДРФ-профилей коагулазного гена, выявленные у одного или двух изолятов.

При проведении исследования сделана попытка проследить взаимосвязь между структурой коагулазного гена (*coa*-ПЦР-ПДРФ-паттернами) и способностью

данных изолятов вызывать пневмонию у обезьян. Семь типов коагулазного гена *S. aureus* было выявлено только в легких. Вероятнее всего, данные изоляты имеют тропность к легочной ткани. Среди *S. aureus*, обнаруженных при пневмониях, наиболее распространенными были изоляты с XIV, III и I типами *coa*-гена. К инвазивным изолятам можно отнести *S. aureus* одиннадцати типов коагулазного гена, поскольку их удалось обнаружить при исследовании в тканях различных органов. Следовательно, стафилококковая инфекция у обезьян обусловлена генотипически гетерогенной популяцией возбудителя.

Анализируя данные исследования структурного полиморфизма коагулазного гена, было замечено, что некоторые *coa*-паттерны изученных изолятов *S. aureus* встречаются у определенного вида обезьян. Например, паттерн 700/100-200-350 н. п. (VIII тип *coa*-гена) обнаружен у *S. aureus*, изолированных из легких двух павианов гамадрилов; 800/150-200-300 н. п. (XIII тип *coa*-гена) – у *S. aureus*, выделенных из лимфоузла обезьяны этого же вида; 700/250-600 н. п. (VI тип *coa*-гена) – у *S. aureus*, выделенных из легких трех макак яванских; 700/150-550 н. п. (X тип *coa*-гена) – у макака яванского из печени. Таким образом, можно предположить, что существуют некоторые штаммы *S. aureus*, циркулирующие среди конкретных видов обезьян, но этот вопрос требует дальнейшего изучения.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Инфекция, обусловленная *S. aureus*, довольно часто встречается у обезьян, живущих в Адлерском питомнике. Высев этих микробов в высоких диагностических титрах из органов, тканей, жидкостей и полостей организма, которые в норме должны быть стерильными, рассматривался как подтверждение этиологической роли данного микроорганизма в развитии заболевания. По результатам исследования установлено, что все выделенные от обезьян *S. aureus* обладали патогенными свойствами и отнесены к MSSA, поскольку при амплификации со специфическими праймерами методом ПЦР с флуоресцентной меткой у них не обнаружен ген *tesA*.

Продукция коагулазы – важный фенотипический признак, использующийся для идентификации *S. aureus*. Как известно, ПДРФ-анализ является «золотым стандартом» молекулярного типирования изолятов *S. aureus*, так как этот метод считается технически простым и легко воспроизводимым, обладающим высокой степенью специфичности, поэтому успешно используется в изучении эпидемиологии инфекций, вызванных *S. aureus* [5]. Вариабельность 3'-концевого региона коагулазного гена – основа метода типирования для изолятов, выделенных от людей и животных [8, 12, 13, 15]. По утверждению A. Salehzadeh и соавт., разница в типах коагулазного гена может быть связана с географической изменчивостью [12]. Этот полиморфизм также обусловлен различными мутациями, посредством которых часть 3'-концевого региона гена удаляется или вставляются несколько новых нуклеотидов, и, как следствие, изменяется размер коагулазного гена.

Проведенное при исследовании генетическое типирование *S. aureus*, изолированных от обезьян, на основе полиморфизма коагулазного гена подтвердило высокую степень гетерогенности *coa*-гена *S. aureus*.

Изучение фрагмента коагулазного гена методом гелеэлектрофореза показало наличие ампликонов четырех размеров – протяженностью 600, 700, 800, 900 н. п., что указывает на существование структурных различий данного гена у исследованных изолятов. Однако в данной выборке преобладал коагулазный ген протяженностью 900 н. п. (46%). Методом ПЦР-ПДРФ обнаружено 23 геноварианта MSSA. Несмотря на то что было выявлено большое количество генотипов *coa*-гена, доминировали только несколько. Большинство штаммов *S. aureus*, выделенных от обезьян, относились к XIV, III и IV типам. Чаще при пневмониях были обнаружены *S. aureus* с тремя ПЦР-ПДРФ профилями коагулазного гена (XIV, III и I). Следовательно, эти изоляты имеют тропность к тканям легкого.

Полученные данные согласуются с результатами исследований других авторов, подтверждающих наличие нескольких генотипов *S. aureus*, выделенных от людей и животных [8, 11, 15]. Исследование полиморфизма коагулазного гена может использоваться как инструмент для оценки эпизоотической ситуации по стафилококковой инфекции в стаде обезьян питомника. Дальнейшее изучение доминирующих геновариантов *S. aureus*, выявление их общих характеристик (например, антибиотикоустойчивости) также может быть использовано для разработки мер профилактики и лечения пневмоний стафилококковой природы у обезьян.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Иванова С. Н. Результаты мониторинга чувствительности к антибиотикам и препарату «ЭПЛ» условно-патогенной микрофлоры, выделенной из маточно-цервикального секрета больных «синдромом ММА» свиноматок // Вестник Ульяновской ГСХА. – 2011. – № 2 (14). – С. 69–72. – URL: <http://lib.ugsha.ru:8080/handle/123456789/636>.
2. Косолович Л. Н., Иванова С. Н. Микрофлора содержимого матки коров при послеродовых эндометритах и ее чувствительность к антибактериальным средствам и прополису // Вестник Ульяновской ГСХА. – 2013. – № 1 (21). – С. 83–88. – URL: <http://lib.ugsha.ru:8080/handle/123456789/877>.
3. Молекулярно-генетическое типирование *Staphylococcus aureus*, выделенных от обезьян / В. А. Калашникова, О. А. Дмитренко, З. К. Стасилевич, Э. К. Джикидзе // Вестник ветеринарии. – 2012. – № 1. – С. 73–77. – URL: https://elibrary.ru/download/elibrary_20888807_50794656.pdf.
4. Чубин А. Н., Бердников П. П. Инфекционные офтальмохламидиозы кошек и новые методы лечения // Вестник Алтайского ГАУ. – 2010. – № 7 (69). – С. 54–56. – URL: http://www.asau.ru/vestnik/2010/7/Vetmed_Chubin.pdf.
5. Abdulghany H. M., Khairy R. M. The frequency of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and *Coagulase* gene polymorphism in Egypt // Int. J. Bacteriol. – 2014. – Vol. 2014, Article ID 680983; DOI: 10.1155/2014/680983.
6. Alarming proportions of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in wound samples from companion animals, Germany 2010–2012 / S. Vincze, I. Stamm, P. A. Kopp [et al.] // PLoS ONE. – 2014. – Vol. 9 (1):e85656; DOI: 10.1371/journal.pone.0085656.
7. Characterisation of the virulence factors and genetic types of methicillin susceptible *Staphylococcus aureus* from patients and healthy individuals / K-T. Lim, Y. A. Hanifah, M. Y. M. Yusof, K-L. Thong // Indian J. Microbiol. – 2012. – Vol. 52 (4). – P. 593–600; DOI: 10.1007/s12088-012-0286-7.
8. Coagulase gene polymorphism, enterotoxigenicity, biofilm production, and antibiotic resistance in *Staphylococcus aureus* isolated from bovine raw milk in North West India / V. Sharma, S. Sharma, D. K. Dahiya [et al.] // Ann. Clin. Microbiol. Antimicrob. – 2017. – Vol. 16:65; DOI: 10.1186/s12941-017-0242-9.
9. Elsayed M. S., El-Bagoury A. M., Dawoud M. A. Phenotypic and genotypic detection of virulence factors of *Staphylococcus aureus* isolated from clinical and subclinical mastitis in cattle and water buffaloes from different farms of Sadat City in Egypt // Vet. World. – 2015. – Vol. 8 (8). – P. 1051–1058; DOI: 10.14202/vetworld.2015.1051-1058.

10. Hookey J. V., Richardson J. F., Cookson B. Molecular typing of *Staphylococcus aureus* based on PCR restriction fragment length polymorphism and DNA sequence analysis of the coagulase gene // *J. Clin. Microbiol.* – 1998. – Vol. 36 (4). – P. 1083–1089; PMID: PMC104694.

11. Molecular typing of methicillin-resistant and methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* isolates from Shiraz teaching hospitals by PCR-RFLP of coagulase gene / H. Khoshkaram-Roodmajani, J. Sarvari, A. Bazargani [et al.] // *Iran J. Microbiol.* – 2014. – Vol. 6 (4). – P. 246–252; PMID: PMC4367941.

12. Molecular typing of nosocomial *Staphylococcus aureus* strains associated to biofilm based on the coagulase and protein A gene polymorphisms / A. Salehzadeh, H. Zamani, M. Keshtkar Langeroudi, A. Mirzaie // *Iran. J. Basic Med. Sci.* – 2016. – Vol. 19 (12). – P. 1325–1330; DOI: 10.22038/ijbms.2016.7919.

13. Molecular typing of *Staphylococcus aureus* based on coagulase gene / F. Javid, A. Taku, M. A. Bhat [et al.] // *Vet. World.* – 2018. – Vol. 11 (4). – P. 423–430; DOI: 10.14202/vetworld.2018.423-430.

14. Prevalence and molecular characterization of *Staphylococcus aureus* isolated from goats in Chongqing, China / Z. Zhou, M. Zhang, H. Li [et al.] // *BMC Vet. Res.* – 2017. – Vol. 13 (1):352; DOI: 10.1186/s12917-017-1272-4.

15. Rodrigues da Silva E., da Silva N. Coagulase gene typing of *Staphylococcus aureus* isolated from cows with mastitis in Southeastern Brazil // *Can. J. Vet. Res.* – 2005. – Vol. 69 (4). – P. 260–264; PMID: PMC1250237.

16. Schwarzkopf A., Karch H. Genetic variation in *Staphylococcus aureus* coagulase genes: potential and limits for use as epidemiological marker // *J. Clin. Microbiol.* – 1994. – Vol. 32 (10). – P. 2407–2412; PMID: PMC264075.

REFERENCES

1. Ivanova S. N. The results of monitoring the sensitivity of opportunistic pathogenic microflora isolated from utero-cervical secretions of sows with the MMA syndrome to antibiotics and to the "EPL" preparation (placenta extract with hazel) [Rezultaty monitoringa chuvstvitel'nosti k antibiotikam i preparatu «EPL» uslovno-patogennoj mikroflory, vydelennoj iz matochno-cervikal'nogo sekreta bol'nyh «sindromom MMA» svinomatok]. *Vestnik Ulyanovskoi GSKhA.* 2011; 2 (14): 69–72; URL: <http://lib.ugsha.ru:8080/handle/123456789/636> (in Russian).

2. Kosolovich L. N., Ivanova S. N. Bacterial flora of the uterus of cows with postpartum endometritis and its sensitivity to antibiotics and propolis [Mikroflora soderzhimogo matki korov pri poslerodovyyh endometritah i ee chuvstvitel'nost' k antibakterial'nym sredstvam i propolisu]. *Vestnik Ulyanovskoi GSKhA.* 2013; 1 (21): 83–88; URL: <http://lib.ugsha.ru:8080/handle/123456789/877> (in Russian).

3. Molecular genetic typing of *Staphylococci aureus* isolated from monkeys [Molekulyarno-geneticheskoe tipirovanie *Staphylococci aureus*, vydelennyh ot obez'yan]. V. A. Kalashnikova, O. A. Dmitrenko, Z. K. Stasilevich, E. K. Dzhikidze. *Vestnik veterinarii.* 2012; 1: 73–77; URL: https://elibrary.ru/download/elibrary_20888807_50794656.pdf (in Russian).

4. Chubin A. N., Berdnikov P. P. Infectious ophthalmochlamidiosis in cats and new methods of treatment [Infekcionnye oftal'mohlamidiozy ko-

sheki novye metody lecheniya]. *Vestnik Altaiskogo SAU.* 2010; 7 (69): 54–56; URL: http://www.asau.ru/vestnik/2010/7/Vetmed_Chubin.pdf (in Russian).

5. Abdulghany H. M., Khairy R. M. The frequency of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and *Coagulase* gene polymorphism in Egypt. *Int. J. Bacteriol.* 2014; 2014: Article ID 680983; DOI: 10.1155/2014/680983.

6. Alarming proportions of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in wound samples from companion animals, Germany 2010–2012. S. Vincze, I. Stamm, P. A. Kopp [et al.]. *PLoS ONE.* 2014; 9 (1):e85656; DOI: 10.1371/journal.pone.0085656.

7. Characterisation of the virulence factors and genetic types of methicillin susceptible *Staphylococcus aureus* from patients and healthy individuals. K-T. Lim, Y. A. Hanifah, M. Y. M. Yusof, K.-L. Thong. *Indian J. Microbiol.* 2012; 52 (4): 593–600; DOI: 10.1007/s12088-012-0286-7.

8. Coagulase gene polymorphism, enterotoxigenicity, biofilm production, and antibiotic resistance in *Staphylococcus aureus* isolated from bovine raw milk in North West India. V. Sharma, S. Sharma, D. K. Dahiya [et al.]. *Ann. Clin. Microbiol. Antimicrob.* 2017; 16:65; DOI: 10.1186/s12941-017-0242-9.

9. Elsayed M. S., El-Bagoury A. M., Dawoud M. A. Phenotypic and genotypic detection of virulence factors of *Staphylococcus aureus* isolated from clinical and subclinical mastitis in cattle and water buffaloes from different farms of Sadat City in Egypt. *Vet. World.* 2015; 8 (8): 1051–1058; DOI: 10.14202/vetworld.2015.1051-1058.

10. Hookey J. V., Richardson J. F., Cookson B. Molecular typing of *Staphylococcus aureus* based on PCR restriction fragment length polymorphism and DNA sequence analysis of the coagulase gene. *J. Clin. Microbiol.* 1998; 36 (4): 1083–1089; PMID: PMC104694.

11. Molecular typing of methicillin-resistant and methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* isolates from Shiraz teaching hospitals by PCR-RFLP of coagulase gene. H. Khoshkaram-Roodmajani, J. Sarvari, A. Bazargani [et al.]. *Iran J. Microbiol.* 2014; 6 (4): 246–252; PMID: PMC4367941.

12. Molecular typing of nosocomial *Staphylococcus aureus* strains associated to biofilm based on the coagulase and protein A gene polymorphisms. A. Salehzadeh, H. Zamani, M. Keshtkar Langeroudi, A. Mirzaie. *Iran. J. Basic Med. Sci.* 2016; 19 (12): 1325–1330; DOI: 10.22038/ijbms.2016.7919.

13. Molecular typing of *Staphylococcus aureus* based on coagulase gene. F. Javid, A. Taku, M. A. Bhat [et al.]. *Vet. World.* 2018; 11 (4): 423–430; DOI: 10.14202/vetworld.2018.423-430.

14. Prevalence and molecular characterization of *Staphylococcus aureus* isolated from goats in Chongqing, China. Z. Zhou, M. Zhang, H. Li [et al.]. *BMC Vet. Res.* 2017; 13 (1):352; DOI: 10.1186/s12917-017-1272-4.

15. Rodrigues da Silva E., da Silva N. Coagulase gene typing of *Staphylococcus aureus* isolated from cows with mastitis in Southeastern Brazil. *Can. J. Vet. Res.* 2005; 69 (4): 260–264; PMID: PMC1250237.

16. Schwarzkopf A., Karch H. Genetic variation in *Staphylococcus aureus* coagulase genes: potential and limits for use as epidemiological marker. *J. Clin. Microbiol.* 1994; 32 (10): 2407–2412; PMID: PMC264075.

Поступила 10.06.19

Принята в печать 15.07.19