

КЛИНИЧЕСКИЙ СЛУЧАЙ ПОСТТРАВМАТИЧЕСКОГО ОСТЕОМИЕЛИТА, ВЫЗВАННОГО АССОЦИАЦИЕЙ *KYTOCOCCUS SCHROETERI* И *ENTEROCOCCUS FAECALIS*



С.Д. Борисов¹, И.Ф. Каримов¹, А.О. Плотников^{1,2}, К.С. Инчагова², А.С. Паньков¹,
Д.П. Даньшин³

¹ ФГБОУ ВО Оренбургский государственный медицинский университет Минздрава России, г. Оренбург, Россия

² Институт клеточного и внутриклеточного симбиоза Уральского отделения Российской академии наук — обособленное структурное подразделение ФГБУН Оренбургский федеральный исследовательский центр УрО РАН, г. Оренбург, Россия

³ ГАУЗ Оренбургский областной клинический специализированный центр травматологии и ортопедии, г. Оренбург, Россия

Резюме. Введение. Остеомиелиты в большинстве случаев являются мономикробными и вызываются различными грамположительными бактериями, однако предшествующая травма может способствовать формированию микробной ассоциации. Наличие двух и более патогенов в инфекционном очаге может сильно усложнять клиническую картину течения заболевания. *Kytococcus schroeteri* является одним из наиболее редко встречающихся возбудителей в клиническом материале. Число описанных случаев заболеваний, вызванных данным микроорганизмом, в мире насчитывает немногим более двух десятков. Цель исследования — анализ впервые выявленного клинического случая посттравматического остеомиелита, вызванного ассоциацией *Kytococcus schroeteri* и *Enterococcus faecalis*. **Материалы и методы.** Культуры получены бактериологическим методом из раневого отделяемого голени пациента. Идентификацию чистых культур бактерий осуществляли с использованием масс-спектрометра VITEK MS и подтверждали анализом нуклеотидной последовательности 16S рРНК. Установлены морфологические, тинкториальные и биохимические особенности полученных культур, а также определена их чувствительность к антибиотикам. **Результаты.** Клинический случай связан с установленным диагнозом «Хронический посттравматический остеомиелит левой голени». Из раневого отделяемого изолированы два вида микроорганизмов, которые были идентифицированы как *Kytococcus schroeteri* и *Enterococcus faecalis* с использованием метода MALDI-ToF масс-спектрометрии. Секвенирование гена 16S рРНК выделенных культур бактерий полностью подтвердило результаты MALDI-ToF масс-спектрометрии. Чувствительность к антибиотикам для *Kytococcus schroeteri* была определена по критериям для группы стафилококков согласно клиническим рекомендациям «Определение чувствительности к антимикробным препаратам (ред. 2021 г.)». **Выводы.** Нами впервые описан вариант микст-инфекции, вызванной двумя грамположительными бактериями *K. schroeteri* и *E. faecalis*. Подобные ассоциации могут усиливать патогенетические эффекты друг друга, что может способствовать переходу инфекции в хроническую форму с низкой вероятностью положительного результата бактериологического исследования. *K. schroeteri* является одним из представителей нормальной микрофлоры кожи, однако данный микроорганизм способен вызывать различные заболевания. При бактериологическом исследовании подозрительным признаком, указывающим на возможную принадлежность

Адрес для переписки:

Плотников Андрей Олегович
460000, Россия, г. Оренбург, ул. Пионерская, 11,
Институт клеточного и внутриклеточного симбиоза УрО РАН.
Тел.: 8 (3532) 77-54-17.
E-mail: protoz@mail.ru

Contacts:

Andrey O. Plotnikov
460000, Russian Federation, Orenburg, Pionerskaya str., 11,
Institute of Cellular and Intracellular Symbiosis.
Phone: +7 (3532) 77-54-17.
E-mail: protoz@mail.ru

Для цитирования:

Борисов С.Д., Каримов И.Ф., Плотников А.О., Инчагова К.С.,
Паньков А.С., Даньшин Д.П. Клинический случай посттравматического
остеомиелита, вызванного ассоциацией *Kytococcus schroeteri*
и *Enterococcus faecalis* // Инфекция и иммунитет. 2023. Т. 13, № 5.
С. 985–994. doi: 10.15789/2220-7619-ACC-15623

Citation:

Borisov S.D., Karimov I.F., Plotnikov A.O., Inchagova K.S., Pankov A.S.,
Danshin D.P. A clinical case of posttraumatic osteomyelitis associated
with *Kytococcus schroeteri* and *Enterococcus faecalis* // Russian Journal
of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2023, vol. 13, no. 5,
pp. 985–994. doi: 10.15789/2220-7619-ACC-15623

культуры к виду *K. schroeteri*, является устойчивостью к оксациллину. В связи с невозможностью использования имеющихся биохимических тест-систем, не нацеленных на дифференциацию *K. schroeteri* от родственных таксонов, надежная идентификация данного вида пока возможна лишь с применением метода MALDI-ToF масс-спектрометрии или секвенирования гена 16S рРНК.

Ключевые слова: *Kytococcus schroeteri*, *Enterococcus faecalis*, раневая инфекция, остеомиелит, MALDI-ToF масс-спектрометрия, секвенирование гена 16S рРНК.

A CLINICAL CASE OF POSTTRAUMATIC OSTEOMYELITIS ASSOCIATED WITH KYTOCOCCUS SCHROETERI AND ENTEROCOCCUS FAECALIS

Borisov S.D.^a, Karimov I.F.^a, Plotnikov A.O.^{a,b}, Inchagova K.S.^b, Pankov A.S.^a, Danshin D.P.^c

^a Orenburg State Medical University of the Ministry of Health of Russia, Orenburg, Russian Federation

^b Institute for Cellular and Intracellular Symbiosis of the Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, Orenburg Federal Research Center of the UrB RAS, Orenburg, Russian Federation

^c Orenburg Regional Clinical Specialized Center of Traumatology and Orthopedics, Orenburg, Russian Federation

Abstract. Introduction. In most cases, osteomyelitis is the monomicrobial disease caused by various Gram-positive bacteria. However, previous injury may contribute to formation of a microbial association. Presence of two or more pathogens in the infectious focus can markedly complicate the disease clinical picture. *Kytococcus schroeteri* is one of the rarest pathogens found in clinical samples. Slightly more than twenty described cases related to such infection have been recorded globally. The aim of the research was to analyse the first identified clinical case of post-traumatic osteomyelitis associated with *Kytococcus schroeteri* and *Enterococcus faecalis*. **Materials and methods.** The bacterial cultures were obtained from the wound discharge of the patient's shin by the cultural method. Identification of the bacterial cultures was performed using a VITEK MS mass spectrometer followed by 16S rRNA gene sequencing. The morphological, tinctorial and biochemical features of the cultures obtained were established, and their antibacterial resistance was also determined. **Results.** The clinical case was associated with the diagnosis "Chronic post-traumatic osteomyelitis of the left shin". Two types of microorganisms were isolated from the wound discharge, and identified as *Kytococcus schroeteri* and *Enterococcus faecalis* using the MALDI-ToF mass spectrometry method. 16S rRNA gene sequencing from the isolated bacterial cultures confirmed the MALDI-ToF mass spectrometry data. Antimicrobial susceptibility for this microorganism was determined according to the criteria for the staphylococcal group according to the clinical guide "Determination of sensitivity to antimicrobial drugs (rev. 2021)". **Conclusion.** For the first time, the mixed infection caused by two Gram-positive bacteria *K. schroeteri* and *E. faecalis* has been described. Such associations can enhance the pathogenic effects of each other bacterium, which may contribute to transition of the infection to a chronic form with a low probability of positive cultural test. *K. schroeteri* is a representative of the normal skin microbiota, but this microorganism is able to cause various infections. The *K. schroeteri* species should be differentiated from other representatives of the order *Micrococcales*. At cultural examination, resistance to oxacillin is a suspicious sign indicating that the bacterial culture might be potentially assigned to *K. schroeteri* species. Due to the unavailability of current biochemical tests for differentiation *K. schroeteri* from related taxa, reliable identification of this species is recommended using MALDI-ToF mass spectrometry or 16S rRNA gene sequencing.

Key words: *Kytococcus schroeteri*, *Enterococcus faecalis*, wound infection, osteomyelitis, MALDI-ToF mass spectrometry, 16S rRNA gene sequencing.

Введение

Остеомиелит представляет собой заболевание, различное по своему патогенезу, клиническим проявлениям и микробной этиологии. Наиболее типичными возбудителями инфекций подобного типа являются *Staphylococcus aureus*, выделяющийся более чем в 40% случаев, а также *Staphylococcus epidermidis* и *Streptococcus* spp. [11]. Реже обнаруживаются культуры грамотрицательных микроорганизмов, в частности, *Pseudomonas aeruginosa* и представители семейства *Enterobacteriaceae*, и лишь в отдельных случаях — виды *Enterococcus faecalis* и *Enterococcus faecium* [9]. Кроме того, выявляются возбудители, нетипичные для остеомиелита, например, *Bartonella henselae*, *Pasteurella*

multocida, *Brucella* spp. и другие [7]. Также следует отметить, что зачастую остеомиелит представляет собой мономикробный инфекционный процесс, однако остеомиелиты, связанные с травмой или переломами, в 20–30% случаев являются полимикробными [12].

Вид *Kytococcus schroeteri* впервые был описан в 2002 г. и представляет собой аэробные неподвижные грамположительные кокки, не образующие капсулу [5]. Сложности в идентификации данного вида не позволяли раньше точно определять его при выделении бактериальной культуры возбудителя инфекций. Ситуация коренным образом изменилась с внедрением в клиническую микробиологию метода MALDI-ToF масс-спектрометрии, открывшего возможности ускоренного и более точного определения так-

сономической принадлежности микроорганизма вплоть до вида [4]. *K. schroeteri* является одним из наиболее редко встречающихся в клиническом материале возбудителей. Число описанных случаев заболеваний, вызванных данным микроорганизмом, в мире насчитывает немногим более двух десятков. Инфекции, вызванные данным видом, имеют некоторое сходство с инфекциями, вызванными коагулазонегативными стафилококками, и часто ассоциированы с хирургическим вмешательством или повреждениями, связанными с кожными покровами. В большинстве своем *K. schroeteri* был обнаружен при эндокардите, дисците и остеомиелите на фоне протезирования [2]. Стоит отметить, что впервые описанный случай остеомиелита, ассоциированный с данным микроорганизмом, был зарегистрирован у пациента с силиконовым имплантом левого плеча, страдающего рецидивирующей инфекцией, этиология которой впервые была установлена как стафилококковая, затем как микрококковая, и наконец, как китоккокковая [8]. Однако во всех случаях описанных инфекций *K. schroeteri* по-видимому являлся единственным этиологическим агентом, поскольку о наличии других возбудителей в исследуемом материале не упоминается.

Тем не менее наличие двух и более патогенов в инфекционном очаге может сильно усложнять клиническую картину течения заболевания вследствие межвидовых взаимодействий и изменения активности сосуществующих микроорганизмов. На примере *Enterococcus faecalis* показано, что, с одной стороны, данные бактерии могут выступать в качестве соколонизаторов, ускоряя процесс заселения биотопа [10], либо угнетать активность иммунной системы, что дает возможность активироваться оппортунистам [21]. С другой стороны, между разными видами в одном локусе возможны антагонистические взаимоотношения, ведущие, в частности, к нарушению структуры биопленок, образованных грамотрицательными бактериями [3, 20].

В связи с актуальностью выявления новых и редких возбудителей инфекций, в особенности — их ассоциаций, цель исследования заключалась в анализе впервые выявленного клинического случая посттравматического остеомиелита, вызванного ассоциацией *Kytococcus schroeteri* и *Enterococcus faecalis*.

Материалы и методы

Пациент С., мужского пола, 1983 г. рождения, в сентябре 2022 г. травма в быту, в результате падения с высоты собственного роста на левой голени сформировалась рана, которую лечил самостоятельно. Примерно за неделю до обращения в области раны появился свищевой ход с гнойным отделяемым. 11.10.2022

пациент обратился в ГАУЗ «Городская клиническая больница № 4» города Оренбурга (позже переименовано в ГАУЗ «Оренбургский областной клинический специализированный центр травматологии и ортопедии»), госпитализирован в отделение экстренной травматологии, где находился на лечении с 11.10.2022 по 18.10.2022.

Взятие материала осуществляли 14.10.2022 г. с помощью стерильных тупферов (Rustech, Россия), в стерильные пробирки с 2 мл транспортной среды Стюарта (Oxoid, Великобритания) согласно методическим указаниям МУ 4.2.2039-05 [1]. Материал транспортировали в микробиологическую лабораторию научно-исследовательского центра ФГБОУ ВО Оренбургский государственный медицинский университет Минздрава России (зав. лабораторией — к.м.н. С.Д. Борисов), где проводили выделение культур микроорганизмов и их идентификацию по морфологическим, культуральным и биохимическим свойствам, а также по белковым спектрам, оцениваемым методом MALDI-ToF. Посев материала осуществляли секторным методом на чашки, содержащие колумбийский агар с 5% дефибрированной бараньей кровью (Средофф, Россия), после чего материал инкубировали при 37°C и просматривали колонии после 24 и 48 ч роста. Из отдельных колоний готовили мазки, окрашивали по Граму с использованием набора для окраски «Микро-Грамм-НИЦФ» (ООО «НИЦФ», Россия) и просматривали при увеличении ×1000 в микроскопе «Primo Star» (Carl Zeiss, Германия). Культуры идентифицировали с помощью метода MALDI-ToF на масс-спектрометре «VITEK MS» (bioMérieux, Франция). Биохимические свойства изучали с использованием биохимических тест-систем «STAPHYtest 16» (Erba Lachema s.r.o., Чехия) и API STAPH (bioMérieux, Франция) согласно инструкции изготовителя. Тест на цитохромоксидазу осуществляли с использованием тест-полос «OXI-test» и реактива для оксидазы (Erba Lachema s.r.o., Чехия). Тест на пирролидонилариламидазу осуществляли с использованием тест-полос «PYRA-test» и реактива для «PYRA-test» (Erba Lachema s.r.o., Чехия). Продукцию ацетоина оценивали с использованием тест-полос «VP-test» и реактивов VPT-I и VPT-II (Erba Lachema s.r.o., Чехия). Дополнительно ростовые свойства оценивали на лактозо-цистиновом агаре с пониженным содержанием электролитов (Oxoid, Великобритания) и солевом агаре (ФБУН ГНЦ ПМБ, Россия) в течение 48 ч при 37°C. Рост в анаэробных условиях оценивался на колумбийском агаре с 5% дефибрированной бараньей кровью (Средофф, Россия) при инкубации в анаэрогате (Thermo Fisher Scientific, США) с использованием газогенерирующих пакетов «Анаэрогаз» (ООО «ИНКО», Россия). Чувствительность к антибиотикам определяли

согласно методике, описанной в клинических рекомендациях «Определение чувствительности к антимикробным препаратам (ред. 2021 г.)», диско-диффузионным методом на агаре Мюллера–Хинтона (ФБУН ГНЦ ПМБ, Россия) с использованием дисков с антибиотиками производства «ООО НИЦФ» (Россия) и Erba Lachema s.r.o. (Чехия).

Для идентификации по последовательности гена 16S рРНК выделенные культуры были переданы в Институт клеточного и внутриклеточного симбиоза Уральского отделения Российской академии наук (ИКВС УрО РАН) — обособленное структурное подразделение ФГБУН Оренбургского федерального исследовательского центра УрО РАН. Получение ампликонов гена 16S рРНК проводили в ЦКП «Персистенция микроорганизмов» ИКВС УрО РАН (зав. ЦКП — к.м.н. А.О. Плотников). Ампликоны гена 16S рРНК получали методом ПЦР с праймерами 27F (AGAGTTTGATCCTGGCTCAG) и 1492R (GGTACCTTGTACGACTT) (ЗАО Евроген, Россия) и высокоточной Q5 ДНК-полимеразой (New England Biolabs Inc., США). Параметры ПЦР: 1) начальная денатурация при 98°C 30 с; 2) 35 циклов: денатурация при 98°C 10 с; отжиг праймеров при 63°C 30 с; элонгация при 72°C 45 с; 3) завершающий этап элонгации при 72°C 5 мин. Секвенирование полученных ампликонов проводили в ЗАО «Евроген» (Россия) на генетическом анализаторе «Applied Biosystems 3500xL» (Thermo Scientific, США).

Последовательности гена 16S рРНК выделенных культур *Enterococcus faecalis* и *Kytococcus schroeteri* депонированы в GenBank (NCBI) под номерами OQ685952.1 и OQ692569.1 соответственно. Данные штаммы микроорганизмов депонированы в Сетевую коллекцию симбионтных микроорганизмов ИКВС УрО РАН с названиями *Enterococcus faecalis* ICIS11 и *Kytococcus schroeteri* ICIS13 и доступны по запросу (<https://ikvs.info/biobank>).

Результаты

При госпитализации пациента в ходе осмотра установлено наличие свищевой раны 0,5 × 0,5 см со скудным гнойным отделяемым на передней поверхности средней трети левой голени, края раны гиперемированы, грануляции скудные, дном раны является надкостница. В области раны определяется свищевой ход со скудным серозно-гнойным отделяемым. Из анамнеза: в 2000 г. получил перелом обеих костей левой голени в автодорожной травме, после чего осуществлялся остеосинтез костей левой голени аппаратом внешней фиксации до полной консолидации перелома. Через шесть месяцев после демонтажа аппарата появилась гематома на ле-

вой голени, что потребовало вскрытия и дренирования. В сентябре 2022 г. получил бытовую травму левой голени, за медицинской помощью не обращался, лечился самостоятельно, через три недели появился свищевой ход с гнойным отделяемым. Диагноз по МКБ-10: «M86.6 Другой хронический остеомиелит, Хронический посттравматический остеомиелит левой голени. Гнойный свищ левой голени. Ожирение 3 ст.». При поступлении в общеклиническом анализе крови показатели в пределах нормы: лейкоциты — $5,00 \times 10^9$ /л; эритроциты — $5,13 \times 10^{12}$ /л; гемоглобин — 150,00 г/л; гематокрит — 42,00%; тромбоциты — $193,00 \times 10^9$ /л; гранулоциты — 53,00%; средние лейкоциты (Mid) — 7,30%; лимфоциты — 39,70%. В биохимическом анализе крови все показатели в пределах нормы: калий — 4,4 ммоль/л; натрий — 143,0 ммоль/л; холестерин — 4,1 ммоль/л; глюкоза — 5,8 ммоль/л; креатинин — 89,0 мкмоль/л; мочевины — 7,2 ммоль/л; общий белок — 88,0 г/л. На рентгенограмме левой голени: отломки переломов на уровне средней трети диафиза большеберцовой кости и нижней трети диафиза малоберцовой кости плотно консолидированы, на уровне верхней трети диафиза малоберцовой кости отломки стоят с диастазом, смежные поверхности с краевым склерозом — ложный сустав. По данным фистулографии контраст образует скопление на уровне мягких тканей по переднему контуру левой голени.

В ходе микробиологического исследования раневого отделяемого на колумбийском агаре с 5% дефибрированной бараньей кровью обнаружены два типа колоний в диагностическом количестве. Первый тип — белые колонии с полупрозрачным краем средних размеров, количество около 10^6 КОЕ/мл, по данным световой микроскопии — грамположительные кокки овоидной формы, расположенные чаще парно, реже — одиночно. Второй тип — белые мелкие колонии, количество около 10^5 КОЕ/мл, по данным световой микроскопии — грамположительные крупные овоидные кокки в парах, тетрадах или цепочках (рис. 1, III обложка). На вторые сутки инкубации колонии второго типа приобрели бежевую пигментацию.

С использованием MALDI-ToF масс-спектрометра «VITEK MS» (bioMérieux, Франция) культуры первого и второго типа были идентифицированы с уровнем сходства 99,9% по клинической базе микроорганизмов как *Enterococcus faecalis* и *Kytococcus schroeteri* соответственно.

Установлено, что культура *K. schroeteri* не обладает оксидазной и пирролидонилариламидазной активностью, не образует ацетоин в реакции Фогеса–Проскауера, но обладает каталазной активностью. Использование биохимических тест-систем «STAPHYtest 16» (Erba Lachema s.r.o., Чехия) и «API STAPH» (bioMérieux, Франция)

выявило низкую сахаролитическую активность исследуемого штамма и позволило идентифицировать его только как представителя родов *Micrococcus* или *Dermatococcus*. Таким образом, биохимические тест-системы, используемые в клинической микробиологии для идентификации бактерий, не позволяют корректно идентифицировать вид *K. schroeteri*.

Выявлены особенности роста на различных типах питательных сред, в частности рост на колумбийском агаре с бараньей кровью обильный, колонии округлые, выпуклые с ровным краем, при этом бежевая пигментация более отчетливо проявляется после 48 ч инкубации при 37°C. На лактозо-цистиновом агаре с пониженным содержанием электролитов (CLED) рост хоро-

ший, формируются округлые колонии молочного цвета, а на желточно-солевом агаре — рост очень слабый.

При инкубации в анаэробе (Thermo Fisher Scientific, США) с использованием газогенерирующих пакетов «Анаэрогаз» (ООО «ИНКО», Россия) в течение 72 ч роста культуры *K. schroeteri* не наблюдалось, что свидетельствует о принадлежности исследуемой культуры к облигатным аэробам. Чувствительность к антибиотикам была определена по критериям для группы стафилококков согласно клиническим рекомендациям «Определение чувствительности к антимикробным препаратам (ред. 2021 г.)» с использованием дисков (табл. 1). Культура показала резистентность

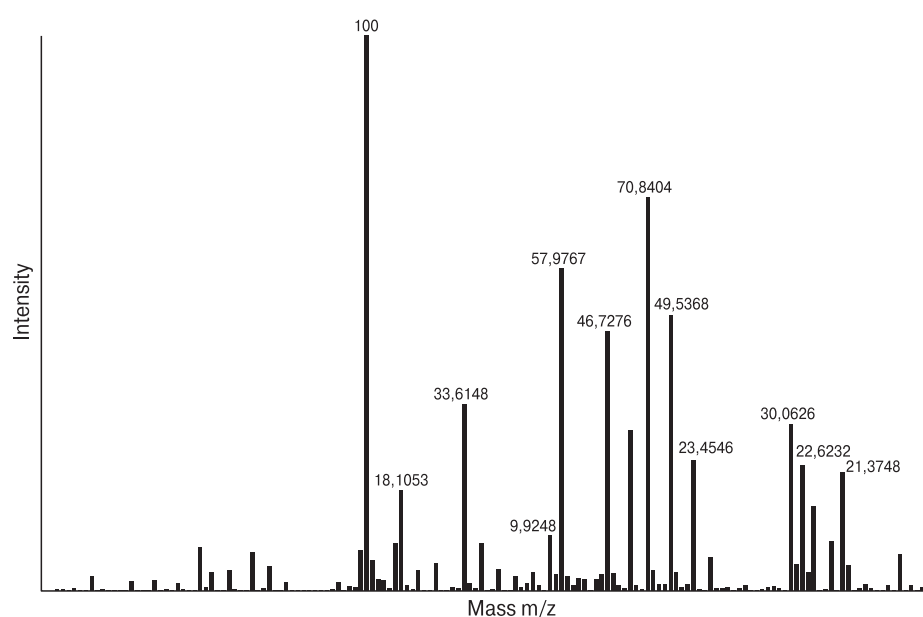
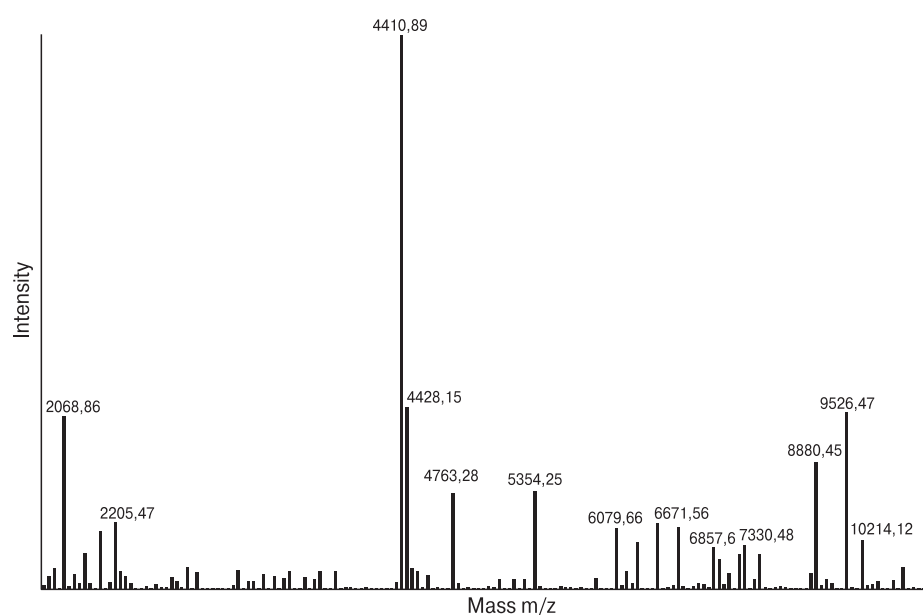
Таблица 1. Результаты антибиотикограммы выделенной культуры *Kytococcus schroeteri* ICIS13

Table 1. Antibacterial resistance in *Kytococcus schroeteri* ICIS13 culture

Группа Group	Антибиотик Antibiotic	Доза (мкг) Dose (µg)	Резистентность/чувствительность Resistance/sensitivity
Пенициллины Penicillins	Бензилпенициллин Benzylpenicillin	1 Ед/Unit	устойчив resistant
Пенициллины Penicillins	Ампициллин Ampicillin	2	устойчив resistant
Пенициллины Penicillins	Тикарциллин Ticarcillin	75	чувствителен sensitive
Пенициллины Penicillins	Оксациллин Oxacillin	1	устойчив resistant
Цефалоспорины Cephalosporins	Цефокситин Cefoxitin	30	чувствителен sensitive
Цефалоспорины Cephalosporins	Цефиксим Cefixime	5	устойчив resistant
Цефалоспорины Cephalosporins	Цефотаксим Cefotaxime	5	устойчив resistant
Тетрациклины Tetracyclines	Тетрациклин Tetracycline	30	чувствителен sensitive
Аминогликозиды Aminoglycosides	Гентамицин Gentamicin	10	чувствителен sensitive
Макролиды Macrolides	Эритромицин Erythromycin	15	чувствителен sensitive
Линкозамиды Lincosamides	Клиндамицин Clindamycin	2	чувствителен sensitive
Фторхинолоны Fluoroquinolones	Ципрофлоксацин Ciprofloxacin	5	чувствителен при увеличенной экспозиции sensitive at long exposition
Сульфаниламиды Sulfonamides	Триметоприм/Сульфометоксазол Trimethoprim/Sulfomethoxazole	1,25/23,75	чувствителен sensitive
Амфениколы Amphenicols	Левомецетин Levomecetin	30	чувствителен sensitive
Стероидные Steroids	Фузидовая кислота Fusidic acid	10	чувствителен sensitive
Ансамцины Ansamycins	Рифампицин Rifampicin	5	чувствителен sensitive
Полипептиды Polypeptides	Бацитрацин Bacitracin	0,04 Ед/Unit	устойчив resistant
Гликопептиды Glycopeptides	Ванкомицин Vancomycin	5	чувствителен sensitive
Оксазолидиноны Oxazolidinones	Линезолид Linezolid	10	чувствителен sensitive

Таблица 2. Результаты антибиотикограммы выделенной культуры *Enterococcus faecalis* ICIS11Table 2. Antibacterial resistance in *Enterococcus faecalis* ICIS11 culture

Группа Group	Антибиотик Antibiotic	Доза (мкг) Dose (μg)	Резистентность/чувствительность Resistance/sensitivity
Пенициллины Penicillins	Ампициллин Ampicillin	2	чувствителен sensitive
Карбапенемы Carbapenems	Имипенем Imipenem	10	устойчив resistant
Фторхинолоны Fluoroquinolones	Ципрофлоксацин Ciprofloxacin	5	чувствителен sensitive
Гликопептиды Glycopeptides	Ванкомицин Vancomycin	5	чувствителен sensitive
Аминогликозиды Aminoglycosides	Гентамицин Gentamicin	30	чувствителен sensitive
Оксазолидиноны Oxazolidinones	Линезолид Linezolid	10	чувствителен sensitive

**Рисунок 2. Масс-спектры культур *Enterococcus faecalis* ICIS11 (вверху) и *Kytococcus schroeteri* ICIS13 (внизу)**Figure 2. Mass spectra of *Enterococcus faecalis* ICIS11 (top) and *Kytococcus schroeteri* ICIS13 (bottom) cultures

к бензилпенициллину, ампициллину, оксациллину, цефиксиму, цефотаксиму, бацитрацину. Для *E. faecalis* чувствительность к антибиотикам определяли по критериям для группы энтерококков (табл. 2), культура оказалась устойчивой к имипенему.

Детальное изучение спектра белков выделенных культур с использованием программного пакета SARAMIS (bioMérieux, Франция) позволило установить, что для культуры *E. faecalis* характерно 174 пика, профиль которых на 99,9% соответствует профилю суперспектра *E. faecalis* 14, основанного на исследовании штамма DSM 20478 и ряда других изолятов. Для полученной нами культуры *K. schroeteri* характерно наличие 153 пиков, что на 99,9% совпадает с профилем суперспектра *Kytococcus schroeteri* 1, собранного на образце П1_V2P2A_K (рис. 2).

Секвенирование гена 16S рРНК выделенных культур бактерий полностью подтвердило результаты MALDI-ToF масс-спектрометрии. Поиск го-

мологических последовательностей гена 16S рРНК в базе данных rRNA/ITS (NCBI) с помощью инструмента BLAST на дату 19.06.2023 г. показал следующие результаты. Последовательность гена 16S рРНК длиной 1443 н.п. выделенного штамма *E. faecalis* оказалась на 100% идентичной последовательности гена *E. faecalis* CC-11 (accession No. GenBank: MW175600.1), депонированной автором из Великобритании (Королевский колледж Лондона). Последовательность гена 16S рРНК длиной 1404 н.п. выделенного штамма *K. schroeteri* показала 99,72% сходства с последовательностью гена *K. schroeteri* isolate CSUR-FIRM1 (accession No. GenBank: DQ358755.1), выделенного из крови пациента с бактериальным эндокардитом (Renvoise и соавт., 2008). Сравнимые последовательности отличались лишь по 4 нуклеотидам и объединялись на филогенетическом древе в общий кластер из 15-ти последовательностей гена 16S рРНК культур *K. schroeteri*, депонированных в GenBank (NCBI) (рис. 3).

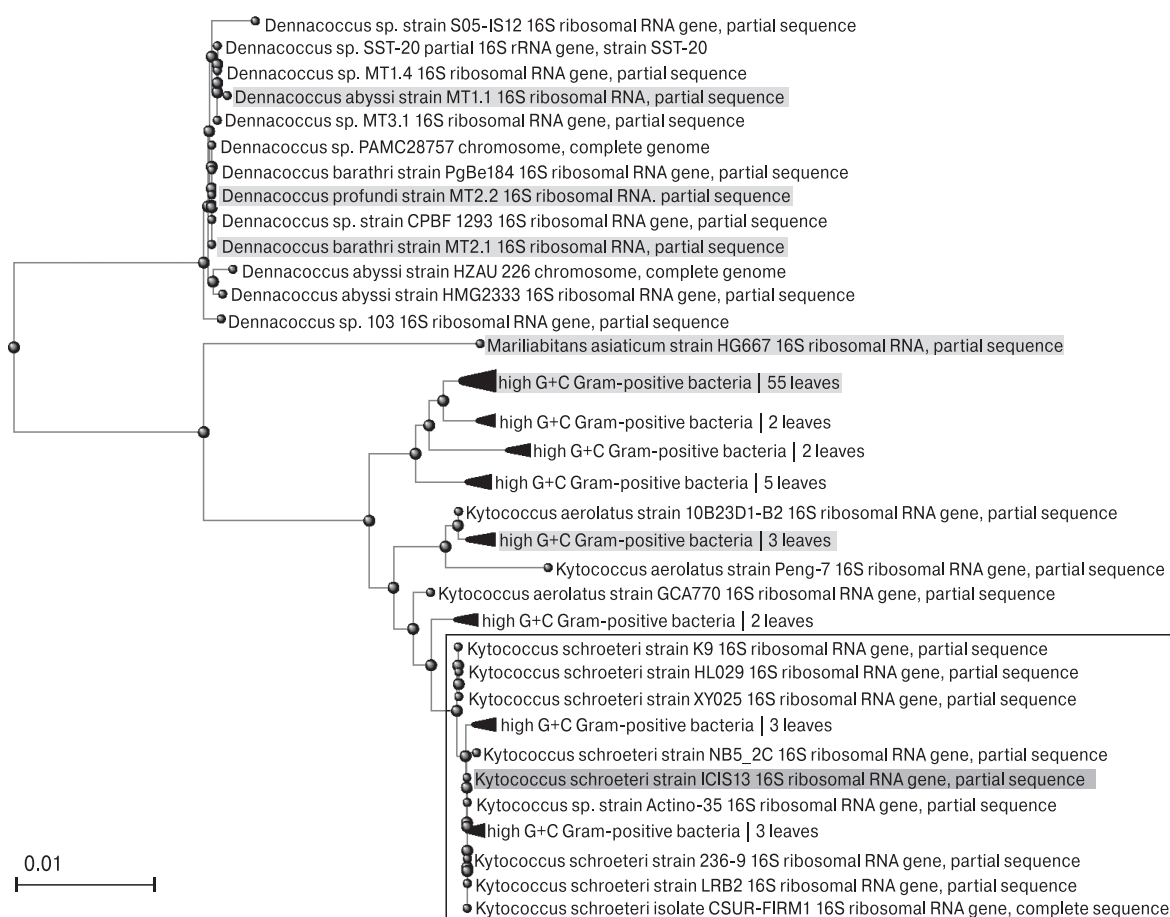


Рисунок 3. Филогенетическое древо, построенное с помощью инструмента BLAST (NCBI) по последовательностям гена 16S рРНК методом Fast Minimum Evolution, демонстрирующее кластер *Kytococcus schroeteri* (в рамке) из 15 последовательностей, включая ген выделенного штамма *K. schroeteri* ICIS13

Figure 3. Phylogenetic tree built using the BLAST tool (NCBI) based on the 16S rRNA gene sequences analyzed by Fast Minimum Evolution method showing the *Kytococcus schroeteri* cluster (in frame) composed of 15 sequences including the gene of isolated *Kytococcus schroeteri* strain ICIS13

12.10.2022 пациенту выполнено оперативное вмешательство: хирургическая обработка гнойного очага левой голени. При ревизии раны обнаружен небольшой участок сухой девитализированной большеберцовой кости. Выполнена декорткация участка, ультразвуковая кавитация ран. Рана обильно промыта перекисью водорода, стерильным 0,9% раствором хлорида натрия, осушена. Рана частично ушита отдельными узловыми швами. До и после операции пациент получал анальгетическую, сосудистую терапию. В качестве антимикробной терапии назначен гентамицин внутримышечно с режимом дозирования по 160 мг дважды в сутки в течение семи дней. В результате лечения отмечено улучшение общего состояния пациента, температура тела снизилась до нормальной, рана очистилась и начала эпителизоваться, бактерии из раны не высеваются. Перед выпиской по данным осмотра левой голени: края раны эпителизованы, без признаков воспаления, дно раны — надкостница, отделяемого из раны нет, швы состоятельны. Рана заживает вторичным натяжением. Полного заживления раневой поверхности следует ожидать в течение двух недель. Рекомендовано наблюдение у травматолога по месту жительства, перевязки с антисептиками ежедневно, снятие швов через 14 дней. После выписки пациент повторно в данное медицинское учреждение не обращался.

Обсуждение

Род *Kytococcus* (семейство *Kytococcaceae*, порядок *Micrococcales*, класс *Actinomycetes*, фила *Actinomycetota*) впервые был выделен в качестве самостоятельного таксона из рода *Micrococcus* в 1995 г. [19] и согласно базе данных LPSN — List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature (<https://lpsn.dsmz.de>) включает в себя три вида: *K. aerolatus*, *K. schroeteri*, *K. sedentarius*. Тем не менее на данный момент не сформированы критерии оценки чувствительности к антибиотикам, а большинство исследователей использует критерии устойчивости/чувствительности, разработанные для стафилококков [2, 18]. *K. schroeteri* обычно характеризуется устойчивостью к пенициллину и цефалоспорином, что не типично для рода *Micrococcus* [14].

Несмотря на то что *K. schroeteri* является одним из представителей нормальной микрофлоры кожи, данный микроорганизм способен вызывать различные заболевания, включая эндокардит протезных клапанов, инфекцию вентрикулоперитонеального шунта, протезный дисцит на фоне диабета второго типа, пневмонию и бактериемию на фоне астмы или лейкемии, а также инфекции после операций по протезированию сухожилий и костей [17].

Одной из проблем определения этиологии заболеваний, вызванных *K. schroeteri*, является относительно слабая известность данного вида, который был впервые описан лишь в 2002 г. [5], а также отсутствие тест-систем, в том числе биохимических, для надежной культуральной идентификации, в связи с чем достоверная идентификация до недавнего времени была возможна лишь с помощью риботипирования. В настоящее время в диагностических лабораториях по-прежнему невозможно бактериологическими методами надежно выделять и идентифицировать бактерии вида *Kytococcus schroeteri*. Данная ситуация объясняет скудное количество информации об этом таксоне — около двух десятков клинических случаев описано в международных журналах, при этом ни одной публикации российских авторов, и всего 15 последовательностей гена 16S рРНК из культур *K. schroeteri* депонировано в крупнейшей мировой базе данных GenBank (NCBI). В нашей работе удалось идентифицировать культуру *K. schroeteri*, выделенную в ассоциации с другим видом бактерий, только с помощью MALDI-ToF масс-спектрометрии. Достоверность идентификации подтверждена секвенированием гена 16S рРНК. Стоит отметить, что вид *K. schroeteri* был добавлен в базу микроорганизмов «VITEK MS — клиническое применение» только начиная с версии 3.2.

В нашем исследовании впервые описан вариант микст-инфекции, вызванной двумя грамположительными бактериями: *K. schroeteri* и *E. faecalis*. Подобные ассоциации могут усиливать патогенетические эффекты друг друга. Одной из причин такого эффекта является образование биопленки в раневой области [15], в которой один вид бактерий способствует адгезии и колонизации другого вида. Как следствие, раневая инфекция может переходить в хроническую форму с низкой вероятностью положительного высева при проведении микробиологического исследования [6]. Обнаружение энтерококков, чаще всего именно *E. faecalis*, как в нашем исследовании, в составе ассоциаций возбудителей инфекции, способствует передаче и распространению генов резистентности к антибиотикам [13], но в то же время может препятствовать колонизации раны грамотрицательными бактериями за счет антагонизма [20].

Таким образом, следует дифференцировать представителей вида *K. schroeteri* от других представителей порядка *Micrococcales*. При бактериологическом исследовании подозрительным признаком, указывающим на возможную принадлежность культуры *K. schroeteri*, является устойчивость к оксациллину. В связи с невозможностью использования имеющихся биохимических тест-систем, не нацеленных на дифференциацию *K. schroeteri* от родственных таксонов,

надежная идентификация данного вида пока возможна лишь с применением метода MALDI-ToF масс-спектрометрии или секвенирования гена 16S рРНК. Для более полного представления о биологии бактерий рода *Kytococcus* требуется более тщательное исследование, которое позволило бы охарактеризовать частоту встречаемости этих бактерий в клиническом материале, фенотипические особенности штаммов, в том числе сахаролитическую и протеолитическую активности, факторы патогенности, персистентный потенциал, механизмы и гены устойчивости к антибиотикам, особенности структуры генома. Дальнейшие

исследования различных типов бактериальных ассоциаций помогут выявить закономерности патогенеза при смешанных инфекциях, что позволит разработать более эффективные средства этиотропной терапии этих заболеваний.

Благодарности

Авторы выражают благодарность д.т.н., в.н.с. ЦКП «Персистенция микроорганизмов» ИКВС УрО РАН (г. Оренбург) Ю.А. Хлопко за депонирование последовательностей ДНК в GenBank (NCBI).

Список литературы/References

1. Техника сбора и транспортирования биоматериалов в микробиологические лаборатории: Методические указания (МУ 4.2.2039-05). М.: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2006. 126 с. [Technique for collecting and transporting biomaterials to microbiological laboratories: Guidelines (MU 4.2.2039-05). Moscow: Federal Center for Hygiene and Epidemiology of Rospotrebnadzor, 2006. 126 p. (In Russ.)]
2. Bagelman S., Zvigule-Neidere G. Insight into *Kytococcus schroeteri* infection management: a case report and review. *Infect. Dis. Rep.*, 2021, vol. 13, no. 1, pp. 230–238. doi: 10.3390/idr13010026
3. Ballén V., Ratia C., Cepas V., Soto S.M. Enterococcus faecalis inhibits *Klebsiella pneumoniae* growth in polymicrobial biofilms in a glucose-enriched medium. *Biofouling*, 2020, vol. 36, no. 7, pp. 846–861. doi: 10.1080/08927014.2020.1824272
4. Bayraktar B., Dalgic N., Duman N., Petmezci E. First case of bacteremia caused by *Kytococcus schroeteri* in a child with congenital adrenal hyperplasia. *Pediatr. Infect. Dis. J.*, 2018, vol. 37, no. 12, pp. 304–305. doi: 10.1097/INF.0000000000002014
5. Becker K., Schumann P., Wüllenweber J., Schulte M., Weil H.-P., Stackebrandt E., Peters G., Von Eiff C. *Kytococcus schroeteri* sp. nov., a novel Gram-positive actinobacterium isolated from a human clinical source. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 2002, vol. 52, pp. 1609–1614. doi: 10.1099/00207713-52-5-1609
6. Black C.E., Costerton J.W. Current concepts regarding the effect of wound microbial ecology and biofilms on wound healing. *Surg. Clin. North Am.*, 2010, vol. 90, no. 6, pp. 1147–1160. doi: 10.1016/j.suc.2010.08.009
7. Carek P.J., Dickerson L.M., Sack J.L. Diagnosis and management of osteomyelitis. *Am. Fam. Physician.*, 2001, vol. 63, no. 12, pp. 2413–2420.
8. Chan J.F., Wong S.S., Leung S.S., Fan R.Y., Ngan A.H., To K.K., Lau S.K., Yuen K.Y., Woo P.C. First report of chronic implant-related septic arthritis and osteomyelitis due to *Kytococcus schroeteri* and a review of human *K. schroeteri* infections. *Infection*, 2012, vol. 40, no. 5, pp. 567–573. doi: 10.1007/s15010-012-0250-9
9. García Del Pozo E., Collazos J., Cartón J.A., Camporro D., Asensi V. Bacterial osteomyelitis: microbiological, clinical, therapeutic, and evolutive characteristics of 344 episodes. *Rev. Esp. Quimioter.*, 2018, vol. 31, no. 3, pp. 217–225
10. Gaston J.R., Andersen M.J., Johnson A.O., Bair K.L., Sullivan C.M., Guterman L.B., White A.N., Brauer A.L., Learman B.S., Flores-Mireles A.L., Armbruster C.E. Enterococcus faecalis polymicrobial interactions facilitate biofilm formation, antibiotic recalcitrance, and persistent colonization of the catheterized urinary tract. *Pathogens*, 2020, vol. 9, no. 10: 835. doi: 10.3390/pathogens9100835
11. Kremers H.M., Nwojo M.E., Ransom J.E., Wood-Wentz C.M., Melton L.J. 3rd, Huddleston P.M. 3rd. Trends in the epidemiology of osteomyelitis: a population-based study, 1969 to 2009. *J. Bone Joint Surg. Am.*, 2015, vol. 97, no. 10, pp. 837–845. doi: 10.2106/JBJS.N.01350
12. Masters E.A., Ricciardi B.F., Bentley K.L.M., Moriarty T.F., Schwarz E.M., Muthukrishnan G. Skeletal infections: microbial pathogenesis, immunity and clinical management. *Nat. Rev. Microbiol.*, 2022, vol. 20, no. 7, pp. 385–400. doi: 10.1038/s41579-022-00686-0
13. Mundy L.M., Sahm D.F., Gilmore M. Relationships between enterococcal virulence and antimicrobial resistance. *Clin. Microbiol. Rev.*, 2000, vol. 13, no. 4, pp. 513–522. doi: 10.1128/cmr.13.4.513-522.2000
14. Noguchi K., Nishimura R., Ikawa Y., Mase S., Matsuda Y., Fujiki T., Kuroda R., Araki R., Maeba H., Yachie A. Half of *Micrococcus* spp. cases identified by conventional methods are revealed as other life-threatening bacteria with different drug susceptibility patterns by 16S ribosomal RNA gene sequencing. *J. Infect. Chemother.*, 2020, vol. 26, no. 3, pp. 318–319. doi: 10.1016/j.jiac.2019.10.019
15. Percival S.L., Hill K.E., Williams D.W., Hooper S.J., Thomas D.W., Costerton J.W. A review of the scientific evidence for biofilms in wounds. *Wound Repair Regen.*, 2012, vol. 20, no. 5, pp. 647–657. doi: 10.1111/j.1524-475X.2012.00836.x
16. Renvoise A., Roux V., Casalta J.P., Thuny F., Ribéri A. *Kytococcus schroeteri*, a rare agent of endocarditis. *Int. J. Infect. Dis.*, 2008, vol. 12, no. 2, pp. 223–227. doi: 10.1016/j.ijid.2007.06.011
17. Shah A.S., Vijayvargiya P., Jung S., Wilson J.W. Postoperative hardware-related infection from *Kytococcus schroeteri*: its association with prosthetic material and hematological malignancies — a report of a case and review of existing literature. *Case Rep. Infect. Dis.*, 2019: 6936472. doi: 10.1155/2019/6936472
18. Shah S., Thakkar P., Poojary S., Singhal T. A case of *Kytococcus schroeteri* prosthetic valve endocarditis in a patient with COVID-19 infection. *Indian J. Med. Microbiol.*, 2023, vol. 42, pp. 89–91. doi: 10.1016/j.ijmmb.2022.09.001
19. Stackebrandt E., Koch C., Gvozdiak O., Schumann P. Taxonomic dissection of the genus *Micrococcus*: *Kocuria* gen. nov., *Nesterenkonia* gen. nov., *Kytococcus* gen. nov., *Dermacoccus* gen. nov., and *Micrococcus* Cohn 1872 gen. emend. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 1995, vol. 45, no. 4, pp. 682–692. doi: 10.1099/00207713-45-4-682

20. Tan C.A.Z., Lam L.N., Biukovic G., Soh E.Y., Toh X.W., Lemos J.A., Kline K.A. Enterococcus faecalis antagonizes Pseudomonas aeruginosa growth in mixed-species interactions. *J. Bacteriol.*, 2022, vol. 204, no. 7: e0061521. doi: 10.1128/jb.00615-21
21. Tien B.Y.Q., Goh H.M.S., Chong K.K.L., Bhaduri-Tagore S., Holec S., Dress R., Ginhoux F., Ingersoll M.A., Williams R.B.H., Kline K.A. Enterococcus faecalis promotes innate immune suppression and polymicrobial catheter-associated urinary tract infection. *Infect. Immun.*, 2017, vol. 85, no. 12: e00378-17. doi: 10.1128/iai.00378-17

Авторы:

Борисов С.Д., к.м.н., заслуженный врач Российской Федерации, заведующий и врач-бактериолог микробиологической лаборатории научно-исследовательского центра ФГБОУ ВО Оренбургский государственный медицинский университет Минздрава России, г. Оренбург, Россия;

Каримов И.Ф., к.б.н., доцент кафедры микробиологии, вирусологии, иммунологии ФГБОУ ВО Оренбургский государственный медицинский университет Минздрава России, г. Оренбург, Россия; биолог микробиологической лаборатории научно-исследовательского центра ФГБОУ ВО Оренбургский государственный медицинский университет Минздрава России, г. Оренбург, Россия;

Плотников А.О., к.м.н., доцент, директор Института клеточного и внутриклеточного симбиоза УрО РАН — обособленного структурного подразделения ФГБНУ Оренбургский федеральный исследовательский центр УрО РАН, г. Оренбург, Россия; доцент кафедры профилактической медицины ФГБОУ ВО Оренбургский государственный медицинский университет Минздрава России, г. Оренбург, Россия;

Инчагова К.С., к.б.н., старший научный сотрудник Центра коллективного пользования «Персистенция микроорганизмов» Института клеточного и внутриклеточного симбиоза УрО РАН — обособленного структурного подразделения ФГБНУ Оренбургский федеральный исследовательский центр УрО РАН, г. Оренбург, Россия;

Паньков А.С., д.м.н., доцент, зав. кафедрой эпидемиологии и инфекционных болезней ФГБОУ ВО Оренбургский государственный медицинский университет Минздрава России, г. Оренбург, Россия; директор научно-исследовательского центра ФГБОУ ВО Оренбургский государственный медицинский университет Минздрава России, г. Оренбург, Россия;

Даньшин Д.П., врач-травматолог ГАУЗ Оренбургский областной клинический специализированный центр травматологии и ортопедии, г. Оренбург, Россия.

Authors:

Borisov S.D., PhD (Medicine), Honored Worker of Science of the Russian Federation, Head and Bacteriologist of the Microbiological Laboratory, Science Research Center, Orenburg State Medical University, Ministry of Health of Russia, Orenburg, Russian Federation;

Karimov I.F., PhD (Biology), Associate Professor of the Department of Microbiology, Virology, Immunology, Orenburg State Medical University, Orenburg, Russian Federation; Biologist of the Microbiological Laboratory, Science Research Center, Orenburg State Medical University, Ministry of Health of Russia, Orenburg, Russian Federation;

Plotnikov A.O., PhD (Medicine), Associate Professor, Director, Institute for Cellular and Intracellular Symbiosis of the Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, Orenburg Federal Research Center of the UrB RAS, Orenburg, Russian Federation; Associate Professor, Department of Preventive Medicine, Orenburg State Medical University, Ministry of Health of Russia, Orenburg, Russian Federation;

Inchagova K.S., PhD (Biology), Senior Researcher, Science Resource Center "Persistence of microorganisms", Institute for Cellular and Intracellular Symbiosis of the Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, Orenburg Federal Research Center of the UrB RAS, Orenburg, Russian Federation;

Pankov A.S., DSc (Medicine), Associate Professor, Head of the Department of Epidemiology and Infectious Diseases, Orenburg State Medical University, Orenburg, Russian Federation; Director of the Science Research Center, Orenburg State Medical University, Orenburg, Russian Federation;

Danshin D.P., Traumatologist, Orenburg Regional Clinical Specialized Center of Traumatology and Orthopedics, Orenburg, Russian Federation.

Иллюстрации к статье «Клинический случай посттравматического остеомиелита, вызванного ассоциацией *Kytococcus schroeteri* и *Enterococcus faecalis*» (авторы: С.Д. Борисов, И.Ф. Каримов, А.О. Плотников, К.С. Инчагова, А.С. Паньков, Д.П. Даньшин) (с. 985–994)

Illustrations for the article “A clinical case of posttraumatic osteomyelitis associated with *Kytococcus schroeteri* and *Enterococcus faecalis*” (authors: Borisov S.D., Karimov I.F., Plotnikov A.O., Inchagova K.S., Pankov A.S., Danshin D.P.) (pp. 985–994)

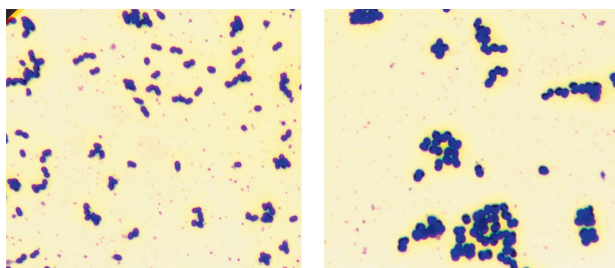


Рисунок 1. Микроскопия культур *Enterococcus faecalis* (слева) и *Kytococcus schroeteri* (справа). Окраска по Граму, увеличение ×1000

Figure 1. Microscopy imaging of *Enterococcus faecalis* (left) and *Kytococcus schroeteri* (right) cultures. Gram stainining, ×1000 magnification