

# ВЫЯВЛЕНИЕ РОЛИ МЕТИЦИЛЛИНРЕЗИСТЕНТНЫХ *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* И ИХ МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИХ ОСОБЕННОСТЕЙ В РАЗВИТИИ ГНОЙНО- НЕКРОТИЧЕСКИХ ФОРМ СИНДРОМА ДИАБЕТИЧЕСКОЙ СТОПЫ

О.Е. Хохлова<sup>1</sup>, Я. Ивао<sup>5</sup>, В.В. Камшилова<sup>3</sup>, О.В. Теплякова<sup>1,4</sup>, А.И. Мотова<sup>3</sup>,  
А.И. Дробушевская<sup>4</sup>, О.В. Перьянова<sup>1,2</sup>, Ю.С. Винник<sup>1</sup>, Н.К. Поткина<sup>1,2</sup>,  
Д.Э. Здзитовецкий<sup>1,4</sup>, Т. Ямамото<sup>2,5</sup>

<sup>1</sup> ФГБОУ ВО Красноярский государственный медицинский университет имени профессора В.Ф. Войно-Ясенецкого МЗ РФ, г. Красноярск, Россия

<sup>2</sup> Российско-Японский центр микробиологии, метагеномики и инфекционных заболеваний, г. Красноярск, Россия

<sup>3</sup> КГБУЗ Красноярская межрайонная клиническая больница скорой медицинской помощи им. Н.С. Карповича, г. Красноярск, Россия

<sup>4</sup> КГБУЗ Красноярская межрайонная клиническая больница № 7, г. Красноярск, Россия

<sup>5</sup> Международный медицинский образовательно-исследовательский центр (IMERC), Ниигата, Япония

**Резюме.** Гнойно-некротические осложнения у больных с синдромом диабетической стопы являются одной из главных причин ампутаций и инвалидизации и даже гибели пациентов. Целью данной работы явилось изучение роли MRSA и их молекулярно-генетических особенностей, а также антибиотикорезистентности в развитии гнойно-некротических форм синдрома диабетической стопы пациентов г. Красноярск за период 2010–2016 гг. Исследована в динамике микрофлора гнойно-некротических осложнений у 240 пациентов с синдромом диабетической стопы, ее антибиотикочувствительность, а также молекулярно-генетические особенности метициллинрезистентных *Staphylococcus aureus*. Для изучения микрофлоры гнойных осложнений использован бактериологический метод. Антибиотикочувствительность определяли диско-диффузионным методом; чувствительность стафилококков к антибиотикам проводили методом скрининга, ПЦР, методом серийных разведений в плотной среде в соответствии с международными рекомендациями CLSI, EUCAST. Для генотипирования и определения молекулярно-генетических особенностей — ПЦР, М-ПЦР, секвенирование. Обработку результатов проводили с использованием компьютерной программы WHONET (ВОЗ). Уровень значимости  $p < 0,05$ . Микрофлора гнойно-некротических форм синдрома диабетической стопы представлена грамотрицательными микроорганизмами — на долю представителей семейства *Enterobacteriaceae* приходилось 34,4%, неферментирующих грамотрицательных бактерий — 19,1%; грамположительными

## Адрес для переписки:

Хохлова Ольга Евгеньевна  
660022, Россия, г. Красноярск, ул. Партизана Железняка, 1,  
Красноярский государственный медицинский университет  
имени проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого.  
Тел.: 8 (391) 220-13-61; 8 (908) 018-99-84 (моб.).  
E-mail: khokhlovaol@mail.ru

## Contacts:

Olga E. Khokhlova  
660022, Russian Federation, Krasnoyarsk, Partizan Zheleznyak str., 1,  
Krasnoyarsk State Medical University named after professor  
V.F. Voyno-Yasenetsky.  
Phone: +7 (391) 220-13-61; +7 (908) 018-99-84 (mob.).  
E-mail: khokhlovaol@mail.ru

## Библиографическое описание:

Хохлова О.Е., Ивао Я., Камшилова В.В., Теплякова О.В.,  
Мотова А.И., Дробушевская А.И., Перьянова О.В., Винник Ю.С.,  
Поткина Н.К., Здзитовецкий Д.Э., Ямамото Т. Выявление роли  
метициллинрезистентных *Staphylococcus aureus* и их молекулярно-  
генетических особенностей в развитии гнойно-некротических форм  
синдрома диабетической стопы // Инфекция и иммунитет. 2019. Т. 9,  
№ 1. С. 95–106. doi: 10.15789/2220-7619-2019-1-95-106

© Хохлова О.Е. и соавт., 2019

## Citation:

Khokhlova O.E., Iwao Y., Kamshilova V.V., Teplyakova O.V., Motova A.I.,  
Drobusheskaya A.I., Peryanova O.V., Vinnik Yu.S., Potkina N.K.,  
Zdzitowiecki D.E., Yamamoto T. A role of methicillinresistant *Staphylococcus*  
*aureus* strains and related molecular genetic features in developing purulent-  
necrotic forms of the diabetic foot syndrome // Russian Journal of Infection  
and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2019, vol. 9, no. 1, pp. 95–106.  
doi: 10.15789/2220-7619-2019-1-95-106

DOI: <http://dx.doi.org/10.15789/2220-7619-2019-1-95-106>

микроорганизмами — в 46,5% случаев, доля *S. aureus* — 18,4%. Микроорганизмы характеризовались полирезистентностью к антимикробным препаратам: доля БЛРС-продуцентов — 36,4%; доля МБЛ-продуцентов — 30,3%; доля MRSA — 36,4%. Доминирующим клоном MRSA среди пациентов с гнойно-некротическими формами синдрома диабетической стопы, госпитализированных в правобережный и левобережный стационары г. Красноярск являлся ST239/spa3(t037)/agr1/SCCmecIII.1.1.2(IIIA)/coaIV/tst+, характеризующийся высоким уровнем вирулентности и мультирезистентностью. Вторыми по значимости генетическими вариантами MRSA являлись ST8/spa1(t008)/agr1/SCCmecIV.3.1.1/CoaIII и ST12/spanew(t156)/agr1/SCCmecUT/coaIorVII, которые характеризовались устойчивостью к 1–2 группам антимикробных препаратов, помимо β-лактамов. Среди пациентов с гнойно-некротическими формами синдрома диабетической стопы, госпитализированных в стационары г. Красноярск распространены в основном генетические варианты MRSA, соответствующие клонам, выявленным ранее от пациентов с другими нозологиями на данной территории. Установлено, что среди от пациентов с гнойно-некротическими формами синдрома диабетической стопы, госпитализированных как в правобережный, так и левобережный стационары г. Красноярск, выделяются изоляты MRSA, преимущественно относящиеся к одним и тем же генетическим вариантам. Длительная госпитализация пациентов с данной патологией, а также их последующая неоднократная госпитализация в другие стационары г. Красноярск, способствует переносу госпитальных штаммов из одного стационара в другой.

**Ключевые слова:** микрофлора, антибиотикорезистентность, метициллинрезистентные *S. aureus*, молекулярно-генетические особенности, синдром диабетической стопы, гнойно-некротические осложнения.

## A ROLE OF METHICILLIN-RESISTANT *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* STRAINS AND RELATED MOLECULAR GENETIC FEATURES IN DEVELOPING PURULENT-NECROTIC FORMS OF THE DIABETIC FOOT SYNDROME

Khokhlova O.E.<sup>a</sup>, Iwao Y.<sup>c</sup>, Kamshilova V.V.<sup>c</sup>, Teplyakova O.V.<sup>a,d</sup>, Motova A.I.<sup>c</sup>, Drobusheskaya A.I.<sup>d</sup>, Peryanova O.V.<sup>a,d</sup>, Vinnik Yu.S.<sup>a</sup>, Potkina N.K.<sup>a,b</sup>, Zdzitowiecki D.E.<sup>a,c</sup>, Yamamoto T.<sup>b,e</sup>

<sup>a</sup> Krasnoyarsk State Medical University named after professor V.F. Voyno-Yasenetsky, Krasnoyarsk, Russian Federation

<sup>b</sup> Russia-Japan Center of Microbiology, Metagenomics and Infectious Diseases, Krasnoyarsk State Medical University, Krasnoyarsk, Russian Federation

<sup>c</sup> Krasnoyarsk State Emergency Hospital named after N.S. Karpovich, Krasnoyarsk, Russian Federation

<sup>d</sup> Krasnoyarsk State Municipal Clinical Hospital No. 7, Krasnoyarsk, Russian Federation

<sup>e</sup> International Medical Education and Research Center, Niigata, Japan

**Abstract.** Purulent-necrotic complications in patients with diabetic foot syndrome is one of the main causes resulting in amputation and disability, or even lethal outcome. Our study was aimed at investigating a role played by MRSA and related molecular genetic features, as well as antibiotic resistance in developing purulent-necrotic forms of the diabetic foot syndrome in Krasnoyarsk, in the 2010–2016 period. A microbiota profile related to purulent-necrotic complications, antibiotic susceptibility, as well as the molecular genetic features of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* were examined in 240 patients with diabetic foot syndrome. A bacteriological method was used to investigate microbiota profile related to purulent complications. Antibiotic sensitivity was analyzed by disc-diffusion method; staphylococcal antibiotic sensitivity was evaluated by screening, PCR, solid medium serial dilution, in accordance with the CLSI and EUCAST international recommendations. Genotyping and examining molecular genetic features were performed by using PCR, M-PCR, and sequencing. The data were analyzed by using WHONET (WHO) software. Significance level was set at  $p < 0.05$ . It was found that microbiota profile linked to purulent-necrotic forms of the diabetic foot syndrome was presented by various Gram-negative microorganisms including Enterobacteriaceae spp. and non-fermenting bacteria accounting for 34.4% and 19.1%, respectively, as well as Gram-positive microorganisms found in 46.5% cases, including *S. aureus* (18.4% cases). Moreover, microorganisms were characterized by multiresistance to diverse antimicrobial drugs: percentage of BLDS- and MBL-producers as well as MRSA comprised 36.4%, 30.3%, and 36.4%, respectively. Further, MRSA ST239/spa3(t037)/agr1/SCCmecIII.1.1.2(IIIA)/coaIV/tst+ clone dominated in patients with purulent-necrotic forms of diabetic foot syndrome admitted to the right-bank and left-bank hospitals in the city of Krasnoyarsk that was characterized by a high virulence level and multidrug resistance. Next, subdominant MRSA genetic variants were presented by ST8/spa1(t008)/agr1/SCCmecIV.3.1.1/CoaIII and ST12/spanew(t156)/agr1/SCCmecUT/coaIorVII characterized by resistance to 1–2 groups of antimicrobials apart from β-lactams. Importantly, similar MRSA genetic variants earlier isolated in patients with other nosological entities common in this geographic region were also mainly verified in patients with purulent-necrotic forms of diabetic foot syndrome admitted to Krasnoyarsk hospitals. In particular, it was demonstrated that MRSA isolates predominantly belonging to the same genetic variants were detected in patients with purulent-necrotic forms of diabetic foot syndrome hospitalized both at the right-bank and left-bank hospitals of the city of Krasnoyarsk. Thus, long-term hospitalization of patients with purulent-necrotic forms of diabetic foot syndrome as well as subsequent repeated admittance to other hospitals in the city of Krasnoyarsk facilitates inter-hospital bacterial strain transmission.

**Key words:** microflora, antibiotic resistance, methicillin-resistant *S. aureus*, molecular genetic features, diabetic foot syndrome, purulent-necrotic complications.

## Введение

Синдром диабетической стопы — самое частое осложнение сахарного диабета. С ним связана примерно треть госпитализаций этих больных. Синдром возникает у 80% больных сахарным диабетом и при наличии критической ишемии нижних конечностей без коррекции артериального кровотока частота больших ампутаций составляет 70—90%, летальность после которых достигает 60—70% [4]. Две трети пациентов умирают от гнойно-некротических поражений нижних конечностей, причем их развитие у больных сахарным диабетом наблюдается в 40 раз чаще, чем в общей популяции [7, 17, 22]. В США частота ампутаций, связанных с диабетом, составляет 66 тыс. случаев в год; в 50—70% случаев причиной ампутации стопы является гангрена [26]. Пребывание пациентов с сахарным диабетом и с гнойно-некротическими поражениями в стационаре на 50% дольше [8]. Гнойно-некротические процессы на фоне сахарного диабета возникают в результате ишемии тканей дистальных отделов конечности, нейроэндокринных отклонений, нарушения иммунного статуса, изменений в системе гемостаза, а также воздействия патогенных микроорганизмов [1, 7].

При микробиологическом исследовании поражений нижних конечностей при синдроме диабетической стопы без риска ампутации наиболее часто выделяют *S. aureus* и  $\beta$ -гемолитические стрептококки (групп А, В, С, G) [6, 11]. Диабетическое поражение нижних конечностей имеет хроническое течение и, как правило, приводит к необратимым последствиям. От пациентов, длительно болеющих и имеющих хронические инфицированные язвы стоп с высокой вероятностью необходимости ампутации, относительно часто выделяются энтерококки, энтеробактерии, анаэробы, неферментирующие грамотрицательные бактерии. Предшествующая госпитализация, длительная антибиотикотерапия препаратами широкого спектра действия и хирургическое лечение являются предрасполагающими факторами к инфицированию язв полирезистентными микроорганизмами, например метициллинрезистентными *S. aureus* (MRSA) и полирезистентными энтерококками, что значительно ухудшает прогноз у пациентов с диабетической стопой [8, 23]. Таким образом, одним из ведущих возбудителей гнойных осложнений у пациентов с синдромом диабетической стопы является MRSA, доля которых среди *S. aureus* у данных пациентов в США составляет 40—50% [26].

Сложность терапии инфекций, вызванных MRSA, обусловлена их устойчивостью не только к бета-лактамам антибиотикам, но и к широкому кругу препаратов других классов [2]. Традиционно MRSA классифицируют как ассо-

циированные с врачебной деятельностью штаммы (HA-MRSA), внебольничные штаммы (CA-MRSA), ассоциированные с животноводством штаммы (LA-MRSA) [27]. В разных странах мира распространены основные генетические клоны данных линий MRSA, различающихся по степени вирулентности и уровню антибиотикорезистентности [10, 15, 21]. Так, во Франции и Швейцарии выявили распространение среди пациентов с синдромом диабетической стопы штаммов MRSA генотип ST8/spa(t008) и ST5/ST105/spa(t002), устойчивых помимо бета-лактамов антибиотиков к гентамицину [24]. В Мексике выявлено распространение клона MRSA USA300 (ST8/spa(t008)/PVL+) среди пациентов с диабетической стопой [13].

В РФ опубликована информация о распространении генетических вариантов MRSA, изолированных от госпитализированных пациентов [14, 19], но нет информации о распространении генетических вариантов MRSA среди пациентов с синдромом диабетической стопы.

Целью данной работы явилось изучение роли MRSA и их молекулярно-генетических особенностей, а также антибиотикорезистентности в развитии гнойно-некротических форм синдрома диабетической стопы пациентов г. Красноярска за период 2010—2016 гг.

## Материалы и методы

За период 2010—2016 гг. в г. Красноярске проспективно обследовано 240 больных с вторичными осложненными инфекциями кожи и мягких тканей, такими как гнойно-некротические формы синдрома диабетической стопы, госпитализированных в КГБУЗ КМКБСМП им. Н.С. Карповича и КГБУЗ Красноярская межрайонная клиническая больница № 7. Обследуемые дали информированное добровольное согласие на обследование. Работу проводили в соответствии с биомедицинской этикой согласно требованиям Женевской конвенции о правах человека (1997 г.) и Хельсинкской декларации Всемирной медицинской ассоциации (2000 г.) при одобрении локального этического комитета ФГБОУ ВО КрасГМУ им. проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого Минздрава России (№ 28/2010). Возраст обследованных 32—89 лет (средний возраст 61,2±15,9). Доля мужчин составила 55,8%, доля женщин 44,2%. Критерии включения: возраст  $\geq 18$  лет, сахарный диабет 2-го типа, гнойно-некротические формы синдрома диабетической стопы, госпитализация в стационар. Критерии исключения: сахарный диабет 1-го типа, ВИЧ-инфекция. Материал для исследования — биоптат, гнойное отделяемое. Забор материала осуществляли в первые 48 часов госпитализации (240 образцов) и далее по мере необходимости на 5—50 сутки госпитализации (163 образцов). Посев материала осуществля-

ли на комплекс питательных сред по методу Gould — кровяной агар, желточно-солевой агар, хром-агар. У 16 обследуемых параллельно с изучением аэробной и факультативно-анаэробной микрофлорой было проведено выделение анаэробных микроорганизмов. С этой целью осуществляли забор биоптата во время операции. Посев исследуемого материала осуществляли незамедлительно на свежеприготовленную питательную среду для выделения анаэробов — агар Шадлера по методу Gould. Чашки с посевами исследуемого материала на агар Шадлера помещали в индивидуальные газогенераторные пакеты Generbag (bioMerieux, Франция) для выделения анаэробов. Посевы инкубировали в термостате при 37°C в течение 48–96 ч. Выросшие колонии отсеивали на чашки Петри с агаром Шадлера и культивировали в аэробных и анаэробных условиях. В случае если рост наблюдался только в анаэробных условиях, культура — облигатный анаэроб, если культура росла и в аэробных условиях — факультативный анаэроб. Идентификацию исследуемых культур проводили на основании морфо-тинкториальных, культуральных и биохимических свойств, используя помимо рутинных методов тест-системы Remel (США), bioMerieux (Франция) для идентификации микроорганизмов.

Чувствительность микроорганизмов к антибиотикам определяли диско-диффузионным методом на агаре Мюллера–Хинтон с использованием дисков ОХОИД (Великобритания); чувствительность стафилококков к оксациллину (Sigma-Aldrich, США), цефокситину (ОХОИД, Великобритания) проводили методом скрининга; чувствительность стафилококков к другим антимикробным препаратам проводили методом серийных разведений в соответствии с международными рекомендациями CLSI, EUCAST. Продукцию бета-лактамаз расширенного спектра (БЛРС) у энтеробактерий определяли фенотипически: методом «двойных дисков», при котором продукция определяется за счет синергизма цефалоспорины (цефотаксим, цефтазидим, цефепим) с клавулановой кислотой на среде Мюллера–Хинтон с использованием дисков с антибиотиками ОХОИД (Великобритания) [9, 12]. Продукцию металло-β-лактамаз (МБЛ) проводили методом инактивации карбапенемов (СІМ) [30]. Для внутрилабораторного контроля определения антибиотикочувствительности и метициллинорезистентности использовали референс-штаммы из коллекции ATCC (*S. aureus* ATCC 25923, *E. coli* ATCC 25922 и *P. aeruginosa* ATCC 27853).

Для генетических исследований MRSA микроорганизмы культивировали в бульоне LB (Difco, Detroit, MI) при температуре 37°C до фазы логарифмического роста.

Для определения принадлежности к MRSA исследовали гены *nuc* и *tecA* с помощью ПЦР.

Праймеры для выявления гена *nuc* (*nuc1*: GCG ATTGATGGTGATACGGTT и *nuc2*: AGCCAA GCCTTGACGAACATAAGC) необходимы для дифференциации MRSA и MSSA от коагулазонегативных стафилококков. Праймеры для выявления гена *tecA* (*tecA-QF2*: GGGATCATA GCGTCATTATTCC и *tecA-QR2*: CGATGCCTA TCTCATATGC), кодирующего синтез ПСБ2а. Режим амплификации включал начальный цикл 94°C 3 мин. Следующие этапы амплификации включали денатурацию ДНК при 94°C в течение 90 с; отжиг при 55°C в течение 60 с; синтез в течение 60 с при 72°C (30 циклов) и завершающий цикл в течение 10 мин при 72°C. Детекцию продуктов амплификации ПЦР проводили с помощью электрофореза в 1,5% агарозном геле с использованием бромистого этидия. В качестве контроля молекулярной массы использовали 100 bp DNA ladder (Sigma-Aldrich, Япония).

С помощью ПЦР исследовали 42 гена патогенности: 2 лейкоцидина; 4 гемолизина; 19 генов стафилококковых энтеротоксинов (SE): *tst*, *sea*, *seb*, *sec*, *sed*, *see*, *seg*, *seh*, *sei*, *sej*, *sek*, *sel*, *sem*, *sen*, *seo*, *sep*, *seq*, *seu*; 3 эксфолиатина; *set*, *edin*, *ssl*; 14 генов адгезии [28].

Молекулярное типирование штаммов MRSA проводили в соответствии с международными стандартами [28]. MLST типирование основано на изучении семи «генов домашнего хозяйства» и определения аллельного профиля (аллельный номер) с использованием вебсайта (<http://www.mlst.net>). Данные были проанализированы с помощью программного обеспечения eBURST. SCCmec типирование (I–V типы) — с применением ПЦР, М-ПЦР. Субтипирование SCCmec проводили в соответствии с рекомендациями [16, 20] (<http://www.staphylococcus.net>).

Молекулярное типирование бактериального генома путем анализа хромосомных рестрикционных фрагментов PFGE анализ проводили с использованием SmaI, электрофорез проводили в 1,2% геле с маркерной ДНК Lambda ladder (Bio-Rad Laboratories, США) [25, 29].

Плазмидный профиль изучили модифицированным вариантом метода Kado и Liu с помощью Plasmid Midi Kit (QIAGEN Sciences, Япония) [18]. Плазмидную ДНК анализировали электрофорезом в 0,6–1% геле. Гены резистентности к антимикробным препаратам определяли методом ПЦР.

Все праймеры заказывали в ЗАО «Евроген», для постановки ПЦР использовали реактивы Thermo Fisher Scientific (США).

Обработку результатов проводили с использованием компьютерной программы WHONET (ВОЗ). Критерий Шапиро–Уилка использовали для проверки количественных признаков на нормальность распределения. Количественные признаки описывались в виде минимального (min), максимального (max), среднего значений (Mean), стандартного отклонения (m); качественные

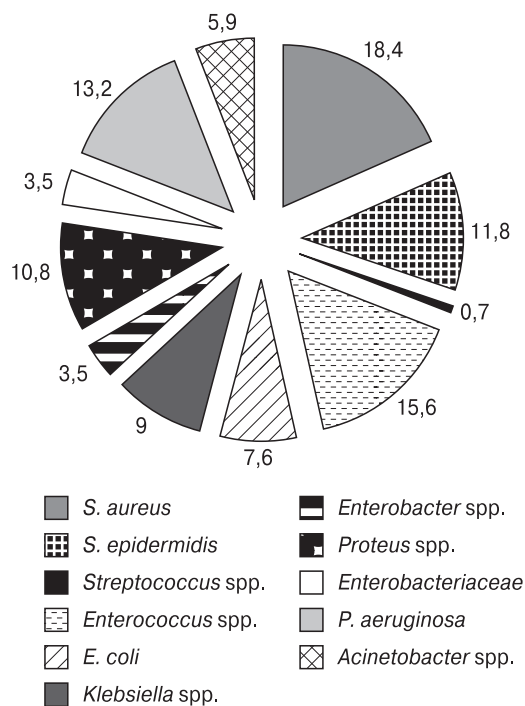


признаки представлялись в виде долей (%) и абсолютных чисел. Сравнение количественных признаков проводилось с помощью критерия Манна–Уитни. В сравнительном анализе использовался двусторонний критерий Фишера. Уровень значимости  $p < 0,05$ .

## Результаты

При исследовании биоптата, гнойного отделяемого 240 больных в первые сутки поступления в стационар рост микроорганизмов в этиологически значимом количестве был получен в 85% случаев (у 204 обследованных). При этом микроорганизмы были выделены в монокультуре в 76,4% случаев, доля ассоциаций составила 23,6%, в том числе из двух микроорганизмов — 20,1%, из трех микроорганизмов — 3,5%. В составе микрофлоры гнойного отделяемого, биоптатов преобладала грамотрицательная микрофлора и выделена в 53,5% случаев; на долю представителей семейства *Enterobacteriaceae* приходилось 34,4%, в том числе выделены *E. coli* (7,6%), *Klebsiella* spp. (9,0%), *Enterobacter* spp. (3,5%), *Proteus* spp. (10,8%) и др. (*Citrobacter freundii*, *Serratia marcescens*, *Providencia rettgeri* — 3,5%). На долю неферментирующих грамотрицательных бактерий приходилось 19,1% случаев, выделены *P. aeruginosa* (13,2%), *Acinetobacter* spp. (5,9%). Грамположительные микроорганизмы, выделены в 46,5% случаев (рис. 1). В 30,2% случаев были выделены стафилококки. Доля *Enterococcus* spp. составила 15,6%, при этом преобладали *Enterococcus faecalis* (11,5%).

На 5–50 сутки госпитализации обследовано 163 больных с вторичными осложненными инфекциями кожи и мягких тканей, такими как гнойно-некротические формы синдрома диабетической стопы, госпитализированных в КГБУЗ КМКБСМП им. Н.С. Карповича и КГБУЗ Красноярскую межрайонную клиническую больницу № 7. У больных с синдромом диабетической стопы при посеве биоптатов, раневого отделяемого на 5–50 сут госпитализации рост микроорганизмов был получен в 95,1% случаев в этиологически значимом количестве. Доля ассоциаций микроорганизмов в биоптате, раневом отделяемом составила 48,4%. При исследовании биоптата, раневого отделяемого у больных с синдромом диабетической стопы в составе микрофлоры преобладали грамположительные микроорганизмы, выделенные в 50% случаев и представленные преимущественно *Staphylococcus* spp. (31,3%), а также *Enterococcus* spp. (16,2%) (рис. 2). На долю грамотрицательных микроорганизмов приходилось 48%, в том числе неферментирующих грамотрицательных бактерий (НГОб) приходилось 15,7% случаев, при этом среди них доминировали *P. aeruginosa*. Среди представителей семейства *Enterobacteriaceae* (32,3%) доминировали *Proteus* spp. Дрожжеподобные грибы р. *Candida*



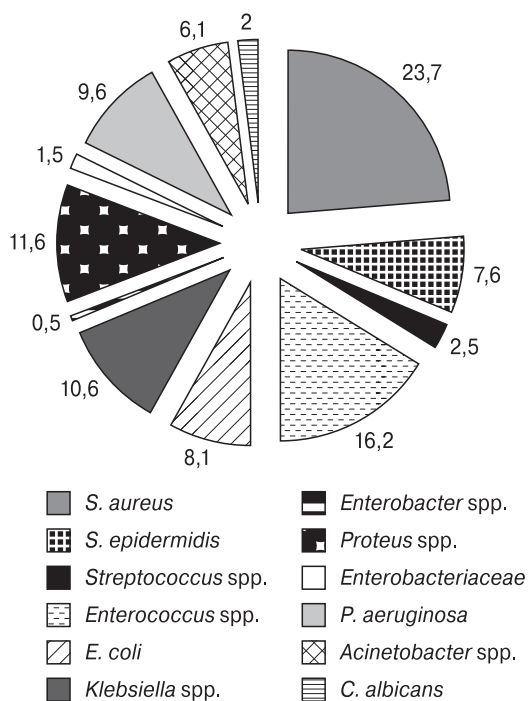
**Рисунок 1. Микрофлора гнойного отделяемого, биоптата от пациентов с гнойно-некротическими формами синдрома диабетической стопы в первые сутки госпитализации (%)**

Figure 1. Analyzing microflora profile in purulent discharge and biopsy samples from patients with purulent-necrotic forms of diabetic foot syndrome at day 1 during hospitalization (%)

выделены в 2% случаев. Наиболее частыми ассоциантами являлись MSSA и *P. aeruginosa*; MSSA и *A. baumannii*, *E. faecalis*; *P. aeruginosa* и *Proteus mirabilis*; *K. pneumoniae*; *E. faecalis* и *K. pneumoniae*.

При изучении антибиотикорезистентности штаммов представителей сем. *Enterobacteriaceae*, выделенных от больных с синдромом диабетической стопы в первые сутки госпитализации, резистентность их к цефтазидиму была установлена в 36,4% случаев; к цефоперазону/сульбактаму и ампициллину/сульбактаму в 3 и 11,1% случаев соответственно; к ципрофлоксацину были устойчивы 56,6% штаммов; камикацину — 24,2%; к карбапенемам — 4% (рис. 3). На 5–50 сутки госпитализации уровень резистентности штаммов представителей сем. *Enterobacteriaceae* к амикацину, цефтазидиму, цефоперазону/сульбактаму, ципрофлоксацину и карбапенемам изменился не значимо. Отмечалось увеличение резистентности к ампициллину/сульбактаму до 52,1%. Доля БЛРС-продуцентов среди энтеробактерий, выделенных в первые сутки госпитализации, составила 36,4%; на 5–50 сутки госпитализации — 35,7%.

При изучении антибиотикорезистентности неферментирующих грамотрицательных бактерий, выделенных от больных с синдромом диабетической стопы в первые сутки госпитализации



**Рисунок 2. Микрофлора гнойного отделяемого, биоптата от пациентов с гнойно-некротическими формами синдрома диабетической стопы на 5–50 сутки госпитализации (%)**

Figure 2. Analyzing microflora profile in purulent discharge and biopsy samples from patients with purulent-necrotic forms of diabetic foot syndrome at day 5–50 during hospitalization (%)

ции, установили их резистентность к амикацину в 49,1% случаев, к ципрофлоксацину в 47,4% случаев, к карбапенемам в 41,3% случаев. На 5–30 сутки госпитализации уровень резистентности штаммов неферментирующих грамотрицательных бактерий к карбапенемам изменился незначительно. Увеличился процент штаммов, резистентных к амикацину, до 66,7%, к ципрофлоксацину — до 70,8% (рис. 3). Доля МБЛ-продуцентов среди неферментирующих грамотрицательных бактерий, выделенных в первые сутки госпитализации, составила 30,3%; на 5–50 сутки госпитализации — 32,4%.

В первые сутки госпитализации 26,7% штаммов энтерококков были устойчивы к ампициллину. На 5–50 сутки госпитализации их доля возросла до 28,4%.

В первые сутки госпитализации доля MRSA составила 36,4%; на 5–50 сутки госпитализации — 38,8%. Среди коагулазоотрицательных стафилококков доля метициллинрезистентных штаммов составила 26,7%.

Проведено генотипирование 15 штаммов MRSA. Все выделенные штаммы MRSA были PVL-негативными, 40% изученных штаммов MRSA были отнесены к генотипу ST8/spa1(t008)/agr1/SCCmecIV.3.1.1/CoaIII, характеризовались наличием лейкоцидина lukED, гемолизина,

энтеротоксина SEA (sea), адгезинов (за исключением spa, bbp) (табл. 1). Характеризовались антибиотикорезистентностью к фторхинолонам, хлорамфениколу (гены резистентности локализованы в плазмиде 2,9 т.п.н.), в 50% случаев резистентны к аминогликозидам (гены резистентности локализованы в плазмиде 25 и 27 т.п.н.) и к макролидам (гены резистентности локализованы в плазмиде 2,4 и 2,5 т.п.н.); и чувствительностью ко всем остальным изученным препаратам. 3 штамма MRSA варианта ST8/spa1(t008)/agr1/SCCmecIV.3.1.1/CoaIII были выделены от пациентов в момент поступления в стационар и возможно относились к внебольничным, так как штаммы были выделены в срок до 48 ч госпитализации и у пациентов не было выявлено риска колонизации госпитальными штаммами. Все выделенные изоляты, относящиеся к данному генотипу были получены от пациентов, госпитализированных в разные стационары одного города.

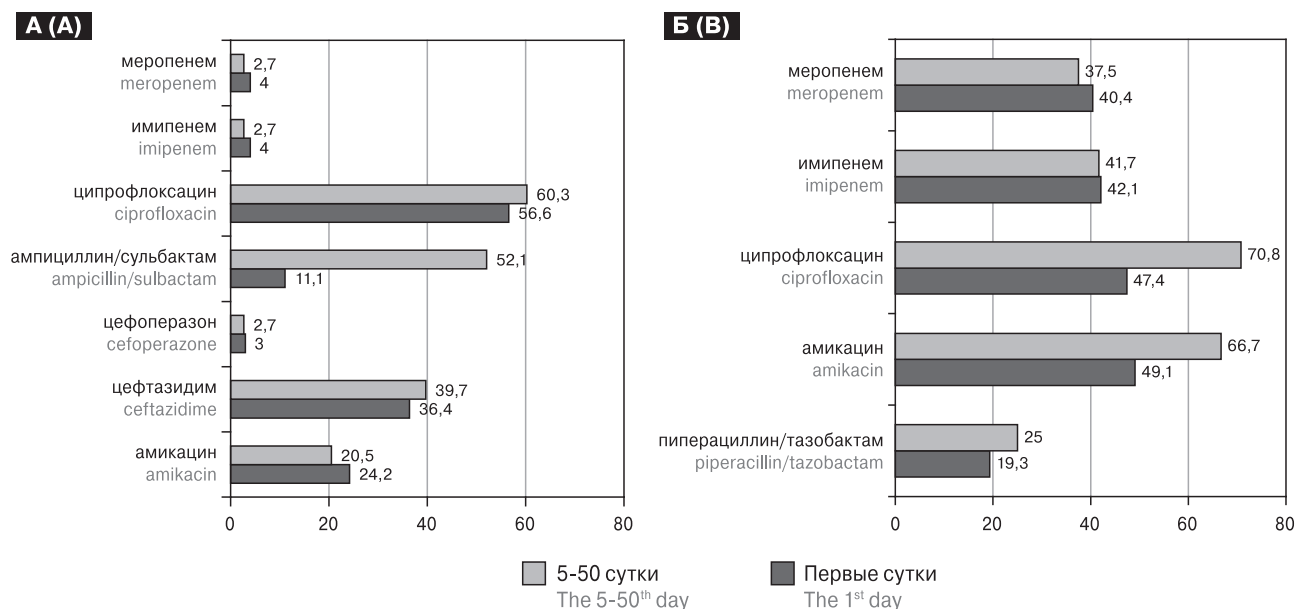
Из выделенных штаммов MRSA 46,7% принадлежали к ST239/spa3(t037)/agr1/SCCmecIII.1.1.2 (PIA)/coaIV, характеризовались наличием лейкоцидина lukED, гемолизина, токсина синдрома токсического шока TSST-1 (tst), энтеротоксинов SEK (sek), SEQ (seq), адгезинов (за исключением bbp). Характеризовались антибиотикорезистентностью к аминогликозидам, макролидам, линкозамидам, фторхинолонам, хлорамфениколу (гены резистентности локализованы в плазмиде 2,9 т.п.н.), рифампицину (МПК > 128 мкг/мл), сульфаметоксазол/триметоприму и чувствительностью ко всем остальным изученным препаратам. По результатам PFGE анализа данные штаммы относились к одному клону, но при этом отличались между собой на один банд, то есть не были полностью идентичными. При этом, все выделенные штаммы данного генотипа, вероятно, относились к госпитальным, так как были выделены от пациентов позднее 48 ч пребывания в стационаре (пациенты при этом находились в разных стационарах г. Красноярск).

Два выделенных штамма MRSA (13,3%) относились к ST12/spanew(t156)/agr1/SCCmecUT/coaIorVII, характеризовались наличием лейкоцидина lukED, гемолизина, энтеротоксина SEC (sec), SEP (sep), адгезинов (за исключением spa, bbp), а также чувствительностью к аминогликозидам, макролидам, тетрациклину, фторхинолонам, рифампицину, сульфаметоксазол/триметоприму, гликопептидам, оксазолидинонам, мупироцину, фосфомицину, фузидиевой кислоте; были устойчивы к хлорамфениколу, гены резистентности к которому локализовались в плазмиде (4,5 т.п.н.). Оба штамма были выделены от разных пациентов, госпитализированных в один стационар. Один из штаммов MRSA генотип ST12/spanew(t156)/agr1/SCCmecUT/coaIorVII был выделен от пациента К., мужчи-

ны 84 лет, проживавшего в г. Красноярске, 01.10.2010 г. экстренно поступившего в стационар КГБУЗ Красноярская межрайонная клиническая больница № 7 с основным диагнозом «Сахарный диабет 2 типа, стадия декомпенсации. Диабетический гломерулосклероз. Состояние после ампутации правой нижней конечности на уровне верхней трети бедра и левой нижней конечности на уровне верхней трети голени. Гнойно-некротическое воспаление культи левой голени. Сопутствующий: ИБС: дилатация полости левого желудочка сердца, мелкоочаговый кардиосклероз, стенозирующий коронаросклероз около 50%». Операции от 06.10.2010 г. и 13.10.2010 г.: вторичная хирургическая обработка раны, некрэктомия. На фоне назначенной стандартной терапии продолжалось гнойно-гранулирующее воспаление в мягких тканях культи левой голени. Начался внутриальвеолярный отек легких; образовался двусторонний гидроторакс; отмечались мелкоточечные кровоизлияния в слизистые и серозные оболочки, дистрофические изменения паренхиматозных органов. Сохраняющаяся интоксикация вследствие продолжающегося воспаления в культе усугубляла сердечную недостаточность. Развившаяся острая сердечная недостаточность привела к смерти больного 15.10.2010 г. Штамм MRSA OC50 был выделен из биоптата, забранного во время операции от 06.10.2010 г. и из аутоптата при патологоанатомическом вскрытии.

## Обсуждение

Микрофлора гангренозных поражений у пациентов гнойно-некротическими формами синдрома диабетической стопы представлена как грамположительными, так и грамотрицательными микроорганизмами. При этом нами не установлено существенных различий ( $p > 0,05$ ) в спектре микроорганизмов выделенных в первые сутки госпитализации и на 5–50 сутки. Доля *S. aureus* среди всех возбудителей гнойно-некротических осложнений синдрома диабетической стопы в первые сутки госпитализации составила 18,4%, на 5–50 сутки — 23,7%. По результатам микробиологических исследований биоптатов пациентов с синдромом диабетической стопы за рубежом доля *S. aureus* составляет 15–50% [26], таким образом, наши результаты соответствуют общемировым. В плане распространенности полирезистентных микроорганизмов среди данной категории пациентов, в частности доли MRSA, БЛРС-продуцирующих энтеробактерий, МБЛ-положительных р. *Pseudomonas*, р. *Acinetobacter*, выделенных в первые сутки госпитализации и на 5–50 сутки, также существенных различий не выявлено ( $p > 0,05$ ). Пациенты с синдромом диабетической стопы являются особой категорией больных, поражение тканей у которых приобретает затяжной характер и требует неоднократных госпитализаций. Нарушения микроциркуляции в тяжелых случаях, таких как синдром



**Рисунок 3. Результаты определения резистентности к антибактериальным препаратам (%)**

Figure 3. Evaluation of antibacterial drug resistance (%)

**Примечание.** А — представителей сем. *Enterobacteriaceae*; Б — неферментирующих грамотрицательных бактерий (*Acinetobacter* spp. — изучали чувствительность к перечисленным антибиотикам, за исключением пиперациллин/тазобактама).

Note. A — *Enterobacteriaceae* spp., B — non-fermenting Gram-negative bacteria (*Acinetobacter* spp. — antibacterial drug sensitivity was examined except piperacillin/tazobactam).

**Таблица 1. Молекулярно-генетическая характеристика штаммов MRSA, изолированных от больных с гнойно-некротическими формами синдрома диабетической стопы**

Table 1. Molecular-genetic characteristics of strains of MRSA isolated from patients with purulent-necrotic forms of the diabetic foot syndrome

Определяемые характеристики Features examined	Результаты типирования штаммов MRSA Typing of MRSA strains		
	n = 7	n = 2	n = 6
<b>CC</b>	8	12	8
<b>ST</b>	239	12	8
<b>Spa</b>	3 (t037)	(t156)	1 (t008)
<b>SCCmec</b>	III.1,1.2 (III A)	<b>нт</b> /ut	IV.3,1.1 (IVc)
<b>agr</b>	1	1	1
<b>Coa</b>	IV	I. VII	III
<b>Токсины</b> Toxins			
<b>Лейкоцидины/Leukocidins</b>			
<i>lukPVSF</i>	–	–	–
<i>lukE-lukD</i>	+	+	+
<i>lukM</i>	–	–	–
<b>Гемолизины/Hemolysins</b>			
<i>hla, hlg, hlg-v</i>	+	+	+
<i>hlb (split)</i>	(+)	(+)	(+)
<b>Пептидные цитолизины/Peptide cytolysins</b>			
<i>psma, hld</i>	+	+	+
<b>Энтеротоксины/Enterotoxins</b>			
<i>sea</i>	–	–	+
<i>tst</i>	+	–	–
<i>sec, sep, seb, sed, see, she, set, sel</i>	–	–	–
<i>SapI5 (sek, seq)</i>	+	+	–
<i>sej, seu, egc*</i>	–	–	–
<b>Эксфолиатины/Exfoliatins</b>			
<i>eta, etb, etd</i>	–	–	–
<b>Адгезины</b> Adhesins			
<i>c12ag'</i>	+	+	+
<i>cna</i>	+	+	–
<i>bbp</i>	–	–	–
<b>Другие/Other</b>			
<i>ACME (arcA)</i>	–	–	–
<i>ssl</i>	+	+	+
<i>edin</i>	–	–	–
<b>Антибиотикорезистентность</b> Antibiotic resistance			
<b>Имипенем (МПК, мкг/мл)</b> Imipenem (MIC, µg/ml)	32–64	0,5	0,25
<b>Оксациллин (МПК, мкг/мл)</b> Oxacillin (MIC, µg/ml)	> 128	64	32
<b>Ампициллин (МПК, мкг/мл)</b> Ampicillin (MIC, µg/ml)	32–64	8	4
<b>Аминогликозиды</b> Aminoglycosides	100%	0%	50%
<b>Тетрациклины</b> Tetracyclines	100%	0%	0%
<b>Макролиды</b> Macrolides	100%	0%	50%
<b>Линкозамиды</b> Lincosamides	100%	0%	0%
<b>Фторхинолоны</b> Fluoroquinolones	100%	0%	100%



Определяемые характеристики Features examined	Результаты типирования штаммов MRSA Typing of MRSA strains		
	n = 7	n = 2	n = 6
<b>Рифампицин (МПК, мкг/мл)</b> Rifampicin (MIC, µg/ml)	100% > 128	0% 0,008	0% 0,008
<b>Хлорамфеникол</b> Chloramphenicol	100%	100%	100%
<b>Сульфаметоксазол/Триметоприм</b> Sulfamethoxazole/Trimethoprim	100%	0%	0%
<b>Гликопептиды</b> <b>Ванкомицин (МПК, мкг/мл)</b> Glycopeptides Vancomycin (MIC, µg/ml)	0% 0,5	0% 0,5	0% 0,5
<b>Оксазолидиноны</b> Oxazolidinones	0%	0%	0%
<b>Мупироцин</b> Mupirocin	0%	0%	0%
<b>Плазмиды (т.п.н.)</b> Plasmids (kb)	2,9 (7/7)	4,5 (2/2)	2,9 (6/6)
	–	–	2,4 (1/6)
	–	–	2,5 (2/6)
	–	–	25 (2/6)
	–	–	27 (1/6)

**Примечания.** \**egc* — кластер генов *seg, sei, sem, sen, seo*, кодирующих синтез энтеротоксинов. *c12ag'* — кластер генов *icaA, icaD, eno, fnbA, fnbB, ebpS, clfA, clfB, fib, sdrC, sdrD, sdrE*, кодирующих синтез адгезинов; нт — не типлируемый.

Notes. \**egc* — cluster of *seg, sei, sem, sen, seo* genes encoding enterotoxin synthesis. *c12ag'* — cluster of *icaA, icaD, eno, fnbA, fnbB, ebpS, clfA, clfB, fib, sdrC, sdrD, sdrE* encoding adhesin synthesis; ut — untyped.

диабетической стопы, может сопровождаться развитием тяжелых трофических нарушений [5]. При развитии гнойного процесса, сопровождающегося некрозом тканей, помимо консервативной терапии, требуется хирургическая обработка ран, предполагающая радикальное удаление всех некротизированных тканей. Однако излишнее иссечение здоровых тканей с целью полного удаления некроза приводит к дополнительной травматизации и является причиной дальнейшего развития инфекционно-гнойного процесса, а недостаточное удаление некротических тканей и фибрина, сложности проведения некрэктомии при глубоких поражениях, а также развитие гангрены определяют необходимость ампутации конечности [3]. При этом пациентов данной категории госпитализируют в разные стационары города. Так, нами были обнаружены больные, у которых выделялись штаммы полирезистентных микроорганизмов (в частности MRSA), и которые в течение изученного периода в разные сроки находились на лечении в различных стационарах г. Красноярск.

Например, больная Л., 59 лет, пенсионерка. 11.08.2010 г. была доставлена по экстренным показаниям в стационар КГБУЗ КМКБСМП им. Н.С. Карповича с диагнозом: «Рожистое воспаление правой голени и стопы, буллезно-геморрагическая форма. Соп.: Варикозное расширение вен нижних конечностей. ПТФС. Хроническая венозная недостаточность III ст. Сахарный диабет II типа, вторичная инсулинопотребная форма, субкомпенсация». Из анамнеза: отмечала ухудшение самочувствия в те-

чении недели — температура тела поднималась до 38°C, появились локальная гиперемия кожных покровов, отек, буллы. С перечисленными жалобами была госпитализирована и получала консервативную терапию, в том числе азитромицин, положительной динамики не наблюдалось. 21.09.2010 г. из патологического материала в этиологически значимом количестве были выделены *P. aeruginosa* (резистентная к амикацину и ципрофлоксацину) и MRSA. 22.09.2010 на фоне появления участков некроза на передней поверхности правой голени была выполнена некрэктомия. После оперативного вмешательства неоднократно корректировалась антибиотикотерапия: назначался имипенем/циластатин; затем ципрофлоксацин и метронидазол; затем рифампицин и ципрофлоксацин. На фоне терапии наблюдалась положительная динамика: выраженная краевая эпителизация ран, раны очистились, отделяемое стало серозным. Пациентка была выписана 04.10.2010 (54 койко-дня).

21.10.2010 г. та же больная Л. вновь экстренно госпитализируется уже в КГБУЗ Красноярская межрайонная клиническая больница № 7 с диагнозом: «Сахарный диабет II типа тяжелое течение, стадия субкомпенсации, гнойно-некротические трофические язвы правой голени. Рожистое воспаление правой голени, буллезная форма. Варикозная болезнь вен нижних конечностей. ХВН II ст.». 21.10.2010 г. и 27.10.2010 г. проводилась хирургическая обработка ран, некрэктомия. 21.10.2010 г. при посеве биоптата из раны в этиологически значимом количестве выделены MRSA. Проведена антибиотикотера-

пия, противовоспалительная, сахароснижающая, обезболивающая терапия. На фоне лечения состояние улучшилось, язвы на голени зарубцевались, в области голеностопного сустава уменьшились в размерах, умеренно гранулировали. 11.11.2010 г. больная Л. была выписана (20 койко-дней) в удовлетворительном состоянии на амбулаторное долечивание.

Выделенные от данной пациентки штаммы MRSA OC66 и OC159 были отнесены к одному и тому же генотипу ST239/spa3(t037)/SCCmecIII.1.1.2(IIIА)/coaIV/agrI и характеризовались: наличием лейкоцидина lukED, гемолизинов, токсина синдрома токсического шока TSST-1 (tst), энтеротоксинов SEK (sek), SEQ (seq), адгезинов (за исключением bbb) (табл. 1). Штаммы были устойчивы практически ко всем группам антимикробных препаратов — беталактамам (МПК оксациллин — 128 мкг/мл, имипенем — 16 мкг/мл), аминогликозидам, макролидам, линкозамидам, фторхинолонам, рифампицину (МПК > 128 мкг/мл), хлорамфениколу, сульфаметоксазол/триметоприму, и сохраняли чувствительность к ванкомицину, линезолиду, тейкопланину, мупиноцину, фосфомицину, фузидовой кислоте. Данные PFGE показали идентичность штаммов MRSA, изолированных от одной пациентки, во время обеих госпитализаций в разных стационарах.

Таким образом, установлено, что среди пациентов с гнойно-некротическими формами синдрома диабетической стопы, госпитализированных в стационары г. Красноярска распространены в основном генетические варианты MRSA, соответствующие клонам, выявленным ранее от пациентов с другими нозология-

ми на данной территории [19]. Установлено, что доминирующим клоном MRSA среди пациентов с гнойно-некротическими формами синдрома диабетической стопы, госпитализированных в правобережный и левобережный стационары крупного промышленного мегаполиса Западной Сибири являлся ST239/spa3(t037)/agrI/SCCmecIII.1.1.2(IIIА)/coaIV/tst+; характеризующийся высоким уровнем вирулентности и мультирезистентностью. Вторыми по значимости генетическими вариантами MRSA являлись ST8/spa1(t008)/agrI/SCCmecIV.3.1.1/CoaIII и ST12/spanew(t156)/agrI/SCCmecUT/coaVII; которые характеризовались устойчивостью к 1–2 группам антимикробных препаратов, помимо β-лактамов. Установлено, что среди от пациентов с гнойно-некротическими формами синдрома диабетической стопы, госпитализированных как в правобережный так и левобережный стационары г. Красноярска выделяются изоляты MRSA, преимущественно относящиеся к одним и тем же генетическим вариантам. Длительная госпитализация пациентов с данной патологией, а также их последующая неоднократная госпитализация в другие стационары г. Красноярска, способствует переносу госпитальных штаммов из одного стационара в другой. Данная ситуация определяет острую необходимость продолжения проведения мониторинга генетических вариантов MRSA и разработки системы противоэпидемиологических мероприятий по предотвращению распространения мультирезистентных вариантов MRSA среди больных с гнойно-некротическими формами синдрома диабетической стопы в стационаре.

## Список литературы/References

1. Бахарев И.В., Редькин Ю.А. Синдром диабетической стопы: диагностика, лечение, профилактика. Качество жизни // Медицина. 2003. № 1. С. 35–38. [Bakharev I.V., Redkin Y.A. Syndrome diabetic foot: diagnosis, treatment, prevention. Quality of life. *Meditsina = Medicine*, 2003, no. 1, pp. 35–38. (In Russ.)]
2. Гостев В.В., Калиногорская О.С., Попенко Л.Н., Черенькая Т.В., Науменко З.С., Ворошилова Т.М., Захарова Ю.А., Хохлова О.Е., Круглов А.Н., Ершова М.Г., Молчанова И.В., Сидоренко С.В. Антибиотикорезистентность метициллинрезистентных *Staphylococcus aureus*, циркулирующих в Российской Федерации // Антибиотики и химиотерапия. 2015. Т. 60, № 1–2. С. 3–10. [Gostev V.V., Kalinogorskaya O.S., Popenko L.N., Chernenkaya T.V., Naumenko Z.S., Voroshilova T.M., Zakharova Y.A., Khokhlova O.E., Kruglov A.N., Ershova M.G., Molchanova I.V., Sidorenko S.V. Antibiotic resistance of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* circulating in the Russian Federation. *Antibiotiki i khimioterapiya = Antibiotics and Chemotherapy*, 2015, vol. 60, no. 1–2, pp. 3–10. (In Russ.)]
3. Доброквашин С.В., Якупов Р.Р., Валеев А.З. Лечение больных с гнойно-некротическими осложнениями синдрома диабетической стопы // Акушерство. Гинекология. Эндокринология. 2011. Т. 54, № 6. С. 97–99. [Dobrokvashin S.V., Yakupov R.R., Valeev A.Z. Treatment of patients with purulent-necrotic complications of diabetic foot syndrome. *Akusherstvo. Ginekologiya. Endokrinologiya = Obstetrics. Gynecology. Endocrinology*, 2011, vol. 54, no. 6, pp. 97–99. (In Russ.)]
4. Митиш В.А., Пасхалова Ю.С., Ерошкин И.А., Галстян Г.Р., Блатун Л.А. Гнойно-некротические поражения при нейроишемической форме синдрома диабетической стопы // Хирургия. 2014. № 1. С. 48–53. [Mitish V.A., Paskhalova Yu.S., Eroshkin I.A., Galstyan G.R., Blatun L.A. Purulent-necrotic lesions in the neuroischemic form of the diabetic foot syndrome. *Hirurgiya = Surgery*, 2014, no. 1, pp. 48–53. (In Russ.)]
5. Попова Т.Е., Шнайдер Н.А., Петрова М.М., Говорина Ю.Б., Николаева Т.Я. Диагностика нарушений микроциркуляции у пациентов с преимущественно сенсорным вариантом хронической воспалительной демиелинизирующей полиневропатии: пилотное исследование // Сибирское медицинское обозрение. 2015. № 1. С. 32–37. [Popova T.E., Schneider N.A., Petrova M.M., Govorina Y.B., Nicolaeva T.Y. Diagnosis of microcirculatory disorders in patients with a predominantly sensory variant of chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy: a pilot study. *Sibirskoe meditsinskoe obozrenie = Siberian Medical Review*, 2015, no. 1, pp. 32–37. (In Russ.)]

6. Привольнев В.В., Решедько Г.К., Савкин В.А., Кречикова О.И. Структура возбудителей и их антибиотикорезистентность при инфекциях нижних конечностей у больных сахарным диабетом // Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. 2009. Т. 11, № 1. С. 86–89. [Privolnev V.V., Reshedko G.K., Savkin V.A., Krechikova O.I. Structure of pathogens and their antibiotic resistance in infections of lower extremities in patients with diabetes mellitus. *Klinicheskaya mikrobiologiya i antimikrobnaya khimioterapiya = Clinical Microbiology and Antimicrobial Chemotherapy*, 2009, vol. 11, no. 1, pp. 86–89. (In Russ.)]
7. Рундо А.И. Современные аспекты этиологии и патогенеза синдрома диабетической стопы // Новости хирургии. 2015. Т. 23, № 1. С. 97–104. [Rundo A.I. Modern aspects of the etiology and pathogenesis of diabetic foot syndrome. *Novosti khirurgii = News of Surgery*, 2015, vol. 23, no. 1, pp. 97–104. (In Russ.)]
8. Токмакова А.Ю. Современная концепция диагностики и лечения хронических ран у больных с синдромом диабетической стопы // Сахарный диабет. 2009. № 1. С. 14–17. [Tokmakova A.Y. The modern concept of diagnosis and treatment of chronic wounds in patients with diabetic foot syndrome. *Sakharnyy diabet = Diabetes mellitus*, 2009, no. 1, pp. 14–17. (In Russ.)]
9. Фенотипическое определение Enterobacter – продуцентов β-лактамаз расширенного спектра: обзор и руководство по проведению испытаний. Европейское общество клинической микробиологии и инфекционных болезней // Клиническая микробиология и инфекционные заболевания. 2008. Т. 14 (Прил. 1). С. 90–103. [Phenotypic determination of Enterobacter – producers of extended-spectrum β-lactamases: a review and a test guide. European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases. *Klinicheskaya mikrobiologiya i infektsionnye zabolovaniya = Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 2008, vol. 14 (attachment 1), pp. 90–103. (In Russ.)]
10. Bal A.M., Coombs G.W., Holden M.T., Lindsay J.A., Nimmo G.R., Tattevin P., Skov R.L. Genomic insights into the emergence and spread of international clones of healthcare-, community- and livestock-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: Blurring of the traditional definitions. *J. Glob. Antimicrob. Resist.*, 2016, vol. 95–101, pp. 8–34. doi: 10.1016/j.jgar.2016.04.004
11. Cavanagh P., Lipsky B.A., Bradbury A.W., Botek G. Treatment for diabetic foot ulcers. *Lancet*, 2005, vol. 366, pp. 1725–1735. doi: 10.1016/S0140-6736(05)67699-4
12. Drieux L., Brossier F., Sougakoff W., Jarlier V. Phenotypic detection of extended-spectrum β-lactamase production in Enterobacteriaceae: review and bench guide. *Clin. Microbiol. Infect.*, 2008, vol. 14 (suppl. 1), pp. 90–103. doi: 10.1111/j.1469-0691.2007.01846.x
13. Echaniz-Aviles G., Velazquez-Meza M.E., Vazquez-Larios Mdel R., Soto-Noguerón A., Hernández-Deñás A.M. Diabetic foot infection caused by community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (USA300). *J. Diabetes*, 2015, vol. 7 (6), pp. 891–892. doi: 10.1111/1753-0407.12324
14. Gostev V., Kruglov A., Kalinogorskaya O., Dmitrenko O., Khokhlova O., Yamamoto T., Lobzin Y., Ryabchenko I., Sidorenko S. Molecular epidemiology and antibiotic resistance of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* circulating in the Russian Federation. *Infect. Genet. Evol.*, 2017, vol. 53, pp. 189–194. doi: 10.1016/j.meegid.2017.06.006
15. Hiramatsu K., Ito T., Tsubakishita S., Sasaki T., Takeuchi F., Morimoto Y., Katayama Y., Matsuo M., Kuwahara-Arai K., Hishinuma T., Baba T. Genomic basis for methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*. *Infect. Chemother.*, 2013, vol. 45, pp. 117–136. doi: 10.3947/ic.2013.45.2.117
16. International working group on the classification of staphylococcal cassette chromosome elements (IWG-SCC). Classification of staphylococcal cassette chromosome mec (SCCmec): guidelines for reporting novel SCCmec elements. *Agents Chemother.*, 2009, vol. 53, pp. 4961–4967. doi: 10.1128/AAC.00579-09
17. Jeffcoate W.J., Harding K.G. Diabetic foot ulcers. *Lancet*, 2003, vol. 361, no. 9368, pp. 1545–1551. doi: 10.1016/S0140-6736(03)13169-8
18. Kado C.I., Liu S.T. Rapid procedure for detection and isolation of large and small plasmids. *J. Bacteriol.*, 1981, vol. 145, pp. 1365–1373.
19. Khokhlova O.E., Hung W.C., Wan T.W., Iwao Y., Takano T., Higuchi W., Yachenko S.V., Teplyakova O.V., Kamshilova V.V., Kotlovsky Y.V., Nishiyama A., Reva I.V., Sidorenko S.V., Peryanova O.V., Reva G.V., Teng L.J., Salmina A.B., Yamamoto T. Healthcare- and community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) and fatal pneumonia with pediatric deaths in Krasnoyarsk, Siberian Russia: unique MRSA's multiple virulence factors, genome, and stepwise evolution. *PLoS One*, 2015, vol. 1, pp. 1–30. doi: 10.1371/journal.pone.0128017
20. Kondo Y., Ito T., Ma X.X., Watanabe S., Kreiswirth B.N., Etienne J., Hiramatsu K. Combination of multiplex PCRs for staphylococcal cassette chromosome mec type assignment: rapid identification system for mec, ccr, and major differences in junkyard regions. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2007, vol. 51, pp. 264–274. doi: 10.1128/AAC.00165-06
21. Lindsay J.A. Genomic variation and evolution of *Staphylococcus aureus*. *Int. J. Med. Microbiol.*, 2010, vol. 300, pp. 98–103. doi: 10.1016/j.ijmm.2009.08.013
22. Morbach S., Müller E., Reike H., Risse A., Rümenapf G., Spraul M. Diabetic foot syndrome. *Exp. Clin. Endocrinol. Diabetes*, 2014, vol. 122, no. 7, pp. 416–424. doi: 10.1055/s-0034-1366455
23. Nelson A., Wright-Hughes A., Backhouse M.R., Lipsky B.A., Nixon J., Bhogal M.S., Reynolds C., Brown S. CODIFI (Concordance in Diabetic Foot Ulcer Infection): a cross-sectional study of wound swab versus tissue sampling in infected diabetic foot ulcers in England. *BMJ Open*, 2018, vol. 8 (1): e019437, pp. 1–12. doi: 10.1136/bmjopen-2017-019437
24. Post V., Wahl P., Uckay I., Ochsner P., Zimmerli W., Corvec S., Loiez C., Richards R.G., Moriarty T.F. Phenotypic and genotypic characterisation of *Staphylococcus aureus* causing musculoskeletal infections. *Int. J. Med. Microbiol.*, 2014, vol. 304 (5–6), pp. 565–576. doi: 10.1016/j.ijmm.2014.03.003
25. Prevost G., Jaulhac B., Piemont Y. DNA fingerprinting by pulsed-field gel electrophoresis is more effective than ribotyping in distinguishing among methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates. *J. Clin. Microbiol.*, 1992, vol. 30, pp. 967–973.
26. Reveles K.R., Duhon B.M., Moore R.J., Hand E.O., Howell C.K. Epidemiology of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* diabetic foot infections in a large academic hospital: implications for antimicrobial stewardship. *PLoS One*, 2016, vol. 24, no. 11 (8): e0161658. doi: 10.1371/journal.pone.0161658
27. Sorensen A.I., Toft N., Boklund A., Espinosa-Gongora C., Græsboell K., Larsen J., Halasa T. A mechanistic model for spread of livestock-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (LA-MRSA) within a pig herd. *PLoS One*, 2017, vol. 12, no. 11: e0188429, pp. 1–18. doi: 10.1371/journal.pone.0188429

28. Takano T., Hung W.C., Shibuya M., Higuchi W., Iwao Y., Nishiyama A., Reva I., Khokhlova O.E., Yabe S., Ozaki K., Takano M., Yamamoto T. A new local variant (ST764) of the globally disseminated ST5 lineage of hospital-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) carrying the virulence determinants of community-associated MRSA. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2013, vol. 57, pp. 1589–1595. doi: 10.1128/AAC.01147-12
29. Tenover F.C., Arbeit R., Archer G., Biddle J., Byrne S., Goering R., Hancock G., Hébert G.A., Hill B., Hollis R. Comparison of traditional and molecular methods of typing isolates of *Staphylococcus aureus*. *J. Clin. Microbiol.*, 1994, vol. 32, pp. 407–415.
30. Van der Zwaluw K., de Haan A., Pluister G.N., Bootsma H.J., de Neeling A.J., Schouls L.M. The carbapenem inactivation method (CIM), a simple and low-cost alternative for the Carba NP test to assess phenotypic carbapenemase activity in gram-negative rods. *PLoS One*, 2015, vol. 10, no. 3: e0123690, pp. 1–13. doi: 10.1371/journal.pone.0123690

**Авторы:**

**Хохлова О.Е.**, к.б.н., доцент микробиологии им. доц. Б.М. Зельмановича ФГБОУ ВО Красноярский государственный медицинский университет имени проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого МЗ РФ, г. Красноярск, Россия;

**Ивао Я.**, PhD, научный сотрудник лаборатории молекулярной бактериологии Международного медицинского образовательно-исследовательского центра (IMERC), Ниигата, Япония;

**Камшилова В.В.**, к.б.н., врач-бактериолог КГБУЗ Красноярская межрайонная клиническая больница скорой медицинской помощи им. Н.С. Карповича, г. Красноярск, Россия;

**Теплякова О.В.**, к.м.н., доцент кафедры общей хирургии им. проф. М.И. Гульмана ФГБОУ ВО Красноярский государственный медицинский университет имени проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого МЗ РФ, г. Красноярск, Россия; врач-хирург КГБУЗ Красноярская межрайонная клиническая больница № 7, г. Красноярск, Россия;

**Мотова А.И.**, врач-клинический фармаколог КГБУЗ Красноярская межрайонная клиническая больница скорой медицинской помощи им. Н.С. Карповича, г. Красноярск, Россия;

**Дробушевская А.И.**, к.м.н., врач-хирург КГБУЗ Красноярская межрайонная клиническая больница № 7, г. Красноярск, Россия;

**Перьянова О.В.**, к.б.н., зав. кафедрой микробиологии им. доц. Б.М. Зельмановича ФГБОУ ВО Красноярский государственный медицинский университет имени проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого МЗ РФ, г. Красноярск, Россия; руководитель Российско-Японского центра микробиологии, метагеномики и инфекционных заболеваний, г. Красноярск, Россия;

**Винник Ю.С.**, д.м.н., профессор, зав. кафедрой общей хирургии им. проф. М.И. Гульмана, председатель диссертационного совета ФГБОУ ВО Красноярский государственный медицинский университет имени проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого МЗ РФ, г. Красноярск, Россия;

**Поткина Н.К.**, научный сотрудник, ФГБОУ ВО Красноярский государственный медицинский университет имени проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого МЗ РФ, г. Красноярск, Россия; научный сотрудник Российско-Японского центра микробиологии, метагеномики и инфекционных заболеваний, г. Красноярск, Россия;

**Здзитовецкий Д.Э.**, д.м.н., доцент, зав. кафедрой и клиникой хирургических болезней им. проф. Ю.М. Лубенского ФГБОУ ВО Красноярский государственный медицинский университет имени проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого МЗ РФ, г. Красноярск, Россия; врач-хирург КГБУЗ Красноярская межрайонная клиническая больница № 7, г. Красноярск, Россия;

**Ямамото Т.**, PhD, профессор, куратор Российско-Японского центра микробиологии, метагеномики и инфекционных заболеваний, г. Красноярск, Россия; директор Международного медицинского образовательно-исследовательского центра (IMERC), Ниигата, Япония.

**Authors:**

**Khokhlova O.E.**, PhD (Biology), Associate Professor, Department of Microbiology named after B.I. Zelmanovich, Krasnoyarsk State Medical University named after professor V.F. Voyno-Yasenetsky, Krasnoyarsk, Russian Federation;

**Iwao Y.**, PhD, Researcher, Laboratory of Molecular Bacteriology, International Medical Education and Research Center, Niigata, Japan;

**Kamshilova V.V.**, PhD (Biology), Bacteriologist, Krasnoyarsk State Emergency Hospital named after N.S. Karpovich, Krasnoyarsk, Russian Federation;

**Tepliyakova O.V.**, PhD (Medicine), Associate Professor, Department of General Surgery named after M.I. Gulman, Krasnoyarsk State Medical University named after professor V.F. Voyno-Yasenetsky, Krasnoyarsk, Russian Federation; Surgeon, Krasnoyarsk State Municipal Clinical Hospital No. 7, Krasnoyarsk, Russian Federation;

**Motova A.I.**, Clinical Pharmacologist, Krasnoyarsk State Emergency Hospital named after N.S. Karpovich, Krasnoyarsk, Russian Federation;

**Drobusheskaya A.I.**, PhD (Medicine), Surgeon, Krasnoyarsk State Municipal Clinical Hospital No. 7, Krasnoyarsk, Russian Federation;

**Perianova O.V.**, PhD (Biology), Head of Department of Microbiology named after B.I. Zelmanovich, Krasnoyarsk State Medical University named after professor V.F. Voyno-Yasenetsky, Krasnoyarsk, Russian Federation; Director of Russian-Japan Center of Microbiology, Metagenomics and Infectious Diseases, Krasnoyarsk State Medical University, Krasnoyarsk, Russian Federation;

**Vinnik Y.S.**, PhD, MD (Medicine), Professor, Head of Department of General Surgery named after M.I. Gulman, Krasnoyarsk State Medical University named after professor V.F. Voyno-Yasenetsky, Krasnoyarsk, Russian Federation;

**Potkin N.K.**, Researcher, Krasnoyarsk State Medical University named after professor V.F. Voyno-Yasenetsky, Krasnoyarsk, Russian Federation; Researcher, Russian-Japan Center of Microbiology, Metagenomics and Infectious Diseases, Krasnoyarsk State Medical University, Krasnoyarsk, Russian Federation;

**Zdzitowiecki D.E.**, PhD, MD (Medicine), Associate Professor, Head of the Department of Surgical Pathology named after Yu.M. Lubenskiy, Krasnoyarsk State Medical University named after professor V.F. Voyno-Yasenetsky, Krasnoyarsk, Russian Federation; Surgeon, Krasnoyarsk State Municipal Clinical Hospital No. 7, Krasnoyarsk, Russian Federation;

**Yamamoto T.**, PhD, Professor, Curator of Russian-Japan Center of Microbiology, Metagenomics and Infectious Diseases, Krasnoyarsk State Medical University, Krasnoyarsk, Russian Federation; Director of International Medical Education and Research Center, Niigata, Japan.