

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ «ДЕТСКИЙ
НАУЧНО-КЛИНИЧЕСКИЙ ЦЕНТР ИНФЕКЦИОННЫХ БОЛЕЗНЕЙ ФЕДЕРАЛЬНОГО
МЕДИКО-БИОЛОГИЧЕСКОГО АГЕНТСТВА»

На правах рукописи

Гостев Владимир Валерьевич

**Популяционная структура *Staphylococcus aureus* и траектории эволюции
устойчивости к антимикробным препаратам**

1.5.11. Микробиология

Диссертация на соискание ученой степени

доктора биологических наук

Научный консультант:

чл.-корр. РАН, доктор медицинских наук, профессор

Сидоренко Сергей Владимирович

Санкт-Петербург – 2024

СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	7
ОСНОВНАЯ ЧАСТЬ.....	20
ГЛАВА 1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	20
1.1. Общая характеристика <i>S. aureus</i>	20
1.2. Клиническое значение <i>S. aureus</i>	22
1.3. Эпидемиология и популяционная структура MRSA	29
1.4. Носительство <i>S. aureus</i>	32
1.5. Устойчивость <i>S. aureus</i> к бета-лактамам	33
1.5.1. Фенотипы «исключения»: чувствительность MRSA к бета-лактамам (OS-MRSA) и устойчивость MSSA к оксациллину (BORSA, MODSA).....	36
1.5.2. Роль высоких внутриклеточных концентраций c-di-AMP в формировании устойчивости к антибиотикам, действующих на клеточную стенку	38
1.6. Устойчивость к основным анти-MRSA антибиотикам	39
1.7. Антибиотикотолерантность у <i>S. aureus</i>	43
ГЛАВА 2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	46
2.1. Фенотипические методы исследований	46
2.1.1. Коллекция бактериальных культур	46
2.1.2. Оценка чувствительности к антибиотикам.....	46
2.1.3. Популяционный анализ	49
2.1.4. Селекция устойчивости при PAP-анализе с оксациллином.....	50
2.1.5. Оценка кинетики отмирания бактерий под действием антибиотиков («time-killing») 51	
2.1.6. Оценка скорости роста.....	52
2.1.7. Оценка индуцированной аутолитической активности	52
2.2. Эксперименты по адаптивной эволюции устойчивости <i>in vitro</i>	53
2.2.1. Селекция устойчивости MRSA к цефтаролину, определение MPC.....	54
2.2.2. Селекция устойчивости MSSA к бета-лактамам.....	55
2.2.3. Селекция устойчивости к ванкомицину и даптомицину.....	56
2.2.4. Селекция под воздействием шоковых концентраций ванкомицина	57
2.2.5. Селекция под воздействием шоковых концентраций ципрофлоксацина, гентамицина 58	
2.3. Молекулярные методы.....	59

2.3.1.	Молекулярное типирование (SCC _{mec} , <i>spa</i> , MLST)	59
2.3.2.	Полногеномное секвенирование	59
2.3.3.	Выделение белка, трипсинолиз и белковое профилирование	60
2.3.4.	Оценка экспрессии генов, кодирующих пенициллинсвязывающие белки	61
2.4.	Генно-инженерные методы	62
2.4.1.	Направленное геномное редактирование гена <i>gdpP</i>	62
2.5.	Биоинформатические методы	65
2.5.1.	Сборка геномов и их аннотация	65
2.5.2.	Типирование <i>in silico</i>	66
2.5.3.	Добавление геномных данных из ранее проведенных исследований	66
2.5.4.	Филогенетический и пангеномный анализ	66
2.5.5.	Филогенетический анализ с оценкой времени дивергенции	68
2.5.6.	Аннотация и картирование генов резистентности <i>in silico</i>	68
2.5.7.	Аннотация мутаций и выявление аллельной глубины при анализе данных геномного секвенирования	68
2.5.8.	Доступность данных в публичных репозиториях	69
2.6.	Статистические методы и визуализация данных	70
	РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ	71
	ГЛАВА 3 СРАВНИТЕЛЬНАЯ ФЕНОТИПИЧЕСКАЯ ОЦЕНКА ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ К АНТИБИОТИКАМ У ИЗОЛЯТОВ HA-MRSA И CA-MRSA	71
3.1.	Описание коллекции изолятов MRSA	71
3.2.	Оценка чувствительности к бета-лактамам антибиотикам	73
3.3.	Оценка чувствительности к ванкомицину, даптомицину и липогликопептидным антибиотикам	76
3.4.	Анализ ассоциированной устойчивости, профили резистентности	79
3.5.	Заключение по главе: ассоциированная устойчивость MRSA в России	82
	ГЛАВА 4 ОСОБЕННОСТИ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ К АНТИБИОТИКАМ У РАЗНЫХ ГЕНЕТИЧЕСКИХ ЛИНИЙ MRSA	85
4.1.	Молекулярное типирование MRSA	85
4.2.	Сравнение чувствительности к антибиотикам среди доминирующих генетических линий	86
4.3.	Молекулярная характеристика изолятов MRSA со сниженной чувствительностью к цефтаролину	89
4.3.1.	Поиск мутаций в <i>tesA</i> (PBP2a), ассоциированных со снижением чувствительности к цефтаролину	89
4.3.2.	Оценка MPC и MSW цефтаролина	90

4.4.	Фенотипические, генотипические особенности OS-MRSA и механизмы, ассоциированные с чувствительностью к бета-лактамам	92
4.4.1.	Сравнение фенотипических методов выявления OS-MRSA	96
4.4.2.	Оценка гетерорезистентности и выделение субпопуляций OS-MRSA	100
4.4.3.	Заключение по разделу: особенности Российских изолятов OS-MRSA и связанных с ними механизмов чувствительности к бета-лактамам.....	107
4.5.	Анализ MRSA со сниженной чувствительностью к ванкомицину	110
ГЛАВА 5 АНАЛИЗ ГЛОБАЛЬНОЙ И ЛОКАЛЬНОЙ ПОПУЛЯЦИОННОЙ СТРУКТУРЫ ДОМИНИРУЮЩИХ ГЕНЕТИЧЕСКИХ ЛИНИЙ, ЦИРКУЛИРУЮЩИХ В РОССИИ.....		113
5.1.	Анализ клональной структуры HA-MRSA	113
5.2.	Популяционная структура доминирующего клона HA-MRSA ST8	117
5.2.1.	Реконструкция эволюции и времени появления генетической линии MRSA-ST8 ..	121
5.2.2.	Заключение по разделу: глобальная и локальная эволюция генетической линии ST8	125
5.3.	Популяционная структура доминирующего клона HA-MRSA ST239	129
5.3.1.	Заключение по разделу: глобальная и локальная эволюция генетической линии ST239	132
5.4.	Анализ клональной структуры CA-MRSA, выделенных у здоровых носителей.....	135
5.5.	Сравнительная геномная характеристика «Газа-клона» ST22.....	138
5.5.1.	Заключение по разделу: эпидемиология и эволюция генетической линии ST22	144
5.6.	Сравнительная геномная характеристика MRSA-ST59.....	146
5.6.1.	Заключение по разделу: глобальная и локальная эволюция генетической линии ST59	151
ГЛАВА 6 СЕЛЕКЦИЯ УСТОЙЧИВОСТИ <i>IN VITRO</i>		153
6.1.	Стратегия получения резистентных мутантов при многоступенчатой селекции.....	153
6.1.1.	Селекция устойчивости <i>in vitro</i> MRSA к цефтаролину	153
6.1.1.1.	Фенотипические изменения при формировании устойчивости MRSA к цефтаролину	153
6.1.1.2.	Мутационные события в процессе селекции на цефтаролине.....	155
6.1.1.3.	Анализ белковых профилей у цефтаролин-устойчивых штаммов после селекции устойчивости.....	161
6.1.1.4.	Заключение по разделу: <i>tes</i> -независимые механизмы устойчивости к цефтаролину	162
6.1.2.	Селекция устойчивости MSSA к бета-лактамам антибиотикам и оценка фенотипических изменений.....	165
6.1.2.1.	Динамика изменения чувствительности к бета-лактамам антибиотикам в процессе селекции устойчивости <i>in vitro</i>	167

6.1.2.2. Механизмы устойчивости MSSA к оксациллину.....	170
6.1.2.3. Механизмы устойчивости MSSA к цефтаролину	172
6.1.2.4. Механизмы устойчивости MSSA к меропенему	173
6.1.2.5. Получение направленных делеций в гене <i>gdpP</i> на модельном штамме <i>S. aureus</i> RN4220, анализ фенотипов.....	174
6.1.2.6. Влияние делеций в гене <i>gdpP</i> на уровень экспрессии пенициллинсвязывающих белков	177
6.1.2.7. Заключение по разделу: <i>tes</i> -независимые пути формирования устойчивости к бета-лактамам и фенотипическая гетерорезистентность	180
6.1.3. Селекция устойчивости к даптомицину и ванкомицину.....	183
6.1.3.1. Фенотипические изменения при селекции на ванкомицине.....	183
6.1.3.2. Фенотипические изменения при селекции на даптомицине.....	185
6.1.3.3. Оценка динамики фенотипической гетерорезистентности.....	189
6.1.3.4. Оценка генотипических изменений при селекции на ванкомицине и даптомицине, подходы к оценке генотипической гетерорезистентности.....	192
6.1.3.5. Селекция контрольных штаммов.....	197
6.1.4. Оценка мутаций после селекции на ванкомицине и даптомицине	198
6.1.4.1. Генотипические изменения при селекции на ванкомицине.....	198
6.1.4.2. Генотипические изменения при селекции на даптомицине.....	200
6.1.4.3. Анализ формирования перекрестной устойчивости ванкомицин - и даптомицин-устойчивых штаммов к липогликопептидам	202
6.1.4.4. Анализ мутационных событий, приводящих к переходу гетеромутаций в гомомутации.....	205
6.1.4.4.1. Заключение по разделу: подходы к оценке гетеромутаций	207
6.1.4.5. Заключение по разделу: формирование независимых и общих путей устойчивости к ванкомицину и даптомицину	208
6.1.5. Изменение индуцированной аутолитической активности у мутантов, проявляющих устойчивость к ванкомицину, даптомицину и цефтаролину	212
6.2. Селекция под воздействием шоковых концентраций антимикробных препаратов .	216
6.2.1. Селекция под воздействием шоковых концентраций ванкомицина: формирование гетерорезистентности.....	216
6.2.1.1. Генотипические изменения	219
6.2.1.2. Заключение по разделу: влияние высоких концентраций ванкомицина на формирование гетерорезистентности.....	222
6.2.2. Селекция под воздействием шоковых концентраций ципрофлоксацина: формирование толерантности	224

6.2.2.1. Оценка кросс-толерантности после воздействия шоковыми концентрациями ципрофлоксацина	226
6.2.2.2. Заключение по разделу: оценка роли мутаций в пептидил-ТРНК-гидролазе в формировании универсальной толерантности к действию бактерицидных антибиотиков....	230
6.2.3. Влияние шоковых концентраций гентамицина на формирование устойчивости и мелкоколониальных фенотипов	233
6.2.3.1. Заключение по разделу: влияние воздействия шоковых концентраций гентамицина на формирование устойчивости	237
ГЛАВА 7 ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ РАБОТЫ: ТРАЕКТОРИИ ЭВОЛЮЦИИ РЕЗИСТЕНТНОСТИ К АНТИБИОТИКАМ У <i>S. AUREUS</i>	241
7.1. Траектории эволюции клонов, ассоциированных с устойчивостью к антибиотикам 241	
7.2. Траектории эволюции мутационных резистомов	245
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	254
ВЫВОДЫ	257
ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ	259
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	260
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	262
ПРИЛОЖЕНИЕ 1. Патенты на изобретения	307
ПРИЛОЖЕНИЕ 2. Свидетельства о депонировании штаммов	308
ПРИЛОЖЕНИЕ 3. Список основных работ, опубликованных по теме диссертации	311
ПРИЛОЖЕНИЕ 4. География сбора изолятов MRSA	313
ПРИЛОЖЕНИЕ 5. Оценка изменения чувствительности (МПК, мкг/мл) к антибиотикам различных классов у штаммов после селекции на ванкомицине, даптомицине и при пассажах на среде без антибиотиков	314
ПРИЛОЖЕНИЕ 6. Мутации и гетеромутации, выявленные у штаммов <i>S. aureus</i> при селекции на оксациллине, меропенеме, цефтаролине.....	316
ПРИЛОЖЕНИЕ 7. Мутации и гетеромутации, выявленные у штаммов <i>S. aureus</i> при селекции на ванкомицине и даптомицине.....	322

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность исследования.

Staphylococcus aureus способен вызывать инфекционный процесс практически в любой ткани и органе человеческого организма, это определяет широкий спектр возможных форм заболеваний – от инфекций кожи и мягких тканей до критических состояний при сепсисе [1]. В настоящее время смертность от инфекций, вызванных *S. aureus*, остается достаточно высокой, даже несмотря на внедрение в последние десятилетия новых эффективных антибиотиков. Так, по результатам исследования группы GBD (Global Burden of Diseases), было установлено, что *S. aureus* занимает первое место по абсолютному числу смертей среди всех бактериальных инфекций и по уровню летальности в 135-ти странах мира [2]. *S. aureus* оказался первым микроорганизмом, для которого приобретенная антимикробная резистентность оказалась серьезной проблемой. Исторически первым глобально распространившимся в конце 50-х годов механизмом устойчивости была продукция бета-лактамаз, разрушающих природные пенициллины. В 1961 были описаны метициллин-резистентные стафилококки (Methicillin-resistant *S. aureus* - MRSA), однако, на основании данных геномного секвенирования и эволюционного моделирования, расчетное время появления MRSA находится в интервале 1938–1952 гг. [3]. Основное свойство MRSA – это устойчивость ко всем бета-лактамам антибиотикам, за исключением цефалоспоринов с анти-MRSA активностью (цефтаролина и цефтобипрола), обусловленная наличием дополнительного пенициллинсвязывающего белка 2a (PBP2a), кодируемого геном *mecA*.

Ген *mecA* локализован на стафилококковой хромосомной *mec*-кассете (Staphylococcal cassette chromosome *mec*, SCC*mec*), вероятное происхождение которой связывают с горизонтальным переносом от коагулазоотрицательных стафилококков группы *Staphylococcus sciuri*, *Staphylococcus vitulinus* и *Staphylococcus fleuretti* [4]. Однако, функционирование SCC*mec* и экспрессия устойчивости к бета-лактамам зависит от хромосомных факторов [5, 6]. Оксациллин-чувствительные MRSA (oxacillin-susceptible MRSA, OS-MRSA) являются примером, когда наличие *mecA* не отражается в проявлении фенотипической устойчивости к оксациллину [7, 8]. Такая «молчащая» устойчивость является неблагоприятным фактором, влияющим на корректную фенотипическую оценку чувствительности к антибиотикам, и, следовательно, на назначение адекватной антибактериальной терапии [9].

Кроме хорошо известных механизмов резистентности *S. aureus* реализует и другие стратегии ухода от действия антимикробных препаратов – это гетерорезистентность и толерантность. Резистентность у *S. aureus* к различным антибиотикам обуславливается как генами, приобретаемыми на мобильных генетических элементах, так и мутациями в собственных генах. Однако, описываются и принципиально новые механизмы, в частности, влияние высоких внутриклеточных концентраций циклического ди-аденозинмонофосфата (с-di-AMP) на устойчивость к антимикробным агентам, действующим на клеточную стенку [10]. На повышение концентрации с-di-AMP влияет активность специфической фосфодиэстеразы GdpP (GGDEF domain protein containing phosphodiesterase), которая при нормальных условиях гидролизует молекулы с-di-AMP. Молекулярный механизм этого процесса остается неизученным.

В настоящее время выделяют моноклональную гетерорезистентность, при которой, клетки одной генетической линии характеризуются разной чувствительностью к антибиотикам. У *S. aureus* гетерорезистентность описана к разным антибиотикам – бета-лактамам, гликопептидам, даптомицину и гентамицину [11]. Опасность распространения таких фенотипов заключается в неправильной оценке чувствительности к антибиотикам, которая может привести к назначению неадекватной антибиотикотерапии [12]. Явление формирования множества субклонов в пределах чистой культуры клона, культивируемого в среде на протяжении длительного периода, было продемонстрировано в работах группы Lenski и соавт. [13, 14] при изучении длительной эволюции кишечной палочки (long-term evolution experiment (LTEE)). При растущем интересе к проблеме гетерорезистентности остаются неизученными многие аспекты: триггерные факторы, приводящие к ее появлению, связь с генотипом и генетическими линиями, межклональные взаимодействия и проблема детекции фенотипов.

Третья стратегия уклонения от действия антимикробных препаратов, реализуемая *S. aureus* – это формирование толерантности, которая описана в отношении многих бактерицидных антибиотиков, в частности, бета-лактамов, даптомицина и цефтаролина. В основе толерантности лежит универсальное для микроорганизмов явление – увеличение периода времени, необходимого для эффективного киллинга бактериальной популяции. Данный механизм остается до конца не изученным, однако многие экспериментальные исследования показывают, что замедление роста и работы рибосом и, как следствие, снижение метаболической активности бактериальной клетки являются главными драйверами антибиотикотолерантности [15]. Прогнозирование и моделирование траекторий эволюции устойчивости является важным фундаментальным научно-практическим направлением, как для локальной, так и международной систем здравоохранения [16].

После первого описания в 1961 г в течение длительного времени значение MRSA определялось их ролью как основных возбудителей внутрибольничных инфекций (Hospital-acquired MRSA, HA-MRSA) [17]. Внебольничные MRSA (Community-acquired MRSA, CA-MRSA), которые характеризовались необычайно высокой степенью вирулентности, были описаны в 1990-х годах. Первоначально эпидемия CA-MRSA инфекций захватила территорию США, Центральной и Южной Америки [18, 19], а в дальнейшем распространилась на другие регионы.

Еще один эпидемиологический кластер – это MRSA, вызывающие инфекции у животных (Livestock-associated MRSA, LA-MRSA) [20]. Инфекционные заболевания у сельскохозяйственных животных имеют стратегическое продовольственное значение [21, 22]. Появление и распространение LA-MRSA связывают с популяцией ежей (*Erinaceus europaeus*) европейского ареала, которые являются резервуаром MRSA [23]. Кожу ежей, наряду с *S. aureus*, колонизирует сапрофитный дерматофит *Trichophyton erinacei*, продуцирующий бета-лактамы. Возможно, формирование генотипа MRSA связано с необходимостью для *S. aureus* адаптироваться к селективному давлению этих антибиотиков, а использование антибиотиков в сельском хозяйстве опосредовало смену ниш обитания с появлением нового эпидемиологического кластера *S. aureus* – LA-MRSA.

Популяционная структура MRSA клональна, и основной механизм распространения – также клональный [24]. Однако, существует географическая и эпидемиологическая детерминированность, в частности, среди HA-MRSA наиболее распространены генетические линии (sequence type, ST) ST8, ST5, ST22, ST239, и ST228. Среди CA-MRSA доминируют ST8 (USA300), ST80, ST59 и ST30. Наиболее успешные клоны среди LA-MRSA – ST398 и ST97. В последнее десятилетие были проведены фундаментальные исследования, позволившие проследить эволюционную историю распространения наиболее успешных клонов *S. aureus*. Так, было установлено, что ST8-USA300, главный эпидемический клон на территории всей Америки, произошел от Европейских вариантов *S. aureus* в начале XX века [25]. Один из самых успешных клонов HA-MRSA ST239, появившийся в 1930 – 1950 гг. и распространившийся на всех континентах в 1980-х гг., является гибридным вариантом, возникшим в результате приобретения ST8 фрагмента генома ST30 [26]. Установлено Африканское происхождение доминирующего на территории Европы клона CA-MRSA ST80 [27]. В настоящее время выявлен отдельный подкластер эпидемического клона ST22 (EMRSA-15) – «Газа клон», впервые описанный на территории Палестины, характеризующийся быстрой скоростью распространения и эволюции [28-30]. Параллельный анализ локальной и глобальной геномной эволюции позволяет в значительной степени реконструировать историю появления успешных

эпидемических клонов, а также выявить новые варианты. Прогнозирование клональных сдвигов и их траектории эволюции можно использовать в долгосрочной перспективе для оценки различных биологических рисков, связанных с появлением и распространением новых потенциально опасных клонов.

Степень разработанности темы исследования.

В мире существуют несколько авторитетных школ, которые занимаются многими аспектами микробиологии *S. aureus*. В частности, ведущим специалистом в области изучения проблем устойчивости к гликопептидам является К. Hiramatsu и его коллеги из Медицинского Университета Юнтендо (Токио, Япония). Работы А. Tomasz и Н. de Lencastre из Рокфеллерского Университета (Нью-Йорк, США) связаны с исследованиями механизмов резистентности, толерантности к бета-лактамам и изучением динамики популяционной структуры. Группа профессора В. Howden из Университета Мельбурна (Австралия) занимается проблемами устойчивости к гликопептидам, геномной эволюцией MRSA. Несмотря на наличие больших международных коллективов, многие вопросы остаются неизученными – механизмы формирования устойчивости к гликопептидам, липопептидам, происхождение MRSA и успешных генетических линий, а также факторы, определяющие успешность распространения MRSA. В последние несколько лет интенсивно изучается роль вторичных внутриклеточных мессенджеров c-di-AMP в формировании устойчивости к бета-лактамам.

В Российской Федерации существует несколько научных школ, занимающихся проблемами эпидемиологии и формирования устойчивости *S. aureus* к различным антимикробным препаратам. Это коллективы из НИИ Антимикробной химиотерапии, Смоленск (работы Р.С. Козлова, А.В. Дехнича и коллег); НИЦ эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф. Гамалеи, Москва (работы О.А. Дмитренко и коллег), кафедра микробиологии Красноярского медицинского Университета им. Войно – Ясенецкого (работы О.Е. Хохловой и коллег), ФБУН ГНЦ прикладной микробиологии и биотехнологии, Москва, Оболенск (работы И.В. Абаева и коллег). Однако, исследования вышеперечисленных научных коллективов в основном затрагивают вопросы эпидемиологии, изучения популяционной структуры и резистентности нозокомиальных стафилококков. В частности, ранее было показано (Дмитренко О.А. и др., 2008), что на территории РФ длительно циркулируют два нозокомиальных клона – ST8 и ST239, однако детальная сравнительная геномная характеристика, происхождение и эволюция этих клонов остаются неизученными. Помимо этого, практически не изучена проблема популяционной структуры внебольничных MRSA на территории РФ, опубликованы только единичные исследования [31, 32]. Не изучены проблемы гетерорезистентности и

снижения чувствительности к гликопептидам, эволюции устойчивости к антибиотикам у *S. aureus*. Экспериментальные работы по эволюционной динамике и изучению молекулярных механизмов устойчивости к антимикробным препаратам в Российской Федерации представлены недостаточно полно.

Цель и задачи исследования.

Цель: Охарактеризовать популяционную структуру и траектории эволюции устойчивости к антимикробным препаратам у *S. aureus*.

Задачи:

1. Охарактеризовать клональную структуру внутрибольничных (HA-MRSA) и внебольничных MRSA (CA-MRSA), циркулирующих в России, провести сравнительную оценку их чувствительности к традиционным и новым антимикробным препаратам, применяемым для лечения стафилококковых инфекций.
2. Выявить генотипические особенности генетических линий MRSA, доминирующих на территории Российской Федерации, и их эволюционные связи с глобальной популяцией стафилококков.
3. Определить генетические механизмы антимикробной резистентности среди доминирующих на территории Российской Федерации клонов HA-MRSA и CA-MRSA.
4. Охарактеризовать фенотипические изменения и траектории эволюции устойчивости *S. aureus* к антибиотикам при ступенчатых пассажах на возрастающих концентрациях ванкомицина, даптомицина и бета-лактамов.
5. Охарактеризовать фенотипические изменения и траектории эволюции устойчивости *S. aureus* к антибиотикам при воздействии шоковых концентраций ванкомицина, ципрофлоксацина и гентамицина.
6. Дать оценку роли феноменов гетерорезистентности и толерантности в формировании устойчивости *S. aureus* к антимикробным препаратам.

Научная новизна.

Предложены эволюционные модели, объясняющие появление клонов ST8 и ST239 на территории Российской Федерации и предполагающие формирование MRSA задолго до внедрения метициллина в клиническую практику (1930 – 1950 гг.). Установлено, что клоны ST8, длительно циркулирующие на всей территории России, имеют общее происхождение с европейскими клонами, но в настоящее время эволюционируют как отдельные генетические линии. Клоны ST239 представлены разными кластерами, что предполагает их многократный импорт.

Представлена популяционная структура циркулирующих CA-MRSA, выявлены доминирующие клоны – ST22 и ST59. Анализ доступной глобальной коллекции геномов, а также полученных в настоящем исследовании *S. aureus* генотипа ST22, позволил выделить отдельный кластер – «Газа клон». Проведенный филогенетический анализ послужил отправной точкой для молекулярно-эпидемиологического анализа клонов ST22, циркулирующих в других странах. Среди CA-MRSA выявлен ранее не описываемый в Российской Федерации клон ST59, который относится к Восточно-Азиатскому кластеру.

Впервые на территории РФ описаны фенотипы OS-MRSA, характеризующиеся мутациями в промоторе гена *tesA*, низкой его экспрессией, а также фенотипической гетерорезистентностью к оксациллину. Установлено, что OS-MRSA способны быстро трансформироваться в MRSA за счет хромосомных мутаций, влияющих на формирование устойчивости к бета-лактамам антибиотикам, независимо от *tesA*. Основная опасность OS-MRSA – это сложность корректной лабораторной детекции данного фенотипа, которая может привести к назначению неадекватной антибактериальной терапии.

В ходе изучения эволюции резистентности *in vitro* были получены фундаментальные результаты. Существующее раннее представление о формировании устойчивости, как появлении одной конкретной мутации, требует детализации. В частности, установлено, что к одному фенотипическому проявлению устойчивости могут приводить мутационные события, затрагивающие различные метаболические пути. Полученные данные свидетельствуют о том, что формирование устойчивости у *S. aureus* проходит по различным траекториям через этап формирования в популяции минорных клонов, которые либо элиминируют, либо начинают доминировать. Производные штаммы, полученные и детально охарактеризованные в ходе выполнения экспериментов селекции устойчивости *in vitro*, запатентованы (Приложение 1). Изобретения относятся к медицинской микробиологии и могут быть использованы для разработки диагностических платформ.

Теоретическая значимость.

За прошедшие несколько лет внимание научного сообщества к таким проблемам, как роль вторичных мессенджеров c-di-AMP и феномен моноклональной гетерорезистентности неуклонно возрастает [33, 34]. Полученные в настоящей работе данные подтверждают роль c-di-AMP в формировании устойчивости к бета-лактамам. Отмечается растущая роль *tes*-независимых путей формирования устойчивости к бета-лактамам у *S. aureus* за счет тенденции к преобладанию MSSA над MRSA, особенно при бактериемиях [35]. Полученные результаты подтверждают, что формирование устойчивости происходит путем разных параллельных

механизмов, что согласуется с последними экспериментальными данными по эволюции резистентности [36]. Было обнаружено, что при формировании устойчивости к бета-лактамам затрагивается процесс изменения метаболизма *c-di-AMP* за счет мутаций в *gdpP*. У мутантов, полученных при селекции на разных бета-лактамах, детектируются мутации в пенициллинсвязывающих белках, системах регуляции, биосинтеза клеточной стенки, генах генерального метаболизма. Селекция мутаций может происходить через формирование множества минорных клонов с различными полиморфизмами, последующей экспансией единичных клонов, их доминированием и закреплением во всей популяции, что было продемонстрировано при анализе данных геномного секвенирования с обнаружением минорных (редких) генетических событий, а также фенотипически, с использованием популяционного анализа. В диссертационной работе было показано, что приобретение устойчивости сопровождалось снижением скорости роста бактериальных культур, наиболее значимые изменения были выявлены при формировании устойчивости к даптомицину. Это позволяет прогнозировать длительный процесс эволюции устойчивости к препаратам, действующим на цитоплазматическую мембрану, что может являться вектором для будущих разработок антибактериальных препаратов. В ходе исследования было установлено, что формирование устойчивости к бета-лактамам и гликопептидам происходит с накоплением множества мутаций, а также через формирование гетерорезистентных популяций. Выявлено, что устойчивость к ванкомицину и даптомицину сопровождается множественным накоплением мутаций в различных регуляторных генах, участвующих в регуляции биосинтеза клеточной стенки.

Кратковременное воздействие высокими концентрациями ванкомицина способствует формированию гетерорезистентности. Воздействие ципрофлоксацином опосредует появление перекрестной толерантности к бактерицидным антибиотикам.

Практическая значимость.

Полученные научные результаты могут быть использованы в практической медицине, в частности, в диагностическом процессе, фармакологии (корректировка существующих схем антибактериальной терапии), а также при разработке лабораторных диагностических платформ. Предложенные модели эволюции доминирующих генетических линий могут быть использованы в эпидемиологическом мониторинге за эволюцией MRSA на территории РФ. Характеристика циркулирующих «клонов высокого риска» является важным эпидемиологическим звеном в системе здравоохранения для сохранения национальной безопасности Российской Федерации. Особую значимость имеют выявленные MRSA изоляты,

проявляющие ложную чувствительность к бета-лактамам, циркулирующие на территории РФ. Такие фенотипы представляют опасность вследствие возможного определения ошибочной чувствительности в лабораториях системы здравоохранения РФ. В работе приведен сравнительный анализ эффективности разных методов выявления OS-MRSA фенотипов.

Данные по эволюции устойчивости *in vitro* могут быть использованы при разработке и поиске новых антибактериальных препаратов. Полученные результаты подчеркивают риски появления ассоциированной и перекрестной устойчивости на фоне воздействия бета-лактамами и гликопептидными антибиотиками, что важно учитывать при использовании этих препаратов в клинической практике для лечения стафилококковых инфекций. В ходе экспериментов по селекции устойчивости *in vitro* к бета-лактамам у MSSA было выявлено, что устойчивые мутанты сохраняли чувствительность к маркерному антибиотику – цефокситину, по чувствительности к которому судят об общей чувствительности стафилококков к бета-лактамам. Это данные говорят о неэффективности использования цефокситина как маркерного антибиотика для детекции *tes*-независимых механизмов устойчивости. Было также показано, что устойчивые к ванкомицину и даптомицину производные штаммы *S. aureus* характеризуются перекрестной устойчивостью к липогликопептидам: телаванцину, далбаванцину и оритаванцину. Эти результаты свидетельствуют о неэффективности использования липогликопептидов в отношении изолятов со сниженной чувствительностью к ванкомицину и/или даптомицину.

Производные устойчивые штаммы могут быть использованы в качестве тест-культур для оценки чувствительности к гликопептидным, липопептидным и бета-лактамам антибиотикам или как референс-штаммы для постановки РАР-анализа, «time-killing»-анализа; для поиска новых мишеней в клетке с целью разработки новых потенциальных антибактериальных препаратов; для тестирования новых потенциальных антимикробных соединений. Депонированные штаммы, характеризующиеся перекрестной толерантностью, могут быть использованы в опытах по моделированию фармакодинамических параметров при использовании различных антибиотиков; для тестирования новых потенциальных антимикробных соединений с оценкой их эффективности на антибиотикотолерантные стафилококки; как референс-штаммы для изучения феномена антибиотикотолерантности. Штаммы депонированы в Государственную коллекцию патогенных микроорганизмов и клеточных культур (ГКПМ-Оболensk) и доступны для практического и научного использования (Приложение 2). Полученные данные по исследованию гетерорезистентности, антибиотикотолерантности, общих путях формирования устойчивости *S. aureus* к бета-

лактамам, гликопептидам, даптомицину могут быть использованы для разработки и оптимизации существующих схем антибактериальной терапии.

Результаты диссертационного исследования используются в медицинских учреждениях Санкт-Петербурга: ФГБУ ДНКЦИБ ФМБА России (акт внедрения от 19.01.2024), ГБУ Спб НИИ СП им. И.И. Джанелидзе (акт внедрения от 18.01.2024) и Москвы: ГБУЗ «ГКБ им. В.В. Вересаева ДЗМ» (акт внедрения от 18.01.2024), ГБУЗ «ГКБ им. С.С. Юдина ДЗМ» (акт внедрения от 22.01.2024), уровень внедрения – учрежденческий. Материалы диссертационного исследования используются в лекционном материале и на практических занятиях по медицинской микробиологии для студентов, врачей – бактериологов, ординаторов различных специальностей, специалистов среднего медицинского образования в медицинских ВУЗах – ФГБОУ ВО СЗГМУ им. И.И. Мечникова (акт внедрения от 05.02.2024) и ФГБОУ ВО КрасГМУ им. проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого Минздрава России (акт внедрения от 02.02.2024), уровень внедрения – учрежденческий.

Методология и методы исследования.

Объектом исследования являлся микроорганизм *S. aureus*, а изучаемые явления – закономерности, влияющие на приобретение и распространение устойчивости к антибиотикам у данного микроорганизма. Для достижения поставленных цели и задач анализировалась как принадлежность *S. aureus* к определенной генетической линии, так и пути формирования устойчивости при селекции *in vitro* посредством индуцированного изменения генотипа и фенотипа. Диссертационное исследование сочетает в себе два методологических подхода. Первый – это применение описательных методов, второй – использование эксперимента по моделированию формирования резистентности. Для описания коллекции бактериальных культур *S. aureus* были использованы фенотипические и генотипические методы исследований. Геномы представителей изолятов доминирующих генетических линий были секвенированы с проведением комплекса биоинформатических подходов, включающих сравнение с глобально-распространенными клонами, пангеномный и филогенетический анализ, оценку времени дивергенции а также Байесовскую кластеризацию. В экспериментах по адаптивной эволюции проводилось изучение приобретения устойчивости с оценкой мутационного резистома. Для этого проводилось сравнение генотипа и фенотипа до селекции и в динамике на разных этапах селекции с использованием комплекса различных подходов: фенотипических, геномного секвенирования и биоинформатики.

Положения, выносимые на защиту.

1. Для внутрибольничных и внебольничных изолятов MRSA характерна различная популяционная структура с преобладанием определенных генетических линий. Среди внутрибольничных генетических линий доминирует клон ST8, представленный тремя кластерами, произошедшими от европейской линии, расчетное время появления которых относится к 1930 – 1950 гг. Среди внебольничных изолятов MRSA доминирует субкластер «Газа клон» ST22, вероятное происхождение которого – Палестина. Данные генетические линии характеризуются разным уровнем ассоциированной устойчивости к антибиотикам различных групп. Выявлена ложная чувствительность к оксациллину (OS-MRSA) среди внебольничных представителей MRSA.

2. В экспериментальных условиях траектории эволюции устойчивости MRSA и MSSA к антимикробным препаратам, применяемым для лечения соответствующих инфекций, определяются генетическим окружением, особенностями воздействия антибиотиков на микроорганизм (серийные пассажи в присутствии возрастающих концентраций антибиотиков или кратковременное воздействие шокowymi концентрациями).

3. Процесс приобретения устойчивости связан со значительной «биологической ценой сопротивления», а степень ее выраженности зависит от действующего антибиотика и механизма устойчивости. По мере увеличения количества приобретаемых мутаций увеличивается и «биологическая цена сопротивления». Формирование устойчивости к антибиотикам приводит к появлению перекрестной и ассоциированной устойчивости. Воздействие шокowymi концентрациями ципрофлоксацина приводит к появлению толерантности.

4. Изменения в метаболизме c-di-AMP (посредством мутаций в *gdpP*) и мутации в *pbp4* и его промоторе детерминируют устойчивость к бета-лактамам. Мутации в регуляторных генах, ответственных за биосинтез клеточной стенки, приводят к устойчивости к гликопептидам. Мутации в системах биосинтеза мембранных фосфолипидов приводят к устойчивости к даптомицину. Кросс-толерантность связана с появлением мутаций в пептидил-тРНК-гидролазе (Pth). Приобретение устойчивости также ассоциировано с накоплением мутаций в «нецелевых» генах, генах метаболизма.

5. Гетерорезистентность и накопление гетеромутаций в популяции являются первичным этапом формирования полноценной устойчивости (гоморезистентности) к антибиотикам.

Степень достоверности.

Исследование выполнено с использованием современного исследовательского оборудования. Были использованы современные международные протоколы и стандарты исследований, касающиеся разделов по оценке чувствительности и молекулярного типирования

бактерий. Экспериментальные работы проводились с повторностями и включением надлежащих контролей. На всех этапах использовались контрольные референсные штаммы АТСС. Использовали входной контроль полученных данных секвенирования, некачественные ДНК-прочтения удалялись из анализа с повторным получением данных секвенирования. Результаты статистически обработаны с порогом принятия значимости (p) от $\leq 0,001$ до $< 0,05$. Полученные результаты были рецензированы в различных международных и российских изданиях при публикации материалов по теме диссертационного исследования. Часть экспериментальных работ также рецензирована экспертами Российского Научного Фонда (РНФ), по грантам которого выполнялась часть исследований. Выводы диссертации соответствуют цели и задачам исследования.

Апробация результатов.

Результаты работы были представлены на 40 различных международных и всероссийских конгрессах, научно-практических конференциях в виде устных и постерных докладов. Наиболее значимые результаты были представлены на Европейских конгрессах по клинической микробиологии и инфекционным болезням ESCMID (European Congress of Clinical Microbiology & Infectious Diseases): ESCMID 2014 (Барселона, Испания), ESCMID 2015 (Копенгаген, Дания), ESCMID 2016 и ESCMID 2019 (Амстердам, Нидерланды), ESCMID2020 (online abstract book), ESCMID 2021 – 2022 (online); 10-ом международном симпозиуме по резистентности и антимикробным агентам, 10th ISAAR, International Symposium on Antimicrobial Agents and Resistance 2015 (Инчхон, Южная Корея); Конгрессах «Молекулярная диагностика (МД)» - МД 2014, МД 2017, МД 2021 и МД 2023 (Москва, Россия); Всероссийских конгрессах «Кашкинские чтения» (Санкт-Петербург, Россия) в 2014 – 2022 гг.; Российских конференциях «Современные проблемы и перспективы антимикробной терапии» в 2016, 2020 – 2022гг; X конгрессе с международным участием «Контроль и профилактика инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи 2022» (Москва, Россия); «Санкт-Петербургском септическом форуме» в 2018, 2022 (Санкт-Петербург, Россия). Большинство международных выступлений (ESCMID, ISAAR) было поддержано грантами конференций для молодых ученых (Young scientist Travel Grants). В 2016 г. получен грант на прохождение образовательного курса по программе Европейского общества клинических микробиологов и инфекционистов (ESCMID) – Virulence and Resistance in Staphylococcus aureus: State of the Art, ESCMID Postgraduate Education Course (Лион, Франция). Исследование было поддержано гратами РНФ: 15-15-00185 (2015 – 2017 гг., основной исполнитель), 18-75-10114 (2018 – 2021 гг., руководитель) и 18-75-10114-П (2021 – 2023 гг., руководитель). Апробация диссертационной работы проведена на Ученом совете ФГБУ ДНКЦИБ ФМБА (протокол №9 от 24.10.2023).

Личное участие автора в получении результатов.

Автор принимал участие во всех этапах исследования: ведение коллекции бактериальных культур, проведение лабораторных, микробиологических методов исследований, молекулярного типирования, геномного секвенирования и биоинформатического анализа. Микробиологические работы, секвенирование геномов, а также работы по селекции устойчивости *in vitro* были проведены на базе научно-исследовательского отдела медицинской микробиологии и молекулярной эпидемиологии ФГБУ ДНКЦИБ ФМБА совместно с коллегами – к.м.н. Калиногорской О.С., Сабиновой К.А., Чулковой П.С., Сулян О.С. Биоинформатический анализ проводился совместно с сотрудниками НИО Лихолетовой Д.В., Павловой П.А. и Цветковой И.А. Экспериментальные работы, связанные с выделением РНК, оценкой экспрессии генов, геномным редактированием, были проведены на базе Санкт-Петербургского филиала ИоГЕН РАН совместно с сотрудниками к.б.н Соповой Ю.В., Велижаниной М.Е.. Секвенирование коллекции изолятов, относящихся к ST8 и ST239, и первичный анализ данных секвенирования был проведен на базе ФГБУ ЦСП ФМБА России совместно с сотрудниками Шаповаловой В.В., Мацвай А.Д., Нурмукановой В.А. Часть изолятов MRSA ST239 были типированы совместно с доктором Stefan Monecke (Институт фотонных технологий им. Лейбница, Йена, Германия).

Связь работы с научными программами.

Проблема формирования и распространения устойчивости к антибиотикам является глобальной угрозой человечеству. В развитых странах мира многие государственные программы в сфере здравоохранения направлены на исследования таких аспектов, как механизмы формирования устойчивости, молекулярные векторы распространения резистентности и разработка мер по сдерживанию экспансии множественно устойчивых клонов бактерий. Проводятся программы по слежению за эволюцией и распространением как известных, так и новых генетических линий. Диссертационное исследование проведено в рамках этих задач. Работа была направлена на расшифровку механизмов резистентности, изучение возможности детекции новых фенотипов устойчивости у клинически значимого патогена – *S. aureus*. Диссертационная работа полностью соответствует направлению Стратегии научно-технологического развития Российской Федерации (пункт 20в): переход к персонализированной медицине, высокотехнологичному здравоохранению и технологиям здоровьесбережения, в том числе за счет рационального применения лекарственных препаратов (прежде всего антибактериальных).

Публикации научных трудов.

По результатам диссертационного исследования было опубликовано 32 печатные работы. Из них, 24 работы опубликованы в изданиях, рекомендованных ВАК и индексируемые в базах данных РИНЦ, Scopus или Web of Science, включая 8 публикаций в изданиях, входящих (на момент публикации) в Q1 по системе SJR (Приложение 3). Остальные печатные работы представлены в виде тезисов докладов конференций. Получено пять патентов на изобретения (Приложение 1).

Объем и структура диссертации.

Диссертация состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов исследования, результатов исследования и их обсуждения, заключения, выводов, списка цитируемой литературы и приложений. Текст изложен на 333 страницах, проиллюстрирован 54 рисунками, включает 38 таблиц, список литературы содержит 506 библиографических источника.

ОСНОВНАЯ ЧАСТЬ

ГЛАВА 1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

Глава 1 подготовлена на основе ранее опубликованных обзоров литературы по различным аспектам микробиологии *S. aureus* в рамках выполнения диссертационной работы [37-39].

1.1. Общая характеристика *S. aureus*

Золотистый стафилококк (*Staphylococcus aureus*) может рассматриваться одновременно как комменсал и патоген человека. Биология *S. aureus*, факторы вирулентности максимально адаптированы к существованию на поверхности кожи и слизистых человека. Эти же факторы обеспечивают и вирулентный потенциал. На сегодняшний день у *S. aureus* описано более 50 различных эндогенных и секретируемых факторов вирулентности. К их числу относятся различные адгезины, суперантигены, гемолизины, лейкоцидины, энтеротоксины и различные комплексы уклонения от действия иммунного ответа макроорганизма. Большое число различных факторов вирулентности определяет разнообразный спектр клинических проявлений стафилококковых инфекций. *S. aureus* входит в состав нормальной микрофлоры у приблизительно 30% человеческой популяции. Золотистый стафилококк способен вызывать инфекционный процесс практически в любой ткани и органе человеческого организма, в этом заключается большой спектр возможных форм заболеваний от инфекций кожи мягких тканей до критических состояний при сепсисе [1]. Усугубляет положение и высокая степень устойчивости к антимикробным препаратам, которая характерна для метициллинрезистентных *S. aureus* (Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, MRSA). Устойчивый к пенициллину *S. aureus* фаготип 80/81 доминировал в период с 1953 по 1963 год. После того, как он возник во внутрибольничных условиях, он распространился во внебольничной среде, в частности, в Северной Америке, Великобритании и Австралии [40]. После внедрения метицилина в клиническую практику фаготип 80/81 полностью элиминировал. MRSA впервые были описаны в Великобритании в 1961г, основная особенность этих фенотипов заключается в устойчивости ко всем бета-лактамам антибиотикам. Такой фенотип устойчивости детерминирован особым генетическим элементом – стафилококковой хромосомной кассетой *mec* (Staphylococcal Cassette Chromosome *mec*, SCC*mec*), где закодирован ген (*mecA*), кодирующий альтернативный пенициллинсвязывающий белок – PBP2a. Бета-лактамы антибиотиков проявляют крайне

низкую аффинность к РВР2а. Помимо этого, MRSA, в отличие от метициллинчувствительных *S. aureus* (Methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus*, MSSA), характеризуются также и высокой степенью ассоциированной устойчивости к антибиотикам различных классов. После первого описания MRSA они распространились на все континенты и длительное время сохраняли лидерство в качестве основных возбудителей внутрибольничных инфекций (Hospital-acquired MRSA, HA-MRSA). Отличительная особенность HA-MRSA – это высокий уровень ассоциированной устойчивости к антибиотикам различных классов, вплоть до конца 1990-х единственным эффективным антибиотиком для лечения инфекций MRSA был ванкомицин. Хотя к тому времени были описаны фенотипы устойчивости к ванкомицину среди энтерококков и коагулазоотрицательных стафилококков, вероятность появления устойчивости у *S. aureus* оценивалась как низкая. Однако в 1997 г. в Японии были впервые описаны изоляты со сниженной чувствительностью к ванкомицину (Vancomycin-intermediate *S. aureus*, VISA и hetero-VISA). Позже, в начале 2000-х уже были описаны и ванкомицин-устойчивые *S. aureus* (Vancomycin-resistant *S. aureus*, VRSA). Данное обстоятельство послужило стимулом для внедрения в клиническую практику новых антимикробных препаратов – альтернатив ванкомицину, для эффективного лечения инфекций, вызываемых MRSA. В 1990-х также впервые были описаны внебольничные MRSA (Community-acquired MRSA, CA-MRSA), которые характеризовались необычайно высокой степенью вирулентности. Появление таких фенотипов носило характер вспышек, особенно среди замкнутых коллективов. Высокая вирулентность приводила к появлению осложненных форм стафилококковых инфекций, в частности, некротизирующих пневмоний, летальный исход при которых мог наступить в течение 48 часов. Эпидемия CA-MRSA инфекций распространялась на территории США, Центральной и Южной Америке, позже в Европе, Африке и других странах. Пожалуй, наиболее изученный клон CA-MRSA, циркулирующий на территории США – это USA300 (название штаммов присвоено на основе номенклатуры при использовании молекулярного типирования с помощью пульс-электрофореза). Отличительной особенностью CA-MRSA была чувствительность к антибиотикам различных классов (за исключением бета-лактамов) и наличие токсина – лейкоцидина Пантон-Валентайна (Panton–Valentine leukocidin, PVL). Для USA300 было также дополнительно характерно наличие комплекса генов ACME (Arginine Catabolic Mobile Element, ACME), участвующих в катаболизме аргинина. На сегодняшний день, с точки зрения эпидемиологии и молекулярного типирования, границы между HA-MRSA и CA-MRSA стираются. Наличие генов PVL или ACME не является обязательной характеристикой CA-MRSA. В частности, клоны, которые формируются во внутригоспитальной среде (HA-MRSA), способны циркулировать и во внегоспитальной среде, возможна и обратная ситуация. Еще один эпидемиологический кластер – это MRSA, вызывающие инфекции у животных

(Livestock-associated MRSA, LA-MRSA) [20]. Инфекционные заболевания у сельскохозяйственных животных имеют стратегическое продовольственное значение. LA-MRSA вызывают кожные поражения, маститы и другие инфекционные поражения у крупного рогатого скота, свиней, лошадей. Помимо животных LA-MRSA вызывают инфекции и у человека, первый клинически верифицированный случай передачи инфекции от животного человеку был описан в 2000-х гг. [41]. Высокая плотность сельскохозяйственных угодий и, как следствие, большое количество поголовья животных – один из основных рисков распространения LA-MRSA. Граница Нидерландов и Северной Германии является «горячей точкой» распространения этих фенотипов [21, 22]. В этой географической зоне регистрируется высокая частота стафилококковых инфекций, а также высокий уровень носительства LA-MRSA среди местных жителей. Северная Европа и Скандинавские страны отличаются очень низким уровнем HA-MRSA инфекций, однако в последние годы отмечается подъем инфекций, связанных с LA-MRSA [42].

1.2. Клиническое значение *S. aureus*

Смертность от инфекций, вызываемых *S. aureus*, и в настоящее время остается достаточно высокой. Это подтверждается исследованием группы GBD (Global Burden of Diseases), включающей исследователей из более двухсот стран мира, в котором была приведена статистика летальности от инфекционных заболеваний в 2019 году [2]. Анализ включал 343 млн записей пациентов со всех континентов, из которых ~7,7 млн умерли от инфекционных заболеваний бактериальной природы. Лидером по летальности во взрослой популяции среди 33 возбудителей был *S. aureus*, вызвавший более 1 миллиона смертей с самым высоким показателем летальности в 135-ти странах мира. Самым грозным инфекционным осложнением является стафилококковая бактериемия. Частота выявления бактериемий, вызванных *S. aureus*, по разным литературным данным различается, но в среднем в развитых странах составляет от 10 до 30 случаев на 100000 населения [43]. Эпидемиология стафилококковых бактериемий в достаточной мере зависит от возраста пациентов, в частности, высокий риск развития характерен для первого года жизни, а также пожилого возраста. Например, в исследовании Laurland и соавт. [43] было показано, что в популяции у пациентов с возрастом >70 лет частота выявления бактериемий составляла 100 случаев на 100000 населения. К группам риска также относятся пациенты с различными иммунодефицитами, инъекционные наркоманы и особенно пациенты, находящиеся на гемодиализе [44]. В зависимости от первичного источника инфекции, уровень 30-дневной летальности значительно варьирует. В частности, более высокие

показатели смертности наблюдаются при неустановленном очаге (22–48%), инфекционном эндокардите (25–60%), пневмониях (39–67%). Уровень 30-дневной летальности, не превышающий 20%, наблюдается при катетер-ассоциированных бактериемиях, кожных и мочевыводящих инфекциях [45, 46]. В мета-анализе Bai и соавт. [47], включавшем 341 работу, был проведен анализ клинических данных более 530000 пациентов со стафилококковыми бактериемиями за 1991 – 2021 гг. из различных стран мира. Авторы установили, что средняя общая 30-дневная летальность составляла 18%. Однако, при бактериемии, вызванной изолятами MRSA, уровень госпитальной летальности был выше (29 – 40%) по сравнению с MSSA (14 – 23%). Еще одна особенность, которую отмечали авторы – это снижение госпитальной летальности с 1991 по 2021 гг., такое снижение по всей видимости связано с усовершенствованием рекомендаций по ведению пациентов со стафилококковыми бактериемиями, а также внедрением новых препаратов в клиническую практику (даптомицина, цефтаролина, оксазолидинонов, липогликопептидов). В работе Kourtis и соавт. [35], проведенной в США, были отмечены похожие результаты, так летальность при MRSA бактериемии составляла 17%, однако авторы также отмечали и снижение летальности на 17% с 2005 по 2016. При этом данный показатель возрастал для MSSA на 4% с 2012 по 2017 г. Ванкомицин является препаратом выбора для лечения стафилококковых инфекций, и в частности, бактериемий. Снижение чувствительности к ванкомицину с формированием фенотипов VISA, hVISA является неблагоприятным прогностическим признаком при бактериемии, ассоциированной с риском неблагоприятных исходов. Однако, стоит подчеркнуть, что данный вопрос остается дискуссионным, существует и противоположная точка зрения, при которой нет однозначной роли снижения чувствительности к ванкомицину в формировании неблагоприятных исходов. В работе Giulieri и соавт. [48] был проведен анализ клинических данных более 1300 пациентов с бактериемиями, с полногеномным секвенированием изолятов *S. aureus* с последующим анализом результатов с помощью алгоритмов машинного обучения. По результатам этого исследования была выявлена связь между неблагоприятными исходами и сниженной чувствительностью к ванкомицину, обусловленной мутациями как в известных генах, ассоциированных с устойчивостью к ванкомицину (*mprF*, *walk*), так новых – аспараткиназе (*thrD*) и «выключателе» рибосом, участвующем в SOS-ответе (*rsfS*).

В настоящее время *S. aureus* является наиболее распространенной причиной развития инфекционного эндокардита [49]. Вследствие потенциальной возможности вызывать тяжелые заболевания, а также вкупе с ассоциированной устойчивостью к антибиотикам, *S. aureus* является опасным этиологическим агентом данного заболевания. Это подтверждается многими

сравнительными клиническими наблюдениями, где *S. aureus* в большей степени ассоциирован с летальными исходами по сравнению с другими возбудителями инфекционного эндокардита. Эпидемиология инфекционного эндокардита, вызванного *S. aureus*, различается в зависимости от географии, но в среднем составляет 4 – 5 случая на 100000 населения [49]. Формирование очага бактериальной колонизации и инфекции начинается с повреждения эндотелия сердца либо путем травматизации при кардиологических хирургических вмешательствах. Воздействие субэндотелиальных клеток вызывает выработку белков внеклеточного матрикса и тканевого фактора, а также отложение фибрина и тромбоцитов с образованием скопления тромбоцитарных бляшек. Колонизация *S. aureus* таких тромбоцитарных образований приводит к развитию инфекционного эндокардита. *S. aureus* имеет ряд факторов – адгезинов, связанных с клеточной стенкой, которые позволяют ему прикрепляться к белкам внеклеточного матрикса, фибрину и тромбоцитам. В частности, фибриногенсвязывающие белки (факторы слипания ClfA и ClfB) являются ключевыми для прикрепления и колонизации ткани клапанов сердца. Фибронектинсвязывающие белки (FnBPA и FnBPB) облегчают связывание с фибриногеном и фибронектином, а также играют роль в последующей инвазии и воспалении эндотелиальных клеток. Белок SdrE, содержащий сериновые, аспартатные повторы, индуцирует агрегацию и активацию тромбоцитов. Гликопротеины плазмы крови (фактор фон Виллебранда) являются вспомогательными компонентами при адгезии *S. aureus* к эндотелиоцитам. Белок, связывающий фактор Виллебранда, связывает протромбин и превращает фибриноген в фибрин. При инфекционном эндокардите часто возникают осложнения – эмболия системного кровообращения и сердечная недостаточность. Летальность при инфекционном эндокардите, вызванном *S. aureus*, колеблется от 22 до 66%. Инфекционный эндокардит, связанный с оказанием медицинской помощи, имеет худший прогноз, чем внебольничный, и инфекция при протезировании клапана также имеет худший прогноз, чем поражение нативного клапана.

S. aureus вызывает различные формы инфекции кожи: от легко поддающихся лечению (импетиго) до угрожающих жизни (кожные абсцессы, гнойный целлюлит). *S. aureus* является наиболее частым возбудителем гнойных осложнений ран после различных хирургических вмешательств. Особую роль в развитии кожных инфекций играет CA-MRSA, характеризующийся более выраженной вирулентностью, ведущей к утяжелению инфекционного процесса и ухудшению исходов.

Первичной защитой от инфекции *S. aureus* является нейтрофильный фагоцитоз. При попадании *S. aureus* в кожу нейтрофилы и макрофаги мигрируют к месту заражения. *S. aureus* уклоняется от этого ответа, используя множество способов, которые включают блокирование хемотаксиса лейкоцитов, разрушение антител хозяина, защиту посредством образования

полисахаридной капсулы или образования биопленок и сопротивление разрушению в фагоцитарной фагосоме. Немаловажную роль в развитии инфекции играют лейкоцидин Пантона-Валентайна (PVL), гемолизин альфа, фенолрастворимые модулины (PSM), комплекс АСМЕ и общий регуляторный локус – Agr. Импетиго – наиболее распространенная бактериальная инфекция кожи у детей [50]. Недавние исследования импетигиозных поражений выявили показатели выздоровления от 29 до 90% и от 57 до 81% для *Streptococcus pyogenes* и *S. aureus*, соответственно [51]. Хотя отличительным признаком инфекции *S. aureus* обычно считается кожный абсцесс [1], в клинической практике также встречаются и другие проявления кожной инфекции. Негнойный целлюлит может быть вызван *S. aureus* [52]. Хотя целлюлит, вызванный *S. aureus*, чаще всего поражает нижние конечности, он также может поражать и другие области, включая верхние конечности, брюшную стенку и лицо. Некротизирующий фасциит – еще одно грозное осложнение, вызываемое *S. aureus*. Стафилококковый пиомиозит чаще всего встречается в тропических странах [53]. Инфекции, связанные с хирургическими ранами, возникают в 10% случаев [54], на это влияет множество факторов – тип хирургического вмешательства, коморбидность, опыт медицинского персонала, условия пребывания пациента и проведенная антимикробная профилактика. Во многих странах *S. aureus* является одной из распространенных причин хирургических инфекций, так в США регистрируется около 30% инфекций, вызванных *S. aureus* [55].

Синдром ошпаренной кожи (синдром Риттера) – одно из проявлений стафилококковой инфекции, проявляющейся у новорожденных и детей первого года жизни [56]. Развитие данного заболевания связано с наличием токсинов – эксфолиатинов (*eta*, *etb*). Данные токсины представляют собой сериновые протеазы, которые избирательно гидролизуют десмосомальные белки кожи (десмоглеин 1), что приводит к отслоению и разрушению верхнего слоя клеток эпидермиса (*Stratum granulosum*). Летальность при данной форме заболевания у детей низкая, но положительно коррелирует с возрастом пациентов. Наиболее тяжелые случаи описаны у взрослых пациентов [56-58].

S. aureus является наиболее распространенным возбудителем костно-суставных инфекций, включающих остеомиелит [59, 60], септический артрит и перипротезную инфекцию как у детей, так и взрослых. *S. aureus* является наиболее частой причиной гематогенного остеомиелита. Гематогенный остеомиелит обычно поражает концы длинных костей у детей и подростков и осевой скелет у пожилых людей, вследствие более выраженного кровоснабжения позвонков, чем длинных костей у взрослых. Частота выявления остеомиелита в Европе колеблется в пределах 5 – 8 случаев на 100000 населения с преобладанием *S. aureus* в роли этиологического агента.

Наличие многочисленных поверхностных белков *S. aureus* обеспечивает адгезию к компонентам костного матрикса и коллагену. Эти адгезины входят в группу рецепторных белков MSCRAMM (Microbial Surface Components Recognizing Adhesive Matrix Molecules) – поверхностные микробные белки, распознающие молекулы матрикса адгезии [61, 62]. В экспериментах на животных было установлено, что MSCRAMM белки имеют существенное влияние на развитие костно-суставных инфекций [63]. Помимо этого *S. aureus* способен образовывать биопленки на различных материалах, в частности, используемых в травматологии и ортопедии для фиксации переломов или протезирования [64]. Формирование биопленок может усугублять течение инфекционного процесса вследствие наличия экзополисахаридного матрикса, защищающего микроколонию бактерий от действия внешних факторов, а также путем формирования клеток-персистеров со свойствами антибиотикотолерантности. Клетки *S. aureus* способны проникать в остеобласты и внутри цитоплазмы образовывать мелкоколониевые варианты (Small-Colony Variants, SCV), где они способны выживать в течение продолжительного времени [65, 66]. Такое выживание связано с низкой метаболической активностью SCV вариантов, а также защитой от действия антибиотиков, которые могут не проникать в клетки остеобластов. В этой связи целесообразно использовать antimicrobные препараты, которые способны пенетрировать во внутриклеточную среду: рифампицин и фторхинолоны. Наиболее частой формой гематогенного остеомиелита осевого скелета, вызванного *S. aureus*, являются дисциты (поражение межпозвоночного дискового пространства). Ранняя диагностика остеомиелита и особенно различных осложнений (дисцитов) в значительной мере влияет на исход заболевания. Костно-суставные инфекции, вызванные *S. aureus*, которые связаны с рисками летального исхода, хроническими течениями, ухудшающими качество жизни пациентов, а также инвалидизацией, являются серьёзной проблемой для системы здравоохранения [67, 68].

Одна из особенностей, описанная у *S. aureus*, а именно образование особого морфотипа – мелкоколониальных вариантов (SCV), связана с устойчивостью к гентамицину. SCV фенотипы представляют собой очень мелкие колонии, часто без пигментации, с крайне низкой и линейной скоростью роста. Это связано с появлением зависимости роста от наличия гемина, менадиона, менахинона. Появление такой ауксотрофности ассоциировано с воздействием гентамицина [69]. Появление зависимости роста от тимидина связано с воздействием триметоприма-сульфаметоксазола [70]. Выделяют также и CO₂-зависимые фенотипы SCV [66]. Делеции и мутации в ключевых генах биосинтеза кофакторов (Men, Hem, ThyA) являются основной причиной появления ауксотрофности. Выявление SCV фенотипов ассоциировано с неблагоприятными клиническими исходами [66].

S. aureus может являться этиологическим агентом различных пневмоний: внебольничной, вентилятор-ассоциированной и нозокомиальной. Наиболее опасным вариантом является некротизирующая пневмония, характеризующаяся молниеносным течением, и в подавляющем большинстве случаев связанная с наличием токсина PVL. Как отмечалось ранее, на фоне распространения CA-MRSA на территории США и Центральной Америки с 1990 г значительно увеличилось количество случаев стафилококковых некротизирующих пневмоний. В целом стоит отметить, что в общей структуре внебольничных пневмоний, *S. aureus* встречается довольно редко, не более 5 – 10% случаев у взрослых и менее 1% среди детей [71-73]. Одним из доминирующих видов при инфекционных осложнениях у больных муковисцидозом также является *S. aureus*. Стафилококковая пневмония на фоне вирусных респираторных инфекций (особенно гриппа) является существенным фактором риска. Летальность при таких ко-инфекциях может составлять 21 – 40% [74, 75]. Нозокомиальная пневмония, ассоциированная с бактериемией, связана с высоким риском летальности (более 50%) в независимости от наличия MSSA или MRSA [76]. При развитии пневмонии, вызванной *S. aureus*, происходит массивный приток полиморфно-ядерных лейкоцитов в паренхиму легких с образованием микроабсцессов. На различных инфекционных моделях на животных было показано, что наличие PVL и альфа-гемолизина существенно влияют на патогенез стафилококковых пневмоний. Воздействие альфа-гемолизина приводит к образованию агрегатов тромбоцитов и нейтрофилов с последующим разрушением тканей легкого. Использование антител против альфа-гемолизина защищает от развития летальной пневмонии у мышей [77].

Менингиты, вызванные *S. aureus*, встречаются достаточно редко и не превышают 5% от числа всех потенциальных бактериальных возбудителей. Гематогенный менингит обычно является внебольничным и, по сравнению с послеоперационным, поражает пожилых людей с выраженной коморбидностью [78, 79]. Чаще всего источником гематогенного менингита является инфекционный эндокардит, пневмония или инфекции кожи и мягких тканей. Смертность от гематогенного менингита, вызванного *S. aureus*, выше, чем после постоперационного. Однако, выявление MRSA в случае нозокомиального варианта повышает 30-дневную летальность. Лечение менингитов, вызванных MRSA, осложняется узким спектром антибиотиков, которые возможно использовать. В частности, одной из опций остается интратекальное введение ванкомицина, однако это сопряжено с нейротоксичностью [80]. Другие возможные варианты – это применение линезолида, триметоприма/сульфаметоксазола или даптомицина [81].

Синдром токсического шока был впервые описан у детей со стафилококковой инфекцией. Однако наибольшее внимание привлекли случаи развития этого опасного симптома среди женщин во время менструаций при использовании соответствующих гигиенических средств в 1980-1990-х гг. [82]. На территории США на тот период времени среди женщин на 100000 населения регистрировалось 14 случаев проявления токсического шока, связанных исключительно с использованием сильно впитывающих тампонов [1]. После отмены продаж таких типов тампонов количество регистрируемых случаев данного синдрома резко сократилось. Синдром токсического шока обусловлен наличием секретируемого токсина-суперантигена (TSST-1) у *S. aureus*. Не все клоны синтезируют TSST-1, распространение в популяции *S. aureus* этого фактора вирулентности обусловлено циркуляцией определённых бактериофагов, несущих данный ген. TSST-1 связывается с Т-клеточным рецептором и рецептором основного комплекса гистосовместимости класса II, представленными на антигенпрезентирующих клетках. Это приводит к массивной активации Т-клеток и цитокиновому шторму [83], результатом чего является развитие мультисистемного воспалительного ответа, септического шока и полиорганной недостаточности. При несвоевременном лечении существует высокая вероятность летального исхода. На сегодняшний день разделяют менструальную и другие формы токсического шока. Первый вариант практически не описывается в настоящее время, в то время как остальные преимущественно возникают у детей при инвазивных формах стафилококковых инфекций [82]. Синдром стафилококкового токсического шока по патогенезу и другим особенностям напоминает стрептококковый, вызываемый *S. pyogenes*. Однако, при сравнении клинических особенностей двух синдромов, стрептококковый в большей степени ассоциирован с неблагоприятными исходами [84]. Первичным этапом терапевтических мероприятий является удаление источника стафилококкового токсина, а также антибактериальная терапия, направленная на снижение биосинтеза токсина (использование комбинированной антибактериальной терапии с использованием линкозамидов, линезолида) [85].

Еще одно важное медицинское и эпидемиологическое значение *S. aureus* – это способность контаминировать продукты питания и вызывать токсикоинфекции. Это обусловлено наличием стафилококковых энтеротоксинов (в частности, энтеротоксина В, SEB), которые сохраняют стабильность при воздействии содержимого желудочно-кишечного тракта. Только в США ежегодно регистрируется около 240000 случаев стафилококковых гастроэнтеритов, связанных с контаминацией пищевых продуктов. В Европе около 1% проверяемых кисло-молочных продуктов содержат стафилококковые энтеротоксины. У *S. aureus* описано около 30 различных энтеротоксинов – суперантигенов, представленных

четырьмя филогенетическими группами (SEA, SEB, SEI, SE/X), которые могут быть локализованы на плаزمиде, профаговых структурах, хромосоме [86, 87].

Таким образом, *S. aureus* имеет важное клиническое, эпидемиологическое значение, способность поражать любые органы и ткани является примером очень высокой адаптации к существованию у макроорганизма. Помимо этого, *S. aureus* остается одним из главных «проблемных» патогенов с высоким уровнем множественной устойчивости к антимикробным препаратам, посредством реализации нескольких стратегий ухода от действия антимикробных препаратов – резистентности, гетерорезистентности и толерантности.

1.3. Эпидемиология и популяционная структура MRSA

Клональная структура популяции *S. aureus* имеет ряд особенностей. База данных MLST (Multi-Locus Sequence Typing), основной первичный источник для оценки популяционной структуры клинически значимых микроорганизмов, включает на 2023 г более 8700 клонов, аллельных профилей или сиквенс-типов (Sequence type, ST) *S. aureus*, которые объединены в одиннадцать основных клональных комплексов (Clonal complex, CC) [88]. Для MRSA характерна выраженная клональность популяции. Так, среди всех описанных клонов менее 1% ассоциированы с фенотипом MRSA. Для MSSA напротив характерна тенденция к панмиксии. Другая особенность - это выраженная географическая детерминированность, так разные ST и CC MRSA циркулируют в различных географических регионах. Частота встречаемости MRSA в мире в значительной степени варьирует. Так, в США, Центральной и Южной Америке, Юго-Восточной Азии и Австралии частота выявления MRSA наиболее высокая. В странах Евросоюза наибольшая доля встречаемости MRSA в Центральной и Западной Европе, в Скандинавских странах, напротив, степень выявляемости крайне низкая. Распространение HA-MRSA в России крайне не равномерно и колеблется от 0 до 80% [37]. В разных странах доминируют разные генетические линии MRSA. В странах Африки доминируют ST88, ST80 (CA-MRSA) и ST239 [89]. В Азии, Юго-Восточной Азии ST239 выступает основным HA-MRSA клоном; из CA-MRSA преимущественно циркулируют ST59, ST772, ST72, ST30 и ST8 [90, 91]. В Латинской и Южной Америке циркулируют ST239, ST5, ST100 и доминирует CA-MRSA ST8-USA300 [92]. В Австралии циркулируют различные генетические линии ST93, ST121, ST5, CA-MRSA ST8-USA300 [93]. Ввиду географического положения России (соседство, как с Европой, так и с Азией) особенности эпидемиологии MRSA в России представляют не только локальное значение. Представители CC8, и в частности, ST8 и ST239 являются наиболее распространенными HA-MRSA в России. Это полностью подтверждается многими

исследованиями, проведенными разными научными группами в России. В глобальном аспекте CC8 представлен несколькими эпидемическими генетическими линиями MRSA: ST250-SCCmec-I (Архаический клон), ST247-SCCmec-I (Иберийский клон), ST8-SCCmec IV и ST239-MRSA-SCCmec III (Бразильский/Венгерский клон). В России генотип ST8-SCCmec IV доминирует на огромной территории от Красноярска до Санкт-Петербурга. Описаны и локальные варианты ST8. Так, по результатам работы Хохловой О.Е. и соавт., в Красноярске был обнаружен локальный вариант ST8 (ST8_{Kras}), который отличался от других циркулирующих представителей ST8 [94]. Авторы выявили повышенную вирулентность у части изолятов ST8_{Kras}. Так, было проанализировано десять изолятов ST8, шесть из них были выделены при летальных случаях вследствие развития тяжелой внебольничной пневмонии и характеризовались усиленной экспрессией генов цитолитических пептидов (фенол растворимых модулинов α , и δ -гемолизин), факторов уклонения от иммунитета (immune evasion cluster): стафилокиназы, SAK и ингибитора стафилококкового комплемента (SCIN, *scn*), энтеротоксина А (SEA). Согласно эпидемиологическим критериям ряд изолятов ST8_{Kras} из Красноярска [94] были оценены как CA-MRSA, однако по данным молекулярного типирования, эти клоны были PVL- и ACME-отрицательными, но имели SCCmec IVc. Таким образом, эти изоляты характеризовались молекулярным паттерном, характерным в большей степени для HA-MRSA. Несмотря на обилие работ по молекулярной эпидемиологии доминирующих клонов, вопросы их происхождения и эволюции в России остаются до конца не изученными. Согласно более ранним исследованиям [95-98] ST8-t008-SCCmec IV, циркулирующий с 1990-х годов, является одним из наиболее распространенных клонов MRSA в России. В Европе, и в частности во Франции и Бельгии, изоляты ST8 также циркулируют длительный период времени и относятся к так называемому Лионскому клону (Lyon clone) [99, 100]. Позже, в работах 2014 – 2016 годов географическое распространение ST8 в Европе было подтверждено исследованием молекулярной эпидемиологии MRSA в 13 отделениях реанимации и интенсивной терапии в восьми европейских странах [101, 102]. Пожалуй, самый успешный представитель ST8, циркулирующий с конца 1990-х на территории всей континентальной Америки – клон USA300. Первоначально данный клон являлся CA-MRSA и главной его особенностью было наличие гена токсина PVL и ACME-комплекса. В настоящее время этот клон циркулирует как во внебольничной среде, так и внутрибольничной, и является основной причиной стафилококковых инфекций в США. Второй по частоте распространения клон в России – ST239. Считается, что возникновение данной генетической линии связано с рекомбинацией между клонами CC8 и CC30 [103, 104]. Клоны ST239 представляют собой преимущественно нозокомиальные варианты и распространены в Австралии, Азии, Южной Америки, но спорадически регистрируются в других географических регионах [105]. В Европе ST239 в

последние несколько лет практически не встречается [106]. В России данный клон оказался более успешным, распространен на большой территории и представлен разными локальными вариантами. Например, один из вариантов ранее был описан в Красноярске (ST239_{Kras}), изоляты этого варианта принадлежали к spa-типу t037, были *tsst*-положительными, но отрицательными по энтеротоксину А и были выделены у пациентов с летальными внутрибольничными пневмониями [94].

Клональный комплекс CC5 широко распространен в Европе и представлен тремя основными клонами: ST225, ST228 и ST125 [100]. В России CC5 представлен в основном Южно-Германским нозокомиальным клоном ST228-t041-SCC*mec* IA [107].

В настоящее время представители CC22 являются одной из самых распространенных генетических линий HA-MRSA в Европе. В данный комплекс входит эпидемический клон ST22 (EMRSA-15), характеризующийся наличием SCC*mec* IVh, фенотипом множественной устойчивости к антибиоткам, и устойчивость к фторхинолонам является его наиболее типичным признаком [108]. Клон ST22 (EMRSA-15) является основной причиной нозокомиальных стафилококковых инфекций в Великобритании. Описан также и другой вариант ST22, встречающийся преимущественно среди CA-MRSA и характеризующийся низким уровнем ассоциированной устойчивости к антибиотикам. Данный клон первоначально был описан среди здоровых носителей в секторе Газа (Палестина) [109]. Отсюда появилось название данной генетической линии как «Газа клон». Позднее об этом варианте сообщалось из других стран Ближнего Востока [110-112], реже из Европы [113]. Помимо того, что этот клон ассоциирован с носительством, описываются и случаи выявления при инфекциях [114]. Происхождение ближневосточного варианта ST22 до конца не изучено, один из сценариев предполагает формирование «Газа клона» через приобретение SCC*mec* IVa локально циркулирующими MSSA-t223. Вовлечение EMRSA-15 в эволюцию «Газа клона» является менее правдоподобным сценарием [109]. Наиболее детализированное молекулярно-эпидемиологическое исследование было сделано Chang и соавт. [30], где подтверждается, что «Газа клон» – самостоятельная генетическая линия.

К LA-MRSA относятся CC398 и CC97, которые характеризуются высоким уровнем распространения и быстро эволюционируют [115, 116]. В качестве примера можно привести сложную эпидемиологическую ситуацию на севере Германии, Нидерландах и Дании, где, начиная с 2014 года, регистрируется крайне высокий уровень выявления LA-MRSA у сельскохозяйственных животных и высокий уровень инфекций среди населения [22]. На фоне появления и распространения во многих странах мира CA-MRSA в 1990-х годах, в России практически отсутствуют данные как об уровне распространённости CA-MRSA, так и о заболеваемости. Одно из первых исследований о выделении генетически верифицированного

CA-MRSA из России было опубликовано во Владивостоке в 2006 г [31]. Авторы отмечали, что PVL-положительный изолят MRSA был выделен от женщины с кожной инфекцией и относился к ST30-SCC_{mec} IVc. Юго-Западный Тихоокеанский клон ST30-PVL(+) является одной из успешных генетических линий CA-MRSA в Индонезии и Юго-Восточной Азии, и можно предположить его импорт на Дальний Восток России [117]. Позже были сообщения о выявлении CA-MRSA снова из Владивостока (клоны ST8-t826-SCC_{mec} IVc PVL (-) и ST30-t019-SCC_{mec} IVc PVL(+) [32]) и Красноярска (локальный вариант ST8_{Kras} с крупной геномной инверсией [118]).

1.4. Носительство *S. aureus*

MSSA и MRSA могут входить в состав нормальной микрофлоры у 30% и 1%, соответственно, человеческой популяции [119, 120]. Колонизация *S. aureus* и особенно MRSA являются факторами риска инфицирования. Риск колонизации MRSA гораздо выше среди спортсменов, заключенных, призывников, детей, жителей крупных городов, и в частности, бедных районов городов, владельцев домашних животных, работников животноводства, лиц, ранее перенесших инфекцию MRSA, или с различными формами иммунодефицитов, муковисцидозом, а также у людей, часто обращающихся за медицинской помощью [121-123]. Золотистый стафилококк способен длительно сохраняться на различных поверхностях в домашней среде, что подчеркивает быстрое его распространение среди членов семьи. Многие исследования показывают, что в 50 – 80% случаев, штаммы, выделенные при инфекции, по генотипам схожи со штаммами при колонизации. Иными словами, источником инфекции могут стать носительские штаммы. Колонизация MRSA может увеличить риск заражения на 25% [124]. В частности, наличие стафилококкового энтеротоксина Р коррелирует с повышенным риском бактериемии у лиц, которые являются носителями [125]. Колонизация с течением жизни человека, по-видимому, является динамичной, поскольку разные клоны могут быть выделены из разных участков тела, и может наблюдаться переключение между MSSA и MRSA. Также уровень колонизации *S. aureus* определяется и наличием комменсалов-антагонистов, в частности, *Staphylococcus epidermidis* и *S. lugdunensis*. Некоторые клоны *S. epidermidis*, секретирующие сериновую протеазу Esp, ингибируют образование биопленок *S. aureus* и могут снижать риск колонизации MRSA [126]. Образование антибиотика лугдунина бактерией *S. lugdunensis* полностью подавляет рост *S. aureus* [127]. Поскольку *S. aureus* является одновременно и комменсалом, и патогеном, существует много дискуссий о том, может ли обнаружение колонизации *S. aureus*, и в частности MRSA, и проведение последующей санации,

снизить риск развития инфекции. В многочисленных исследованиях предпринимались попытки определить оптимальные подходы к скринингу и деколонизационным мероприятиям. Обычно колонизацию MRSA выявляют путем мазка из носоглотки, хотя известно, что чувствительность данного подхода составляет 66% [128]. Во-первых, культуральный метод в значительной степени уступает ПЦР, и во-вторых, колонизация *S. aureus* обнаруживается в разных биотопах человека: подмышечных впадинах, промежности, прямой кишке [120]. Скрининг нескольких участков тела гораздо эффективнее для выявления *S. aureus* и MRSA [129]. Поскольку выявление MRSA является фактором риска, то в некоторых странах, в частности центральной и северной Европе, вводятся жесткие превентивные меры по санации от *S. aureus* у пациентов, медицинского персонала и пожилых людей [130]. Существуют аргументированные данные о роли проведения санации пациентов в снижении инфекций в области хирургического вмешательства, перенесших операцию на сердце [131]. Аналогичным образом меры универсальной деколонизации в условиях отделений интенсивной терапии снижают риск инфекций [132, 133]. Колонизация *S. aureus* ассоциирована с риском развития тяжелых форм пневмонии, требующих перевода пациентов в отделение ОПИТ [134]. Стоит, однако, отметить, что наряду с явно положительными результатами существуют и другие крупные исследования, где эффективность санации в снижении инфицирования не была доказана [135]. По результатам многочисленных исследований, среди носителей могут встречаться различные клоны MRSA. Однако среди медицинского персонала могут выявляться типичные HA-MRSA клоны (ST239, ST228, ST22-EMRSA-15), на территории Северной Америки среди носителей встречается ST8-USA300, в скандинавских странах преобладают клоны LA-MRSA (ST398) [120].

1.5. Устойчивость *S. aureus* к бета-лактамам антибиотикам

Бета-лактамы проявляют выраженную бактерицидную активность в отношении *S. aureus*, что делает их основными препаратами стартовой терапии, в частности для лечения инфекций, вызываемых MSSA. Самый первый механизм устойчивости – продукция стафилококковой бета-лактамазы (пенициллиназы) был описан в 1944 г. [136]. В течение нескольких лет после первого описания пенициллин-устойчивые стафилококки распространились по всему миру. В 1961 г. были впервые описаны *S. aureus*, устойчивые к метициллину (MRSA) [137] и другим бета-лактамам антибиотикам [138] за счет приобретения SCC*mec*. У *S. aureus* можно выделить также *tes*-независимые механизмы устойчивости к бета-лактамам, связанные преимущественно с разными мутациями в генах биосинтеза клеточной стенки. Отдельного внимания заслуживает новый механизм устойчивости, связанный с

изменением метаболизма внутриклеточных вторичных мессенджеров – циклического ди-аденозинмонофосфата (cyclic-di-adenosine monophosphate, c-di-AMP).

Стафилококковая пенициллиназа относится к классу А сериновых бета-лактамаз [139] и проявляет выраженную гидролитическую активность в отношении природных и большинства полусинтетических пенициллинов, очень слабую активность в отношении оксациллина, цефемов и карбапенемов. Пенициллиназа *S. aureus* инактивируется ингибиторами: клавуланатом, сульбактамом и тазобактамом [140]. Ген бета-лактамазы (*blaZ*) локализован в *bla*-опероне, как правило, в составе плазмид, его экспрессия является индуцибельной и регулируется системой двух генов – *blaR1-blaI*, соответственно репрессором и индуктором. Экспрессия *BlaZ* начинается только в присутствии бета-лактамов в среде [141]. Выделяют четыре основные группы пенициллиназ *S. aureus* (А – F) со значительным преобладанием группы А. «Серотип» бета-лактамаз зависит от аминокислотной последовательности и особенно в 128 и 216 положениях белка *BlaZ*.

Уровень гидролитической активности в отношении разных бета-лактамов может зависеть от мутаций в ферменте и особенно от аминокислотных замен в положениях 128 и 216 [142]. Это может отражаться в феномене инокулюм – зависимой чувствительности к цефазолину (CzIE, *cefazolin inoculum effect*), проявляющийся в увеличении МПК цефазолина при увеличении стафилококковой биомассы [143]. Инокулюм эффект ассоциирован с неблагоприятными клиническими исходами, и в частности, при бактериемиях, когда цефазолин не приводит к полной эрадикации патогена [144, 145]. В работе Carvajal и соавт. [146] было показано, что феномен CzIE проявлялся у 40% бактериемических изолятов MSSA и был связан с разными вариантами бета-лактамаз, и в особенности с аминокислотными заменами в положениях A9V, E112A и G145E. Стоит отметить, что данная работа была проведена в Латинской Америке, где препаратом выбора для лечения стафилококковых бактериемий является цефазолин. В этом регионе частота обнаружения фенотипов с CzIE достаточно высокая. В настоящее время выявление стафилококковых бета-лактамаз не составляет особых сложностей [147, 148], однако быстрое выявление CzIE феномена затруднительно. В работе Rincon и соавт. [149] был предложен оригинальный экспресс-тест, основанный на предварительной инкубации тест-культур с ампициллином, с последующим добавлением нитроцефина. Появление красной окраски свидетельствовало о наличии эффекта CzIE.

У *S. aureus* описано три аллельных *tec* гена, это *tecA*, *tecB* и *tecC*, обуславливающих устойчивость ко всем бета-лактамам (за исключением цефтаролина и цефтобипрола). Наиболее распространенный ген *tecA*, встречающийся среди MRSA всех эпидемических кластеров: HA-MRSA, CA-MRSA и LA-MRSA. Ген *tecB* был описан в 2018 году в составе плазмиды в *bla*-опероне [150]. На сегодняшний день *tecB* практически не описывается. Ген *tecC* был впервые

описан в 2011 г. у изолята LA-MRSA LGA251, выделенного в 2007 г. [151] В настоящее время *tecC*-положительные изоляты спорадически описываются в Европе и Юго-Восточной Азии как при инфекциях у животных, так и у человека [152].

Как правило, *tec*-гены локализованы в SCC*tec* (исключение *tecB*), представляющих собой мобильные элементы – кассеты. На основании генетического строения описано 15 основных вариантов SCC*tec* I – XV [153-155] и множество различных подвариантов. Классификация SCC*tec* основана на их генетическом строении: наличии разных *Csr* рекомбиназ (*ccr*-complex), регуляторного комплекса *tec* (*tec*-complex), наличии дополнительных генетических элементов - инсерций, транспозонов, встроенных плазмид и дополнительных генов устойчивости к антибиотикам и солям тяжелых металлов. Размер SCC*tec* составляет 20–70 тыс. п.н., наиболее протяженный размер характерен для SCC*tec* III, наименьший размер описан среди SCC*tec* IV и SCC*tec* V. Гены *tec*-комплекса участвуют в прямой регуляции экспрессии *tecA(C)* по индуцибельному типу, *ccr*-комплекс участвует в мобилизации SCC*tec* [156, 157]. В регуляции экспрессии *tecA(C)* принимает также участие *bla*-оперон. Стоит обратить внимание, что, не смотря на возможность мобильности SCC*tec*, основной механизм распространения MRSA – клональный. Пожалуй, самый интригующий вопрос, связанный с MRSA, это происхождение SCC*tec* – элемента. Основная гипотеза связана с появлением SCC*tec* в геноме *S. aureus* посредством горизонтального переноса SCC-элементов от коагулазоотрицательных стафилококков – *Staphylococcus sciuri*, *S. vitulinus* и *S. fleuretti* [4, 158].

Регуляция *tecA*, а также фенотипическая экспрессия устойчивости, включая *tec*-независимую, находится под влиянием множества факторов микробной клетки. Генетические детерминанты, участвующие в этом процессе принято относить к дополнительным факторам – auxiliary factors. На сегодняшний день выделяют более 50 таких генов, мутации или изменение экспрессии которых влияет на чувствительность к бета-лактамам антибиотикам [6]. К их числу относятся гены, принимающие участие непосредственно в биосинтезе клеточной стенки на разных этапах: гены биосинтеза мономеров пептидогликана (*murABCDEFGHI*, *glmS*, *glmM*, *femXAB*, *glyS*, *ftsW*); пенициллинсвязывающие белки (*pbp1*, *pbp2*, *pbp4*); гены биосинтеза тейхоевых и липотейхоевых кислот (*tarABDLIOS*, *ItaS*); компоненты дивисомы (*ftsA*, *ftsZ*); глобальные клеточные регуляторы (*prsS*, *sigB*, *sarA*); белки, участвующие в фолдинге PBP2a (*prsA*, *htrA1*); генеральный метаболизм (*sucCD*, *gatD*). В свою очередь, некоторые факторы участвуют в формировании устойчивости у MSSA и увеличению МПК к бета-лактамам у MRSA. К их числу можно отнести мутации в *relA*, что приводит к гиперэкспрессии молекул алармонов (гуанозинтетрафосфатов, ppGpp) [159, 160]. Алармоны являются сигнальными молекулами, отвечающими на стрессовое воздействие клетки. В свою очередь алармоны также

вливают и на увеличение уровня экспрессии *tecA*. Амплификация *SCC_{tec}* может приводить к увеличению устойчивости [161]. Появление мутаций в глобальных регуляторных генах, *ropB*, *ropC* или *agr* приводит к увеличению устойчивости [162]. Изменение экспрессии *dlt*-оперона, участвующего в реакции модификации-присоединения остатков аланина к тейхоевым кислотам, мутации в протеазах *clpPX*, пептидогликан-гидролазе *lytH* также рассматриваются факторы увеличения устойчивости [6].

1.5.1. Фенотипы «исключения»: чувствительность MRSA к бета-лактамам (OS-MRSA) и устойчивость MSSA к оксациллину (BORSA, MODSA)

В 1992 г. Hiramatsu и соавт. впервые описали *tecA*-положительные *S. aureus*, демонстрирующие низкие значения МПК к метициллину, которые были названы "Borderline-Resistant Methicillin-Resistant *S. aureus*" [163]. В конце 1990 – 2000 гг. в различных работах по изучению механизмов устойчивости к бета-лактамам у *S. aureus* такие фенотипы были описаны более подробно, и в настоящее время принято использовать устоявшийся термин оксациллин-чувствительные метициллинрезистентные *S. aureus* (Oxacillin-Susceptible Methicillin-Resistant *S. aureus*, OS-MRSA) [164, 165]. К OS-MRSA относят изоляты, несущие гены *tec*-типа, но проявляющие фенотипическую чувствительность к оксациллину (МПК оксациллина ≤ 2 мкг/мл), при этом к цефокситину может детектироваться как устойчивость, так и чувствительность. Частота встречаемости OS-MRSA колеблется в диапазоне 1 – 30% [7]. Высокая вероятность определения ложной чувствительности к бета-лактамам и, как следствие, назначение неадекватной антибактериальной терапии представляют главную опасность распространения OS-MRSA. В литературе описаны клинические случаи с неблагоприятным исходом у пациентов, у которых были выделены OS-MRSA, с изначально неправильной определенной чувствительностью к антибиотикам [166]. На сегодняшний день OS-MRSA считаются сложно выявляемыми фенотипами в рутинной лабораторной практике и относятся к группе микроорганизмов с молчащими механизмами устойчивости [167]. В 2018 году Американской организацией FDA (Food and Drug Administration) было опубликовано предупреждение об опасности распространения MRSA, проявляющих *in vitro* чувствительность к бета-лактамам [8]. Такое предупреждение было основано на выявлении *tecA*-положительных *S. aureus*, но не детектируемых на распространенных бактериологических анализаторах - Vitek 2™, MicroScan WalkAway™, и Phoenix™. Наиболее эффективный способ выявления таких фенотипов — это использование ПЦР на распространенные гены *tecA* или *tecC*. Фенотипы OS-MRSA не имеют строгой ассоциации с какими-либо клонами, за исключением некоторых

сиквенс-типов, часто характеризуются чувствительностью к не бета-лактамам антибиотикам и наличием *SCCmec* IV или V типа и преимущественно представлены как CA-MRSA. Эти особенности больше характерны для MSSA, нежели чем для MRSA. Существует предположение, что OS-MRSA является стадией фенотипической эволюции MRSA от «pre-MRSA» [5]. По географии распространения OS-MRSA описаны во многих странах: в США [168, 169], Бразилии [170], Великобритании [171, 172], странах Европы [173, 174], Африки [175], в Иране [176], Индии [177], и Китае [178-180]. Помимо человека, OS-MRSA выделяются от домашних животных [181], крупного рогатого скота [182], в продуктах питания [183-185]. Наиболее доминирующий клон OS-MRSA в Китае и Тайване – ST59, в Африке – ST88, в других регионах описаны разные генетические линии: ST1, ST2, ST5, ST8, ST121, ST89, ST22, ST45, и ST30.

В 1980-х годах впервые были описаны *S. aureus* с устойчивостью к бета-лактамам, но не имеющих гена *mecA*, *SCCmec*. Такие фенотипы были названы Borderline oxacillin-resistant *S. aureus* (BORSA). BORSA фенотипы характеризуются повышением МПК к пенициллиназа-стабильным бета-лактамам (метициллин, оксациллин, цефазолин) в пределах 2 – 16 мкг/мл [186]. Гиперпродукция стафилококковой бета-лактамазы – это один из первых описанных механизмов, приводящих к быстрому гидролизу пенициллина и медленному гидролизу пенициллиназа-стабильных антибиотиков (оксациллина) [187]. При добавлении ингибитора, например клавуланата, блокирующего пенициллиназу, BORSA становятся чувствительными к бета-лактамам антибиотикам. Однако, если механизм не связан с гиперпродукцией бета-лактамазы, то исторически такие стафилококки называли Modified *S. aureus* (MODSA) [188]. MODSA фенотипы характеризуются устойчивостью к пенициллиназа-стабильным бета-лактамам в следствие мутаций в разных пенициллинсвязывающих белках, и в особенности, в RBP4. Частота выявления BORSA варьирует в пределах 1 – 10% [186]. Однако, в некоторых работах отмечается необычно высокая частота выявления – до 50%, по всей видимости, связанная с клональным распространением в конкретном стационаре [189]. В недавнем исследовании Sawhney и соавт. [190] была описана вспышка, связанная с BORSA фенотипами в отделении неонатальной реанимации, которая изначально была неправильно определена как вспышка MRSA. Авторы выявили, что из 42 устойчивых к бета-лактамам изолятов, 33 были *mec*-отрицательными. Данные BORSA изоляты относились к разным клонам и характеризовались разными механизмами устойчивости [190]. Чаще всего BORSA выявляются у носителей, при внебольничных инфекциях, а также выделяются и у животных. BORSA могут быть выделены при различных формах стафилококковых инфекций, включая эндокардит и сепсис, но наиболее часто описываются при дерматологических патологиях [191].

Использование высоких доз бета-лактамов для лечения инфекций, вызванных BORSA, при МПК оксацилина 2–16 мкг/мл, нецелесообразно и приводит к неэффективной антибактериальной терапии, что подтверждается клиническими наблюдениями [192].

Главная опасность распространения BORSA – это возможная неправильная идентификация профиля чувствительности к бета-лактамам антибиотикам, что может отразиться в неадекватном назначении соответствующих антибиотиков. Эффективность доступных методов лабораторной детекции BORSA различается. Цефокситин в отношении выявления BORSA фенотипов характеризуется низкой чувствительностью и специфичностью. Применение селективных хромогенных сред позволяет с высокой чувствительностью выявлять BORSA фенотипы, однако специфичность при дифференциации от MRSA может составлять всего 50% [193]. Наиболее приемлемыми подходами для дифференциации фенотипов MRSA, MSSA, OS-MRSA и BORSA будут являться комбинации использования ПЦР или латекс-агглютинации для детекции *tes*-генов или PBP2a в совокупности с одновременным определением чувствительности к цефокситину и оксацилину.

1.5.2. Роль высоких внутриклеточных концентраций c-di-AMP в формировании устойчивости к антибиотикам, действующих на клеточную стенку

Впервые в эксперименте Corrigan и соавт. [33], в ходе сайт-направленного мутагенеза были получены мутанты *S. aureus*, неспособные к синтезу важнейшего компонента клеточной стенки - липотейхоевых кислот (ЛТК). Впоследствии авторы выращивали этих мутантов на двух типах питательных сред – среде, условия которой позволяли расти клеткам без ЛТК, и на обычной среде, где мутанты без ЛТК расти были не способны. Однако, в сериях экспериментов было отмечено, что некоторые мутанты без ЛТК все же образовывали колонии на обычной среде. Было выдвинуто предположение о наличии компенсаторного фактора, за счет которого выживали *S. aureus* без ЛТК на минимальной среде. Такой фактор впоследствии был обнаружен – это мутации в гене *gdpP*. Еще более интересным в этой работе стало открытие, что такие клетки стали проявлять устойчивость ко многим химическим агентам, действующим на клеточную стенку, включая бета-лактамы антибиотики. Ген *gdpP* (GGDEF domain protein containing phosphodiesterase) кодирует специфическую фосфодиэстеразу, которая разрушает внутриклеточные сигнальные молекулы циклических ди-аденозинмонофосфатов (c-di-AMP). В свою очередь c-di-AMP синтезируются диаденилатциклазой *dacA* (diadenylate cyclase activity) [10]. Для многих представителей *Bacillota* (*Firmicutes*) вторичные сигнальные молекулы являются обязательными эссенциальными компонентами, регулируемыми многие процессы

метаболизма бактерий. Так, c-di-AMP обеспечивают контроль осмотического баланса, интенсивности центрального метаболизма, контроль репараций при повреждении ДНК, формирования биопленок и образования спор, контроль вирулентности у некоторых видов [194]. На сегодняшний день у *S. aureus* хорошо изучена роль c-di-AMP в обеспечении калиевого баланса и поступления в клетку осмопротекторов (бетаина, карнитина, аминокислот), однако, несмотря на это, интенсивно продолжаются поиски новых рецепторов для c-di-AMP [34]. Система DacA – GdpP осуществляет синтез и разрушение сигнальных молекул и соответственно принимает участие в поддержании гомеостаза c-di-AMP. Мутации и делеции в *gdpP* способствуют внутриклеточному накоплению молекул c-di-AMP, что приводит к изменению работы многих систем, а также формированию устойчивости к препаратам, действующим на клеточную стенку, включая бета-лактамы антибиотики. Устойчивость к бета-лактамам вследствие мутаций или инактивации *gdpP* описана как у MSSA [195, 196], так и MRSA [197-199]. Пока остается неизвестным, как высокие внутриклеточные концентрации c-di-AMP связаны с формированием устойчивости к бета-лактамам. Выдвигается несколько гипотез, в частности, взаимодействие с пенициллинсвязывающими белками с последующим изменением их белковой структуры (посттрансляционная модификация) или изменением тургора клетки и структуры пептидогликана. У разных представителей грамположительных бактерий высокие внутриклеточные концентрации c-di-AMP (за счет мутаций в *gdpP*) опосредуют различные биологические изменения в клетках. Например, у стрептококков происходит увеличение экспрессии факторов вирулентности; у *Lactococcus lactis* - повышение кислотоустойчивости и чувствительности к температуре; у *Mycobacterium smegmatis* происходит накопление жирных кислот, что приводит к изменению клеточной морфологии [10]. Мутации в эссенциальном белке DacA приводят к снижению уровня c-di-AMP и, как следствие, приводят к восстановлению чувствительности к препаратам, действующим на клеточную стенку [200]. Без вторичных мессенджеров c-di-AMP клетка погибает. По этой причине DacA может рассматриваться как мишень для создания новых антибактериальных препаратов [10]. Стоит еще раз подчеркнуть, что детальный молекулярный механизм, объясняющий влияние высоких внутриклеточных концентраций c-di-AMP на формирование устойчивости к препаратам, действующим на различные мишени в составе клеточной стенки, остается неизвестным.

1.6. Устойчивость к основным анти-MRSA антибиотикам

В последние десятилетия в клиническую практику внедрены эффективные антибиотики для лечения инфекций, вызванных MRSA, и к настоящему времени, помимо ванкомицина,

доступны цефтаролин, даптомицин, тигециклин, оксазолидиноны и липогликопептиды. Далее рассмотрены ключевые особенности механизмов резистентности к данным антибиотикам.

Ванкомицин остается основным препаратом для лечения инфекций, вызванных MRSA. Высокий уровень устойчивости (МПК > 16 мкг/мл) характерен для ванкомицин резистентных *S. aureus* (Vancomycin-resistant *S. aureus*, VRSA) [201]. Механизм устойчивости VRSA связан с генами *vanAB* – основными детерминантами устойчивости к гликопептидам у энтерококков [202]. В настоящее время VRSA не имеет глобального распространения [203]. Другой механизм – это изменение структуры клеточной стенки с накоплением большого количества свободных остатков dALA-dALA, которые являются молекулярными ловушками для ванкомицина. Такой механизм выявляется у *S. aureus* со сниженной чувствительностью ванкомицину (Vancomycin intermediate *S. aureus*, VISA) с МПК 2 – 16 мкг/мл. Формирование множества мутаций, включая мутации в регуляторных генах, участвующих в биосинтезе пептидогликана, являются основными механизмами. Как правило, VISA ассоциированы с утолщением клеточной стенки [204]. Изоляты MRSA с МПК ≥ 2 мкг/мл ассоциированы с высоким риском неудовлетворительной антибиотикотерапии [205, 206]. Процесс появления VISA проходит с формированием гетерорезистентности (heteroresistant VISA, hVISA). Гетерорезистентность – феномен, возникающий, когда в популяции бактерий, относящихся к одному виду и клону, появляется небольшое количество клеток с разным уровнем чувствительности, от минимальных значений МПК до высоких. Процесс формирования VISA включает многоступенчатое накопление мутаций, изменение транскриптомного профиля и связан с выраженной гетерогенностью [207]. По результатам работы Hiramatsu и соавт. [204], можно выделить еще два фенотипа, это: pre-hVISA, предшественник hVISA и sVISA (slow VISA). Нестабильный фенотип pre-hVISA характеризуется наличием субпопуляции, имеющей ключевые мутации, и легко реверсирует либо в hVISA, либо в чувствительный вариант. sVISA – это фенотип, проявляющий высокий уровень устойчивости (МПК = 8 мкг/мл и выше), но с очень низкой скоростью роста [208, 209]. Обнаружение hVISA или VISA стандартными микробиологическими методами остается весьма проблематичным, а «золотым стандартом» является популяционный анализ (Population analysis profile, PAP). В мета-анализе Shariati и соавт. [210] по исследованию частоты встречаемости VRSA/VISA фенотипов, включающий 155 публикаций с 2000 – 2019 гг. и охватывающий более 75000 изолятов, собранных и описанных на всех континентах, были получены следующие результаты. Суммарно, доля VRSA и hVISA/VISA фенотипов не превышала 2,5% и 6%, соответственно. Однако, авторы отмечают тенденцию к увеличению частоты встречаемости данных фенотипов в последние несколько лет. Чаще всего VRSA/VISA описываются в Америке и Азии [210].

Липогликопептиды — далбаванцин, оритаванцин и телаванцин представляют собой полусинтетические производные гликопептидов (ванкомицина и тейкопланина). Данные антибиотики имеют ряд преимуществ над ванкомицином. Во-первых, это двойной механизм действия – связывание с остатками dALA-dALA и, за счет наличия боковой липидной цепи, взаимодействие с мембраной. Во-вторых, оритаванцин связывается с пептидным мостиком, что позволяет преодолевать устойчивость, связанную с наличием *vanA* гена [211, 212]. Все три представителя липогликопептидов остаются активными *in vitro* против штаммов VISA и hVISA [213]. Устойчивость к липогликопептидам среди *S. aureus* пока остается редким явлением [214]. Однако, несмотря на это, описываются клинические случаи формирования устойчивости к липогликопептидам на фоне неудовлетворительной терапии ванкомицином [215] и/или даптомицином [216].

Даптомицин – единственный антибиотик из группы липопептидов, одна из альтернатив ванкомицину для лечения тяжелых инфекций, таких как бактериемия и эндокардит [217]. Мишень действия этого антибиотика – образование кальций-зависимых поровых каналов в цитоплазматической мембране грамположительных бактерий. У *S. aureus* описано несколько механизмов устойчивости, большинство из них связаны с нарушением электрохимического взаимодействия молекулы антибиотика и мембраны посредством изменения метаболизма компонентов мембраны. Устойчивость к данному антибиотику регистрируется крайне редко и не имеет глобального распространения. Тем не менее, определенные опасения вызывает перекрестная устойчивость с ванкомицином и липогликопептидными антибиотиками. Основным механизмом устойчивости к даптомицину связан с изменением наружного заряда цитоплазматической мембраны и ее физико-химических свойств [218]. Мутации в фосфатидилглицерол-лизилтрансферазе (*mprF*) ассоциированы с устойчивостью к даптомицину. Данный фермент участвует в биосинтезе мембраны и транспозиции фосфолипидов из цитоплазмы в билипидный слой мембраны. Мутации в *mprF* приводят к увеличению положительного заряда внешнего листка мембраны, что снижает электрохимическое взаимодействие с даптомицином. Ген *mprF* имеет множество полиморфизмов, но мутации опосредуют устойчивость только в определенных доменах. Мутации в фосфотидиотрансферазе (*pgsA*) и кардиолипин – синтазе (*cls2*) способствуют снижению количества фосфатидилглицерола, что приводит к изменению физико-химических свойств (текучести) мембраны, что в значительной степени снижает взаимодействие молекул даптомицина. Среди даптомицин-устойчивых изолятов также выявляются мутации в регуляторных генах: *walk* (*yucG*), *rpoB*, *rpoC*. Формирование мутаций в этих генах ведет также к снижению чувствительности к ванкомицину.

Цефтаролин, первый цефалоспорин с анти-MRSA активностью, был одобрен FDA для клинического использования в 2010 году для лечения осложненных форм инфекций кожи и мягких тканей. В рандомизированных контролируемых клинических испытаниях цефтаролин не уступал препаратам сравнения, в частности, ванкомицину [219, 220]. Цефтаролин активен против штаммов MRSA, поскольку имеет высокую аффинность связывания с PBP2a, в отличие от обычных бета-лактамов [221]. Цефтаролин проявляет синергизм с даптомицином, что позволяет использовать данную комбинацию для лечения различных жизнеугрожающих инфекций (бактериемия, инфекционный эндокардит), вызванных *S. aureus* [222, 223]. В *in vitro* исследованиях наблюдался эффект качелей (seesaw effect): при формировании устойчивости к ванкомицину, даптомицину и тейкопланину было показано, что МПК цефтаролина наоборот снижалось [224]. По результатам многоцентровых исследований установлено, что устойчивость среди MRSA регистрируется редко, за исключением единичных исследований, где уровень изолятов с сниженной чувствительностью (МПК 2 – 4 мкг/мл) составлял 17 – 20% [225]. В России, по данным ресурса AMRmap [226], количество изолятов *S. aureus* с МПК ≥ 2 мкг/мл составляло 4,5%, в исследовании [227] среди циркулирующих в России MRSA 5% имели сниженную чувствительность к цефтаролину. Мутации в *tesA* и промоторной области пенициллинсвязывающего белка Pbp4 относятся к основным механизмам устойчивости [228, 229], которые чаще всего обнаруживаются среди определенных генетических линий – ST228, ST239 и ST5 [230-233]. Цефтаролин имеет высокую аффинность к следующим пенициллинсвязывающим белкам: Pbp1 – Pbp3, Pbp2. Белок Pbp4, напротив, характеризуется низкой аффинностью, в этой связи мутации в кодирующей его части и промоторе приводят к повышению МПК [234, 235].

На сегодняшний день оксазолидиноны (линезолид и тедизолид) широко используются для лечения тяжелых инфекций, вызванных MRSA. Можно выделить несколько основных механизмов устойчивости к линезолиду – это экзогенное метилирование участка связывания оксазолидинонов в 23S рРНК за счет плазмидного гена *cfi*. Вторым механизмом связан с формированием мутаций в 23S рРНК. И наконец, третий механизм – эффлюкс (*optrA*). У MRSA преимущественно описываются первые два механизма. Первый описанный клинический изолят MRSA, устойчивый к линезолиду, характеризовался наличием мутации G2576T во всех пяти копиях гена 23S рРНК [236]. Хотя мутации в генах, кодирующих рибосомальные белки L3 и L4, встречаются реже, они также придают устойчивость к линезолиду. Продукт гена *cfi* метилирует участок рибосомы в позиции A2503, блокируя сайт связывания. Ген *cfi* распространяется в составе мобильных генетических элементов и связан со вспышками устойчивости к линезолиду у *S. aureus* во всем мире [237]. Несколько видов бактерий в комменсальной флоре человека и

домашнего скота содержат ген *cfr*, служащий резервуаром устойчивости к лекарственным средствам с потенциалом распространения. Эффлюкс (*optrA*), впервые описанный в Китае среди энтерококков, также обнаруживается и среди клинических изолятов MRSA, нередко совместно с *cfr*-геном или его аллелью *cfr(D)* [238, 239]. Существует предположение, что использование флорфеникола в животноводстве в Китае могло привести к появлению как *cfr*, так и *optrA* генов [240]. Другой новый ген, *poxtA*, был впервые идентифицирован у изолята MRSA. *PoxtA* имеет структурное сходство с *optrA* и придает устойчивость *in vitro* к оксазолидинонам, фениколам и тетрациклинам [241]. Глобально устойчивость к оксазолидинонам среди *S. aureus* встречается крайне редко, а появление носит характер локальных вспышек.

Тигециклин из класса глицилциклинов способен преодолевать устойчивость к тетрациклинам, обусловленную *tet*-генами [242]. Устойчивость среди *S. aureus* не обнаруживается, имеются только единичные сообщения. Среди описанных механизмов устойчивости можно отметить мутации в неспецифическом мембранном насосе *MerA* и мутации в регуляторе транскрипции *MerR* [243]. Помимо этого описаны мутации в гене *rpsJ*, кодирующем рибосомальный белок S10 [244]. В последние несколько лет в медицинскую практику были внедрены еще два антибиотика, омадациклин и эравациклин, эффективно преодолевающие устойчивость, связанную с *tet*-генами. Оба данных препарата успешно применяются для лечения инфекций, вызванных MRSA. Гетерорезистентность описана для омадациклина [245].

В систематизированном обзоре и мета-анализе Shariati и соавт. [246], включающем крупные многоцентровые исследования, отмечалось, что частота встречаемости устойчивости к линезолиду, тигециклину и даптомицину у MSSA и MRSA не превышает 0,1%.

1.7. Антибиотикотолерантность у *S. aureus*

Толерантность это одна из стратегий ухода от действия антибиотиков, которую реализует *S. aureus*. В 1944 г. Bigger впервые описал феномен выживания стафилококков под действием высоких концентраций пенициллина и предложил термин «персистеры» [247]. Более подробно толерантность к пенициллину у *S. aureus*, как способность переживать очень высокие концентрации пенициллина без изменения уровня МПК, была описана в 1977 в работе Sabath и соавт. [248]. Авторы использовали соотношение уровня МПК и минимальной бактерицидной концентрации (МБК): МБК/МПК, и выявили, что некоторые изоляты характеризовались очень

выраженной разницей, которая составляла >32 . Стоит отметить, что соотношение МБК/МПК достаточно долго использовалось для выявления толерантности у разных бактерий. На сегодняшний день толерантность у *S. aureus* описана для многих бактерицидных антибиотиков – фторхинолонов, гентамицина, бета-лактамов, ванкомицина, даптомицина и рифампицина. В основе толерантности лежит универсальное для микроорганизмов явление – увеличение периода времени, необходимого для киллинга бактериальной популяции. Данный механизм остается до конца не изученным, однако многие экспериментальные исследования показывают, что в его основе лежит стратегия замедления роста и снижение метаболической активности бактериальной клетки [15]. Наибольший интерес представляет вопрос о том, насколько толерантность – универсальное явление в отношении действия разных групп антибиотиков. Не до конца изучен вопрос, может ли толерантность проявляться к действию только одного препарата, множества или всех?

Бактерицидные антибиотики наиболее эффективны в отношении бактериальных клеток, находящихся в экспоненциальной фазе роста с активным делением и максимальным уровнем метаболизма. Напротив, для покоящихся форм эффективность антибиотиков будет ниже. Для инициализации процесса снижения клеточной активности клетки *S. aureus* реализуют разные пути [249, 250]. Низкий внутриклеточный уровень молекул АТФ может представлять собой один из механизмов, который ассоциирован с толерантностью к антибиотикам у *S. aureus*. Дефицит АТФ замедляет или останавливает многие клеточные процессы и тем самым защищает бактериальную клетку от бактерицидного действия антибиотиков. Помимо этого, у *S. aureus* описаны и другие механизмы [251]. Делеция протеолитической системы Clp, участвующей в деградации нескольких антитоксинов в системах токсин/антитоксин и в регуляции стресс-реакций, а также в цикле трикарбоновых кислот связана с повышенным уровнем толерантности *S. aureus*. Работа токсин/антитоксиновых систем (MazF/MazE) также влияет на увеличение выживаемости клеток при воздействии бета-лактамных антибиотиков или ванкомицина. Увеличение алармонов (гуанозинтетрафосфатов, ppGpp), синтезируемых RelA, в ответ на прямой стресс, также ассоциировано с толерантностью [252]. Отсутствие аутолизиса приводит к увеличению выживаемости при воздействии бета-лактамных антибиотиков у *S. aureus*. Недавние исследования показали, что дефицит регуляторов внеклеточных муреин-гидролаз (CidABC и LrgA), связанных с отсутствием аутолиза, повышает выживаемость. Более высокий уровень толерантности наблюдался у мутантов с дефектами в регуляторе quorum-sensing, системе Agr. Дисфункция Agr может способствовать формированию толерантных фенотипов за счет повышенного образования биопленок или за счет секретируемых факторов, влияющих на действие антибиотиков, таких как гентамицин или даптомицин. Увеличение внутриклеточного неорганического фосфата и полифосфатов за счет мутаций в гене *pitA*

связано с увеличением толерантности к даптомицину [253]. Предположительно внутриклеточное увеличение полифосфатов приводит к изменению работы *relA*, транскрипции и биосинтезу мембранных фосфолипидов. Увеличение внутриклеточных мессенджеров c-di-AMP также способствует толерантности к бета-лактамам. Мутации в генах синтеза тРНК, в частности, в изолейцин-тРНК синтазе (*IleS*), приводят к снижению и нарушению трансляции, изменению биосинтеза клеточной стенки и аутолиза. Фенотипически это проявляется толерантностью к бета-лактамам, ванкомицину и рифампицину. Мутации в ферментах цикла Кребса и снижение метаболической активности приводят к толерантности к действию гентамицина, ципрофлоксацина и бета-лактамов. Таким образом, разные механизмы могут обуславливать толерантность у *S. aureus*. Все перечисленные механизмы были получены и изучены преимущественно в экспериментальных работах *in vitro*. Клиническое значение толерантности на сегодняшний день неоднозначно и требует более детального изучения. У *S. aureus* преимущественно были описаны клинически верифицированные неудовлетворительные клинические исходы (осложнения, хронический процесс, отсутствие эффекта от использования назначенной терапии), связанные с толерантностью к ванкомицину, бета-лактамам и даптомицину [249, 254].

ГЛАВА 2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1. Фенотипические методы исследований

2.1.1. Коллекция бактериальных культур

В работу включена коллекция *tesA*-положительных MRSA изолятов (n=853), собранная в период 2011 – 2021 гг. в 50 медицинских центрах (многопрофильных и специализированных стационарах) в 14 городах России (Приложение 4). Внутрибольничные изоляты MRSA (HA-MRSA, n=659) были выделены при различных стафилококковых инфекциях и осложнениях, развившихся в период пребывания пациентов стационаре. В эту же группу были включены изоляты MRSA, выделенные из носоглотки у пациентов, пребывавших в стационаре более 48 часов, у пациентов с COVID-19, а также изоляты, выделенные от носителей среди медицинского персонала. Группа изолятов CA-MRSA (n=194) была собрана в период 2015 – 2019 гг. при исследованиях на назальное носительство *S. aureus* у взрослых – сотрудников сетевых универсальных магазинов в Москве (n=4053 мазков); у детей, обратившихся в амбулаторно-поликлиническое отделение ФГБУ ДНКЦИБ ФМБА России (Санкт-Петербург), без признаков бактериальных и стафилококковых инфекций в рамках рутинного бактериологического обследования на носительство *S. aureus* и иных патогенных микроорганизмов (n=21967 мазков). Помимо этого, в группу CA-MRSA вошли изоляты, выделенные из носоглотки у взрослых, которые обращались за различной амбулаторной медицинской помощью в различные медицинские центры, без признаков бактериальных инфекций. До проведения различных исследований все изоляты хранились в музейной коллекции бактериальных культур ФГБУ ДНКЦИБ ФМБА России при температуре не выше -70°C в 1,5 мл триптиказо-соевого бульона TSB (Bio-Rad, Франция) с глицерином (30% от объема). Реидентификацию восстановленных суточных культур *S. aureus*, выращенных на кровяном агаре, проводили с помощью MALDI-TOF MS Microflex LT (Bruker, Германия). Принадлежность к изолятов к MRSA подтверждали методом ПЦР по наличию гена *tesA*.

2.1.2. Оценка чувствительности к антибиотикам

Антибиотикочувствительность коллекции изолятов MRSA оценивали методом серийных микроразведений с определением минимальной подавляющей концентрации (МПК) в бульоне Cation-Adjusted Mueller Hinton (CAMH) II Broth («Becton Dickinson», США) по стандарту ISO

20776-1:2019. Интерпретацию результатов осуществляли в соответствии с рекомендациями EUCAST (версия 12.0, 2022) и CLSI (версия M100-Ed32, 2022), используя клинические критерии (clinical breakpoint), а также микробиологические критерии epidemiological cut-off (ECOFF). Постановку опыта проводили в 96-луночных круглодонных планшетах (НПО «Медполимер», Санкт-Петербург). Список использованных антибактериальных препаратов представлен в Таблице 1. Для определения чувствительности к даптомицину в среду был добавлен CaCl_2^{2+} в конечной концентрации 50 мг/л. Для определения чувствительности к липогликопептидам в среду был добавлен Tween®80 (P80) («Sigma-Aldrich», Германия) в конечной концентрации 0,002%. Стоковые растворы антибиотиков хранили при $-80\text{ }^\circ\text{C}$ в течение 6 месяцев, рабочие растворы использовали *ex tempore*. В качестве контрольных культур были использованы *S. aureus* ATCC 29213 и *S. aureus* Mu50 (ATCC 700699). Для обработки массивов данных МПК использовали программу WHONET версии 5.6. (<https://whonet.org/software.html>) с получением следующих характеристик: распределение и диапазон МПК, МПК₅₀, МПК₉₀, средняя геометрическая МПК (МПК_{СГ}), количество и процент чувствительных изолятов (S), устойчивых изолятов (R), изолятов с промежуточной чувствительностью (I).

Таблица 1 – Список использованных антибактериальных соединений

Название	Сокращенное название	Производитель	Концентрация стоковых растворов, мкг/мл	Диапазон разведений антибиотиков, мкг/мл
Оксациллин	OXA	«Molekula», Англия	20480	0,016 – 512
Цефокситин	FOX	«Molekula», Англия	20480	1 – 512
Пенициллин	PEN	«Molekula», Англия	5120	0,008 – 128
Амоксициллин	AMX	«Molekula», Англия	5120	0,008 – 128
Меропенем	MER	«Molekula», Англия	5120	0,008 – 128
Клавуланат	CL	«Molekula», Англия	2000	0,004 – 64
Гентамицин	GEN	«Sigma-Aldrich», Германия	5120	0,016 – 128
Амикацин	AMK	«Molekula», Англия	2560	0,016 – 128
Эритромицин	ERY	«Molekula», Англия	5120	0,016 – 128
Клиндамицин	CLI	«Molekula», Англия	2560	0,016 – 128
Ципрофлоксацин	CIP	«Molekula», Англия	5120	0,016 – 256

Левифлоксацин	LEV	«Molekula», Англия	5120	0,016 – 256
Моксифлоксацин	MXF	«Molekula», Англия	2560	0,008 – 64
Тетрациклин	TET	«Molekula», Англия	5120	0,016 – 128
Мупиноцин	MUP	«Molekula», Англия	1280	0,016 – 128
Фузидиевая кислота	FUS	«Molekula», Англия	1000	0,004 – 16
Триметоприм	SXT	«Molekula», Англия	2560	0,016 – 32
Сульфаметоксазол		«Molekula», Англия	48640	0,3 – 608
Даптомицин	DAP	«Molekula», Англия	2000	0,004 – 16
Рифампицин	RIF	«Molekula», Англия	1000	0,004 – 16
Цефтаролин	CPT	«AstraZeneca», Англия	1000	0,03 – 32
Ванкомицин	VAN	«Molekula», Англия	2000	0,03 – 32
Тейкопланин	TEC	«Biosynth Carbosynth», Англия	2000	0,03 – 32
Линезолид	LNZ	«Sigma-Aldrich», Германия	1280	0,016 – 32
Тедизолид	TDZ	«Bayer», Германия	1280	0,004 – 16
Тигециклин	TGC	«Molekula», Англия	1000	0,004 – 16
Телаванцин	TLV	«Biosynth Carbosynth», Англия	1000	0,004 – 16
Далбаванцин	DAL	«Biosynth Carbosynth», Англия	1000	0,004 – 16
Оритаванцин	ORI	«Biosynth Carbosynth», Англия	1000	0,004 – 16
Хлорамфеникол	CHL	«Molekula», Англия	1000	16 – 32

Для оценки чувствительности к бета-лактамам антибиотикам, ванкомицину, даптомицину и цефтаролину дополнительно были использованы следующие методы: диско-диффузионный метод (ДДМ) с цефокситином (диск 30 мкг), оксациллином (1 мкг), меропенемом (10 мкг); метод градиентной диффузии в агар (ГДМ, производители: ETEST®, bioMérieux и Liofilchem, США); использование бактериологического анализатора VITEK® 2 с картами AST-GP67 (bioMérieux, Франция); использование хромогенной среды Brilliance MRSA 2 Agar® (Oxoid, Великобритания); использование методов ГДМ и ДДМ на агаре Мюллера-Хинтона (Bio-Rad, США) с добавлением 2% NaCl. Постановку осуществляли также по

стандарту ISO 20776-1:2019, интерпретацию результатов в соответствие с рекомендациями EUCAST (2022) и CLSI (2022).

2.1.3. Популяционный анализ

Популяционный анализ (PAP) проводили в микро-варианте по методике Pfeltz и соавт. [255] на агаре Brain-Heart Infusion, BHI (Bio-Rad, France). Использовали ряд разведений ванкомицина в агаре от 0 до 16 мкг/мл (10 разведений): 0-0,5-1-1,5-2-3-4-6-8-12 и 16 мкг/мл. Для оксациллина использовали следующий ряд разведений: 0-0,06-0,125-0,25-0,5-1-2-4-8-16-32 мкг/мл. Стартовый инокулюм готовился по шкале McFarland со значением мутности 2,5. Инокулюм разводили с шагом 1 log в одном миллилитре, таким образом для каждой тестируемой бактериальной культуры готовили 6 разведений: (-1) – (-6). На каждое разведение антибиотика в агаре добавляли три разведения инокулюма. Разведения инокулюма, которое добавлялось для конкретной концентрации антибиотика, подбирались эмпирически таким образом, чтобы в каждом секторе можно было посчитать колонии (от 3 до 50 колоний). На каждое разведение антибиотика добавляли по три сектора инокулюма в объеме 10 мкл. Таким образом, на одно разведение антибиотика (рис. 1) добавлялось 9 секторов трех разведений инокулюма. Подсчет выросших колоний проводили только в тех разведениях, где количество колоний было в диапазоне 3 – 50 колоний на сектор. Количество колоний переводили в log КОЕ/мл, используя формулу:

$$\log ((n(\text{колоний}) \times \text{ФАКТОР РАЗВЕДЕНИЯ})/0,01).$$

Учет результатов проводили в течение 24 – 72 часов. Оценивали следующие параметры: зависимость роста клеточной биомассы (log КОЕ/мл) от концентрации антибиотика и площади под кривой (Area under curve, AUC). Параметр AUC рассчитывали методом трапеций. Для предсказания фенотипа VISA и гетерорезистентности к ванкомицину рассчитывали соотношение PAP/AUC относительно референсного штамма Mu50 по формуле:

$$\text{AUC}_{\text{тестируемый штамм}}/\text{AUC}_{\text{Mu50}}.$$

Интерпретацию результатов осуществляли исходя из следующих критериев: при получении PAP/AUC < 0,9 фенотип оценивали как VSSA (vancomycin susceptible *S. aureus*), при PAP/AUC > 0,9 – как VISA [256]. Для оксациллина гетерорезистентность оценивали следующим образом. Отмечали минимальную неингибирующую концентрацию (PAP-МНИК) на кривой PAP (изменение не более 2-х log) и максимальную ингибирующую концентрацию (PAP-МИК), при разнице между PAP-МНИК и PAP-МИК более 8 результат принимали за гетерорезистентность [257].

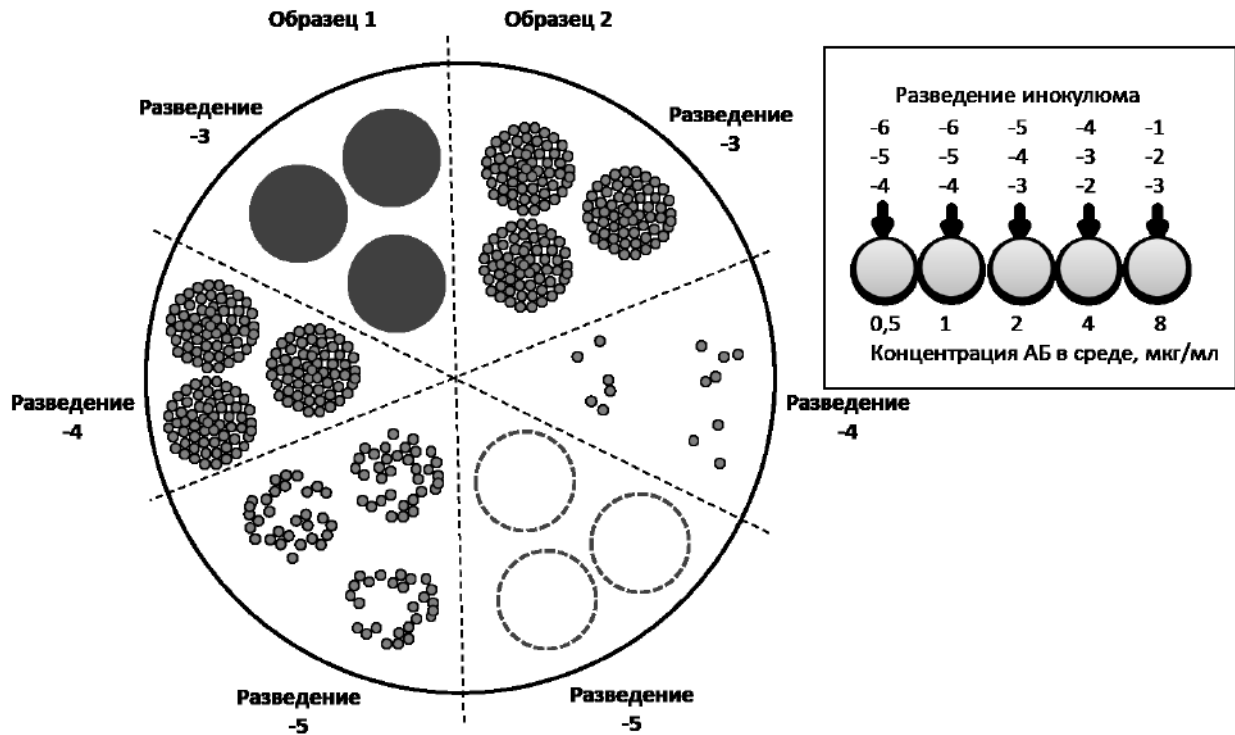


Рисунок 1 – Схема постановки PAP анализа и пример получения результатов. Для каждой концентрации антибиотика на каждый изолят готовили по три разведения (рисунок, рамка). После появления роста в виде мелких колоний через 24 – 72 часа в зоне, куда был закапан инокулюм, подсчитывали количество колоний. Например, для образца 1 на концентрации X мкг/мл в -5 разведении было подсчитано в трех зонах роста 30, 35 и 29 колоний соответственно, при -4 разведении затруднительно посчитать количество колоний, в -3 разведении – сплошной рост. Таким образом, для данного антибиотика на концентрации X количество колоний будет составлять 31 (среднее значение), что составляет с учетом разведения, 3×10^8 КОЕ/мл или $8,5 \log$ КОЕ/мл. Для образца 2 в -4 разведении количество колоний составляло 6, 5 и 3 (среднее 5), при -5 разведении роста не было, в -3 разведении подсчет колоний невозможен. Таким образом, на концентрации X количество колоний будет составлять $6,7 \log$ КОЕ/мл.

2.1.4. Селекция устойчивости при PAP-анализе с оксациллином

Получение субпопуляций после PAP-анализа осуществлялось прямым пересевом всех выросших колоний ($10^4 - 10^6$ КОЕ/мл) на максимальной концентрации оксациллина в агаре в жидкий бульон TSB (Bio-Rad, Франция), содержащий оксациллин в концентрации 16 и 32 мкг/мл. Затем образцы инкубировали в течение 48 часов. Для контроля колонии, выросшие на

среде без антибиотика, разводили до $10^4 - 10^6$ КОЕ/мл, и также инокулировали в бульон TSB с антибиотиком. Схема представлена на рис. 2.

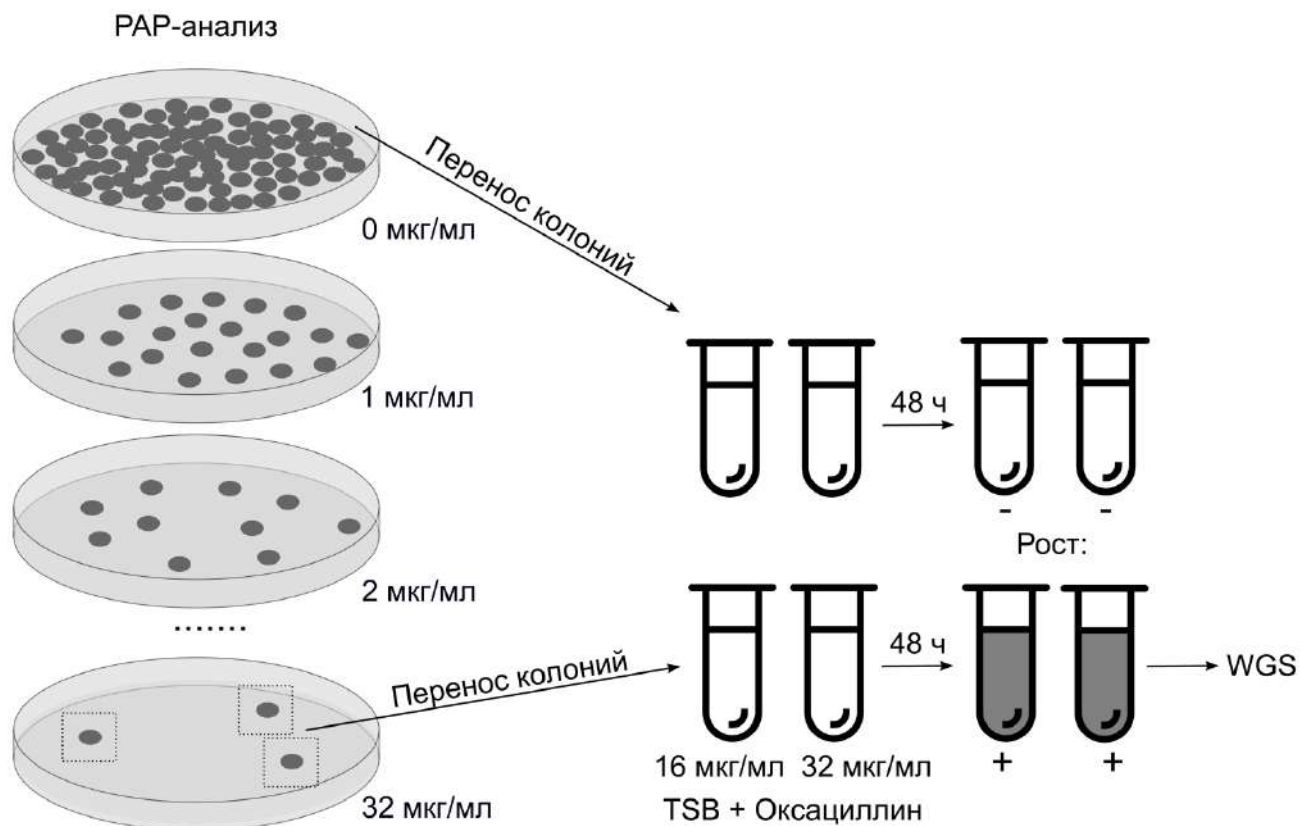


Рисунок 2 – Схема получения субпопуляций после RAP-анализа с оксациллином.

2.1.5. Оценка кинетики отмирания бактерий под действием антибиотиков («time-killing»)

Модель эксперимента «time-killing» была осуществлена по классической методике в течение 24-72 часового эксперимента. Использовали следующие бактерицидные антибиотики: ванкомицин, левофлоксацин, моксифлоксацин, гентамицин, даптомицин и оксациллин в конечной концентрации 16 мкг/мл. Из ночного инокулюма готовили взвесь исследуемых изолятов мутностью 2,4 – 2,5 McF, что составляло $\sim 6 \times 10^8$ КОЕ/мл в 15 – 35 мл физ. раствора. Далее в соотношении 1:10 в 50 мл бульона Мюллера-Хинтона (Bio-Rad, Франция) добавляли подготовленный инокулюм (конечная клеточная концентрация составляла $\sim 6 \times 10^7 - 1 \times 10^8$ КОЕ/мл). После этого делали высев на агар TSA с соответствующими разведениями из бульона для определения клеточной плотности (КОЕ/мл) перед началом эксперимента. Затем добавляли антибиотик в бульон в соотношении 1:50. Флаконы инкубировали в течение 24-72 часов при

37°C с периодическими посевами на агар TSA для подсчета КОЕ/мл. Всего было использовано 10 точек посева со следующим интервалом (часы): 0-3-6-9-14-18-24-38-48-72. Для подсчета колоний делали 10-кратные серийные разведения и наносили (10 мкл) на агар TSA с последующей инкубацией при 37°C в течение 24-48 ч. С каждой временной точки высевали по три разведения (и три по 10 мкл каждого из разведений). Подсчет колоний осуществляли при росте 5-50 колоний на точку 10 мкл зоны разведения. За MDK₉₉ (minimal duration of killing) принимали время, необходимое для киллинга 99,99% клеток (КОЕ/мл), что соответствовало снижению КОЕ/мл на ~3 – 4 логарифма. Долю живых клеток рассчитывали по следующему соотношению:

$$(\text{КОЕ/мл (до воздействия АБ)} / \text{КОЕ/мл (после воздействия АБ)}) * 100 = \% \text{ живых клеток.}$$

2.1.6. Оценка скорости роста

Относительную скорость роста (r , мин⁻¹), время удвоения клеток (мин), ЛАГ – фазу (мин) оценивали путем измерения оптической плотности (OD₆₀₀), используя планшетный ридер-шейкер инкубатор Infinite 200 Pro (Tecan, Австрия) в 96-луночном плоскодонном планшете в объеме 100 мкл среды ВНИ. Для этого из ночного инокулюма готовили взвесь исследуемых изолятов мутностью 2,4 – 2,5 McF, в 2 мл физраствора. Далее, в соотношении 1:10 в 100 мкл бульона ВНИ (Bio-Rad, Франция) добавляли подготовленный инокулюм. Используя 96-луночный планшет, подготовленный инокулюм тестируемых штаммов, раскапывали в 48 лунок, в остальные (периферийные) лунки добавляли дистиллированную воду (200 мкл) во избежание образования конденсата. Крышку планшета по периферии заклеивали пленкой Parafilm “M” (США). Считывание OD₆₀₀ проводили каждые 10 минут в течение 14 часов; был использован орбитальный режим шейкирования (6мм) с 5-ти секундной паузой перед считыванием OD₆₀₀. Считывание с лунки (flashes) осуществлялось в 25-ти повторениях, на каждый изолят использовали по 8-лунок. ЛАГ-фазу оценивали как временной интервал от момента начала инкубации до момента 15% увеличения OD₆₀₀. Анализ кривых роста проводили с помощью R пакета Growthcurver [258].

2.1.7. Оценка индуцированной аутолитической активности

Была проведена оценка индуцированной аутолитической активности среди штаммов бактерий-мутантов, полученных при селекции устойчивости *in vitro* к цефтаролину, ванкомицину и даптомицину. Всего в исследование было включено 16 мутантов, устойчивых к

антибиотикам, а также их исходных штаммов (чувствительных штаммов до селекции). Мутанты, устойчивые к цефтаролину (CPT) - 77/40, 85/40, 420/40, 422/40, 146/40. Мутанты, устойчивые к ванкомицину (VAN) и даптомицину (DAP) - 77/40, 85/40, 422/40, 736/40, ATCC29213/40, 420/40 (мутант только по даптомицину). Оценку индуцированной аутолитической активности проводили по стандартной методике, предложенной Gustafson и соавт. [259]. Для выполнения измерений мы адаптировали эксперимент под 96-луночный планшетный формат. Для этого в жидкой среде получали ночной инокулом, затем разбавляли его в 100 мл среды в соотношении инокулом и среда 1:100 (сердечно – мозговой бульон, ВНИ). Далее клетки доводили до средней экспоненциальной фазы роста, после осадок охлаждали до 4°C и все клетки дважды отмывали в холодном растворе PBS (pH=7.4) при центрифугировании с охлаждением. Отмытые клетки доводили от оптической плотности $OD_{610} = 0,3 (\pm 20\%)$. При этом клетки делили на две части – контроль (добавляли разбавитель PBS) и опытная часть (добавляли индуктор аутолизиса – 0,05% раствор Тритона X-100). По 100 мкл раскапывали взвеси клеток в 96-луночный планшет (контроль + опыт), при этом на одну культуру использовали не менее 8 лунок. Инкубирования планшетов проводили в планшетном шейкере – ридер инкубаторе Infinite 200 Pro. Для каждого штамма было проведено не менее трех независимых измерений. Считывание OD проводили каждые 10 минут при 30°C инкубации и орбитальной амплитудой шейкирования – 142 rpm (амплитуда орбитального шейкирования – 6мм) в течение 5 часов.

2.2. Эксперименты по адаптивной эволюции устойчивости *in vitro*

В эксперименты по адаптивной эволюции устойчивости к 7-ми антибиотикам было включено 10 штаммов (Таблица 2). Использовали две основные стратегии селекции устойчивости, это ступенчатые пассажи на возрастающих концентрациях антибиотиков и циклическое кратковременное воздействие шокowymi концентрациями (в 10 – 100 раз превышающие уровень МПК) антибиотиков. У полученных производных штаммов был проведен сравнительный анализ фенотипов и генотипов. Также проведен анализ динамического адаптивного изменения геномов в процессе селекции.

Таблица 2 – Штаммы, включенные в эксперименты по изучению адаптивной эволюции устойчивости

Штамм	Фенотип	MLST, ST	Стратегия А					Стратегия В		
			CPT	VAN	DAP	OXA	MER	VAN	CIP	GEN
SA0077	MRSA	ST8	+	+	+			+		
SA0085	MRSA	ST239	+	+	+			+		
SA0146	MRSA	ST228	+							
SA0420	MRSA	ST239	+		+					
SA0422	MRSA	ST8	+	+	+			+		
SA0707	MSSA	ST8	+			+	+		+	+
SA0736	MRSA	ST8		+	+			+		
SA0937	MSSA	ST97	+			+	+		+	+
SA1037	MRSA	ST22							+	+
ATCC 29213	MSSA	ST5		+	+			+	+	+

Примечание: Стратегия А – ступенчатые пассажи на возрастающих концентрациях антибиотиков; В – циклическое кратковременное воздействие шокowymi концентрациями. Антибиотики: CPT – цефтаролин, VAN – ванкомицин, DAP – даптомицин, OXA – оксациллин, MER – меропенем, CIP – ципрофлоксацин, GEN – гентамицин.

2.2.1. Селекция устойчивости MRSA к цефтаролину, определение MPC

Селекцию устойчивости к цефтаролину проводили в диапазоне концентраций антибиотика, определяемых как окно селекции мутантов (mutant selection window, MSW). MSW ограничивается двумя значениями концентраций: стандартной минимальной подавляющей концентрацией (МПК) и минимальной концентрацией антибиотика, предотвращающей образование резистентных мутантов (mutant prevention concentration, MPC).

Для экспериментов по определению MPC и дальнейшей селекции устойчивости были использованы 6 изолятов. Определение MPC проводили по модифицированной методике, описанной в работах [260, 261]. Культуры *S. aureus* выращивали на кровяном агаре для получения суточного сливного роста на двух чашках Петри. Далее всю биомассу с двух чашек переносили в 100 мл бульона Мюллера-Хинтона и дополнительно инкубировали в орбитальном шейкер – инкубаторе 2,5 часа при 37°C и 250 об/мин. Клеточную биомассу концентрировали центрифугированием в течение 5 минут при 3000 об/мин при комнатной температуре таким образом, чтобы концентрация клеток составляла более 10^{10} КОЕ/мл в объеме 2 мл стерильного физиологического раствора.

Концентрацию бактериальной суспензии контролировали с помощью серийных 10-кратных разведений с последующими высевами на триптиказо-соевый агар TSA, (Bio-Rad, Франция) и визуальным подсчетом выросших колоний. После валидации клеточных концентраций готовили *ex tempore* серийные разведения цефтаролина в чашках с сердечно-мозговым агаром (Bio-Rad, Франция) в диапазоне конечных концентраций антибиотика от 0,25 до 64 мкг/мл. Инокулюм в объеме 0,1 мл переносили на среды с антибиотиком и осуществляли посев газоном. Посевы инкубировали в течение 72 часов при 37°C. Опыт проводили в трех повторах. За MPC принимали минимальную концентрацию антибиотика, при которой полностью отсутствовал рост исследуемой культуры.

Для селекции устойчивости колонии, выросшие при концентрации $\frac{1}{2}$ от MPC, собирали с чашек, концентрировали в 2 мл физиологического раствора и вновь рассеивали на свежий ряд чашек с концентрацией антибиотика $\frac{1}{2}$ от MPC и плюс/минус две концентрации. Культуры инкубировали до момента получения колоний, до 72 часов. При этом для всех изолятов отмечалась выраженная диссоциация, отражающаяся в изменении морфологии колоний. Всего было сделано 40 пересевов, при этом через каждые 5 пересевов проводили мониторинг изменения чувствительности к цефтаролину и контроль контаминации культур с использованием MALDI-TOF MS идентификации подозрительных колоний.

2.2.2. Селекция устойчивости MSSA к бета-лактамам

Для селекции на бета-лактамах использовали два *mecA*-отрицательных штамма MSSA: SA0937 (ST97, *blaZ*-отрицательный) и SA0707 (ST8, *blaZ*-положительный). Оба штамма были выделены среди взрослых здоровых носителей из носоглотки в 2016г. Пассажи обоих штаммов осуществляли на возрастающей концентрации антибиотиков в агаре, используя предыдущую схему селекции (раздел 2.2.1). Каждый штамм пассировали на трех антибиотиках: оксациллине, цефтаролине и меропенеме. На первом этапе готовили серию разведений антибиотиков (от 0,5 до 4 мкг/мл). Добавляли инокуляты штаммов (10^9 КОЕ/мл) и инкубировали при 37°C до появления роста хотя бы в одном из разведений антибиотиков. На первых циклах селекции появление единичных колоний отмечалось в течение 48–96 часов. Выросшие колонии собирали петлей, ресуспендировали в физиологическом растворе и использовали для дальнейшего пассирования. Если колонии появлялись через 18 часов после инокуляции, суспензию клеток переносили на новые чашки, содержащие ту же концентрацию бета-лактамов, что и в предыдущем цикле. Однако, если время появления колоний составляло <18 часов, концентрацию бета-лактамов удваивали для следующего пассажа. Измерение МПК, РАР-

анализ, измерение скорости роста и полногеномное секвенирование проводили перед селекцией и через 5, 15, 30 пассажей, а также дополнительно через 10 пассажей на средах без антибиотиков (40 циклов).

2.2.3. Селекция устойчивости к ванкомицину и даптомицину

В эксперимент были включены те же изоляты MRSA, которые были отобраны для селекции устойчивости к цефтаролину (SA0077, SA0085, SA0422 и SA0420), кроме изолята SA0146 (генотип ST228 – t041 – SCC $_{mec}$ IA). Дополнительно в работу были включены клинический изолят SA0736 (генотип ST8 – t024 – SCC $_{mec}$ IVc) и лабораторный референс-штамм ATCC 29213 (MSSA, генотип ST5 – t002, *mecA* - отрицательный). Изначально готовили инокулюм с клеточной концентрацией более 10^9 КОЕ/мл, который добавляли к 2 мл среды с антибиотиком в диапазонах от 0,25 до 16 мкг/мл. Пробы инкубировали в орбитальном шейкере при 37°C и 250 об/мин в течение 48 часов. После инкубации, выбирались пробы, которые выросли при максимальной концентрации антибиотика, эти пробы (20 мкл) снова переносили в свежую среду с антибиотиком (2 мл). При последующих пересевах использовался диапазон концентраций, включающий: крайнюю концентрацию с ростом (где был произведен отбор культуры), двух субингибирующих и двух ингибирующих концентраций. Такой подход позволял проводить мониторинг изменения роста культуры, и в дальнейшем использовалась ступенчатая селекция (рис. 3). Так, стартовый диапазон концентраций для ванкомицина составлял 2-4 мкг/мл, для даптомицина – 0,5-2 мкг/мл. При завершении селекции эти диапазоны составляли 8-32 мкг/мл и 64-256 мкг/мл соответственно. Для даптомицина предварительно была проведена валидация содержания катионов кальция в среде, при этом оптимальная конечная концентрация составляла 50 мг/л. Всего было осуществлено 40 пересевов. В ходе селекции осуществлялся мониторинг чувствительности и контроль контаминации пересевов. Два изолята (SA0077 и SA0085) параллельно пересевались на среде (с добавлением 50мг/л кальция и без добавления) без антибиотиков, таким образом, было получено 4 контрольных изолята. После завершения селекции была проведена оценка чувствительности и возможного «seesaw» эффекта для 18 антибиотиков. Стабильность сформированной устойчивости оценивали после 15-ти пересевов на среде без антибиотиков в ВНИ бульоне.

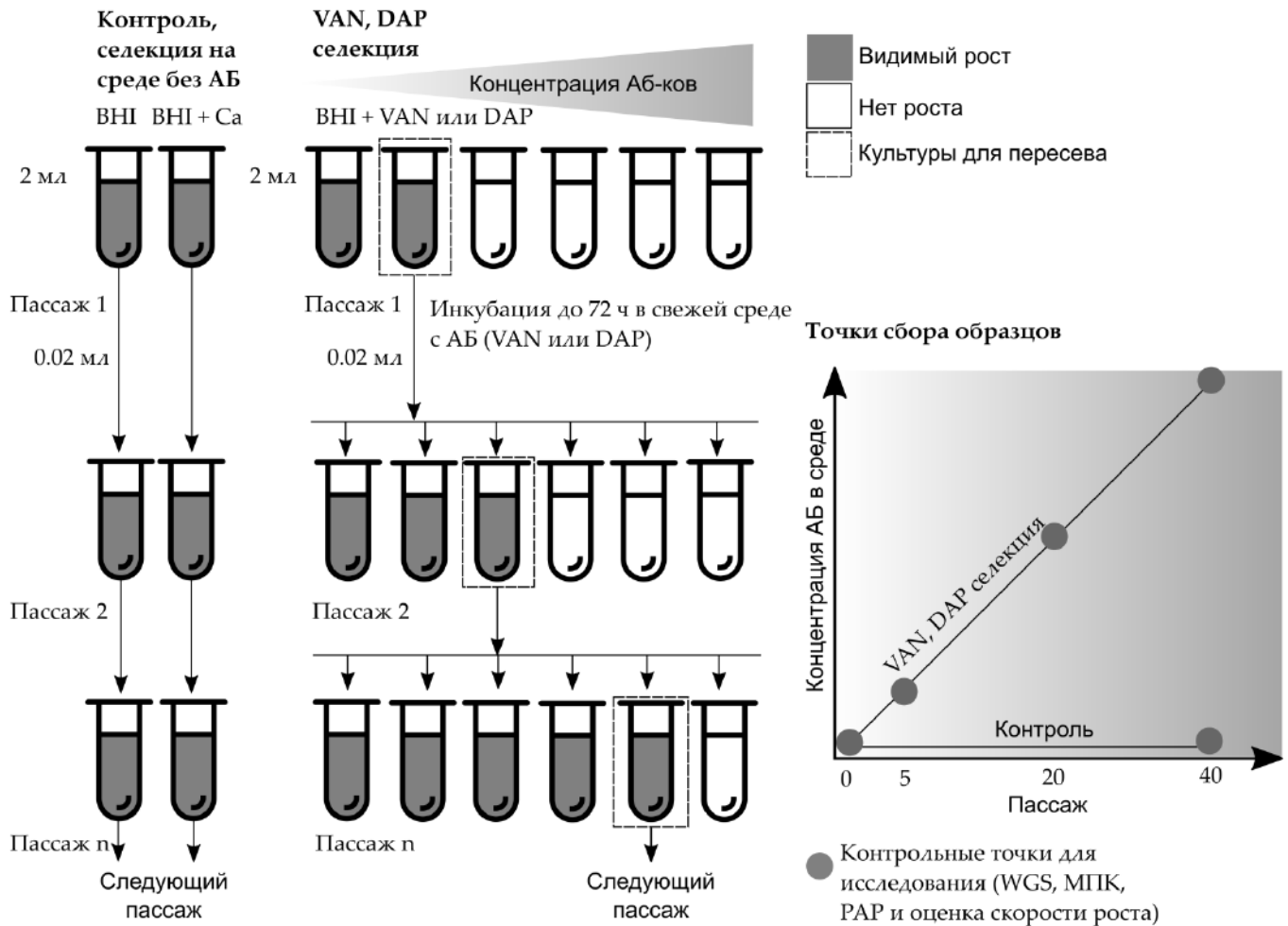


Рисунок 3 – Схема ступенчатой селекции устойчивости в жидкой питательной среде. АБ – антибиотик, VAN – ванкомицин, DAP – даптомицин.

2.2.4. Селекция под воздействием шоковых концентраций ванкомицина

В эксперимент были включены те же изоляты MRSA, которые были отобраны для селекции устойчивости к ванкомицину и даптомицину (SA0077, SA0085, SA0422, SA0736, и штамм ATCC 29213). В качестве основы эксперимента был взят метод, использованный ранее для получения антибиотикотолерантности у *E. coli* [262, 263]. Опыт выполняли по следующей схеме. Изначально получали ночной инокулюм, далее делали разведение клеточной биомассы исследуемых штаммов в соотношении 1:100. При этом оценивали плотность клеточной биомассы, используя количественный метод с соответствующим разведением с подсчетом КОЕ/мл живых клеток на плотной питательной среде TSA. Затем в среду добавляли антибиотик ванкомицин в концентрации 50 мг/л, что соответствует максимальной терапевтической сывороточной концентрации, а также превышает начальный уровень МПК исследуемых

штаммов в 25-100 раз. Жидкую среду ВНИ с антибиотиком и инокулятом инкубировали в течение пяти часов при 37°C и шейкировании 250 об/мин. В оригинальной методике авторы использовали разные временные интервалы от 2 до 8 часов воздействия антибиотиком, при этом отмечалось, что более эффективным способом получения антибиотикотолерантных мутантов оказался интервал воздействия 5-8 часов. В настоящей работе использовался интервал в пять часов. После 5-ти часов воздействия антибиотиком снова проводили оценку плотности клеточной биомассы с подсчетом КОЕ на плотной питательной среде. Далее весь объем среды и клеток (100мл) дважды отмывали от антибиотика центрифугированием с добавлением PBS буфера (10 мин при 10000 об/мин); получали клеточный осадок и ресуспендировали в свежей жидкой питательной среде. Среду снова инкубировали для получения ночного инокулюма. Общая схема селекции представлена на рис. 4. Все вышеописанные манипуляции составляли один цикл селекции. Всего было проведено 10 таких циклов.

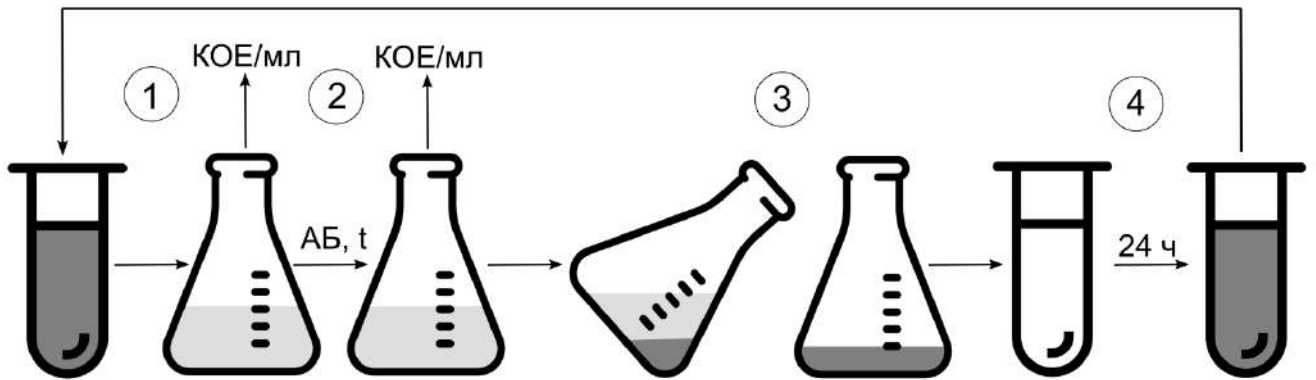


Рисунок 4 – Селекция под воздействием шоковых концентраций антибиотиков (за основу схемы взят рисунок из работы Fridman и соавт. [262]). Схема селекции: 1) Разведение ночного инокулюма; 2) Воздействие антибиотиками в течение времени (t); 3) Отмывка клеток от антибиотика центрифугированием; 4) Клеточный осадок разводится в свежей среде для получения ночного инокулюма.

2.2.5. Селекция под воздействием шоковых концентраций ципрофлоксацина, гентамицина

В эксперимент были включены три клинических изолята *S. aureus* из коллекции бактериальных культур, а также штамм ATCC 29213, (MSSA, ST5). Клинические изоляты включали SA0707 (ST8, MSSA), SA0937 (ST97, MSSA) и SA01037 (ST22, MRSA). Воздействие шоковыми концентрациями (16 мкг/мл для гентамицина и ципрофлоксацина) выполняли

согласно методу, описанному выше (рис. 4). Время воздействия (часы) определили в предварительных «time-killing» экспериментах, подбирая оптимальные значения наиболее эффективного киллинга бактерий. Для обоих антибиотиков это время составило 6 часов. В процессе селекции в каждом цикле была проведена оценка доли выживших клеток после воздействия шокowymi концентрациями антибиотиков.

2.3. Молекулярные методы

2.3.1. Молекулярное типирование (*SCCmec*, *spa*, MLST)

Определение сиквенс-типов (ST) и *spa*-типов осуществлялось согласно стандартным протоколам MLST (<http://pubmlst.org/saureus/>) и *spa*-типирования (<http://spaserver.ridom.de/>), соответственно. ПЦР проводили с использованием наборов ScreenMix-HS (ЗАО Евроген, Россия) или DreamTaq PCR Master Mix (Thermo Scientific, США) в 20-25 мкл с праймерами, рекомендованными в протоколах (синтезированы в ЗАО Евроген, Россия). Полученные ампликоны очищали с помощью D-Pure (NimaGen, Нидерланды) по протоколу производителя. Сиквенсовую реакцию с прямыми и обратными праймерами проводили с помощью набора BrilliantDye Terminator v3.1 (NimaGen, Нидерланды) с последующей очисткой шариками D-Pure. Секвенирование проводили на приборе 3730 DNA Analyzer (Applied Biosystems, Япония) с использованием полимера NimaPOP-7 (NimaGen, Нидерланды). Сборку секвенированных генов проводили в программе Contig Express Vector NTI™ (Invitrogen, США). Мультиплексная ПЦР использовалась для типирования *SCCmec* в соответствии с рекомендациями Международной рабочей группы по классификации стафилококковых кассетных хромосомных элементов [264]. Для визуализации данных MLST была использована программа PHYLOViZ 2.0 [265].

2.3.2. Полногеномное секвенирование

Экстракция геномной ДНК из суточных бактериальных культур проводилась с помощью наборов PureLink™ Genomic DNA Mini Kit (Invitrogen™, Калифорния, США) или DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen™, Германия) с предварительным лизисом клеток в буфере, содержащем 5 мг/мл лизостафина (Sigma-Aldrich, США) и 50 мг/мл лизоцима (Amresco, США) при инкубации в течение >1 часа при 37°C. Для подготовки библиотек ДНК использовался набор Nextera XT или DNA Prep (Illumina, Сан-Диего, Калифорния, США) с последующим индексированием

образцов и амплификацией в соответствии с протоколом производителя. В качестве контроля секвенирования использовалась 1% стандартная библиотека PhiX (Illumina, США). Оценку распределения длин библиотек ДНК проводилась на приборе 4150 TapeStation (Agilent, США) с использованием набора High Sensitivity D1000 Reagents (Agilent, США). За оптимальный размер принимались образцы с диапазоном длин 450-1000 п.н. Концентрацию измеряли на флуориметре Qubit 2.0 (ThermoFisher Scientific, США) с использованием наборов High Sensitivity dsDNA (ThermoFisher Scientific, США). За оптимальную концентрацию принимали значение >2 нг/мкл. ДНК библиотеки секвенировали на приборе MiSeq (Illumina, Сан-Диего, Калифорния, США) с использованием картриджей v2-500 или v3-600 с получением парноконцевых прочтений (ридов). Среднее количество парных ридов на образец составляло 1,2 млн (850 тыс. – 1,5 млн).

2.3.3. Выделение белка, трипсинолиз и белковое профилирование

Оценку белкового профилирования проводили согласно методике, описанной Соповой и соавт. [266]. Анализ проводили для трех штаммов, полученных при селекции на цефтаролине при индукции и без индукции антибиотиками. Ночной инокулюм инокулировали в 200 мл жидкой среды LB и готовили несколько проб: пробу без добавления антибиотиков, пробы с меропенемом (8 мкг/мл), ампициллином (50 мкг/мл), оксациллином (32 мкг/мл), ванкомицином (8 мкг/мл). Лизис и разрушение клеточных стенок осуществляли механическим способом на вортекс-миксере в холодной камере при +4 °С. Клеточный лизат центрифугировали (10 000 g, +4°C, 10 минут) для дальнейшего исследования. **SDS-PAGE** проводили в 10% акриламидном геле с окраской по Кумасси в Mini-PROTEAN II (Bio-Rad, США) согласно рекомендациям производителя. **Трипсинолиз белков в фрагментах акриламидного геля проводили при экспозиции в буфере, содержащем 50 mM NH₄HCO₃ и ацетонитрил в соотношении 1 : 1.** Фрагменты геля высушивались в вакуумном центробежном концентраторе Labconco. Трипсинолиз выполнялся в буфере с 20 нг/мкл трипсина и 25 mM NH₄HCO₃ при инкубации в течение 18 часов при 37°C с последующей обработкой ультразвуком в ультразвуковой бане. Раствор высушивали с использованием вакуумного центробежного концентратора Labconco при 18 °С. **Масс-спектрометрический анализ проводили с помощью масс-спектрометра UltrafleXtreme (Bruker Daltonics, США).** Идентификация белков проводилась с использованием программы Mascot 2.4.2 (Matrix Science, <http://www.matrixscience.com>) с белковой базой данных UniProt (<http://www.uniprot.org/>), содержащей стафилококковый протеом.

2.3.4. Оценка экспрессии генов, кодирующих пенициллинсвязывающие белки

Для оценки экспрессии генов, кодирующих пенициллинсвязывающие белки (*pbp1*, *pbp2*, *pbp3*, *pbp4*, *tesA*), ночной инокулом разводили в соотношении 1:100, доводили до начала фазы экспоненциального роста (оптическая плотность при длине волны 600нм (OD_{600}) – 0,05) в бульоне ВНИ в объеме 100мл. Инкубировали при 37°C и 250 об/мин. По достижении OD_{600} – 0,05, инокулом снова разводили свежим бульоном ВНИ в соотношении 1:10 и конечном объеме 100 мл; далее инкубировали при 37°C и 250 об/мин до поздней экспоненциальной фазы роста OD_{600} –0,5. При втором разведении 1:10, для проверки индуцированной экспрессии, добавляли оксациллин в конечной концентрации 0,016 мкг/мл. По достижении требуемой клеточной плотности собирали клетки центрифугированием (5 мин, 5000 об/мин при +4 °C), дважды отмывали от среды в PBS буфере (режим центрифугирования тот же при +4 °C) и инкубировали (15 мин) клеточный осадок в 2 мл буфера RNeasy Protect Bacteria Reagent (Qiagen, Германия) при +4 °C для стабилизации РНК. Ресуспендированные осадки подвергались заморозке при -70°C до этапа выделения тотальной РНК. Лизис и разрушение клеточных стенок осуществляли механическим способом. После добавления лизис-буфера, содержащего 2-меркаптоэтанол и стеклянные шарики (Sigma-Aldrich, США), осуществлялся лизис бактериальных осадков методом гомогенизирования на вортекс-миксере в холодильной камере при +4 °C. Все последующие этапы выделения тотальной РНК проводились с помощью набора для выделения РНК PureLink RNA Mini Kit (ThermoFisher Scientific, США) согласно инструкции производителя. Таким образом, были получены образцы РНК из двух серий выделений: без воздействия антибиотиком и при воздействии антибиотиком. Концентрация выделенной РНК, измеренная при помощи Qubit RNA High Sensitivity (HS) Assay Kits (Invitrogen, США), составляла 15 – 250 нг/мкл. Целостность выделенной РНК (индекс RIN) оценивали на приборе TapeStation 4150 (Agilent, США) с использованием наборов High Sensitivity RNA ScreenTape (Agilent, США) в соответствии с рекомендациями производителя наборов. Для удаления контаминирующей ДНК из образцов РНК и последующего удаления ДНКазы, а также двухвалентных катионов был использован набор TURBO DNA-free (Invitrogen, США) в соответствии с рекомендациями производителя. Для контроля удаления контаминирующей ДНК была проведена ПЦР на детекцию гена *nuc*. Ген домашнего хозяйства – термостабильная нуклеаза (*nuc*), использовался для нормализации данных и расчетов дифференциальной экспрессии. В работу для последующей реакции обратной транскрипции были отобраны образцы, отрицательные по гену *nuc*. Для получения кДНК был использован набор для обратной транскрипции QuantiTect (Qiagen, Германия) в соответствии с рекомендациями производителя. Полученную кДНК использовали в ПЦР в режиме реального времени для

оценки представленности транскриптов с использованием прибора CFX96 C1000 (Bio-Rad, США). Последовательности Taqman-зондов (probe) и праймеров (F и R) представлены в таблице 3. Реакцию амплификации проводили с использованием наборов DreamTaq PCR Master Mix (ThermoFisher Scientific, США) в мультиплексном режиме по две мишени в реакции (*nuc* + *pbp1/2/3/4/mecA*). Для комбинаций мишеней *nuc* + *pbp1/2/3/4/* использовали следующий температурный протокол: 95 °С – 5 мин; далее 40 циклов 95 °С – 10 с, 60 °С – 30 с (считывание сигнала). Для комбинации мишеней *nuc* + *mecA* температура отжига составляла 52 °С. Оценку экспрессии генов проводили, используя пороговые значения циклов Ct методом двойной дельты ($2^{-\Delta\Delta Ct}$), сравнивая с контрольными образцами, согласно Livak и соавт. [267].

Таблица 3 – Последовательности праймеров и зондов, использованных для оценки экспрессии генов

Мишень	Название	Последовательность 5'-3'*	Канал детекции
<i>nuc</i>	Nuc_F	AGCGATTGATGGTGATACGGT	ROX
	Nuc_R	AGGATGCTTTGTTTCAGGTGT	
	Nuc_probe	GTCAACCAATGACATTCAGACTATTA	
<i>pbp1</i>	Pbp_1_F	TТАААGGTCCAAACCCATATT	FAM
	Pbp_1_R	AACACCTAATTCATAAGCTTC	
	Pbp_1_probe	GACGCGCCGAAGAAAAATCCT	
<i>pbp2</i>	Pbp_2_F	TACTTGCAACTGAAGACAATC	HEX
	Pbp_2_R	CTTGTTGTGTTAATGTTGAGG	
	Pbp_2_probe	CGAACATGGCGCACTTGATTA	
<i>pbp3</i>	Pbp_3_F	CACATTGGATTAACGATTCAT	FAM
	Pbp_3_R	CCAGTACCATCTTTATCATTA	
	Pbp_3_probe	GAGGTTGGTCCACTCAAGAAG	
<i>pbp4</i>	Pbp_4_F	ATAAACTTGTAGTCGAAGATG	HEX
	Pbp_4_R	CAGTATTTGCCTTTTGAATAA	
	Pbp_4_probe	TACACGCGGACTATCCAAGAG	
<i>mecA</i>	mecA_F	GATGGTATGTGGAAGTTAG	FAM
	mecA_R	TTCGGTCTAAAATTTTACC	
	mecA_probe	ATCATAGCGTCATTATCCA	

Примечание: * – терминальное расположение гасителя флюоресценции и флюорофора.

2.4. Генно-инженерные методы

2.4.1. Направленное геномное редактирование гена *gdpP*

В основу метода геномного редактирования с применением CRISPR/Cas9 была положена методика Renewit и соавт. [268]. Была использована термочувствительная двухвекторная система. В качестве векторов выступали плазмиды pCN-EF2132tet и pCAS9counter.

Направленность Cas9 на интересующий локус достигалась путем клонирования олигонуклеотида (20 п.н. ДНК) в основную цепь направляющей РНК (sgRNA), который соответствует указанному локусу и находится непосредственно перед сайтом распознавания Cas9. Изначально трансформация проводилась вектором pCN-EF2132tet в модельный штамм *S. aureus* RN4220 для получения рекомбинирующих компетентных клеток. На втором этапе проводилось введение рекомбинирующего олигонуклеотида одновременно с вектором контрселекции. Только клетки, подвергающиеся успешной рекомбинации, обладают иммунитетом к летальным двухцепочечным разрывам ДНК, индуцированным контрселективной плазмидой. Температура роста клеток может быть впоследствии повышена, что приводит к потере векторной системы. В начале гена *gdpP* был выбран участок, содержащий последовательность PAM (protospacer adjacent motif, NGG), 20 нуклеотидов после этого участка были использованы для таргетирования направляющей sgRNA. В качестве ДНК субстрата для рекомбинации были использованы праймеры длиной 90 нуклеотидов, несущие с 5'-конца четыре модифицированных фосфотиоатом нуклеотида (Таблица 4). Частично комплементарные фосфорилированные олигонуклеотиды были использованы в реакции клонирования Golden Gate. Для этого праймеры смешивали в эквимольном соотношении (по 50 мкМ) и инкубировали их в присутствии 50мМ хлорида натрия при 95°C в течение 3 минут для денатурации, а затем медленно охлаждали смесь до комнатной температуры. Полученный олигонуклеотидный дуплекс имел выступающие одонитевые концы, необходимые для встраивания в вектор pCAS9counter по сайту рестрикции BsaI. Далее мы смешивали 6 мкл деионизованной воды, 1 мкл плазмиды pCAS9counter (20 фемтомоль), 1 мкл олигонуклеотидного дуплекса (100 фемтомоль), 1 мкл буфера для лигирования, 0.5 мкл T4 ДНК лигазы и 0,5 мкл эндонуклеазы BsaI и инкубировали полученную смесь в амплификаторе при следующих параметрах: 37°C – 2 мин; 16°C – 5 мин; 50°C – 5 мин; 80°C – 15 мин. Полученной смесью трансформировали штамм *E. coli* DH5α с последующим отбором трансформантов. Наличие вставки спейсера подтверждали методом секвенирования с использованием праймера представленного в таблице 4. Далее были получены электрокомпетентные клетки штамма *S. aureus* RN4220 согласно протоколам [269], которые были на первом этапе трансформированы плазмидой pCN-EF2132tet, после чего были снова получены электрокомпетентные клетки *S. aureus* RN4220, несущие плазмиду pCN-EF2132tet. Они были трансформированы плазмидой pCAS9counter-gdpPspacer совместно с праймером *gdpP_del*. Отобранные трансформанты культивировали при 42°C в течение 18 часов для потери плазмид pCN-EF2132tet и pCAS9counter-gdpPspacer. Потерю плазмид оценивали по отсутствию роста на селективных средах с антибиотиками эритромицином и хлорамфениколом.

Таблица 4 – Олигонуклеотиды, использованные для геномного редактирования штамма *S. aureus* RN4220

Последовательность 5'-3'	Применение
CAAGTTGCAATTAAAAGTATTAATGGTAAT GTGCGTTTCTATGGCGTCATTATCATGGGA CATAAACGTCCTGACTTAGATGCAATTGGT	Направляющий праймер использовавшийся в качестве матрицы для рекомбинации при внесении делеции без сдвига рамки считывания (штамм RN_2)
CAAGTTGCAATTAAAAGTATTAATGGTAAT GTGCGTTTCTATGGCCATTATCATGGGACA TAAACGTCCTGACTTAGATGCAATTGGT	Внесение делеции со сдвигом рамки считывания (штамм RN_3)
PO4-AGCTCTGACTTTGTCCACCTCTGCAG GACTGAAACAGTGGGAGACGTCAAAA-PO4	Фосфорилированные праймеры для реакции клонирования Golden Gate
CGGTGCCACTTTTTCAAGTT	Праймер для обнаружения вставки спейсера (gdpP_del)
TGGTGTTATCGATTTAAGTTTG ACTGGTACTTCTTTAACTTCACC	Праймеры для обнаружения внесённой делеции в ген <i>gdpP</i>

После потери плазмид из клеток была выделена геномная ДНК и поставлена ПЦР с праймерами, комплементарными фрагменту гена *gdpP*. По результатам секвенирования фрагмента ПЦР оценивали наличие делеции. Таким образом, был получен мутант штамма *S. aureus* RN4220 (RN_2) с делецией в *gdpP* без сдвига рамки считывания. Схема получения мутанта RN_3 представлена на рис. 5. Делеция, затрагивающая 92 нуклеотида, приводила к выпадению из белковой последовательности 30 аминокислот (308-337 а.к.) и сдвигу рамки считывания с образованием стоп-кодона. Делетируемая последовательность находилась между доменами GGDEF и DHH, отвечающими за фосфодиэстеразную активность, поэтому образующийся укороченный белок не являлся функциональным у штамма RN_3.

cgacCAAGTTGCAATTA AAAAGTATTAATGGTAATGTGCGTTTCTATGGCggtaagactgacccg
 atggagaaacglactcgtgtaagagcacgtgtgatctcacatgcgttaaaagata CCTgacagagggtgacaaaagtCATTATCATGG
 GACATAAACGTCCTGACTTAGATGCAATTGGTgc



cgacCAAGTTGCAATTA AAAAGTATTAATGGTAATGTGCGTTTCTATGGCCATTATCATG
 GGACAtaaACGTCCTGACTTAGATGCAATTGGTgc

Рисунок 5 – Схема редактирования гена *gdpP*. Фрагмент последовательности гена *gdpP*, красным выделены последовательность праймера, использовавшегося в качестве матрицы для рекомбинации, подчеркнута последовательность для таргетирования sgRNA, жирным выделен РАМ, курсивом – преждевременный стоп-кодон, возникший в результате делеции и сдвига рамки считывания.

2.5. Биоинформатические методы

2.5.1. Сборка геномов и их аннотация

Полученные первичные парные ДНК-прочтения (риды) были фильтрованы по качеству с удалением адаптерных и низкокачественных последовательностей с помощью Trimmomatic [270]. Качество и распределение длин ридов были анализированы до и после фильтрации с помощью FastQC [271]. Сборку геномов *de novo* до уровня контигов осуществляли с помощью SPAdes [272] в режиме коррекции ошибок (--carefull). Всего было *de novo* собрано 429 геномов. После фильтрации контигов (контиги менее 300 п.н. были удалены) были получены следующие контрольные параметры качества сборок: количество контигов на геном (M+IQR): 135 (87 – 203); N50: 110Kb (68 – 190 Kb); количество N на 100 Kb не превышало 5%. Абсолютное покрытие (количество ридов) на геном после удаления многокопийных элементов составляло 125,6 (99 – 140). Программы Bowtie 2 2.3.5 [273] и SAMtools 1.10 [274] использовались для определения однонуклеотидных мутаций, коротких инсерций и делеций. Для аннотации SNP использовали SNPeff 4.3t [275] с включением очищенных и дедулицированных ридов после обработки с помощью SAMtools. В качестве референс-геномов использовали следующие геномы: *S. aureus* COL (CP000046.1), *S. aureus* USA300_FPR3757 (GCF_000013465.1), *S. aureus* NCTC13616 (NZ_LR134193.1), *S. aureus* ATCC 29213 (PRJNA292059). Собранные *de novo* геномы были аннотированы с помощью PROKKA 1.14.5 [276].

2.5.2. Типирование *in silico*

Для типирования геномов *in silico* были использованы следующие скрипты. Типирование по схеме MLST – скрипт MLST 2.18.0 (<https://github.com/tseemann/mlst>); определение *spa*-типов с помощью скрипта spaTyper.py (<https://github.com/HCGB-IGTP/spaTyper>) против базы данных Ridom SpaServer (<http://spaserver.ridom.de/>), обновление 12 – 2022 г.; поиск генов вирулентности и резистентности – скрипт ABRicate 0.9.8 (<https://github.com/tseemann/abricate>), с использованием баз данных: VFDB: Virulence Factor Database (<http://www.mgc.ac.cn/VFs/>) и ResFinder (<https://cge.food.dtu.dk/services/ResFinder/>), соответственно. Для определения типов SCCmec была собрана локальная база данных, основанная на коллекции последовательностей генов *ccr*- и *mec*-комплексов sccmecfinder_db (https://bitbucket.org/genomicpidemiology/sccmecfinder_db/src/master/) для программы SCCmec Finder (<https://cge.food.dtu.dk/services/SCCmecFinder/>). Поиск генов осуществляли с помощью ABRicate 0.9.8.

2.5.3. Добавление геномных данных из ранее проведенных исследований

Для сравнительного филогенетического анализа геномов в работу были включены доступные для сборки и/или первичные ряды из публичных репозиториях NCBI GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>), ENA (European Nucleotide Archive, <https://www.ebi.ac.uk/ena/browser/home>) с использованием списка геномов из базы данных PATRIC (обновления 2019 – 2022 г.) [277] с доступными метаданными.

2.5.4. Филогенетический и пангеномный анализ

Пангеномный анализ был проведен с помощью программы Roary 3.13.0 [278]; сравнение геномного контента между сравниваемыми группами геномов осуществлялось с помощью scoary [279]. Помимо этого, для поиска ассоциаций геномного контента и выделенных групп геномов был использован классификатор XGboost (<https://xgboost.readthedocs.io/>), использующий алгоритм машинного обучения. Все включенные геномы (полученные в настоящем исследовании и загруженные из доступных репозиториях) были типированы *in silico* против баз данных PubMLST с обновлениями 2020 – 2022 гг. [280] с использованием скрипта MLST версия 2.18.0 (<https://github.com/tseemann/mlst>). Для получения выравнивания core-части геномов с последующей реконструкций филогенетического дерева было использовано несколько

подходов. Один подход реализован на основе алгоритма выравнивания под названием Panmap (<https://github.com/sleyn/panmap>). Для Panmap используется скрипт nucmer 3.9.4 [281] для создания попарного выравнивания для каждого генома относительно сборок референс-геномов, использованных в работе: *S. aureus* COL (CP000046.1), *S. aureus* NCTC13616 (NZ_LR134193.1). Затем используются аннотации контрольных геномов для каждой области: геной или межгеной, проводится подсчет позиций с пропусками. Позиция с пропусками определяется как позиция, в которой доля пропусков превышает некоторый порог. Если пропорции позиций с пропусками в области выше, чем второй порог, то вся область отбрасывается. В противном случае – сохраняется вся область. Оба порога были установлены на 1%. Этот подход был реализован на основе аннотаций от региона к региону, чтобы сохранить как можно больше информации о расстоянии между позициями SNP, поскольку программа Gubbins 2.4.1 [282], определяющая потенциальные области рекомбинации, использует информацию о плотности SNP. Используя Gubbins 2.4.1, были удалены потенциальные области рекомбинации из выравнивания ядерного генома. Второй подход получения выравнивания core-SNP реализовывался с использованием программы Snippy v4.6.0 (<https://github.com/tseemann/snippy>) с референсными геномами с параметрами по умолчанию. Полученные выравнивания были использованы для реконструкции филогенетических деревьев с помощью программного обеспечения IQ-tree 1.6.12 с модулем ModelFinder в режиме быстрого определения бутстрэппинг-статистики (ultra fast bootstrap) с > 1000 итераций [283-285]. Запуск программы осуществлялся с автоматическим определением оптимального числа потоков для алгоритмических вычислений (-nt AUTO). Модель нуклеотидных замен, автоматически выбранная модулем ModelFinder, была TVMe + ASC + R4. Данная модель была выбрана на основании результатов ModelFinder при использовании параметров по умолчанию. С филогенетических деревьев были удалены длинные ветви, не содержащие интересующих геномов. Выравнивание ядерного генома было кластеризовано с использованием Байесовского анализа структуры популяции (BAPS) с помощью rhierBAPS R package 1.0.1 [286, 287] с ожидаемым количеством популяций, установленным как 20, и максимальной глубиной кластеризации, установленной как 2. Внутри- и межгрупповое попарное сравнение числа SNP проводилось с использованием R-скрипта pairwise_snp_differences (https://github.com/MDU-PHL/pairwise_snp_differences). Матрицы абсолютного количества SNP между сравниваемыми последовательностями в выравниваниях core-геномов были получены с помощью скрипта snp-dists (<https://github.com/tseemann/snp-dists>).

2.5.5. Филогенетический анализ с оценкой времени дивергенции

Для филогенетического анализа (хронограммы) использовалась программа BEAST (v2.7.3) со смягченным лог – нормальным распределением и коалесцентным постоянным предшествующим деревом. Использовались следующие параметры: модель замен GTR и HKY, Strict clock rate 1e-6, Yule model, MCMC — цепь 10000000, 10 независимых запусков. Конвергенция дерева была подтверждена при использовании программы BEAST Tracer 1.7.2 с применением рекомендуемого критерия (ESS > 200) [288]. Затем использовали TreeAnnotator, чтобы идентифицировать максимальную вероятность клад (MCC) дерева, с применением 10%-ого удаления дефектов. Для визуализации филогенетических деревьев после анализа BEAST использовалась программа FigTree (v1.4.4).

2.5.6. Аннотация и картирование генов резистентности *in silico*

Анализ олигонуклеотидных полиморфизмов, небольших инсерций и делеций осуществлялся с использованием двух подходов: BLAST-поиска генов интереса с последующим выравниванием; анализа ДНК-ридов с аннотацией выявленных мутаций. Для выравнивания отдельных генов или локусов с поиском аннотацией возможных замен (нуклеотидных и аминокислотных) нуклеотидные последовательности были извлечены с помощью скрипта Riddikulus (<https://github.com/dariader/Riddikulus>). Гены были выровнены с помощью MAFFT [289]. Поиск замен осуществлялся с помощью программного обеспечения Unipro UGENE [290]. Расчет общего количества приобретенных генов устойчивости для каждого генома производился с помощью ABRicate 0.9.8 (<https://github.com/tseemann/abricate>). Семнадцать белков, ассоциированных с устойчивостью к гликопептидам у *S. aureus* (MprF, Pbp123, WalKR, GraSR, VraSRT, RpoBC, YucIH, Cmk и MsrR) были отобраны для анализа. Частота замен аминокислот сравнивались с использованием всех выборок геномов. Визуализация и аннотация филогенетических деревьев выполнялись с помощью ITOL 6.1.1 [291].

2.5.7. Аннотация мутаций и выявление аллельной глубины при анализе данных геномного секвенирования

Алгоритм исследования включал следующие этапы. На полученные сборки исходных геномов выравнивали риды этих же геномов, при этом все выявленные мутации и

нуклеотидные гетеро-позиции отмечались как «ложные» и исключались из дальнейшего анализа при сравнении с мутантами для предотвращения интерпретации ложноположительных мутаций. Помимо этого, из анализа были исключены все мобильные генетические элементы, профаговые области, адгезины, поверхностные белки вирулентности и протяженные нуклеотидные гомополимерные области, вследствие высокой скорости накопления неспецифических мутаций в этих локусах. Для выявления генетических изменений риды штаммов после 5-го, 20-го и 40-го пассажей выравнивали на контиги контрольных геномов. Проводили выявление гетеромутаций, анализ аллельной глубины, а также аннотацию генетических изменений с помощью программы Breseq [292-294] в режиме mixed allele model. За гетеромутации принимали долю альтернативных прочтений в конкретной позиции с частотой 5-95%. За гомомутации принимали 96-100% частоту нуклеотидных замен в конкретной позиции при выравнивании ридов штаммов после 5-го, 20-го и 40-го пересевов на контиги контрольного штамма. Коррекцию аннотаций, а также оценку гипотетических белков проводили с помощью NCBI protein BLAST и UniProt при этом использовали референс-геном *S. aureus* COL (GenBank: CP000046.1). Для детальной подтверждающей оценки гетеромутаций использовали визуальную оценку данных bam-файлов в программе Unipro Ugene. Использование программы Breseq позволяет проводить оценку формирования субклонов и гетеромутаций в экспериментах по селекции с моделированием эволюции [294]. Основная гипотеза, которая проверяется в настоящем исследовании – это возможное формирование множества субклонов в процессе селекции устойчивости к антибиотикам. Соответственно за гетеромутации принимаются смесь разных клеток, несущих различные механизмы (мутации) устойчивости в популяции. Предполагается, что на начальном этапе формируется большое количество субклонов, и следовательно, большое количество гетеромутаций. В процессе селекции одни гетеромутации могут закрепляться в популяции и переходить в гомомутации, другие элиминируют из популяции.

2.5.8. Доступность данных в публичных репозиториях

Данные геномного секвенирования (ДНК-риды) загружены в SRA депозитарий (Sequence Read Archive) Национального института биотехнологической информации США (NCBI GenBank). Данные зарегистрированы под следующими номерами биопроектов (BioProject): PRJNA872007, PRJNA325350, PRJNA721282, PRJNA609231, PRJNA237679, PRJNA996487.

2.6. Статистические методы и визуализация данных

Для статистического анализа использовалась программная среда R (версия 4.1.2) в интерфейсе RStudio (версия 2021.09.01). Использовались следующие пакеты и функции. Библиотека `library(ggpubr)` для оценки нормальности распределения данных с функцией `shapiro.test`. Функция `prop.test`, `z-test` с поправкой Йейтса на непрерывность использовалась для оценки статистической значимости при сравнении долей. Критерий Манна-Уитни использовался для сравнения независимых выборок (функция `wilcox.test`). Корреляционный анализ (с непараметрическим критерием) осуществлялся с помощью библиотеки `library(corrplot)` со следующими параметрами: `sig.level = 0.01`, `type = "spearman"`. Для визуализации данных, построения диаграмм использовались следующие библиотеки: `ggplot2`, построение основных диаграмм и графиков; `ggsignif`, расчет и визуализация статистической значимости для графиков; `VennDiagram`, построение диаграмм Венна; `treemapify`, построение картированных графиков. Редактор Excel 2010 (Microsoft Office) использовался для ведения локальных баз данных; первичной обработки результатов и построения некоторых графиков. Редактор `inkscape` (<https://inkscape.org/ru/>) был использован для финальной обработки рисунков с векторной графикой.

РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

ГЛАВА 3 СРАВНИТЕЛЬНАЯ ФЕНОТИПИЧЕСКАЯ ОЦЕНКА ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ К АНТИБИОТИКАМ У ИЗОЛЯТОВ HA-MRSA И CA-MRSA

3.1. Описание коллекции изолятов MRSA

Коллекция изолятов MRSA, включенная в исследование была собрана за десятилетний период из различных многопрофильных и специализированных медицинских центров (ортопедо-травматологического, онкологического профилей). В исследование были включены неповторяющиеся изоляты, выделенные от одного пациента. 48% HA-MRSA изолятов были собраны в период 2011 – 2012 гг. В 2020 году на фоне пандемии COVID-19 сбор изолятов не осуществлялся (рис. 6А). В среднем, за каждый год (2013 – 2021) коллекция пополнялась на 6% изолятов. Все изоляты HA-MRSA и CA-MRSA(100%), включенные в исследование, были положительные по гену *mecA*. В наибольшем количестве изоляты были собраны из 32 медицинских центров Санкт-Петербурга (57%). На втором месте по количеству собранных изолятов была Москва (13% изолятов), включающая шесть центров. На долю остальных городов приходилось 30% изолятов (Приложение 4). На рисунке рис. 6В представлено распределение изолятов по нозологическим формам. Изоляты HA-MRSA выделялись у пациентов с различными инфекционными заболеваниями и осложнениями, включающими инфекции в зонах хирургического вмешательства (26%), инфекции костей и суставов (14,4%), бактериемии (12%), инфекции нижних дыхательных путей (11%) и инфекций кожи и мягких тканей (10,6%). У 2,7% госпитализированных пациентов с COVID-19 в условиях стационара из носоглотки были выделены MRSA, которые были отнесены в группу HA-MRSA. У 1,5% пациентов с пневмонией COVID-19 из БАЛа также были выделены MRSA. У 9,5% пациентов с выделенными изолятами MRSA диагноз остался неуточнённым. Биологический материал, откуда были выделены HA-MRSA, включал преимущественно отделяемое хирургических ран (26%), отделяемое и фрагменты костной ткани, полученные при инфекциях костей и суставов (14%), мокрота (13,5%) и кровь (12%). В 4% случаях источник выделения изолятов остался не уточнённым (рис. 6С). В группу CA-MRSA вошли изоляты, выделенные у детей и взрослых при назальном носительстве и без признаков инфекционных заболеваний (n=148 из 194). Часть изолятов (n=36 из 194) были собраны у взрослых здоровых носителей – работников сети продуктовых магазинов Москвы в ходе рутинного скрининга на носительство золотистого стафилококка. Ретроспективно, при скрининге на носительство, было проанализировано 26020

мазков, из которых *S. aureus* был выделен в 6662 случаях. Мазки высевали на желточно-солевой агар, и характерные для *S. aureus* колонии идентифицировали с помощью MALDI-TOF MS. Для выделенных стафилококков проводилась оценка чувствительности к антибиотикам с помощью диско-диффузионного метода. Цефокситин-устойчивые изоляты и изоляты с пограничной зоной ингибирования роста (21 – 23 мм) отбирались для дальнейших исследований и хранились при соответствующих условиях. Количество верифицированных MRSA из отобранных изолятов (положительных по гену *mecA*) составило 0,57% (148 изолятов от числа всех анализированных образцов). Остальные 46 изолятов (из 194) были выделены из зева от взрослых пациентов без признаков стафилококковых инфекций в амбулаторно-поликлинических отделениях различных медицинских центров.

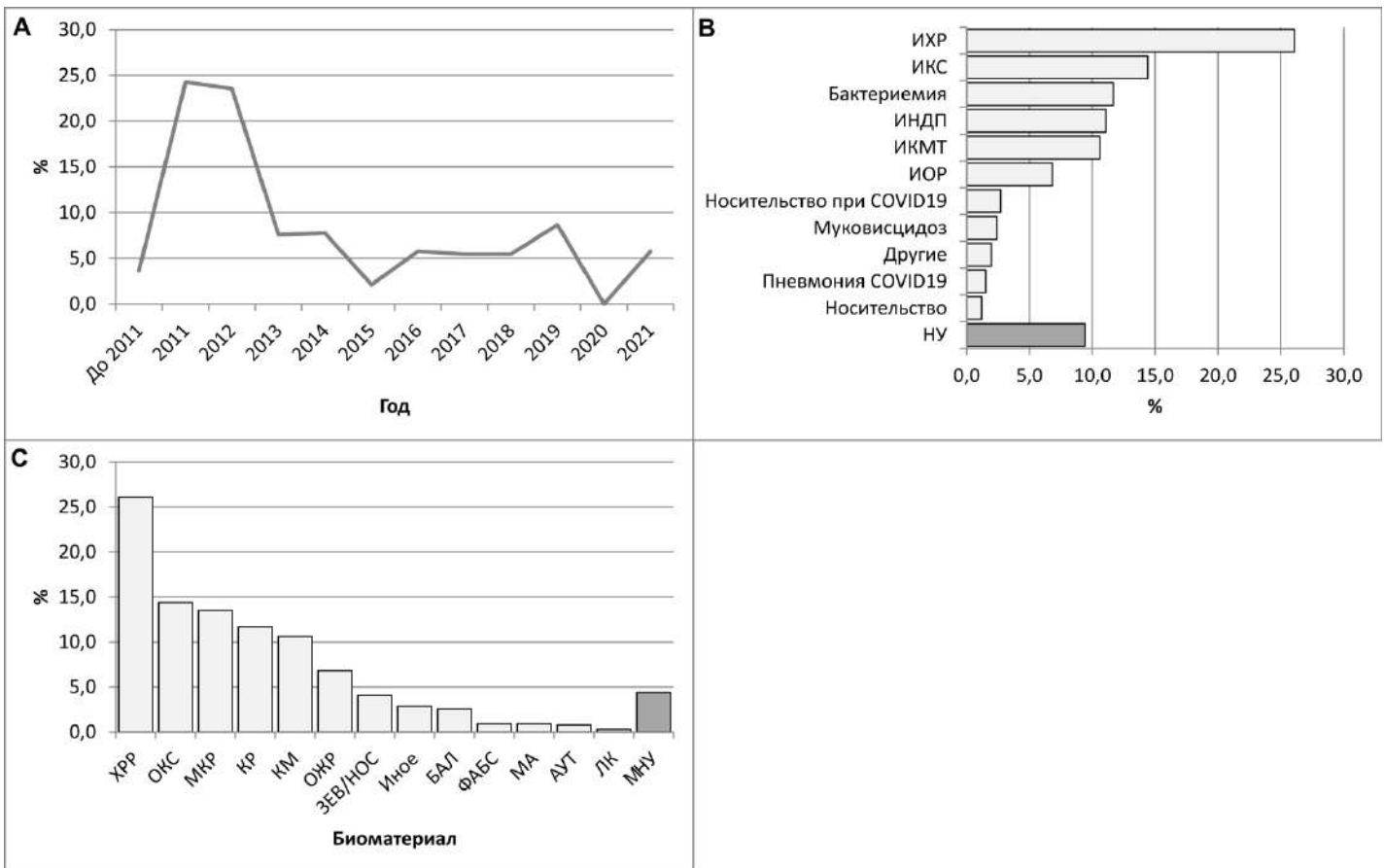


Рисунок 6 – Описание коллекции MRSA. А – распределение изолятов MRSA по годам; В – распределение изолятов HA-MRSA по нозологическим формам: ИХР – инфекции в области хирургических ран, ИКС – инфекции костей и суставов, ИНДП – инфекции нижних дыхательных путей, ИКМТ – инфекции кожи и мягких тканей, ИОР – инфекции ожоговых ран, НУ – неуточненные нозологические формы; С – распределение изолятов HA-MRSA по источнику выделения: XPP – хирургические раны, ОКС – материал, полученный при инфекциях костей и суставов, МКР – мокрота, КР – кровь, КМ – мазок с раневой поверхности

кожи при ИКМТ, ОЖР – отделяемое, полученное при ожоговых ранах, ЗЕВ/НОС – мазки из носоглотки у носителей HA-MRSA, БАЛ – бронхоальвеолярный лаваж, ФАБС – отделяемое флегмон и абсцессов, МА – моча, АУТ – аутопсийный материал, ЛК – ликвор, МНУ – неуточненный материал.

3.2. Оценка чувствительности к бета-лактамам антибиотикам

Основные результаты по оценке чувствительности MRSA к действию антибиотиков были опубликованы в работах [227, 295]. Результаты оценки антибиотикочувствительности, включая распределение МПК, представлены в таблицах 5 и 6, соответственно для HA-MRSA и CA-MRSA. Несмотря на наличие *tesA* гена, 9,4% от всей коллекции изолятов проявляли чувствительность к оксациллину и 4% – к цефокситину. Однако чувствительность к оксациллину у *tes*-положительных стафилококков в большей степени встречалась среди CA-MRSA изолятов (26%) по сравнению с HA-MRSA (3,5%). Детальный анализ *tes*-положительных оксациллин-чувствительных фенотипов (OS-MRSA) представлен в разделе 5.2. Другой представитель бета-лактамов, цефтаролин, демонстрировал высокий уровень антимикробной активности. Доля изолятов HA-MRSA со сниженной чувствительностью к цефтаролину (МПК = 2 мкг/мл) составляла 8,8%, среди CA-MRSA количество таких фенотипов составляло 2,6%. Для изолятов HA-MRSA, выделенных в БАЛе и мокроте у пациентов с пневмониями, муковисцидозом и имеющих МПК=2 мкг/мл, составила 8%. Существующие рекомендации EUCAST рассматривают фенотипы с МПК цефтаролина 2 мкг/мл и выделенные при инфекциях нижних дыхательных путей как устойчивые. Высокий уровень устойчивости (МПК=4 мкг/мл) был выявлен только среди HA-MRSA изолятов (0,8%). Была выявлена перекрестная зависимость увеличения МПК бета-лактамовых антибиотиков. На скаттерплотах (рис. 7) представлено распределение значений МПК оксациллина, цефокситина и цефтаролина: при увеличении МПК оксациллина, увеличивались и МПК двух других бета-лактамов.

Таблица 5 – Распределение МПК антибиотиков в отношении изолятов HA-MRSA (%), n=659

Антибиотики	Антибиотики с диапазоном МПК 0,25 – 512 мкг/мл													МПК ₅₀	МПК ₉₀	C _r
	≤0,125	0,25	0,5	1	2	4	8	16	32	64	128	256	≥512			
Оксациллин		1,5	0,2	0,7	1,1	2,9	4,8	7,0	9,7	10,7	9,6	17,1	34,7	256	512	107,8
Цефокситин					2,8	1,7	6,1	5,0	13,6	17,3	11,7	18,1	23,7	128	512	94,5
Цефтаролин	3,9	22,3	31,5	32,8	8,8	0,8								0,5	1	0,6
Гентамицин	7,5	4,5	8,8	9,1	3,1	1,7	0,3	0,6	1,5	2,6	6,3	54,1		256	256	25,9
Ципрофлоксацин	1,4	1,7	1,8	1,7	1,5	2,6	5,1	13,2	25,7	20,6	7,2	5,2	12,2	32	512	36,6
Моксифлоксацин	8,2	0,6	3,5	23,2	37,2	15,7	10,0		0,5	0,9	0,2			2	8	1,7
Эритромицин	25,3	10,8	3,7	1,4	1,4	1,5	1,5	0,5	0,8	0,6	1,2	51,3		256	256	8,6
Клиндамицин	56,3	1,1	0,6		0,2			0,2		0,3	41,4			0,06	128	1,5
Тетрациклин	42,7	4,6	1,5	0,5	0,2	0,5	1,1	4,8	18,5	20,3	5,4			4	64	2,1
Антибиотики	Антибиотики с диапазоном МПК 0,004 – 16 мкг/мл													МПК ₅₀	МПК ₉₀	C _r
	0,004	0,008	0,016	0,03	0,06	0,125	0,25	0,5	1	2	4	8	≥16			
Ванкомицин							0,4	16,5	66,6	15,6	0,7			1	2	0,99
Тейкопланин						2,0	8,9	28,9	40,6	16,1	3,5			1	2	0,82
Телаванцин				17,0	39,9	39,5	3,5							0,06	0,125	0,07
Далбаванцин			47,5	27,8	16,5	7,0	1,1							0,03	0,06	0,03
Оритаванцин			51,6	0,2	18,7	21,5	8,0							0,016	0,125	0,04
Даптомицин					2,0	3,7	22,9	54,1	15,6	1,4	0,4			0,5	1	0,45
Линезолид							0,2	4,1	40,2	50,7	4,8			2	2	1,5
Тедизолид				1,1	0,8	16,0	73,3	8,8						0,25	0,25	0,2
Тигециклин	3,8	3,3	6,6	7,5	18,6	28,3	25,2	6,8						0,125	0,25	0,1
Трим./сульфам.				34,9	26,3	11,4	12,9	2,6	2,5	4,1	3,7	0,5	1,3	0,06	1	0,1
Фузидиевая к-та			31,2	10,8	20,3	19,1	12,0	3,4	1,1	0,2	0,8	0,5	0,8	0,06	0,25	0,1
Мупиरोцин						7,1	18,4	35,6	22,1	8,9	5,5	0,4	2	0,5	2	0,7
Рифампицин	18,0	5,7	2,3	7,2	27,2	3,7	0,6	0,2	0,6	2,3	1,7	30,5		0,06	8	0,2

Примечание: серая заливка соответствует значениям резистентности по использованным критериям.

Таблица 6 – Распределение МПК антибиотиков в отношении изолятов СА-MRSA (%), n=194

Антибиотики	Антибиотики с диапазоном МПК 0,25 – 512 мкг/мл													МПК ₅₀	МПК ₉₀	C _r
	≤0,125	0,25	0,5	1	2	4	8	16	32	64	128	256	≥512			
Оксациллин		14,7		1,6	9,9	12,0	20,4	6,3	11,0	6,3	4,2	2,6	11,0	8	512	10,1
Цефокситин					1,4	1,4	18,9	33,1	21,6	10,1	3,4		10,1	16	512	27,3
Цефтаролин	10,9	42,2	33,9	10,4	2,6									0,25	1	0,3
Гентамицин	14,9	4,6	3,6	19,6	13,9	5,2	5,2	1,0	1,5	3,6	2,6	24,2		2	256	4,8
Ципрофлоксацин	20,6	1,5	24,2	15,5	3,6	2,1	2,1	3,6	9,8	3,1		1,5	12,4	1	512	2,5
Моксифлоксацин	64,4	3,1	2,1	8,2	11,3	7,7	2,1	1,0						0,125	4	0,3
Эритромицин	51,0	9,8	2,6	0,5	0,5	1,0			1,5	2,6	1,0	29,4		0,06	256	1,3
Клиндамицин	80	0,5	0,5		1,5			0,5			17,0			0,06	128	0,2
Тетрациклин	53,6	2,6	2,1	2,1	0,5	1,5	3,6	4,1	14,9	7,7	7,2			0,06	64	0,9
Антибиотики	Антибиотики с диапазоном МПК 0,004 – 16 мкг/мл													МПК ₅₀	МПК ₉₀	C _r
	0,004	0,008	0,016	0,03	0,06	0,125	0,25	0,5	1	2	4	8	≥16			
Ванкомицин							4,4	38,0	50,2	7,3				1	1	0,76
Тейкопланин					0,5	11,0	26,0	34,0	22,5	5,0	1,0			0,5	1	0,45
Телаванцин			33,5	0,5	41,9	21,7	2,5							0,06	0,125	0,05
Далбаванцин			60,8	20,1	14,7	3,4	1,0							0,016	0,06	0,02
Оритаванцин				36,8	27,8	25,7	9,7							0,06	0,125	0,05
Даптомицин					16,5	8,5	25,6	41,5	6,8	1,1				0,25	0,5	0,28
Линезолид								1,5	19,6	59,3	19,6			2	4	2,0
Тедизолид				8,0		4,0	80,0	8,0						0,25	0,25	0,2
Тигециклин	4,7		3,1	21,9	18,8	21,9	25,0	4,7						0,25	0,25	0,2
Трим./сульфам.				50,0	6,7	5,7	7,7	6,7	1,5	4,1	5,7	4,1	3,1	0,125	0,25	0,1
Фузидиевая к-та			42,8	2,6	5,7	5,7	21,1	10,8	2,1	0,5	3,6	2,1	2,6	0,032	8	0,2
Мупироцин						0,6	3,0	14,2	18,9	18,3	36,1	4,1	1,2	0,06	1	0,1
Рифампицин	59,3	1,0	0,5	4,1	19,6	5,2	2,1	0,5	1,0	0,5	0,5	5,7		2	4	2,1

Примечание: серая заливка соответствует значениям резистентности по использованным критериям.

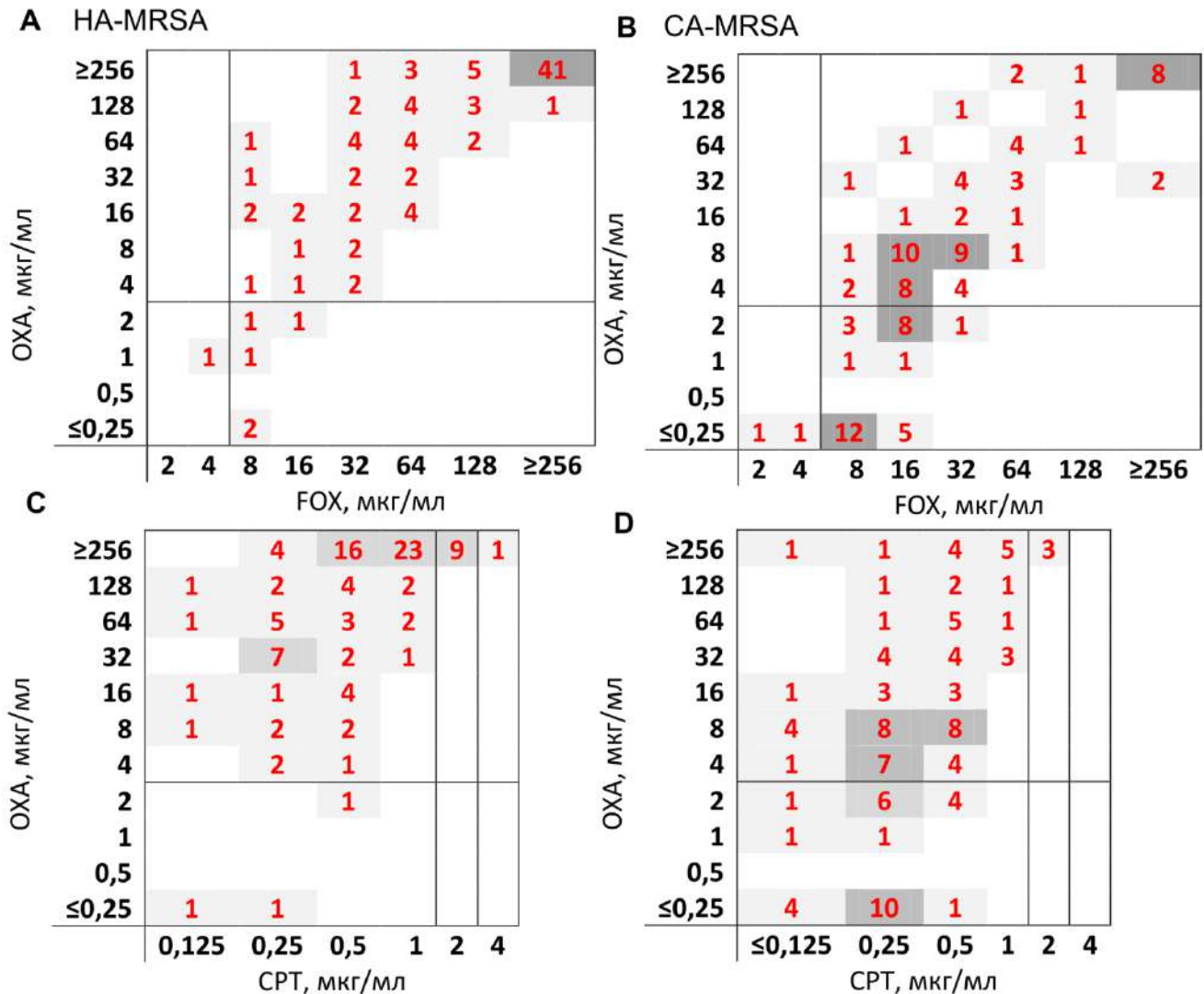


Рисунок 7 – Оценка чувствительности к бета-лактамам (скаттерплот, %). Сравнение МПК оксациллина и цефокситина в отношении HA-MRSA (A) и CA-MRSA (B); сравнение МПК оксациллина и цефтаролина в отношении HA-MRSA (C) и CA-MRSA (D).

Более высокая МПК и плотность изолятов с этими значениями к трем антибиотикам были характерны для HA-MRSA. Напротив, для CA-MRSA были характерны более низкие значения МПК (и их плотность) бета-лактаменных антибиотиков.

3.3. Оценка чувствительности к ванкомицину, даптомицину и липогликопептидным антибиотикам

Результаты данного раздела опубликованы в работе [296]. Подавляющее большинство изолятов MRSA проявляли чувствительность к ванкомицину с МПК₅₀ и МПК₉₀ – 1 и 2 мкг/мл,

соответственно. Аналогичные результаты были получены для тейкопланина. Единичные изоляты HA-MRSA (0,7%) характеризовались устойчивостью к ванкомицину (hVISA/VISA фенотипы с МПК = 4 мкг/мл) и тейкопланину (3,5% изолятов с МПК = 4 мкг/мл). Стоит отметить, что для тейкопланина критерий чувствительности по рекомендациям CLSI установлен как $S \leq 8$ мкг/мл. Среди CA-MRSA было выявлено два изолята с МПК тейкопланина = 4 мкг/мл. При сравнении активности ванкомицина и тейкопланина последний демонстрировал сдвиг МПК для HA-MRSA изолятов в более низкую концентрацию от 0,125 до 1 мкг/мл (81% значений) и имел МПК_{СТ} 0,82 мкг/мл, что ниже, чем МПК_{СТ} ванкомицина – 0,99 мкг/мл. Для CA-MRSA значение МПК_{СТ} тейкопланина составляло 0,45 мкг/мл (для ванкомицина – 0,76 мкг/мл). Количество изолятов со сниженной чувствительностью к ванкомицину (МПК = 2 мкг/мл) было выше среди HA-MRSA (15,6%) по сравнению с CA-MRSA (7,3%).

Для оценки чувствительности к липогликопептидным антибиотикам и даптомицину изначально была проведена оценка влияния дополнительных компонентов в среде (Р80 и соли кальция) на МПК с использованием контрольных штаммов. Различная концентрация Р80 в среде влияла на значение МПК. Полное отсутствие Р80 в среде в значительной степени влияло на повышение МПК ко всем липогликопептидам. Так, для штамма ATCC 29213 значения МПК в серии повторов были в диапазоне от 0,125 мкг/мл до 1 мкг/мл к оритаванцину, далбаванцину и телаванцину; для ATCC 700699 значения МПК составили от 2 мкг/мл до ≥ 4 мкг/мл. При добавлении Р80 в бульон Мюллера-Хинтон в концентрациях от 0,001% – 0,01%, МПК штамма ATCC 29213 находилась в пределах допустимых границ: $\leq 0,016$ – 0,06 мкг/мл; МПК штамма ATCC 700699 была в пределах 0,25 – 1 мкг/мл. Добавление Р80 в конечной концентрации 0,002% обусловлено необходимостью предотвращения адсорбции антибиотиков на поверхности полистироловых 96-луночных планшетов, что является критичным в методе серийных разведений в бульоне [297]. Уровень адсорбции липогликопептидов при использовании Р80 зависит также и от видов полистироловых 96-луночных планшет. Планшеты разных производителей по-разному влияют на степень адсорбции антибиотиков и значений МПК [298]. Для оценки чувствительности к даптомицину использовали разные конечные концентрации соли CaCl_2^{2+} . Было установлено, что увеличение или снижение концентраций CaCl_2^{2+} в среде приводило соответственно к снижению или увеличению МПК. Рекомендованная конечная концентрация кальция в среде должна составлять 50 мг/л. При концентрациях CaCl_2^{2+} 0 – 15 мг/л уровень МПК даптомицина повышался у контрольных штаммов до 1 – 2 мкг/мл (ATCC 29213) и до 4-х мкг/мл (ATCC 700699). Напротив, при увеличении CaCl_2^{2+} до 75 – 100 мг/л уровень МПК снижался до 0,125 мкг/мл (ATCC 29213) и 0,5 мкг/мл (ATCC 700699). В дальнейших сериях опытов было проверено сочетание добавок на чувствительность к

ванкомицину, даптомицину и липогликопептидам. В случае если в бульоне присутствовали обе добавки (Ca^{2+} + P80), это отражалось на изменении МПК ванкомицина, тейкопланина и даптомицина. Влияние отдельно добавленных CaCl_2^{2+} или P80 было антибиотик-специфичным. В этой связи в серийных разведениях использовались только рекомендованные для каждого антибиотика добавки в соответствующей концентрации.

Липогликопептиды проявляли более выраженную антибактериальную активность в отношении MRSA по сравнению с ванкомицином, тейкопланином и даптомицином. Так, МПК₉₀ липогликопептидов был на уровне 0,125 мкг/мл (таблицы 5-6) как у HA-MRSA, так и CA-MRSA изолятов. Среди MRSA до 9% изолятов характеризовались пограничными значениями МПК – 0,25 мкг/мл к телаванцину и оритаванцину. Данные изоляты характеризовались разной чувствительностью к ванкомицину, тейкопланину и даптомицину. По всей видимости, эффект «сползания» МПК связан с особенностями использования P80 и разных 96-луночных планшетов, что уже было отмечено ранее [297, 298]. Для далбаванцина 1% изолятов характеризовались МПК 0,25 мкг/мл, что по критериям CLSI является зоной чувствительности. Используя значения параметра МПК_{СТ} (мкг/мл), была проведена оценка зависимости между значениями МПК ванкомицина и другими антибиотиками. Так, была установлена тенденция к увеличению МПК липогликопептидов, а также даптомицина по мере увеличения МПК ванкомицина. Значение МПК_{СТ} оритаванцина, далбаванцина, телаванцина и даптомицина было в 1,5 раза выше у изолятов с МПК ванкомицина 2 мкг/мл, по сравнению с изолятами, имеющими МПК ≤ 1 мкг/мл (рис. 8).

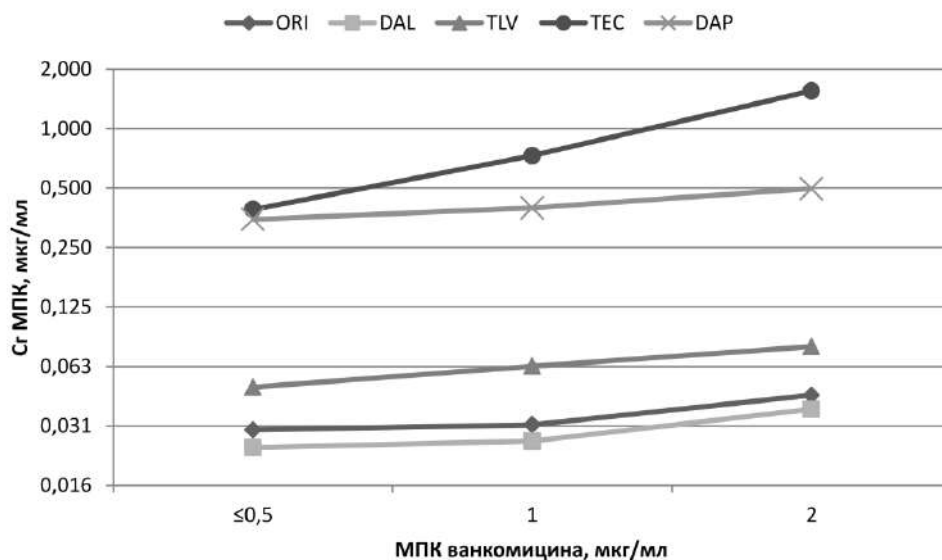


Рисунок 8 – Влияние МПК ванкомицина на МПК липогликопептидов (сравнение значений МПК_{СТ} на рисунке обозначен как Сг МПК). Рисунок был использован в работе [296].

По результатам оценки чувствительности в разных исследованиях отмечается, что изоляты со сниженной чувствительностью к ванкомицину (hVISA/VISA) характеризуются устойчивостью и к липогликопептидам [299, 300]. В ряде работ отмечается также формирование перекрёстной устойчивости между ванкомицином, даптомицином и липогликопептидами на фоне лечения этими антибиотиками [301].

3.4. Анализ ассоциированной устойчивости, профили резистентности

При анализе профилей резистентности, то есть оценке одновременной устойчивости изолятов к разным классам антибиотиков, не было выявлено пан-резистентных или экстремально-резистентных фенотипов. Для расчетов уровня ассоциированной устойчивости были взяты значения количества устойчивых изолятов, кроме оксациллина, цефокситина, липогликопептидов, оксазолидинонов и тигециклина. В данном анализе изоляты с МПК ванкомицина 2 мкг/мл рассматривались как устойчивые. Анализ профилей резистентности HA-MRSA и CA-MRSA позволил их отнести к фенотипам с множественной устойчивостью. Уровень ассоциированной устойчивости для HA-MRSA и CA-MRSA изолятов различался, однако можно выделить антибиотики с высокой резистентностью. В целом, для изолятов, относящихся к HA-MRSA, наблюдалась более выраженная степень антибиотикорезистентности (таблица 7), за исключением некоторых антибиотиков.

Таблица 7 – Сравнение уровня резистентности (%) к различным антибиотикам

Антибиотик	HA-MRSA			CA-MRSA			Уровень значимости (p)
	R	I	S	R	I	S	
Оксациллин	96,5	0,0	3,5	73,8	0,0	26,2	< 0,001*
Цефтаролин	0,8	8,8	90,5	0,0	2,6	97,4	0,5
Цефокситин	95,5	0,0	4,5	97,3	0,0	2,7	0,5
Гентамицин	70,2	0,0	29,8	57,2	0,0	42,8	0,002*
Рифампицин	35,1	4,5	60,5	7,7	7,7	84,5	< 0,001*
Ципрофлоксацин	93,4	6,6	0,0	38,1	61,9	0,0	< 0,001*
Моксифлоксацин	91,2	0,0	8,8	32,5	0,0	67,5	< 0,001*
Трим./сульфам.	1,7	3,7	94,6	11,9	5,7	82,5	< 0,001*
Клиндамицин	42,0	0,6	57,4	19,1	0,5	80,4	< 0,001*
Даптомицин	1,3	0,0	98,7	0,0	0,0	100,0	0,6
Эритромицин	57,5	1,4	41,1	35,6	0,5	63,9	< 0,001*
Ванкомицин	0,5	0,0	99,5	0,0	0,0	100,0	0,03
Ванкомицин (2)**	15,6			7,3			0,004*
Тетрациклин	50,5	0,2	49,4	39,2	0,5	60,3	0,03
Фузидиевая кислота	2,2	0,0	97,8	9,3	0,0	90,7	< 0,001*
Мупиноцин	16,8	0,0	83,2	63,3	0,0	36,7	< 0,001*

Примечание: * – статистически значимые различия при сравнении доли устойчивых (R) изолятов при $p < 0,01$. ** – для сравнения использовалось количество изолятов с МПК ванкомицина 2 мкг/мл.

Так, уровень резистентности составлял более 30% для следующих антибактериальных препаратов: фторхинолоны, гентамицин, эритромицин, клиндамицин, тетрациклин и рифампицин. Среди CA-MRSA в большей степени встречалась устойчивость к фузидиевой кислоте и триметоприму/сульфаметоксазолу. Для HA-MRSA медиана количества антибиотиков, к которым изоляты были одновременно устойчивы, составила 4 (нижний и верхний квартиль: 2 – 5), для CA-MRSA медиана составила 3 (2 – 5). При сравнении количества антибиотиков в профилях резистентности у CA-MRSA и HA-MRSA не было выявлено существенных различий (количественное распределение профилей резистентности представлено на рис. 9) за исключением профиля с шестью антибиотиками, где этот показатель более выражен для изолятов HA-MRSA.

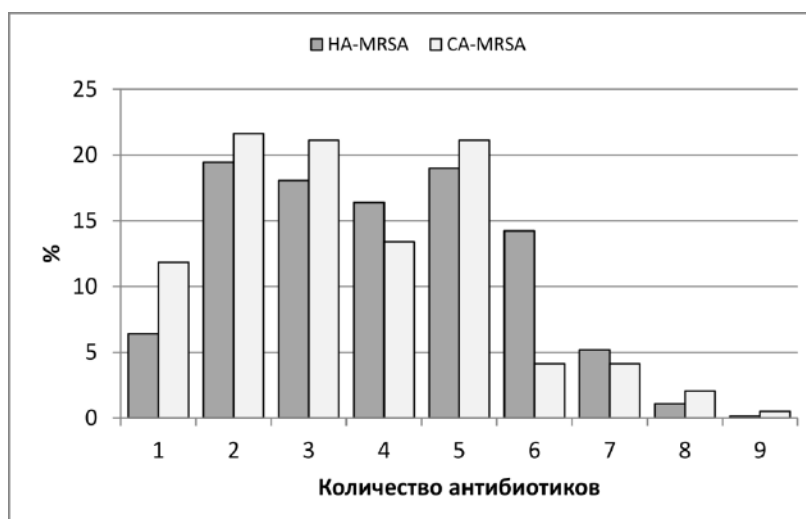


Рисунок 9 – Распределение изолятов HA-MRSA и CA-MRSA относительно анализа ассоциированной устойчивости к антибиотикам.

Наиболее критичными значениями устойчивости характеризовались фторхинолоны, к которым было устойчиво 93% изолятов HA-MRSA и 38% изолятов CA-MRSA. При этом диапазон значений МПК составлял для ципрофлоксацина 2 – 512 мкг/мл, моксифлоксацина – 0,5 – 128 мкг/мл. У изолятов CA-MRSA диапазон значений МПК моксифлоксацина составлял 0,5 – 16 мкг/мл, что свидетельствует о наличии разных мутаций в генах гираз и топоизомераз у представителей двух эпидемиологических кластеров. Высокий уровень устойчивости к гентамицину был характерен как для HA-MRSA (70,2%), так и CA-MRSA (57,2%), при этом диапазон МПК составлял 4 – 256 мкг/мл. К эритромицину проявляли устойчивость 57,5% HA-

MRSA и 35,6% CA-MRSA изолятов; конститутивная устойчивость к клиндамицину выявлена у 41,6% HA-MRSA и 18% CA-MRSA изолятов. К рифампицину в большей степени (35,1%) проявляли устойчивость HA-MRSA изоляты. Для оценки чувствительности к мупироцину был использован критерий EUCAST E-coff (МПК мупироцина $S < 2$ мкг/мл), при этом 63% CA-MRSA изолятов оценивались как изоляты со сниженной чувствительностью с диапазоном МПК $2 - \geq 16$ мкг/мл. Высокий уровень устойчивости – МПК > 128 мкг/мл, не определялся в настоящем исследовании. Качественный анализ состава профилей выявил большую вариативность среди обеих групп MRSA (101 комбинация антибиотиков в профиле у HA-MRSA, 60 – у CA-MRSA). Наиболее часто встречающиеся варианты (топ-10) ассоциированной устойчивости представлены в верхней части рисунка 10.

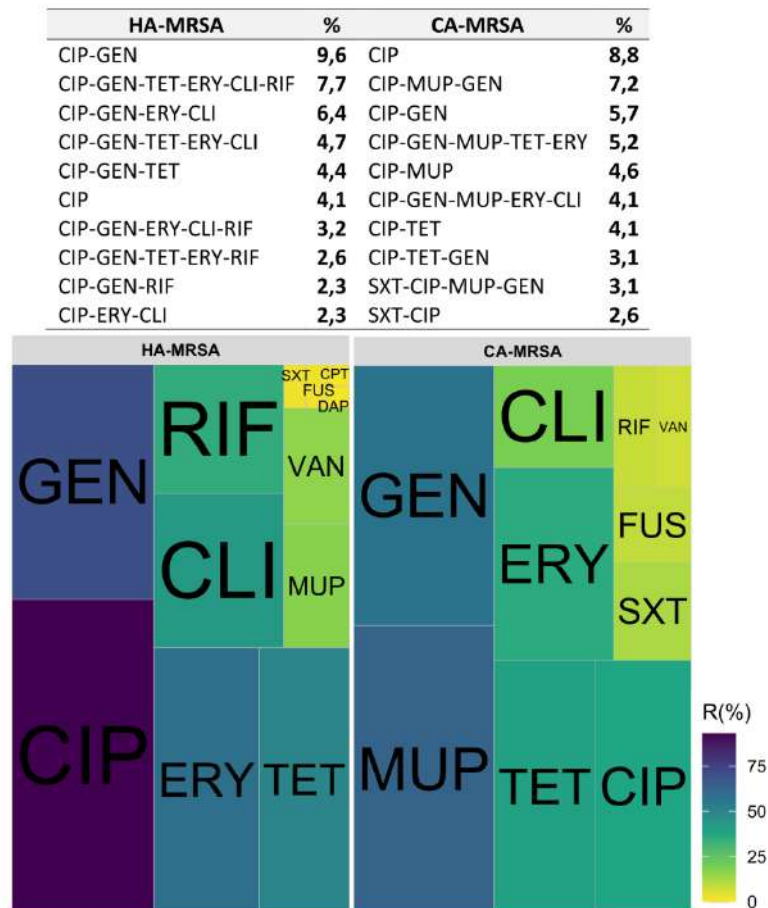


Рисунок 10 – Профили резистентности у HA-MRSA и CA-MRSA. В верхней части рисунка представлен топ-10 наиболее часто встречающихся профилей резистентности. В нижней части рисунка – совокупные спектры ассоциированной устойчивости HA-MRSA и CA-MRSA (цвет, размер текста и блоков в схемах коррелируют с количеством устойчивых изолятов к конкретному антибиотику); R(%) – доля устойчивых изолятов к конкретному антибиотику.

Представленные на рис. 10 профили встречались у 47% изолятов HA-MRSA и 48% - CA-MRSA. Например, наиболее частые профили устойчивости у HA-MRSA представлены комбинациями CIP-GEN (10%), CIP-GEN-TET-ERY-CLI-RIF (9%). У CA-MRSA наиболее представленные профили включают устойчивость к фторхинолонам (9%), CIP-MUP-GEN (7%). Совокупные спектры ассоциированной устойчивости HA-MRSA и CA-MRSA, включающие профиль и количество устойчивых изолятов, представлены в нижней части рисунка 10. Не было выявлено зависимости профилей резистентности от источника выделения, диагноза и медицинского центра. Изоляты как с минимальным, так и максимальным профилем с одинаковой частотой выделялись из различных источников в разных медицинских центрах. Во всей коллекции MRSA не было выявлено устойчивости к оксазолидинонам, тигециклину.

3.5. Заключение по главе: ассоциированная устойчивость MRSA в России

Сравнительный анализ чувствительности MRSA к различным антибиотикам выявил ожидаемо более высокий уровень устойчивости у нозокомиальных изолятов по сравнению с внебольничными. Первые описанные в мире изоляты CA-MRSA характеризовались почти полной чувствительностью к не бета-лактамам антибиотикам. Очевидно, что современные CA-MRSA приобрели и приобретают различные детерминанты резистентности и фенотипически – черты HA-MRSA. Это вызывает определенное беспокойство вследствие возможного неадекватного эмпирического назначения антибиотиков для лечения внебольничных инфекций. Еще один аспект, связанный с CA-MRSA, это относительно высокая частота выявления OS-MRSA фенотипов, которые могут быть пропущены при рутинном определении чувствительности к антибиотикам (раздел 5.2.). В свою очередь, HA-MRSA традиционно проявляют высокий уровень ассоциированной устойчивости к не бета-лактамам. Аминогликозиды, макролиды, клиндамицин, рифампицин, тетрациклин и фторхинолоны также могут использоваться для лечения стафилококковых инфекций только при наличии чувствительности. Однако по мере распространения HA-MRSA по миру уровень устойчивости к этим антибиотикам неуклонно растет. Распространение устойчивости для каждого класса не бета-лактамов антибиотиков в значительной степени различается в зависимости от географии, циркулирующих клонов, локальных используемых схем антибактериальной терапии и других факторов. В Российской Федерации по данным многоцентровых исследований [226, 302] для этих групп антибиотиков наблюдается высокий уровень устойчивости: 20 – 70%.

В настоящем исследовании не было обнаружено устойчивости к линезолиду, тедизолиду и тигециклину. Устойчивость к оксазолидинонам среди *S. aureus* и MRSA обнаруживается

крайне редко. По результатам разных международных многоцентровых исследований уровень выявления изолятов с высокими значениями МПК составляет менее 0,1% [303, 304]. К настоящему моменту в Российской Федерации в базе данных AMRmap [226] зарегистрировано только 0,03% изолятов с МПК линезолида 8 мкг/мл. Единичные клинические случаи устойчивости к оксазолидинонам описываются во многих странах мира, а также такие фенотипы обнаруживаются при инфекциях и носительстве у животных [228]. Устойчивость к тигециклину у клинических изолятов MRSA также встречается редко, менее 0,1% по результатам различных международных скрининговых программ, в мире описываются единичные случаи обнаружения изолятов с высокими значениями МПК [246]. В базе данных AMRmap количество изолятов *S. aureus* с МПК тигециклина 1 – 4 мкг/мл составляет 0,9%. Цефтаролин в настоящем исследовании проявлял высокую активность в отношении MRSA. Так, среди всех MRSA, доля изолятов с МПК ≤ 1 мкг/мл составила 92%, с МПК = 2 мкг/мл - 7,4%, устойчивых изолятов - 0,6%. В базе данных AMRmap 4,4% изолятов имеют МПК 2 мкг/мл и 0,3% изолятов – МПК > 2 мкг/мл. В целом, по результатам международных исследований, устойчивость к данному антибиотику регистрируется в 1 – 15% случаях. Например, в Северной Америке среди клинических изолятов MRSA 98,4% проявляли полную чувствительность (МПК ≤ 1 мкг/мл). В Латинской Америке и Европе около 83% клинических изолятов были чувствительны к цефтаролину [228], в Азии и Тихоокеанских странах регистрировалось 78,8% чувствительных изолятов [225]. Один из распространённых механизмов устойчивости к цефтаролину – мутации в PBP2a, которые, в свою очередь, чаще могут возникать у определённых генетических линий. Этим может частично объясняться географические различия в распространённости резистентности. Например, устойчивость чаще обнаруживается среди генетических линий, принадлежащих к ST239, ST228, ST241, ST247, ST22, ST5 и ST72. Перечисленные клоны преимущественно циркулируют в Европе, Азии, Австралии [228]. Стоит отметить, что при альтернативных механизмах устойчивости, не связанных с мутациями в *tesA* (PBP2a), не обнаруживается зависимости от принадлежности к разным генетическим линиям. Цефтаролин проявляет синергизм с даптомицином, что позволяет успешно использовать данную комбинацию для лечения осложненных форм стафилококковых инфекций [223]. Устойчивость к даптомицину встречается редко, но отмечаются случаи формирования устойчивости на фоне терапии ванкомицином или липогликопептидами [305]. По результатам программы МАРАФОН, проводимой в 2013-2014 гг., среди нозокомиальных *S. aureus* не было выявлено устойчивости к даптомицину, и только 11% изолятов характеризовались МПК = 1 мкг/мл (пограничное значение по критериям EUCAST/CLSI: S < 2 мкг/мл) [302]. Ванкомицин остается основным препаратом выбора для лечения инфекций, вызываемых MRSA. В настоящем исследовании среди всех MRSA было

выявлено 13% изолятов с МПК = 2 мкг/мл. Данное значение является пограничным (хотя и относится к зоне чувствительности) и коррелирует с неблагоприятными исходами антибактериальной терапии [306] и высокой вероятностью формирования hVISA/VISA фенотипов [307]. В базе данных AMRmap только 1,2% изолятов *S. aureus* имеют МПК = 2 мкг/мл; по результатам программы МАРАФОН (2013-2014) количество таких изолятов составляло 2,4% [302]. Альтернативой ванкомицину могут служить липогликопептидные антибиотики: оритаванцин, далбаванцин и телаванцин. По результатам мета-анализа Liu и соавт. [308], включающего 38 публикаций с анализом более чем 28000 изолятов, собранных по всему миру, устойчивость к липогликопептидам практически не регистрируется, и МПК₉₀ не превышает 0,125 мкг/мл (при использовании Р80 в *in vitro* исследованиях). Тем не менее, за последние несколько лет описаны клинические случаи устойчивости к этим антибиотикам на фоне лечения ванкомицином или даптомицином [215, 300]. В настоящем исследовании были обнаружены изоляты MRSA с более высокими значениями МПК (до 0,25 мкг/мл), по всей видимости, завышение МПК происходит вследствие особенностей использования добавки в среде Р80 и разных вариантов 96-луночных планшетов. Дискуссионным остается вопрос возможности использования липогликопептидов для лечения инфекций, вызываемых даптомицин-устойчивыми или hVISA/VISA изолятами. Фузидиевая кислота входит во многие рекомендации по лечению стафилококковых инфекций и, в частности инфекций, кожи и мягких тканей. Устойчивость к данному антибиотику регистрируется во многих странах, за исключением США, где этот препарат не разрешен для использования. Уровень устойчивости варьирует в разных географических регионах и не превышает 10% [309, 310]. В настоящем исследовании 9,3% CA-MRSA изолятов проявляли устойчивость к фузидиевой кислоте. Так же среди CA-MRSA высокий процент изолятов проявляли устойчивость к мупироцину, основному препарату, рекомендованному для санации от *S. aureus*, включая MRSA. Однако, стоит отметить, что 58% изолятов характеризовались невысоким уровнем МПК (2 – 8 мкг/мл), что можно расценивать как сниженную чувствительность. При этом допускается краткосрочное использование мупироцина в отношении изолятов со сниженной чувствительностью к нему (с МПК < 128 мкг/мл). Распространение высокого уровня устойчивости к мупироцину (МПК > 128 мкг/мл), обусловленное наличием гена резистентности *mupA*, различается в разных географических точках, но не превышает 10 – 15% [311]. Стоит также отметить, в настоящем исследовании было отмечено увеличение количества устойчивых изолятов HA-MRSA к рифампицину (35%) среди HA-MRSA по сравнению с данными из базы данных AMRmap (10%).

ГЛАВА 4 ОСОБЕННОСТИ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ К АНТИБИОТИКАМ У РАЗНЫХ ГЕНЕТИЧЕСКИХ ЛИНИЙ MRSA

4.1. Молекулярное типирование MRSA

В данной главе представлены результаты молекулярного типирования изолятов HA-MRSA и CA-MRSA с использованием методов SCC*mec*-, MLST- и *spa*-типирования. Основные результаты данного раздела опубликованы в работах [118, 312, 313]. Определение SCC*mec* типов было выполнено для всех изолятов. Для MLST- и *spa*-типирования изоляты были отобраны случайным образом, но включали все медицинские центры, все биологические материалы и весь временной интервал сбора. Изоляты с уникальными профилями резистентности также были включены для типирования. Таким образом, *spa*-типирование было проведено для 569 изолятов, MLST-типирование для 455 изолятов. Всего было выявлено 12 подтипов стафилококковых *mec*-кассет (SCC*mec*), 81 *spa*-тип и 31 уникальный сиквенс тип (ST), входящий в состав одиннадцати клональных комплексов (CC). Наиболее распространённые типы SCC*mec*, *spa*-типы и ST среди всей коллекции MRSA представлены в таблице 8. Популяционная структура циркулирующих клонов HA-MRSA и CA-MRSA в значительной степени различалась. Используя алгоритм eBURST с аннотацией по эпидемиологическому признаку (рис. 11) выявлено несколько особенностей. Во-первых, клональный паттерн различался, и большим разнообразием характеризовались CA-MRSA изоляты, что приближает их к клональной структуре MSSA. Во-вторых, для HA-MRSA установлено преобладание представителей CC8 и частично CC5, в то время как среди CA-MRSA преобладали представители CC22, CC59 и CC1.

Таблица 8 – Результаты молекулярного типирования коллекции изолятов MRSA (представлены наиболее часто встречающиеся варианты SCC*mec* и *spa*- и MLST-типы)

SCC <i>mec</i>	%	<i>spa</i>	%	MLST			
				ST	%	CC	%
SCC <i>mec</i> IVc	57,0	t008	28,0	ST8	43,0	CC8	64,2
SCC <i>mec</i> III- <i>ccrC</i>	20,4	t024	19,0	ST239	19,5	CC22	15,6
SCC <i>mec</i> IVa	6,2	t632	9,5	ST22	15,9	CC5	7,5
SCC <i>mec</i> I	4,5	t223	9,0	ST228	3,7	CC1	2,2
SCC <i>mec</i> V	3,5	t037	6,2	ST59	2,0	CC59	2,0
SCC <i>mec</i> III- <i>mer</i>	3,0	t030	3,2	ST1	1,7	CC398	0,8
SCC <i>mec</i> IV	2,0	t041	2,3	ST5	1,7		
SCC <i>mec</i> III	2,0	t321	2,0	ST2704	1,3		
Другие	2,0	t1950	1,8	ST72	0,6		
		t688	1,2	ST398	0,6		

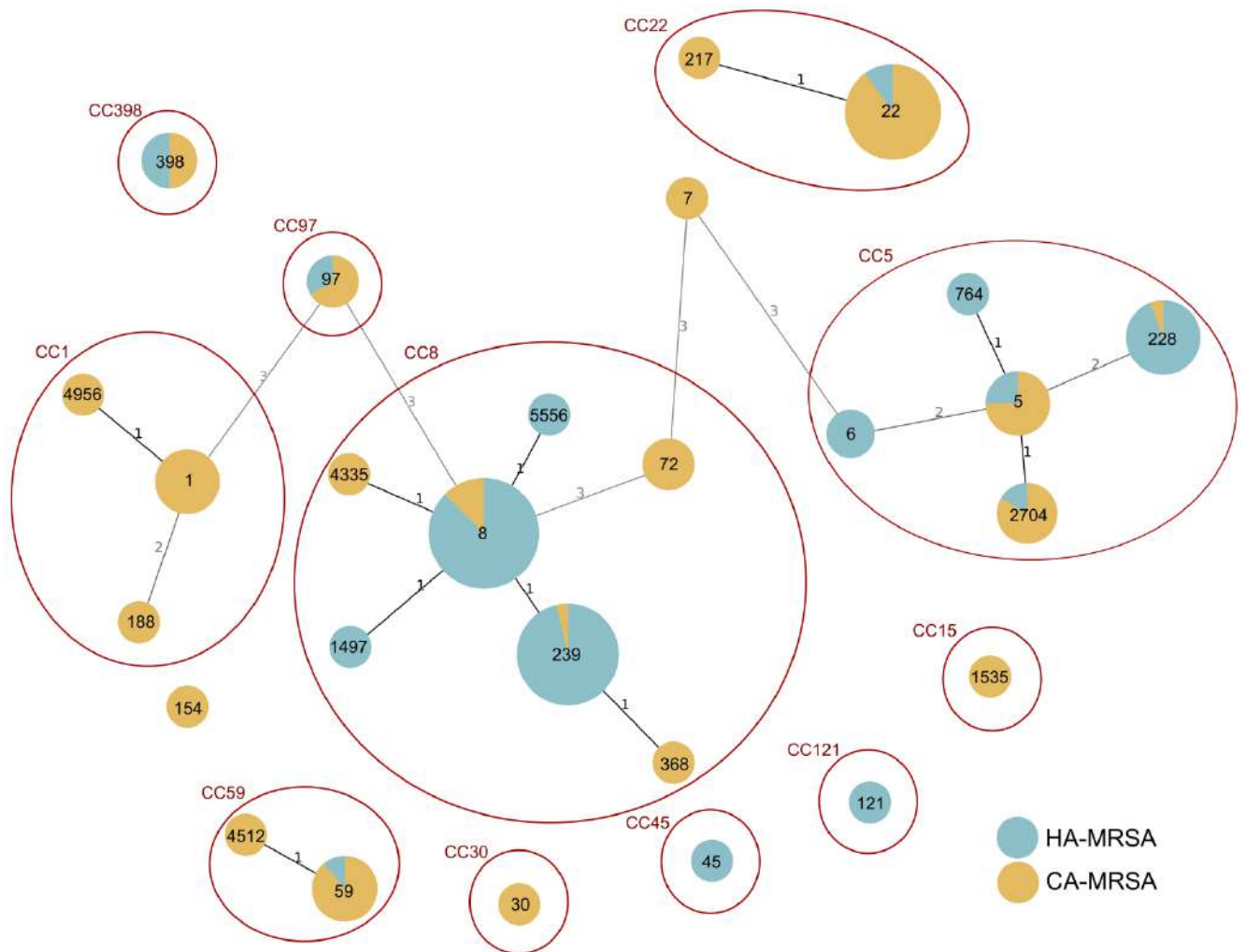


Рисунок 11 – Клональная структура популяции MRSA, циркулирующих в России. Карта построена по алгоритму eBURST на основании результатов MLST-типирования. Степень присоединения родственных клонов выбрана по наличию трех одинаковых локусов (triple locus variants, TLV), уровень TLV представлен на соединяющих линиях. Клональные комплексы (CC) обведены красным цветом. Размер окружностей соответствует количеству клонов в изучаемой выборке MRSA.

4.2. Сравнение чувствительности к антибиотикам среди доминирующих генетических линий

Для сравнительного анализа уровня устойчивости к антибиотикам были отобраны наиболее часто встречающиеся клоны, для которых был определен сиквенс-тип. Среди HA-MRSA, были отобраны ST8 (n=156), ST239 (n=111), ST228 (n=23), среди CA-MRSA – ST22 (n=70). Было отмечено, что представители разных генетических линий характеризовались различными особенностями чувствительности к антибиотикам. Анализируя профили

резистентности по параметрам, которые были описаны в разделе 3.4. статистически достоверно, наибольшей ассоциированной устойчивостью характеризовался генотип ST239, а наименьшей – ST22 (рис. 12А). Среди изолятов ST239 отмечался высокий уровень устойчивости к ципрофлоксацину (99%), тетрациклину (97%), рифампицину (96%), гентамицину (94%) и эритромицину (80%). Изоляты со сниженной чувствительностью к ванкомицину в большей степени встречались среди изолятов ST8 (19%, $p < 0,01$) по сравнению с другими генетическими линиями (рис. 12В). Также среди ST8 выявлялись изоляты со сниженной чувствительностью (МПК=2 мкг/мл) к даптомицину (2%). Уровень ассоциированной устойчивости к гентамицину, макролидам, фторхинолонам и тетрациклину был значительно ниже среди изолятов генетической линии ST22, чем среди изолятов других генетических линий (рис. 12С). Однако, среди ST22 в большей степени были представлены изоляты с устойчивостью к мупиноцину (63%), триметоприму/сульфаметоксазолу (17%), фузидиевой кислоте (11%). Среди ST228, как отмечалось ранее, чаще всего встречались изоляты со сниженной чувствительностью (50%) и устойчивостью (5%) к цефтаролину. Среди ST239 изоляты со сниженной чувствительностью к цефтаролину выявлены в 8% случаев, устойчивостью – в 1%.

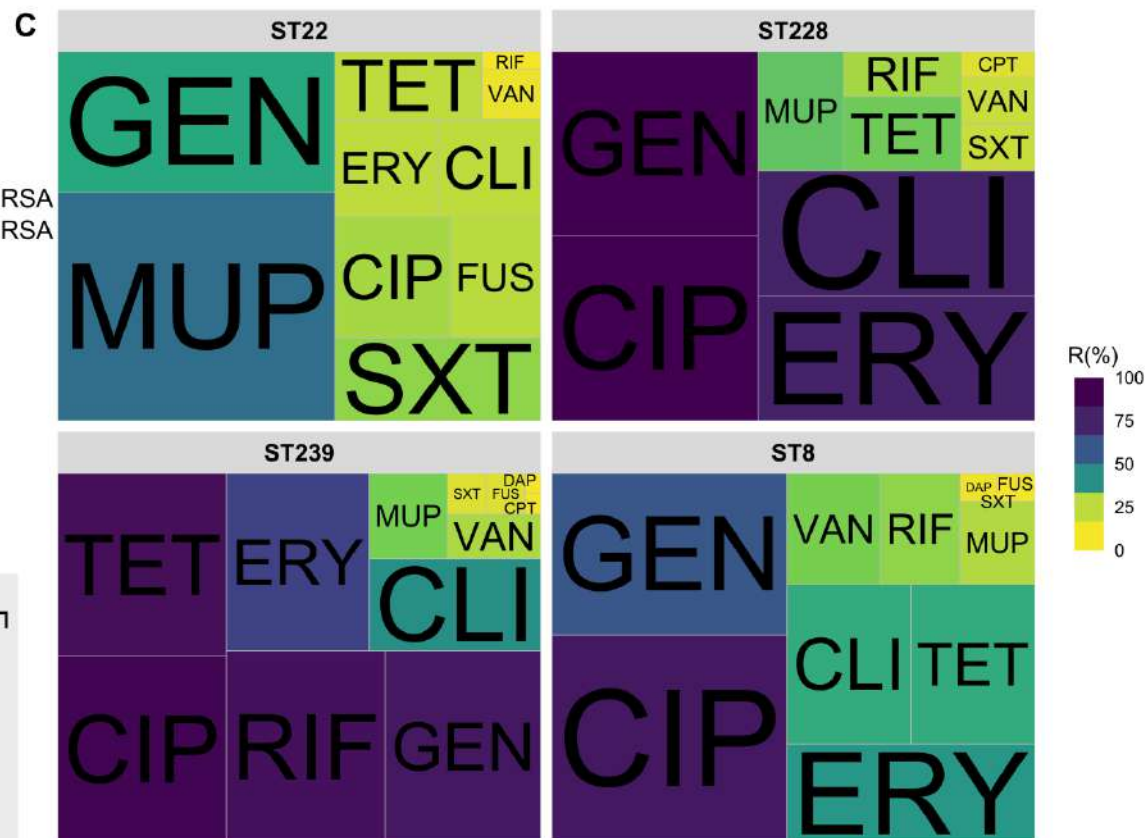
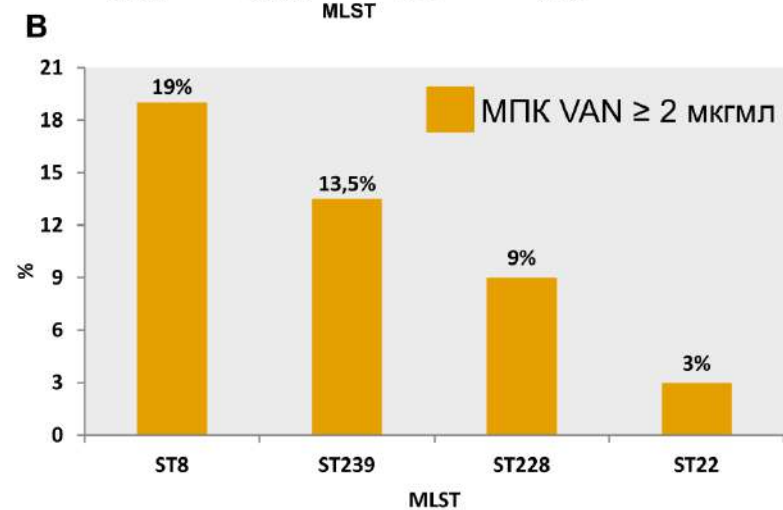
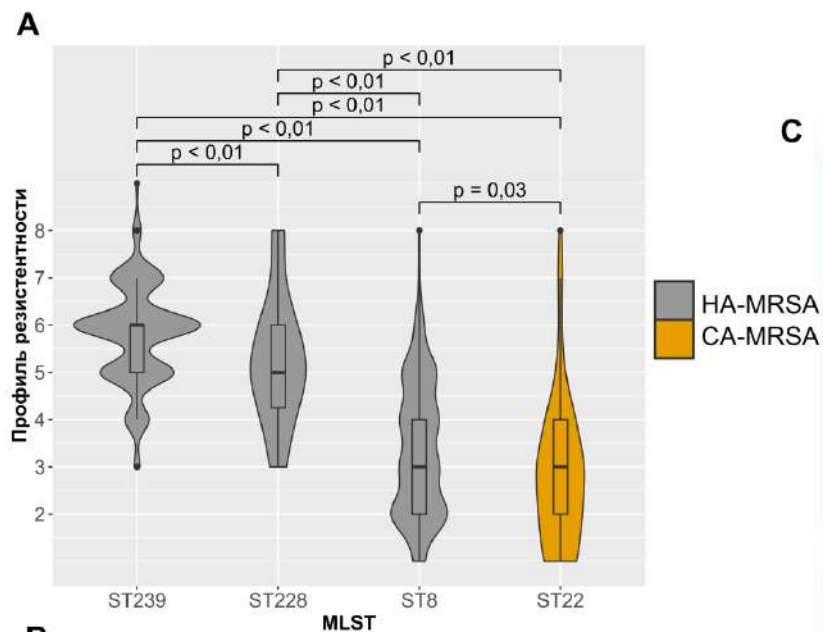


Рисунок 12 – Сравнение чувствительности к антибиотикам у разных сиквенс-типов MRSA. А – скрипичный график, сравнение профилей резистентности (количества антибиотиков к которым одновременно устойчивы изоляты, принадлежащие к конкретной генетической линии); В – распределение изолятов разных сиквенс-типов с МПК ванкомицина ≥ 2 мкг/мл; С – совокупные спектры ассоциированной устойчивости разных сиквенс-типов (цвет, размер текста и блоков в схемах коррелируют с количеством устойчивых изолятов к конкретному антибиотику); R(%) – доля устойчивых изолятов к конкретному антибиотику.

4.3. Молекулярная характеристика изолятов MRSA со сниженной чувствительностью к цефтаролину

Для расшифровки механизмов снижения чувствительности MRSA к цефтаролину было использовано несколько подходов. Во-первых, поиск мутаций в гене *mecA* (PBP2a) среди различных генетических линий, имеющих МПК цефтаролина 2 мкг/мл. Во-вторых, это определение MPC (mutant prevention concentration) и MSW (mutant selection window) для изолятов с разными значениями МПК к цефтаролину. В-третьих, геномное секвенирование двух изолятов, относящихся к ST228 как представителей генетической линии с наибольшей частотой встречаемости устойчивости к цефтаролину. Основные результаты по данному разделу были опубликованы в работах [229, 314].

4.3.1. Поиск мутаций в *mecA* (PBP2a), ассоциированных со снижением чувствительности к цефтаролину

Для секвенирования гена *mecA* были отобраны случайным образом изоляты MRSA (n=29) со сниженной чувствительностью к цефтаролину (МПК = 2 мкг/мл). Большинство изолятов (13/29) относились к CC5, сиквенс-типу ST228, *spa*-типу t041 и имели стафилококковую *mec*-кассету SCC*mec* IA (ST228-t041-SCC*mec* IA), совокупность представленных данных молекулярного типирования позволила отнести указанные изоляты к «Южно – Германскому» клону. Остальные изоляты соответственно относились к CC8: ST239-t632-SCC*mec* III.1 (5/29), ST239-t030/t037-SCC*mec* III.1 (4/29) и ST8-t008-SCC*mec* IVсе (2/29). Для контроля были взяты изоляты с МПК < 2 мкг/мл (n=29). Результаты секвенирования гена *mecA* представлены в таблице 9. Все изоляты, относящиеся к ST228, несмотря на чувствительность к цефтаролину, имели замену N146K. Аминокислотные замены D208E и T235I были характерны только для изолятов с МПК = 2 мкг/мл, замена G246E встречалась

среди изолятов с МПК < 2 мкг/мл. Не было выявлено мутаций в транспептидажном домене. Для изолятов, относящихся к ST8, не было выявлено мутаций.

Таблица 9 – Чувствительность к цефтаролину и мутации в *mecA* (PBP2a)

MLST, ST	МПК=2				МПК ≤ 1			
	n	spa	SCC <i>mec</i>	PBP2a	n	spa	SCC <i>mec</i>	PBP2a
ST228	14	t041	IA	N146K (14)	3	041	IA	N146K (3)
ST228	-	-	-	-	1	t2746	IA	N146K (1)
ST239	2	t030	III.1	E239K (2)	4	t030	III.1	Wt (2) E239K (1) N146K+N204K+G246E (1)
ST239	2	t037	III.1	N146K (1) N204K (1)	4	t037	III.1	Wt (2) N204K (1) N204K+G246E (1)
ST239	6	t632	III.1	N146K (3) N146K+D2 08E (1) N204K + T235I (2)	4	t632	III.1	Wt (2) E239K (1) N204K (1)
ST8	5	t008	IVce	Wt (5)	9	t008	IVce	Wt (9)
ST22	-	-	-	-	4	t223	IVa	Wt (3) G246E (1)

Примечание: WT – мутации не обнаружены.

4.3.2. Оценка MPC и MSW цефтаролина

Для эксперимента были отобраны 8 изолятов с МПК цефтаролина от 0,25 до 2 мкг/мл, относящихся к нескольким сиквенс типам. В качестве контроля использовался штамм *S. aureus* ATCC29213. Результаты определения MPC представлены в таблице 10. Максимальным значением MPC = 32 мкг/мл характеризовались два изолята, принадлежащие к широко распространенному в России генотипу ST8-t008-SCC*mec* IVce. При этом окно селекции (MSW) для этих изолятов было в широком диапазоне и составляло 2-16 мкг/мл. Такие данные свидетельствуют о высокой потенциальной возможности формирования устойчивости к цефтаролину у данного генотипа.

Таблица 10 – Результаты определения MPC для изолятов с разными значениями МПК цефтаролина

Изолят	Год выделения	Генотип	МПК	MPC ₉₀	MSW (MPC/MIC)
ATCC29213	-	ST5-t002	0,5	0,5	-
SA0520	1998	ST8-t008-SCC <i>mec</i> IVce	0,25	0,25	-
SA0422	2011	ST8-t008-SCC <i>mec</i> IVce	2	32	4 - 16
SA0077	2011	ST8-t008-SCC <i>mec</i> IVce	1	32	2-16
SA0085	2011	ST239-t632-SCC <i>mec</i> III.1	1	8	2 - 4
SA0420	2011	ST239-t632-SCC <i>mec</i> III.1	2	8	4
SA0146	2011	ST228-t041-SCC <i>mec</i> IA	2	4	2
SA0428	2013	ST228-t041-SCC <i>mec</i> IA	2	8	4

Наряду с этим, один изолят относящийся к этому же клону, но выделенный в 1998 году, характеризовался очень низким значением MPC (0,25 мкг/мл), и при этом МПК также составила 0,25 мкг/мл. Это свидетельствует об отсутствии гетерорезистентности и, соответственно, низкой вероятности формирования мутантов. Для генотипов ST228-t041-SCC*mec* IA и ST239-t632-SCC*mec* III.1 уровень MPC составлял 4-8 мкг/мл с окном селекции 2-8 мкг/мл. Не было обнаружено зависимости уровня МПК от значения MPC. Определение параметров MPC является важным исследованием для микроорганизмов, механизмы резистентности которых связаны с формированием мутаций. Полученные данные свидетельствуют о высокой вероятности появления устойчивости к цефтаролину среди изолятов доминирующей Российской генетической линии ST8-t008-SCC*mec* IVce.

Таким образом, полученные данные совпадают с ранее полученными результатами о неоднозначной роли мутаций в не транспептидазном домене PBP2a. Такие мутации могут встречаться как среди чувствительных, так и устойчивых изолятов MRSA [228]. Ранее роль мутаций в *mecA* была изучена по данным рентген кристаллографического анализа. Так, было показано, что молекула цефтаролина взаимодействует сразу с двумя доменами белка PBP2a, аллостерическим и транспептидазным [315]. Поэтому при возникновении мутаций только в аллостерическом домене цефтаролин связывается с транспептидазным доменом, что приводит к снижению МПК только до 2 мкг/мл, но как только происходят изменения в активном центре белка (например, замены в позициях Y446N и E447K), происходит повышение МПК до высоких значений. Несмотря на существующие критерии оценки чувствительности, недавние исследования, проведенные по изучению фармакокинетики и фармакодинамики, показывают, что стандартные дозировки препарата преодолевают уровень МПК в 2 мкг/мл [316, 317]. В таблице 11 представлены аминокислотные замены, описываемые среди клинических изолятов MRSA с МПК цефтаролина ≥ 2 мкг/мл (составлено на основе обзора [228]).

Таблица 11 – Мутации в PBP2a и их клиническая значимость

Домен	nPBD	TD
Аминокислотные замены	N104K, V117I, M122I, D139W, N146K, E150K, E170K, V117I, N204K, N206K, D208E, S225R, A228V, T235I, N236K, E239K, G246E, K281R	H351N/Q, L357I, Y446N, E447K, I563T, S649A
МПК	≤ 2 мкг/мл	≥ 2 мкг/мл
Распространение	5 – 15%	< 1 %
Применение СРТ в клинике	ИКМТ, максимальные дозы при МПК = 2 мкг/мл	Нет

Примечание: nPBD – не транспептидазный, аллостерический домен; TD – транспептидазный домен; СРТ – цефтаролин; ИКМТ – инфекции кожи и мягких тканей.

Большинство изолятов MRSA со сниженной чувствительностью к цефтаролину относилось к генетической линии ST228 – t041 – SCCmec IA. Данная генетическая линия имеет, по всей видимости, Европейское происхождение.

4.4. Фенотипические, генотипические особенности OS-MRSA и механизмы, ассоциированные с чувствительностью к бета-лактамам

Основные результаты фенотипического и генотипического типирования OS-MRSA представлены в работе [318]. В коллекции изолятов стафилококков было выявлено 60 фенотипов OS-MRSA, проявляющих чувствительность к оксациллину, но имеющих ген mecA. Все OS-MRSA изоляты характеризовались МПК ≤ 2 мкг/мл, определенным методом серийных разведений. Данный фенотип превалировал среди CA-MRSA (n=49, 24%), среди HA-MRSA эти изоляты были определены в 2% случаев (n=11). Анализ генотипов на основании данных MLST и spa-типирования позволил выделить 12 сиквенс-типов, подавляющее большинство из них относились к клонам ST22-t223-SCCmec IVc («Газа клон») и ST59, остальные генотипы представлены в Таблице 12. Генетическая линия ST59 («Тайваньский клон») часто ассоциирована с фенотипом OS-MRSA и описывается в Тайване и континентальном Китае, где этот клон является доминирующим [178, 319]. Полногеномное секвенирование и филогенетический анализ 60-ти изолятов OS-MRSA, основанный на выравнивании 117726 core-SNPs, представлен на рис. 13. Двенадцать сиквенс типов формировали 12 филогенетических клад, что свидетельствует об отсутствии клонального распространения OS-MRSA в разное время и в разных географических точках. OS-MRSA характеризовались наличием SCCmec IV и

V типов, семь изолятов были *blaZ*-отрицательными (таблица 12). Гены *bla* (*blaZ*, *blaR1*, *blaI*) имели плазмидную локализацию, за исключением изолятов ST22 и ST1, у которых *blaZ* локализовался в хромосоме. Изоляты демонстрировали низкий уровень ассоциированной устойчивости, среднее количество детерминант резистентности к антибиотикам на изолят, за исключением бета-лактамов, составляло 2 (1 – 3) детерминанты. Гены устойчивости включали: *ermB*, *ermC*, *cat*, *fexA*, *fusC*, *tetK*, *tetM*, *aac(6')-aph(2'')*, *ant(6)-Ia*, *aph(3')-III* и мутации в генах *gyrA* (S84L) и *parC* (S80F). Все изоляты были чувствительны к ванкомицину, даптомицину, линезолиду, тигециклину и цефтаролину. Распределение генов вирулентности у OS-MRSA было связано со специфическими сиквенс-типами. В частности, *lukFS* (PVL) были идентифицированы у изолятов ST2704, токсин *tsst* у ST22 и *seb* – у ST59. При оценке чувствительности OS-MRSA к разным бета-лактамам был отмечен ряд особенностей. Большинство изолятов демонстрировали чувствительностью к комбинации PEN-CL при ECOFF ≤ 2 мкг/мл (критерии использовали из работы Harrison и соавт. [320]), тогда как изоляты HA-MRSA, использованные в качестве контроля, имели МПК > 16 мкг/мл. Диапазон значений МПК для других бета-лактамов был следующим: пенициллин 0,125–32 мкг/мл, амоксициллин 2 – 128 мкг/мл, амоксициллин-клавуланат 1–64 мкг/мл и меропенем 0,125–2 мкг/мл (Таблица 13).

У всех OS-MRSA были идентифицированы мутации в промоторной области гена *tesA* в положениях -7 с заменой G→T/A или -33 с заменой C→T (Таблица 12). У одного изолята была обнаружена мутация A→G в положении -38, связанная с устойчивостью к комбинации пенициллин-клавуланата, такой механизм ранее был описан в исследовании Chen и соавт. [321]. Также были идентифицированы мутации в белке PBP2a. Так, у большинства изолятов обнаруживалась мутация E246G, прочие мутации перечислены в таблице 12. Анализ представленности транскриптов *tesA* показал, что OS-MRSA характеризовались низким уровнем экспрессии. Базальный уровень экспрессии *tesA* у изолятов OS-MRSA с мутацией в промоторе *tesA* в положении -7 был в среднем в 8 раз меньше ($p < 0,05$) по сравнению с контрольным изолятом ST8-HA-MRSA (рис. 14B). Еще более низкий уровень экспрессии, в 440 раз меньше, наблюдался у изолятов с мутацией в положении -33 ($p < 0,05$) по сравнению с контролем. Добавление в среду оксациллина индуцировало повышение числа *tesA*-транскриптов как у контрольного изолята (в 2 раза, $p < 0,05$), так и у OS-MRSA (в 10 – 150 раз $p < 0,05$). Однако, при сравнении уровня индуцированной экспрессии OS-MRSA с контролем, он оставался низким ($p < 0,05$): для изолятов с мутацией в положении -33 в 4 раз меньше, для изолятов с мутацией в положении -7 в 2 раза меньше.

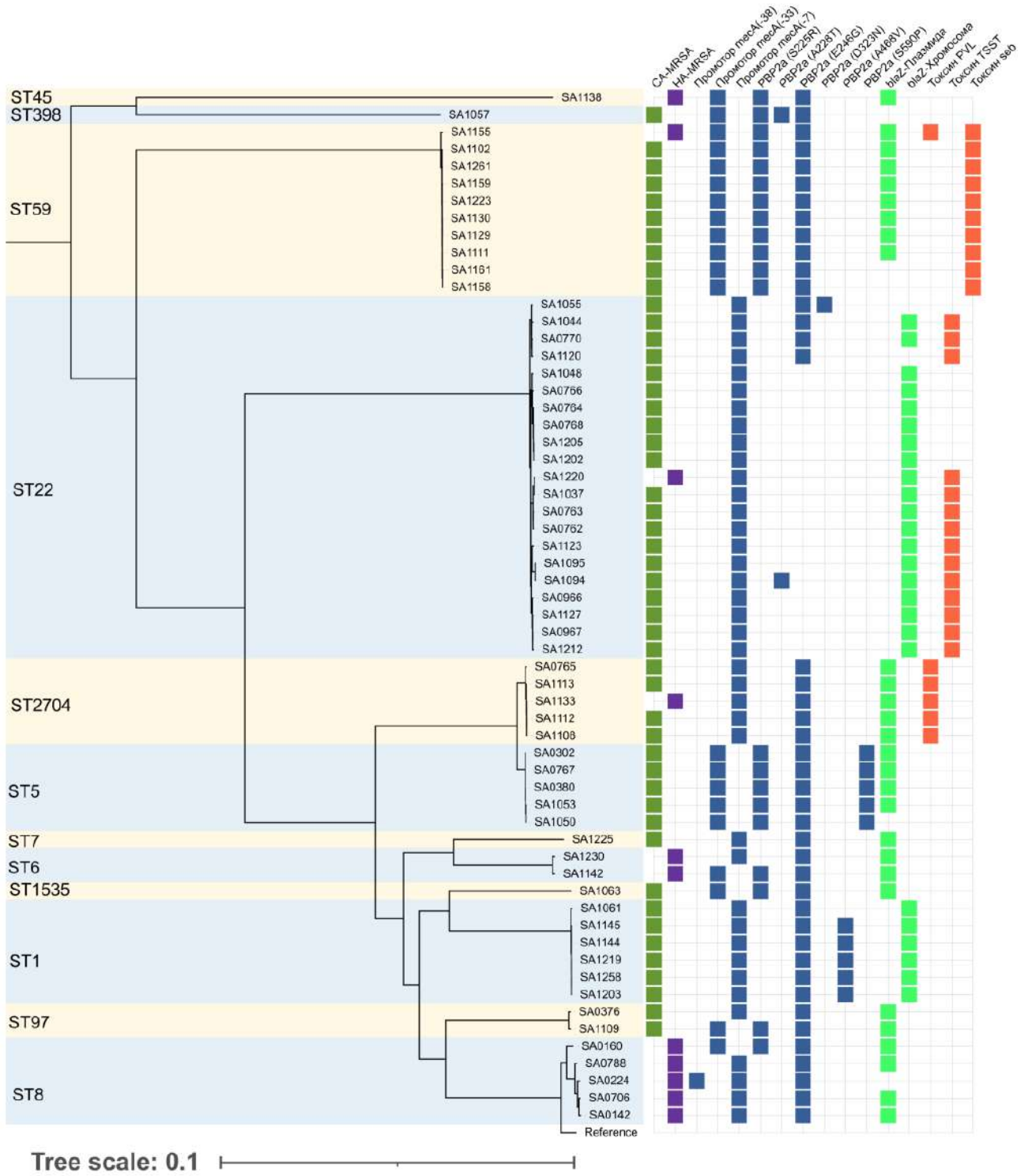


Рисунок 13 – Филогенетический анализ изолятов OS-MRSA, в качестве референс генома (Reference) использован геном *S. aureus* NCTC8325.

Таблица 12 – Генотипы и мутации, ассоциированные с чувствительностью к оксациллину у *mecA*-положительных *S. aureus*

MLST, ST	<i>Spa</i> -тип	SCC <i>mec</i>	<i>blaZ</i> *	Мутации в промоторе <i>mecA</i> , позиция:			PBP2a						N (абс.)
				-38	-33	-7	S225R	A228T	E246G	D323N	A468V	S590P	
ST22	t223	IVa, IVc	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	17
ST22	t223	IVa, IVc	+/- (1)	-	-	+	-	-	+	-	-	-	3
ST22	t223	IVc	-	-	-	+	-	-	+	+	-	-	1
ST59	t1950	Vb	+/- (2)	-	+	-	+	-	+	-	-	-	10
ST1	t321	IVa	+	-	-	+	-	-	+	-	+	-	5
ST1	t127	IVa	+	-	-	+	-	-	+	-	-	-	1
ST8	t008	IVc	+	-	-	+	-	-	+	-	-	-	3
ST8	t008	IVc	-	+	-	+	-	-	+	-	-	-	1
ST8	t3308	V	+	-	+	-	+	-	+	-	-	-	1
ST5	t688	V	+/- (1)	-	+	-	+	-	+	-	-	+	5
ST2704	t002	IVc	+	-	-	+	-	-	+	-	-	-	5
ST97	t359	IVb	+	-	-	+	-	-	+	-	-	-	1
ST97	t9129	V	+	-	+	-	+	-	+	-	-	-	1
ST6	t1950	V	+	-	+	-	+	-	+	-	-	-	1
ST6	t304	IVa	+	-	-	+	-	-	+	-	-	-	1
ST45	NT	Vc	+	-	+	-	+	-	+	-	-	-	1
ST398	t034	Vc	-	-	+	-	+	+	+	-	-	-	1
ST1535	t084	V	+	-	+	-	+	-	+	-	-	-	1
ST7	t091	IVa	+	-	-	+	-	-	+	-	-	-	1

Примечание: представлены наиболее преобладающие варианты SCC*mec* и *spa*-типы; * - в скобках отмечено количество *blaZ*-отрицательных изолятов; NT – не типизируемый изолят.

Таблица 13 – Оценка чувствительности OS-MRSA к разным бета-лактамам, используя метод серийных разведений

АБ	МПК, мкг/мл											
	Распределение (абс. значения)									С _{геом}	МПК ₅₀	МПК ₉₀
	≤0,125	0,25	0,5	1	2	4	8	16	≥32			
OXA	0	29	1	3	27	0	0	0	0	2,6	0,5	2
FOX	0	0	0	0	2	0	29	26	3	11,3	8	16
PEN	2	2	4	9	14	11	14	3	1	2,6	4	8
PEN-CL	1	9	19	21	7	2	1	0	0	0,7	1	2
AMX	0	0	0	0	2	1	2	20	35	26,3	32	64
AMX-CL	0	0	0	1	8	21	24	4	2	5,7	8	16
MER	5	19	24	7	5	0	0	0	0	0,5	0,5	2

Примечание: OXA – оксациллин, FOX – цефокситин, PEN – пенициллин, PEN-CL – пенициллин-клавуланат, AMX – амоксициллин, AMX-CL – амоксициллин-клавуланат, MER – меропенем, С_{геом} – средняя геометрическая.

Статистически значимой разницы между индуцированным уровнем экспрессии у изолятов OS-MRSA с разными мутациями в промоторе гена *tesA* выявлено не было ($p = 0,3$). Ранее в исследовании Harrison и соавт. была описана чувствительность к пенициллину-клавуланату среди большой коллекции MRSA, принадлежащих к разным генетическим линиям [320]. Авторы показали, что такая чувствительность связана с наличием одновременно мутаций в промоторе *tesA* и аминокислотных замен в PBP2a, что в свою очередь влияет на низкую экспрессию. Следует отметить, что возможность использования этой комбинации для лечения инфекции MRSA обсуждалась в исследованиях 1980-х годов [322].

4.4.1. Сравнение фенотипических методов выявления OS-MRSA

По результатам серийных разведений в бульоне с оксациллином, 100% изолятов характеризовались ложной чувствительностью ($\text{МПК} \leq 2$ мкг/мл). Сравнительный анализ различных методов для определения фенотипа метициллинрезистентности показал, что тесты на основе цефокситина гораздо более специфичны для выявления *tesA*-положительных фенотипов. В частности, наибольшей положительной прогностической ценностью ($\text{PPV} > 0,95$) характеризовались следующие методы: серийные разведения, использование автоматической системы VITEK® 2 и хромогенных сред (таблица 14). Добавление 2% хлорида натрия в среду значительно увеличивало PPV (до 0,92) в тестах на основе оксациллина, в работе [323] ранее также было продемонстрировано, что добавление NaCl в концентрациях 2 – 4% в значительной степени увеличивает возможность детекции OS-MRSA. При использовании OXA-ДДМ

количество ложночувствительных результатов снижалось с 68% до 15%, при использовании ОХА-ГДМ количество ложночувствительных результатов снижалось с 81% до 22%.

Таблица 14 – Сравнение различных методов определения метициллинрезистентности у *mesA*-положительных изолятов OS-MRSA

Тесты	S ^A (n)	R ^A (n)	PPV	МПК (мкг/мл) или ДДМ (мм)		МПК ₅₀	МПК ₉₀
				Диапазон	C _{геом}		
ОХА-СР	60	0	0	0,25 – 2	0,7	0,5	2
ОХА-ГДМ	49	11	0,18	0,5 – 24	1,6	1,5	4
VITEK® 2-ОХА	53	7	0,11	≤0,25 – >4	НП	НП	НП
ОХА-ДДМ ^B	41	19	0,32	0 – 23	14	НП	НП
ОХА-ГДМ-NaCl	13	47	0,78	1 – 256	4,7	4	16
FOX-ГДМ	12	48	0,8	3 – 64	9,7	8	16
FOX-ГДМ-NaCl	10	50	0,83	4 – 48	9,1	8	16
FOX-ДДМ	7	53	0,9	0 – 25	18	НП	НП
ОХА-ДДМ-NaCl ^B	5	55	0,92	0 – 19	0	НП	НП
FOX-ДДМ-NaCl	5	55	0,92	8 – 24	18,5	НП	НП
FOX-СР	2	58	0,96	2 – 32	11	8	16
ХС	2	58	0,96	НП	НП	НП	НП
VITEK® 2-FOX	1	59	0,98	НП	НП	НП	НП

Примечание: А – интерпретация в соответствии с рекомендациями EUCAST 2022; В – критерий устойчивости был взят как $R \leq 10$ мм; Аббревиатуры: ОХА – оксациллин, FOX – цефокситин, ГДМ – градиентный диффузионный метод; ДДМ – диско-диффузионный метод, C_{геом} – средняя геометрическая; ХС – хромогенная среда; NaCl – среда с добавлением 2% NaCl; НП – не применимо; PPV – положительная прогностическая ценность; СР – определение МПК методом серийных разведений в бульоне; VITEK® 2 – использование автоматического бактериологического анализатора VITEK® 2 Compact (bioMérieux, Франция).

Согласно ранее опубликованным исследованиям, OS-MRSA можно разделить на цефокситин-устойчивые/оксациллин-чувствительные и цефокситин-чувствительные/оксациллин-чувствительные изоляты. Однако в большинстве предыдущих исследований интерпретации тестов на основе цефокситина включали либо только ДДМ, либо автоматические анализаторы без множественных сравнений. В настоящем исследовании, используя комплекс различных подходов для детекции устойчивости, было обнаружено несоответствие между разными подходами. Так интерпретация результатов методов диффузии не совпадала с интерпретацией результатов серийных разведений или других подходов. Аналогичные наблюдения были описаны в предыдущих исследованиях [178, 324, 325]. Тем не менее, проведенное сравнительное исследование показало наличие корреляций между разными подходами для детекции метициллинрезистентности (рис. 14А).

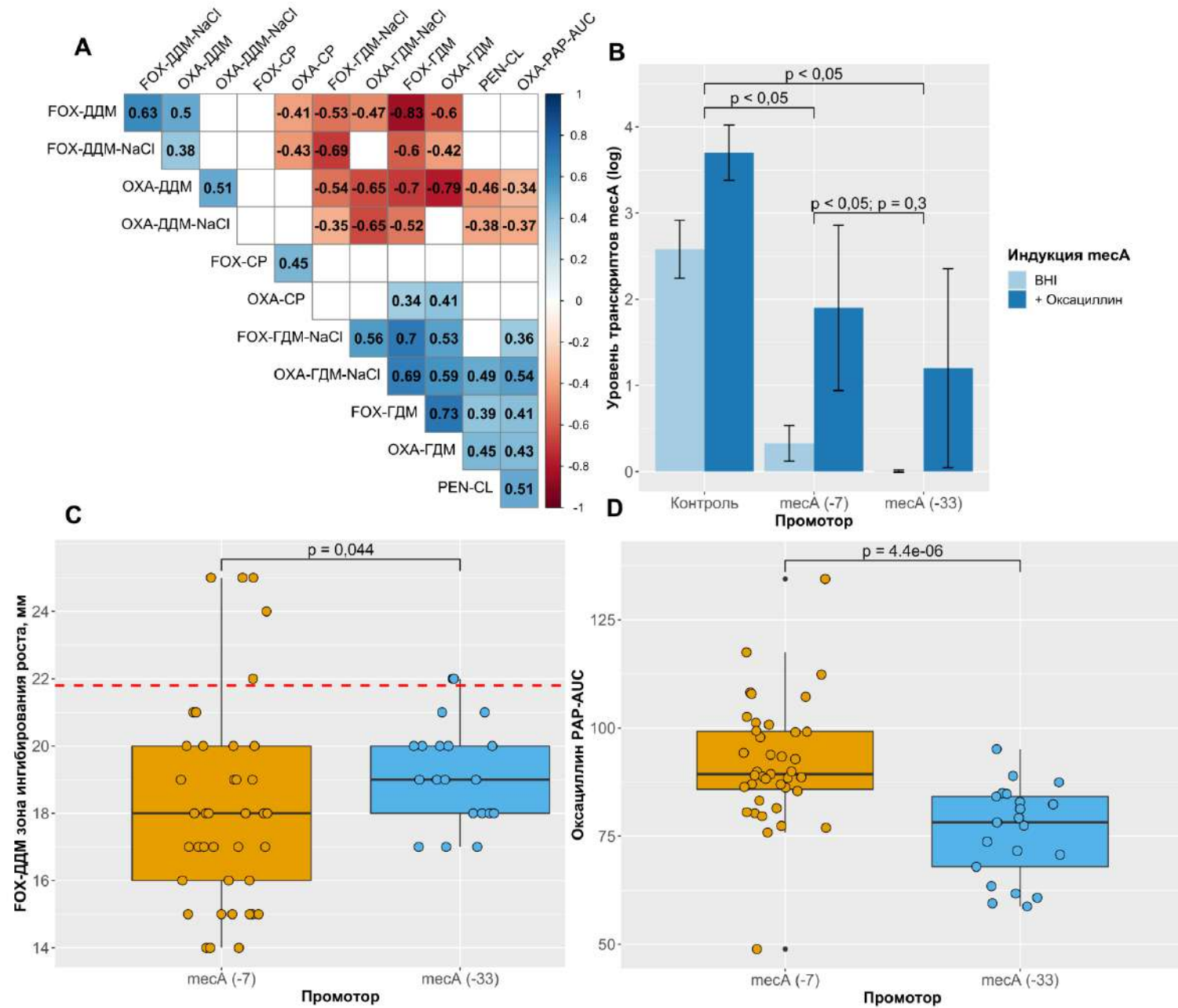


Рисунок 14 – Фенотипические и генотипические особенности OS-MRSA. А – коррелограмма корреляционного анализа, включающая разные результаты тестов чувствительности к антибиотикам. Отмечены только значения корреляции при $p < 0,01$, аббревиатуры аналогичны примечанию таблицы 14. В – изменение уровня экспрессии гена *tesA* в зависимости от типа мутаций в промоторной области (ген *nuc* использовался как референс) и индукции под воздействием 0,016 мкг/мл оксациллина в среде ВНІ. В качестве контроля использовался штамм HA-MRSA ST8-SCC*tes* IV. С – Распределение значений зон задержек роста вокруг диска с цефокситином у изолятов в зависимости от типа мутаций в промоторной области гена *tesA*. D – Распределение значений PAP-AUC у изолятов в зависимости от типа мутаций в промоторной области.

В частности, наибольшая ($r_s > 0,7$, $p < 0,001$) отрицательная или положительная корреляция обнаружена в следующих случаях. Увеличение МПК в тестах FOX-ГДМ коррелировало с увеличением МПК в среде с 2% NaCl, с увеличением МПК в ОХА-ГДМ и уменьшением зоны ингибирования в FOX-ДДМ. Повышение МПК при постановке ОХА-ГДМ коррелировало с уменьшением зоны ингибирования при учете ОХА-ДДМ. Корреляция между значениями МПК пенициллин-клавуланата и разными тестами для определения чувствительности к антибиотикам была низкой или не обнаружена. Выявлена тенденция ($p = 0,044$) влияния вариантов мутаций в промоторе на распределение зон ингибирования в FOX-ДДМ (рис. 15С). Среднее значение диаметров зон задержки роста в ДДМ с диском цефокситина составила - 18 ± 4 мм. Для изолятов с мутацией в позиции -33 диапазон значений диаметров зон ингибирования составлял 17-22 мм, тогда как у изолятов с мутацией в положении -7 распределение значений было более широким (14-25 мм). При оценке распределения зон задержки роста FOX-ДДМ было выявлено, что диапазон границ колеблется от 14 мм до 28 мм, при этом 67% значений было в диапазоне 17 – 21 мм, что очень близко к границе чувствительности 22 мм (критерии EUCAST 2022 – 2023). При использовании FOX-ГДМ диапазон значений МПК составлял 3 – 64 мкг/мл, при этом 50% значений МПК были в диапазоне 6 – 8 мкг/мл, что очень близко к пограничной зоне 4 мкг/мл (EUCAST 2022 – 2023). При использовании ОХА-ГДМ 82% значений были за пограничной чертой (МПК=2 мкг/мл, EUCAST 2022 – 2023), при этом диапазон значений МПК составлял 0,5 – 32 мкг/мл. На сегодняшний день ДДМ с оксациллином не рекомендуется использовать для определения чувствительности к бета-лактамам антибиотикам у стафилококков, и в настоящем исследовании этот тест был использован только как сравнительный. Хотя в работах Ва и соавт., Мата и соавт. [323, 326] авторы предложили использовать оксациллин и цефокситин на агаре с NaCl в формате ДДМ для дифференциации OS-MRSA, MRSA и MSSA.

4.4.2. Оценка гетерорезистентности и выделение субпопуляций OS-MRSA

В ходе работы при использовании PAP-анализа было установлено, что большинство OS-MRSA характеризовались гетерорезистентностью к оксациллину (рис. 15). Максимальная концентрация ингибирования роста (PAP-МИК) составила 32 мкг/мл, и значения AUC были в диапазоне 71–134. У *tesA*-отрицательных изолятов (n=3), которые были взяты в качестве контроля, диапазон AUC составлял 59 – 75 (рис. 15C). Восемь изолятов OS-MRSA, относящихся к разным клонам (ST5, ST2704, ST59, ST1535, ST45, ST97), демонстрировали MSSA-подобный характер кривой в PAP-анализе без детектируемой гетерорезистентности, имели AUC в диапазоне 48 – 72 и параметр PAP-МНИК/МИК <8. МПК цефокситина для таких изолятов было в диапазоне 8 – 32 мкг/мл. Средняя величина значений зон задержки роста в ДДМ с цефокситином составляла – 18±4 мм. Изоляты с мутацией промотора в положении -7 характеризовались увеличением гетерорезистентности с диапазоном значений AUC 76 – 134 и соотношением PAP-МНИК/МИК 16 – 128. Изоляты с мутацией промотора в положении -33 характеризовались умеренной гетерорезистентностью с диапазоном значений AUC 71 – 95 и соотношением PAP-МНИК/МИК ≤ 64 (рис. 16). Результаты PAP-анализа имели умеренную корреляцию ($r_s \leq 0,54$, $p < 0,01$) с данными по чувствительности к антибиотикам (рис. 14A).

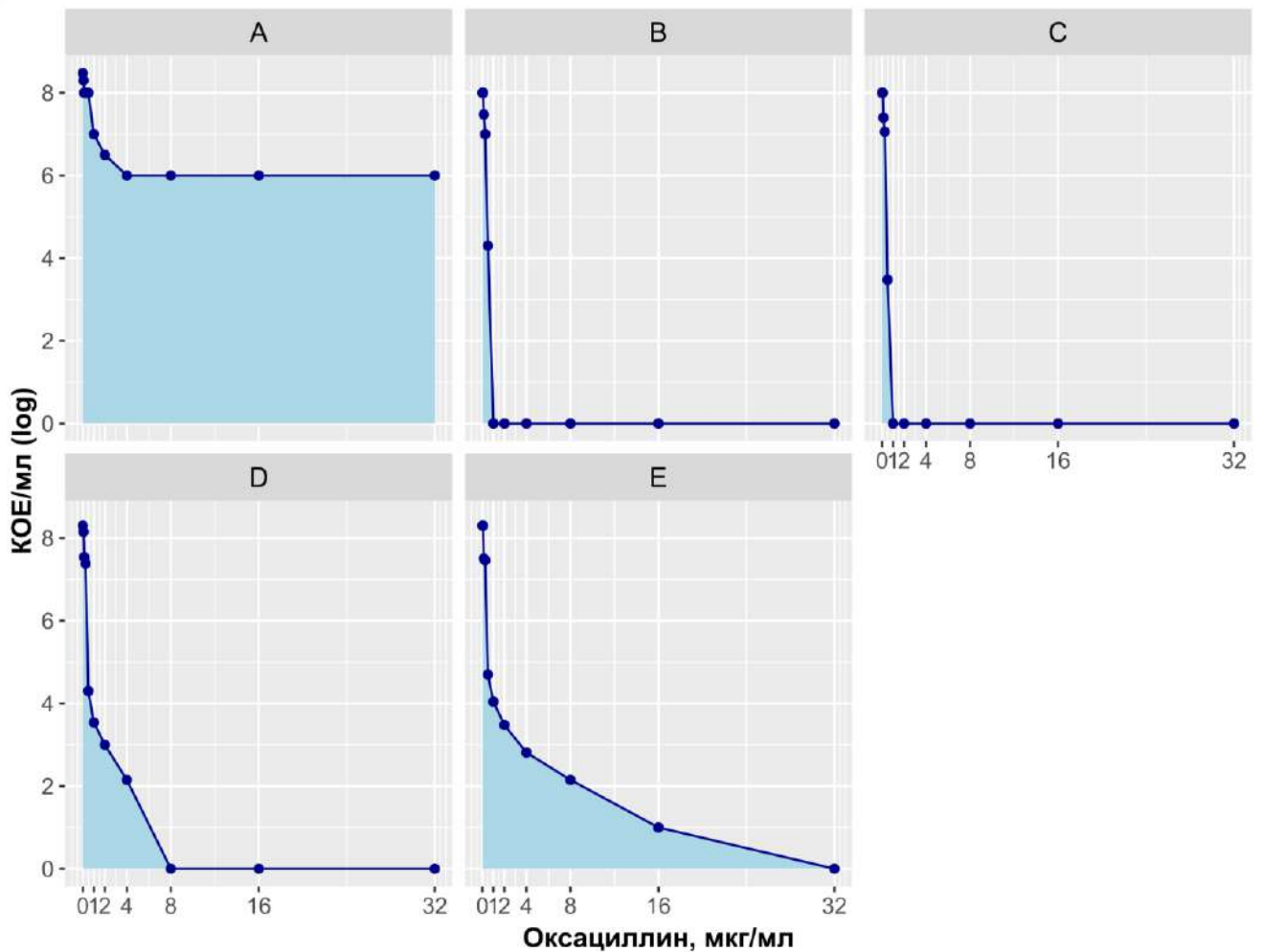


Рисунок 15 – PAF-анализ, включающий 10 разведений оксациллина от 0 до 32 мкг/мл, для изолятов OS-MRSA. Обозначения: А – контрольные штаммы HA-MRSA-ST8-SCC*mec* IV с МПК оксациллина > 32 мкг/мл (n=3), AUC = 145±25; В – контрольные штаммы MSSA (*mecA*-отрицательные, n=3), AUC = 67±12; С – изоляты OS-MRSA, имеющие MSSA-подобный характер кривой с мутацией в положении -33 промоторной области гена *mecA* (n=8), AUC = 63±15; D – изоляты OS-MRSA с мутацией в положении -33 промоторной области (n=14), AUC = 82±17; E – изоляты OS-MRSA с мутацией в положении -7 промоторной области (n=38) AUC = 93±21. Представлены медианы значений.

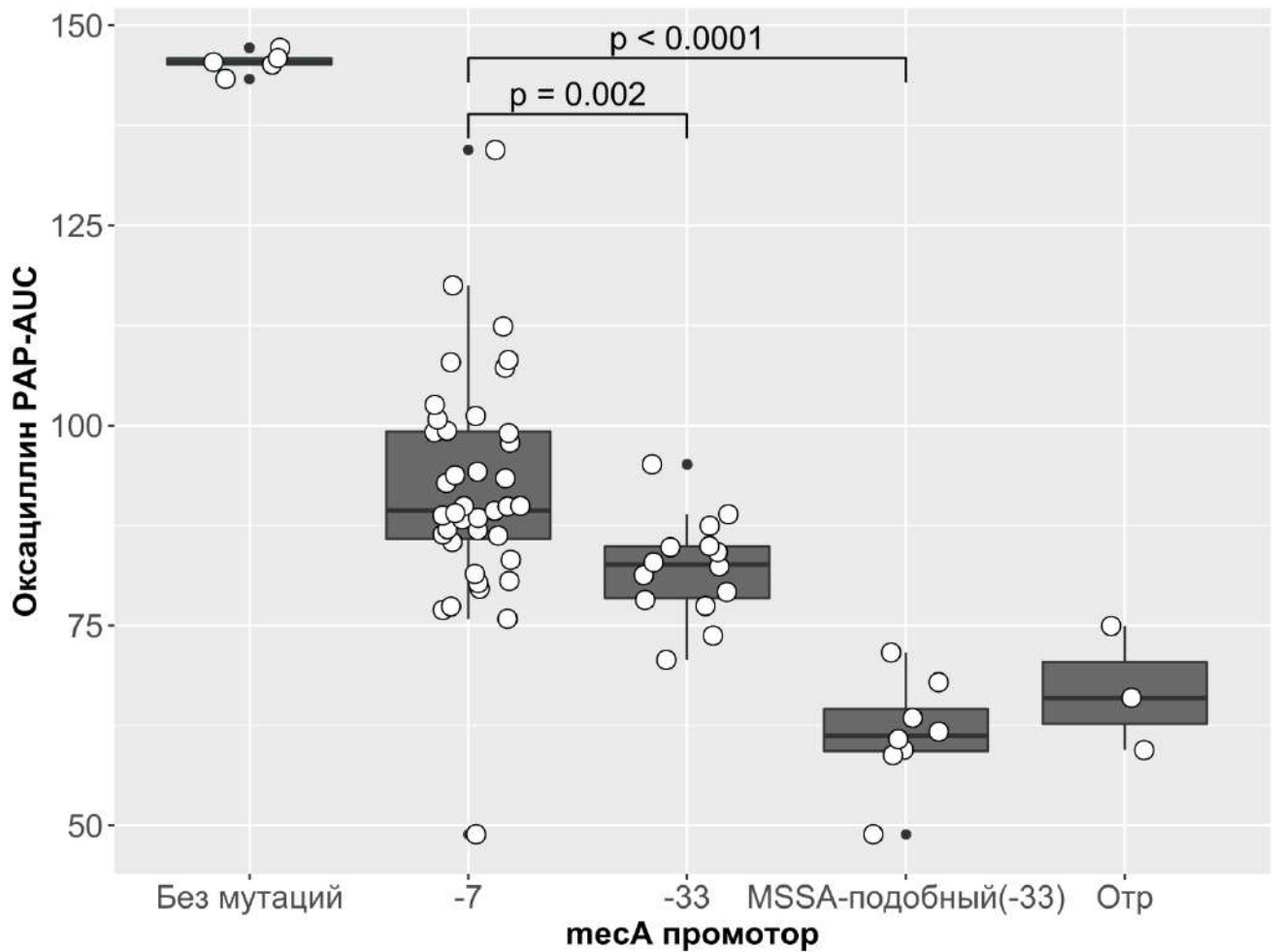


Рисунок 16 – Распределение значений PAP-AUC в зависимости от мутаций в промоторе *tecA* в позициях -7 и -33. В анализ включены два контроля – изоляты HA-MRSA (ST8) без мутаций в промоторной области и изоляты MSSA без гена *tecA* (Отр).

Полученные данные могут свидетельствовать о невысокой эффективности предсказания возможной гетерорезистентности при использовании только стандартных «рутинных» тестов оценки чувствительности к бета-лактамам антибиотикам. Очевидно, что уровень гетерорезистентности и степень экспрессии фенотипа устойчивости к бета-лактамам антибиотикам в значительной степени разнятся между изолятами. Для подтверждения гетерорезистентности выросшие колонии на максимальной концентрации (32 мкг/мл) в PAP-анализе, имевшие параметр PAP-МНИК/МИК > 32, переносили в бульон TSB, содержащий оксациллин в концентрации 32 мкг/мл и инкубировали в течение 48 часов (раздел 2.1.4). Всего было отобрано 12 изолятов, принадлежащих к разным генетическим линиям. Параллельно с этим использовали оригинальные культуры этих же изолятов. Проводили инокуляцию культур ($10^6 - 10^7$ КОЕ/мл) в жидкую среду TSB, также содержащую 32 мкг/мл оксациллина. После 48 часов инкубации оценивали наличие или отсутствие помутнения среды. Все субпопуляции дали

хороший видимый рост в отличие от оригинальных культур, для которых рост отсутствовал (среда сохраняла прозрачность). Полученные культуры субпопуляций высевали на кровяной агар и для исключения возможной контаминации проводили видовую идентификацию с помощью MALDI-TOF MS. Затем оценивали результаты чувствительности к бета-лактамам методом серийных разведений. Для большинства изолятов субпопуляций наблюдался рост МПК к большинству бета-лактамовых антибиотиков (таблица 15). Так, диапазон МПК к оксациллину составлял 0,25-32 мкг/мл, пенициллину/клавуланату – 0,5-8 мкг/мл. Помимо изменений МПК для субпопуляций было характерно изменение скорости роста. Так, отмечалось значительное увеличение ЛАГ-фазы роста до 178 (138-198) минут у субпопуляции по сравнению с оригинальными популяциями, для которых эта фаза роста длилась 104 (IQR: 90-129) минуты ($p < 0,001$). Для большинства субпопуляций также отмечалось увеличение времени удвоения клеток с 31 минуты (IQR: 28 – 33) до 33 минут (IQR: 27 - 45). Однако статистической значимости выявлено не было ($p=0,184$), поскольку рассматриваемые изменения были штамм-специфичными для субпопуляций, и диапазон времени удвоения клеток был в пределах от 28 до 60 минут (для оригинальной популяции диапазон составлял 19 – 38 минут). Для выявления возможных генетических изменений у изолятов субпопуляций было проведено полногеномное секвенирование с последующим сравнением с геномами оригинальных популяций.

У изолятов субпопуляций были выявлены различные мутации в различных метаболических путях клеток, которые включали: метаболизм пуринов, систему гликолиза и пентозофосфатного пути, биосинтез тРНК, биосинтез аминокислот и другие локусы (таблица 16). В среднем на геном приходилось 2 значимые мутации. Многие гены (и их промоторы), в которых были выявлены мутации, относятся к дополнительным факторам (*auxiliary factors*), влияющим как на экспрессию гена *tesA*, так и на фенотипическое проявление устойчивости к бета-лактамам. К их числу можно отнести следующие гены: *relA*, *eno*, *pyk*, *gmk* и *prsA*. У штаммов субпопуляций сохранялись ранее описанные мутации как в промоторе, так и в структурной области гена *tesA*. Была также проведена оценка уровня экспрессии *tesA* у 12 производных штаммов (с индукцией и без индукции оксациллином) по сравнению с их родительскими штаммами (рис. 17). Изменения экспрессии у большинства производных штаммов не выявлялось ($p > 0,05$), либо незначительно увеличивалось в 1,5 – 2 раза вне зависимости от добавления оксациллина в среду. Только два производных штамма, SA1161 и SA1205, характеризовались увеличением экспрессии *tesA* в 100 и 10 раз ($p < 0,001$), соответственно. Таким образом, дополнительные факторы играют важнейшую роль в регуляции устойчивости к бета-лактамам у MRSA, также стоит отметить роль *tes*-независимых механизмов устойчивости *S. aureus* к бета-лактамовым антибиотикам.

Полученные данные свидетельствуют, во-первых, о важности корректной лабораторной детекции OS-MRSA фенотипов, во-вторых, о нецелесообразности использования бета-лактамовых антибиотиков для лечения инфекций, вызываемых такими фенотипами. Большинство OS-MRSA демонстрировали присутствие незначительной популяции с высокой МПК к оксациллину и возможность во время воздействия бета-лактамов или реакции на стресс OS-MRSA трансформироваться в MRSA с высоким уровнем устойчивости к бета-лактамам, такое явление было ранее продемонстрировано в предыдущих исследованиях [324, 327].

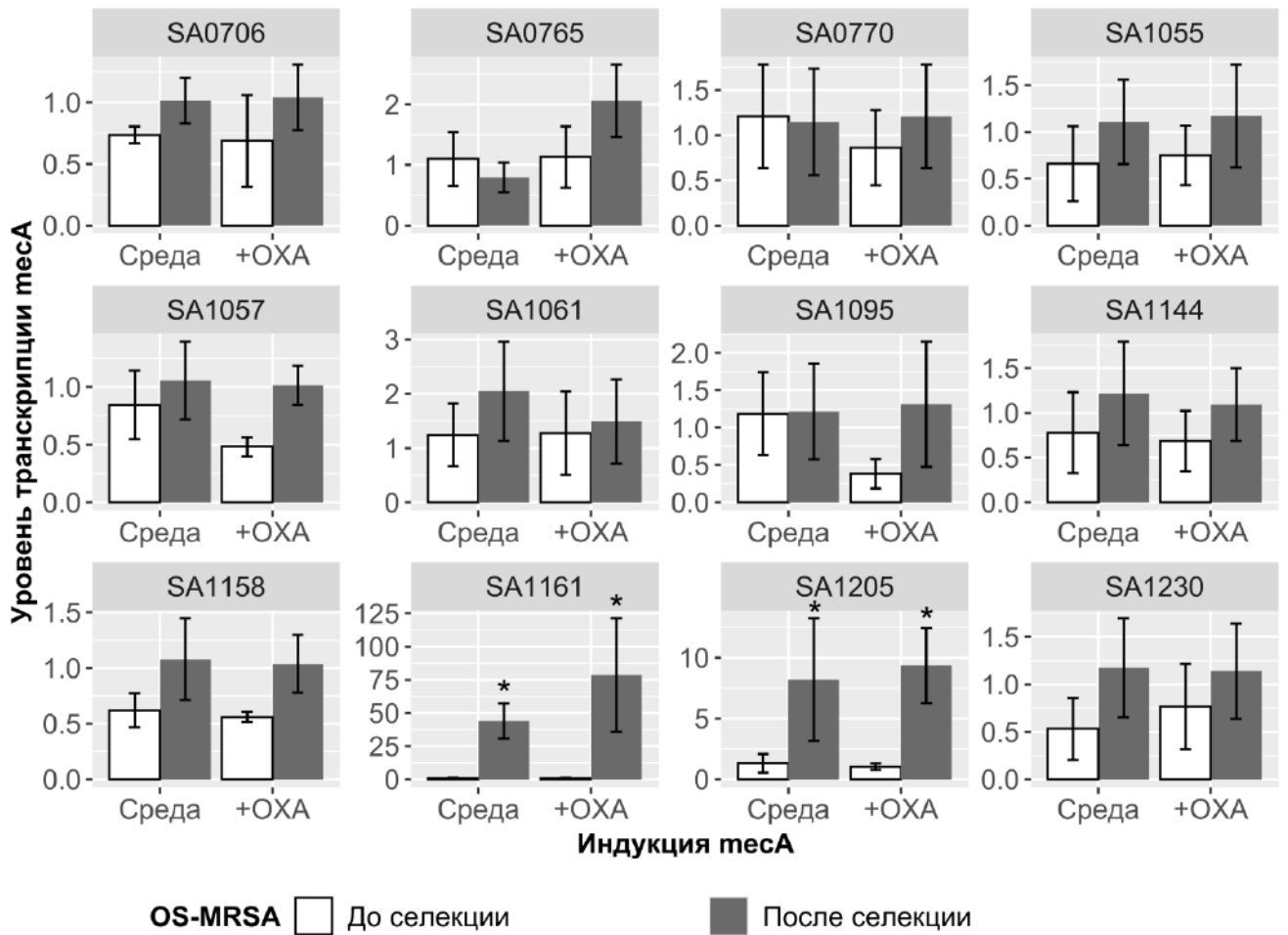


Рисунок 17 – Сравнение уровня экспрессии гена месА у родительских штаммов OS-MRSA (до селекции) и их производных (после селекции). Среда – измерение без добавления антибиотика, OXA – добавление оксациллина в концентрации 0,016 мкг/мл; * - достоверные различия ($p < 0,001$).

Таблица 15 – Фенотипические особенности субпопуляций OS-MRSA

Изолят	MLST	Скорость роста, мин				МПК, мкг/мл															
		Вся популяция		Субпопуляция		Вся популяция								Субпопуляция							
		ЛАГ ^А	DT ^В	ЛАГ ^А	DT ^В	FOX	OXA	CPT	PEN	PEN-CL	AMX	AMX-CL	MER	FOX	OXA	CPT	PEN	PEN-CL	AMX	AMX-CL	MER
SA0706	ST8	69,3	19 - 24	118,8	28 - 32	8	2	0,5	8	1	64	32	1	64	32	0,5	32	8	64	16	16
SA0765	ST2704	89,0	31 - 32	227,7	45 - 47	16	2	0,5	4	1	32	8	0,5	64	2	0,12	16	2	16	4	4
SA0770	ST22	148,5	39 - 41	188,1	56 - 60	16	2	0,25	8	1	64	16	0,5	64	32	0,25	8	4	16	8	4
SA1055	ST22	118,8	35 - 38	148,5	30 - 35	8	<0,5	0,25	0,5	0,5	32	8	0,5	64	32	0,25	8	8	8	8	8
SA1057	ST398	99,0	30 - 31	158,4	29 - 32	8	<0,5	0,25	0,25	0,12	2	1	0,12	8	32	0,5	8	8	16	16	2
SA1061	ST1	89,1	34 - 38	178,2	35 - 36	32	2	0,5	4	0,5	128	2	<	8	0,25	0,12	32	8	16	2	2
SA1095	ST22	118,8	24 - 25	128,7	32 - 34	2	<0,5	<	8	1	32	8	0,5	16	16	0,25	8	4	4	2	4
SA1144	ST1	128,7	27 - 28	198,0	26 - 27	16	<0,5	0,5	2	0,5	32	8	0,25	16	16	0,5	32	8	16	8	2
SA1158	ST59	89,1	29 - 34	128,7	26 - 32	16	<0,5	0,25	0,5	0,5	8	4	0,25	8	0,5	0,12	0,5	0,5	2	2	0,25
SA1161	ST59	109,0	27 - 28	178,2	32 - 36	32	2	0,25	0,12	0,12	4	4	0,5	16	16	0,25	4	4	8	8	2
SA1205	ST22	148,5	30 - 33	217,8	49 - 53	8	<0,5	0,12	4	1	32	8	0,5	16	8	0,12	8	4	8	8	4
SA1230	ST6	99,0	29 - 30	138,6	31 - 32	16	2	0,25	8	2	32	8	1	64	32	0,25	16	8	16	8	8

Примечание: ^АЛАГ – ЛАГ фаза роста (представлена медиана значений); ^ВDT – время удвоения клетки (представлены минимальные – максимальные значения).

Таблица 16 – Мутации в геномах субпопуляций изолятов OS-MRSA

Изолят	Мутации	Белок, локус	Локус референс ^A	Система
SA1205	Up (-10)	Enolase (EC 4.2.1.11)	<i>eno</i>	Гликолиз, глюконеогенез
	Y19F (TAC→TTC)	Транспозаза, IS4 family	01786 ^B	Мобильный генетический элемент
	S5* (TCG→TAG)	Транспозаза, IS4 family	01786 ^B	Мобильный генетический элемент
	Up (-33)	Транспозаза, IS4 family	01786 ^B	Мобильный генетический элемент
	Up (-413)	Hypothetical protein	SACOL2734	Гипотетический протеин
SA0706	G290E (GGG→GAG)	ppGpp synthetase (EC 3.1.7.2)	<i>relA</i>	Метаболизм пуринов, ppGpp
	Up (-5)	Транспозаза, IS200 family	01460 ^C	Мобильный генетический элемент
SA0765	G415E (GGA→GAA)	Pyruvate kinase (EC 2.7.1.40)	<i>pyk</i>	Гликолиз, глюконеогенез
SA0770	Δ21425 п.н.	Плазмида rep20_3_rep(pTW20), rep5_1_rep(pMW2)	SAP077A ^D	Мобильный генетический элемент
	F123S (TTC→TCC)	Guanylate kinase (EC 2.7.4.8)	<i>gmk</i>	Метаболизм пуринов
SA1055	G178A (GGT→GCT)	Fructose-bisphosphate aldolase class II (EC 4.1.2.13)	<i>fbaA</i>	Гликолиз, глюконеогенез
SA1057	K84E (AAA→GAA)	Tyrosyl-tRNA synthetase (EC 6.1.1.1)	<i>tyrS</i>	Биосинтез тРНК
	G78D (GGT→GAT)	Транспозаза IS30-like element ISSau1 family	06885 ^E	Мобильный генетический элемент
	CPC (290/303)	Pyruvate/2-oxoglutarate dehydrogenase complex	<i>gor</i> ^F	Гликолиз, глюконеогенез
SA1061	CPC (290/525)	Shikimate kinase I (EC 2.7.1.71)	<i>aroK</i>	Биосинтез аминокислот
SA1095	F258Y (TTC→TAC)	CysteinyI-tRNA synthetase (EC 6.1.1.16)	<i>cysS</i>	Биосинтез тРНК
	A440V (GCA→GTA)	CysteinyI-tRNA synthetase (EC 6.1.1.16)	<i>cysS</i>	Биосинтез тРНК
SA1144	A83T (GCT→ACT)	Ribose-phosphate pyrophosphokinase (EC 2.7.6.1)	<i>prsA</i>	Пентозофосфатный путь
SA1158	K152E (AAA→GAA)	Tyrosyl-tRNA synthetase (EC 6.1.1.1)	<i>tyrS</i>	Биосинтез тРНК
SA1161	Up (-241)	Serine acetyltransferase (EC 2.3.1.30)	<i>cysE</i>	Биосинтез аминокислот
	T159A (ACA→GCA)	Alkaline phosphatase (EC 3.1.3.1)	SACOL2648	Метаболизм тиамин
	G490D (GGT→GAT)	D-3-phosphoglycerate dehydrogenase (EC 1.1.1.95)	<i>serA</i>	Биосинтез аминокислот
	N19K (AAT→AAA)	Sugar efflux transpoter	SACOL0733	Гипотетический протеин
	ИНС (331/342 nt)	Transcriptional regulator, MerR family	SACOL2388	Транскрипционный регулятор MerR
SA1230	P175S (CCA→TCA)	1-phosphofruktokinase (EC 2.7.1.56)	<i>fruK</i>	Метаболизм маннозы и фруктозы
	Up (-386)	FadG/Acyl carrier protein	<i>acpP (hmrB)</i>	Биосинтез жирных кислот

Примечание (Таблица 16):

Локусы референс геномов (номер регистрации геномов в NCBI GenBank):

^A*Staphylococcus aureus subsp. aureus* COL (CP000046.1);

^B*Staphylococcus aureus* strain NCTC13616 (LR134193.1);

^C*Staphylococcus aureus* TPS3156 DNA (AP023034.1);

^D*Staphylococcus aureus* plasmid SAP077A (GQ900428.1);

^E*Staphylococcus aureus* strain GD1677 (CP019595.2);

^F*Staphylococcus aureus* strain NCTC10344 (LS483324.1).

Обозначения мутаций: Up (upstream) – мутации в потенциальном промоторе, * – стоп-кодон, Δ - делеция, СРС- сдвиг рамки считывания вследствие делеции, ИНС – инсерция.

4.4.3. Заключение по разделу: особенности Российских изолятов OS-MRSA и связанных с ними механизмов чувствительности к бета-лактамам

На сегодняшний день ни один из фенотипических методов детекции метициллинрезистентности не является полностью чувствительным и специфичным. Детекция гена *mecA* или его продукции (PBP2a) остаются золотым стандартом в определении чувствительности к бета-лактамам антибиотикам у *S. aureus*. Фенотипы OS-MRSA требуют особого внимания, поскольку связаны с возможностью неправильного назначения бета-лактамов и следовательно неэффективностью назначенной терапии. Согласно предыдущим исследованиям [7, 8], OS-MRSA можно разделить на две подгруппы: цефокситин-резистентные/оксациллин-чувствительные и цефокситин-чувствительные/оксациллин-чувствительные изоляты. Однако, в большинстве предыдущих исследований интерпретация тестов на основе цефокситина включала либо только диффузионные тесты, либо автоматические системы без множественных сравнений. В настоящем исследовании сравнительный анализ показал несоответствие между измерениями различными методами: результаты интерпретации методами диффузии не совпадали с результатами интерпретаций метода серийных разведений или других подходов; таким образом, разные результаты тестов можно интерпретировать по-разному. Подобное расхождение результатов оценки чувствительности было описано и в предыдущих исследованиях по OS-MRSA [178, 325, 328].

Проблема чувствительности *mecA*-позитивных стафилококков к бета-лактамам рассматривалась еще в начале 2000-х годов [329]. Помимо низких МПК для оксациллина и иногда цефокситина, эти изоляты демонстрируют более низкие значения МПК карбапенемов и пенициллинов по сравнению с типичными MRSA. По сравнению с цефалоспоринами ранние пенициллины проявляют большую аффинность к PBP2a и более низкие значения МПК, в случае если изоляты MRSA не продуцируют бета-лактамазы. В случае *blaZ*⁺ изолятов MRSA,

при добавлении ингибиторов бета-лактамаз (клавуланата или сульбактама) к пенициллинам происходит значительное снижение МПК. Однако, имеются крайне ограниченные данные о клинической эффективности ингибитор-защищенных пенициллинов при инфекциях MRSA [329]. В недавнем исследовании Harrison и соавт. [320] было показано, что чувствительность к пенициллину у *blaZ*-отрицательных MRSA и чувствительность к пенициллину-клавуланату у *blaZ*-положительных MRSA опосредована комбинацией двух различных мутаций в промоторной области *tesA* (положение -7 или -33) и одной из двух замен в PBP2a (E246G или M122I). При этом авторы использовали параметр ECOFF ≤ 2 мкг/мл, что выше, чем в рекомендациях EUCAST для пенициллина (ECOFF $\leq 0,125$ мкг/мл). В работе Harrison и соавт. [320] у пенициллин-клавуланат-чувствительных MRSA не исследовалась чувствительность к оксациллину. Полученные результаты в настоящем исследовании и аналогичных исследованиях [178] позволяют сделать вывод, что чувствительность к пенициллин-клавуланату за счет мутаций в промоторе и самом гене *tesA* влияют и на формирование чувствительности к оксациллину. Так, в исследовании Zhuang и соавт. было показано, что изоляты с комбинацией мутаций в промоторе (-7) и заменами в положениях S225R+E246G в PBP2a, имели минимальные значения МПК пенициллина-клавуланата: 0,03 – 1 мкг/мл [330]. Результаты настоящего исследования подтверждают роль ингибирования *blaZ* как механизма синергизма пенициллинов и клавуланата, однако снижение МПК пенициллинов у изолятов с *tesA* дикого типа и мутации в промоторной области указывает на главную роль в формировании OS-MRSA именно промоторных изменений. В настоящей работе было показано, что мутация в положении -33 приводит к более низкому базальному и индуцированному уровню экспрессии *tesA* и ассоциирована с незначительным уровнем гетерорезистентности (выявляемой с помощью PAP-анализа).

Наличие субпопуляции с высокими значениями МПК способствует трансформации OS-MRSA в MRSA с высоким уровнем устойчивости к бета-лактамам, что было продемонстрировано в других исследованиях [324, 327]. В настоящем исследовании удалось выделить субпопуляции от основной популяции OS-MRSA у 12 изолятов. Субпопуляции характеризовались увеличением МПК к бета-лактамам, низкой скоростью роста и наличием мутаций в генах центрального метаболизма. Можно рассмотреть два сценария появления субпопуляций. Первый сценарий наиболее вероятен и предполагает исходную гетерогенность популяций OS-MRSA, представленную единичными клетками с высокими значениями МПК оксациллина. Вторым сценарием менее вероятен и подразумевает быстрое формирование мутаций при кратковременном воздействии оксациллина. Выявленные мутации были связаны с дополнительными факторами (Auxiliary factors), регулирующими уровень резистентности к бета-лактамам у MRSA [6]. В частности, были выявлены мутации в генах, кодирующих белки

гликолитического пути (*pyk*, *fbaA*), метаболизм пуринов (*gmk*), синтез алармона (*relA*) и аминокислотного метаболизма (*tyrS*, *cysS*, *cysE*, *serA*), но не было обнаружено мутаций, непосредственно связанных с устойчивостью к бета-лактамам. Также необходимо отметить, что у всех штаммов после селекции сохранялись мутации в промоторе гена *mecA*. Аналогичные результаты были получены в исследовании Boonsiri и соавт. [331], где было обнаружено, что экспрессия устойчивости к оксациллину тесно связана с мутациями в следующих генах: РНК-полимеразе (*rpoBC*), биосинтеза пуринов (*guaA*, *prs*, *hprT*), синтеза алармонов (*relA*), гликолиза (*pykA*, *fbaA*, *fruB*), шаперонов (*clpXP*, *ftsH*) и тРНК-синтазах (*lysS*, *gltX*). Устойчивость к бета-лактамам, опосредованная прямой реакцией на стресс через изменение экспрессии гена *relA*, достаточно хорошо изучена [160]. Другие метаболические изменения, включая биосинтез пуринов, гликолиз и синтез тРНК, также могут способствовать резистентности к бета-лактамам [159, 160, 332]. В настоящем исследовании не у всех субпопуляций штаммов наблюдалось увеличение МПК бета-лактамов. Более того, было показано, что большинство производных штаммов с высокими значениями МПК по отношению к бета-лактамам не вызывали повышения уровня экспрессии *mecA*. Эти данные свидетельствуют о том, что резистентность к бета-лактамам зависит не только от функциональности оперонов *mec/bla*, но и от метаболических изменений. Толерантность может играть роль в способности субпопуляции к выживанию, без повышения значений МПК. Так, мутации в метаболизме аминокислот и тРНК обнаружены у штаммов, у которых уровень МПК оставался без изменений. Антибиотикотолерантность *S. aureus* связана с изменениями в метаболизме аминокислот и тРНК [249]. Стоит также отметить, что мутации в *mecA* и его промоторе были выявлены у каждого штамма в субпопуляции, выделенных в РАР-анализе. Эти данные свидетельствуют о том, что вспомогательные факторы, влияющие на экспрессию *mecA*, играют существенную роль в высоком уровне резистентности к бета-лактамам у MRSA. Данное наблюдение еще раз подчеркивает неэффективность этой группы препаратов для лечения инфекций, вызванных MRSA. Как было показано в исследовании Boonsiri и соавт. [331], несмотря на увеличение МПК оксациллина производных штаммов OS-MRSA после селекции, продукция РВР2а и экспрессия *mecA* существенно не изменялась. Результаты диссертационной работы согласуются с существующей концепцией влияния стресса на приобретение устойчивости к бета-лактамам. Строгий стрессовый ответ изменяет бактериальный метаболизм, без участия *mec/bla* генов, в сторону приобретения устойчивости к бета-лактамам у *S. aureus* [331].

4.5. Анализ MRSA со сниженной чувствительностью к ванкомицину

С целью выявления гетерорезистентности был проведен PAP анализ с ванкомицином с последующей оценкой параметра PAP/AUC (рис. 18). Для этого случайным образом были выбраны изоляты ST8 (n=60) и ST239 (n=40), с разным уровнем чувствительности к ванкомицину (МПК 0,5 – 2 мкг/мл). В качестве контроля определения уровня PAP/AUC был использован штамм *S. aureus* Mu50, а также среднее значение PAP/AUC штаммов, относящихся к ST8 и ST239 после 5 циклов воздействия ванкомицином (раздел 6.1.3.3). Было установлено, что для всех изолятов с МПК < 2 мкг/мл и МПК = 2 мкг/мл, уровень PAP/AUC составлял 0,41 (0,25 – 0,55) и 0,55 (0,43 – 0,62), соответственно. Однако, наибольшим значением PAP/AUC ($p < 0,05$) характеризовались изоляты ST8 (0,6), по сравнению с ST239 (0,54). Подавляющее большинство значений PAP/AUC находилось вблизи уровня 0,75, что соответствует первому этапу формирования устойчивости к ванкомицину.

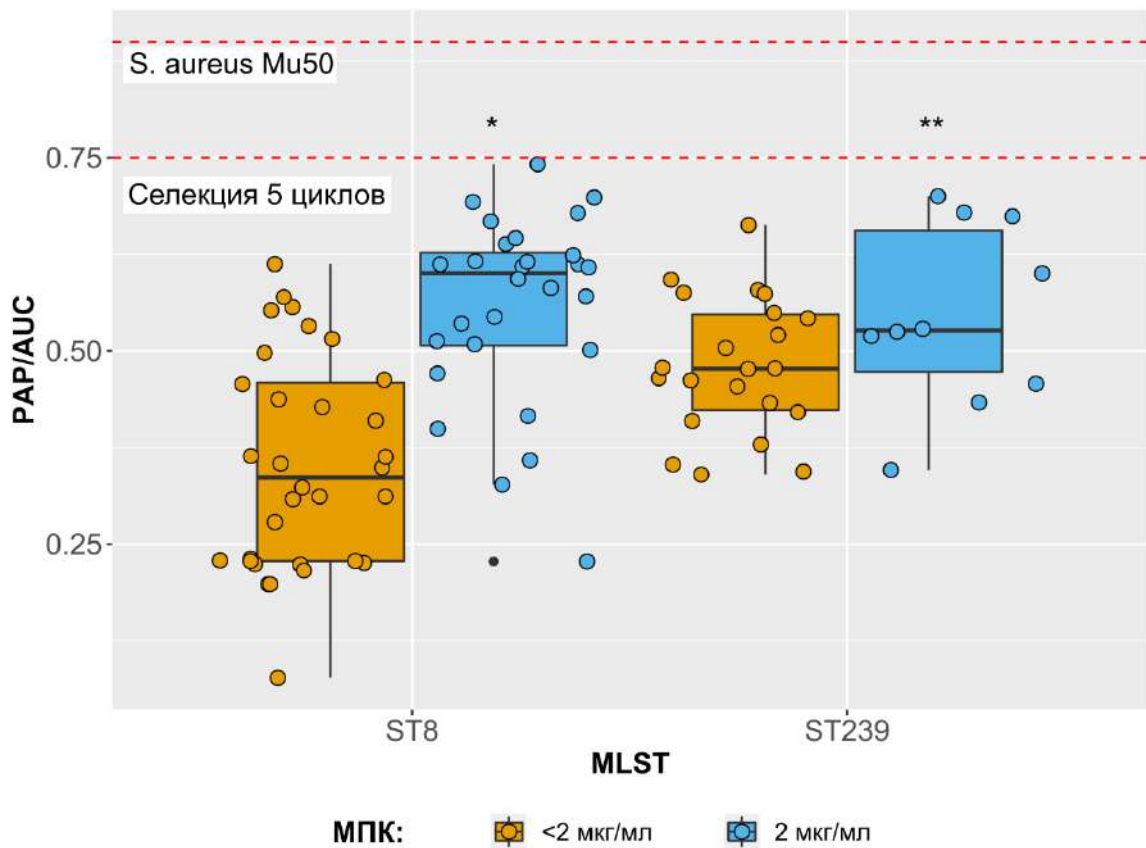


Рисунок 18 – Результаты оценки параметра PAP/AUC для изолятов ST8, ST239, имеющих МПК ванкомицина 2 мкг/мл и 0,5 – 1 мкг/мл; * - сравнение PAP/AUC у изолятов ST8 ($p < 0,01$), ** - сравнение PAP/AUC у изолятов с МПК 2 мкг/мл, относящихся к ST239 и ST8 ($p < 0,05$). Красная пунктирная линия соответствует уровню PAP/AUC контрольного штамма *S. aureus* Mu50. Вторая пунктирная линия соответствует уровню PAP/AUC для изолятов ST8 и ST239

после пяти циклов воздействия ванкомицином в экспериментах по селекции устойчивости на ванкомицине (раздел 6.1.3.3).

Не было выявлено изолятов с PAP/AUC=0,9, что говорит об отсутствии фенотипов VISA, однако не исключает наличие hVISA. Стоит отметить, что в работе [333] было отмечено, что наибольшей долей MRSA со сниженной чувствительностью к ванкомицину характеризуется клональный комплекс 8 (CC8), к которому относятся и изучаемые в настоящей работе изоляты.

С целью выявления возможных механизмов, обуславливающих сниженную чувствительность к ванкомицину, было проведено геномное секвенирование. Для этого в качестве сравнительной группы были отобраны изоляты с МПК ванкомицина 1 мкг/мл. В анализ были добавлены сиквенсы референсных изолятов с хорошо описанными фенотипическими и генотипическими особенностями, это VISA и hVISA штаммы (Mu50, Mu3, JKD6008, Z172, JH9), имеющие МПК 4 – 8 мкг/мл. В качестве референс-генома использовался штамм *S. aureus* COL. Фрагмент этого исследования представлен в работе [334].

Были проанализированы аминокислотные последовательности 44 основных белков, ассоциированных с формированием устойчивости к гликопептидам, гены, участвующие в биосинтезе пептидогликана: *ddl, murA, murB, murZ, murC, murD, murE, murF, murI, murG, pbp2, mecA, pbp4, mprF, mraY, femAB, femX, FtsI12, msrR, sgtA*; регуляторные гены: *uvqF, vraSR, vraFG, vraT, walkR, graSR, sigB, rpoBC, sle1, stp1*; гены генерального метаболизма: *clpP, glnA, mgt, cmk, fdh2, glmU, SACOL2161*. Среди большинства белков были выявлены полиморфизмы, которые напрямую не связаны с повышением МПК к ванкомицину. Однако для части генов были выявлены миссенс-мутации, характерные исключительно для группы устойчивых изолятов. К их числу относились: *murA, murZ, murB, murF, mecA, sgtA, femX, rpoB, vraS, fdh2*. Уникальные мутации, характерные только для изолятов с МПК = 2 мкг/мл, были обнаружены в нескольких генах: *murZ* (T353A), *rpoB* (Y946C) и *fdh2* (G446S). Ген *murZ* кодирует UDP-N-acetylglucosamine 1-carboxyvinyltransferase, который катализирует реакцию карбоксилирования ацетилглюкозамина на ранней стадии сборки пептидогликана. В работе Matsuo и соавт. [335] было установлено, что фенотипы «медленных VISA» (slow-VISA), полученные при селекции *in vitro*, характеризовались наличием мутаций в MurZ (G10V, T240R, T306I). Ген *rpoB*, кодирующий β-субъединицу РНК-полимеразы, является глобальным регулятором и важнейшим переключателем фенотипов VSSA → hVISA → VISA. Описано около 50 вариантов мутаций в *rpoB* у клинических изолятов, проявляющих сниженную чувствительность к ванкомицину, роль многих из них доказана в экспериментах по мутагенезу [207, 336]. Почти у всех изолятов были обнаружены миссенс-мутации в *rpoB* в позициях V798A и L875S. Мутация Y946C была

характерна только для изолятов с МПК = 2 мкг/мл. Данная позиция находится в локусе, где обнаруживаются мутации характерные для фенотипов sVISA (H929T G977V) и VISA (L887F, Q1069E, A1085V) [204, 207]. В гене *fdh2*, предположительно кодирующем формиатдегидрагеназу, выявлена мутация G446S. Мутации в *fdh2* опосредуют утолщение клеточной стенки и обнаруживаются среди VISA изолятов [207, 337].

Таким образом, проведенный анализ показал, что изоляты со сниженной чувствительностью к ванкомицину (МПК 2 мкг/мл) не обладают фенотипом hVISA или VISA. Однако, выявленные мутации в «ключевых» генах биосинтеза пептидогликана (*murZ*, *rpoB* и *fdh2*) могут свидетельствовать о начальном этапе селекции устойчивости к ванкомицину.

ГЛАВА 5 АНАЛИЗ ГЛОБАЛЬНОЙ И ЛОКАЛЬНОЙ ПОПУЛЯЦИОННОЙ СТРУКТУРЫ ДОМИНИРУЮЩИХ ГЕНЕТИЧЕСКИХ ЛИНИЙ, ЦИРКУЛИРУЮЩИХ В РОССИИ

5.1. Анализ клональной структуры HA-MRSA

Как отмечалось ранее, среди HA-MRSA абсолютно преобладали представители CC8 и CC5, (96% изолятов). Всего среди HA-MRSA было выявлено 15 ST и 47 *spa*-типов. Среди представителей CC8 преобладали два клон: ST8-t008/t024-SCCmec IVc (49% от числа типированных HA-MRSA) и ST239-t037/t030/t632-SCCmec III (35%), из представителей CC5 – ST228-t041-SCCmec I (6%). Изоляты, относящиеся к ST8 и ST239, доминировали во всех географических регионах и встречались во всех медицинских центрах. При этом изоляты ST8 преобладали в гораздо большей степени (таблица 17). Все ST8 содержали SCCmec IVc и набор генов устойчивости (по результатам ПЦР-типирования): *ermC*, *cat*, *tetK*, *aac* (6')-*aph* (2'). Изоляты, типированные как ST8, были ассоциированы преимущественно с двумя *spa*-типами: t008, t024. У единичных изолятов ST8 были выявлены другие *spa*-типы: t190, t2072, t2169, t3308, t528, t574 и t9121. Изоляты с указанными *spa*-типами выделялись у пациентов с различными стафилококковыми инфекциями и в различных регионах страны: в Санкт-Петербурге, Москве, Кургане, Челябинске, Ярославле. У изолятов ST8 не были обнаружены гены вирулентности *tsst*, *lukFS*, *seb*, комплекс генов ACME.

Среди изолятов ST239 выделялись несколько *spa*-типов: t037, t030, t632, t138, t4238, t4410 и t7576. Отмечалась географическая особенность распространения *spa*-типов. В частности, *spa*-тип t632 встречался преимущественно в медицинских центрах Санкт-Петербурга, Москвы и Мурманска, в то время как *spa*-типы t037, t030 выявлялись во многих географических регионах. Единичные изоляты были представлены *spa*-типами t138, t4238, t4410 и t7576. Изоляты ST239 содержали SCCmec III, который обычно характеризуется присутствием комплекса *mer*-генов, обуславливающих устойчивость к солям ртути. Однако, в настоящем исследовании этот комплекс был обнаружен только у некоторых ST239, относящихся к *spa*-типам t037, t4238 и t138. Другой особенностью строения SCCmec III у изолятов ST239-t037/t030/t632 было наличие дополнительной рекомбиназы *ccrC* (что обычно не характерно для данного типа стафилококковых кассет). У изолятов ST239 были обнаружены различные наборы генов устойчивости, включающие *ermA*, *spc*, *cat*, *aac* (6') - *aph* (2'), *aadD*, *tetM*, *fusB* и *fusD*. Все изоляты ST239 из Красноярска отличались наличием генов токсина, вызывающего синдром токсического шока (TSST).

Таблица 17 – Данные молекулярного типирования изолятов HA-MRSA, выделенных у пациентов с различными стафилококковыми инфекциями

MLST		<i>sra</i> -тип	SCCmec	% ^A	OS-MRSA ^B	Гены вирулентности (%) ^C		
СС*	ST**					<i>lukSF</i>	<i>tsst</i>	<i>seb</i>
8	ST8	t008, t024, t574, t190, t2072, t9121	IVc	49	+	-	-	-
8	ST239	t037, t030, t632, t138, t4410, t4238, t7576	IIIa, IIIccrC, IIImer	35	-	-	+/(17)	-
5	ST228	t041, t2746	IA	6	-	-	-	-
22	ST22	t032, t223, t309	IVh, IVa, IVc	2	+	-	-	-
5	ST5	t2460, t688	III, V	1	-	-	-	-
5	ST6	t1950, t304	V, IVa	1	+	-	-	-
398	ST398	t011, t127	IVa, IVc	1	-	-	-	-
121, 97, 45, 5, 59, 8,	Другие: ST121, ST97, ST45, ST764, ST59, ST2704, ST1497, ST5556	^D Другие: t308, t037, t309, t008, t045, t701, t437	IVa, IVc, V	4,5	+	+/(1)	+/(1)	+/(1)

Примечание: ^AКоличество от числа типированных HA-MRSA (n=318); ^BOS-MRSA – mecA(+) оксациллин-чувствительные фенотипы, выявленные среди разных сиквенс-типов; ^CВ скобках отмечено количество (%) положительных изолятов в тех случаях, когда только часть изолятов были положительными; ^DДругие – перечислены все *sra*-типы, выявленные среди HA-MRSA; ST – сиквенс-тип; СС – клональный комплекс.

Не было выявлено зависимости результатов молекулярного типирования от источников выделения или диагнозов. Клоны ST8 и ST239 в одинаковой степени выделялись у пациентов из различного биологического материала. У пациентов с COVID-19, находящихся на стационарном лечении, из верхних и нижних дыхательных путей преимущественно выделялись клоны, относящиеся к ST8 и ST239. Это свидетельствует о колонизации внутрибольничными стафилококками во время пребывания пациентов на лечении в стационаре. Другие единичные представители CC8 включали следующие клоны: клон ST1497-t008-SCCmec IVc выделенный у пациента в Москве, характеризовался чувствительностью к не бета-лактамам антибиотикам; клон ST5556-t008-SCCmec IVc, выделенный в Санкт-Петербурге у пациента из мокроты.

Клональный комплекс CC5 был представлен преимущественно ST228 и единичными изолятами ST5, ST6, ST764 и ST2704. Превалирующий клон ST228-t041-SCCmec IA является эпидемическим клоном, длительно циркулирующим на территории Европы (альтернативное название «Южно-Германский клон»). Особенностью данного клона является сниженная чувствительность к цефтаролину (МПК = 2 мкг/мл). Помимо этого, изоляты ST228 характеризовались выраженной множественной устойчивостью к антибиотикам с набором различных детерминант устойчивости: *ermA*, *spc*, *aphA3*, *aac* (6') - *aph* (2''), *cat*, *tetK*, *tetM*. В отличие от представителей ST8 и ST239, изоляты ST228 отличались чувствительностью к рифампицину. Единичные изоляты CC5 были представлены следующими клонами. Один изолят ST5-t2460-SCCmec III (*ccrC* +) был выделен в Кургане, второй ST5-t688-SCCmec V выявлен в Санкт-Петербурге у носителя, госпитализированного в стационар. Два изолята: ST6-t1950-SCCmec V и ST6-t1950-SCCmec IVa, были выделены у пациентов с ИКМТ в Санкт-Петербурге и характеризовались OS-MRSA фенотипом. Изолят ST2704-t701-SCCmec IVc также был выделен у пациента с ИКМТ и ассоциировался с чувствительностью к оксациллину и наличием токсина PVL. Другой PVL – положительный изолят MRSA (клон ST59-t437-SCCmec V) выявлен в Санкт-Петербурге у пациента с ИКМТ и характеризовался чувствительностью к оксациллину (OS-MRSA). Клон ST764-t045-SCCmec II выделен у одного пациента из мокроты в Санкт-Петербурге.

Помимо основных доминирующих клонов были выявлены также представители других клональных комплексов. Изоляты ST398-t011-SCCmec IVa и ST398-t034-SCCmec V были выделены у пациента с хроническим остеомиелитом при бессимптомном носительстве в Санкт-Петербурге. Клон ST398 является успешной эпидемической генетической линией, ассоциированной с инфекциями у животных (LA-MRSA). Ранее циркуляция таких клонов не выявлялась на территории России. Ввиду отсутствия эпидемиологических данных невозможно оценить предполагаемую связь изолятов с животными и пути передачи этих клонов у

пациентов. Изоляты ST398 несли одинаковый набор генов устойчивости (*ermA*, *spc*, *aac* (6') -*aph* (2')). Два изолята принадлежали к CC97 (ST97) и были выделены от больных остеомиелитом из географически удаленных регионов (Санкт-Петербурга и Кургана). Изоляты ST97 были представлены разными *spa*-типами (t037, t3308), содержали разные типы *SCCmec* (IVa, V), один изолят был чувствителен к не бета-лактамам антибиотикам, другой имел *ermC*, *tetK*, *aac* (6') -*aph* (2') гены. Представители CC97 также относятся к LA-MRSA. Шесть изолятов принадлежали к CC22 (ST22), они были представлены различными *spa*-типами (t223, t032, t11618) и имели кассеты *SCCmec* IVc или *SCCmec* IVh. Данные изоляты были выделены у пациентов в Москве (из мокроты и раневого отделяемого), Санкт-Петербурге (при ИКМТ) и Кургане (из раневого отделяемого при хроническом остеомиелите). Изолят из Санкт-Петербурга характеризовался OS-MRSA фенотипом. Единственный клон ST121-t308-*SCCmec* IV был выделен у пациента в Москве из раневого отделяемого при хроническом остеомиелите.

Таким образом, в России генотип ST8-*SCCmec* IV доминирует на огромной территории от Красноярска до Санкт-Петербурга. Изоляты ST8 из разных географических регионов демонстрировали сходные свойства (одинаковые *spa*-типы, *SCCmec*-типы и спектр чувствительности к антибиотикам). Среди CA-MRSA у носителей также выделялся клон ST8-t008/t024-*SCCmec* IVc, однако он характеризовался в основном чувствительностью к не бета-лактамам антибиотикам.

Клон ST239 был представлен несколькими вариантами. Так, *tsst*-положительные ST239 были выявлены только в Красноярском крае. Другой вариант ST239 – это *spa*-тип t632 *tsst*-отрицательный *sea*-положительный, выявленный в только в медицинских центрах центральной части России (Санкт-Петербург, Москва, Ярославль). *Spa*-типы t030 и t037 (*tsst*-отрицательные) выявлялись во всех регионах. Единичные ST239 были выявлены в группе CA-MRSA, однако нельзя исключать возможность предшествующей госпитализации у таких носителей. Детальный эпидемиологический анамнез не анализировался. В России CC5 представлен в основном Южно-Германским нозокомиальным клоном ST228-t041-*SCCmec* IA [107]. Ранее данный клон не описывался на территории России, и частота встречаемости составляет 3,7%. По результатам исследования ST228 выделялся в Санкт-Петербурге, Москве и Мурманске. В одном случае ST228 был выявлен у носителя, и как отмечалось ранее, нельзя исключать возможность предшествующей госпитализации. Другой представитель CC5 – ST6 также впервые выявлен в России в Санкт-Петербурге. Нозокомиальный клон ST6-t304-*SCCmec* IVa (PVL-отрицательный) превалирует в некоторых странах – Омане, Кувейте [338, 339]. До 2010 года данный клон спорадически встречался на территории Европы. Однако, в последние несколько лет отмечается увеличение частоты встречаемости ST6 в Скандинавских странах

(Дании, Норвегии, Швеции, Финляндии) и в Великобритании [340, 341]. В исследовании Bartels и соавт. [340] авторы выдвигают гипотезу о возможной связи увеличения выявления ST6-t304 в Европе с увеличением числа беженцев из Ирака, Сирии, то есть стран Ближнего Востока, где этот клон является одним из доминирующих. Эволюция, скорость экспансии и возможные биологические особенности клона ST6 являются предметом дальнейшего изучения. Еще один клон ST764, впервые описан как локальный вариант генетической линии ST5, циркулирующей в Японии с 2000-х годов [342, 343]. В настоящее время ST764 является одним из доминирующих клонов, циркулирующих в странах Юго-Восточной Азии и Китае [344, 345]. Данный клон долгое время рассматривался как CA-MRSA и характеризовался повышенной вирулентностью. В настоящем исследовании только один изолят был типирован как ST764.

В настоящем исследовании среди HA-MRSA только шесть изолятов были типированы как ST22. При этом два изолята относились к *spa*-типу t032 и имели стафилококковую кассету SCCmec IVh (характерные признаки для EMRSA-15). Остальные изоляты ST22 имели *spa*-тип t223 и SCCmec IVh/IVa. Если среди HA-MRSA были описаны единичные изоляты ST22, то среди CA-MRSA они доминировали (45,6%). Однако, изоляты CA-MRSA-ST22 отличались по ряду признаков, в частности, *spa*-типу t223, стафилококковой кассете SCCmec IVc/IVa и наличию фактора вирулентности *tsst*.

Единичные изоляты принадлежали к CC398 и CC97, относящихся к эпидемиологическому кластеру LA-MRSA. Насколько нам известно, это первые обнаружения LA-MRSA среди клинических изолятов на территории России. Поскольку для LA-MRSA характерна смена хозяев (передача стафилококков от животных человеку) в связи с отсутствием эпидемиологических данных о связи пациентов с животными, нельзя точно проследить источник происхождения таких клонов. Полученные данные требуют более детальной проработки с вовлечением ветеринарных специалистов, поскольку в России практически отсутствуют данные о клональной структуре стафилококков, вызывающих инфекции у животных, имеющих сельскохозяйственное значение.

5.2. Популяционная структура доминирующего клона HA-MRSA ST8

В работе анализированы все доступные геномы ST8, полученные из NCBI GenBank: 2238 геномов, включая 156 геномов из России, а также геномы ST8–USA300, выделенные в США [346]. Геномы, собранные в различное время на протяжении XX века из Европы, Африки, Австралии, Центральной Америки, загружены из биопроекта PRJEB14816 [25]. На основе

филогенетического анализа и Байесовской кластеризации 29990 core-SNP среди всей популяции *S. aureus* ST8 выделялось три кластера (рис. 19).

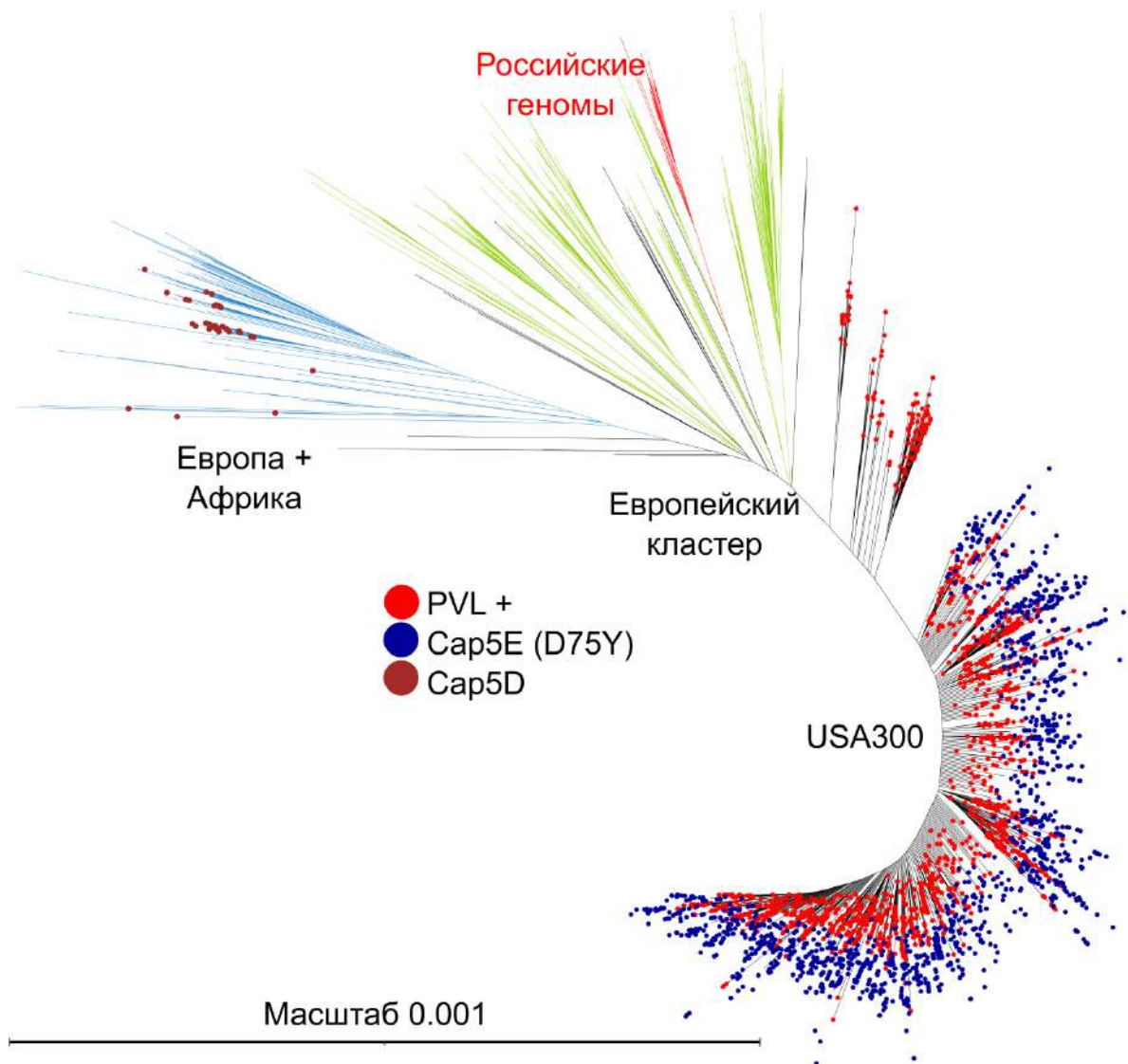


Рисунок 19 – Неукорененное филогенетическое дерево *S. aureus* ST8 на основании выравнивания 29990 core-SNP, полученных у 2238 геномов. Разными цветами отмечены ветки трех кластеров (Голубой – кластер геномов из Африки и Европы, зеленый – Европейские геномы, черный – кластер USA300, преимущественно из США, Ю. Америки и Австралии). Российские геномы (n=156) отмечены красным цветом в Европейском кластере. Красные точки – наличие токсина PVL, синие – наличие мутации (D57E) в гене *cap5E*, коричневые – дикий тип гена *cap5D*.

Кластеризация преимущественно зависела от страны происхождения геномов. Большая часть геномов (75%) принадлежала к линии USA300, распространенной в США, Южной Америке и Австралии (клады черного цвета на рис. 19). Российские геномы (красные ветви)

образуют монофилетический субклад Европейской клады (зеленые ветви), близкий к геномам из Германии, возникшим в 2000-х гг. Межгрупповое попарное сравнение core-SNP между Российскими и другими геномами показывает большие различия с более чем 200 core-SNP (межквартильный интервал (IQR): 185–365). Несмотря на географическую удаленность точек сбора изолятов (Северо-Западный, Центральный регионы и Сибирь) и длительный период сбора коллекции (девять лет), Российские геномы ST8 при внутригрупповом сравнении демонстрировали высокий уровень идентичности – всего 45 core-SNP (IQR: 36 - 55). Все Российские геномы относились к *sra*-типу t008 или t024, характеризовались наличием SCCmec IVc, имели инсерцию в гене *cap5D*, аллель гена *cap5E* дикого типа и отрицательные по локусам PVL/ACME (список детерминант вирулентности и резистентности представлен в таблице 18).

Таблица 18 – Детерминанты вирулентности и резистентности, характерные для российских MRSA-ST8

Гены резистентности	<i>mecA</i> , <i>blaZ</i> , <i>cat</i> , <i>aac(6')-aph(2'')</i> , <i>ant(9)-Ia</i> , <i>ermC</i> , <i>tetK</i> , <i>tetM</i> , <i>gyrA</i> (S84L, S85P), <i>rpoB</i> (H481N).
Капсульные гены	<i>cap8A</i> , <i>cap8B</i> , <i>cap8C</i> , <i>cap8D</i> , <i>cap8E</i> , <i>cap8F</i> , <i>cap8G</i> , <i>cap8L</i> , <i>cap8M</i> , <i>cap8N</i> , <i>cap8O</i> , <i>cap8P</i>
Факторы слипания и адгезии	<i>ebp</i> , <i>esaA</i> , <i>esaB</i> , <i>esaD</i> , <i>esaE</i> , <i>esaG1</i> , <i>esaG2</i> , <i>esaG3</i> , <i>esaG4</i> , <i>esaG7</i> , <i>esaG8</i> , <i>esaG9</i> , <i>essA</i> , <i>essB</i> , <i>essC</i> , <i>esxA</i> , <i>esxB</i> , <i>esxC</i> , <i>esxD</i> , <i>fnbA</i> , <i>fnbB</i> , <i>clfA</i> , <i>clfB</i> , <i>clpP</i>
Гемолизины, факторы биопленкообразования, сидерофоры, гемолизины, энтеротоксины, суперантигены	<i>geh</i> , <i>hly</i> , <i>hld</i> , <i>hlgA</i> , <i>hlgB</i> , <i>hlgC</i> , <i>hly/hla</i> , <i>hysA</i> , <i>icaA</i> , <i>icaB</i> , <i>icaC</i> , <i>icaD</i> , <i>icaR</i> , <i>isdA</i> , <i>isdB</i> , <i>isdC</i> , <i>isdD</i> , <i>isdE</i> , <i>isdF</i> , <i>isdG</i> , <i>lip</i> , <i>lukD</i> , <i>map</i> , <i>sak</i> , <i>sbi</i> , <i>scn</i> , <i>sdrC</i> , <i>sdrD</i> , <i>sdrE</i> , <i>sea</i> , <i>spa</i> , <i>srtB</i> , <i>sspA</i> , <i>sspB</i> , <i>sspC</i>

Установлено, что устойчивость к не бета-лактамам антибиотикам опосредована плазмидными генами, их среднее количество на геном составляло 4,8. На рис. 20 показаны результаты выравнивания 180 российских и европейских геномов (PRJEB14816 [25]) без включения генетической линии ST8-USA300. В независимости от времени выделения изолятов, все российские геномы имели один общий узел с геномами изолятов, собранных в Германии (на рис. отмечено пунктиром).

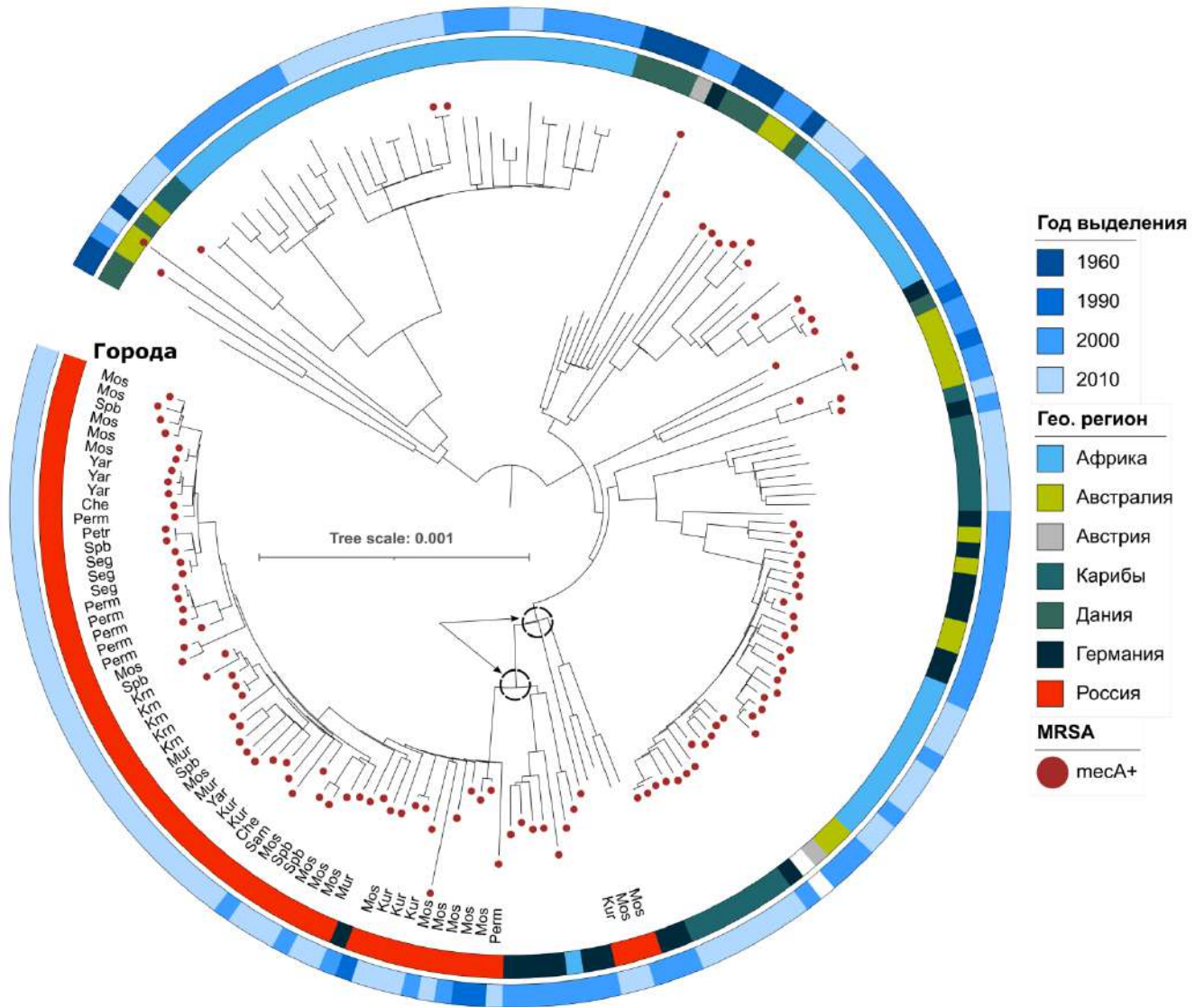


Рисунок 20 – Филогенетический анализ на основе выравнивания core-SNP (19900) геномов ST8, включающий российские, европейские и другие геномы изолятов. Обозначения городов: Mos – Москва, Spb – Санкт-Петербург, Mur – Мурманск, Kur – Курган, Yar – Ярославль, Perm – Пермь, Seg – Сегежа, Petr – Петрозаводск, Che – Челябинск, Sam – Самара, Krm – Красноярск.

Для выполнения пангеномного анализа было произведено уменьшение выборки идентичных геномов за счет исключения геномов ST8-USA300. Для этого был использован Assembly Dereplicator с параметром distance = 0,0015. После удаления высоко идентичных геномов для оставшихся 350-ти было произведено выделение core-генов и последующий пангеномный анализ. Пан-геном включал 10420 генов, из них 1482 core-генов и 8948 дополнительных генов.

Таким образом, генетическая линия HA-MRSA-ST8 имеет высокий уровень нуклеотидной идентичности с геномами изолятов, циркулирующих в Европе, и относится к соответствующему кластеру (Европейскому).

5.2.1. Реконструкция эволюции и времени появления генетической линии MRSA-ST8

Для расчета времени дивергенции и определения датировки узлов филогенетического дерева с использованием алгоритма BEAST были отобраны 172 генома, из них 153 генома были получены и секвенированы при выполнении диссертационной работы. Поскольку наибольшим сходством с российскими геномами характеризовались геномы, выделенные в разное время из Германии (n=8, PRJEB14816), они также были включены в анализ. Для калибровки построения консенсусного дерева были также добавлены геномы MSSA, выделенные в середине XX века в Европе и Австралии (n=6, PRJEB14816). Для оценки возможной филогенетической связи между ST8-MRSA и ST8-MSSA, циркулирующими на территории России, также были добавлены два генома MSSA (PRJNA541565 и PRJNA431177). Данные изоляты были выделены в 2007 и 2015 годах у пациентов с кожной инфекцией и при бактериемии, соответственно. Филогенетическое дерево с оценкой времени дивергенции представлено на рисунке 21. Общий стафилококковый предок ST8 в полученном анализе определяется 1845±30 годом, при апостериорной вероятности (posterior probability, PP)=1. Геномы изолятов MSSA-ST8 (из Дании и Австралии) образуют максимально длинные ветви с общими предшественниками, произошедшими в 1910±20 году (PP=1). В эту же группу входили и два генома российских изолятов MSSA-ST8 (обозначены на рисунке «MSSA-Ru»), а также геном изолята SA0160 (MRSA), выделенного в 2011г от пациента с остеомиелитом в Кургане. Данный изолят характеризуется *sra*-типом t3308 и стафилококковой кассетой SCCmec V типа.

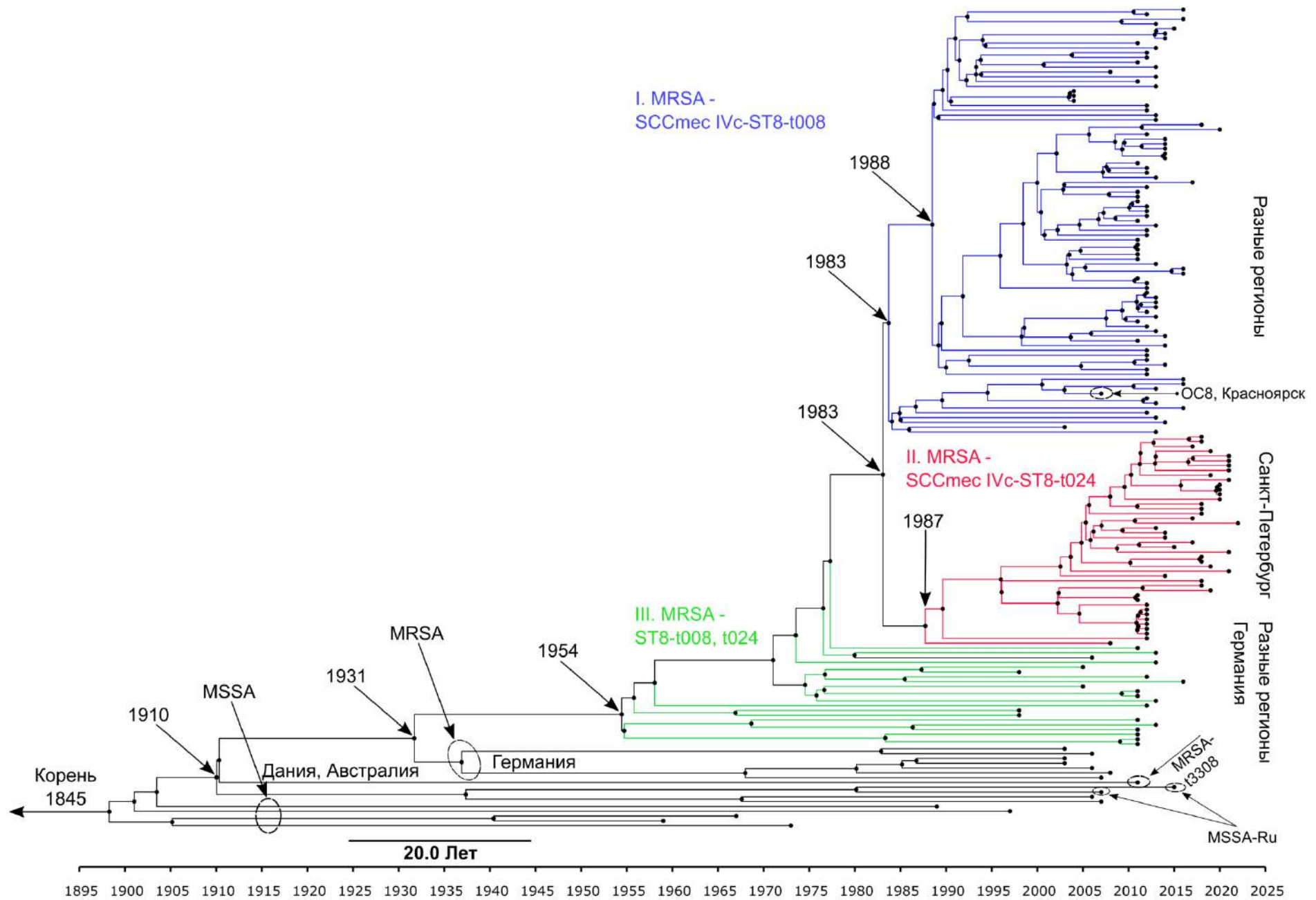


Рисунок 21 – Анализ Timed phylogeny геномов изолятов ST8 (n=172). Уровень апостериорной вероятности для времени дивергенции отмеченных узлов составляло не менее 0,98.

Геномы российских и немецких изолятов MRSA имели общего предка, появившегося в 1910±20 году, однако уровень PP составлял только 0,42, что говорит о высокой вероятности ошибки определения датировки дивергенции для данного узла. Деление от общего предка на современные немецкие и российские MRSA-ST8 определяется 1931±16 годом (PP=1). Диапазон вероятных датировок захватывает и 1940-е годы, когда в клиническую практику был внедрен пенициллин, хотя первый клинический изолят MRSA был описан гораздо позже - в 1960-х. Несмотря на это несоответствие, имеются аналогичные исследования, которые демонстрируют теоретическое расчетное время появления первых MRSA в самом начале XX века, в частности результаты работы Strauss и соавт. [25]. В настоящем исследовании геномы изолятов, максимально близкие к геномам из Германии, формировали отдельный кластер (зеленая ветка на рисунке – кластер III), который произошел от гипотетического предка в 1954±10 году (PP=1). Для геномов III кластера были характерны следующие особенности. Изоляты были собраны в 1998 – 2013 гг. из различных регионов, однако сюда не входили изоляты из Санкт-Петербурга. Все изоляты характеризовались наличием стафилококковых касет SCCmec IVc, IV (несубтипированный) типов преимущественно чувствительных к фторхинолонам и рифампицину. По спектру факторов вирулентности не было выявлено существенных отличий от других представителей MRSA-ST8 (генов, кодирующих токсины PVL, TSST, SEB обнаружено не было). Таким образом, MRSA-ST8, входящие в III кластер, можно отнести к группе архаичных промежуточных вариантов, которые с одной стороны проявляют максимальное сходство с европейскими геномами, а с другой стороны, являются предшественниками геномов двух других кластеров. Кластер I и II дивергировали от общего предшественника с геномами III кластера в 1983±7 году (PP=1). Появление геномов II кластера датируется 1987±5 годом. В данный кластер входили геномы изолятов, выделенные преимущественно в Санкт-Петербурге в период 2008 – 2022 гг. от разных пациентов, включая колонизированных *S. aureus* на фоне инфекции COVID-19. Также для геномов данного кластера были выявлены уникальные маркерные мутации, которые не встречались среди геномов других групп (таблица 19). В частности, в генах, кодирующих транспортный белок для катионов/анионов (MnhA1), рибонуклеазу Y и белок семейства CamS, участвующий в инициации конъюгативного переноса генов. Устойчивость к фторхинолонам за счет мутаций в GyrA (S84L и/или S85P) была характерным признаком данных геномов. У большинства геномов был выявлен токсин Sea. Все геномы характеризовались наличием стафилококковых касет SCCmec IVc, а также относились

к *spa*-типу t024. Появление предшественника геномов I кластера датируется 1983±5 годом (PP=0,99). Сюда вошли геномы изолятов, выделенные из различных городов России в период 2003 – 2020 гг.

Таблица 19 – Уникальные мутации, характерные для трех кластеров российских представителей MRSA-ST8

Кластер	Локус, ген	Полиморфизм	Описание продукта	
I	SecA	Ala302Thr	Участие в образовании септы и липотейхоевых кислот	
I и II	RS00125	S. (633, T→C)	Ме-гидролаза	
	EsxD	E54G	Секретируемый фактор вирулентности (секреторная система VII типа)	
	RS02085	S. (699, T→A)	Токсин-антитоксиновая система (PemK/MazF)	
	RS02390-treP	P. (T→C)	Фосфотрансфераза, транспорт сахаров	
	FusA	S. (495, A→C)	Фактор элонгации G	
	RS02930	T74K	Гликозилтрансфераза	
	RS03955	T115P	Предположительная амидофосфорибозилтрансфераза	
	RS05275	S. (555, T→C)	Гипотетический протеин	
	ArcC	A265T	Карбаматкиназа	
	PyrR	V147I	Урацил-фосфорибозилтрансфераза	
	Ebh	S. (23517, G→A)	Стафилококковый гигантский поверхностный протеин адгезии (Ebh)	
	SrrA	S. (678, C→T)	Двух-компонентная сигнальная система	
	RS07895	A102G	DUF309 domain-containing protein	
	RS08090	K138R	Белок, содержащий домен семейства FtsK/SpoIIIЕ	
	RS08610	A232S	LLM class flavin-dependent oxidoreductase	
	CspA	A177T	Регулятор транскрипции	
	RS09205	T196P	Предположительный мембранный протеин	
	RS15420- RS09700	P. (T→C)	Гипотетический протеин	
	RS10920	A16T	Нитроредуктаза	
	RS12010	Q129K	АТФаза	
	RS12410	V49I	Регулятор транскрипции (AraC)	
	RS14445-icaR	P. (C→A)	Участие в биопленкообразовании	
	VraE	S. (1278, T→C)	Регулятор биосинтеза клеточной стенки	
	II	MnhA1	T426A	Транспорт катионов/анионов
		RS04710	S. (1134, C→T)	CoA-disulfide reductase
		Rny	N214T	Рибонуклеаза Y
RS10310		P154L	Белок, участвующий в горизонтальном переносе генов	

Примечание. Аннотированные полиморфизмы представлены относительно референс-генома *S. aureus* USA300_FPR3757 (NC_007793.1). Названия локусов представлены по референс-геному,

отмечены синонимичные мутации (S.), мутации в области потенциальных промоторов (P.) и мутации, приводящие к аминокислотным заменам.

В I кластер также входил ранее описанный complete-геном изолята OC8 (описанный как CA-MRSA), выделенный в Красноярске в 2007 (PRJDB4364) от пациента с летальным исходом при развитии тяжелой пневмонии [94, 118]. Для этой группы геномов было характерно наличие мутаций в *GyrA* (S84L), *RpoB* (S464P, A477D, H481N, Y946C). Также для геномов I и II кластеров были выявлены уникальные генетические маркеры, характерные исключительно для этих групп.

5.2.2. Заключение по разделу: глобальная и локальная эволюция генетической линии ST8

Появление и распространение по всему миру CA-MRSA с конца 1980-х годов привело к стремительно распространяющейся эпидемии инфекций кожи и мягких тканей [347]. Около 5–10% из этих внебольничных инфекций являются инвазивными с высоким риском летальности, часто поражают молодых и здоровых людей [348]. Наибольшее бремя инфекций CA-MRSA пришлось на США, где получил распространение один доминирующий клон – USA300 (такое штаммовое название было присвоено на основе результатов типирования с помощью пульс-электрофореза) [349]. Позже, с внедрением MLST-типирования, было определено, что USA300 относится к ST8 [350, 351]. Повышенная экспрессия генов вирулентности и поэтапное приобретение уникальных мобильных генетических элементов повлияло на формирование гипервирулентного фенотипа. Гипервирулентность была подтверждена во многих экспериментах с использованием разных инфекционных моделей на животных [352, 353]. К числу ключевых генетических факторов можно отнести остров патогенности SaPI5, профаг Sa2int, кодирующий лейкоцидин PVL, и приобретенный комплекс ACME. Гены комплекса ACME преимущественно встречается среди ST8-USA300, обуславливают резистентность к антимикробным пептидам человека и в развитии кожных инфекций [354]. Клон USA300 распространялся по Соединенным Штатам с разной скоростью, в частности, появление USA300 в Нью-Йорке отставало от других регионов страны [350, 351], но к 2009 году этот клон стал преобладающей причиной инфекций CA-MRSA (~75%) в северных районах города и на Манхэттене. Было установлено, что колонизация человека и окружающей среды стала одной из причин высокого распространения CA-MRSA USA300 [355, 356]. В работе Uhlemann и соавт. [346] провели секвенирование и сравнительный анализ большой коллекции хорошо

охарактеризованных с эпидемиологической точки зрения изолятов *S. aureus* ST8, собранных при эпидемиологических расследованиях передачи CA-MRSA. Использовался дизайн оценки популяционной структуры и краткосрочной эволюции в городском сообществе на примере Манхэттена (Нью-Йорк). Коллекция этих геномов была включена в настоящее исследование, все они формировали один монофилетический кластер на филогенетическом дереве (рис. 21, черные ветви). Из работы Uhlemann и соавт. [346] следует, что домохозяйства служат критическим резервуаром для диверсификации, передачи и заражения CA-MRSA. Авторы также высказывают предположение, что появление устойчивости к фторхинолонам еще больше способствовало распространению USA300 как основного клона *S. aureus*.

Ранее было высказано предположение, что успешная генетическая линия MRSA-USA300-ST8 имеет происхождение от циркулирующих на территории США клонов USA500-ST8 [357]. Однако, проведённые позже более детальные работы по молекулярному типированию двух генетических линий USA300 и USA500 опровергли данную гипотезу [358]. Полученные результаты показывали, что прямая эволюция USA300 от USA500 маловероятна, поскольку их последний общий предок, по результатам эволюционного моделирования, циркулировал в Европе около 100 лет назад. Другая гипотеза подразумевала происхождение ST8 CA-MRSA на территории США от PVL-положительных MSSA-ST8, циркулирующих в Западной Австралии, Тринидаде и Тобаго и Западной Африке. Однако и эта гипотеза не была подтверждена. В фундаментальной работе Strauss и соавт. [25], при изучении коллекции разных штаммов MSSA-ST8, MRSA-ST8, собранных по всей планете, начиная с 1950-х годов, была выдвинута версия о европейском происхождении генетической линии ST8-USA300. Проведенный филогеномный анализ показал, что начало эпидемического распространения клона USA300 началось в середине XIX века через клональную экспансию популяции ST8-MSSA в Центральной Европе, в частности, в Дании. В настоящей диссертационной работе для сравнительного геномного анализа были использованы геномы из работы Strauss и соавт. [25], которые формировали два отдельных кластера (зеленые и голубые ветки на филогенетическом дереве рис. 19). Проведенный анализ в настоящей работе также согласуется с такими расчетами, так появления общего предка генетической линии ST8 датируется 1845 годом. Исходя из результатов эволюционного моделирования, ST8-MSSA со специфической мутацией в капсульном гене *cap5D*, был экспортирован в США в начале XX века из Европы, и постепенно приобрел такие генетические маркеры как PVL, ACME, SCCmec IVa/c и мутацию D75Y в гене *cap5E*. Помимо этого, выделяют еще один маркерный признак USA300-линии - наличие мобильного генетического элемента, придающего устойчивость к меди и ртути. Со временем эта «модифицированная» генетическая линия распространилась на всем американском континенте и в других географических областях (реимпорт в Европу, Африку, Австралию) [359]. Таким

образом, отправной точкой появления и распространения ST8-USA300 следует считать Данию. В настоящее время из клонов генетической линии ST8, в Европе и Австралии циркулируют как «оригинальные» варианты ST8-USA300 (PVL+/ACME+), так и различные клоны-предшественники. В работе Strauss и соавт. [25] было продемонстрировано, что геномы изолятов из этих географических областей «разбросаны» по всему филогенетическому дереву. Такое генетическое разнообразие европейских изолятов также наблюдалось и в предыдущих исследованиях [357, 360]. В отличие от европейских и австралийских ST8, изоляты из Карибского бассейна и Африки характеризуются формированием отдельных кластеров с формированием отдельных монофилетических ветвей. Также такие генетические линии могут характеризоваться иным молекулярным паттерном, в частности, другими *spa*-типами. Классический клон USA300 относится к *spa*-типу t008, хотя в некоторых исследованиях отмечается и циркуляция другого варианта – t121 [361]. Данный *spa*-тип характерен для USA300-линии, циркулирующей в странах Африки. В недавнем исследовании, проведенном в Китае, было обнаружено, что циркулирующие изоляты ST8 относились к USA300-линии. Однако, часть изолятов характеризовалась другими молекулярными особенностями, в частности, *spa*-типом t9101 и уникальным строением стафилококковых *mec*-кассет: SCC*mec* V с формированием отдельного филогенетического кластера [91]. Стоит отметить, что ST8 практически не циркулирует на территории Китая, имеются только спорадические сообщения. Полученные в настоящем исследовании результаты четко демонстрируют, что циркулирующие ST8-MRSA не относятся к линии USA-300. Однако, наибольшим генетическим сходством с геномами российских изолятов характеризовались современные европейские геномы, в частности, выделенные в Германии и не относящиеся к линии USA300, то есть без наличия таких маркерных признаков, как PVL, ACME, SCC*mec* IV подтипа а и особенностей капсульных генов (*cap5D*, *cap5E*). Используя эволюционное моделирование было установлено, что один общий предок дивергировал в 1931 году, дав начало современным европейским и российским изолятам. В свою очередь, геномы российских изолятов образуют смешанную популяционную структуру, представляющую разные кластеры, циркулирующие и в настоящее время. На основе результатов филогенетического анализа, оценки времени дивергенции и Байесовской кластеризации составлена модель эволюции MRSA-ST8 на территории России (рис. 22).

Таким образом, полученные данные свидетельствуют о том, что MRSA-ST8 на территории России формирует несколько субклонов, имеющих вероятное общее происхождение от одного предшественника с геномами изолятов, циркулирующих в Европе. Время дивергенции европейской и российской клад - 1930-е годы. Также установлено, что циркулирующие MSSA относятся к другому кластеру и формируют отдельные субклоны, что

исключает гипотезу самостоятельного формирования российского кластера стафилококков через приобретение SCCmec IVc циркулирующими MSSA. Параллельно, с распространением USA300 на территории Американского континента, Африки, Австралии и Европы и успешной длительной циркуляции ST8 на огромной территории России, можно сделать вывод, что MRSA-ST8 - наиболее успешная генетическая платформа стафилококка, обеспечивающая стабильность и высокий конкурентный потенциал по сравнению с другими генетическими линиями в глобальной популяции *S. aureus*.

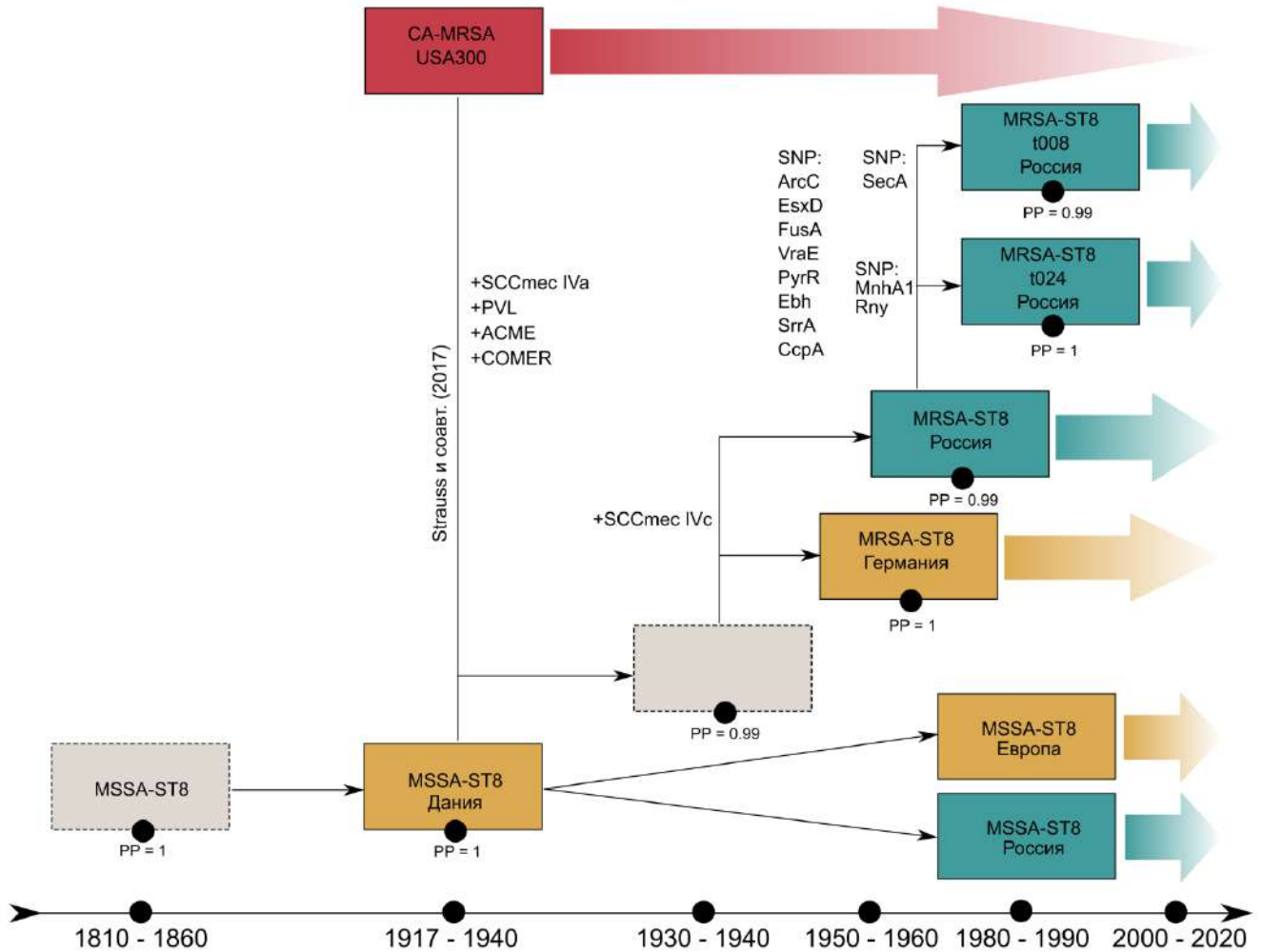


Рисунок 22 – Модель эволюции *S. aureus* ST8. PP – апостериорная вероятность, SNP – уникальные полиморфизмы. Пунктирная обводка прямоугольников – гипотетические предшественники.

5.3. Популяционная структура доминирующего клона HA-MRSA ST239

Для характеристики изолятов ST239 изначально было проведено множественное молекулярное типирование (microarray molecular typing) 24 изолятов по 540 мишеням, включающим гены и локусы вирулентности и резистентности. Данный фрагмент работы был выполнен совместно с доктором S. Monecke [362]. В исследование были включены штаммы, собранные из различных стран с конца 1990-х по 2015 гг., включая изоляты из РФ. Используя кластерный анализ на основе сравнения большого количества дискретных признаков, удалось выделить несколько кластеров: Евразийский, Европейский, Азиатский Юго-Восточный, Южноамериканский/Ближневосточный и некоторые другие. Большинство Российских изолятов (13/24) из Москвы, Санкт-Петербурга, Кургана и Челябинска относились к Евразийскому кластеру, с максимальной идентичностью к следующим референс-геномам: *S. aureus* 16K (PRJDA53963) и *S. aureus* CN79 (PRJNA177559). Три изолята из Санкт-Петербурга отличались наличием аллельного варианта гена *sea(N315)/sep*. Локальные варианты из Красноярска отличались дополнительными особенностями, в частности, наличием гена токсина TSST (референс-геном *S. aureus* OC3, PRJDB3046). Другой изолят из Красноярска принадлежал к Южноамериканскому/Ближневосточному кластеру. Четыре изолята из Кургана и Челябинска были идентичны по всем генотипическим маркерам эталонному штамму *S. aureus* ATCC 33592 («Португальский вариант» Азиатского Юго-Восточного кластера). Один изолят из Кургана был идентичен Тайваньскому варианту Азиатского Юго-Восточного кластера (референс геном *S. aureus* Z172, PRJNA222409). Один изолят из Москвы не соответствовал ни одному из кластеров, но характеризовался схожим молекулярным паттерном со штаммами Ближневосточного варианта. Молекулярные особенности штаммов, относящихся к разным кластерам, представлены в таблице 20. Таким образом, полученные данные свидетельствуют о циркуляции разных вариантов ST239 на территории России. При использовании MLST были также выявлены синглтоны (Single locus variant, SLV) и двухлокусные (Double locus variant, DLV) варианты клона ST239 (Таблица 21).

Использованная схема выделения кластеров по дискретным признакам была применена к филогенетическому дереву. В филогенетический анализ были включены 632 генома ST239 (данные были выгружены из NCBI GenBank включая SRA архив), включая 104 из России. Дерево было построено на основе выравнивания 10100 core-SNP, в качестве референс-генома использовался *S. aureus* TW20 (FN433596).

Таблица 20 – Детерминанты вирулентности и резистентности, характерные для российских MRSA-ST239

Кластер	SCC _{mec}	Гены вирулентности	Гены резистентности	spa-типы
EA	III+Cd+ <i>ccrC</i>	<i>sea+sak+scn, splE, fnbB</i> -отрицательные	<i>mecA, blaZ, cat, aac(6')-aph(2''), ant(9)-Ia, ermC, tetK, tetM, gyrA (S84L, S85P), rpoB (H481N)</i>	t030, t0632, t459
EU	III+Cd/Hg+ <i>ccrC</i>	<i>sea+sak+scn, fnbA</i> -отрицательные		t037
SEA	III+Cd/Hg+ <i>ccrC</i>	<i>sea+sak+scn, sesX/sesI</i>		t037
<i>hla/hly</i> -отрицательные	III+Cd/Hg+ <i>ccrC</i>	<i>sea+sak+scn, chp</i> -отрицательные		t037

Примечание: SLV – синглтоны, DLV – двухлокусные варианты, (~) – однонуклеотидный полиморфизм.

Таблица 21 – Таблица SLV/DLV-варианты ST239

Локус	Вариант MLST	<i>arcC</i>	<i>aroE</i>	<i>glpF</i>	<i>gmk</i>	<i>pta</i>	<i>tpi</i>	<i>yqiL</i>	spa-тип	N
SLV	Новый профиль	2	3	1	1	4	381	3	t632	10
SLV	Новая аллель	2	~3	1	1	4	4	3	t037	6
SLV	Новый профиль	2	3	944	1	4	4	3	t632	2
DLV	Новый профиль	847	3	1	1	4	381	3	t632	5
-	Стандарт ST239	2	3	1	1	4	4	3	t037	

Примечание: SLV – синглтоны, DLV – двухлокусные варианты, (~) – однонуклеотидный полиморфизм; N – абсолютное значение количества изолятов.

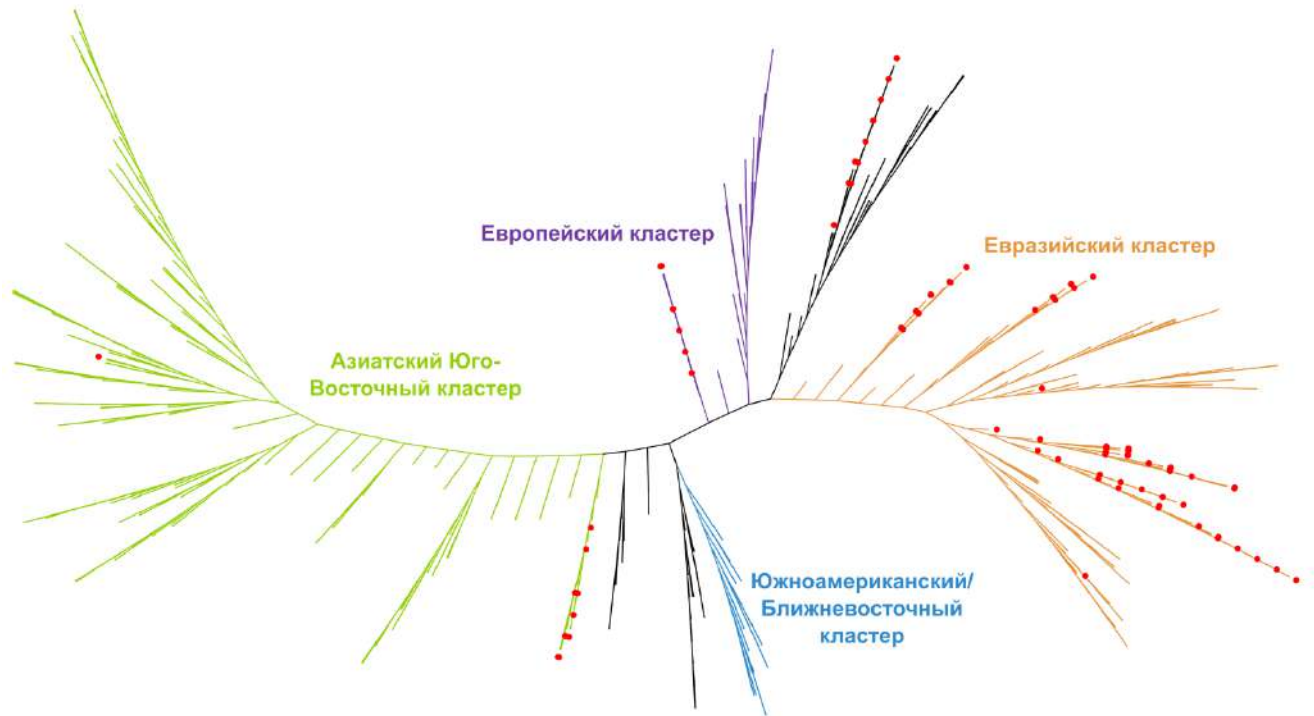


Рисунок 23 – Неукорененное филогенетическое дерево *S. aureus* ST239 (n=632) на основании выравнивания 10100 core-SNP. Цветами обозначены ветки кластеров, выделенные с помощью BAPS, названия соответствуют классификации Monecke [362]; ветки черного цвета соответствуют *hla/hly*-отрицательным изолятам. Красными точками обозначены геномы изолятов из России.

Схема кластеризации по Monecke подтверждалась на 80% результатами Байесовской кластеризации, что позволило составить основные группы изолятов по результатам типирования по дискретным признакам. Всего было выявлено пять кластеров (BAPS по Байесовской кластеризации), однако часть веток филогенетического дерева непропорционально локализовалась в разных BAPS-кластерах, это прежде всего было выявлено для Европейской группы (по Monecke). Данное наблюдение может свидетельствовать о рекомбинационных событиях, которые возможно не в полной мере были удалены из настоящей выборки геномов. Геномы изолятов из России локализовались на разных ветках филогенетического дерева и входили в состав следующих кластеров: Европейский, Азиатский Ю.-В. и Евразийский (рис. 23). Помимо этого, геномы нескольких изолятов входили в кластер BAPS-3, который не соответствовал ни одной группе по классификации Monecke (черные ветки на рис. 23).

Для датировки дивергенции узлов на филогенетическом дереве, а также расчета времени появления общих предшественников в работу было включено 219 геномов из различных коллекций, покрывающих 42-летний период (1980 – 2022 гг.), оптимальный для калибровки (рис. 24). В анализ были включены российские геномы ST239 из всех кластеров по Monecke

(n=74) за исключением SLV- и DLV-вариантов ST239. Также были включены детально охарактеризованные геномы из работы Hsu и соавт. [363] (PRJEB2295) и другие геномы с наиболее полными метаданными из NCBI GenBank (n=145). Расчетное время появления генетической линии ST239 - 1923 г. (1915 – 1935). Разделение на два основных кластера (по классификации Moneske) произошло в 1943 г. (1935 – 1955). Геномы изолятов из России, как и при предыдущем варианте филогенетического анализа, локализовались вперемешку с другими геномами из разных географических регионов. Локальный Красноярский вариант (*tsst*-положительные изоляты) образовывал отдельную группу геномов в составе Евразийского кластера, время происхождения которой приходится на 1965 г. (1956 – 1974). Отдельная группа *hla/hly* отрицательных ST239 входила в состав Азиатского Ю.-В. кластера, время появления которых датировалось 1970 г. (1964 – 1978).

5.3.1. Заключение по разделу: глобальная и локальная эволюция генетической линии ST239

S. aureus ST239 является одним из основных эпидемических штаммов, который является возбудителем стафилококковых инфекций в медицинских учреждениях по всему миру. Одни из первых описанных изолятов ST239 были собраны в конце 1970-х годов в Австралии. Позже, в Великобритании в 1981 г. описан клон EMRSA-1, который также относился к ST239. В дальнейшем вплоть до 1990 гг. данный клон являлся доминирующим на территории Великобритании. Параллельно с этим в 1980-1990 гг. ST239 получает широкое распространение и во всем мире [26]. К середине 2000-х гг. ST239 был преобладающим клоном среди MRSA в Азии, вызывающим до 90% госпитальных инфекций [364]. В настоящее время ST239 вытесняется другими успешными генетическими линиями, однако причины такого клонального сдвига остаются неизвестными [365]. На сегодняшний день ST239 рассматривается как гибридный клон, результат рекомбинации между клонами ST8 (основной тип) и ST30 (донор генетического материала). Так, в хромосоме ST239 обнаруживается около 20% (около 600 Kb.) гомологичных участков, соответствующих клону ST30 [26]. Область генетического обмена связана с «горячей» рекомбинационной областью, включающей область интеграции мобильной кассеты *SCCmec* III. Однако, элемент *SCCmec* III не встречается среди изолятов генетической линии ST30. Отсутствие *SCCmec*-III в ST30 предполагает, что истинный предок ST239 может принадлежать к близкородственной линии.

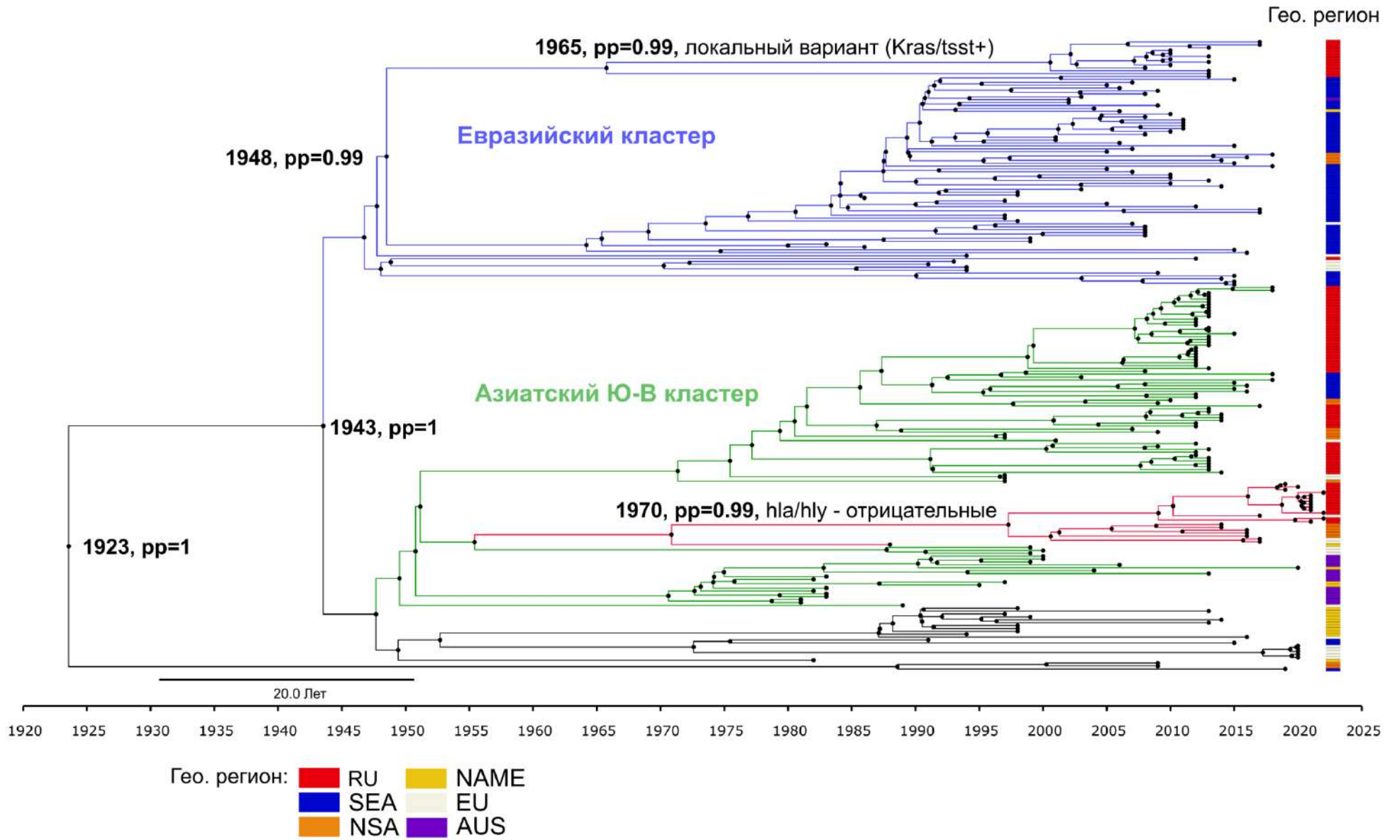


Рисунок 24 – Анализ Timed phylogeny геномов изолятов ST239 (n=219). Уровень апостериорной вероятности (pp) для времени дивергенции отмеченных узлов составлял не менее 0,98. Обозначения географических регионов: Ru – Россия, SEA – Юго-Восточная Азия, NSA – Северная и Южная Америки, NAME – Северная Африка и Ближний Восток, EU – Европа, AUS – Австралия.

По всей видимости, внедрение метициллина в клиническую практику в 1960-е годы послужило толчком к появлению ST239. Стоит отметить, что в недавних исследованиях отмечается расчетное время появления MRSA некоторых генетических линий до клинического внедрения метициллина [3], таким образом, есть вероятность того, что ST239 также может иметь более глубокую эволюционную историю. Как отмечалось ранее, распространение ST239 в последнее время снижается вследствие клонального смещения. По всей видимости, это связано с высокой биологической ценой сопротивления по мере накопления генов устойчивости к антибактериальным препаратам, а также приобретением самого крупного элемента – SCC_{mec} [106, 366]. Как показывают филогеографические и молекулярно-эпидемиологические исследования [26, 367, 368], *S. aureus* ST239 не является монофилитической генетической линией, а представлен разными субклонами. Разные кластеры характеризуются определенными генетическими особенностями. Стоит также отметить, что, по разным исследованиям, расчетное время появления ST239 датируется первой половиной XX века до 1950-х гг., то есть за долго до внедрения метициллина в клиническую практику. Однако, также стоит учитывать, что ST239 появился позже по сравнению с ST8. *S. aureus* ST239 длительно циркулирует на территории России и характеризуется выраженной ассоциированной устойчивостью к не бета-лактамам антибиотикам. По полученным результатам, в частности, используя классификацию Monecke и соавт. [362], можно сделать вывод, что в России циркулируют сразу несколько субклонов – это геномы изолятов Азиатского Ю.-В., Европейского и Евразийского кластеров. Российские изоляты не образуют отдельных кластеров, а перемешаны с геномами изолятов из других стран. Помимо этого, была выявлена циркуляция «нового» кластера – группы геномов изолятов с делетированными локусами генов гемолизинов (*hla/hly*). Данные изоляты были преимущественно выделены в 2021 – 2022 гг. у пациентов с COVID-19. Отрицательные по *hla/hly* изоляты *S. aureus* ST239 ранее были описаны в работе Monecke и соавт. [362] и входили в состав *hla*-отрицательного Азиатского Юго-Восточного подкластера. По результатам настоящего исследования данные геномы не были связаны с BAPS-3 кластером. При поиске аналогичных геномов в NCBI GenBank была выявлена их малая представленность, и в основном записи выделения геномов соответствуют 2010 гг., что может свидетельствовать о формировании нового субклона. Отмечается также

появление локального варианта ST239, циркулирующего на территории Красноярска, особенностью которого является наличие токсина TSST [94]. Таким образом, беря во внимание большую географическую территорию, можно предположить, что формирование популяционной структуры ST239 происходило путем многократного импорта и перемешивания разных субклонов. Также отмечается появление новых клонов и вариантов, что может свидетельствовать об активной эволюции данной генетической линии, несмотря на общую тенденцию сокращения частоты встречаемости ST239. Расчетное время появления ST239 (1923г, $pp=1$) в целом совпадает с результатами других авторов [100, 369, 370].

5.4. Анализ клональной структуры CA-MRSA, выделенных у здоровых носителей

Ретроспективный анализ показал, что частота выявления *S. aureus* при назальном носительстве у здоровых взрослых и детей составила 21% и 28,4%, соответственно (Таблица 22). При этом у детей за три года ретроспективного анализа (2017 – 2019 гг.) не было отмечено возрастания количества выявленных *S. aureus* (28,5 – 30%). Частота выявления MRSA у здоровых взрослых и детей составила 0,9% и 0,6%, соответственно (от числа анализированных проб за все периоды). Также не было отмечено статистически достоверного увеличения уровня носительства MRSA среди детей за 2017 – 2019 гг. ($p > 0,05$).

Таблица 22 – Частота выделения *S. aureus* и MRSA из зева у носителей (ретроспективный анализ)

Категория (Год)	Город	Образцов (n)	N (%) <i>S. aureus</i>	N (%) MRSA
Взрослые (2015)	Москва	2053	426 (21%)	13 (0,6%)
Взрослые (2016)	Москва	2000	НД*	23 (1,1%)
Всего взрослые		4053	-	36 (0,8%)
Дети (2017)	Санкт-Петербург	6360	1811 (28,5%)	24 (0,38%)
Дети (2018)	Санкт-Петербург	7666	2058 (27%)	43 (0,56%)
Дети (2019)	Санкт-Петербург	7941	2367 (30%)	45 (0,56%)
Всего дети		21967	6236 (28,4%)	112 (0,51%)
Всего		26020	6662 (25,6%)	148 (0,57%)

Примечание: * - НД – нет данных

По результатам молекулярного типирования 138 изолятов MRSA, выделенных у носителей (группа CA-MRSA, $n=194$), было выявлено 20 сиквенс-типов, относящихся к десяти клональным комплексам, 41 *sra*-тип и три основных варианта *SCCmec* – кассет. Результаты типирования CA-MRSA представлены в таблице 23. Превалирующей генетической линией была ST22-t223-*SCCmec* IVa (45,6% от числа типированных CA-MRSA изолятов). Другие

генетические линии включали: ST8-t008/t024-SCC*mec* IVc (18,2%), ST59-t1950-SCC*mec* V (8%) и ST1-t321-SCC*mec* IV (6%). Ген вирулентности *tsst* был идентифицирован у 40% изолятов, принадлежащих в основном к ST22. Гены токсина PVL были идентифицированы у восьми изолятов (5,4%), принадлежащих к ST2704, ST217 и ST154. Ген *seb* (стафилококковый энтеротоксин b) был идентифицирован у 8% изолятов, принадлежащих к ST59, ST398, ST4956 и ST4512. Фенотип OS-MRSA (*mecA*-положительные оксациллин-чувствительные *S. aureus*) был обнаружен у 36% изолятов, при этом диапазон МПК оксациллина среди этих изолятов был в диапазоне 0,25-2 мкг/мл.

Таблица 23 – Данные молекулярного типирования изолятов CA-MRSA, выделенных у носителей

MLST		<i>spa</i> -тип	SCC <i>mec</i>	% ^A	OS-MRSA ^B	Гены вирулентности (n) ^C		
CC*	ST**					<i>lukSF</i>	<i>tsst</i>	<i>seb</i>
22	ST22	t223, t309, t3375, t2571	IVa	45,6	+	-	+	+/- (2)
8	ST8	t008, t024	IV	18,2	-	-	+	-
59	ST59	t1950	V	8	-	-	-	+
1	ST1	t321, t127	IV	6	+	-	-	-
5	ST5	t688	V	3,6	+	-	+	-
5	ST2704	t002	IV	3	+	+	-	-
8	ST239	t037	III	3	-	-	-	-
8	ST72	t1597, t148, t324	IV	2	-	-	-	-
22	ST217	t359	IV	1	-	+	+	-
398	ST398	t034, t011	V	1,4	-	-	-	+
1	ST188	t189	IV	0,7	-	-	-	-
1	ST4956	t321	IV	0,7	-	-	-	+
59	ST4512	t1950	V	0,7	+	-	-	+
-	ST154	^D НТ	IV	0,7	-	+	-	-
15, 30, 8, 97	Другие: ST7, ST1535, ST30, ST4335, ST97	^E Другие: t012, t425, t6675, t8391, t6606, t7078, t103, t9606, t091, t11791, t359, t1405, t084, t148, t1597, t18470	V, IV, IVb	5	+	-	+/- (7)	-

Примечание: ^AКоличество от числа типированных CA-MRSA (n=137); ^BOS-MRSA – *mecA*(+) оксациллин-чувствительные фенотипы, выявленные среди разных сиквенс-типов; ^CВ скобках отмечено количество (абс.) положительных изолятов в тех случаях, когда только часть изолятов были положительными; ^DНТ – не типлируемые изоляты; ^EДругие – перечислены все *spa*-типы, выявленные среди CA-MRSA; ST – сиквенс-тип; CC – клональный комплекс.

Таким образом, в настоящем исследовании была осуществлена попытка анализа CA-MRSA одного из популяционных кластеров – здоровых носителей. Ранее, в диссертационном исследовании О. Е. Хохловой [371] были исследованы стафилококки, выделенные от различных носителей (детей в домах ребенка, школьников, студентов, спортсменов и носителей среди медицинского персонала) в Красноярском крае. Автором было проанализировано более 6000 мазков, и доля верифицированных MRSA составляла, в зависимости от категории носителей, 0 – 4,2%. При этом MRSA были выявлены только среди детей домов ребенка, студентов медицинских вузов и медицинского персонала. Выявленные MRSA относились к ST8-t008-SCCmec IVc, ST239-t037-SCCmec IIIA и ST30-t019-SCCmec IVc. По результатам настоящего исследования только у одного ребенка был выявлен PVL-отрицательный клон ST30-t012-SCCmec IVc, положительный по гену *tsst*. В целом результаты по анализу клональной структуры CA-MRSA у носителей в значительной степени отличаются от работы О. Е. Хохловой. Как отмечалось ранее среди HA-MRSA были обнаружены единичные клоны CC22 (EMRSA-15), а большинство изолятов CA-MRSA принадлежали к ST22-t223-SCCmec IVc (*tsst*⁺). Особенностью CA-MRSA ST22 был низкий уровень ассоциированной устойчивости к антибиотикам. Высокая частота выявления «Газа клона» вызывает определённую обеспокоенность, поскольку неизвестно о дальнейшем распространении этой генетической линии, не исключен сценарий замещения циркулирующих клонов HA-MRSA новым клоном ST22, несущем ген вирулентности *tsst*. Три изолята ST22-t223 были выделены в группе HA-MRSA, таким образом «Газа клон» ассоциирован не только с носительством.

5.5. Сравнительная геномная характеристика «Газа-клона» ST22

Для характеристики глобальной геномной эпидемиологии генетической линии ST22, а также определения места ST22 в Российской популяции, проведен сравнительный анализ нескольких выборок геномов. Основные результаты данного раздела представлены в работе [372]. В анализ были включены следующие выборки геномов: *S. aureus* ST22 из NCBI GenBank (n=1283), загруженные в 2020 году, и геномы 60 изолятов ST22-SCCmec IV из России. Среди геномов из GenBank 724 принадлежали к клону EMRSA-15 [373], и 59 представляли собой «Газа клон» [30]. Было проведено несколько геномных выравниваний: выравнивание всей выборки (1343 геномов), выравнивание Российских геномов и геномов «Газа клона» (n= 59+60), выравнивание только Российских геномов (n=61, референс-геном: *S. aureus* NCTC13616 (NZ_LR134193.1). Пангеном популяции ST22 (n=1343) состоял из 10555 генов, из которых 15% относились к ядерному геному. Филогенетический анализ проведен на основе выравнивания

19693 core-SNP, экстрагированных из 1528 локусов, относящихся к ядерному геному. С использованием байесовской иерархической кластеризации (BAPS) были определены три основных кластера: «EMRSA-15», «Газа-клон» и «Кластер-3» (рис. 25).

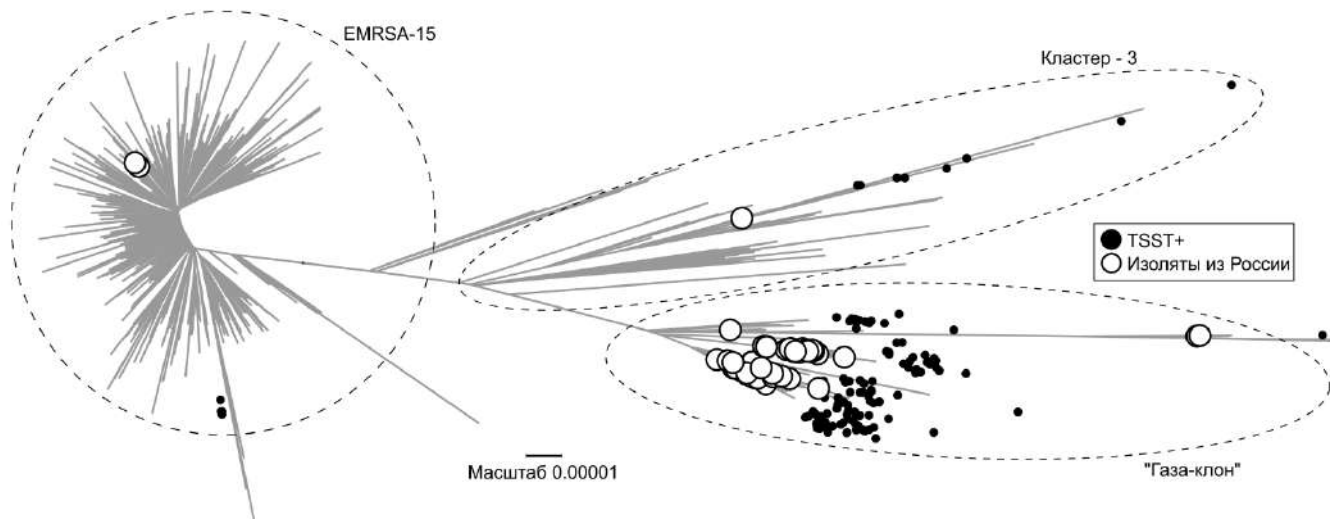


Рисунок 25 – Глобальная популяционная структура генетической линии ST22 на основании выравнивания 19101 core-SNP, полученных из 1343 геномов. Отмечены три ветки – кластер геномов EMRSA15 (A), кластер-3 (B), представленная группой геномов, имеющих черты сходства EMRSA-15 и «Газа клона», кластер «Газа клон» (C). Российские геномы (n=60) отмечены белыми окружностями, черные точки – наличие токсина TSST.

Межгрупповые попарные сравнения медиан core-SNP (ММПС) между тремя кластерами геномов показали низкую гетерогенность с отличием всего на 27 – 33 core-SNP с нижним и верхним межквартильным диапазоном (МД): 24–37 (табл. 1). Кластер «EMRSA-15» был представлен преимущественно геномами EMRSA-15 с высоким уровнем нуклеотидной идентичности при МВПС 8 core-SNP (МД: 6 – 10 core-SNP). Данный кластер преимущественно включал геномы из Великобритании и единичные геномы из Европы, Австралии, Азии и Ближнего Востока, несущие SCC*tec* IVh вариант стафилококковых *tec*-кассет. Только два изолята из России относились (рис. 25) к кластеру «EMRSA-15». Делеция в гене уреазы (*ureC*) является маркерным признаком EMRSA-15, следовательно в наибольшей степени этот признак представлен в соответствующем кластере. Частота встречаемости различных маркерных признаков в трех кластерах представлена в таблице 24. Кластер 3 включал изоляты из Азии, Европы, Великобритании, Австралии и других регионов, а также по одному изоляту из Ближнего Востока и России с SCC*tec* IVa и IVc. Подавляющее большинство в выборке геномов ST22 относились к MRSA, однако в этом кластере 35% изолятов были *tecA*-отрицательными. Геномы характеризовались МВПС 29 core-SNP (МД: 23–34 core-SNP).

Кластер «Газа-клон» в большей степени представлен изолятами из Ближнего Востока и России, единичные изоляты были из Европы, Великобритании, Азии и других регионов. Геномы характеризовались МВПС 13 core-SNP (МД: 9–17). Все изоляты, охарактеризованные ранее как «Газа клон» [30], были в составе данного кластера. Таким образом, почти все Российские изоляты (n=58), выделенные от здоровых носителей, относились к «Газа клону» (рис. 25).

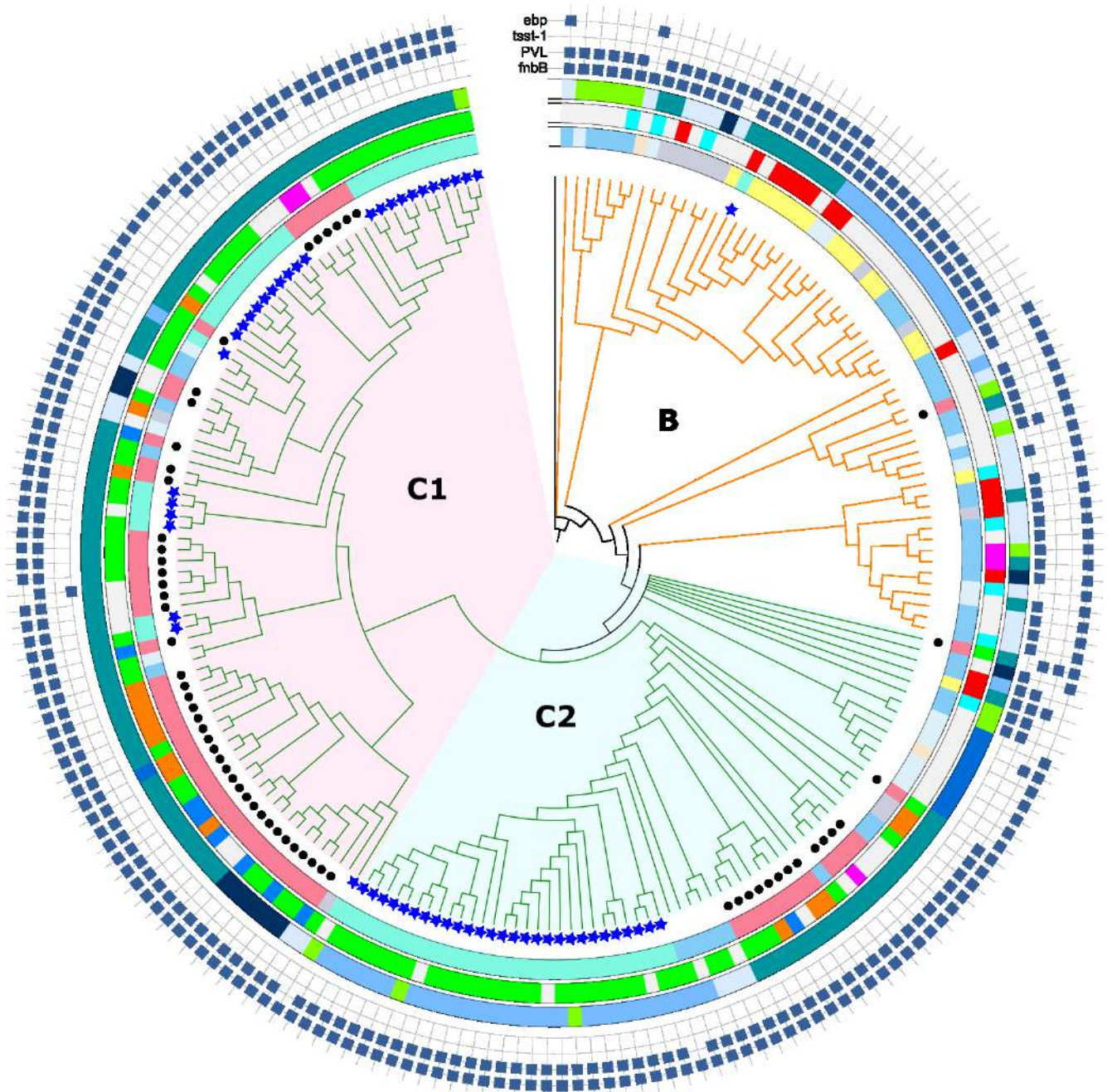
Таблица 24 – Частота встречаемости разных генетических маркеров в трех кластерах генетической линии ST22

Маркер	*Кластер А (n=1137)	Кластер В (n=60)	Кластер С (n=146)
SCCmec	IVh	IVa, IVc, V	IVa, IVc
<i>spa</i> ^A	t032 (53%), t379 (9%)	t005 (22%), t310 (12%)	t223 (55%), t3243, (11%)
NCTC13616_00051 ^B	98%	0%	5,5%
NCTC13616_00047 ^B	98,6%	37%	20%
<i>fnbB</i>	0%	5%	92%
<i>ebpS</i>	100%	55%	96,6%
<i>mecA</i>	99%	65%	94,5%
<i>blaZ</i>	99%	90%	86%
<i>ermC</i>	67%	27%	18,5%
<i>aac(6')-aph(2'')</i> , <i>aadD</i>	2%	50%	6%
<i>tetK</i>	1,6%	2%	9,5%
<i>fusA</i> (мутации)+ <i>fusB/C</i> ^C	8%	8%	2%
<i>ureC</i> 69delT	99,3%	0%	4,8%
TSST	0,35%	13%	87%
Уровень рекомбинаций, rho/theta	0,027 ± 0,022	0,012 ± 0,008	0,02 ± 0,016
GyrA (S84L)	98,1%	31,6%	6,8%
RpoB (A477V, A477D, H481N)	2%	0%	0%
<i>lukFS</i> (PVL)	0	60%	3,4%

Примечание: А – представлены доминирующие *spa*-типы. В – названия локусов штамма *S. aureus* NCTC13616 (NZ_LR134193.1). С – устойчивость к фузидиевой кислоте. * – Кластер EMRSA-15 (А), кластер 3 (В), кластер «Газа клон» (С).

Анализ рекомбинационных событий для геномов ST22 показал, что они характеризуются низким уровнем рекомбинаций, и для геномов кластера С этот показатель наименьший (медиана значений rho/theta 0,02±0,003 анализ программы Gubbins). Результаты анализов PCA и

UPGMA-кластеризации, основанные на бинарном распределении генов пангенома ST22, показали наличие трех кластеров, которые совпадали с результатами байесовской иерархической кластеризации. При оценке различий в составах генов, а также мутаций были выявлены следующие особенности. Для кластера А (EMRSA-15) было характерно наличие следующих генов: кодирующие гипотетические белки NCTC13616_00047, NCTC13616_00051 (названия относительно локусов штамма *S. aureus* NCTC13616 (NZ_LR134193.1), делеции в *ureC* и мутации в *gyrA*. Наличие гена токсина *tsst* было характерным признаком для геномов кластера С (черные точки рис. 25), а отсутствие гена *ebpS* — характерным признаком кластера В (отсутствует у 55% геномов). Кластер В также был связан с высокой частотой встречаемости генов токсина PVL (*lukSF*). Три кластера различались по наличию генов субъединиц фибронектин-связывающего белка (*fnb*). В частности, геномы всех кластеров содержали ген *fnbA*, однако, *fnbB* был обнаружен только в геномах кластера С («Газа клон»), не выявлялся у изолятов кластера А и был обнаружен у 5% геномов кластера В. Ген *fnbB* полностью делетирован между участком гена *galU* (UTP-glucose-1-phosphate uridylyltransferase, участвующем в гликолипидном обмене и биосинтезе липотейхоевых кислот) и *fnbA*. Все Российские изоляты ST22 имели МВПС 25 core-SNP (МД: 14 – 35). Из 60 изолятов два изолята (ST22-t032-SCC*mec* IVh) принадлежали к кластеру А (EMRSA-15), один (ST22-t005-SCC*mec* IVa) – к кластеру В, остальные (n=57) – к кластеру С (ST22- t223-SCC*mec* IVa/IVc). На рисунке 26 представлено выравнивание 21922 core-SNP геномов, вошедших в три кластера. Кластер «Газа клона» состоял из двух очень похожих субкластеров С1 и С2; различия между двумя субкластерами были связаны с типом SCC*mec*. Изоляты субкластера С1 преимущественно содержали *mec*-кассеты типа IVa, тогда как изоляты С2 характеризовались значительным разнообразием SCC*mec* вариантов (IVc, IVa и IVh). На кладограмме рис. 26 также представлено распределение геномов по географии происхождения, *sprA*-типированию и SCC*mec*-типированию. Не было выявлено зависимости деления на субкластеры от географического происхождения изолятов и результатов типирования. Российские ST22 представлены в обоих субкластерах С1 и С2 совместно с ST22 из Ближнего Востока, что говорит об общности происхождения двух географически независимых и время-независимых клонов. На рисунке 27 изображен третий вариант выравнивания 30170 core-SNP, представленный только Российскими геномами. При таком варианте выравнивания сохранялось деление на субкластеры С1 и С2.



Country	spa type	SCCmec type
UK	t223	SCCmec IVc
Europe	t3243	SCCmec IVa
Asia	t005	SCCmec IVh
Middle East	t7454	SCCmec V
Australia	t310	Other
Russia	t1328	mecA/mecC negative
Other	Other	

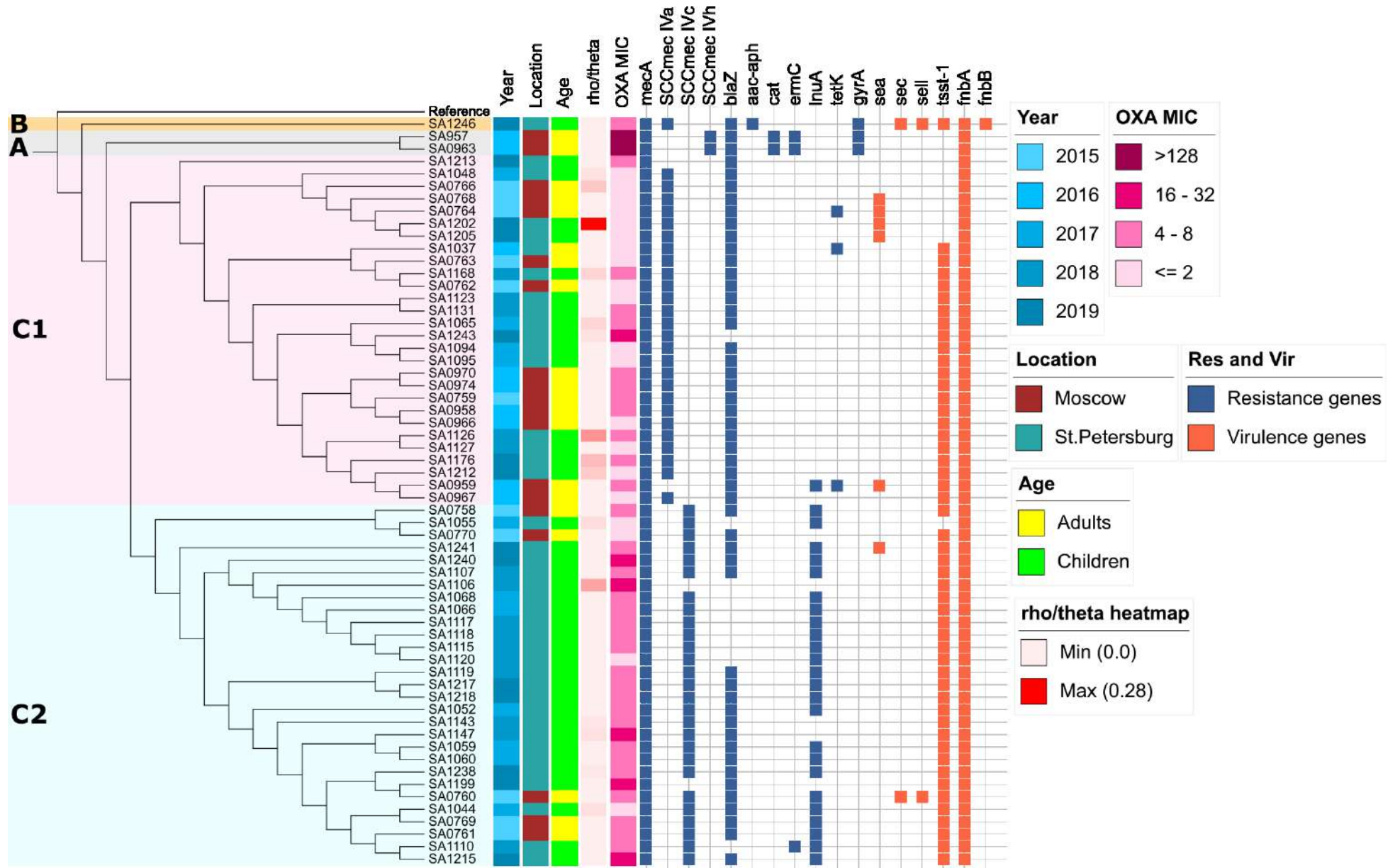


Рисунок 26 – Филогенетическая реконструкция (кладограмма) «Газа клон» кластеров В и С (n = 207) на основании выравнивания 21922 core-SNP с удалением сайтов рекомбинаций. Субкластеры С1 и С2 отмечены заливкой фонового цвета. Аннотации представлены от внутреннего кольца к внешнему: география (Country), spa-типирование (spa type), типы SCCmec (SCCmec type) и наличие генов вирулентности (*ebpS*, *tsst*, *lukFS* и *fnbB*, соответственно). Синие звездочки обозначают российские геномы ST22, черные кружки обозначают геномы ST22 из исследования Chang и соавт. [30].

Рисунок 27 – Филогенетическая реконструкция (кладограмма) Российских геномов ST22 (n=60). Аннотации: год сбора изолятов (Year), город (Location), возраст носителей (Age), факторы резистентности (синий цвет) и вирулентности (оранжевый) – Res and Vir, включающие *mecA*, SCCmec IVa, IVc, IVh, *blaZ*, *aac-aph*, *cat*, *ermC*, *lnuA*, *tetK*, мутации в *gyrA*, *sea*, *sek*, *seiL*, *tsst*, *fnbA*, *fnbB*. Столбцы тепловой карты демонстрируют уровень рекомбинационных событий (ρ/θ heatmap) и МПК оксациллина (OXA MIC). Изоляты, принадлежащие к кластерам А, В или субкластерам С1, С2, обозначены заливкой фонового цвета. В качестве референс-генома использовался *S. aureus* NCTC13616 (NZ_LR134193.1).

Геномы изолятов были равномерно распределены между субкластерами С1 и С2. Все геномы изолятов субкластера С1 содержали SCCmec IVa, 55% из них характеризовались чувствительностью к оксациллину (МПК ≤ 2 мкг/мл). Изоляты субкластера С2 содержали SCCmec IVc, и только 13% из них проявляли чувствительность к оксациллину. Изоляты этого субкластера также несли ген *lnuA*, кодирующий линкозамид-нуклеотидилтрансферазу, обуславливающий устойчивость к линкозидам. Остальные гены, определяющие устойчивость к антимикробным препаратам (*aac-aph*, *cat*, *ermC* и *tetK*), обнаружены только у единичных изолятов обоих субкластеров. Все изоляты были полностью чувствительны к линезолиду, тигециклину, даптомицину, цефтаролину и ванкомицину.

5.5.1. Заключение по разделу: эпидемиология и эволюция генетической линии ST22

В 2012 г. среди здоровых людей в секторе Газа (Палестина) была зарегистрирована необычно высокая заболеваемость чувствительным к ципрофлоксацину CA-MRSA-spa-t223-SCCmec-IVa [109]. Авторы пришли к выводу, что «Газа клон» имеет происхождение от локального циркулирующего варианта -MSSA-spa-t223-ST22, а не от эпидемического клона EMRSA-15, доминирующей генетической линии в Западной Европе. Позже была описана еще

одна отличительная черта «Газа клона» — наличие гена, кодирующего токсин TSST, а также *sra*-тип t223 [374]. Методы геномной эпидемиологии, использованные в недавних исследованиях, позволили локализовать «Газа клон» как отдельный кластер, отличный от EMRSA-15 [30]. Авторы исследования также выразили обеспокоенность возможным распространением этой генетической линии за пределами сектора Газа, в других географических регионах. Так, на сегодняшний день «Газа клон» уже описан и в других регионах, не только на Ближнем Востоке [375]. В Италии среди носителей также были выявлены *tsst*-положительные MRSA ST22-t223-IVa [376]. Анализ 60 геномов российских изолятов и 1283 геномов из GenBank показал, что глобальная популяция ST22 достаточно однородна; однако нельзя исключать, что уровень однородности преувеличен из-за недостаточной представленности MSSA в исследуемой популяции. Вдобавок к уже известным молекулярным маркерам «Газа клона», в настоящем исследовании были определены и новые маркеры. К их числу можно отнести наличие гена *ebpS*, гипотетические белки NCTC13616_00047, NCTC13616_00051, вероятно участвующие в мобилизации стафилококковых *tec*-кассет [377]. Большинство генетических линий MRSA содержат два фибронектин-связывающих белка (FnbA и FnbB), однако его отсутствие является характерным признаком EMRSA-15 и клонов, входящих в CC5 [109, 378]. Напротив, «Газа клон» характеризуется наличием интактных генов *fnbA* и *fnbB*, что может рассматриваться как еще один молекулярный маркер. Помимо этого, для EMRSA-15 характерно наличие делеции в гене *ureC*, которая отсутствует у «Газа клона». Геномы изолятов ST22, полученных от здоровых носителей, демонстрируют стабильность и низкую эволюционную изменчивость. Это определяется крайне низким количеством мутаций и рекомбинационными событиями в сравниваемых геномах, несмотря на географию сбора образцов (два города – Санкт-Петербург, Москва), возрастную категорию участников (взрослые и дети), временной интервал сбора (2015 – 2019 гг.). Кластер С включал геномы ST22 «Газа клона» из Палестины [30], а также 57 геномов из России и небольшое количество геномов изолятов из других географических регионов. Несмотря на то, что изоляты кластера С характеризовались высокой степенью идентичности, удалось выделить два субкластера С1 и С2. Поскольку все изоляты из России были сгруппированы в субкластеры С1 и С2 вместе с изолятами «Газа клона», можно предположить, что в ближневосточном регионе «Газа клон» дифференцировался в две близкородственные линии, и эти линии были импортированы в Россию независимо друг от друга. В подавляющем большинстве случаев «Газа клон» выявляется от здоровых носителей, однако в исследовании из Палестины в одном медицинском центре описано выделение *tsst*-положительных ST22 MRSA из разных источников, включая кровь [374]. Возможно, роль «Газа клона» в развитии инфекций недостаточно изучена и более значительна, чем принято считать.

Наличие токсина TSST в геноме представляет потенциальную угрозу развития тяжелых инфекций. Полученные данные свидетельствуют о начале распространения «Газа клона». Если в начале 2000-х годов этот клон встречался только среди здоровых носителей, то в последних исследованиях все больше приводятся описания этого клона как возбудителя инфекций [379, 380]. Стоит также отметить, что в настоящей работе в коллекции изолятов MRSA, собранных с 2019 года, единичные изоляты ST22-t223-SCC*mec* IV были выделены от пациентов со стафилококковыми инфекциями, что обсуждалось в разделе 5.1. Необходимы дополнительные исследования оценки клинической значимости «Газа клона», а также выявления причин успешной колонизации слизистой оболочки носа человека. В 2023 в Японии были обнаружены изоляты MRSA ST22 несущие два токсина TSST и PVL, выделенные при тяжелых инвазивных инфекциях [381]. Анализ таких клонов показал, что они имеют черты эпидемических ST22 и «Газа клона». Это исследование еще раз подчеркивает важность наблюдения за распространением и локальной эволюцией ST22.

5.6. Сравнительная геномная характеристика MRSA-ST59

Результаты данного раздела опубликованы в работе [382]. Были проанализированы девять OS-MRSA изолятов, характеризующихся наличием энтеротоксина B, относящиеся к *sra*-типу t1950 и несущие SCC*mec* V. Восемь изолятов были выделены от здоровых носителей (группа CA-MRSA), еще один изолят SA1155 (ST59-t437, *lukFS*+) выделен у пациента с инфекционным поражением кожи. Изоляты преимущественно характеризовались отсутствием ассоциированной устойчивости к не бета-лактамам антибиотикам, были выявлены единичные гены резистентности (*ermB*, *ant(6)-Ia_1*, *aph(3')-III_1*, *tetK*). Два изолята характеризовались отсутствием пенициллиназы.

Для проведения сравнительного анализа в исследование были включены геномы *S. aureus* ST59 из различных источников (Таблица 25). Геномы, представленные в виде сырых данных (ридов), были загружены из ENA или SRA репозиторий и собраны в контиги. При этом использовалась такая же оценка качества, как для всех собранных геномов в настоящем исследовании. Различные однонуклеотидные варианты ST59, определённые по стандартной схеме MLST, исключались из анализа. Таким образом, для последующего геномного анализа было включено 252 генома. После проведения геномного выравнивания были экстрагированы core-SNP. Эти уникальные полиморфизмы были объединены в выравненные последовательности, финальный размер которой составил 252 x 13,2 Кб. С использованием Байесовской кластеризации было выделено четыре кластера (BAPS1 – BAPS4).

Филогенетическая кластеризация на 90% совпадала с BAPS-кластерами (рис. 28). В кластер BAPS1 входили преимущественно MRSA изоляты, характеризующиеся наличием SCC $_{mec}$ Vb, а также относящиеся к следующим *spa*-типам: t441, t437 и t1950. Изоляты кластера BAPS1 характеризовались наличием OS-MRSA-ассоциированных мутаций (*mecA*(-7G/A) + E246G или *mecA*(-33C/T) + E246G + S225R). По географии в рассматриваемый кластер входили геномы изолятов из Китая, Тайваня и Европы. Изоляты из России входили только в кластер BAPS1 совместно с геномами изолятов из Европы и Юго-Восточной Азии без формирования монофилетической ветки. Особенностью резистомов этого кластера было наличие следующих генов: *ant(6)-Ia_1*, *aph(3')-III_1*, *ermB*, *blaZ* и *tetK*. Анализ генов вирулентности, кроме наличия *seb*, выявил следующие характерные гены: *lukFS*, *chp*, *scn*, *selk*, *selq*. Ранее была предложена классификация представителей ST59 на основе генотипирования основных маркеров вирулентности и резистентности, а также BEAST-кластеризации с оценкой времени дивергенции [383, 384]. На основе этих данных с использованием предложенных схем классификаций было установлено, что российские геномы входили в группу геномов Восточно-Азиатской линии. Данная группа геномов состояла из циркулирующих в настоящее время как инвазивных изолятов, так и изолятов от носителей.

Таблица 25 – Геномы MRSA/MSSA – ST59, включенные в сравнительный анализ

Источник	Количество геномов (абс.)	Краткая характеристика изолятов
NCBI GenBank	96	Различные изоляты (MRSA, MSSA), собранные как при носительстве, так и при инвазивных инфекциях
Исследование Harrison и соавт. [320]	16	Изоляты MRSA проявляющие чувствительность к бета-лактамам антибиотикам, включая комбинацию PEN/CL
Исследование Ward и соавт. [384]	93	Коллекции изолятов MRSA, MSSA, собранных из разных географических регионов. Преимущественно инвазивные изоляты
Исследование McClure и соавт. [383]	37	
NCBI GenBank	<i>S. aureus</i> M013 (CP003166.1)	Референс-геном

Примечание: PEN/CL – пенициллин-клавуланат.

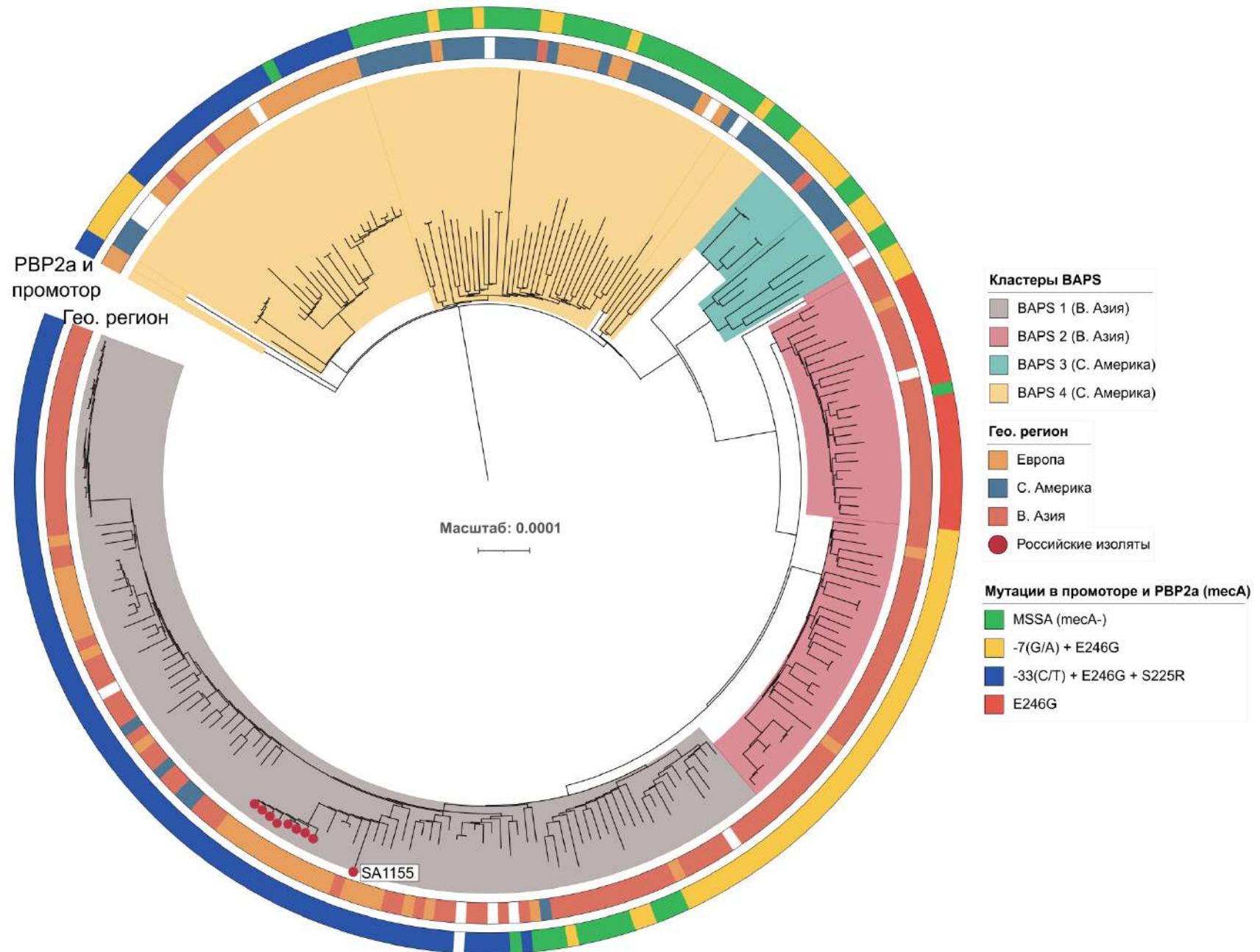


Рисунок 28 – Филогенетический анализ с оценкой максимального правдоподобия популяции *S. aureus* ST59. На рисунке отмечены: положение генома изолята SA1155, кластеры BAPS, происхождение изолятов, промоторные мутации *tecA* и аминокислотные замены в RBP2a. Рисунок был использован в работе [382].

Большинство (87%) представителей ST59 являются носителями профаговых структур, где закодирован экзотоксин SEB, у 80% геномов, входящих в состав кластера BAPS 1, был выявлен токсин PVL, который также локализован в профаге. Как уже отмечалось ранее, для OS-MRSA характерно наличие мутаций как в промоторе *tecA*, так и в его структурной кодирующей области. Подавляющее большинство геномов MRSA-ST59 (70%) характеризовались наличием таких мутаций. В частности, были выявлены: промоторная мутация G→A в положении -7 совместно с наличием аминокислотной замены E246G (группа «Чувствительные-2» по Harrison и соавт. [320]), замена C→T в положении -33 и замены E246G, S225R («Чувствительные-3»). Как уже отмечалось ранее, Российские изоляты ST59, включая изолят SA1155, входили в кластер BAPS1 и по классификации Harrison и соавт. [320] относились к категории «Чувствительные-3». Кластер BAPS2 включал MRSA изоляты, выделенные из Китая и Тайваня, характеризующиеся наличием SCC*tec* IVa/ IVg и относящиеся к *sra*-типам t441 и t437. По классификации McClure данная группа геномов дивергировала в 1982 г., образуя одну из Восточно-Азиатских сублиний. По классификации Harrison изоляты характеризовались как «Чувствительные-2» и «Устойчивые-2» (фенотипы, проявляющие обычный уровень устойчивости к бета-лактамам и имеющие мутацию в RBP2a – E246G). По спектру генов резистентности и вирулентности изоляты BAPS2 не отличались от BAPS1, за исключением отсутствия генов токсина PVL. Кластеры BAPS3, BAPS4 были представлены MSSA и MRSA изолятами, относились к Северо-Американской сублинии по классификации McClure с расчетным временем появления в 1950-х гг. По географии распространения данные изоляты циркулируют в основном на территории Северной Америки и Западной Европы. MRSA изоляты характеризуются также OS-MRSA-ассоциированными мутациями, по классификации Harrison характеризуются как «Чувствительные-2» и «Чувствительные-3». Геномы кластеров BAPS3 и BAPS4 характеризовались следующими молекулярными особенностями: это преобладание *sra*-типов t163, t172, t216, t316; наличие SCC*tec* IVd и SCC*tec* V; относительно низкое количество детерминант резистентности с наличием только пенициллиназы (*blaZ*).

Дополнительно было проведено попарное сравнение количества core-SNP между представителями геномов разных BAPS кластеров, а также геномов из России. Так при внутригрупповом сравнении все российские геномы характеризовались высокой степенью

идентичности, которая составила (M (IQR) – 13 (8 – 18) core-SNP. При сравнении российских геномов и геномов, входящих в состав кластера BAPS1, количество core-SNP составляло 142 (120 – 157). Наибольшим количеством core-SNP отличались результаты сравнения представителей BAPS1 и BAPS4 кластеров, что составляло 438 (416 – 461) core-SNP. Стоит также отметить, что геномы, входящие в состав BAPS1 (включая и изоляты из России) и BAPS2, при внутригрупповых сравнениях характеризовались более выраженной гомогенностью (M – не более 164 core-SNP) по сравнению с результатами сравнений внутри кластеров BAPS3 и BAPS4 (M – 342 core-SNP). Геномы российских изолятов характеризовались наличием уникальных маркерных полиморфизмов. Значимые миссенс-мутации относительно референс-генома *S. aureus* M013 были выявлены в 20-ти различных генах, входящих в разные биологические системы клетки (генеральный метаболизм, клеточное дыхание, разные биосинтетические пути, системы секреции). В наибольшей степени по спектру разных полиморфизмов отличался геном изолята SA1155. Так, для этого изолята было характерно наличие 72 core-SNP, отличающих его, как от российских, так других геномов кластера BAPS1. В список core-SNP относительно референс-генома входило несколько стоп-кодонов, в частности, в гене M013TW_RS00585 (биосинтез структур O-антигена), в гене M013TW_RS04335 (транспорт солей серы), в гене M013TW_RS10290 (транспорт соединений аммония). Различные аминокислотные полиморфизмы обнаруживались в разных локусах генома, включая зоны интеграции мобильных генетических элементов, белках, входящих в состав рибосом, регуляторных и транспортных белках. Было выявлено три уникальных core-SNP, характерных исключительно для генома изолята SA1155, в частности, в рибосомальном белке L28 (M013TW_RS05945) с заменой в положении T140C (V47A), в предположительной глиоксалазе (M013TW_RS07825), с заменой T125C (V42A), в гипотетическом протеине семейства DUF2316 с заменой A94G (K32E). Для всех российских геномов было характерно наличие уникальной замены (G2380C, E794Q) в гене M013TW_RS05840, кодирующей большую субъединицу карбамоилфосфатсинтетазы и участвующей в метаболизме пиримидинов. Также для всех российских геномов, кроме изолята SA1155, было характерно наличие уникального полиморфизма в гене *glpR* (локус M013TW_RS03495), в позиции A502G (N168D). Данный ген участвует в углеводном метаболизме, в частности, в метаболизме лактозы. Таким образом, перечисленные уникальные генетические маркеры характеризуются наибольшей дискриминирующей силой.

5.6.1. Заключение по разделу: глобальная и локальная эволюция генетической линии ST59

MRSA-ST59 – это доминирующий клон, циркулирующий на территории Восточной, Юго-Восточной Азии и вызывающий как внутрибольничные, так и внебольничные инфекции [385, 386]. Данный клон также встречается в Северной Америке и Европе, но это единичные описания [383, 384]. Было установлено, что MRSA-ST59 является одним из основных возбудителей инфекций кожи у детей [387]. Рост числа инфекций отмечается в Китае [388]. Недавно был исследован путь распространения MRSA-ST59 в Китае через продукты питания, так была выявлена высокая нуклеотидная идентичность между геномами изолятов, выделенных из различных продуктов и от пациентов со стафилококковыми инфекциями [389]. Особую озабоченность представляют PVL-положительные изоляты ST59, способные вызывать тяжелые формы инфекций [390]. На территории РФ ST59 ранее не описывались, отсутствуют данные о циркуляции этого клона как в внутригоспитальной среде, так и в популяции человека. Все изоляты MRSA-ST59, описанные в настоящем исследовании, были выделены исключительно при стафилококковом носительстве, и, следовательно, могут быть отнесены к CA-MRSA. Однако, учитывая высокий туристический поток между Китаем и Россией, не исключается сценарий клонального сдвига в популяционной структуре MRSA, особенно в двух мегаполисах: Москве и Санкт-Петербурге. Одной из особенностей ST59 являлась ассоциация с OS-MRSA фенотипом с чувствительностью к комбинации пенициллина-клавуланата. Однако стоит отметить, что данная особенность распространяется в целом на подавляющее большинство геномов, относящихся к ST59, исходя из результатов типирования *in silico* на коллекции геномов из доступных репозиториях. Это подтверждается ранними работами, где было установлено, что ST59 характеризуются выраженной гетерогенностью в отношении уровня МПК к оксациллину [321]. При анализе глобальной популяционной структуры ST59, циркулирующего в Азиатском регионе, данную генетическую линию можно разделить на две большие субклады – Тайваньскую и Азиатско-Тихоокеанскую [390]. При этом изоляты Тайваньской субклады отличаются более выраженной вирулентностью, высокой частотой встречаемости токсина PVL, чаще выделяются при инвазивных формах инфекций. Вторая субклада, напротив, представлена изолятами, которые в большей степени встречаются среди носителей. В настоящее время это деление ST59 на две субклады дополнено результатами сравнительной геномной эпидемиологии всех глобально циркулирующих представителей ST59, включая изоляты из Европы и США [383]. Так, на основе данных результатов, выделяются две основные группы геномов, это Восточно-Азиатская и Северо-Американская субклады. Несмотря на то, что ST59 является доминирующим клоном в Азиатском регионе, по этим

результатам, предшественником современных ST59 является Северо-Американская субклада, расчетное время появления которой – 1950-е гг. У изолятов Северо-Американской субклады отсутствуют гены *lukFS*, плазмиды и многие детерминанты резистентности. Восточно-Азиатская субклада характеризуется параллельной эволюцией и имеет общего гипотетического предшественника с Северо-Американской линией, время появления которого – 1950 – 1970 гг. Представители данной субклады циркулируют на территории Китая, Тайваня и других регионов Юго-Восточной Азии, отличаются наличием плазмид с детерминантами резистентности, наличием закодированных фагов с генами токсина PVL. Все геномы российских изолятов, включая PVL-положительный изолят SA1155, относились Восточно-Азиатской субклада. Несмотря на отсутствие эпидемиологической связи между носителями, у которых были выделены ST59, все геномы характеризовались высокой нуклеотидной идентичностью.

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о циркуляции в популяции человека на территории РФ клона ST59 Восточно-Азиатской субклады. Высокая нуклеотидная идентичность между российскими геномами и геномами, входящими в состав BAPS1 (Восточно-Азиатской субклада), также может свидетельствовать о возможном импорте. Гипотеза о возможном формировании MRSA-ST59 от локально циркулирующих MSSA-ST59 требует проведения дополнительных исследований. Уникальные генетические маркеры, характерные для российских представителей MRSA-ST59, необходимо учитывать при дальнейшем мониторинге распространения и эволюции данной генетической линии.

ГЛАВА 6 СЕЛЕКЦИЯ УСТОЙЧИВОСТИ *IN VITRO*

6.1. Стратегия получения резистентных мутантов при многоступенчатой селекции

В данной главе представлены результаты экспериментов по адаптивной эволюции устойчивости *S. aureus* к антибиотикам, проведенных с использованием стратегии ступенчатых пересевов на увеличивающихся концентрациях антибиотиков в среде с динамическим мониторингом изменения фенотипа и генотипа. Основные результаты селекции устойчивости представлены в работах [198, 391-393].

6.1.1. Селекция устойчивости *in vitro* MRSA к цефтаролину

6.1.1.1. Фенотипические изменения при формировании устойчивости MRSA к цефтаролину

У изолятов SA0077, SA0085, SA0420, SA0422 наблюдался ступенчатый рост МПК (схема селекции и изменение МПК представлены на рис. 29). Для всех штаммов, после 10-го пассажа МПК составляла 4-16 мкг/мл; к 20-му пересеву МПК увеличилась до 32 – 64 мкг/мл, и по завершению селекции этот уровень уже составлял 64 – 256 мкг/мл. Исключением был штамм SA0146, для которого на протяжении всей селекции МПК составляла 16 – 32 мкг/мл. При последовательных пассажах при одной и той же концентрации время появления колоний постепенно уменьшалось. Для получения видимых колоний в течение 18 часов требовалось от 3 до 15 пассажей. В целом МПК цефтаролина при селекции *in vitro* соответствовала накоплению мутаций.

Родительские штаммы MRSA-ST8 (SA0077 и SA0422) проявляли различные уровни изначальной чувствительности к цефтаролину. Штамм SA0077 был полностью чувствительным (МПК = 0,5 мкг/мл), тогда как изолят SA0422 демонстрировал более низкий уровень чувствительности (МПК = 2 мкг/мл). Концентрации цефтаролина, используемые для селекции резистентности, увеличивались в три этапа для обоих штаммов MRSA-ST8, начиная с 32 мкг/мл (0,5 MPC) при 1-ом пассаже, повышаясь с 64 мкг/мл и 128 мкг/мл до конечной концентрации 256 мкг/мл на 40-ом пассаже. МПК цефтаролина достигала 128 мкг/мл у производных штаммов к концу селекции.

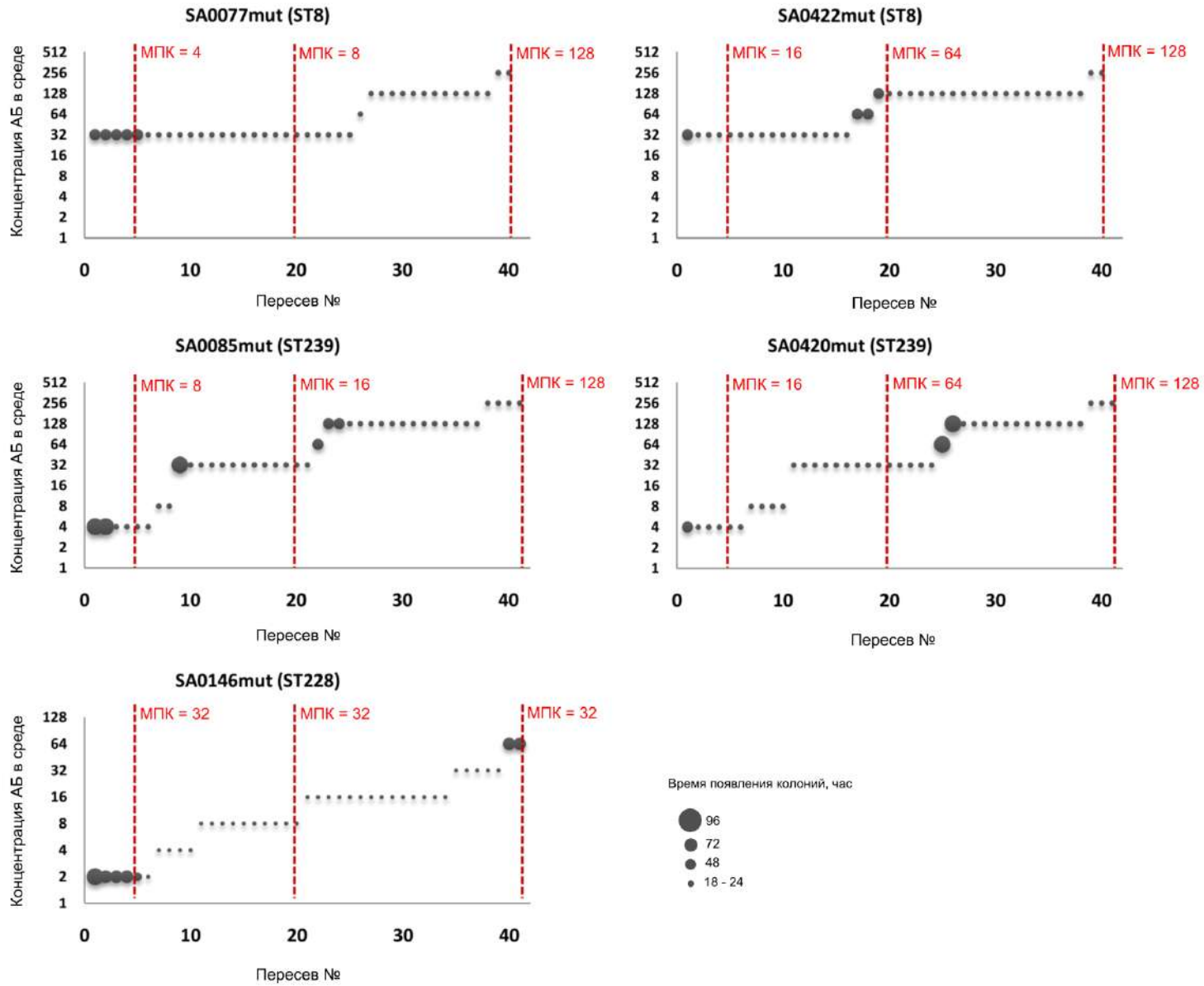


Рисунок 29 – Схема селекции MRSA на цефтаролине и изменение МПК (отмечена концентрация антибиотика в среде).

Увеличение МПК коррелировало со статистически значимым снижением скорости роста и увеличением времени удвоения. У штаммов SA0077 и SA0422 время удвоения клеток увеличивалось с $20,6 \pm 2$ и 23 ± 2 мин до $26,3 \pm 2$ и 34 ± 2 мин ($p < 0,05$), соответственно. ЛАГ-фаза увеличилась с 2-х ч до 3-х только у мутантного штамма SA0422. Относительная скорость роста была снижена у этих штаммов на 10 – 19% ($p < 0,05$). Оба производных штамма MRSA-ST8 продемонстрировали незначительное снижение МПК ванкомицина: с 2 до 1 мкг/мл у штамма SA0077 и с 2 до 0,5 мкг/мл у штамма SA0422 (Таблица 26). Штамм MRSA SA0077 продемонстрировал полное восстановление чувствительности к эритромицину и клиндамицину после 40-ка пассажей из-за потери плазмиды размером 3 Kb. (*rep10*), несущей метилазу *ermC* (Таблица 27).

Оба родительских штамма MRSA-ST239 (SA0085, SA0420) содержали замены в пPBD PBP2a: SA0420 содержал замену N146K, SA0085 – E239K. В процессе селекции МПК цефтаролина для двух штаммов ST239 ступенчато увеличивались в 64 – 128 раз с достижением конечной МПК 128 мкг/мл. У производного штамма SA0420 наблюдалось значимое изменение скорости роста ($p < 0,05$). Так, время удвоения клеток увеличивалось с $26,4 \pm 1$ мин до 34 ± 3 мин; ЛАГ-фаза увеличивалась с $2,5 \pm 0,25$ до $4 \pm 0,2$ часов; относительная скорость роста снижалась на 35%. У штамма SA0085 достоверно изменилась только скорость роста на 18% ($p < 0,05$); время удвоения клеток составляло 21 ± 3 мин до селекции, и $23,5 \pm 0,25$ после селекции; ЛАГ-фаза составляла 3 часа. МПК цефтаролина для штамма MRSA-ST228 (SA0146) увеличилась с 2 до 32 мкг/мл после пяти пассажей и оставалась стабильной до конца селекции. Не было обнаружено существенных различий в скорости роста, времени удвоения или ЛАГ-фазы роста между родительским и производным штаммом (время удвоения клеток составляло 23 ± 1 мин, длительность ЛАГ-фазы - $2,5 \pm 0,3$ часа, относительная скорость роста не изменялась). Помимо определения МПК был использован метод ГДМ, на рис. 30 представлены результаты определения чувствительности. Стоит отметить, что для ГДМ были характерны более низкие значения уровня МПК, а также присутствие двойной зоны роста, что может говорить о наличии гетерорезистентной популяции.

6.1.1.2. Мутационные события в процессе селекции на цефтаролине

Данные секвенирования, полученные от штаммов до и после селекции при выравнивании ридов, имели нуклеотидную идентичность 99,9%, что позволило исключить

потенциально возможную контаминацию во время проведения экспериментов. Генетические изменения, идентифицированные в консервативных кодирующих последовательностях и подтвержденные с помощью BLAST-поиска, представлены в таблице 27. Формирование устойчивости у SA0077 было связано с появлением небольшого числа мутаций. В частности, миссенс-мутации были обнаружены в GdpP (R322C), Apt (V66L), AtIE (G149C) и HsdM (E94Q) после 40 пассажей. На 5-м и 20-м пассажах мутаций обнаружено не было, несмотря на повышенные значения МПК. У штамма SA0422 стоп-кодон в положении R545 в GdpP был обнаружен после 20-ти пассажей. Кроме того, еще один стоп-кодон был обнаружен в GraS (K74*); этот белок входит в часть двухкомпонентной системы GraSR, регулирующей биосинтез клеточной стенки. Эта мутация была обнаружена после 20-го пассажа и была идентифицирована только в 80% ридов при анализе данных секвенирования; после 40-го пассажа мутаций в GraS выявлено не было. Замены в Pbp4 были обнаружены после 40-го пассажа у обоих штаммов, относящихся к ST239. Мутация N138I была обнаружена в производном штамме SA0085, тогда как мутация T201A была обнаружена в SA0420. У обоих штаммов дополнительные нуклеотидные замены были идентифицированы в промоторной области гена *pbp4*. Мутаций в других генах, кодирующих пенициллин-связывающие белки (*pbp1*, *pbp2*, *tesA* и *pbp3*), обнаружено не было. Мутация в GdpP (T260A) была обнаружена у SA0085 к концу селекции; однако на 20-м пассаже была обнаружена 3 п.н.-делеция в *gdpP* в 10% ридов. У штамма SA0085 обнаружена 13 п.н. делеция в гене, кодирующем О-ацетилтрансферазу (*oatA*), ответственную за устойчивость к лизоциму. Для оценки возможной роли делеции в *oatA* производный и родительские штаммы SA0085 инкубировали в жидкой среде в присутствии лизоцима в разных концентрациях (2 – 32 мг/л). При этом оценивали динамику изменения OD₆₀₀. Производный штамм SA0085 демонстрировал значительное снижение скорости роста по сравнению с исходным штаммом на всех концентрациях лизоцима, начиная с 2 мг/л. Таким образом, делеция в гене *oatA* влияла на формирование чувствительности к действию лизоцима. На 20-м пассаже в 88% ридов была обнаружена делеция 11 п.н. в *graR*, регуляторе транскрипции системы GraSR. Однако, на 40-ом пассаже в другом участке гена *graR* была обнаружена только 1 п.н.-делеция. Другие миссенс-мутации были обнаружены в следующих генах: в гене *sucC*, кодирующем сукцинил-КоА-лигазу (K79E); в гене *pepF*, кодирующем олигоэндопептидазу F (P191S); и в гене стафилококкового липопротейна *fepA* (N233S). Производный штамм SA0420 характеризовался наибольшим количеством мутационных событий.

Таблица 26 – Изменения чувствительности к антибиотикам на фоне селекции MRSA на цефтаролине

Антибиотики	МПК, мкг/мл									
	SA0077		SA0085		SA0420		SA0422		SA0146	
	1*	2*	1	2	1	2	1	2	1	2
Оксациллин	512	>512	512	>512	>512	>512	512	>512	>512	>512
Цефокситин	256	256	256	256	128	256	128	256	256	256
Цефтаролин	0,5	128	1	128	2	128	2	128	2	32
Ванкомицин	2	0,5	1	0,5	1	0,5	2	0,5	1	1
Даптомицин	0,5	1	0,5	0,5	1	0,5	1	0,5	1	1
Линезолид	1	1	4	4	2	2	2	1	2	1
Тедизолид	0,125	0,125	0,25	0,125	0,25	0,25	0,25	0,125	0,25	0,25
Тигециклин	0,125	0,125	0,125	0,125	0,25	0,25	0,125	0,06	0,016	0,016
Тетрациклин	<0,06	<0,06	32	16	64	32	<0,06	<0,06	<0,06	<0,06
Ципрофлоксацин	32	32	256	256	256	128	128	128	32	64
Моксифлоксацин	2	2	8	8	4	4	2	2	4	4
Рифампицин	<0,004	<0,004	>4	>4	>4	>4	0,06	0,06	0,016	0,016
Гентамицин	128	128	>128	>128	128	128	128	128	>128	>128
Трим./сульф.	0,06	0,06	0,25	0,5	0,25	0,5	0,06	0,125	0,125	0,125
Мупиरोцин	0,5	0,5	2	2	2	1	1	0,5	0,5	1
Фузидиевая к-та	0,06	0,06	0,125	0,25	0,25	0,125	0,125	0,06	0,125	0,125
Эритромицин	>128	1	>128	>128	>128	>128	<0,125	<0,125	>128	>128
Клиндамицин	>64	0,5	>64	>64	<0,06	<0,06	<0,06	<0,06	>64	>64

Примечание: 1* – МПК до селекции; 2* – МПК после селекции (после 40-го цикла); серая заливка – различия в значениях МПК более чем на одно разведение.

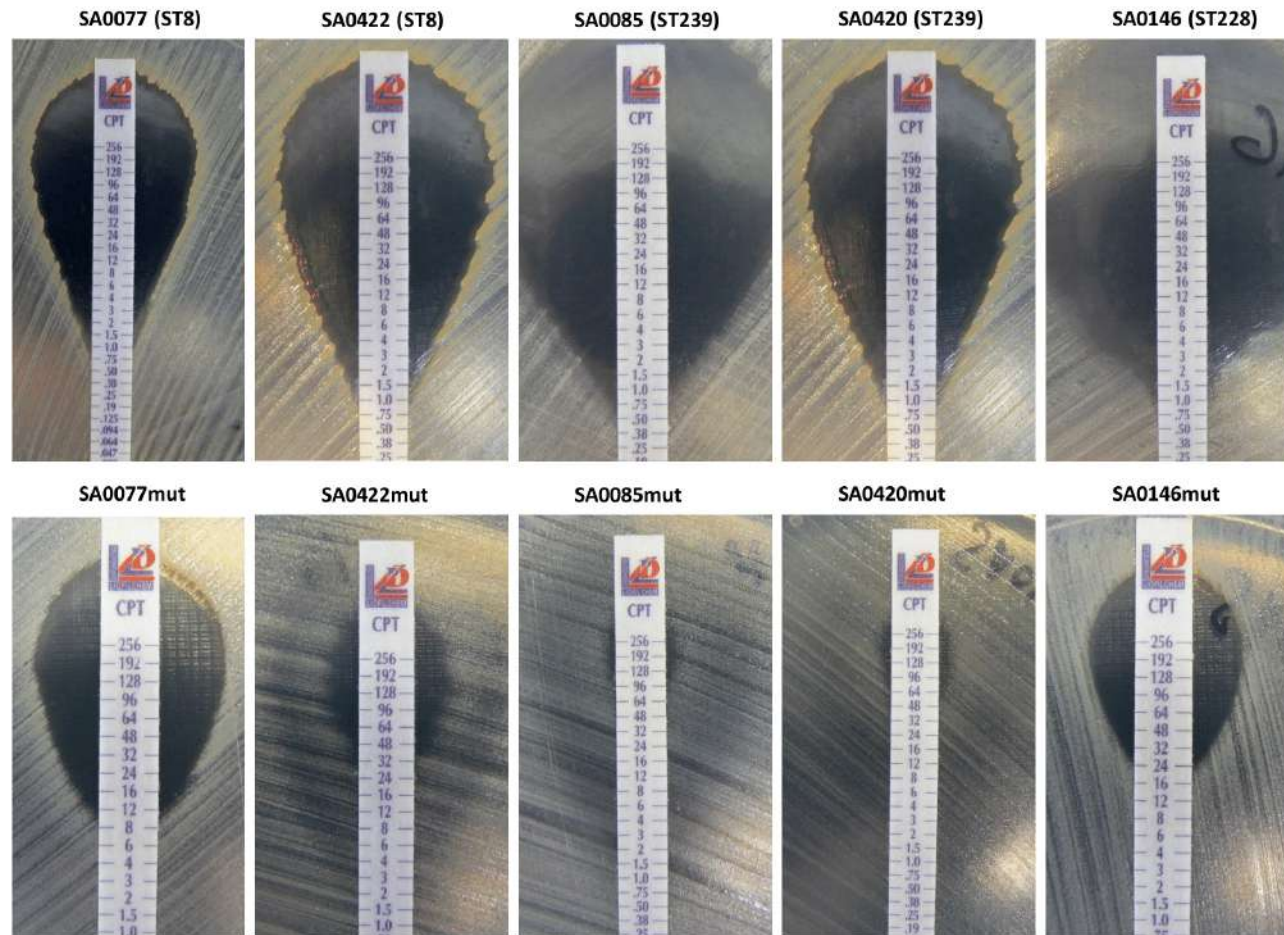


Рисунок 30 – Оценка чувствительности к цефтаролину методом ГДМ для штаммов до и после селекции (mut).

Таблица 27 – Мутационные события, выявленные у штаммов MRSA после селекции на цефтаролине

Продукт, фермент	Локус	Нуклеотидная мутация	Мутация в белке	Селекция, пассажи		
				5-ый	20-ый	40-ой
Штамм SA0077 - ST8						
Type I restriction-modification	hsdM1	G280C	E94Q	NEG	NEG	POS
Autolysin E	SACOL2298	G445T	G149C	NEG	NEG	POS
Adenine phosphoribosyltransferase, apt	apt	G196T	V66L	NEG	NEG	POS
Phosphoesterase2C DHH family protein, gdpP	SACOL0014	C964T	R322C	NEG	NEG	POS
Штамм SA0422 - ST8						
Phosphoesterase2C DHH family protein, gdpP	SACOL0014	C1633T	R545*	NEG	POS	POS
Sensor histidine kinase, GraS	SACOL0717	A220T	K74*	NEG	hetero	NEG
Штамм SA0420 - ST239						
2-oxoglutarate dehydrogenase E2, bfmB	SACOL1516	A1261G	T421A	NEG	NEG	POS
Putative membrane protein	SACOL0166	G425C	G142A	NEG	NEG	hetero
DNA repair protein, recN	recN	C1094T	A365V	NEG	NEG	POS
Shikimate 5-dehydrogenase I alpha, aroE	aroE	G97A	E33K	NEG	NEG	POS
DNA topoisomerase I, topA	topA	C758T	P255L	NEG	NEG	POS
Ribitol-5-phosphate dehydrogenase, tarJ	SACOL0237	C245T	T82M	NEG	hetero	POS
Lipoteichoic acid synthase, ltaS	SACOL0778	C587T	P196L	NEG	NEG	POS
Hypothetical protein	SACOL0730	A218G	Y73C	NEG	NEG	POS
Penicillin-binding protein 4, pbp4	pbp4	Промотор (-14) A→G		NEG	hetero	POS
Penicillin-binding protein 4, pbp4	pbp4	A601G	T201A	NEG	NEG	POS
N-acetylmannosaminyltransferase, tarA	tagA	C277T	R93C	NEG	NEG	POS
N-acetylmannosaminyltransferase, tarA	tagA	C143T	A48V	NEG	NEG	POS
30S ribosomal protein S8, rpsH	rpsH	G370A	G124S	NEG	NEG	POS
N-acetylglucosaminyl transferase,	SACOL2670	A901G	T301A	NEG	NEG	POS
DNA-directed RNA polymerase beta subunit, rpoC	rpoC	C1406T	A469V	NEG	NEG	POS
Штамм SA0085 - ST239						

O-acetyltransferase, oatA	SACOL2582	13 bp TATCTAATGATACGA		hetero	POS	POS
Penicillin-binding protein 4, pbp4	pbp4	Промотор (-285) T→G		NEG	NEG	POS
Penicillin-binding protein 4, pbp4	pbp4	Промотор (-282) G→A		NEG	NEG	POS
Penicillin-binding protein 4, pbp4	pbp4	A413T	N138I	NEG	NEG	POS
Succinyl-CoA ligase ADP-forming beta chain, sucC	sucC	A235G	K79E	POS	POS	POS
Phosphoesterase 2C DHH family protein, gdpP	SACOL0014	3 bp AAT		NEG	hetero	NEG
Phosphoesterase 2C DHH family protein, gdpP	SACOL0014	A778G	T260A	NEG	NEG	POS
Efem/EfeO family lipoprotein, fepA	SACOL0414	A698G	N233S	POS	POS	POS
Transcriptional regulator, graR	SACOL0716	11 п.н. ACGAGATGATA		NEG	hetero	NEG
Transcriptional regulator, graR	SACOL0716	1 п.н. ATT→A*T		NEG	NEG	POS
Oligoendopeptidase F, pepF	SACOL1419	C571T	P191S	POS	POS	POS
Штамм SA0146 - ST228						
vraSRT three-component regulatory system, vraT	SACOL1944	A467G	E156G	NEG	NEG	POS
Penicillin-binding protein 2a, mecA	mecA	G1339A	E447K	NEG	POS	POS
Penicillin-binding protein 2a, mecA	mecA	T1336A	Y446N	POS	POS	POS

Примечание: POS – наличие мутации, hetero – Гетеромутации, NEG – мутации не обнаружены.

Ряд мутаций был обнаружен после 40-го пассажа в белках, участвующих в биосинтезе тейхоевых и липотейхоевых кислот, входящих в состав клеточной стенки, таких как TarA (A48V и R93C), TarJ (T82M) и LtaS (P196L). Другие мутации, обнаруженные у SA0420, включали гены, кодирующие белки генерального метаболизма, и белки с неизвестными функциями. Механизм устойчивости производного штамма SA0146 был очевиден. Первая миссенс-мутация Y446N в активном центре PBP2a была обнаружена после пяти пассажей. Вторая мутация (E447K) в PBP2a была обнаружена после 20-ти пассажей. Кроме того, на 40-м пассаже была обнаружена мутация в гене, кодирующем VraT (E156G). Мутации Y446N, E447K являются наиболее часто встречающимися и обуславливают высокий уровень устойчивости к цефтаролину. У остальных штаммов ген *tesA* оставался интактным на протяжении всей селекции.

6.1.1.3. Анализ белковых профилей у цефтаролин-устойчивых штаммов после селекции устойчивости

Фрагмент данной работы был выполнен совместно с сотрудниками Ю.В. Соповой, М.Е. Велижаниной в Санкт-Петербургском филиале ИОГЕН РАН им. Н.И. Вавилова, результаты работы опубликованы в [266]. В исследование были включены штаммы MRSA после селекции на цефтаролине и характеризующиеся наличием мутаций в *gdpP* (SA0077, SA0085, SA0422). Белковые профили сравнивались у производных штаммов после селекции, в качестве контроля были использованы штаммы до селекции. Добавление в среду разных антибиотиков (ампициллин, оксациллин, ванкомицин) не приводило к существенным изменениям в белковых профилях. Только воздействие меропенемом приводило к появлению специфической полосы, соответствующей размеру в 30 кДа (рис. 31А). Была проведена оценка интенсивности окрашивания геля под воздействием меропенема у штаммов до и после селекции на цефтаролине. Так, для производного штамма SA0077 выраженность окрашивания была статистически значимо выше, по сравнению с исходным штаммом ($p < 0,05$). Для идентификации белков, входящих в состав данной полосы, было проведено разделение белков в электрофорезе с последующим масс-спектрометрическим анализом (рис. 31В). Исходный и производный цефтаролин-устойчивый штаммы SA0077 синтезировали одинаковые белки. Это: 1,4-дигидро-2-нафтоил-СоА синтаза (биосинтез менахинона); 2,3-бисфосфоглицерат-зависимая фосфоглицерат мутаза (углеводный метаболизм); стафилококковый секреторный антиген. При воздействии меропенема у цефтаролин-устойчивого производного штамма SA0077, помимо этих продуктов также выявлялась пенициллиназа. Индукции гиперпродукции бета-лактамазы у

исходного штамма не выявлялось. Полученные данные свидетельствуют, что устойчивость к цефтаролину, обусловленная мутациями в *gdpP*, влияет и на гиперпродукцию пенициллиназы, которая, однако, не специфична в отношении этого антибиотика.

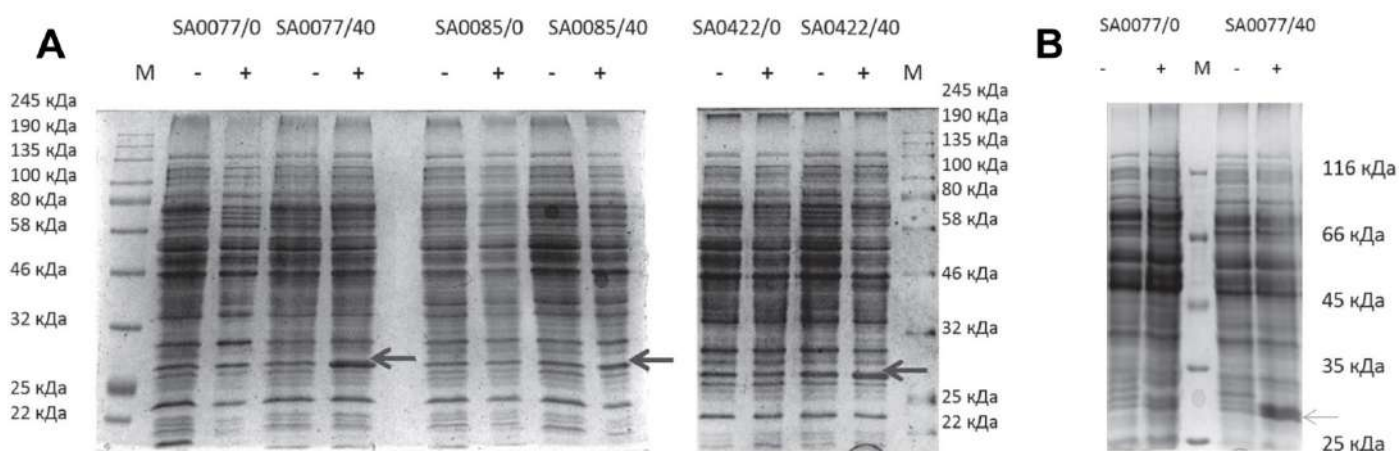


Рисунок 31 – Белковые профили исходных штаммов (SA0077/0, SA0085/0 и SA0422/0) и устойчивых мутантов SA0077/40, SA0085/40 и SA0422/40 после селекции на цефтаролине. А - гель, окрашенный Кумасси, М — маркер молекулярного веса, (+) — инкубация в среде с добавлением меропенема, (–) — инкубация в среде без меропенема. Средние показатели интенсивности окрашивания выделенной стрелкой полосы для штамма SA0077/0 на среде без меропенема составляют $4,8 \pm 0,19$; для штамма SA0077/0 на среде с меропенемом — $5,3 \pm 0,56$; для штамма SA0077/40 на среде без меропенема — $4,8 \pm 0,73$; для штамма SA0077/40 на среде с меропенемом — $13,9 \pm 5,3$; В – сравнение белковых профилей мутанта SA0077/40, выращенного на среде с добавлением меропенема (+) и без него (–) при электрофорезе в 12 % акриламидном геле. Рисунок был использован в работе [266].

6.1.1.4. Заключение по разделу: *tes*-независимые механизмы устойчивости к цефтаролину

Во время селекции *in vitro* резистентность к цефтаролину у штаммов MRSA развивалась разными путями в зависимости от генотипа штаммов. После 40 пассажей все производные штаммы характеризовались повышенной аутолитической активностью. Однако генетических изменений, связанных с аутолизом, обнаружено не было; только у штамма SA0077 была выявлена мутация в гене, кодирующим аутолизин E. Повышенная аутолитическая активность могла быть связана с изменениями регулона клеточной стенки. Различные антибиотики по-разному влияют на скорость аутолиза, например, устойчивость к ванкомицину и даптомицину способствует снижению аутолитической активности.

У штамма SA0146 (ST228) резистентность была связана с классическим механизмом – накоплением мутаций в *mecA*, которые впервые были описаны у цефтаролин-устойчивых стафилококков. Так, в одном из первых клинических наблюдений были описаны цефтаролин-устойчивые изоляты MRSA, выделенные от пациента с муковисцидозом, с высоким уровнем МПК. Было показано, что аминокислотная замена Y446N вносит основной вклад в наблюдаемую резистентность [394]. Мутация в *VraT*, системе регуляции биосинтеза клеточной стенки, которая способствует устойчивости к ванкомицину и бета-лактамам [395, 396], была обнаружена в SA0146 после 40-го пассажа, но это не приводило к дальнейшему увеличению МПК цефтаролина. Мутации в другой системе регуляции клеточной стенки *GraSR* обнаружены у производного штамма SA0085. Данная система играет ключевую роль в снижении чувствительности к ванкомицину [204]. Роль системы *GraSR* в развитии резистентности к бета-лактамам изучена недостаточно; только в одном исследовании делеция в *GraSR* была связана со снижением МПК оксациллина [397].

У изолятов SA0085 и SA0420 были обнаружены мутации (соответственно, N138I и T201A) в неэссенциальном пенициллинсвязывающем белке PBP4, который является одним из основных маркеров устойчивости к цефтаролину [235]. Мутации в PBP4 и его промоторе были общими признаками повышения устойчивости к цефтаролину у двух штаммов ST239. У штамма SA0085 мутации в PBP4 были обнаружены после 40-го пассажа. В отличие от SA0420, мутации в PBP4 были обнаружены раньше, чем в других локусах. Мутации в PBP4 или его промоторе приводят к повышению транспептидазной активности. Это, в свою очередь, способствует биосинтезу пептидогликана клеточной стенки с высокой степенью поперечных сшивок. Более того, бета-лактамы антибиотики и цефтаролин имеют низкую аффинность к этому белку, все эти особенности приводят к формированию устойчивости.

У трех штаммов (SA0077, SA0085 и SA0422) были выявлены мутации в гене, кодирующем неэссенциальную трансмембранную фосфодиэстеразу (*gdpP*). Эти мутации включали следующие замены: R322C, T260A и R545*, снижающие или блокирующие функциональную активность GdpP [33, 34, 200, 398]. Снижение активности GdpP, в свою очередь, приводит к накоплению в клетке вторичных мессенджеров c-di-AMP, действующих предположительно на стимулон клеточной стенки, однако, как это влияет на устойчивость к цефтаролину и бета-лактамам, остается до конца не изученным. Мутации в GdpP обнаруживаются не только при селекции устойчивости *in vitro* к цефтаролину и цефтобипролу [196, 399], но и среди клинических изолятов [197]. У штамма SA0077 после селекции на цефтаролине выявлена гиперпродукция стафилококковой бета-лактамазы. На сегодняшний день роль бета-лактамазы в устойчивости к цефтаролину не изучена. У изолятов SA0422 и SA0085 была обнаружена мутация в гене *tarH* (F74L), кодирующего АТФ – связывающую

субъединицу экспортного комплекса тейхоевых кислот. У изолята SA0420 было выявлено несколько мутаций в системе синтеза тейхоевых кислот. Дополнительно идентифицирован полиморфизм в гене *itaS* (P196L), ответственном за синтез липотейхоевых кислот. Роль мутаций в генах биосинтеза тейхоевых/липотейхоевых кислот при формировании устойчивости к бета-лактамам остается до конца не изученной, хотя существуют исследования, в которых показано, что эти структуры клеточной стенки играют определенную роль в формировании резистентности к антибиотикам, действующим на клеточную стенку [400]. *S. aureus* характеризуется природной устойчивостью к лизоциму за счет ацетилирования в положении C-6 N-ацетилмурамовой кислоты. Реакция ацетилирования катализируется ферментом O-ацетилтрансферазой (OatA) [401, 402]. Потеря функции O-ацетилтрансферазы из-за делеции в *oatA*, которая была обнаружена в производном штамме SA0085, является наиболее вероятной причиной восстановления чувствительности к лизоциму. Потеря функции ацетилирования при формировании устойчивости к цефтаролину остается не совсем понятной. Однако потеря устойчивости к лизоциму потенциально оказывает влияние на вирулентный потенциал стафилококков и может вести к снижению сопротивляемости к иммунному ответу хозяина при развитии инфекции.

Таким образом, устойчивость к цефтаролину, помимо мутаций в *tesA*, может быть опосредована несколькими механизмами: это изменение биосинтеза клеточной стенки (за счет мутаций в *Pbp4*) и внутриклеточное накопление c-di-AMP (мутации в *GdpP*). Роль остальных мутаций, затрагивающих биосинтез тейхоевых кислот, регуляцию биосинтеза клеточной стенки, а также генов генерального метаболизма, требует более детального изучения. В целом приобретение устойчивости к цефтаролину приводит к изменению скорости роста, однако эти изменения не носят выраженного характера, что, по всей видимости, можно интерпретировать как относительно низкий «fitness cost». Однако, потеря одного из факторов природной устойчивости к лизоциму может негативно влиять на вирулентный потенциал *S. aureus*.

6.1.2. Селекция устойчивости MSSA к бета-лактамам и оценка фенотипических изменений

Уровень MPC оксациллина, цефтаролина и меропенема для двух штаммов находился в диапазоне от 0,5 – 4 мкг/мл, за исключением штамма SA0707 и оксациллина, где MPC составлял 16 мкг/мл (Таблица 28).

Таблица 28 – Фенотипические изменения у мутантов MSSA после селекции на бета-лактамах

Фен	Параметр	Штамм	До селекции	Селекция		
				OXA	CPT	MER
1	Dt, мин	SA0937	27,25 (26,86 – 27,47)	41,30* (39,0 – 42,6)	33,53 (33,07 – 34,0)	36,81* (34,2 – 39,5)
		SA0707	25,42 (25,08 – 26,25)	52,32* (51,01 – 53,68)	38,31* (37,56 – 39,14)	28,89* (28,02 – 31,2)
	ОСР, %	SA0937	100	-36*	-20*	-34*
		SA0707	100	-52*	-34*	-26*
	ЛАГ-фаза, мин	SA0937	69 – 79	158 – 168*	128 – 138*	128 – 138*
		SA0707	89 – 99	227 – 237*	168 – 178*	168 – 178*
2	MPC, мкг/мл	SA0937	-	1	0,5	0,5
		SA0707	-	16	4	1
3	АУТ, %	SA0937	55,8 (50,5 – 62,0)	68,15 (62,4 – 75,3)	35,0* (29,5 – 39,7)	58,6 (53,6 – 64,1)
		SA0707	14,0 (7,0 – 16,4)	8,0 (2,0 – 13,0)	14,4 (10,2 – 18,6)	16,3 (10,0 – 19,4)

Примечание: Фен – оценка изменения фенотипических признаков: 1 – оценка скорости роста, 2 – оценка MPC, 3 – оценка индуцированного аутолизиса. ОСР – относительная скорость роста; Dt – время деления клеток; АУТ – аутолизис (% лизированных клеток, определенный как % снижения OD₆₀₀ за период времени t). * – статистически достоверные различия при сравнении со штаммами до селекции (p < 0,05).

Используя аналогичную стратегию селекции MRSA на цефтаролине, удалось получить производных мутантов со значительным повышением МПК к трем антибиотикам. Селекция имела ступенчатый характер, схема пересевов на возрастающих концентрациях антибиотиков представлена на рис. 32. В среднем 3-5 пассажей требовалось для кратного повышения концентраций. Для оксациллина и цефтаролина максимальная использованная концентрация в среде для селекции составляла 64 и 256 мкг/мл, соответственно. Для меропенема максимальная концентрация составляла 32 мкг/мл. Селекция на трех антибиотиках существенно влияла на скорость роста. Наибольшие изменения в скорости роста наблюдались у штаммов после

селекции на оксациллине, наименьшие изменения были отмечены у штаммов после селекции на меропенеме. Так, для штаммов после селекции на оксациллине время удвоения клеток увеличивалось с 25 – 27 до 41 – 52 мин; ЛАГ-фаза роста увеличивалась с 69 – 99 до 157 – 237 мин. Относительная скорость роста снижалась по сравнению со штаммами до селекции на 36 – 53%. Селекция на цефтаролине также в значительной степени, по сравнению с результатами селекции MRSA, влияла на увеличение времени удвоения клеток, увеличение ЛАГ-фазы и снижение относительной скорости роста. Увеличение МПК в течение 40-ка пассажей к оксациллину и цефтаролину носило ступенчатый характер, для меропенема наблюдался длительный этап первичного повышения МПК в течение 15-ти пассажей. Изменение в индуцированном аутолизисе наблюдалось только для одного штамма SA0937 при селекции на цефтаролине. Штамм SA0707 изначально характеризовался сниженной аутолитической активностью.

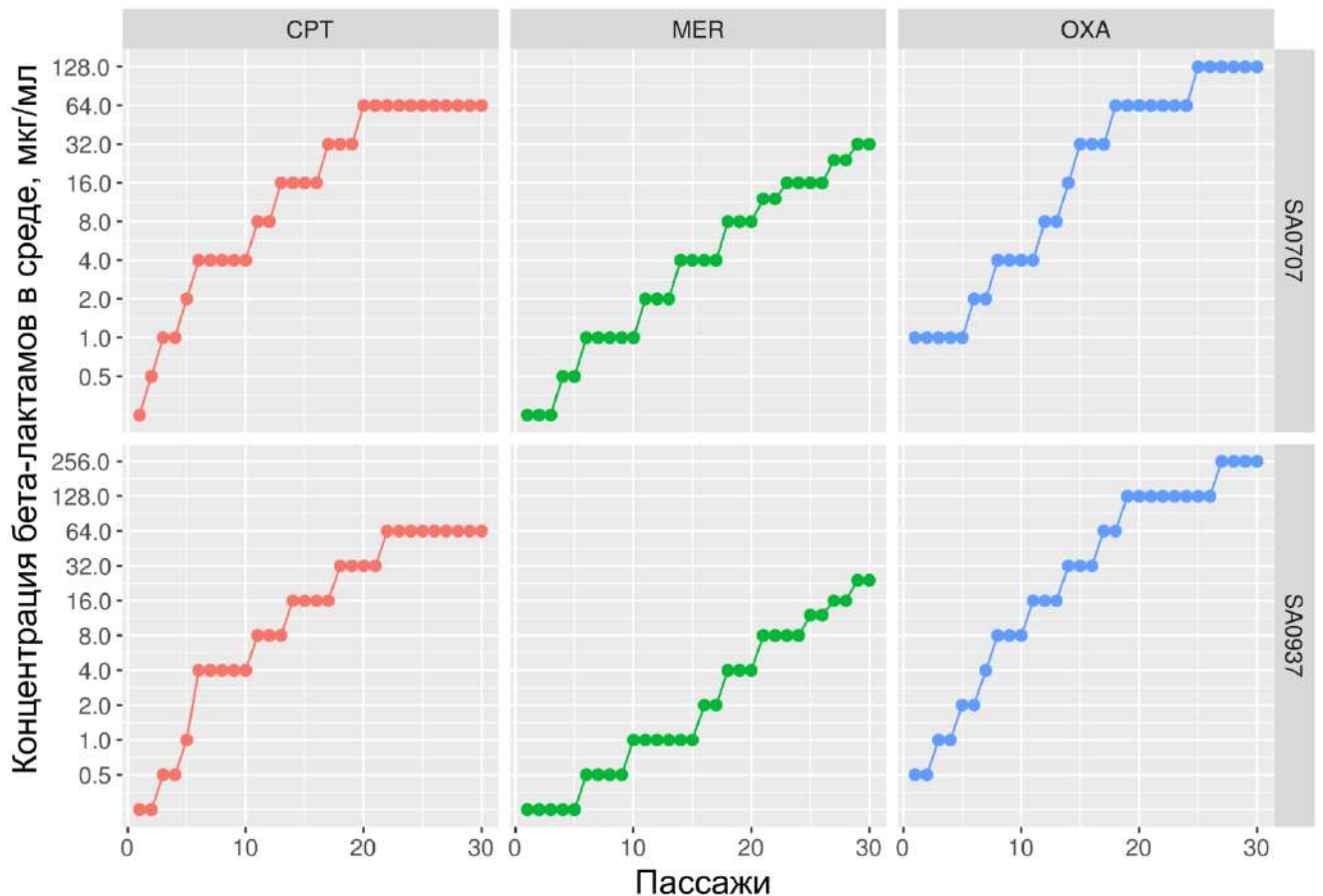


Рисунок 32 – Схема селекции MSSA на трех бета-лактаменных антибиотиках (отмечена концентрация антибиотиков в среде). OXA – оксациллин, CPT – цефтаролин, MER – меропенем.

6.1.2.1. Динамика изменения чувствительности к бета-лактамам антибиотикам в процессе селекции устойчивости *in vitro*

В ходе селекции отмечалось увеличение МПК бета-лактамов антибиотиков для обоих штаммов (Таблица 29). МПК оксациллина выросла с 0,25 – 0,5 до 32 мкг/мл, цефтаролина – с 0,5 до 128 мкг/мл, меропенема – с 0,25 до 4 – 8 мкг/мл. При оценке стабильности фенотипов после 10-ти пассажей на среде без антибиотиков наблюдалось снижение МПК для оксациллина и цефтаролина, что говорит о нестабильности приобретенной резистентности. Было установлено также, что селекция на каком-либо одном из бета-лактамов антибиотиков приводила к перекрестному повышению МПК других бета-лактамов. При этом в меньшей степени наблюдалось повышение МПК к меропенему, и наоборот, при селекции на меропенеме МПК к другим антибиотикам повышалось незначительно. Селекция на оксациллине и цефтаролине для обоих штаммов приводила к быстрому и значимому (в 6–8 раз) увеличению МПК оксациллина, пенициллина, амоксициллина/клавуланата и цефтаролина, по сравнению со штаммами до селекции. Определить точные значения МПК у штамма SA0937 не удавалось, потому что после десяти пассажей производные штаммы на оксациллине были не способны расти на среде Мюллера-Хинтона, но сохранили способность расти в агаре ВНИ. Селекция с меропенемом приводила к ограниченному увеличению МПК всех бета-лактамов у обоих штаммов. Приобретенная резистентность была стабильной и после 10-ти пассажей в среде без антибиотиков. Производные штамма SA0707 не теряли приобретенной устойчивости после пассирования на среде без антибиотиков. Увеличение МПК цефокситина и меропенема во время селекции на оксациллине и цефтаролине было незначительным (не более 2–5 раз). Это свидетельствует о формировании различных механизмов резистентности к меропенему и другим бета-лактамам. Несмотря на то, что при использовании метода серийных разведений в бульоне выявлялось повышение МПК цефокситина, при использовании ДДМ снижение зон задержки роста у мутантов наблюдалось только после селекции на меропенеме. Изменение чувствительности к другим классам антибиотиков выявлено не было. Однако, была отмечена потеря плазмиды, несущей гены *blaZ* и *qacB* у штамма SA0707. Изолят SA0937 был чувствителен ко всем протестированным не бета-лактамовым антибиотикам и не содержал гены устойчивости, изменений чувствительности к не бета-лактамовым антибиотикам в ходе селекции выявлено не было. РАР-анализ с оксациллином выявил значительное увеличение площади под кривой (AUC) производных штаммов после селекции на трех бета-лактамах по сравнению с исходными штаммами. Было также обнаружено, что на первых этапах селекции (5 – 15 пассажи), при незначительном повышении МПК к оксациллину, происходило формирование гоморезистентной популяции. После 30 пассажей отношение AUC производных

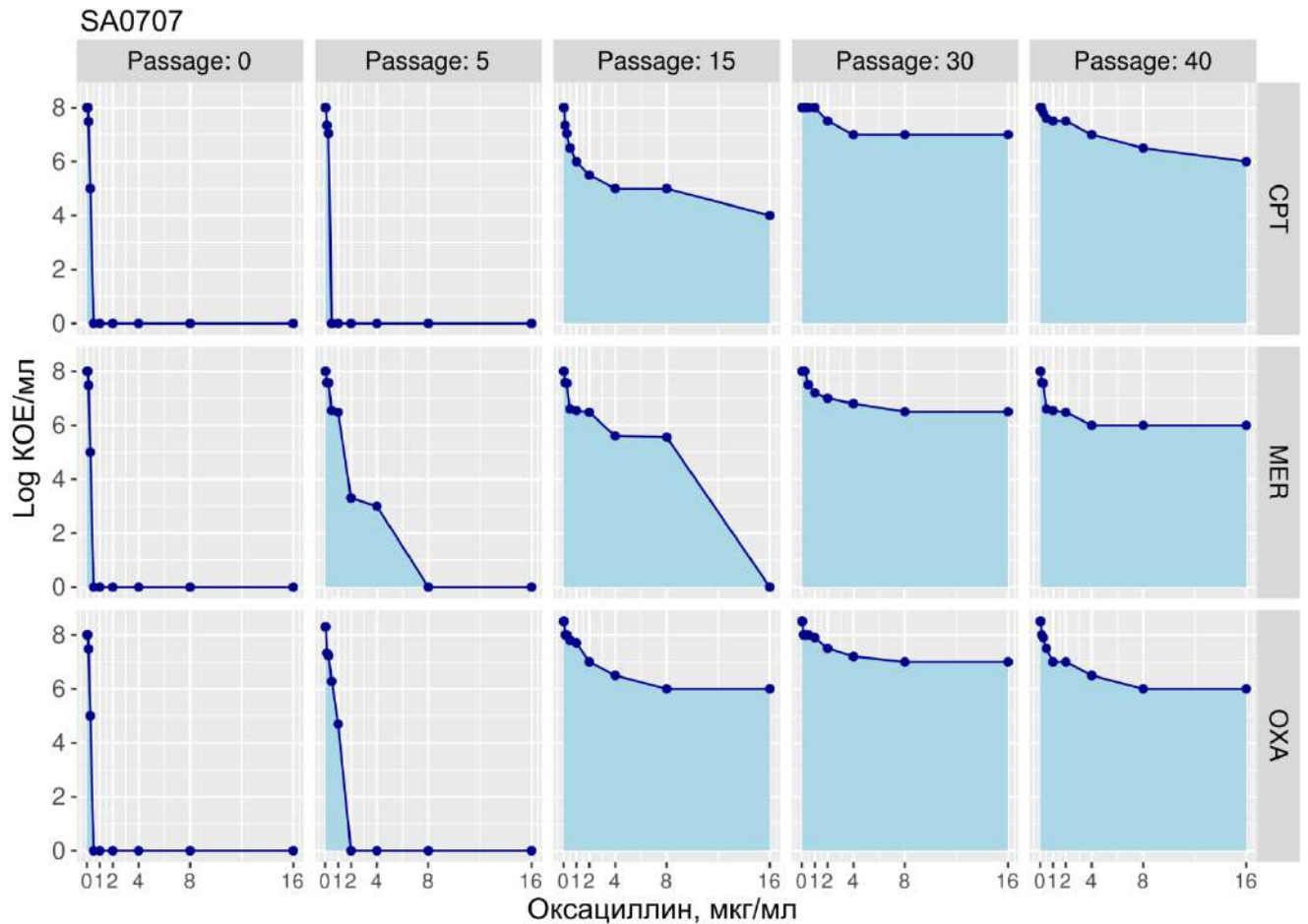
штаммов к АУС штаммов до селекции было выше 2 во всех случаях (Таблица 29). После 30-го пассажа производные обоих изолятов характеризовались неоднородностью по уровню чувствительности к оксациллину, они содержали субпопуляции как с низким, так и с высоким уровнем резистентности. У производных штамма SA0937 эта гетерогенность была более выраженной. Результаты РАР-анализа проиллюстрированы на рис. 33.

Таблица 29 – Изменение фенотипов чувствительности на фоне селекции устойчивости к разным бета-лактамам

Штамм	Селекция	Пассаж	ОХА	СРТ	MER	FOX	АМС	PEN	FOX ДДМ, mm	РАР/ АУС	
	ЕСОFF*		≤2	≤0,5	≤0,5	≤4	-	≤0,125	22≤	-	
SA0937	До	0	0,125	0,25	0,06	4	0,25	0,06	30	-	
	ОХА	5	16	4	0,25	8	16	8	32	2,24	
		15	-**	-	-	-	-	-	27	2,43	
		30	-	-	-	-	-	-	22	2,31	
		40*	2	1	1	8	1	0,25	23	1,93	
	СРТ	5	32	16	0,5	2	32	32	27	2,4	
		15	32	16	1	4	16	32	28	2,62	
		30	64	128	2	8	32	64	24	2,69	
		40	2	4	0,5	8	4	2	28	1,48	
	MER	5	4	1	1	8	2	1	28	2,05	
		15	8	4	2	8	2	4	24	2,55	
		30	8	4	8	16	2	4	0	2,75	
		40	8	2	8	16	2	4	14	2,49	
	SA0707	До	0	0,5	0,25	0,06	4	2	32	28	-
		ОХА	5	4	0,5	0,25	2	2	16	27	1,55
			15	32	2	1	2	32	64	29	2,73
30			32	16	2	8	32	64	25	2,85	
40			32	32	2	8	16	32	24	2,68	
СРТ		5	1	1	0,5	4	4	128	22	1,08	
		15	32	32	0,5	8	32	32	24	2,3	
		30	128	64	2	16	64	128	22	2,82	
		40	128	64	2	16	64	128	22	2,73	
MER		5	2	1	1	8	4	16	28	1,9	
		15	8	2	4	4	4	16	14	2,37	
		30	8	2	4	8	4	4	0	2,71	
	40	8	2	4	8	4	4	14	2,52		

Примечание: 40 пассаж – пассаж на среде без антибиотиков; ОХА - оксациллин; СРТ - цефтаролин; MER - меропенем; FOX - цефокситин; АМС - амоксициллин и клавулановая кислота; PEN – пенициллин; FOX ДДМ – диаметр зон задержки роста в ДДМ; РАР/АУС

– значение параметра площади под кривой, определенной в PAP; ECOFF – эпидемиологическая точка отсечения согласно критериям EUCAST (<https://mic.eucast.org/>); - нет данных (штамм SA0937 после селекции на оксациллине был не способен расти в среде Мюллера-Хинтона).



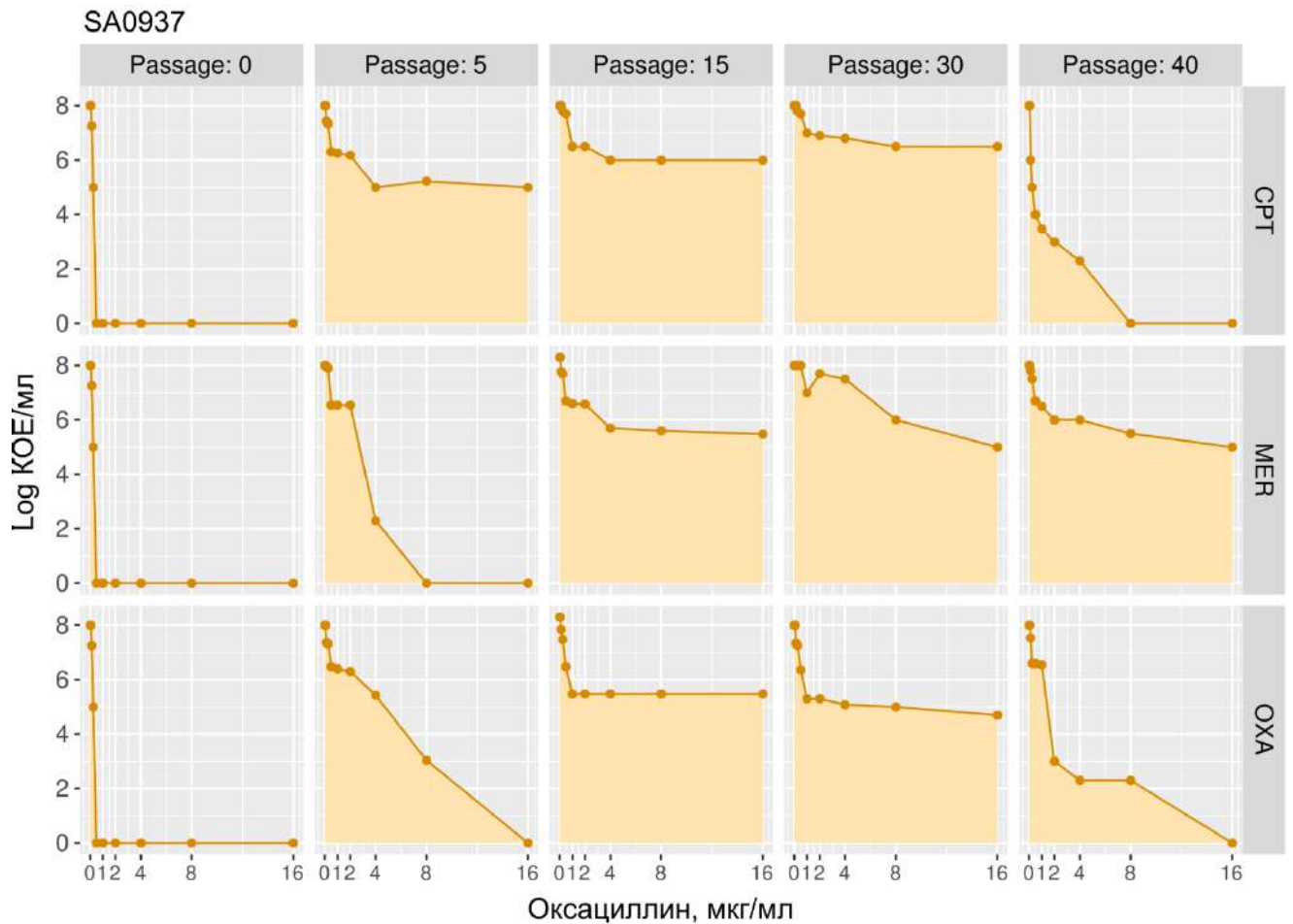


Рисунок 33 – Результаты PAP – анализа с оксациллином в динамике селекции устойчивости штаммов SA0707 и SA0937 на трех бета-лактаменных антибиотиках (40-ой пассаж – 10 пересевов на среде без антибиотиков). OXA – оксациллин; CPT – цефтаролин; MER – меропенем.

6.1.2.2. Механизмы устойчивости MSSA к оксациллину

Полный список всех мутационных событий у штаммов после селекции на трех бета-лактаменных антибиотиках представлен в приложении 6. В таблице 30 представлены мутации в генах биосинтеза клеточной стенки и тейхоевых кислот. У штаммов SA0937 и SA0707 после 5-го и 30-го пассажей, соответственно, была выявлена мутация (делеция 91 п.н.) в промоторной области гена *rbp4*. Дополнительно, у штамма SA0707 в *Rbp4* была идентифицирована аминокислотная замена E297K, однако анализ глубины прочтения показал, что только в 22% ридов имелась данная замена. После 10 пассажа на среде без антибиотиков эта мутация элиминировала. Производные штаммы имели мутации в гене *gdpP*: у штамма SA0937 на 5-м пассаже 23% ридов содержали делецию 1 п.н., которая выявлялась уже в 100% ридов при

последующих пассажирах. У штамма SA0707 наблюдалась минорная мутация Y475C (7 % ридов) в GdpP. У SA0937 после 10-ти пассажиров в среде без антибиотиков была выявлена мутация L81I в аденилатциклазе DacA (синтез c-di-AMP), которая была идентифицирована в 77% ридов.

Таблица 30 – Мутации, выявленные у MSSA при селекции на бета-лактамных антибиотиках

Сис	Локус, белок	SA0937 (<i>blaZ</i> -), селекция на:			SA0707 (<i>blaZ</i> +), селекция на:		
		OXA	CPT	MER	OXA	CPT	MER
CW	Pbp1	-	H499R	G408V, W351L, W351R	-	-	A482V, P431L, H375D, W351K, L18F
	Pbp2	-	-	I19N, G587S, M559I, T552I, A416E, G142S	A450D	T552I, A416T	-
	Pbp3	-	-	G286V, S634F	-	-	-
	Pbp4	P Δ91 п.н.	P Δ1 п.н., T201A, N138I	F241L, N141T	P Δ91 п.н.	P Δ91 п.н.	-
	GdpP	Δ1 п.н.	H621Y, R540Stop	E108Stop	Y475C	-	R289C
	VraS	T274K	Δ1 п.н.	C60Y	-	-	-
	VraT	P174Q	-	-	W119R	-	G226V
	MurAB	-	-	-	P Δ171 п.н.	P Δ171 п.н.	-
	GraR	-	-	-	G59E	Δ161 п.н.	-
WTA	TagA	-	G171E	-	-	G171E	-
	TagH	-	-	-	-	-	Q65Stop
	TagO	-	-	-	L323Stop	L41I	-
	DltA	-	-	-	-	A184V	Δ1 п.н.
	DltD	Δ236 п.н.	-	-	-	-	-
	SgtB	-	-	-	-	Δ1 п.н.	-

Примечание: P – промотор; Δ – делеции; Сис – система: CW – клеточная стенка, WTA – тейхоевые кислоты. OXA – оксациллин; CPT – цефтаролин; MER – меропенем.

Мутации в *vraT* появлялись к 15-му пассажиру у штамма SA0707 в 100% ридов и к 5-му пассажиру в 21% ридов у штамма SA0937 с последующим закреплением в популяции. Другие генетические события, которые были обнаружены, варьировали у обоих штаммов. У обоих

производных штаммов выявлены различные мутации в стимулоне клеточной стенки. У штамма SA0937 идентифицированы мутации в генах *vraS* и *stp1*, у штамма SA0707 - в гене *graR*. Кроме того, у штамма SA0707 были обнаружены мутация в *pbp2* и делеция 117 п.н. в промоторной области гена *murAB* после 30-го пассажа. Появление нескольких минорных (22–38,5% ридов) замен, приводящих к аминокислотным заменам (A95P, P192R, A384V) в MurAB, были обнаружены после пересевов на среде без антибиотиков. Делеция размером 22,5 Kb была идентифицирована у штамма SA0707 на 40-м цикле при пассажах на среде, не содержащей антибиотик. В состав этой делеции входили локусы от SACOL1339 до *rpmG1* (координаты хромосомы: 1,353–1,376 Mb), относительно референс-генома *S. aureus* COL. Гены с известной функцией, входящие в состав делеции, включали кардиолипинсинтазу (*clsI*), гены, участвующие в биосинтезе L-треонина. Остальные последовательности представлены открытыми рамками считывания. В конце селекции различные мутации в генах биосинтеза мембранных фосфолипидов были выявлены у производного штамма SA0707. Мутации в генах, участвующих в биосинтезе тейхоевых кислот, были обнаружены у обоих производных штаммов. На 15-м пассаже в клетках SA0937 была обнаружена делеция 236 п.н. в гене *dltD*. Стоп-кодон в положении L323 был обнаружен в гене *tagO* после 15-ти пассажей у SA0707, а на 5-м пассаже также была обнаружена минорная мутация (18% ридов) в гене *fntA*, продукт которого участвует в аланилировании тейхоевых кислот. Мутация в GuaA (G109C) наблюдалась после 15-ти пассажей у штамма SA0937.

6.1.2.3. Механизмы устойчивости MSSA к цефтаролину

Делеции в промоторной области гена *pbp4* были обнаружены у обоих производных штаммов после воздействия цефтаролином. Делеция была первоначально идентифицирована в 30% ридов у штамма SA0937 к 30-му пассажу, однако на 40-м пассаже (пересевы на среде без антибиотиков) делеция была зафиксирована в 100% ридов. Мутации в Pbp4 (T201A и N138I) были обнаружены на 30-м пассаже (20% ридов), а к 40-му пассажу они были идентифицированы в 100% ридов. Более того, дополнительная мутация была обнаружена в *pbp1* после 5-го пассажа у штамма SA0937. На 15-м пассаже в производном штамме SA0707 в промоторной области *pbp4* была обнаружена делеция 91 п.н. в том же положении, что и после селекции на оксациллине. Также у этого штамма была выявлена делеция (171 п.н.) в области промотора *murAB* после 15-го пассажа. Аналогичная делеция была обнаружена и при селекции на оксациллине. Двойная мутация была идентифицирована в *gdpP*: на 5-м пассаже в положении H621Y (30% ридов) и стоп-кодон в положении R540 (70% ридов). Наличие стоп-кодона при

последующих пассажах выявлялось при 100% ридях. При 40-м пассаже на среде без антибиотиков наблюдалась мутация в *DacA* (E228G).

В отличие от селекции MRSA на цефтаролине, производные MSSA штаммы демонстрировали больший спектр мутаций в белках, участвующих в биосинтезе и процессинге пептидогликана. У штамма SA0937 после 5-го пассажа была идентифицирована однонуклеотидная делеция в гене пептидогликан-гликозилтрансфераза (*sgtB*), участвующая на начальных циклах сборки клеточной стенки в цитоплазматическом компартменте. Мутации в регуляторных генах *graR*, *vraS* выявлены к 40-му циклу селекции (на среде без антибиотиков). Помимо мутаций в ключевых генах, прямо ассоциированных с устойчивостью к бета-лактамам, также были идентифицированы мутационные события в других системах. В частности, у производного штамма SA0937 были обнаружены мутации в генах аэробного дыхания (*cydA*), генах биосинтеза тейхоевых кислот (*dltA*, *tagA*), в генах центрального углеводного метаболизма, системе репарации ДНК, и транскрипции (*greA*, *ruvB* и *mutL*). Была выявлена нонсенс-мутация в глобальном мастер-регуляторе *Spx*. Выявлены разные аминокислотные замены в белках, участвующих в метаболизме жирных кислот (*VraD* и *FadE*). Эти мутационные паттерны схожи с мутациями, обнаруживающимися при селекции на даптомицине.

6.1.2.4. Механизмы устойчивости MSSA к меропенему

У изогенных штаммов после селекции на меропенеме были выявлены мутации в *gdpP*. Многочисленные мутации в *pbp1* были идентифицированы на ранних стадиях селекции у обоих производных штаммов. В производном штамме SA0937 мутации были обнаружены во всех пенициллинсвязывающих белках (*pbp1*, *pbp2*, *pbp3* и *pbp4*), у штамма SA0707 мутации были обнаружены только в *pbp1* и *pbp2*. У штамма SA0707 после 5-го пассажа мутации наблюдались в гене *vraT*. Мутация в гене *tagH* (биосинтез тейхоевых кислот) была обнаружена у штамма SA0707. Кроме того, у этого штамма были выявлены мутации в гене метаболизма липидов (*accD*), гене *prsA*, кодирующем фолдазу Pbp2a, и других генах, связанных с генеральным метаболизмом. Мутации в генах биосинтеза клеточной стенки и образования септы деления были обнаружены у производного штамма SA0937. В частности, на 15-м пассаже в *vraS*, в *dltA*, который участвует в биосинтезе тейхоевых кислот, и в *gpsB*, который участвует в образовании клеточной септы во время деления клеток. Другая мутация, влияющая на деление клеток, была обнаружена в производном штамме SA0937, в гене *smc*, который участвует в сегрегации хромосом. Мутация A211V в *DacA* (77% ридов) была обнаружена после 40-го пассажа на среде,

не содержащей антибиотиков, у производного штамма SA0937. Кроме того, были идентифицированы мутации в генах, вовлеченных в различные бактериальные метаболические пути, в частности, в *acuC* (утилизация ацетона), в генах *cspN*, *cscA*, *scrA* (метаболизм сахаров) и других системах.

6.1.2.5. Получение направленных делеций в гене *gdpP* на модельном штамме *S. aureus* RN4220, анализ фенотипов

При селекции на бета-лактамных антибиотиках, включая цефтаролин, у большинства штаммов обнаруживались мутации в гене *gdpP*. Для подтверждения роли мутаций в данном гене в формировании устойчивости к бета-лактамам, и прежде всего цефтаролину, было использовано геномное редактирование на модельном штамме *S. aureus* RN4220. Фрагмент данной работы был выполнен совместно с сотрудниками Санкт-Петербургского филиала ИОГЕН РАН Ю.В. Соповой и М.Е. Велижаниной [403].

В структуре GdpP выделяют несколько доменов (рис. 34А): два трансмембранных (TM1, TM2) и три внутриклеточных домена (PAS домен, являющийся сенсором сигналов, GGDEF домен, участвующий в передаче сигнала, ДНН/ДННА1, катализирующий гидролиз с-di-AMP до фосфаденилил-аденозина (pApA)). Различные мутации, приводящие к устойчивости к антибиотикам, в основном локализованы в ДНН/ДННА1 домене (337 – 645 а.к.) [404]. В ходе геномного редактирования было получено два мутантных штамма: RN_2 с 90 п.н. делецией без сдвига рамки считывания и RN_3 с frameshift-делецией.

Проверка мутантных штаммов включала следующие фенотипические характеристики: культурально-морфологические параметры, определение чувствительности к антибиотикам и оценку скорости роста. Мутантный штамм RN_2 не отличался по культуральным и морфологическим характеристикам при оценке роста на кровяном агаре. Через 24 ч он давал характерные беловато-серые колонии диаметром 3-5 мм (при культивировании более 48 ч колонии приобретали умеренно желтоватый цвет). Скорость роста не изменялась, так время удвоения клеток составляло $28,2 \pm 3$ мин по сравнению с контрольным штаммом RN_0 без делеции в *gdpP* ($27,8 \pm 2$ мин, $p = 0,123$). ЛАГ-фаза роста также не изменялась и была одинаковой как для контрольного штамма, так и мутантного ($160,5 \pm 3$ мин). Относительная скорость роста у мутантного штамма не изменялась. Не было выявлено изменений в чувствительности к разным антибиотикам. Так, уровень МПК к бета-лактамным антибиотикам: пенициллину, цефокситину, оксациллину, амоксициллину, меропенему, не превышал $0,25 - 1$ мкг/мл для обоих штаммов. МПК гликопептидных и липогликопептидных антибиотиков также

не изменялась. Эти данные свидетельствуют о том, что внесенная делеция в *gdpP* не влияет на чувствительность к антибиотикам, действующим на клеточную стенку. Также не было обнаружено изменения чувствительности к антибиотикам других групп: макролидам, линкозамидам, аминогликозидам, оксазолидинонам и даптомицину. Таким образом, делеция в линкерном участке между доменами GGDEF и DHH/DHHA1 белка GdpP напрямую не влияет на фенотип и чувствительность к антибиотикам у *S. aureus*.

Для второго мутанта RN_3 была получена frameshift-делеция в гене *gdpP*, схема получения делеции представлена на рис. 34В, 34С. Установлено, что делеция опосредует значительный «fitness cost», что отражается в увеличении времени удвоения клеток с 25 мин до 45 минут, а также пролонгации ЛАГ-фазы до 4 часов (у исходного дикого штамма ЛАГ-фаза составляла 1,5 – 2 часа). По результатам полногеномного секвенирования у мутанта не было выявлено других компенсаторных или дополнительных мутаций.

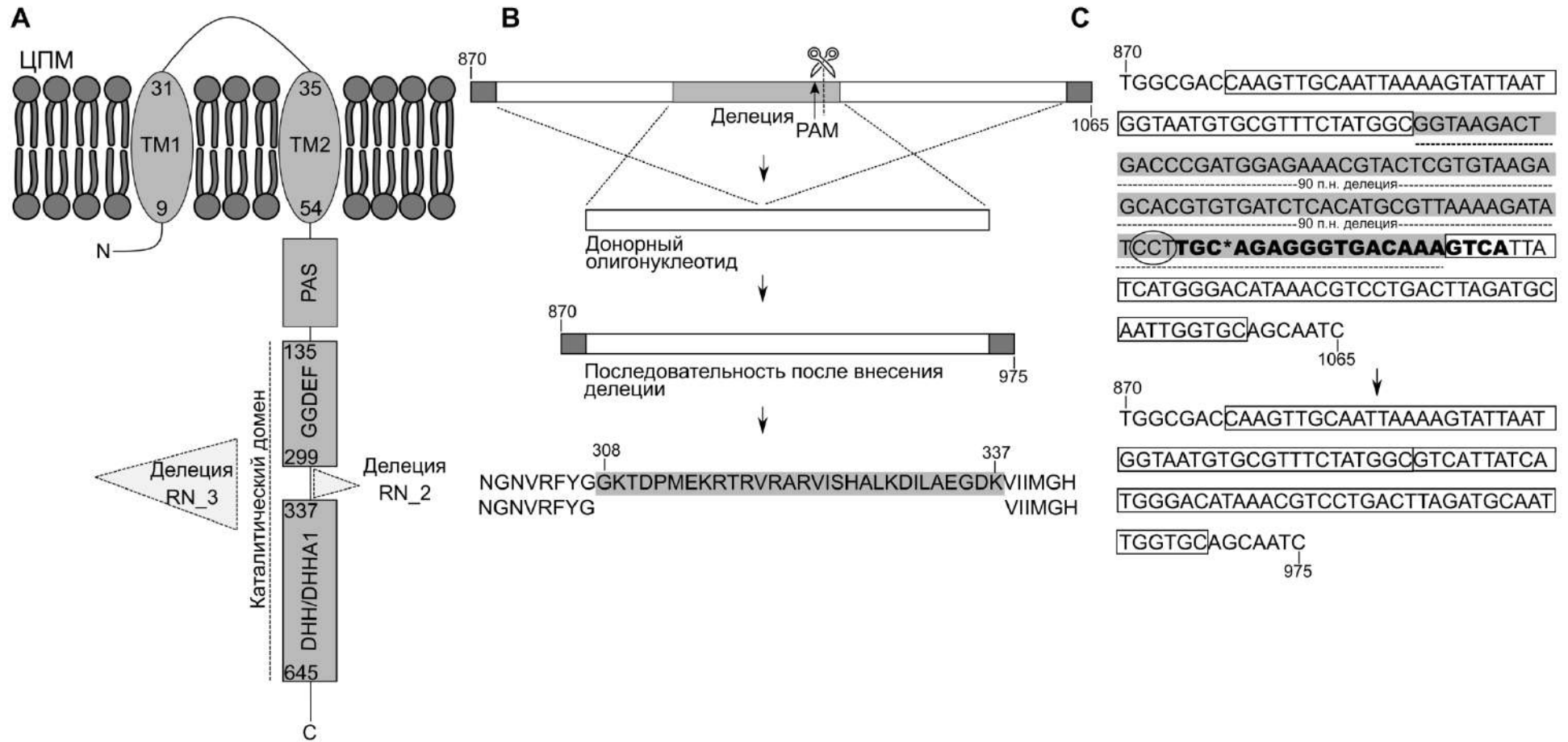


Рисунок 34 – Схема получения делеции. А – структура белка GdpP, вносимые делеции обозначены треугольником; ЦПМ – цитоплазматическая мембрана. В – схема внесения делеции; ножницами отмечено место разреза Cas9; светлым серым цветом отмечена делеция; пунктирными линиями отмечены области идентичных последовательностей донорного олигонуклеотида. С – последовательность гена *gdpP*; в рамках отмечена последовательность донорного праймера (90 н.); *звездочкой отмечено место разреза нуклеазой Cas9; овалом отмечена область РАМ (последовательность ССТ); жирным шрифтом выделена последовательность (20 п.н.) направляющей РНК. Серым цветом отмечена область делеции. Рисунок (с изменениями) был использован в работе [403].

Было отмечено, что МПК бета-лактамов антибиотиков незначительно повышается (в пределах 1-2 разведений). Однако, нами была отмечена фенотипическая гетерогенность в отношении бета-лактамов антибиотиков при использовании ГДМ. Так, выявлен гетерогенный рост в зоне задержек роста, для цефокситина уровень МПК поднялся с 3 до 6 мкг/мл (что соответствует устойчивости). На рис. 35 показаны результаты измерений с помощью ГДМ, для мутантного штамма наблюдалось появление единичных колоний в зонах подавления роста. При использовании методов серийных разведений и ГДМ у мутантного штамма RN_3 не наблюдалось фенотипической устойчивости по цефтаролину и оксациллину. Однако, стоит отметить, что роль мутаций в *gdpP* (и соответственно высокой внутриклеточной концентрации c-di-AMP) не всегда коррелирует с этой устойчивостью. Так, в работе Poop и соавт. [405] было показано, что мутации в *gdpP* не влияют на устойчивость у *S. aureus*, а способствуют толерантности.

6.1.2.6. Влияние делеций в гене *gdpP* на уровень экспрессии пенициллинсвязывающих белков

На сегодняшний день не изучен детальный механизм влияния высоких концентраций внутриклеточных мессенджеров c-di-AMP на устойчивость к бета-лактамам. Одна из гипотез предполагает воздействие молекул c-di-AMP на пенициллинсвязывающие белки и, в частности, на Pbp4. Для оценки возможного влияния делеций в гене *gdpP* в работу были взяты контрольный штамм *S. aureus* RN4220 и два мутантных штамма, RN1 и RN3, несущие делеции в каталитическом и некаталитическом доменах, соответственно. Результаты измерений показали, что независимо от характера мутации (frameshift-делеция или делеция в некаталитическом домене) приводят к изменению экспрессии всех четырех пенициллинсвязывающих белков *S. aureus* (рис. 36). Однако, изменение экспрессии приводило

к незначительному увеличению (менее чем в 10 раз) транскриптов у мутантных штаммов. При этом, наибольшие изменения наблюдались у штамма с делецией в некаталитическом домене. Во-первых, полученные данные могут свидетельствовать о возможной двойной роли гена *gdpP*, влияющего не только на гидролиз c-di-AMP. Во-вторых, нельзя исключить особенности постановки эксперимента. Штамм RN3 характеризовался низкой скоростью роста, в отличие от сравниваемых штаммов (RN0, RN1). Низкая скорость роста может влиять на общий выход суммарной РНК при процедуре выделения, несмотря нормализацию кривых роста при измерении оптической плотности. Также было установлено, что добавление субингибирующей концентрации оксациллина способствовало увеличению транскриптов *pbp4* по сравнению с контролем, что частично подтверждает проверяемую гипотезу.

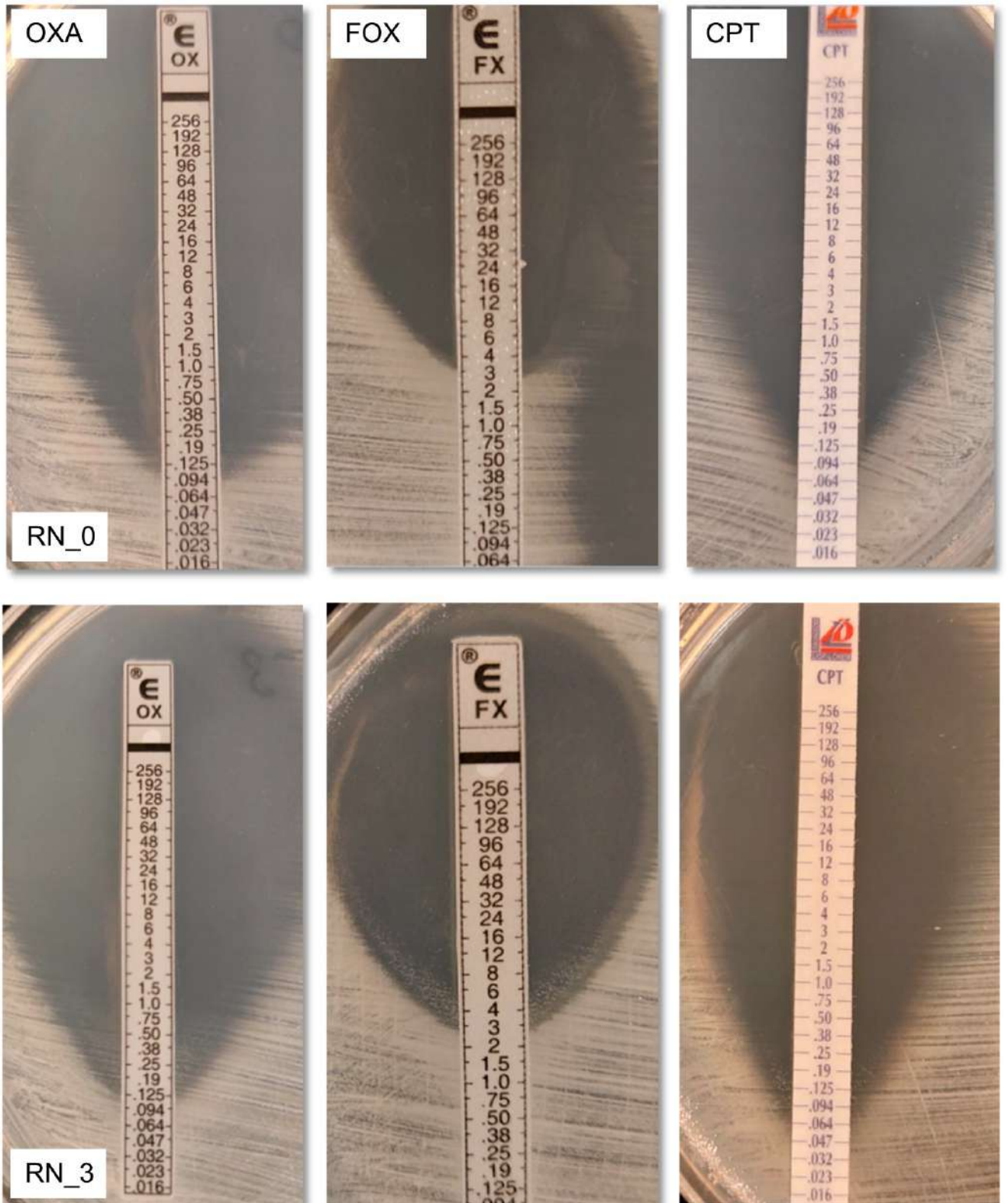


Рисунок 35 – Сравнение оценки чувствительности к бета-лактамам с помощью ГДМ у дикого штамма (RN_0) и штамма с frameshift-делецией в гене *gdpP* (RN_3). Антибиотики: OXA – оксациллин, FOX – цефокситин, CPT – цефтаролин.

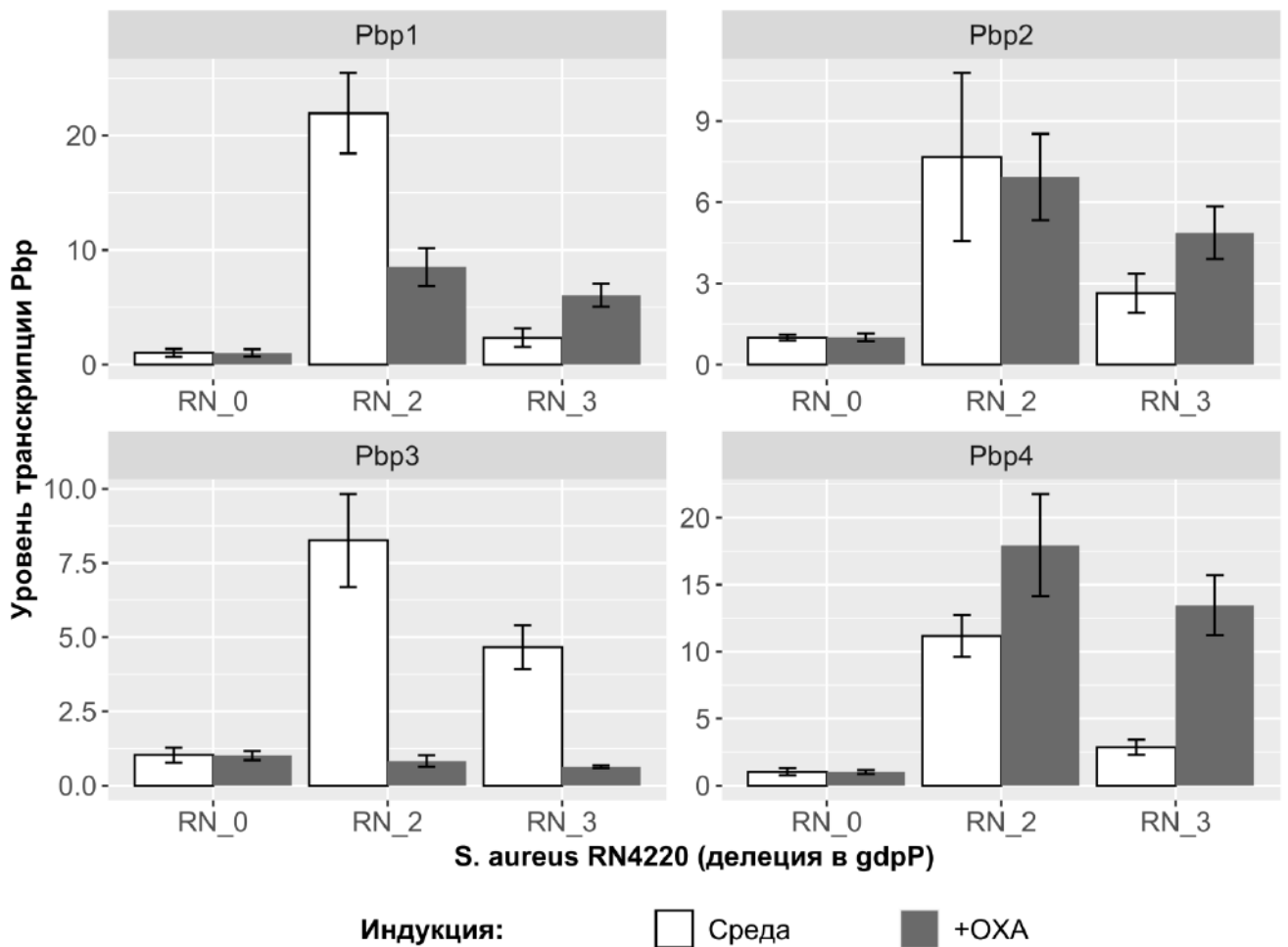


Рисунок 36 – Оценка экспрессии генов пенициллинсвязывающих белков у штаммов с делециями в гене *gdpP*: RN_0 (без делеций), RN_2 (делеция в некаталитическом домене), RN_3 (делеция в каталитическом домене).

6.1.2.7. Заключение по разделу: *tec*-независимые пути формирования устойчивости к бета-лактамам и фенотипическая гетерорезистентность

Метициллин-чувствительные *tecA/tecC*-отрицательные штаммы *S. aureus* со сниженной чувствительностью к бета-лактамам распространены по всему миру. Изоляты BORSA вызывают инфекции различной локализации, их точную распространенность установить сложно из-за необходимости использования специальных методов обнаружения. Частота выявления BORSA составляет 1,4–12,5% [186, 191, 406]. Несмотря на множество исследований, снижение чувствительности к бета-лактамам у MSSA до конца не изучено. В настоящем исследовании проанализированы возможные новые механизмы, приводящие к высокому уровню устойчивости штаммов MSSA (*blaZ*+/*blaZ*-) в эксперименте по селекции

устойчивости *in vitro* к оксациллину, цефтаролину и меропенему. По окончании селекции штаммы фенотипически демонстрировали повышение МПК ко всем бета-лактамам, в независимости от антибиотика на котором велась селекция. Явление формирования перекрестной устойчивости к бета-лактамам описывается в различных исследованиях. Так, в недавней работе сообщалось о формировании устойчивости к оксациллину на фоне воздействия хлор-содержащим дезинфицирующим средством [407]. Воздействие меропенемом индуцирует повышение МПК у штаммов MRSA к цефтаролину [408]. Эти наблюдения создают определённые опасения, поскольку в первом случае, дезинфицирующие средства являются основными веществами, широко используемыми в условиях стационара для проведения санитарных обработок. Постоянное воздействие потенциально может привести к устойчивости MSSA к бета-лактамам. Во втором случае, меропенем не используется для лечения стафилококковых инфекций, однако данный антибиотик широко применяется для лечения инфекций, вызванных грамотрицательными бактериями. Непрямое воздействие также опасно, вследствие возможного формирования устойчивости циркулирующих MSSA (в составе микробиоты пациента или медицинского персонала) к бета-лактамам. Появление устойчивости у производных штаммов было связано с мутациями в ключевых генах, в частности, генах, кодирующих пенициллинсвязывающие белки. Однако, стоит отметить, что на уровень МПК к бета-лактамам также влияют и мутации в других локусах: *gdpP*, протеазах *clpX* и *clpP*, регуляторах *vraRS* и *graRS* [409]. В настоящем исследовании штамм SA0937, у которого отсутствовала бета-лактамаза, продемонстрировал гораздо большее количество мутаций во время селекции на трех бета-лактамах. Также этот штамм характеризовался более выраженными изменениями в скорости роста по сравнению со штаммом SA0707. У производного штамма SA0707 при селекции на оксациллине и меропенеме (но не цефтаролине) было отмечено элиминирование *blaZ* в составе плазмиды. При селекции штаммов MRSA на цефтаролине также не наблюдалось исчезновение пенициллиназы. Эти наблюдения согласуются с аналогичными исследованиями, проведенными ранее [198]. Приобретение устойчивости ко всем бета-лактамам сопровождалось снижением скорости роста. Производный штамм SA0937 характеризовался нестабильностью, что отражалось в снижении уровня МПК, и снижении параметра PAP/AUC с оксациллином после десяти пассажей на среде без антибиотиков. У обоих штаммов выявлялись мутации в *gdpP*, промоторе гена *pbp4*, и других локусах, ассоциированных с биосинтезом клеточной стенки: *pbp1*, *pbp2*, *pbp3*, *vraST* и *graR*. Селекция на меропенеме приводила к формированию мутаций в *pbp1* и *pbp2*, мутации в этих локусах были описаны среди клинических изолятов BORSA [406]. Роль других генов, например *stp1*, или генов биосинтеза тейхоевых кислот (*tagOHA*, *sgtB*) в формировании устойчивости изучены не достаточно, но есть экспериментальные данные косвенно подтверждающие их роль

[400, 410, 411]. Мутации в генах аутолитической системы (*dltAD*) также на прямую не связаны с устойчивостью к бета-лактамам, но могут опосредовать устойчивость к липопептидам [412]. При оценке чувствительности производных штаммов к даптомицину не было выявлено изменений МПК данного антибиотика. Как и при селекции MRSA на цефтаролине, у производного штамма SA0707 была выявлена нонсенс-мутация в О-ацетилтрансферазе (*oatA*), обуславливающая устойчивость к лизоциму. По всей видимости, промоторная делеция в гене *murAB* у производного штамма SA0707 способствует структурному изменению пептидогликана, поскольку эти специфические ферменты принимают участие в биосинтезе каркасной молекулы пептидогликана в цитоплазматическом компартменте [413]. Однако, роль мутаций в промоторе *murAB* в формировании устойчивости к бета-лактамам, пока не доказана. Помимо мутаций в генах, прямо или косвенно участвующих в формировании устойчивости, большое количество разных мутационных событий было выявлено у обоих штаммов в других системах клеток. При этом роль таких мутаций остается не изученной. Например, делеция гена *cls1*, который является детерминантой устойчивости к даптомицину и участвующий в биосинтезе мембранных компонентов [414]. Помимо этого, разные мутации были идентифицированы в генах, кодирующих белки цикла Кребса, глобальные регуляторы и белки метаболизма жирных кислот. По всей видимости, мутации в этих генах играют компенсаторную роль, но также нельзя исключить и феномена метаболической устойчивости, что было продемонстрировано в работе Lopatkin и соавт. [415]. В процессе аннотации мутационных событий был использован подход анализа аллельной глубины конкретных нуклеотидных замен или делеций для выявления возможной смешанной клональной популяции [416]. Так, во время селекции на бета-лактамах некоторые мутационные события изначально детектировались только в малом количестве ридов, что позволяет сделать вывод о том что, клеточная популяция была представлена смесью разных клонов, у которых либо присутствовали, либо отсутствовали мутации. Однако, по мере пассирования на средах с антибиотиками эти мутации закреплялись в популяции и обнаруживались уже в 100% ридов («гомомутации»). Вероятно, что во время селекции сначала образуется минорная субпопуляция, которая затем ведет к клональной экспансии. Например, с учетом мутаций в регулоне клеточной стенки в производном штамме SA0937 на 5-м пассаже оксациллина <30% ридов имели мутации в промоторах генов *vraT*, *gdpP*, *stp1* и *pbp4*. Однако к 15-му пассажу все эти мутации были идентифицированы в 100% ридах. В другом примере в производном штамме SA0707 во время селекции на меропенеме наблюдались множественные мутации в *pbp1*, на 5-м пассаже замена W351K была обнаружена в 57% ридов, но затем эта замена элиминировалась. Мутации A482V + L18F и гетеромутация H375D были идентифицированы между 15-40 пассажами в гене белка Pbp1.

С точки зрения лабораторной диагностики, феномен, который заключается в отсутствии появления устойчивости к цефокситину в формате ДДМ у производных штаммов после селекции на оксациллине и цефтаролине, имеет важное практическое значение. За счет выявленных мутаций, полученные в настоящем исследовании производные штаммы, можно отнести к MODSA фенотипам, и традиционно используемый тест с цефокситином для выявления устойчивости в данном случае не работает. С учетом роста случаев выявления BORSA/MODSA фенотипов в мире [417, 418] целесообразно использовать для оценки чувствительности одновременно несколько бета-лактамовых антибиотиков. И как уже отмечалось ранее, в связи с распространением OS-MRSA, наибольшей эффективностью будет характеризоваться совокупное использование методов ПЦР для выявления гена *tesA* и оценка чувствительности к нескольким бета-лактамам.

6.1.3. Селекция устойчивости к даптомицину и ванкомицину

Селекция устойчивости к бета-лактамовым антибиотикам осуществлялась на плотных питательных средах с использованием диапазона концентраций MSW/MPC. Для ванкомицина и даптомицина MPC определить было невозможно ввиду плохой диффузии антибиотиков в агар. По этой же причине селекция устойчивости проводилась в жидкой питательной среде. Штамм SA0420 был исключен из эксперимента при селекции на ванкомицине вследствие контаминации. Основные результаты по данному разделу были опубликованы в работах [392, 393].

6.1.3.1. Фенотипические изменения при селекции на ванкомицине

В конце селекции с ванкомицином максимальная концентрация в среде достигла 32 мкг/мл (рис. 37), а производные штаммы демонстрировали МПК 4–8 мкг/мл, то есть все штаммы, включенные в эксперимент, характеризовались VISA фенотипами. Наблюдалась ступенчатая динамика роста МПК к ванкомицину для всех изолятов. Так, к 10 пересеву МПК стабильно для всех изолятов составляла 2 мкг/мл, включая референс-штамм ATCC 29213. После 20-го пересева МПК повышалось до 4–8 мкг/мл для всех изолятов кроме ATCC 29213. После 40-го пересева изоляты SA0077, SA0422, SA0420 и SA0736 имели уровень МПК 8 мкг/мл, SA0085 и ATCC 29213 имели МПК 4 мкг/мл. После десяти пассажей в среде без антибиотиков МПК ванкомицина снизилась на одно разведение, что говорит о нестабильности появившихся мутаций и реверсировании к исходному фенотипу. Такое явление вполне

характерно при селекции на ванкомицине. Также была замечена диссоциация колоний при высевах на плотные питательные среды, наблюдался мелкоколониальный рост совместно с нормальными стафилококковыми колониями. Отдельно стоит отметить изменение фенотипа изолята SA0085, который после 10 пересева образовывал только мелкоколониальные варианты, и время прироста биомассы в жидкой среде по сравнению с другими изолятами было увеличено до 48 часов. Селекция на ванкомицине приводила к увеличению МПК гликопептидных, липогликопептидных антибиотиков (до 0,5–4 мкг/мл) и даптомицина (2 мкг/мл) у производных штаммов. Для некоторых штаммов наблюдался «seesaw» эффект (результаты оценки МПК для разных антибиотиков у штаммов до и после селекции представлены в приложении 5). Так, чувствительность к бета-лактамам была восстановлена у штамма SA0085 после 40 пассажей на среде без антибиотиков за счет делеции *SCCmec* элемента. При этом МПК оксациллина снизилась с 512 мкг/мл до 1 мкг/мл, МПК цефокситина - с 128 мкг/мл до 4 мкг/мл. Кроме того, для данного штамма отмечалось также и изменение уровня МПК тетрациклина после селекции на ванкомицине. Штамм ATCC 29213 восстановил свою чувствительность к пенициллину вследствие потери плазмиды, несущей бета-лактамазу *blaZ*. Изменение уровня МПК к другим антибиотикам у контрольных штаммов при пассировании на средах без антибиотиков не наблюдалось.

После селекции на ванкомицине наблюдалось изменение скорости роста у производных штаммов (Таблица 31). Так, время удвоения клеток увеличивалось с 20 – 26 до 27 – 57 минут; ЛАГ-фаза увеличилась со 129 – 178 до 180 – 208 минут. В целом относительная скорость роста снижалась на 10 – 35%. Наименьшие изменения в скорости роста наблюдались у штамма ATCC 29213. У контрольных штаммов SA0085 и SA0077 изменений в скорости роста не наблюдалось после 40-ка пассажей на среде без антибиотика.

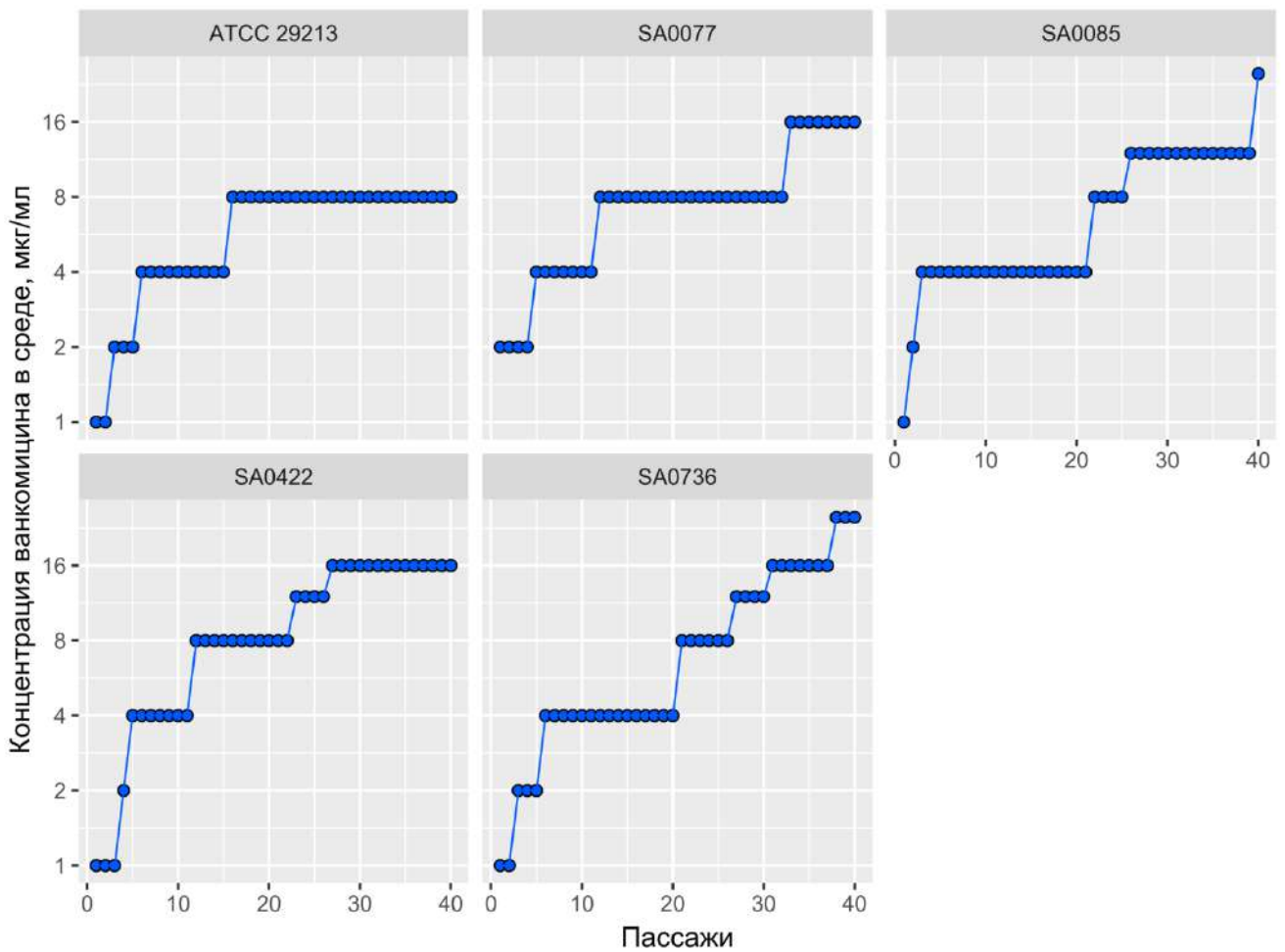


Рисунок 37 – Этапы селекции на ванкомицине. Рисунок был использован в работе [392].

6.1.3.2. Фенотипические изменения при селекции на даптомицине

При селекции на даптомицине максимальная концентрация антибиотика в среде достигала 128 мкг/мл. Схема селекции на даптомицине представлена на рис. 38. После пятого пассажа только один штамм SA0422 демонстрировал повышенный уровень МПК даптомицина. К 20-му пассажу все штаммы приобрели высокий уровень устойчивости к даптомицину (диапазон МПК: 8–32 мкг/мл). Одновременно к концу селекции на даптомицине также наблюдали повышенные уровни МПК ванкомицина, тейкопланина, оритаванцина и далбаванцина. МПК телаванцина находилась в диапазоне 0,125–0,25 мкг/мл. У контрольных штаммов при пассировании на средах без антибиотиков, но с добавлением кальция, изменений уровня МПК антибиотиков не наблюдалось. Чувствительность к бета-лактамам была восстановлена у штамма SA0085 после 40 пассажей на среде с кальцием без добавления антибиотика, аналогично, как при селекции на среде без добавления кальция. Для штамма SA0736 к 40-му пассажу наблюдалась фенотипическая диссоциация: появлялись белые (DAP-

W) и желтые (DAP-Y) колонии, в дальнейшем анализировались оба типа колоний. По завершению селекции удалось получить увеличение МПК для всех изолятов, включая лабораторный референс-штамм ATCC 29213 до 32 – 128 мкг/мл (изначальный уровень составлял ≤ 1 мкг/мл). По сравнению с селекцией на ванкомицине, увеличение МПК к даптомицину шло не плавно. Так, после 12 – 16 пересевов МПК к даптомицину повышалась до 4 – 16 мкг/мл для всех изолятов, после 20 – 25 пересевов МПК уже составляла 32 и более мкг/мл. Как и в случае с селекцией на цефтаролине, наблюдалась выраженная диссоциация культур, особенно при первых 10 пересевах, при этом при высевах из жидкой среды на кровяной агар колонии изменяли не только свою морфологию, но и пигментацию. К концу селекции, мутанты характеризовались выраженной выработкой желто-золотистого пигмента (стафилоксантина). Данный признак является характерным для *S. aureus*, проявляющих устойчивость к даптомицину [419]. Все изоляты стабильно сохраняли устойчивость к даптомицину и пигментообразование после пересевов на среде без антибиотиков. После селекции не наблюдалось изменений МПК к другим антибиотикам (кроме гликопептидов и липогликопептидов). Для ванкомицина наблюдалось повышение МПК у всех изолятов с 1 мкг/мл до 2 – 4 мкг/мл, что подтверждает данные о перекрестной резистентности даптомицина и ванкомицина. Производный штамм SA0420 после селекции характеризовался увеличением МПК даптомицина с 1 мкг/мл до 64 мкг/мл. Параллельно с этим наблюдался рост МПК ванкомицина с 1 до 2 мкг/мл. После 10 пассажей на среде без антибиотиков уровень МПК даптомицина и ванкомицина снижался до 16 мкг/мл и 1 мкг/мл, соответственно. Результаты оценки чувствительности к другим антибиотикам представлены в приложении 5.

Отмечалось существенное изменение в скорости роста для штаммов после селекции (Таблица 31). Время деления клеток было увеличено до 40 – 66 мин; ЛАГ-фаза увеличивалась до 140 – 564 мин; и относительная скорость роста снижалась на 20 – 30%. У контрольных штаммов SA0085 и SA0077 изменений в скорости роста не наблюдалось после 40 пассажей на среде без антибиотика с добавлением кальция.

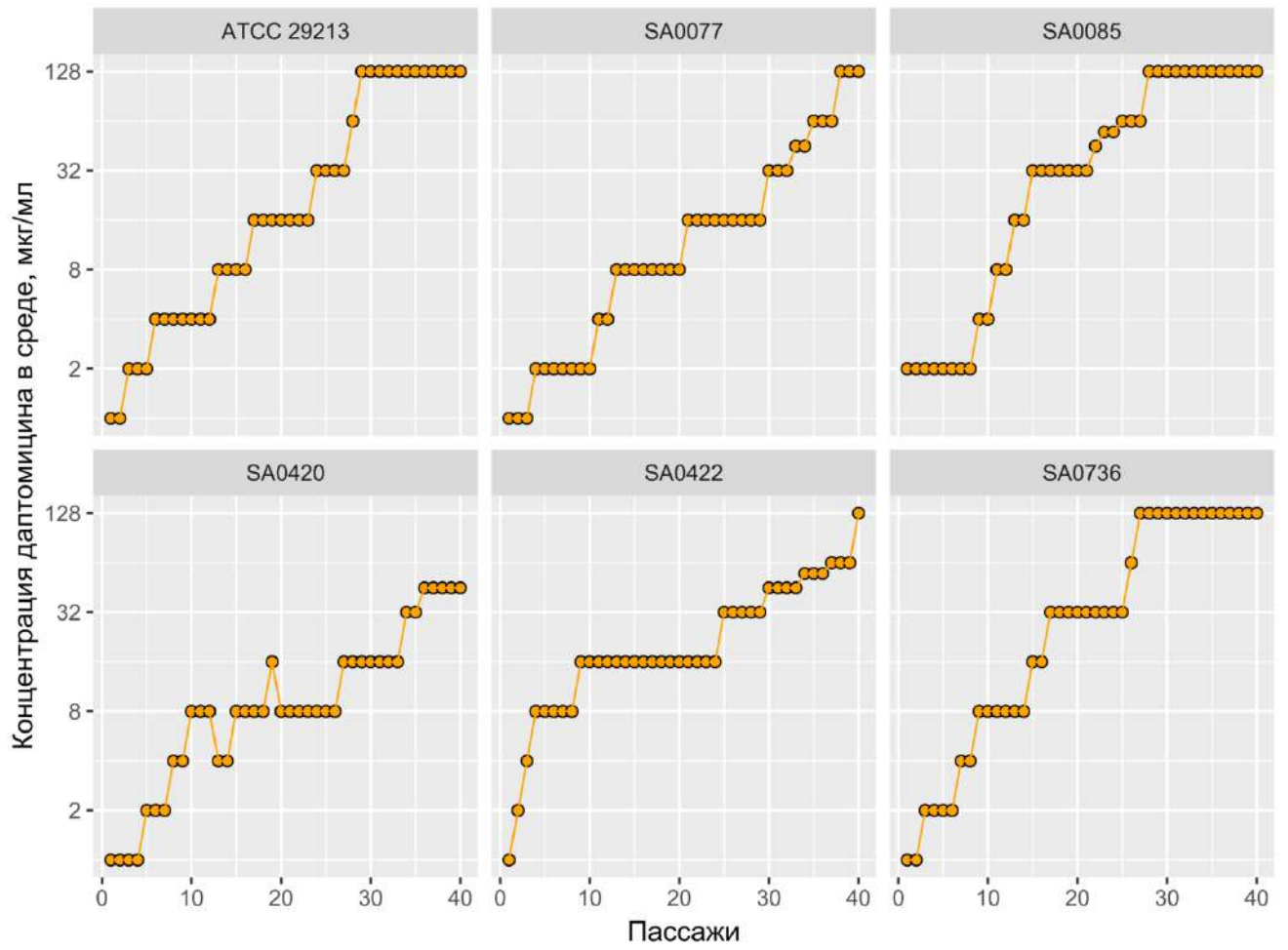


Рисунок 38 – Этапы селекции на даптомицине. Рисунок был использован в работе [392].

Таблица 31 – Изменение скорости роста у штаммов после селекции на ванкомицине и даптомицине

Штамм	Селекция	Dt, мин*		ОСР, %		ЛАГ, мин
		М	Q1-Q3	М	Q1-Q3	Средняя
SA0077	WT	26,086	24,495 - 32,968	100	97 – 100	148,82
	VAN	40,073*	37,227 - 43,888	63*	60 – 66	168,66*
	DAP	66,124*	59,558 - 67,196	63*	35 – 39	228,19*
	Без АБ	25,034	24,321 - 31,784	100	97 – 100	148,82
	Без АБ+Са	26,235	25,078 - 30,674	100	97 – 100	148,82
SA0085	WT	25,4	24,657 - 26,306	100	97 – 100	178,55
	VAN	42,069*	37,771 - 49,315	63*	60 – 66	208,3*
	DAP	39,276*	34,624 - 40,284	65*	60 – 70	367,01*
	Без АБ	24,656	23,554 - 25,987	100	97 – 100	178,55
	Без АБ+Са	25,243	24,123 - 26,052	100	97 – 100	178,55
SA0422	WT	24,251	24,160 - 24,532	100	97 – 100	168,6
	VAN	34,157*	33,912 - 35,260	69*	65 – 72	178,51*
	DAP	30,858*	29,273 - 34,268	72*	66 – 74	198,34*
SA0420	WT	26,567	28,345 – 30,645	100	97 – 100	150
	DAP	40,781*	39,883 – 41,712	82	80 – 85	140,10
SA0736	WT	45,897	41,283 - 50,923	100	97 – 100	178,5
	VAN	56,807*	52,749 - 62,727	90	88 – 93	208,25
	DAP-W	62,020*	57,969 - 69,021	80	78 – 82	495,85*
	DAP-Y	63,13*	57,324 - 69,766	80	78 – 82	564,41*
ATCC 29213	WT	20,629	17,417 - 23,926	100	97 – 100	128,92
	VAN	26,768*	26,419 - 28,411	90*	88 – 92	178,51
	DAP	25,615	23,403 - 32,588	85*	83 – 88	228,09*

Примечание: Селекция: WT – штаммы до селекции, VAN – после селекции на ванкомицине или даптомицине (DAP); DAP-Y/W – колонии желтого или белого цвета соответственно, после селекции на даптомицине. Без АБ – селекция на среде без антибиотика, Без АБ+Са – с добавлением кальция. Оценка скорости роста: Dt – время деления клеток (медиана, межквартильный интервал), ОСР – относительная скорость роста; * - статистически достоверные различия при сравнении со штаммами до селекции ($p < 0,01$).

6.1.3.3. Оценка динамики фенотипической гетерорезистентности

РАР-анализ с ванкомицином выявил значительное увеличение параметра AUC (при использовании в качестве контроля штамма *S. aureus* Mu50) производных по сравнению с исходными штаммами. После 40 пассажей в ванкомицине отношение AUC находилось в пределах 1,0–1,2, после селекции на даптомицине отношение AUC находилось в диапазоне 0,4–1,0. Динамические изменения параметра РАР/AUC в зависимости от селекции на ванкомицине или даптомицине представлены на рис. 39, кривые РАР анализа для каждого штамма в динамике представлены на рис. 40.

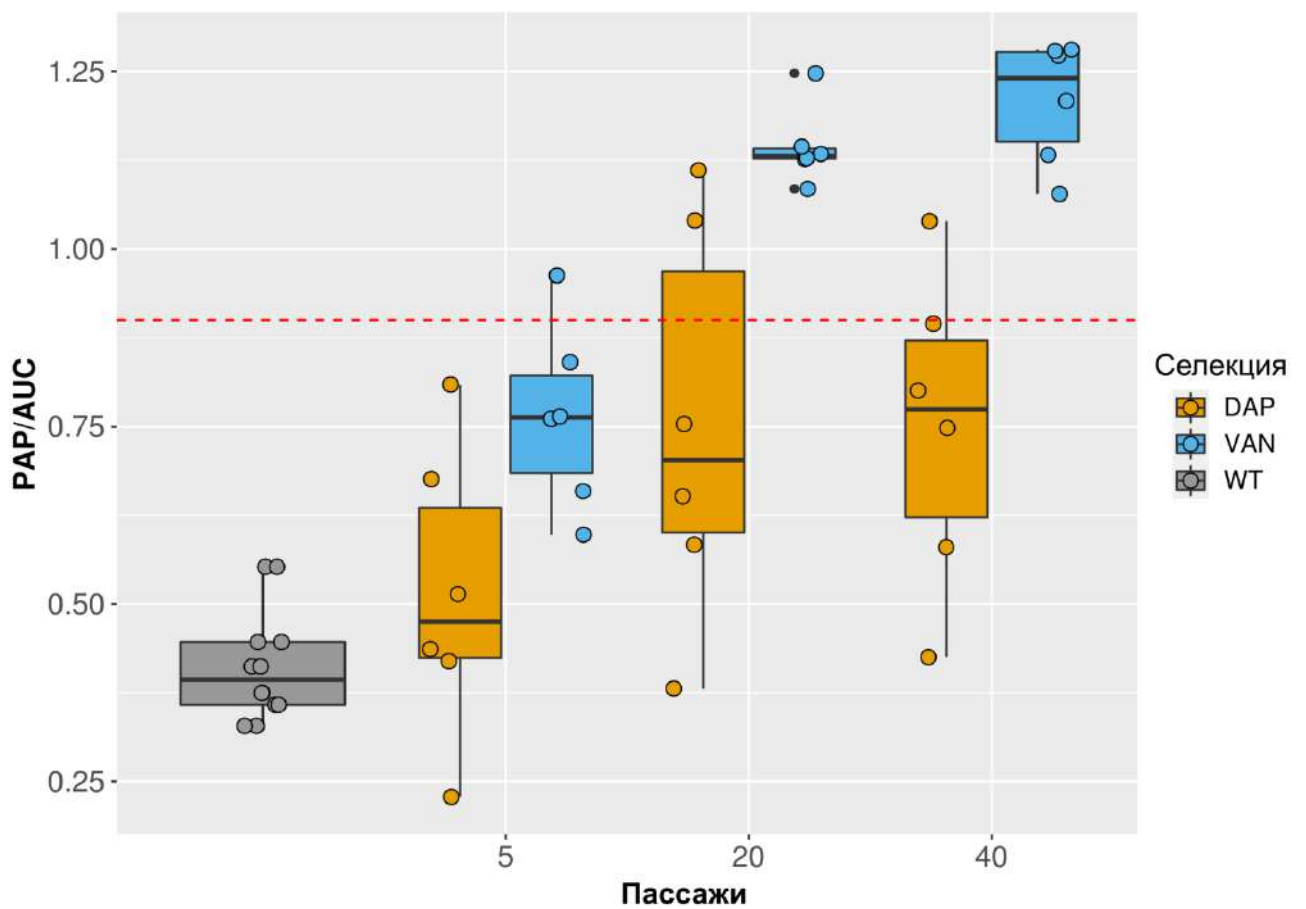
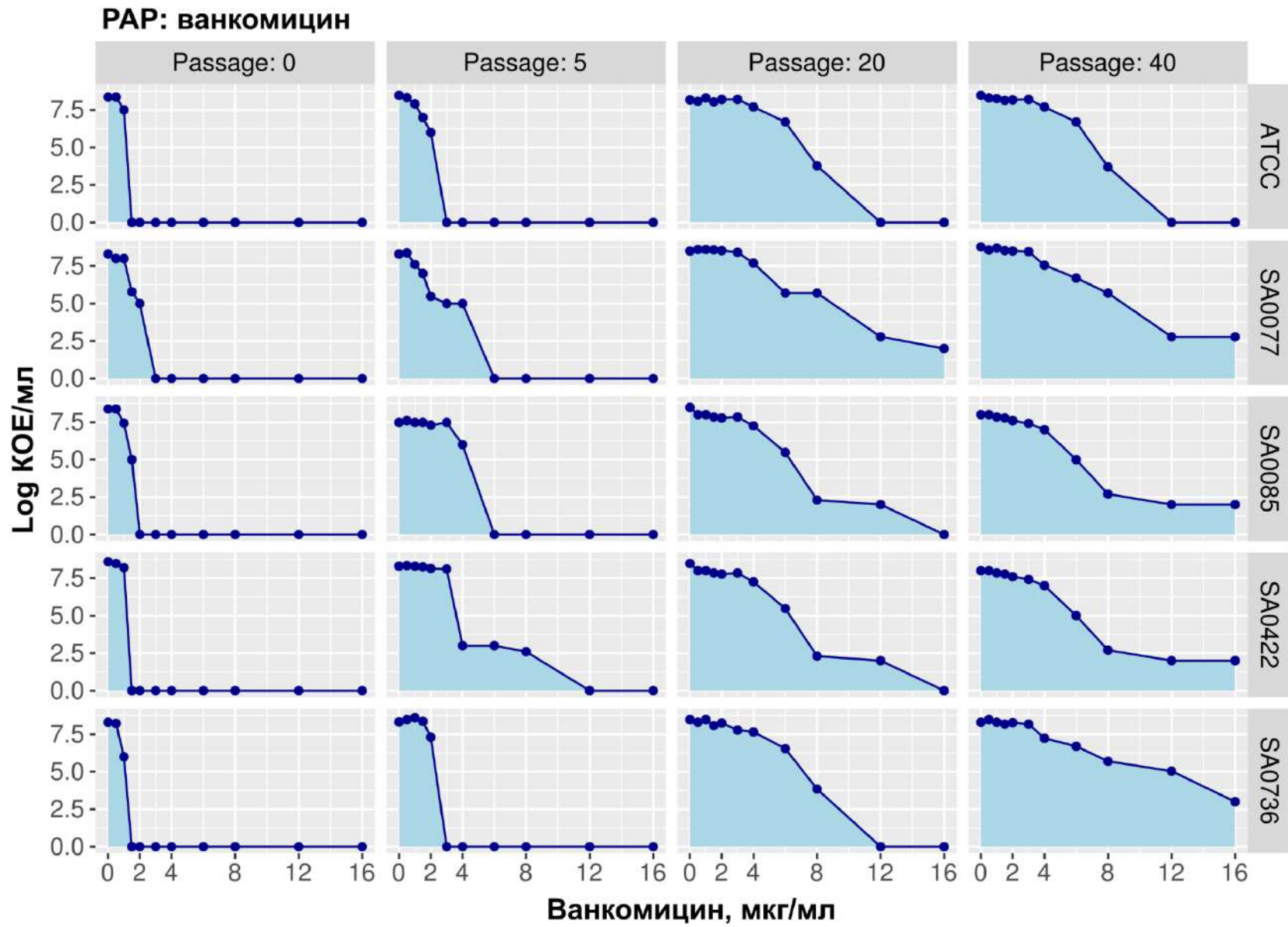


Рисунок 39 – Динамика РАР/AUC родительских изолятов (WT) и всех изогенных производных, полученных после 5-го, 20-го и 40-го пассажей при селекции устойчивости к ванкомицину (VAN) и даптомицину (DAP). Красная пунктирная линия соответствует уровню РАР/AUC контрольного штамма VISA *S. aureus* Mu50. Рисунок был использован в работе [392].



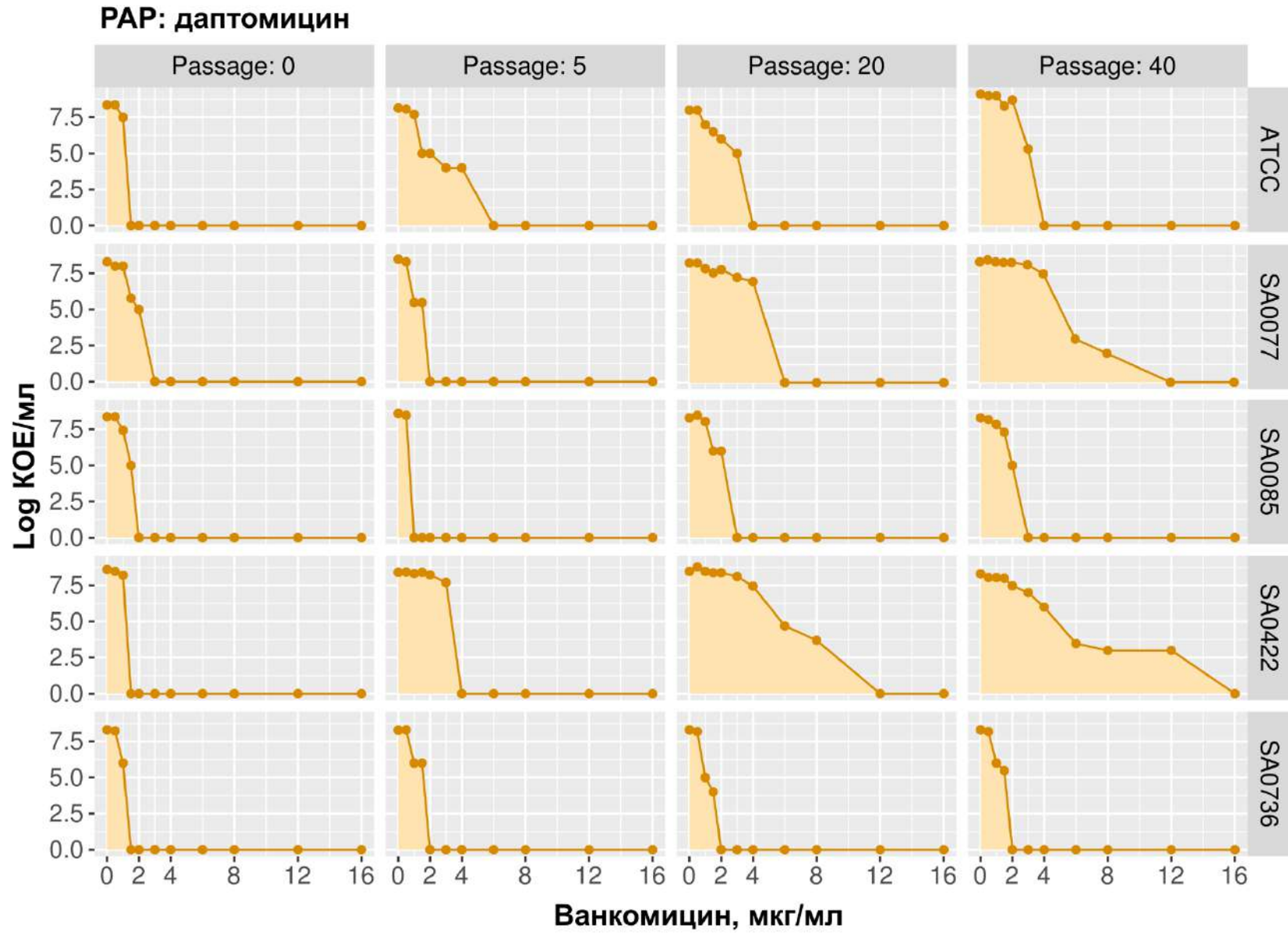


Рисунок 40 – Результаты оценки PАР-анализа с ванкомицином для всех производных штаммов в динамике, на 0 – 40-м пассажах при селекции на ванкомицине и даптомицине. Рисунок был использован в работе [392].

6.1.3.4. Оценка генотипических изменений при селекции на ванкомицине и даптомицине, подходы к оценке генотипической гетерорезистентности

Перед оценкой мутационных событий после селекции была проведена оценка возможной контаминации и кросс-контаминации. Для этого был проведен филогенетический анализ с включением данных секвенирования всех штаммов со всех пересевов. Проведенный филогенетический анализ исключил контаминацию, результаты совместно с аннотацией по чувствительности к антибиотикам представлены на рис. 41. Так, было выявлено пять кластеров, которые соответствуют пяти штаммам, включенным в исследование. Таким образом, возможная контаминация была исключена.

Для возможной оценки формирования в клеточных популяциях поликлональной резистентности при селекции на ванкомицине и даптомицине, используя данные секвенирования, проводили анализ всей популяции, то есть анализировали весь пул ридов. Для этого вся клеточная биомасса, выросшая на средах с антибиотиками, была использована для секвенирования с определением процента прочтений с различными мутациями. В тех случаях, когда мутации обнаруживались только в некоторых ридах, это указывало на неоднородность популяции. Выявленные смешанные риды с частотой от 5 до 90% замен в конкретной позиции (области) принималась за гетеропозиции (или гетеромутации), а выше 90% - за гомопозиции (или гомомутации).

Корреляция глубины прочтений (sequence depth) и наличия смешанных аллелей (allele frequency) оценивалась с использованием всех исходных данных о последовательностях. Для этого анализа были использованы все риды (фильтрованные по качеству) с информацией о конкретной мутации и глубине прочтения каждой позиции. Далее был проведен корреляционный анализ с оценкой возможного влияния глубины прочтения на наличие или отсутствие той или иной гетеропозиции. При этом отдельно были учтены ключевые мутации, которые имеют доказанное значение в формирование устойчивости к ванкомицину и даптомицину (на рис. 42 такие позиции отмечены красными точками). Так, по результатам анализа, наблюдалась умеренная отрицательная корреляция, для ванкомицина коэффициент ранговой корреляции Спирмена составил -0,15 и -0,25 для даптомицина, соответственно ($p < 0,001$). В целом количество смешанных позиций в ридах с мутациями превышало количество

гомомутаций. На последующих этапах селекции наблюдали либо реверсию популяции к дикому типу, либо закрепление мутации во всей популяции. Аналогичный анализ был проведен для ранее описанного эксперимента при селекции на бета-лактамных антибиотиках. При селекции на средах без антибиотиков после 40-го пассажа наблюдались преимущественно гетеромутации.

В целом, при анализе всего пула мутаций (гомомутаций и гетеромутаций) при селекции на ванкомицине и даптомицине в динамике наблюдались различные пути мутаций (рис. 43), число которых в значительной мере было больше по сравнению с селекцией на бета-лактамных антибиотиках. Сравнивая совокупные данные с уникальными локусами, выявленными при селекции на антибиотиках и при пассировании на средах без антибиотиков, наблюдалось небольшое количество одинаковых локусов. Двенадцать локусов были одинаковыми при селекции на ванкомицине и даптомицине, и три локуса были одинаковыми при селекции на антибиотиках и при пассировании на среде без антибиотиков (перекрывающиеся области на диаграмме Венна, рис.43D). У производных штаммов при селекции на ванкомицине и даптомицине были обнаружены мутации в 49 и 66 локусах, соответственно, а мутации в 20 локусах наблюдались у штаммов после пассирования на средах без антибиотиков. Все выявленные мутации с определенной частотой аллелей представлены в приложении 7. Для дальнейшего анализа были исключены синонимичные мутации и мутации в некодирующих областях. Так, используя кумулятивную сумму всех мутационных событий (гомомутаций и гетеромутаций), выявили, что большинство мутаций при селекции на ванкомицине или даптомицине приходилось на самые разнообразные (на рис. 43А, 43В «other») системы бактериальной клетки или белки с неизвестной функцией («Proteins of unknown functions»). У штаммов после селекции на ванкомицине также в большей степени выявлялись мутации в локусах биосинтеза клеточной стенки и биосинтеза аминокислот. У штаммов при селекции на даптомицине выявлены мутации в системах биосинтеза мембранных фосфолипидов, метаболизма глицерола и различных белках, относящихся к циклу Кребса и генерального метаболизма. Помимо этого, после селекции на обоих антибиотиках в разном количестве были выявлены мутации в различных регуляторных системах, двух-компонентных системах (Two-component systems, TCS), биосинтезе тейхоевых кислот (ТСА), транспортных системах, глобальных регуляторах и метаболизме ДНК.

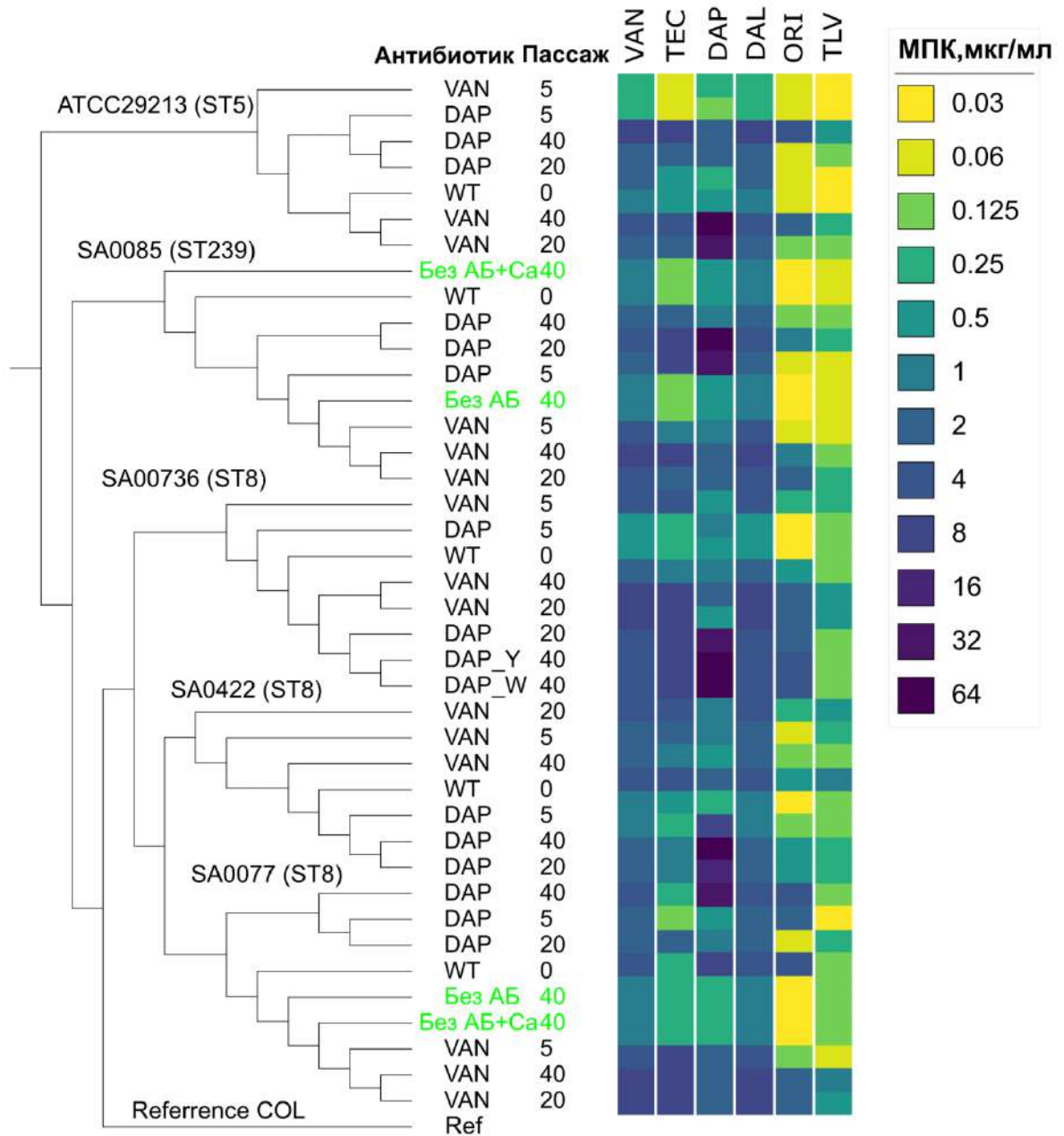
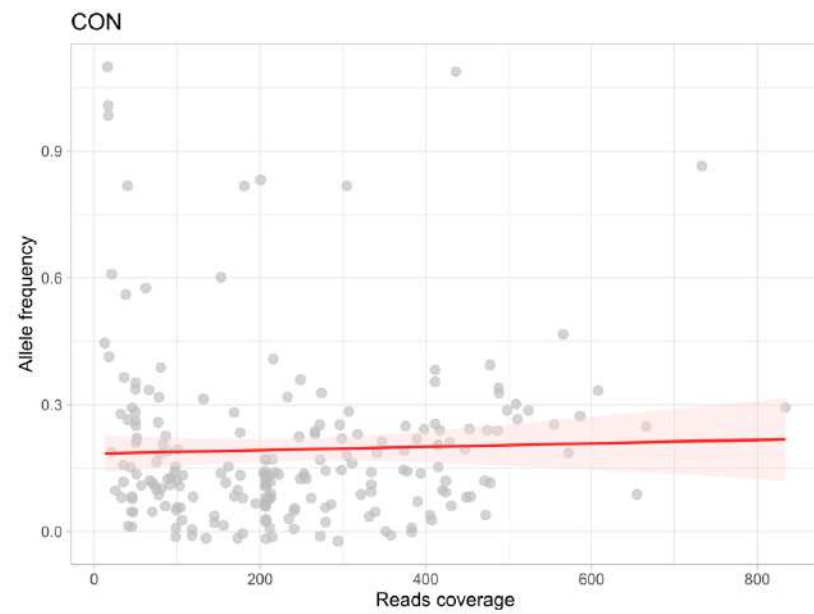
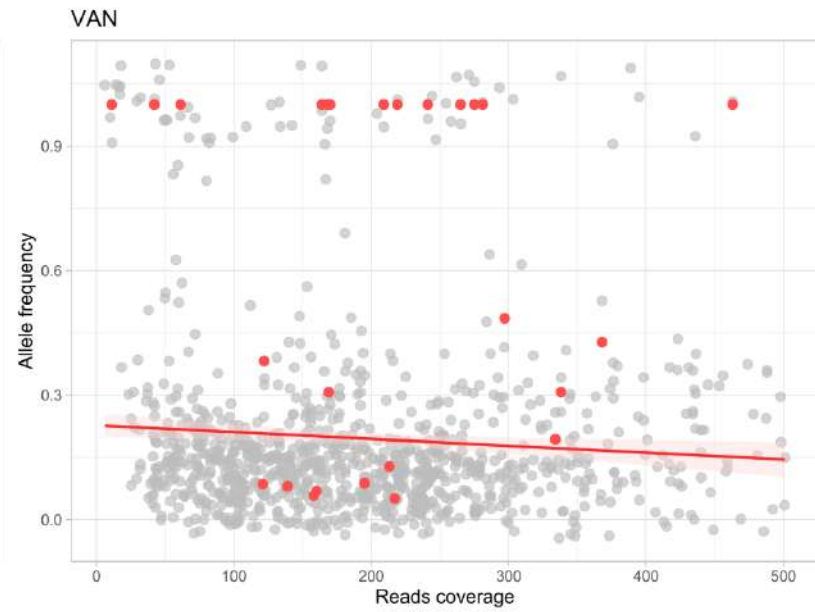
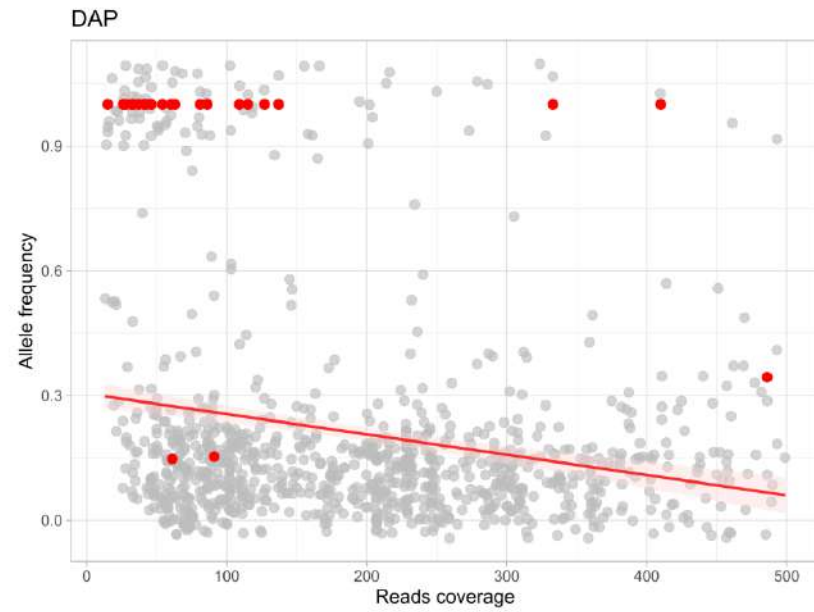


Рисунок 41 – Результаты филогенетического анализа (кладограмма) данных секвенирования штаммов до селекции (WT) и в процессе селекции устойчивости к ванкомицину (VAN), даптомицину (DAP) и пассажах на среде без антибиотиков (Без АБ, Без АБ+Са, зеленый цвет). Диссоциированный штамм SA0736: белые колонии (DAP_W), желтые колонии (DAP_Y). В качестве референса (Ref) был использован геном *S. aureus* COL. Представлена аннотация результатов МПК к гликопептидам и липогликопептидам (VAN – ванкомицин, DAP – даптомицин, TEC – тейкопланин, DAL – далбаванцин, ORI – оритаванцин, TLV – телаванцин).



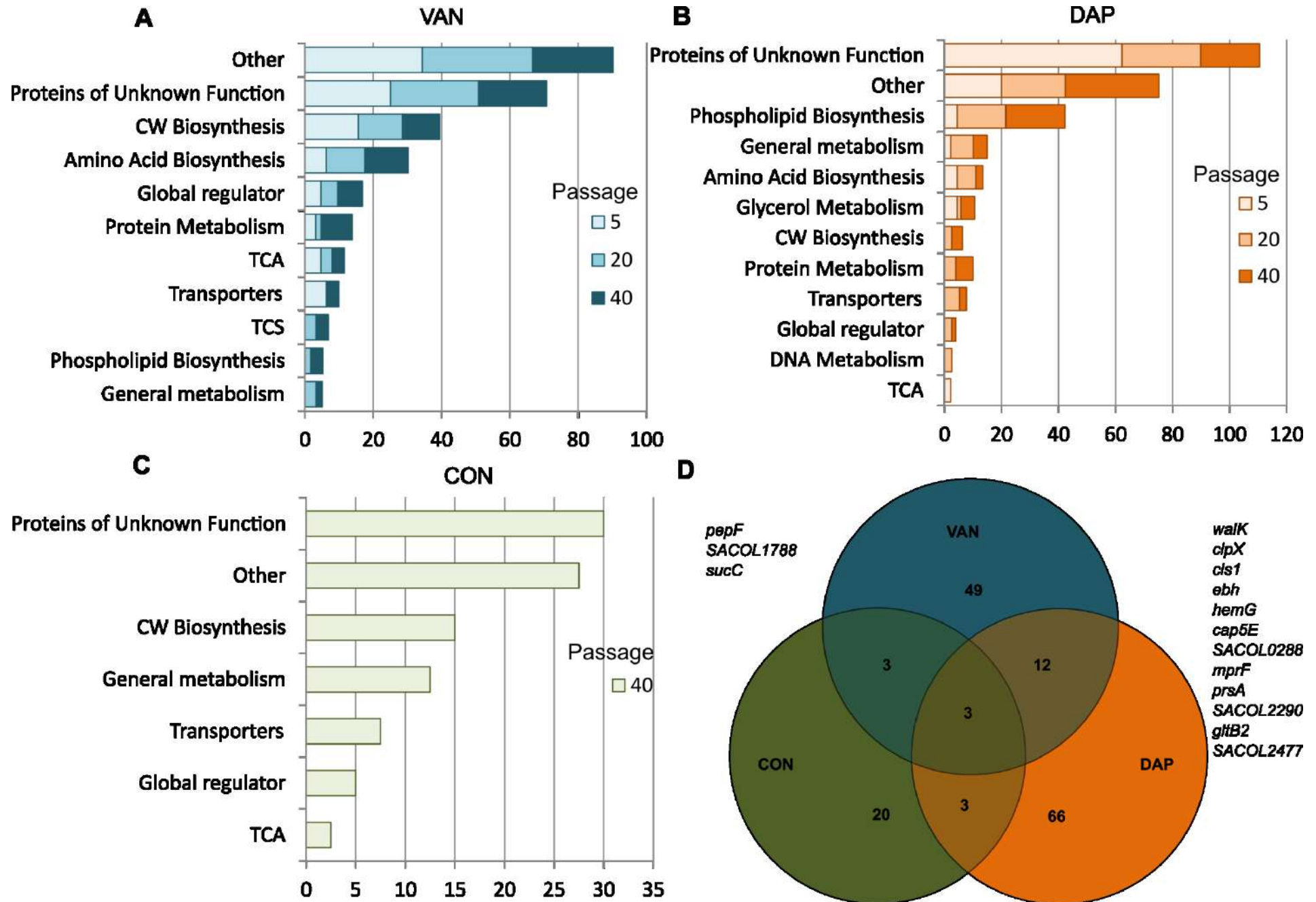


Рисунок 42 – Анализ зависимости аллельной частоты (Allele frequency) индивидуальных мутаций (нуклеотидные замены, делеции) и абсолютной глубины покрытия (Reads coverage). Представлены суммированные данные, включающие все данные секвенирования (всех штаммов со всех пересечений) в процессе селекции устойчивости к ванкомицину (VAN), даптомицину (DAP) или пассирования на среде без антибиотиков (CON). Каждая точка имела аннотацию о типе мутации и биологической роли. Каждая точка, обозначенная серой заливкой, соответствует одной мутации; красные точки соответствуют ключевым мутациям, которые связаны с доказанной устойчивостью к ванкомицину или даптомицину. Красной линией отмечено линейное приближение зависимости глубины прочтения и покрытия. Рисунок был использован в работе [392].

Рисунок 43 – Направление мутационных событий при селекции устойчивости к ванкомицину (A), даптомицину (B) и при пассажах на среде без антибиотиков (C). Представлена кумулятивная сумма (долевое отношение) всех мутаций (гомомутаций и гетеромутаций), объединённых в биологические системы среди всех штаммов, включённых в исследование, из всех контрольных точек. На диаграмме Венна (D) представлены локусы (конкретные гены и области), в которых были выявлены разные мутации. Мутации в 12 локусах (перечислены справа) были одинаковыми у штаммов, для которых вели селекцию на ванкомицине и даптомицине; мутации в 3 локусах (перечислены слева) были выявлены у всех штаммов, как при селекции на антибиотиках, так и при пассировании на среде без антибиотиков (CON). Рисунок был использован в работе [392].

6.1.3.5. Селекция контрольных штаммов

Мутации производных штаммов после пассирования на средах без антибиотиков были представлены преимущественно гетеромутациями в разных генах центрального метаболизма и других путях биосинтеза различных компонентов микробной клетки (рис. 43C). Не было обнаружено каких-либо мутаций в генах, участвующих в биосинтезе мембранных фосфолипидов, путях биосинтеза клеточной стенки, которые связаны с формированием устойчивости к даптомицину или ванкомицину. Были идентифицированы другие мутации в различных системах. Штамм SA0085 в обоих случаях (с добавлением кальция и без него) восстанавливал чувствительность к бета-лактамам вследствие потери элемента *SCC_{mec}* из области *orfX*, включая гены *ccr*- и *mec*-комплексов.

6.1.4. Оценка мутаций после селекции на ванкомицине и даптомицине

6.1.4.1. Генотипические изменения при селекции на ванкомицине

В целом у мутантов были обнаружены разные «ключевые» мутации в геномах, ассоциированные с формированием фенотипов hVISA/VISA (динамика появления таких мутаций представлена на рис. 44). Также стоит отметить, что паттерн мутаций был штамм-специфичным. Ассоциированные с фенотипом VISA аминокислотные замены были идентифицированы в различных двух-компонентных системах (TCS), участвующих в биосинтезе клеточной стенки (WalK/WalR, YucI/YucH, VraS/VraT и VraG), и субъединицах РНК-полимеразы (RpoB, RpoC) (рис. 44). Мутации в регуляторных элементах идентифицированы у SA0077: ген *walK*, мутация Y505H, а также в двух глобальных регуляторах клетки – RpoC (A947S) и KdpD (Q261N). У изолята SA0736 также выявлена мутация в WalK (G223D) и RpoB (R406H). Варианты мутаций в позиции 406 субъединицы RpoB описываются у VISA изолятов как среди клинических вариантов, так и полученных при селекции, при этом мутации, возникающие в области 400 – 500 аминокислот, часто являются «переключателями» фенотипов между VSSA и hVISA/VISA. Наконец, у производного штамма ATCC 29213 выявлена мутация в глобальном регуляторе SrrA (T80I), который регулирует работу факторов вирулентности, а также отвечает на оксидативный стресс. Отдельно стоит отметить изолят SA0085, у которого обнаружили мутации в *pdhC*, *fda*, *sucC*, все эти гены участвуют в цепи гликолитического метаболизма. По всей видимости, фенотипические изменения (замедленный мелкоколониальный вариант роста) связаны с нарушением углеводного обмена и конкретно с нарушением гликолиза. Мутация в гене *mprF* была обнаружена у производного штамма SA0085 после 20-го пассажа. У производного штамма SA0077 мутации в WalK были обнаружены после пятого пассажа менее чем в 10% ридов (G223D и K13R). Эти мутации были заменены на другие: Y505H на 20-40-м пассажах в 100% ридов. Стоп-кодона были обнаружены в производном штамме SA0422 в *yucH* после пятого пассажа менее чем в 50% прочтений, но на 20-40-м пассажах эта мутация была заменена делецией 23 п.н., идентифицированной в 100% ридов. Мутация в РВР2а-фолдазе (*prsA*) была идентифицирована в производном штамме SA0085 на 40-м пассаже (77% ридов). В целом, другие идентифицированные мутации были обнаружены в разных генах, участвующих в различных путях биосинтеза, включая гомеостаз фосфата (*pitA*), метаболизм сукцината (*sucC* и *pdhC*), цикл трикарбоновых кислот, биосинтез аминокислот и TCS.

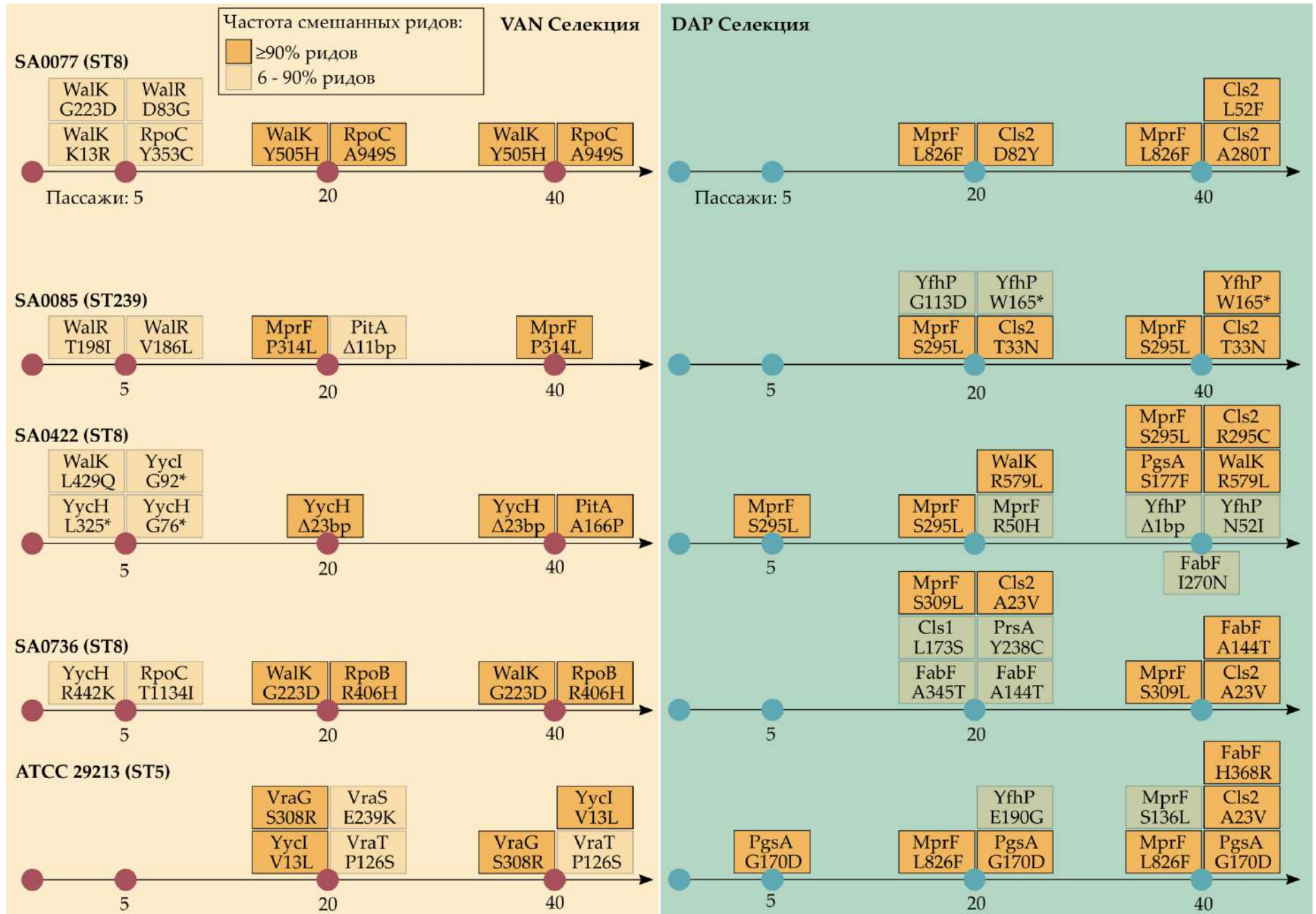


Рисунок 44 – Мутации в ключевых генах, связанные с фенотипами hVISA/VISA и резистентностью к даптомицину. Рисунок был использован в работе [392].

Другие обнаруженные гетеромутации были ассоциированы только с конкретным пассажем, но большинство из них ассоциированы с VISA-фенотипом. Были обнаружены мутации в гене *walR* (часть регуляторной системы WalKR) на 5-ом пассаже у мутантов SA0077 и SA0085. На 40-м пассаже у штаммов SA0422 и SA0736 выявлялись гетеромутации в генах, принимающих участие в биосинтезе цитоплазматической мембраны – *lpP*, *cls1* и *clpX*, что еще раз подчеркивает возможность перекрестной устойчивости гликопептидов и липопептидов (даптомицин). Другие обнаруженные гетеромутации среди мутантов в разных точках пересечений были выявлены в универсальном регуляторе-терминаторе транскрипции Rho (Q71L); транспортном белке для переноса фосфатов – NtpA (идентифицированные мутации - Q31*, R37S, 2xS33P); универсальном транспортном белке неорганических фосфатов PitA (делеции); пептидилпролил изомеразе PrsA (S59L). Список всех мутационных событий представлен в приложении 7.

6.1.4.2. Генотипические изменения при селекции на даптомицине

У всех производных штаммов были выявлены мутации в ключевых генах, участвующих в биосинтезе мембранных фосфолипидов: *mprF*, *cls2* и *pgsA* (рис. 44), связанных с устойчивостью к даптомицину. В MprF были обнаружены следующие различные аминокислотные замены: R50H, S136L, S295L, S309L и L826F. Мутации в MprF появлялись после 20-го пассажа и коррелировали с повышением МПК до 32 мкг/мл. Только у штамма SA0422 замена S295L была идентифицирована после пятого пассажа. После 5-го пересева у штамма SA0420 была обнаружена аминокислотная замена S295L в белке MprF, которая сохранялась на протяжении всего периода селекции. К концу селекции в этом же белке дополнительно была обнаружена мутация, приводящая к замене в кодоне R50C. Помимо этого у всех производных штаммов были выявлены мутации в Cls2: A23V, L52F, D82Y, A280T, T33N и R295C, которые выявлялись на 20-40-м пассажах и ассоциировались со значительным увеличением МПК. У штамма SA0077 замена D82Y выявлялась после 20-го пассажа; однако этот вариант мутации элиминировался на 40-м пассаже. У штамма SA0420 после 40-го пассажа в гене *cls2* обнаруживалась мутация, обуславливающая аминокислотную замену в кодоне A214T. Мутации в *pgsA* были обнаружены у производных штаммов ATCC 29213 и SA0422. Замена G170D не ассоциировалась с увеличением МПК на пятом пассаже. У производного штамма SA0422 замена R579L в регуляторе биосинтеза клеточной стенки WalK была

обнаружена после 20-го пассажа, на пятом пересеве у штамма SA0420 идентифицирована гетеромутация, обуславливающая аминокислотную замену в кодоне Q493K.

Обнаружено несколько мутаций в генах метаболизма глицерина. У производных штаммов SA0422, ATCC 29213 и SA0736 были идентифицированы мутации в *FabF* (часть метаболизма жирных кислот и фосфолипидов) и *GerC* (штамм SA0085). Делеция кластера генов метаболизма глицерина (*mutL*, *glpP*, *glpF*, *glpK* и *glpD*) была идентифицирована у производного штамма ATCC 29213. Делеция в *sepA* была идентифицирована у производного штамма SA0422 после 40-го пассажа.

Во время селекции устойчивости на даптомицине были обнаружены и другие мутации, охватывающие различные биологические системы бактериальной клетки. Несколько мутаций было выявлено в предполагаемом белке с неизвестной функцией SACOL1927 (*YfhP*), роль которого в устойчивости к даптомицину неизвестна. После 40 пассажей, как было отмечено ранее производный штамм SA0736 диссоциировал на две линии, представленные желтыми (DAP-Y) и белыми (DAP-W) колониями. Оба типа колоний отличались несколькими мутационными событиями. В частности, колонии желтого цвета несли мутации в гене, кодирующем диметилменахинон-метилтрансферазу (*MenG*), которая является частью пути биосинтеза менахинона. Еще одна мутация (стоп-кодон) выявлена в гене *mnhD*, который кодирует белок, участвующий в экскреции катионов Na⁺. Колонии белого цвета несли мутацию в гене *mtlD*, который кодирует фермент пути метаболизма маннита, мутацию в хромосомном эффлюксном насосе *sepA*, который придает низкую устойчивость к дезинфицирующим средствам, и в гене пируваткиназы (*pyk*), который является частью гликолитического пути. Остальные мутационные события были одинаковыми в обоих вариантах колоний.

При селекции штамма SA0420 были выявлены следующие мутационные события. В потенциальных промоторах были идентифицированы различные нуклеотидные замены в локусах SACOL1752 и SACOL0031, кодирующих гипотетический протеин, предположительно гидролизующий внутриклеточные сигнальные молекулы, и гипотетический фермент липидного обмена *UgpQ*, соответственно. Гетеромутации встречались в гипотетической карбоксиэстеразе *PnbA*, альдегид-дегидрогеназе SACOL2114, генах, кодирующих транспортные белки (*NtrA* и *KtrA*), а также в некоторых других генах. Нонсенс-мутации были выявлены в гене, кодирующем гипотетический протеин *YfhP*. Роль вышеперечисленных мутаций в формировании устойчивости к даптомицину не изучена. Список всех мутационных событий представлен в приложении 7.

6.1.4.3. Анализ формирования перекрестной устойчивости ванкомицин - и даптомицин-устойчивых штаммов к липогликопептидам

Как было показано ранее (раздел 3.3.) липогликопептидные антибиотики проявляют выраженную активность в отношении как HA-MRSA, так и CA-MRSA. При этом среди внутрибольничных изолятов (HA-MRSA) доля изолятов со сниженной чувствительностью выше по сравнению с внебольничными. При сравнении изолятов с МПК ванкомицина \Rightarrow 2 мкг/мл, обнаруживалась слабая корреляция между МПК с разными липогликопептидами. Так, при сравнении с телаванцином и далбаванцином была выявлена слабая положительная корреляция (коэффициент Пирсона = 0,3 и 0,4, соответственно). Также была выявлена корреляция между чувствительностью к даптомицину, далбаванцину и телаванцину: при увеличении МПК к даптомицину повышалась МПК и к новым антибиотикам. Таким образом, прослеживается следующая тенденция: при формировании гетерорезистентности к ванкомицину происходит снижение чувствительности к липогликопептидам у MRSA.

Ранее было показано, что формирование устойчивости к гликопептидам происходит через формирование гетеромутаций, то есть популяция (колония) может быть представлена разными субклонами, ассоциированными с различными мутациями. Было установлено, что по мере селекции к даптомицину и ванкомицину происходило увеличение параметра PAP/AUC с ванкомицином. Динамика показателя PAP/AUC прямо коррелирует с уровнем чувствительности к ванкомицину, даптомицину и новым липогликопептидам. На сегодняшний день отсутствуют конкретные данные о возможности использования альтернативных новых липогликопептидов в отношении гетерорезистентных к ванкомицину изолятов *S. aureus* (VISA, hVISA). Анализ чувствительности к новым липогликопептидам у устойчивых к ванкомицину и даптомицину мутантов показал, что наблюдается перекрестная устойчивость к новым антибиотикам. Однако не все механизмы связаны с перекрестной устойчивостью. В частности, мутации, ассоциированные с устойчивостью к ванкомицину (гены *walk*, *rpoC*, *kdpD*, *mprf*, *walR*, *yucH*, *rpoB*), опосредуют устойчивость к далбаванцину, оритаванцину и телаванцину. Мутации в генах *srrA*, *yucL* не отражаются на устойчивости к новым антибиотикам. Различные комбинации мутаций при селекции на даптомицине опосредуют разную устойчивость к липогликопептидам, но во всех случаях наблюдается устойчивость к телаванцину. В целом, далбаванцин преодолевает разные механизмы устойчивости, связанные с мутациями при селекции на даптомицине, за исключением комбинаций мутаций в генах *mprF+cls2+pgsA+walk* (Таблица 32). Полученные данные свидетельствуют о том, что разные механизмы формирования устойчивости к ванкомицину или даптомицину опосредуют разный спектр

устойчивости к липогликопептидным антибиотикам, которые имеют схожий механизм действия, однако имеются особенности в лиганд-связывающих структурах.

Таблица 32 – Результаты оценки динамики чувствительности производных штаммов *S. aureus*, при селекции устойчивости к ванкомицину и даптомицину, к липогликопептидным антибиотикам

Штамм	АБ	Пассаж	МПК, мкг/мл					
			VAN	TEC	DAP	ORI	DAL	TLV
SA0077	VAN	0	1	0,25	0,25	<0,03	0,03	0,125
		5	4	8	2	0,125	0,25	0,06
		20	8	8	2	2	1	0,5
		40	8	8	2	2	2	1
SA0085	VAN	0	1	0,125	0,5	<0,03	<0,016	0,06
		5	4	1	1	0,06	0,06	0,06
		20	4	2	2	2	0,5	0,25
		40	8	8	2	1	0,25	0,25
SA0422	VAN	0	1	0,5	0,25	<0,03	0,03	0,125
		5	2	2	1	0,06	0,125	0,25
		20	4	4	1	0,25	0,5	0,5
		40	4	4	2	0,5	1	1
SA0736	VAN	0	0,5	0,25	0,25	<0,03	0,03	0,125
		5	4	4	0,5	0,25	0,125	0,25
		20	8	8	0,5	2	1	0,5
		40	8	8	2	2	1	0,5
ATCC 29213	VAN	0	0,25	0,06	0,125	0,06	<0,016	<0,03
		5	0,25	0,06	0,25	0,06	<0,016	<0,03
		20	2	2	2	0,06	<0,016	0,125
		40	8	8	2	4	2	0,5
SA0077	DAP	0	1	0,25	0,25	<0,03	0,03	0,125
		5	2	0,125	0,5	2	<0,03	0,03
		20	4	0,25	8	4	0,125	0,125
		40	4	0,25	32	4	0,125	0,125
SA0085	DAP	0	1	0,125	0,5	<0,03	<0,016	0,06
		5	1	0,125	0,5	<0,03	<0,016	0,06

SA0085	DAP	20	2	8	32	0,06	0,03	0,06
		40	4	8	>64	1	0,125	0,25
SA0422	DAP	0	1	0,5	0,25	<0,03	0,03	0,125
		5	1	0,25	8	0,125	0,06	0,125
		20	2	1	16	0,5	0,25	0,25
		40	2	1	>64	0,5	0,25	0,25
SA0736	DAP	0	0,5	0,25	0,25	<0,03	0,03	0,125
		5	0,5	0,25	1	<0,03	0,03	0,125
		20	4	8	32	2	0,25	0,125
		40W	4	8	>64	4	0,5	0,125
		40Y	4	8	>64	4	0,5	0,125
ATCC 29213	DAP	0	0,25	0,06	0,125	0,06	<0,016	<0,03
		5	1	0,5	0,5	0,06	0,03	<0,03
		20	2	2	32	0,125	0,06	0,125
		40	4	4	64	2	0,125	0,25

Обозначения: АБ – антибиотики, на которых проводилась селекция; Пассаж – номер пересева; Антибиотики: VAN – ванкомицин, DAP – даптомицин, ТЕС- тейкопланин, ORI – оритаванцин, DAL – далбаванцин, TLV – телаванцин. Таблица была использована в работе [392].

Все комбинации мутаций, полученные у производных штаммов после селекции с ванкомицином, влияют на устойчивость к липогликопептидам. В нескольких исследованиях моделировалась резистентность к липогликопептидам. В исследовании Nines и соавт. [420], мутации в генах *walk* и *vraT* были получены при селекции на далбаванцине. В работе Song и соавт. [421], было продемонстрировано, что селекция на телаванцине влияет как на снижение чувствительности к даптомицину, так и на формирование фенотипа VISA. В исследовании Werth и соавт. [422], при проведении эксперимента по симуляции дозирования однократного воздействия далбаванцином на фармакокинетической модели *in vitro* в течение 28 дней были описаны производные штаммы со сниженной чувствительностью к далбаванцину, ванкомицину и даптомицину, главным образом вследствие мутаций в системе WalKR. На устойчивость к липогликопептидам влияет приобретение устойчивости к даптомицину в результате комбинации мутаций в MprF+Cls2. Все производные штаммы (кроме SA0422), не имеющие мутаций в *walk*, были чувствительны к далбаванцину или телаванцину (МПК $\leq 0,125$ мкг/мл).

Это говорит о том, что мутации в гене *WalK* играют критическую роль в формировании резистентности к липогликопептидам.

6.1.4.4. Анализ мутационных событий, приводящих к переходу гетеромутаций в гомомутации

Анализируя общее количество мутационных событий, как в кодирующих областях, так и в межгенных областях, включая потенциальные промоторы, было установлено, что количество гетеромутационных событий в значительной степени было больше по сравнению с гомомутациями в независимости от того, на каком антибиотике шла селекция. Так, в зависимости от пассажа диапазон гетеромутационных событий составил от 35 до 65 мутаций на геном. Количество гомомутаций было в значительной степени меньше, в среднем от 2 до 12 на геном. Была замечена тенденция снижения количества гетеромутаций от 5-го пассажа к 40-му, и наоборот увеличение количества гомомутаций. Включенные в исследование контрольные штаммы, которые пассировались на средах без антибиотика, к 40-му пассажу также характеризовались значительным количеством гетеромутаций, однако все мутации были распределены в локусах отличных от локусов с мутациями у резистентных штаммов после приобретения устойчивости. Диапазон гомомутаций составлял 3-5 на геном, с увеличением этого количества к концу селекции (4-9 на геном). При этом при каждом варианте селекции практически у каждого штамма наблюдался переход гомомутаций в гетеромутации. Однако, обратного явления – перехода гомомутаций в гетеромутации обнаружено не было, за исключением случаев, когда гетеромутации элиминировали на каком-либо из этапов селекции. Примеры переходов гетеромутаций в гомомутации представлены в таблице 33.

Таблица 33 – Примеры переходов гетеромутаций в гомомутации при селекции на разных антибиотиках

Штаммы	АБ	Белок, локус	Пересевы, % ридов с мутацией		
			5	20	40
SA0077	СРТ	Apt	0	7	100
SA0085		Oat	85	100	100
		GraR	0	88	100
		GdpP	0	6	100
SA0420		TarJ	0	60	100
SA0422		GdpP	0	93	100
SA0707		SACOL1904	12	100	100
SA0937		Pbp4	0	25	100
SA0937		GdpP	31	100	100

SA0937		FadE	0	65	100
SA0707	OXA	(P) <i>pbp4</i>	0	73	100
SA0937		SACOL1924	18	100	100
SA0937		<i>VraT</i>	21	100	100
SA0937		GdpP	23	100	100
SA0937		<i>Stp1</i>	25	100	100
SA0937		MER	<i>VraS</i>	41	74
SA0937	<i>Pbp2</i>		82	76	100
SA0085	DAP	<i>YfhP</i>	0	6	100
SA0422		<i>Ngh2</i>	94	100	100
SA0422		<i>YfhP</i>	0	9	67
SA0736		<i>FabF</i>	0	67	100
ATCC 29213		<i>CtpA</i>	0	10	100
ATCC 29213	VAN	<i>VraT</i>	0	26	77
SA0077		<i>RpoC</i>	6	100	100
SA0077		<i>WalK</i>	6	100	100
SA0422		<i>YucH</i>	43	100	100

Примечание: Антибиотики (АБ), на которых велась селекция: СРТ – цефтаролин, ОХА-оксациллин, MER – меропенем, DAP – даптомицин, VAN – ванкомицин; (P) – промотор.

Были отмечены переходы гетеромутаций в гомомутации, в частности для генов *apt*, *gdpP*, *oatA*, *tarJ* и *graR* у штаммов при селекции на бета-лактамных антибиотиках. У мутантов SA0085 и SA0422 гетеромутации также обнаружены в регуляторной системе *graSR*, принимающей участие в формировании устойчивости к гликопептидам.

В настоящей работе были выявлены хорошо охарактеризованные маркеры, ассоциированные со снижением чувствительности к ванкомицину и характерные для VISA фенотипов. Абсолютное количество гетеромутаций в разных циклах селекции было выше при селекции на ванкомицине по сравнению с селекцией на цефтаролине или других бета-лактамных антибиотиках. Наблюдался переход гетеромутаций в гомомутации. В частности, у штамма ATCC 29213 наблюдался такой переход в гене *vraT* (мутация в кодоне P126S). У штамма SA0077 появившаяся на 5-ом пересеве мутация (5% ридов) в гене *rpoC* (Y353C) к 20-му пересеву была заменена гомомутацией (100% ридов) в другом кодоне (A949S). Помимо этого, в гене *walK* на 5-ом пассаже селекции была двойная гетеромутация (8%) в кодонах K13R и G223D, а к 20-му пассажи эти гетеромутации элиминировали, вместо этого идентифицирована гомомутация Y505H. У штамма SA0422 переход из гетеро- в гомомутацию наблюдался для гена *yucH*. При этом на 5-ом пересеве было идентифицировано две гетеро-нонсенс мутации (L325* и G76*) в этом гене, а к 20-му пересеву уже появилась 23 п.н. делеция.

При селекции на даптомицине также было обнаружено значительное количество гетеромутаций (Приложение 7). У большинства мутантов были обнаружены гетеромутации в

различные периоды пересевов в белке с неизвестной функцией SACOL1927 (SAV1869, *yfhP*), выявленные варианты мутаций: G113D, W265*, E206*, Q182*, N52I, E190G и делеции. При этом у мутантного штамма SA0085 отмечался переход гетеромутации (5-ый пересев, глубина 6%) в гомомутацию (20-ый пересев, 100%). У штамма SA0736 был идентифицирован переход гетеромутации (A144T, 67%) на 20-ом пересеве в гене *fabF* в гомомутацию (100%) к 40-му пассажи. Еще два таких перехода было детектировано для генов *ctpA* (сериновая протеаза, участвующая в деградации протеинов) и NADH-дегидрогеназы энергетического метаболизма клетки. Гетеромутации были обнаружены в специфических детерминантах с доказанной ролью в устойчивости к даптомицину: *mprF* у штамма SA0422 (R50H, 20-ый пассаж, глубина 15%); *cls1* у штамма SA0736 (L173S, 20-ый пассаж, 25%). У штамма SA0085 к 40-му пассажи идентифицирована гетеромутация (Y119*, 30%) в АТФ-зависимой ДНК-хеликазе. У штамма SA0736 на 20-м пассаже выявлена гетеромутация в гене *sbnB*, участвующем в биосинтезе сидерофоров. Помимо этого различные гетеромутации были обнаружены на различных этапах селекции и охватывали гены, входящие в состав различных метаболических систем клетки – *gap*, *purD*, *menB*, *fhs*, *mtlD* и другие. Значительное количество гетеромутаций в позициях -391 (G→A), -393 (A→T), -395 (G→A), -450 (A→T), -599 (C→T) обнаруживалось в ходе всей селекции в потенциальном промоторе гена *UgpQ* (SACOL0031), предположительно участвующего в липидном обмене.

6.1.4.4.1. Заключение по разделу: подходы к оценке гетеромутаций

В настоящем исследовании использовались термины «гомомутации» и «гетеромутации», которые стоит трактовать исключительно в контексте анализа данных полногеномного секвенирования применительно к популяции бактерий (в виде колонии или чистой культуры в жидкой среде), которая может быть представлена клетками с разными мутациями. Используя информацию об аллельной глубине той или иной нуклеотидной замены (или делеции) можно определить относительное количество долю клеток с определенным мутационным событием. При проведении данного анализа необходимо использовать данные только высокого абсолютного покрытия. Безусловно, что такой подход имеет и свои минусы, а именно существует вероятность интерпретации фоновых замен или ошибок прочтения как истинных мутаций. Прямой анализ целого пула ридов из жидкой культуры бактерий апробирован в LTEE экспериментах [292].

Интересным наблюдением было формирование мутаций в гене *yusH* при селекции устойчивости к ванкомицину. Так, сначала отмечалось появление стоп-кодона,

представленных в виде гетеромутаций, а потом появление гомомутаций – делеций. Данный пример свидетельствует о направленной молекулярной эволюции (положительный отбор), когда внешние факторы вызывают необходимость «выключения» гена, при этом молекулярные механизмы клетки (и популяции в целом) эффективно проводят этот процесс. Формирование стоп-кодонов – более быстрый, но менее надежный способ эволюции, поскольку могут произойти реверс-мутации, а делеции, как правило, не имеют обратного пути.

Этот и другие примеры, описанные в разделе, указывают на наличие поликлональной популяции, в которой некоторые клоны либо элиминируют, либо доминируют в процессе селекции. Ранее, в исследовании Rishishwar и соавт. [423], используя аналогичный анализ подсчета доли ридов с определенными мутациями (гетеромутациями или «мутациями в гетерозиготном состоянии»), был продемонстрирован пример динамики формирования устойчивости к ванкомицину (VSSA→hVISA) у пациентов через поликлональные популяции. Необходимо выделить ряд существенных ограничений использованного в настоящем исследовании подхода анализа данных секвенирования. Производные штаммы были секвенированы только в трех точках сбора данных, однако такие исследования требуют гораздо большего их количества. Кроме того, при использовании данного подхода для анализа геномных данных можно ошибочно принять «шум» данных секвенирования за положительные мутации. Еще одним ограничением является тот факт, что многие из обнаруженных мутаций не были подтверждены экспериментально с использованием сайт-направленного мутагенеза. Важно провести более глубокое исследование ряда мутационных событий, в том числе влияющих на общий метаболизм и различные пути биосинтеза в оценке их роли в формировании устойчивости или изменения фенотипа.

6.1.4.5. Заключение по разделу: формирование независимых и общих путей устойчивости к ванкомицину и даптомицину

Ванкомицин является классическим антибиотиком, для которого было описано явление гетерорезистентности со сложным механизмом формирования, детали которого остаются до конца не изученными. Формирование устойчивости к ванкомицину носит сложный ступенчатый характер, можно выделить группы генов, мутации в которых опосредуют формирование устойчивости. К их числу относятся, прежде всего, регуляторы биосинтеза клеточной стенки. Другая важная проблема – это выраженная гетерорезистентность, проявляющаяся в неоднородности популяции. В исследовании было обнаружено, что уровень гетеромутаций, то есть присутствие нескольких вариантов аллелей генов в секретируемом

прокариотическом геноме, значительно выше по сравнению с данными полученными при селекции на других антибиотиках (цефтаролине, даптомицине). Так соотношение гомомутаций и гетеромутаций при анализе ридов составлял, соответственно, 1:3. Формирование VISA может быть связано с высоким уровнем биологической цены сопротивления («fitness cost»), отражающимся на возникновении мутаций в разных системах микробной клетки на фоне селекции.

В проведенном исследовании использовалась классическая схема селекции устойчивости, включающая многоступенчатое повышение концентрации антибиотика в среде в течение относительно длительного периода времени (сорок пассажей). Все включенные в исследование штаммы пассировались параллельно, что позволило оценить одновременную фенотипическую и генотипическую эволюцию *S. aureus* при воздействии двух антибиотиков. Использование длительной селекции *in vitro* было необходимо для достижения стабильного и высокого уровня устойчивости к ванкомицину и даптомицину. Подобные подходы использовались в предыдущих аналогичных исследованиях эволюции (более 30 пассажей), включающих воздействие даптомицином [424] или 60-дневное пассирование на среде с ванкомицином [425]. В настоящем исследовании длительная селекция устойчивости сопровождалась высоким уровнем «fitness cost», который отражался в замедлении скорости роста, особенно для производных штаммов после селекции на даптомицине. В текущем исследовании у производных штаммов были идентифицированы хорошо известные мутации в генах, связанных с устойчивостью к ванкомицину. К ним относились следующие гены: *walK*, *mprF*, *rpoB* и *yusH-yusI*. Мутации в вышеуказанных локусах также наблюдались ранее у устойчивых к даптомицину штаммов [426-428]. Выявленные мутации в генах *vraS* и *vraT* были ранее детально изучены и ассоциированы с фенотипами VISA [207]. У одного производного штамма (SA0085) была обнаружена аминокислотная замена P314L между синтазным и флиппазным доменами MprF во время селекции с ванкомицином. Ранее было показано, что замена P314L вызывает умеренное увеличение МПК даптомицина до 2 мкг/мл [429], тогда как в другом исследовании [430], данная мутация не оказывала влияния на МПК. В исследовании Sulaiman и соавт. [431] было показано, что мутации в регуляторном гене *yusH* индуцируют толерантность к даптомицину и вызывают увеличение МПК ванкомицина. WalKR управляется системой YusI-YusH, следовательно, связанные с ним делеции и мутации влияют на развитие фенотипов VISA и снижение аутолитической активности [432].

В настоящей работе, потенциально новые, ранее не описываемые мутации были выявлены при селекции на ванкомицине. К их числу относятся следующие миссенс-мутации:

WalK (Y505H), RpoB (R406H), YucI (V13L) и RpoC (A949S). Замены F632S и Q961K в белке RpoC ранее были связаны с резистентностью к даптомицину, полученной *in vitro* [433].

Производные штаммы после селекции на даптомицине характеризовались выраженным снижением скорости роста. Более того, при сравнении изменений в скорости роста у производных штаммов, полученных при селекции на других антибиотиках, наибольшим снижением характеризовались даптомицин-устойчивые штаммы. Поскольку мишень действия даптомицина – цитоплазматическая мембрана, выступающая как эссенциальный и важнейший компонент бактериальной клетки, то механизмы устойчивости ассоциированы с высокой биологической ценой сопротивления [424, 434].

Производные штаммы при пассировании на среде с даптомицином характеризовались приобретением хорошо охарактеризованных мутаций в генах *mprF*, *cls2* и *fabF*, которые являются маркерами устойчивости к даптомицину. Ген *mprF*, кодирующий фосфатидилглицерол лизилтрансферазу является основным маркером устойчивости к даптомицину. Белок MprF, полностью погруженный в цитоплазматическую мембрану, состоит из нескольких доменов: N - терминальный конец (1-586 а.к.), бифункциональный домен (276 – 357 а.к.) и C – терминальный конец (511 – 840 а.к.) [430]. Мутации в бифункциональном домене приводят к увеличению МПК даптомицина до 1 – 4 мкг/мл [435, 436]. Производные штаммы, полученные при выполнении настоящего исследования с мутациями в бифункциональном домене демонстрировали незначительное увеличение МПК. В N-конце MprF у некоторых производных штаммов была выявлена замена в положении R50C. Роль этой мутации не верифицирована, однако ближайшая аминокислотная замена G61V ассоциирована с формированием устойчивости [435]. Фермент синтаза жирных кислот (FabF) связан с устойчивостью к даптомицину и формированием мелкоколониальных вариантов [437]. Мутации в *fabF* были идентифицированы у трех производных штаммов (SA0422, SA0736 и ATCC29213). Ген *cls2*, кодирующий белок кардиолипид синтазу, также является хорошо изученным маркером устойчивости к даптомицину. Отрицательно заряженный фосфолипид кардиолипид – важнейший компонент бактериальной мембраны, который участвует в связывании молекулы даптомицина и его олигомеризации [414]. Ранее было показано, что высокие концентрации этого компонента в мембране предотвращают формирование каналов под воздействием антибиотика [438].

Ген *cls* также связан с устойчивостью к даптомицину [439], однако только один производный штамм в исследовании имел эту мутацию.

Белок WalK – важнейший регулятор метаболизма клеточной стенки, мутации в котором ассоциированы со снижением чувствительности как к даптомицину, так и ванкомицину [440].

Несколько новых аминокислотных замен в белках MprF (S309L), CIs2 (D82Y, A280T, R295C), WalK (R579L) и замена G170D в 3-фосфатидилтрансферазе (PgsA) были идентифицированы у устойчивых к даптомицину штаммов. Полный локус генов метаболизма глицерола был делетирован у производного штамма ATCC 29213. Таким образом, это первый описанный случай устойчивости к даптомицину, связанный с крупной генной делецией, роль которой необходимо изучить более детально. Метаболизм глицерола включает несколько ферментативных реакций, промежуточные продукты которых впоследствии участвуют в образовании мембранных фосфолипидов. Согласно исследованию [429], устойчивые к даптомицину изоляты, снижали экспрессию генов, участвующих в метаболизме глицерола, в частности гена *glpF*. Снижение или переключение на альтернативные пути метаболизма глицерола, по-видимому, связаны с устойчивостью к даптомицину.

Кроме того, как на основании обзора ранее опубликованных работ, так и по результатам собственных наблюдений, в ходе селекции обнаруживаются различные мутации в генах, отвечающих за различные метаболические пути и не связанные напрямую с устойчивостью к гликопептидам и даптомицину. В частности, к их числу можно отнести гены, участвующие в биосинтезе аминокислот, белковом обмене, цикле трикарбоновых кислот. Например, ген *pdhC*, кодирующий пируват-дегидрогеназу, и многие другие гены с неизвестными функциями. Стоит отметить, что гены *pitA*, *pdhC* и *pykA* входят в число 30-ти наиболее мутируемых генов у адаптированных к ванкомицину штаммов [441]. Мутация в *pitA*, кодирующем низкоаффинный переносчик неорганических фосфатов, обнаружена у одного штамма (SA0422), в то время как у другого штамма (SA0085) обнаружены только гетеромутации, выявленные на 20-м пассаже селекции. Мутации в этом гене ранее были идентифицированы в недавнем исследовании при селекции на ванкомицине [441], а также в исследовании по изучению толерантности к даптомицину [442]. Мутация в гене *prsA*, который кодирует белок, участвующий в фолдинге РВР2а, была обнаружена у штамма SA0085. Ранее было показано, что «seesaw» эффект, связанный с устойчивостью к даптомицину, сопровождается снижением устойчивости к β-лактамам [443], что может быть связано с влиянием мутаций в *prsA*.

У нескольких производных штаммов были выявлены нонсенс-мутации в локусе SACOL1927, кодирующий предполагаемый белок YfhP с регуляторным доменом. Функциональная роль этого белка не изучена, как и неизвестно его возможное участие в формировании устойчивости. Стоит также обратить внимание, что на разных циклах селекции наблюдалось появление гетеромутаций в генах различных транспортных белков (KtrA, NtpA), участвующих в переносе микроэлементов и низкомолекулярных соединений. Точная связь этих белков с возможным формированием устойчивости к даптомицину не изучена, однако KtrA опосредует молекулярное связывание некоторых агентов, действующих на

цитоплазматическую мембрану – противомикробных пептидов, полимиксинов [444]. Воздействие даптомицином приводит к перестройки многих метаболических путей в бактериальной клетке, но наиболее выраженными изменениями характеризуются метаболизм жирных кислот и мембранных фосфолипидов [445]. Изменение вирулентности на фоне приобретения устойчивости к даптомицину остается дискуссионным вопросом. Одни экспериментальные данные показывают, что даптомицин-устойчивые штаммы теряют инвазивный потенциал [446], в других исследованиях выдвигается гипотеза о том, что гиперэкспрессия каротиноидного пигмента – стафилоксантина является сильным вирулентным фактором [414]. Как было показано в нескольких экспериментальных исследованиях [415, 441], метаболическая эволюция под давлением антибиотиков может играть важную роль в качестве компенсаторного мутационного механизма и/или альтернативного приобретения резистентности или толерантности к антибиотикам.

6.1.5. Изменение индуцированной аутолитической активности у мутантов, проявляющих устойчивость к ванкомицину, даптомицину и цефтаролину

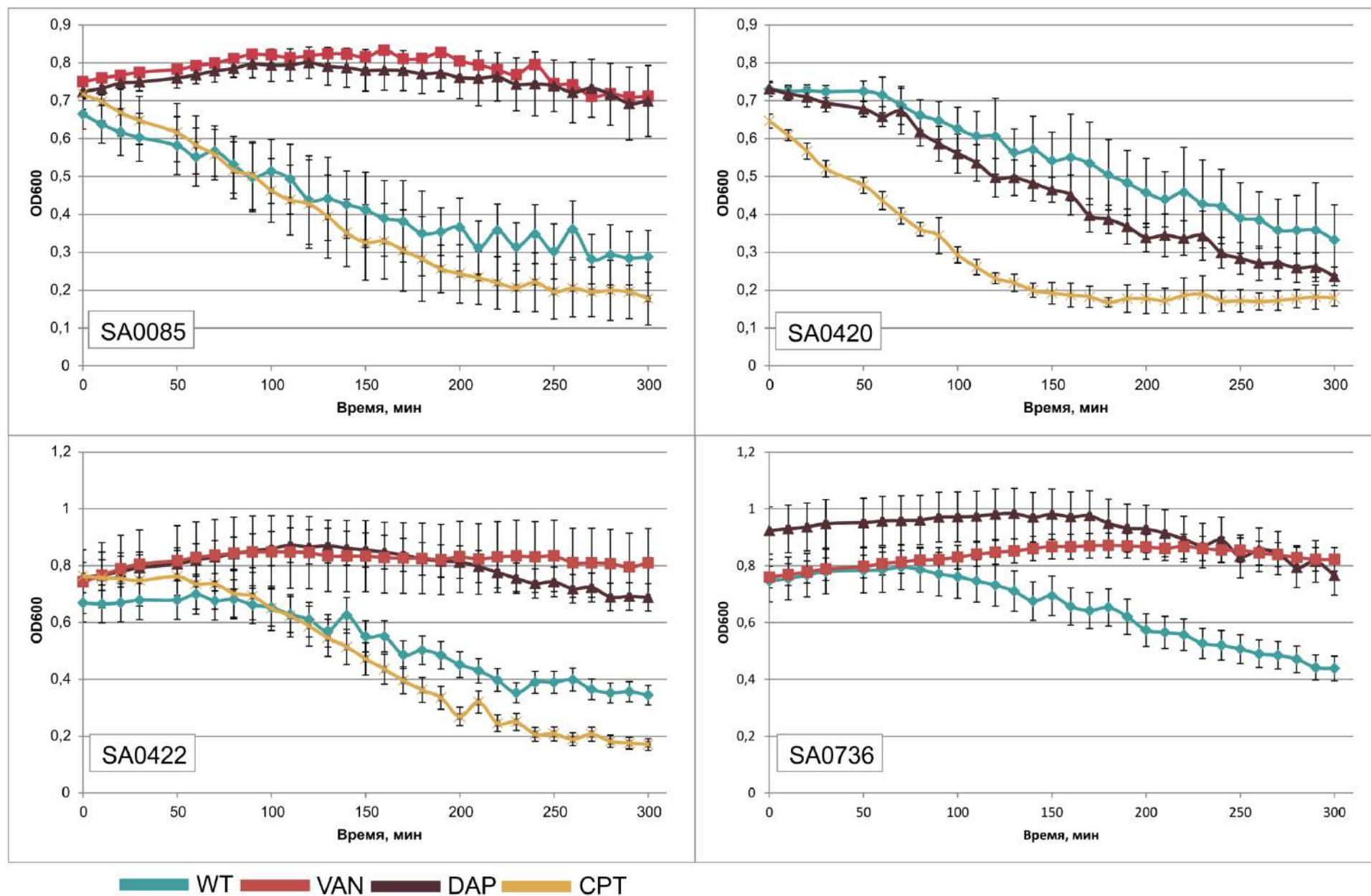
По полученным данным было установлено, что мутанты разных генетических линий (ST8, ST239, ST228), устойчивые к цефтаролину, характеризовались отсутствием или незначительным увеличением индуцированной аутолитической активностью. В частности, если для штаммов до селекции (контроль) процент лизированных клеток составлял 51 – 66%, то для устойчивых к цефтаролину мутантов эта пропорция возрастала до 66 – 77%, за исключением штамма MSSA SA0937, который характеризовался снижением аутолизиса (Таблица 34). Обратный эффект наблюдался для мутантов, устойчивых к ванкомицину и даптомицину. Так, мутанты, устойчивые к действию ванкомицина, характеризовались практически отсутствием индуцированной аутолитической активности (аутолизис 0 – 9%), у даптомицин-устойчивых мутантов отмечалось наличие от 0 до 30% лизированных клеток. Исключением из этого был даптомицин-устойчивый мутант SA0420, после селекции на даптомицине аутолизис которого наоборот увеличивался (68% лизированных клеток после 5-ти часов инкубации). Динамика изменения индуцированной аутолитической активности представлены на рис. 45.

Таблица 34 – Оценка индуцированной аутолитической активности у штаммов после селекции на цефтаролине, ванкомицине и даптомицине (% лизированных клеток после 5 часов инкубации)

Штамм	Генотип	До селекции	Мутанты		
			CPT	VAN	DAP
SA0077	ST8	66±10,4	76,1±6	9,5±6,5*	30,6±13,1*
SA0085	ST239	58±16	75,5±8,7	5±4*	0*
SA0422	ST8	52±17	77,6±5	0*	0*
SA0420	ST239	54,4±12,6	72,2±4	НД	67,7±3,7
SA0146	ST228	51±11,3	66±13,5	НД	НД
SA0937	ST97	55,8±10	35±6*	НД	НД
SA0736	ST8	41,4±10	НД	0*	0*
ATCC29213	ST5	68,6±12,6	НД	0*	0*

Примечание: НД – нет данных; CPT – цефтаролин, VAN – ванкомицин, DAP – даптомицин; * - статистически достоверные изменения ($p < 0,001$).

Аутолиз – важнейший процесс в физиологии клеточной стенки бактерий, являющийся противоположным механизмом относительно биосинтеза пептидогликана. Амидазы и мурамидазы, два типа стафилококковых аутолизинов, которые участвуют в аутолизе и обычно играют роль в поддержании гомеостаза пептидогликана, контролируют элиминацию слоев зрелого пептидогликана на протяжении всего жизненного цикла клетки. Многие исследования показывали, что формирование устойчивости к ванкомицину часто связаны с устойчивостью к индуцированному аутолизу [440, 447]. Более того, данный процесс рассматривается как один из биологических маркеров, связанных с фенотипами VISA/hVISA. Вследствие подавления аутолизинов и снижения лизирующей активности у VISA/hVISA штаммов ванкомицин может не достигать своей мишени действия из-за утолщения клеточной стенки. В настоящей работе было показано, что и даптомицин-устойчивые штаммы демонстрировали снижение аутолитической активности, что указывает на то, что регулон клеточной стенки также участвует и в устойчивости к даптомицину. Напротив, воздействие цефтаролином за некоторым исключением (штамм MSSA SA0937) не влияет на изменение аутолитической активности. Воздействие бета-лактамами также не приводит к существенным изменениям в индуцированной аутолитической активности.



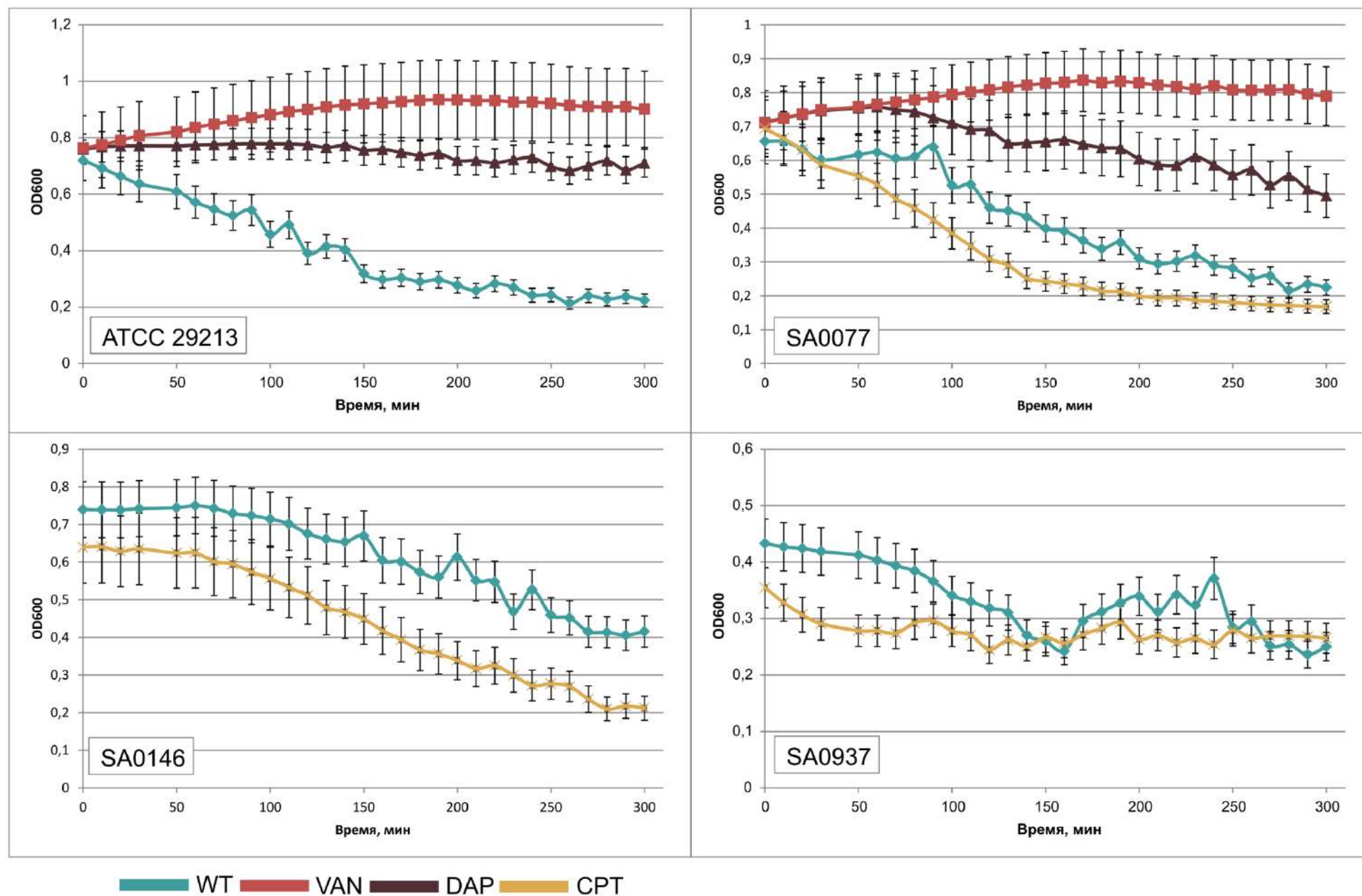


Рисунок 45 – Оценка индуцированной аутолитической активности в динамике при измерении OD_{600} у мутантов MRSA разных генетических линий, устойчивых к цефтаролину (CPT), ванкомицину (VAN) и даптомицину (DAP) при сравнении с родительскими штаммами (WT).

6.2. Селекция под воздействием шоковых концентраций антимикробных препаратов

6.2.1. Селекция под воздействием шоковых концентраций ванкомицина: формирование гетерорезистентности

Основные результаты этого раздела были опубликованы в работе [448]. Была проведена оценка доли выживших клеток после воздействия шоковых концентраций ванкомицина (50 мкг/мл). Следует отметить, что ванкомицин характеризуется медленным киллингом. И в этой связи данный антибиотик может рассматриваться как бактериостатический, нежели чем бактерицидный в отношении действия против *S. aureus*. Особенно это актуально в таком низком временном диапазоне воздействия как 5 часов. Поэтому для некоторых штаммов, включенных в исследование, доля клеток после воздействия ванкомицином была даже выше по сравнению с начальным уровнем (увеличение клеточной биомассы). В среднем на протяжении всех 10-ти циклов количество выживших клеток либо не изменялось (100%), либо сокращалось до 70%. Обращает на себя внимание, что после 5 цикла селекции колебания разброса доли выживших клеток были незначительными между изучаемыми штаммами (рис. 46). Вероятно, на данном этапе происходило формирование специфических субклонов, проявляющих сходный «генетический ответ» на воздействие ванкомицином. Все полученные мутанты характеризовались повышением МПК гликопептидов. Так, диапазон МПК ванкомицина и тейкопланина у изолятов до воздействия составлял 0,5 – 2 мкг/мл и 0,75 – 2 мкг/мл, соответственно (Таблица 35). После селекции значения МПК для ванкомицина составили 2 мкг/мл и тейкопланина 1,5 – 3 мкг/мл. Уровень МПК даптомицина менялся с 0,25 – 1 мкг/мл до 0,25 - 2 мкг/мл после воздействия. По результатам РАР-анализа отмечалось увеличение параметра площади под кривой (рис. 47). Для штаммов до селекции максимальная ингибирующая концентрация в РАР-анализе составляла 3 мкг/мл, после селекции отмечался рост на более высоких концентрациях 4 – 8 мкг/мл.

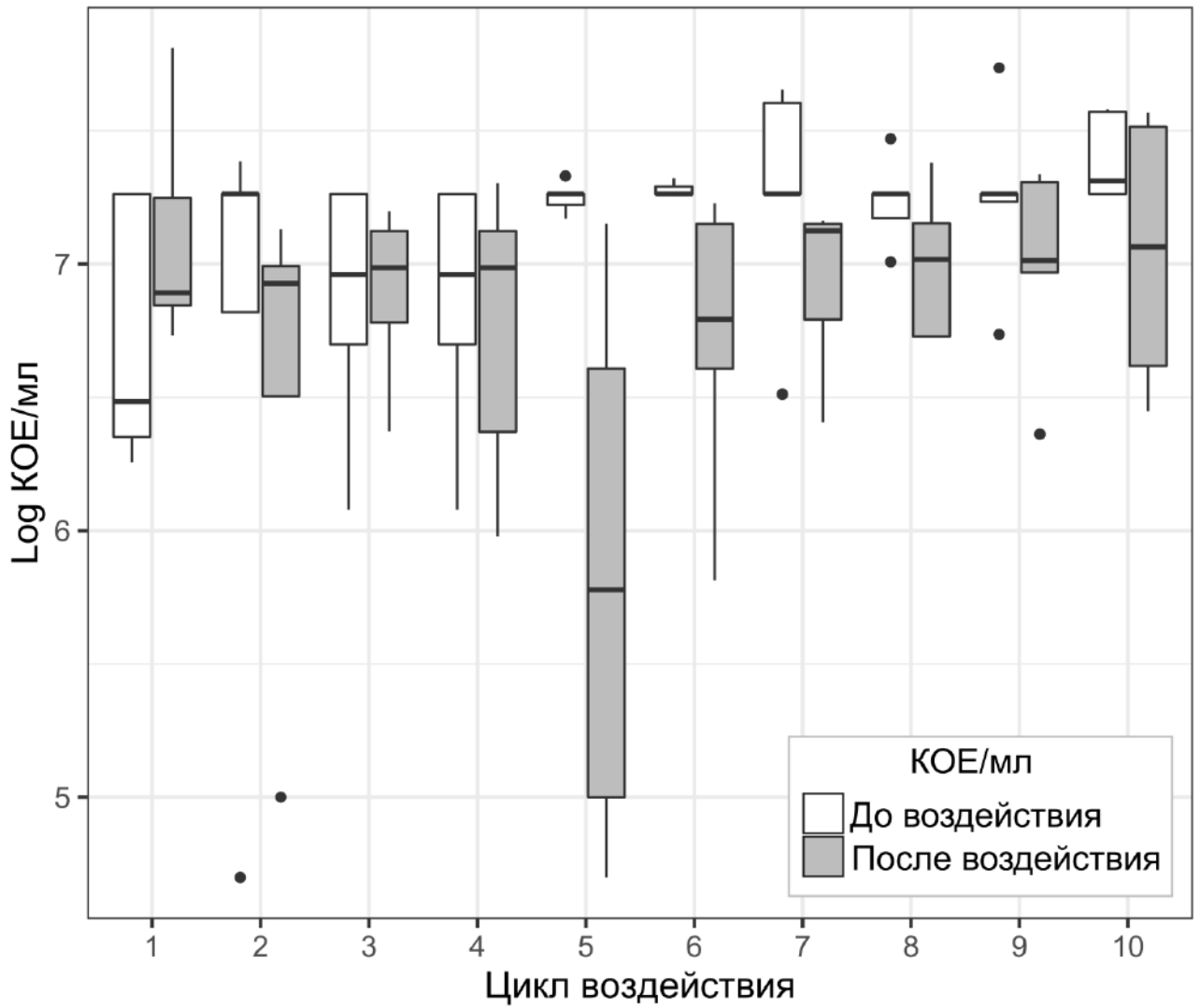


Рисунок 46 – Влияние шоковых концентраций ванкомицина (50 мкг/мл) на чувствительные штаммы *S. aureus* в течение 10 циклов воздействия; представлено соотношение клеток (КОЕ/мл) до и после каждого цикла воздействия (медиана и межквартильный интервал).

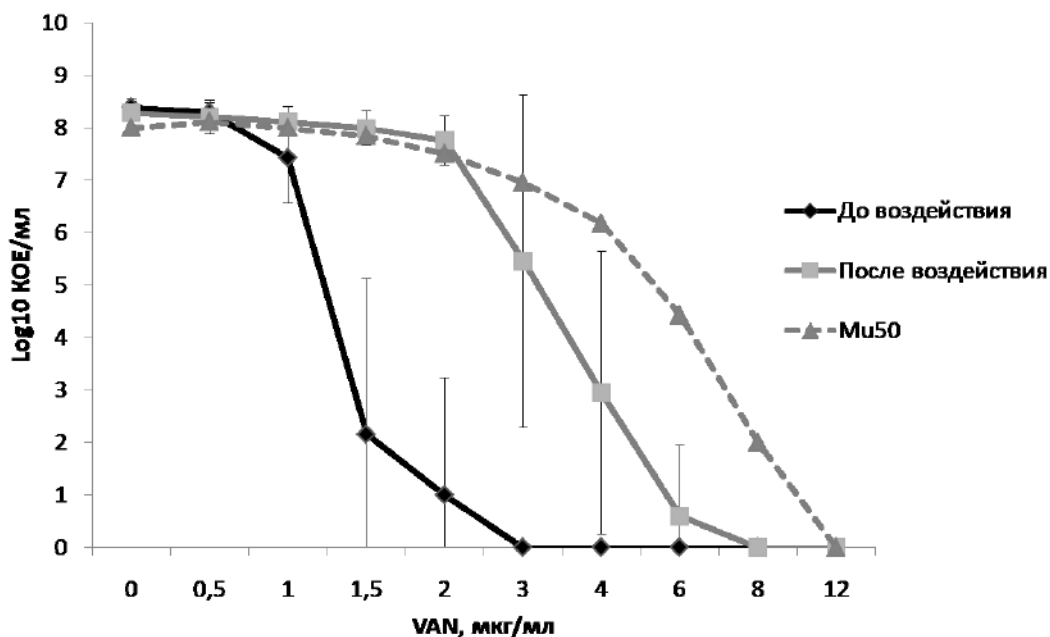


Рисунок 47 – PАР-анализ с ванкомицином (VAN). Представлены средние значения популяционного анализа по пяти изолятам до и после воздействия ванкомицином (50 мкг/мл). Рисунок использовался в работе [448].

Для всех изолятов было характерно увеличение параметра PАР/AUC с $0,42 \pm 0,1$ до $0,82 \pm 0,13$ ($p < 0,05$). Штаммы SA0077, SA0085 и SA0422 характеризовались гетерорезистентным фенотипом по параметру PАР/AUC при сравнении с контрольным штаммом Mu50.

Таблица 35 – Фенотипические изменения у изолятов после воздействия шоковыми концентрациями ванкомицина

Изоляты	До воздействия				После воздействия				
	МПК, мкг/мл			PАР/AUC	МПК, мкг/мл			PАР/AUC	Мутации*
	VAN	TEC	DAP		VAN	TEC	DAP		
ATCC29213	0,5	0,75	0,25	0,36 (V)	2	1,5	0,25	0,62 (V)	T188S
SA0077	2	2	0,5	0,56 (V)	2	3	1	0,93 (H)	D235N
SA0085	1	1	0,25	0,45 (V)	2	2	0,25	0,92 (H)	E261V
SA0422	2	2	1	0,38 (V)	2	3	2	0,88 (H)	V380I
SA0736	1	1,5	0,5	0,33 (V)	2	2	1	0,75 (V)	G223D

Примечание: VAN – ванкомицин; TEC – тейкопланин; DAP – даптомицин, PАР/AUC – в скобках представлены интерпретации PАР – анализа, V- VSSA, H – гетерорезистентность,

фенотип VISA. * - жирным шрифтом выделены ранее не описываемые аминокислотные замены. Таблица использовалась в работе [448].

6.2.1.1. Генотипические изменения

После селекции у всех изолятов были обнаружены миссенс-мутации в ключевом гене *walk*. Ген *walk* входит в важнейшую гистидин-киназную двух компонентную систему *walkR*, принимающую участие в регуляции метаболизма и биосинтеза клеточной стенки у *S. aureus* [449]. Мутации в генах системы *walkR* ассоциированы со снижением чувствительности к гликопептидам и даптомицину [450]. Мутации у изучаемых штаммов детектировались в одном домене гена *walk* (Таблица 36): V380I (штамм SA0422), G223D (SA0736), D235N (SA0077), E261V (SA0085) и T188S (ATCC 29213). У штамма ATCC29213 были обнаружены уникальные мутации в генах генерального метаболизма (*gluD*), а также в нескольких генах с неизвестной функцией. Делеция (138 нуклеотидов) была обнаружена в гене – предполагаемого специфического транспортера гистидина. При анализе баз данных, а также опубликованных работ по изучению устойчивости к ванкомицину, не было обнаружено каких-либо данных о связи этого гена с формированием устойчивости. Следовательно, этот ген может рассматриваться как потенциальная новая детерминанта устойчивости. Дополнительно были обнаружены мутации в других генах с неизвестной функцией, которые также возможно могут играть роль в формировании устойчивости к гликопептидам. Другой интересной находкой стало обнаружение мутации в гене *rlmN*. Это специфическая метилаза, участвующая в ауто-метиляции 23S рРНК и тРНК и соответственно участвующая в регуляции транскрипции. Мутации в *rlmN* могут приводить к снижению чувствительности к линезолиду [451], появлению персистентных SCV форм [452] и *in vivo* формированию VISA фенотипов [453]. У штамма SA0085, помимо мутаций в *pbp4* и *walk*, были обнаружены нуклеотидные замены в генах с неизвестной функцией. У штамма SA0736 была обнаружена гетеромутация (G209V) в регуляторном гене *graS*. Данный регуляторный ген является маркерным относительно снижения чувствительности к гликопептидам, по-видимому, минорная популяция, которая вошла в секвенирование (8% ридов) обладает фенотипом с высоким уровнем устойчивости к ванкомицину. Еще одна мутация была обнаружена в гене генерального метаболизма (*dgkA*). У штамма SA0422 обнаружена мутация в гене с неизвестной функцией. Наибольшее количество гетеромутаций было идентифицировано у штамма SA0077.

Таблица 36 – Анализ мутационных событий после 10 циклов воздействия шоковыми концентрациями ванкомицина

Метаболический путь	Ген, белок или система	Мутации	Производные штаммы					Другие варианты селекции**
			77	422	736	85	ATCC	
Биосинтез клеточной стенки	CW-regulator, WalK	V380I (<u>G</u> TT→ <u>A</u> TT)		100				VAN и DAP селекция
	CW-regulator, WalK	G223D (<u>G</u> GT→ <u>G</u> AT)			100			VAN селекция
	CW-regulator, WalK	D235N (<u>G</u> AT→ <u>A</u> AT)	100					VAN селекция
	CW-regulator, WalK	E261V (<u>G</u> AG→ <u>G</u> TG)				100		VAN селекция
	CW-regulator, WalK	T188S (<u>A</u> CA→ <u>T</u> CA)					100	
	D-Ala-D-Ala carboxypeptidase, pbp4	S137P (<u>T</u> CT→ <u>C</u> CT)				100		CPT селекция
	Sensor histidine kinase, GraS	G209V (<u>G</u> GT→ <u>G</u> TT)			8			
Метаболизм аминокислот	Serine hydroxymethyl transferase, glyA	E349G (<u>G</u> AA→ <u>G</u> GA)	100					
Метаболизм ДНК	Type I restriction-modification system, hsdM	E36Q (<u>G</u> AA→ <u>C</u> AA)	48					CPT селекция
	DNA mismatch repair protein MutL	DEL Δ1 bp coding (1028/2010 nt)	100					
Генеральный метаболизм	Sulfur carrier protein FdhD	A83V (<u>G</u> CC→ <u>G</u> TC)	8,2					
	Acetolactate synthase large subunit, ilvB	G435E (<u>G</u> GA→ <u>G</u> AA)	81					
	Putative Diacylglycerol kinase, dgkA	A80T (<u>G</u> CT→ <u>A</u> CT)	5					
	Putative Diacylglycerol kinase, dgkA	A88T (<u>G</u> CT→ <u>A</u> CT)	80					
	Putative Diacylglycerol kinase, dgkA	L92R (<u>C</u> TT→ <u>C</u> GT)			100			
	Glutamate synthase small subunit, gltD	F219L (<u>T</u> TC→ <u>T</u> TG)					100	
Метаболизм гистидина	Amino acid transporter	DEL Δ138 bp					100	
Токсин-антитоксин модуль	Putative antitoxin, YezG	T2N (<u>A</u> CT→ <u>A</u> AT)	7,5					
Модификация РНК	RNA methyltransferase, RlmN	D19Y (<u>G</u> AT→ <u>T</u> AT)					100	

Белок SOS-ответа	S1 RNA-binding domain protein	H45R (C <u>A</u> T→C <u>G</u> T)	8,5					
Транспорт сахаров	Phosphocarrier protein Hpr, ptsH	L35S (T <u>A</u> A→T <u>C</u> A)	78					
Транскрипционный регулятор	MarR family transcriptional regulatory protein	R59C (C <u>G</u> C→T <u>G</u> C)	25					
Белки с неизвестной функцией	Hypothetical protein	A101T (G <u>C</u> T→A <u>C</u> T)		100				
	Putative haloacid dehalogenase-like hydrolase	T247I (A <u>C</u> A→A <u>T</u> A)				5		
	Hypothetical protein	A60T (G <u>C</u> A→A <u>C</u> A)					100	
	Putative integral membrane protein	DEL Δ4 bp					100	
	Hypothetical protein	Q23* (C <u>A</u> A→T <u>A</u> A)	13					
	Hypothetical protein	V84E (G <u>T</u> A→G <u>A</u> A)						100

Примечание: * - для каждого штамма при выравнивании на референс последовательность рассчитан % ридов (глубина) с определенной мутацией. 95 - 100% считали как гомомутации, 5 - 94% считали как гетеромутации. В данном анализе не учитывались мутации в межгенных областях, промоторах, синонимичные мутации также были исключены. ** - отмечены гены, мутации в которых были идентифицированы при других вариантах селекции на ванкомицине (VAN), даптомицине (DAP) и цефтаролине (CPT). CW-regulator – регулятор биосинтеза компонентов клеточной стенки (Cell wall, CW).

Гетеромутации были выявлены в генах генерального метаболизма, в частности, в универсальном переносчике серы (FdhD), в одном из генов биосинтеза изолейцина (IlvB), двойная мутация – в гене *dgkA*, предположительно участвующем в глицерофосфолипидном метаболизме. Стоит отметить, что мутация в этом гене также была идентифицирована у штамма SA0736. Мутации в генах, затрагивающие фосфолипидный обмен, могут обуславливать снижение чувствительности к антибиотикам, действующим на цитоплазматическую мембрану, в частности, даптомицину. Другие гетеромутации были детектированы в гене универсального переносчика остатков сахаров (*ptsH*), гене универсального стресс-ответа (general stress protein 13, *gsp13*) и транскрипционном регуляторе семейства MarR. Штамм SA0077 по генотипическим характеристикам может рассматриваться как толерантный фенотип, поскольку характеризуется значительным количеством гетеромутаций, и многие из них охватывают гены SOS-ответа, регуляторные гены и систему токсин-антитоксин.

6.2.1.2. Заключение по разделу: влияние высоких концентраций ванкомицина на формирование гетерорезистентности

Субингибирующие концентрации антибиотиков способствуют формированию устойчивости к разным антимикробным препаратам, в том числе и к гликопептидам [454]. Формирование устойчивости к ванкомицину при циклическом воздействии высоких концентраций ранее не оценивалось. При таком варианте селекции вся исходная популяция подвергается воздействию антибиотика, и далее вся выжившая популяция восстанавливается при культивировании в среде без антибиотика. В таком случае возрастает возможность выявления мутаций, поскольку в количественном отношении популяция, которая пережила воздействие антибиотиком, содержит большее количество мутантных клонов. Высокие концентрации антибиотика способствуют гибели подавляющей части популяции и являются мощным стимулом для положительного эволюционного отбора [262]. Используемая концентрация ванкомицина (50 мкг/мл) сопоставима с максимальной сывороточной концентрацией (20 – 40 мкг/мл) при стандартном введении [455]. Таким образом, это частично воспроизводит фармакодинамику ванкомицина и частично моделирует возможное формирование устойчивости при проведении терапии. Гетерорезистентность была выявлена у подавляющего большинства анализируемых штаммов.

По результатам исследования, у всех производных штаммов были выявлены мутации в гене *walK*. Данный регуляторный ген ассоциирован с устойчивостью к ванкомицину и многие аминокислотные замены достаточно хорошо изучены. Одна из первых описанных мутаций в

положении V380I была обнаружена у клинического изолята VISA [456]. Но, наиболее часто встречающийся вариант замены в WalK – это G223D [440, 457]. Аминокислотные замены в положениях D235N, E261V и T188S, выявленные в настоящем исследовании, ранее не описывались, однако они локализованы в функциональных доменах [440] и по всей видимости могут влиять на изменение МПК ванкомицина. После воздействия шоковыми концентрациями, производные штаммы демонстрировали увеличение МПК даптомицина, что предполагает наличие параллельного механизма, обуславливающего формирование устойчивости к двум антибиотикам. Это подтверждается другими клиническими и экспериментальными исследованиями [439, 458]. При данной стратегии селекции обнаруживались преимущественно новые мутации, по сравнению с ранее проведенными 40 пассажами на антибиотиках. Однако для некоторых штаммов были исключения. Помимо перекрестных мутаций в гене *walK* была обнаружена мутация у штамма SA0085 в гене белка RBP4 (S137P), в этом же домене RBP4 ранее была обнаружена мутация N138I при селекции на цефтаролине. Гетеромутация в гене *hsdM* (метилаза, часть системы рестрикции-модификации у *S. aureus*) была обнаружена как при селекции на цефтаролине, так и при шоковых воздействиях ванкомицина у штамма SA0077.

Таким образом, VISA фенотипы могут формироваться при воздействии шоковыми концентрациями ванкомицина, при этом чувствительность, определенная методом серийных разведений, изменяется незначительно. Основными молекулярными маркерами, ассоциированными с формированием гетерорезистентности являются мутации в *WalK* [448].

6.2.2. Селекция под воздействием шоковых концентраций ципрофлоксацина: формирование толерантности

При селекции на ципрофлоксацине не было выявлено устойчивости к фторхинолонам (левофлоксацину, моксифлоксацину, ципрофлоксацину). Так, для всех изолятов на протяжении всех циклов селекции уровень МПК к ципрофлоксацину и левофлоксацину находился в диапазоне 0,25 – 0,5 мкг/мл (0,03 – 0,06 для моксифлоксацина). Данный показатель не отличался от уровня МПК фторхинолонов для штаммов до селекции. В ходе 10 циклов воздействия ципрофлоксацином (рис. 48) к 4 – 6 циклу отмечалось снижение эффекта киллинга с 0,1 - 1% живых клеток (что соответствует $10^2 - 10^3$ КОЕ/мл) до 10 – 100% ($10^7 - 10^8$ КОЕ/мл).

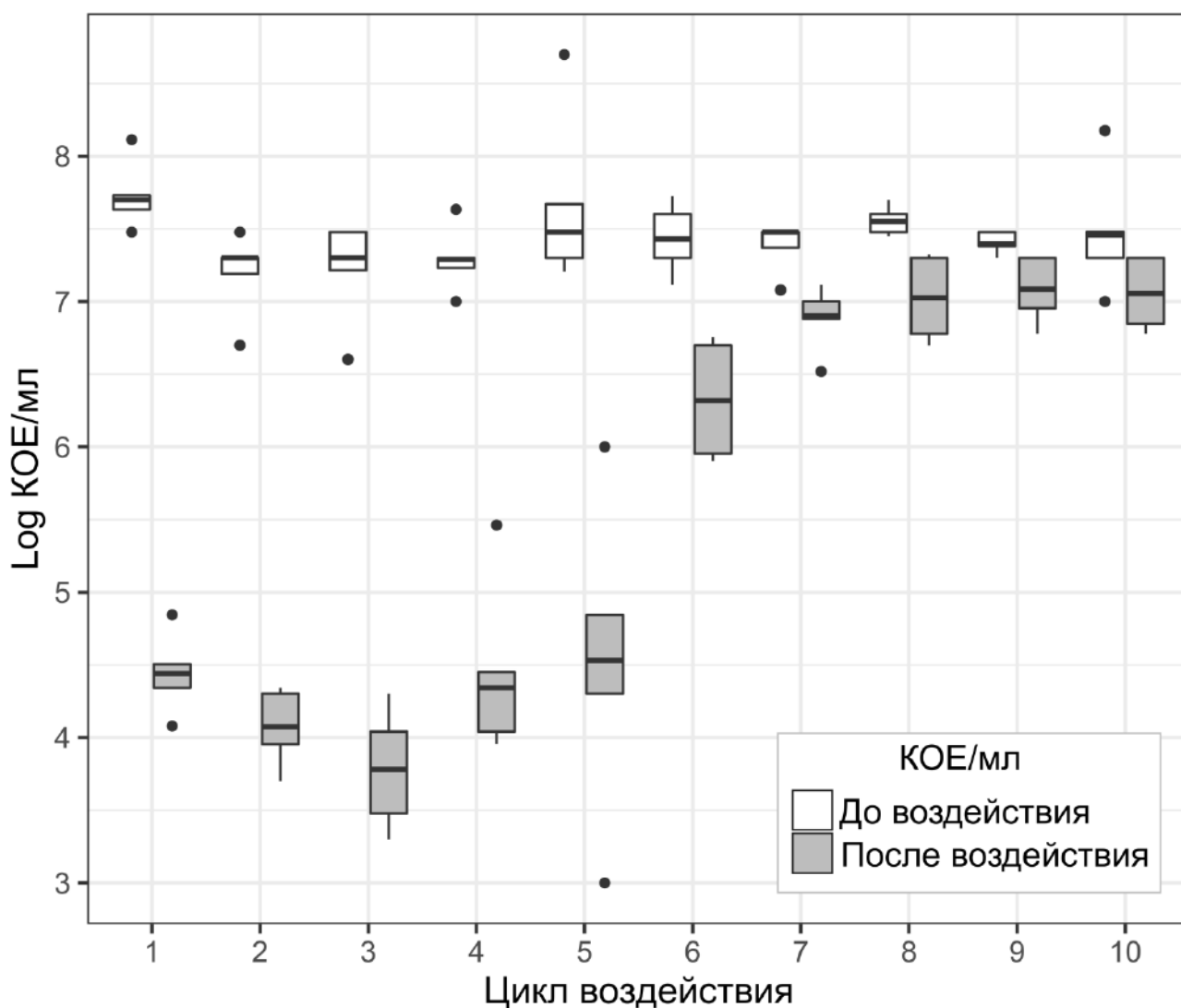


Рисунок 48 – Влияние шоковых концентраций ципрофлоксацина (16 мкг/мл) на чувствительные штаммы *S. aureus* в течение 10 циклов воздействия; представлено соотношение клеток (КОЕ/мл) до и после каждого цикла воздействия (медиана и межквартильный интервал).

Таким образом, к 6 – 10 циклу воздействия шоковой концентрацией ципрофлоксацина, доля выживших клеток после 6-ти часовой экспозиции практически оставалась такой же, как и до воздействия. Отсутствие появления устойчивости (и увеличения МПК) при увеличении периода времени, необходимого для эффективного киллинга, позволяет отнести полученные фенотипы к антибиотикотолерантным. При оценке ростовых характеристик не было выявлено статистически значимых изменений в ЛАГ-фазе роста, времени удвоения клеток и относительной скорости роста.

У штаммов после селекции не было выявлено мутаций, ассоциированных с резистентностью к фторхинолонам, а именно в генах ДНК-гираз (*gyrAB*) и ДНК-топоизомераз (*parCE*). Общее количество выявленных мутаций было значительно меньше, по сравнению, со ступенчатой селекцией резистентности, и при воздействии шокowymi концентрациями ванкомицина. У всех штаммов после селекции были выявлены различные варианты аминокислотных замен (V173D, I162N, F126S, M76K, Y79S, G44D) в пептидил-тРНК-гидролазе (Pth), участвующей в процессе трансляции белка (Таблица 37). Данный фермент катализирует отщепление аминокислоты от нагруженной молекулы т-РНК в процессе наращивания пептидной цепи в рибосоме. Также было выявлено, что формирование мутаций происходит через гетероклональные популяции. Например, у штамма ATCC 29213 после 6-го цикла воздействия было выявлено только 70% ридов с мутацией M76K в Pth, а к 10-му циклу селекции мутация закрепилась в клеточной популяции (100% ридов). У штамма SA0707, помимо мутации в *pth*, выявлена делеция (126 п.н.) в гене, кодирующем гипотетический протеин SACOL2260 (локус в референс-геноме *S. aureus* COL). Локус SACOL2260 (533 п.н.) характеризуется низкой консервативностью и локализован между геном, кодирующим транскрипционный регулятор SarV, и геном *moaA*, продукт которого участвует в метаболизме молибдена. Еще одна мутация F37L выявлена в *epi*-локусе (ген *epiE*), кодирующем стафилококковый лантибиотик – эпидермин [459]. У штамма SA1037 также выявлены дополнительные мутации: в гене SACOL1814, кодирующем лизофосфолипазу (метаболизм глицерола и биосинтез мембранных фосфолипидов [460]); в гипотетическом мембранном гене SACOL0865, который локализован в участке генов с неизвестными функциями, часть из которых имеют профаговые домены. Еще одна мутация выявлена в промоторной области (в положении –274) гена *ebh*, кодирующего гигантский поверхностный белок (10498 а.к.), связывающий внеклеточный матрикс и участвующий в неспецифической адгезии *S. aureus*, вирулентности и биогенезе клеточной стенки [461].

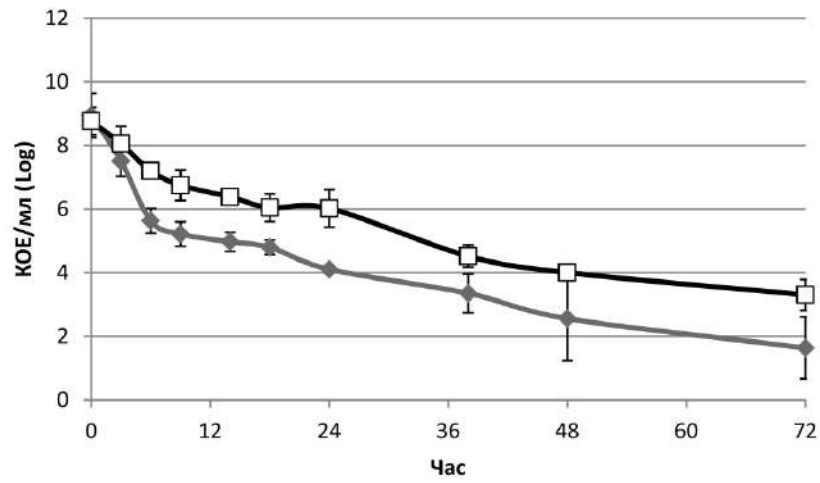
Таблица 37 – Мутационные события у штаммов после воздействия шокowymi концентрациями ципрофлоксацина

Штамм после селекции	Мутации	Ген, локус
ATCC 29213	M76K (ATG→AAG)	Peptidyl-tRNA hydrolase, <i>pth</i>
	F126S (TTT→TCT)	
SA0937	Y79S (TAC→TCC)	Peptidyl-tRNA hydrolase, <i>pth</i>
SA0707	Δ126 п.н.	Hypothetical protein SACOL2260
	F37L	Epidermin immunity protein, <i>epiE</i> (SACOL1872)
	G44D (GGT→GAT)	Peptidyl-tRNA hydrolase, <i>pth</i>
	M76K (ATG→AAG)	
SA1037	I162N (ATC→AAC)	Peptidyl-tRNA hydrolase, <i>pth</i>
	Y78H	Hypothetical protein (SACOL0865)
	A28T (GCA→ACA)	Lysophospholipase (EC 3.1.1.5), SACOL1814
	G→T promoter	<i>ebh</i> , SACOL1472

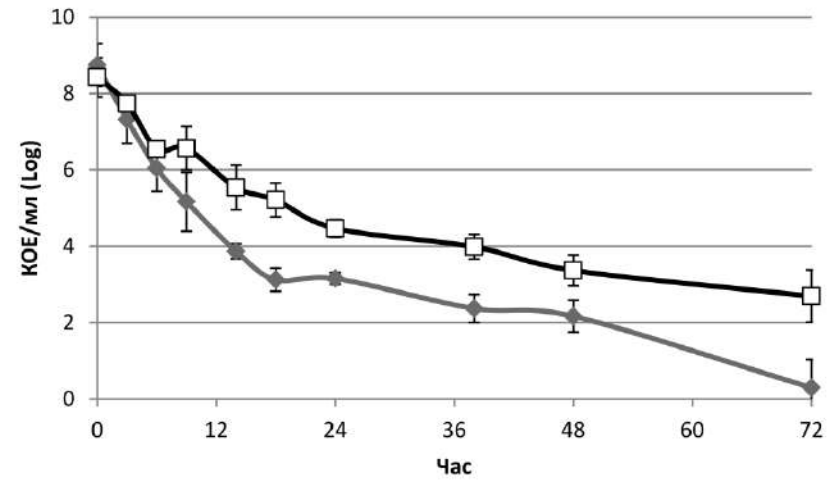
6.2.2.1. Оценка кросс-толерантности после воздействия шокowymi концентрациями ципрофлоксацина

При оценке кривых в 72-часовых опытах «time – killing» было выявлено увеличение продолжительности времени, необходимого для 99% киллинга клеточной популяции бактерицидными антибиотиками: фторхинолонами, ванкомицином, даптомицином и бета-лактамами. На рис. 49 представлены кривые (медиана значений и стандартное отклонение) полученные для всех включенных в исследование штаммов (до и после селекции). На рис. 50 представлены данные изменения параметра MDK_{99,99}. Так, для всех фторхинолонов наблюдалось увеличение MDK_{99,99} с 6 – 14 часов до 24 – 38 часов ($p < 0,01$). При этом на всем протяжении «time – killing» эксперимента (с 3 – 72 ч воздействия) для ципрофлоксацина и левофлоксацина разница между штамма до и после селекции составляла 2 – 4 log КОЕ/мл. Для моксифлоксацина эта разница составляла 3 – 5 log КОЕ/мл.

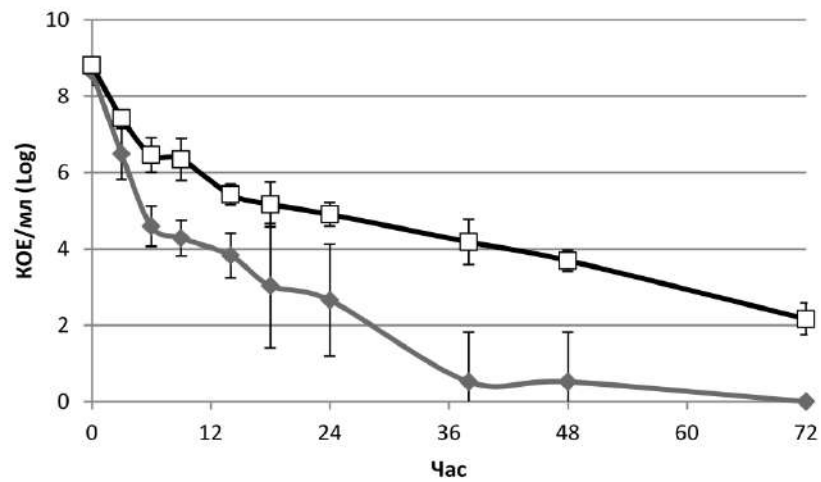
Ципрофлоксацин, 16 мкг/мл



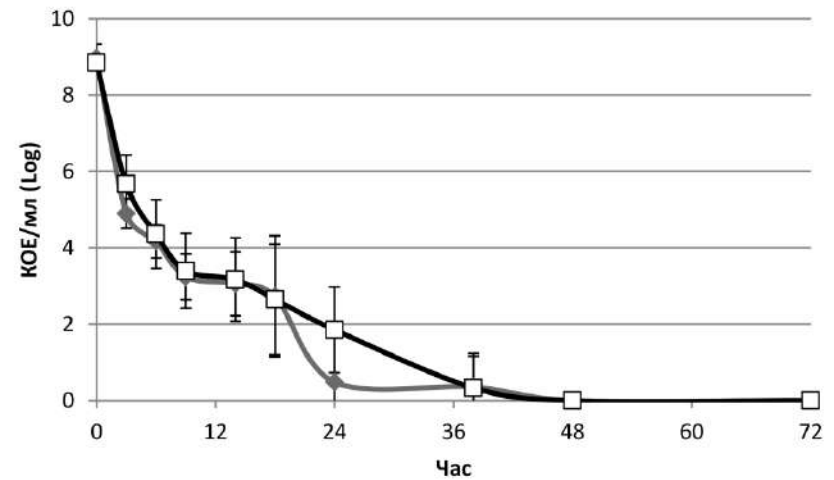
Левифлоксацин, 16 мкг/мл



Моксифлоксацин, 16 мкг/мл

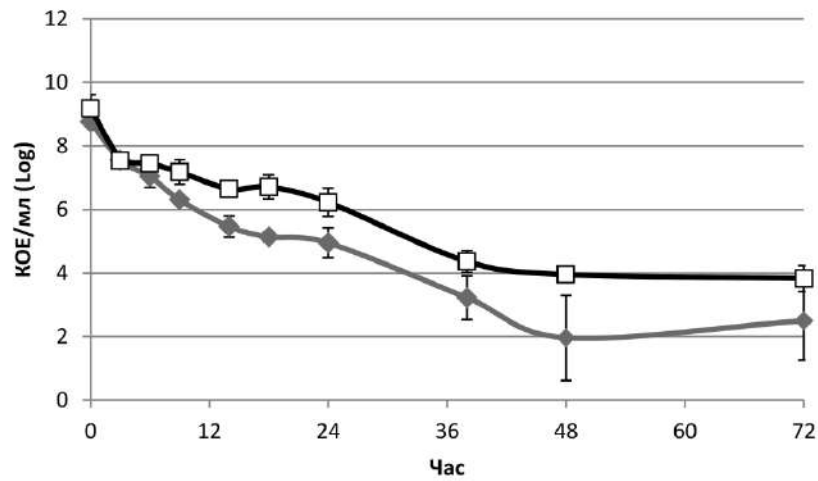


Гентамицин, 16 мкг/мл

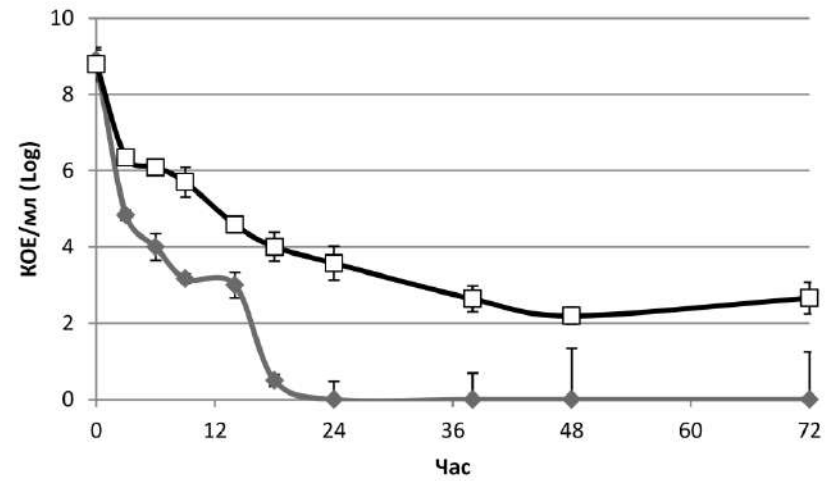


◆ До селекции □ После селекции

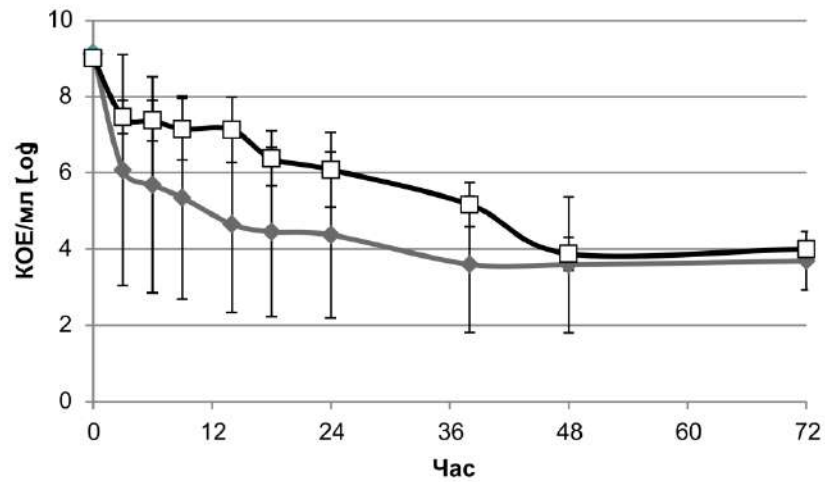
Ванкомицин, 16 мкг/мл



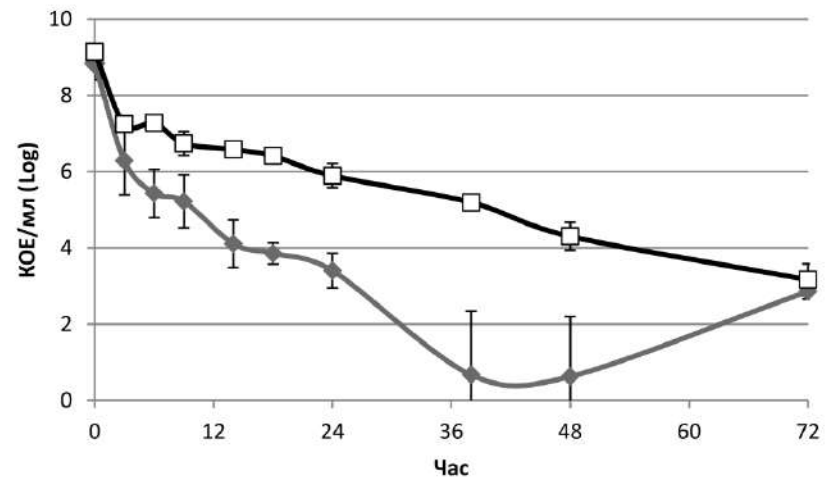
Даптомицин, 16 мкг/мл



Оксациллин, 16 мкг/мл



Цефтаролин, 16 мкг/мл



◆ До селекции □ После селекции

Рисунок 49 – Сравнение кривых в «time-killing» анализе с бактерицидными антибиотиками у штаммов до и после воздействия шокowymi концентрациями ципрофлоксацина.

Не было отмечено фазы regrowth для всех штаммов. Увеличение MDK_{99,99} с 18 – 24 часов до 38 – 48 часов было отмечено и для ванкомицина ($p < 0,01$). Наибольшей скоростью киллинга среди всех тестируемых антибиотиков характеризовался даптомицин, снижение на 4 – 5 log КОЕ/мл происходило за 3 – 6 часов для штаммов до селекции.

Селекция	АБ	Время воздействия, час									
		0	3	6	9	14	18	24	38	48	72
До	CIP	100	0,406	0,033	0,016	0,004	0,002	0,002	0,000	0,000	0,000
	LEV	100	0,194	0,022	0,006	0,001	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
	MXF	100	0,038	0,009	0,004	0,001	0,001	0,000	0,000	0,000	0,000
	VAN	100	10,333	5,389	0,200	0,217	0,021	0,003	0,000	0,000	0,000
	DAP	100	0,009	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
	GEN	100	0,012	0,008	0,002	0,002	0,002	0,000	0,000	0,000	0,000
	OXA	100	1,487	0,513	0,203	0,029	0,017	0,014	0,002	0,002	0,001
	CPT	100	1,565	0,200	0,104	0,007	0,001	0,000	0,000	0,000	0,000
После	CIP	100	3,833	2,167	0,617	0,200	0,033	0,013	0,003	0,003	0,000
	LEV	100	33,793	4,034	2,586	0,307	0,159	0,026	0,003	0,002	0,000
	MXF	100	4,762	0,214	0,200	0,030	0,030	0,018	0,004	0,002	0,000
	VAN	100	2,147	1,453	0,104	0,180	0,151	0,103	0,001	0,000	0,000
	DAP	100	0,318	0,159	0,044	0,004	0,001	0,000	0,000	0,000	0,000
	GEN	100	0,024	0,003	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
	OXA	100	3,385	2,974	2,308	2,308	0,359	0,231	0,019	0,001	0,001
	CPT	100	0,803	0,985	0,200	0,200	0,115	0,011	0,005	0,003	0,000

MDK_{99,99}
 Период времени при < MDK_{99,99}

Рисунок 50 – Результаты определения MDK_{99,99} в 72-часовом «time-killing» эксперименте для штаммов до и после воздействия шоковой концентрацией ципрофлоксацина (представлены медианы значений).

После воздействия ципрофлоксацином MDK_{99,99} увеличился до 14 – 18 часов ($p < 0,01$). Также стоит отметить, что на поздних этапах (≥ 24 часов) для штаммов до селекции было отмечено отсутствие или низкая клеточная плотность (менее 2 log КОЕ/мл) под воздействием даптомицина. Для штаммов после селекции в периоде 24-72 ч клеточная плотность была на уровне 2-3 log КОЕ/мл. Для ванкомицина и даптомицина отмечалось появление фазы regrowth. Для оксациллина (штамм SA1037 (MRSA) не был включен в эксперимент) отмечалось незначительное увеличение MDK_{99,99} с 24 – 38 часов до 38 – 48 часов ($p < 0,05$) для штаммов после селекции. При этом разница клеточной плотности в периоде 3 – 38 часов составляла 2 – 3 log КОЕ/мл с оксациллином. Более существенная разница отмечалась для цефтаролина, так MDK_{99,99} составляла 9 – 14 и 24 – 38 часов для штаммов до и после селекции, соответственно (p

< 0,01). При этом после 24 часов отмечался значимый разрыв в клеточной плотности, который составлял 2 – 4 log КОЕ/мл. После 48 часов для штаммов до селекции наблюдалась фаза regrowth. Единственный антибиотик, для которого не было выявлено значимого увеличения MDK_{99,99} был гентамицин. Кривые отмирания штаммов до и после селекции под действием гентамицина были сопоставимы, за исключением точки 24 часа, где наблюдался разрыв в 1 – 2 log КОЕ/мл. Изменение в кривых отмирания для перечисленных антибиотиков не оказывало влияния на уровень МПК, МПК других антибактериальных препаратов также не изменялась.

6.2.2.2. Заключение по разделу: оценка роли мутаций в пептидил-тРНК-гидролазе в формировании универсальной толерантности к действию бактерицидных антибиотиков

Ципрофлоксацин подавляет репликацию ДНК, связываясь с ДНК-гиразой и ДНК-топоизомеразой, к основным механизмам устойчивости можно отнести мутации в этих генах. Помимо этого, устойчивость к фторхинолонам может быть обусловлена эффлюксными механизмами, в частности, мембранными помпами NorABC. Во многих работах по селекции устойчивости к ципрофлоксацину, где использовались либо схемы ступенчатого воздействия антибиотиком, либо субингибирующих концентраций, это приводило к устойчивости, связанной с появлением мутаций в ранее упомянутых генах [462-464]. Установлено, что фторхинолоны индуцируют SOS-ответ, который в свою очередь, инициирует изменение регуляции многих компонентов бактериальной клетки, таких как вирулентность, синтез алармонов, изменение работы цикла Кребса, изменение биосинтеза клеточной стенки. В исследовании Matsuo и соавт. [465] использовали серию пересевов (отпечатков) колоний со среды после 72-часовой инкубации с ципрофлоксацином на среду без антибиотика. После 5 – 10 таких повторных пересевов были получены толерантные клетки *S. aureus*. Толерантность к фторхинолонам была определена в «time-killing» экспериментах. У толерантных штаммов были выявлены различные мутации, но чаще всего они встречались в гене *relA*, участвующем в синтезе алармонов и генах биосинтеза аминокислот, в частности, в *leuS*. Авторы провели сравнение транскриптомов и обнаружили, что выявленные изменения схожи при воздействии мупироцином, который провоцирует аминокислотное голодание, а также увеличение синтеза алармонов. Таким образом, по результатам работы [465], было сделано предположение, что стресс посредством механизма образования алармонов и нарушения трансляции ведет к толерантности. В отличие от данной работы, все штаммы, включенные в настоящее исследование имели мутации в пептидил-тРНК-гидролазе (Pth) после воздействия

ципрофлоксацином. Во-первых, это может свидетельствовать о влиянии Pth на формирование кросс-толерантности к широкому кругу бактерицидных антибиотиков. Во-вторых, фторхинолоны могут выступать индукторами кросс-антибиотикотолерантности. Фермент Pth является важным неотъемлемым компонентом при биосинтезе белка у бактерий, архей и эукариот. В этой связи он рассматривается как потенциальная мишень для разработки новых антибактериальных препаратов. Пептидил-тРНК-гидролаза (Pth) катализирует реакцию гидролитического отщепления тРНК от растущей пептидной цепи (пептидил-тРНК) [466]. Процесс накопления молекул и остатков пептидил-тРНК токсичен для бактериальной клетки и приводит к торможению и нарушению трансляции, а также дефициту свободных тРНК и аминокислот [467]. В ранних работах было продемонстрировано, что мутации в гене *pth* (в частности аминокислотная замена G101D) опосредуют изменение чувствительности к температуре у *E. coli*, вызывая гибель клеток при температуре культивирования более 39 °C [468]. В работе Khare и соавт. [469] было проведен эксперимент по циклическому кратковременному воздействию шокowymi концентрациями ципрофлоксацина и ампициллина на клетки *E. coli*. После селекции авторы выявили различные мутации в генах метаболизма аминокислот и факторах трансляции, включая Pth. При этом отмечалось, что те культуры, которые характеризовались мутациями в Pth отличались наибольшей толерантностью, отражающейся в существенном увеличении продолжительности эффективного киллинга. Мутации в Pth, вероятно, влияют на доступность свободных тРНК в клетке, что опосредует снижение точности трансляции из-за некорректного присоединения остатков аминокислот к молекулам тРНК, такое состояние аналогично аминокислотному голоданию. Такая трансляция с ошибками может привести к неоднородности популяции, клеточному стрессу с нарушением основных анаболических путей. Такие изменения характерны для персистеров, характеризующихся клеточной формой физиологического покоя. Стоит отметить, что в исследованиях Matsuo и соавт. [465] и Khare и соавт. [469] не проводилась оценка кросс-толерантности. Как отмечалось ранее (раздел 1.7) одной из важных проблем является появление универсальной толерантности к действию разных бактерицидных антибиотиков. В экспериментальной работе Bryson и соавт. [470], используя сайт-направленный мутагенез на модельном штамме *S. aureus*, было продемонстрировано, что привнесённые мутации в ген *relA* опосредовали множественную толерантность к антибиотикам различных групп (бета-лактамам, рифампицину, ванкомицину, ципрофлоксацину и триметоприму/сульфаметоксазолу). Таким образом, SOS-зависимый ответ (через синтез алармонов) инициирует множественную толерантность через изменение генерального метаболизма и трансляции. Еще один пример множественной толерантности был описан в работе Elgrail и соавт. [471]. Авторы изучали клинические изоляты *S. aureus*, выделенные у пациентов с длительно персистирующими

формами бактериемий, и обнаружили, что многие клинические изоляты характеризуются наличием мутаций в разных генах, в том числе и в ранее обсуждаемом гене – *relA*. Однако, подавляющее большинство изолятов характеризовалось наличием мутаций в гене *citZ*, кодирующем цитрат-синтазу цикла Кребса. Используя метод геномного редактирования, воссоздавая мутации в *citZ* на модельном штамме *S. aureus*, авторы обнаружили появление множественной толерантности, в частности к таким препаратам как даптомицин, ванкомицин и цефтаролин. Имеющиеся на сегодняшний день экспериментальные данные позволяют сделать вывод, что в формировании толерантности у *S. aureus* ведущую роль играют такие процессы как изменение интенсивности реакций цикла Кребса [472], SOS-ответ, изменение работы систем белков рибосом, и как следствие, торможение процесса трансляции. Однако, клиническое значение толерантности и множественной толерантности к действию антибактериальных препаратов еще требует более детальной оценки.

Таким образом, полученные данные свидетельствуют, что циклическое воздействие ципрофлоксацином приводит к появлению мутаций в эссенциальном белке Pth, участвующем в процессе трансляции. Это в свою очередь приводит к увеличению периода эффективного киллинга бактерицидными антибиотиками не только группы фторхинолонов, но и других классов. В совокупности с ранее опубликованными экспериментальными работами, можно сделать вывод о существенной роли гена *pth* в формировании универсальной (кросс-) толерантности к действию бактерицидных антибиотиков.

6.2.3. Влияние шоковых концентраций гентамицина на формирование устойчивости и мелкоколониальных фенотипов

Основные результаты данного раздела были опубликованы в работе [473]. За основу проведенного эксперимента была взята ранее использованная схема при воздействии шоковыми концентрациями ванкомицина и ципрофлоксацина. У всех штаммов, включенных в селекцию, отсутствовали аминокликозид-модифицирующие белки и МПК гентамицина, амикацина не превышало 0,5 мкг/мл и 4 мкг/мл, соответственно (Таблица 38). Количество живых клеток *S. aureus* после получения ночного инокулюма на протяжении всего эксперимента перед добавлением гентамицина было в диапазоне 7,2 – 7,5 log КОЕ/мл. Гентамицин (концентрация 16 мкг/мл) характеризовался выраженным бактерицидным действием, что выразилось в снижении КОЕ до 2,5 – 5 log КОЕ/мл, то есть происходил 99% киллинг бактериальной популяции (рис. 51). Однако такой выраженный бактерицидный эффект наблюдался только до третьего цикла воздействия. С четвертого и последующих циклов не наблюдалось отмирания клеточной биомассы, а количество живых клеток было в диапазоне от 6,6 до 7,2 log КОЕ/мл. У производного штамма SA0937 после селекции были обнаружены несколько вариантов колоний. Мелкие колонии с выраженным желтым цветом (рис. 52 – А2), очень мелкие прозрачно-беловатые колонии (рис. 52 – А3, А4) и колонии нормального размера (рис. 52 – А5), которые не отличались от родительского штамма (рис. 52 – А1). Большинство производных штаммов демонстрировали резистентность после селекции, с увеличением МПК до 8 – 64 мкг/мл к гентамицину и амикацину (Таблица 38). При постановке ДДМ у гентамицин-устойчивых производных штаммов наблюдалась двойная зона роста вокруг дисков с антибиотиками (рис. 53). Колонии, собранные из внутренней зоны также давали двойную зону роста при повторной постановке ДДМ. У производного штамма ATCC 29213 после селекции отсутствовало увеличение МПК гентамицина и амикацина, а также сохранялся большой диаметр зоны подавления роста в ДДМ. После этого была проведена оценка кинетики отмирания штамма (24-часовой эксперимент «time-killing») под воздействием гентамицина с концентрацией 16 мкг/мл. Было отмечено увеличение периода времени, необходимого для киллинга 99% клеточной популяции (MDK_{99,99}) с трех до 14 часов. Снижение на 3 – 4 log КОЕ/мл для штамма ATCC 29213 до селекции происходило за два-три часа, для производного штамма этот период времени удлинялся до 14 и более часов. Таким образом, в «time-killing» модели с гентамицином быстрый киллинг изменялся на медленный.

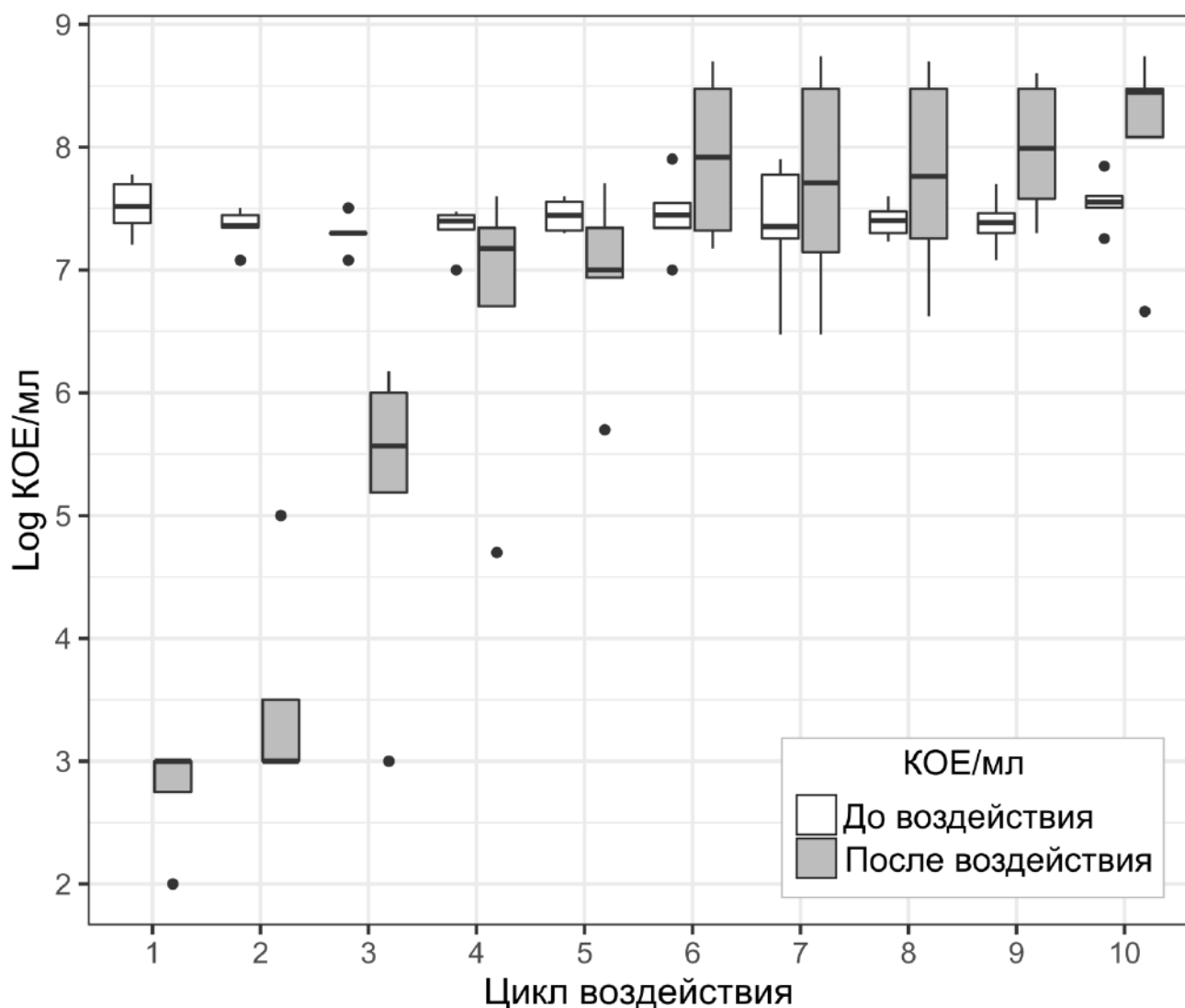


Рисунок 51 – Определение количества живых клеток *S. aureus* (log КОЕ/мл) до и после воздействия гентамицином (16 мкг/мл) в каждом цикле селекции (10 циклов). Значения представлены как М и IQR. Рисунок был использован в работе [473].

Таблица 38 – Микробиологические особенности и мутации у производных штаммов после селекции

Штаммы	До воздействия			После воздействия			Мутации	
	МПК, мкг/мл			Фен	МПК, мкг/мл			
	GEN	ACN	DAP		GEN	ACN		DAP
ATCC 29213	0,5	4	0,5		1	4	0,5	Pth (Y79S + G44D)
SA0707	0,25	4	0,25		8	16	0,25	<i>atpG</i> ($\Delta 15$ п.н.), SACOL2260 ($\Delta 126$ п.н.)
SA0937	0,5	4	0,5	Y	8	16	0,5	<i>hepS</i> ($\Delta 13$ п.н.)
				SCV	16	32	0,5	MenA (D205A, $\Delta 21$ п.н., L17*)
				N	32	64	4	MprF (P314L), <i>atpG</i> ($\Delta 19$ п.н.)
SA1037	0,5	4	0,5		64	64	0,5	<i>atpG</i> ($\Delta 15$ п.н.), <i>FusA</i> (G507S)

Примечание: GEN – гентамицин ($S \leq 2$ мкг/мл), ACN – амикацин ($S \leq 16$ мкг/мл), DAP – даптомицин ($S \leq 1$ мкг/мл); Фен – фенотипическая диссоциация штамма SA0937, Y – колонии желтого цвета, SCV – мелкоколониевые варианты, N – колонии обычного размера; Мутации, Δ – делеции, * – стоп-кодон. Таблица была использована в работе [473].

У гентамицин-устойчивых производных штаммов не было выявлено изменения уровня МПК к бета-лактамам, (липо)гликопептидам, макролидам, линкозамидам, рифампицину и другим антибиотикам. Однако, колонии нормального размера производного штамма SA0937 демонстрировали повышение МПК даптомицина до 2 и 4 мкг/мл в ГДМ и серийных разведениях, соответственно (Таблица 38, рис. 52 В1-В4). Скорость роста (ЛАГ-фаза, время удвоения клеток и относительная скорость роста) для производных штаммов не изменялась, за исключением SCV вариантов, которые практически не давали роста в жидкой среде в течение 24 часов.

Производные штаммы характеризовались наличием различных мутаций (Таблица 38). Чаще всего (у трех производных штаммов) обнаруживались делеции в гене *atpG*, кодирующим белок АТФ-синтазного комплекса. У производного штамма ATCC 29213, проявляющего толерантность, выявлены мутации в гене *pth*. В этом же гене были выявлены мутации при воздействии шокowymi концентрациями ципрофлоксацина. У желтых колоний штамма SA0937 выявлена делеция в гене *hepS*. SCV варианты производного штамма SA0937 характеризовались наличием нескольких мутаций в гене *menA*. Вариант производного штамма SA0937, имеющим нормальную морфологию колоний и проявляющий устойчивость к даптомицину, характеризовался наличием мутации R314L в MprF. К числу других генов, в которых были выявлены мутации, относились *fusA* и ген, кодирующий гипотетический протеин SACOL2260. Аналогичная делеция была выявлена при воздействии шокowymi концентрациями ципрофлоксацина. У всех штаммов до и после воздействия гентамицином не было выявлено генов, кодирующих аминокликозид-модифицирующие белки.

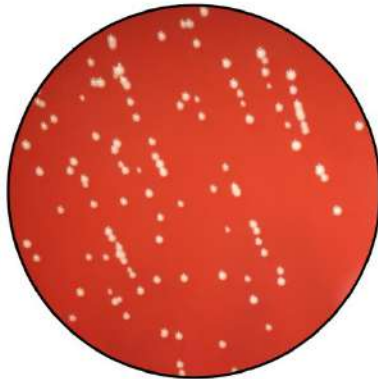
A1



A2



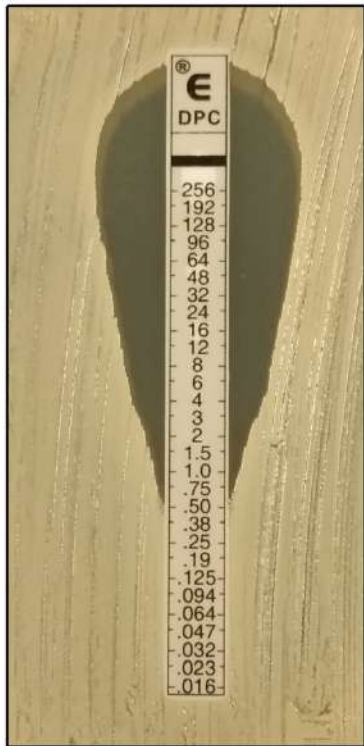
A3



A4



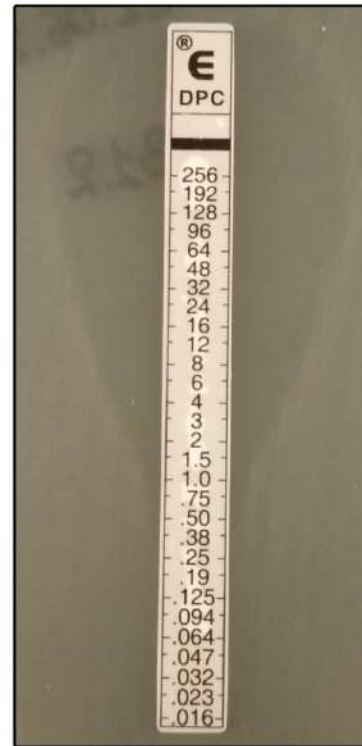
A5



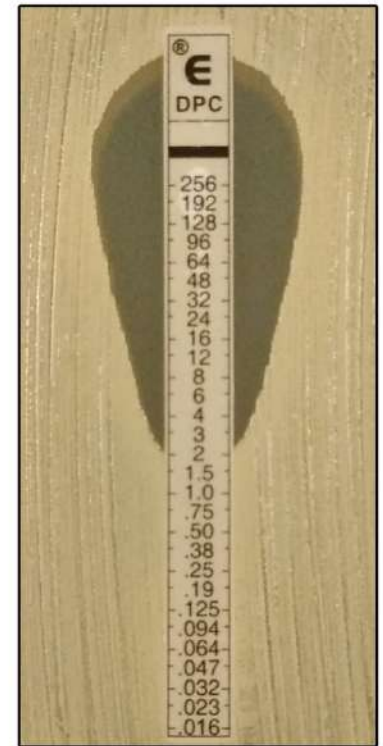
B1



B2



B3



B4

Рисунок 52 – Производный штамм SA0937 после селекции на гентамицине. Морфологические особенности роста на кровяном агаре (A): A1 – штамм до селекции, представленный колониями нормального размера; A2 – производный штамм Y, колонии желтого цвета; A3 – мелкоколониевый вариант; A4 – смешанная культура, SCV и колонии нормального размера; A5 – смешанная культура (штамм N), мелкие колонии и колонии нормального размера. Оценка чувствительности к даптомицину с использованием полосок ГДМ (B): B1 – B3, МПК < 0,75 мкг/мл (S), B4 – МПК = 2 мкг/мл (R). Рисунок был использован в работе [473].

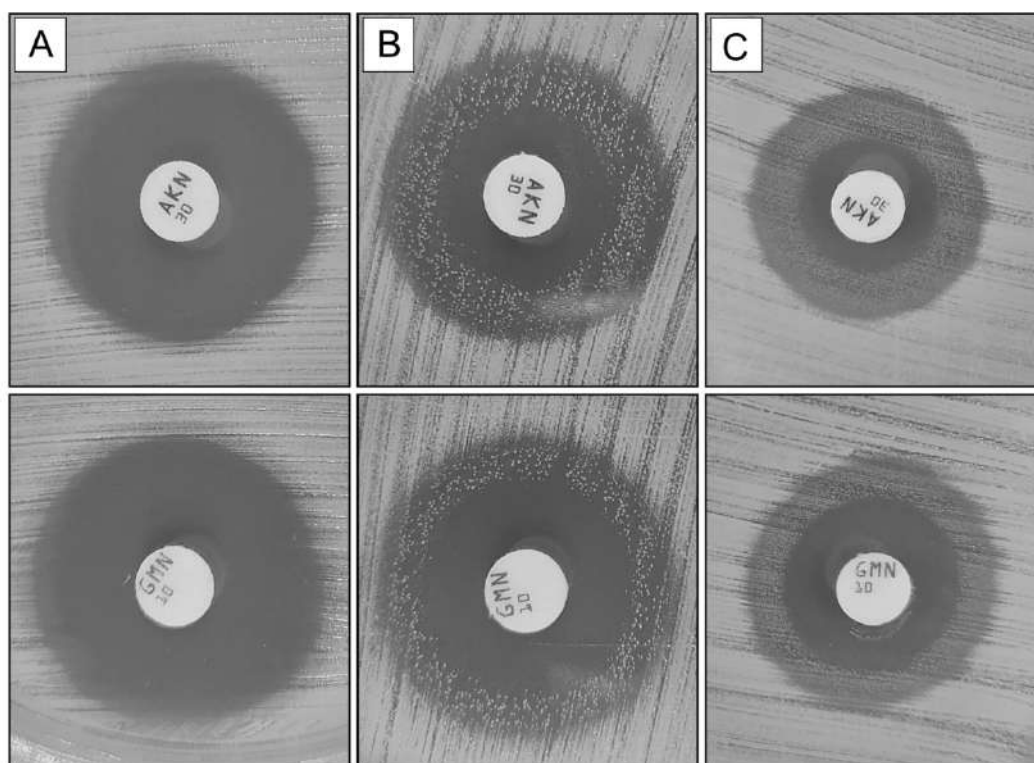


Рисунок 53 – Оценка чувствительности к даптомицину с использованием ДДМ. Диски: GMN – гентамицин, AKN – амикацин. А – штамм SA1037 до селекции; В – производный штамм после пятого цикла; С – после десятого цикла. Рисунок был использован в работе [473].

6.2.3.1. Заключение по разделу: влияние воздействия шоковых концентраций гентамицина на формирование устойчивости

Эксперименты по селекции устойчивости *in vitro* к аминогликозидам ранее проводились не однократно. Так, в одной из первых работ по изучению приобретения устойчивости, производные штаммы *S. aureus* уже после пяти пассажей на среде с канамицином, демонстрировали резистентный фенотип [474]. Как правило, в аналогичных экспериментах

используется схема множественных пересевов на среде, содержащей одну концентрацию антибиотика или на серию возрастающих концентраций антибиотика. При этом исследуемые штаммы всегда растут под воздействием агента селекции. В настоящем исследовании использовалась схема кратковременных шоковых воздействий гентамицином с фазой получения роста бактериальных культур на среде без антибиотика. Таким образом, такая схема селекции почти воспроизводит фармакодинамический процесс при терапевтическом использовании гентамицина. Параметры, которые использовались в настоящем эксперименте – это пиковая концентрация и интервал времени воздействия частично отражают фармакологические особенности гентамицина [475]. В настоящем исследовании эволюционные траектории устойчивости при таком виде селекции опосредовали формирование разных стратегий ухода от действия гентамицина – устойчивости, толерантности и появление мелкоколониальных вариантов. Толерантность была выявлена у производного штамма ATCC 29213 и была связана с появлением мутаций в гене *pth*. Аналогичным образом при воздействии ципрофлоксацином была сформирована толерантность (раздел 6.2.2). У других производных штаммов происходило формирование устойчивости за счет различных мутаций и фенотипической диссоциации. Стоит также отметить скорость появления устойчивости, уже после четвертого-пятого цикла воздействия наблюдалось увеличение уровня МПК гентамицина и амикацина. В отличие от селекции на даптомицине, ванкомицине и бета-лактамах, формирование устойчивости к гентамицину не сопровождалось снижением скорости роста у производных штаммов, за исключением мелкоколониального варианта штамма SA0937. Устойчивость к аминогликозидам у клинических изолятов *S. aureus* в большинстве случаев детерминирована наличием аминогликозид-модифицирующих ферментов, среди которых по частоте встречаемости преобладает бифункциональный белок, обладающий свойством инактивации большинства молекул антибиотиков этой группы. Помимо этого, устойчивость может быть опосредована и мутациями в некоторых системах клетки, участвующих на разных этапах во взаимодействии с молекулами антибиотика. В частности, у гентамицин-устойчивых *S. aureus* могут быть обнаружены мутации – в системе электрон-транспортной цепи (Atp), в транспортных системах (Pot и FhuA), цитохромах (Cyo) и факторе элонгации G (FusA). Мутации в генах кодирующих белки реакций клеточного дыхания и генерации молекул АТФ (гены *atp*) опосредуют устойчивость к аминогликозидам. Такой механизм описан, как у *S. aureus* [476], так и у других грамположительных и грамотрицательных бактерий [477, 478]. Нарушение работы мембранных белков, входящих в систему генерации молекул АТФ, за счет мутаций в *atp* генах может приводить также и к seesaw-эффекту: устойчивость к аминогликозидам с формированием чувствительности к полимиксину и противомикробным пептидам человека [479, 480]. В настоящем исследовании у трех производных штаммов после

воздействия гентамицином были выявлены мутации в *atpG*. Попадание молекул гентамицина в цитоплазму клетки происходит через первичный активный трансмембранный транспорт с затратой клеточной энергии АТФ, соответственно нарушение образования этих молекул приводит к нарушению транспорта гентамицина [481]. Помимо мутаций в *atpG*, на устойчивость к аминогликозидам влияют мутации в трансляционном факторе элонгации G (FusA) [482], в настоящем исследовании один производный штамм характеризовался наличием мутации в данном гене. Поскольку FusA один из факторов трансляции, входящих в рибосомальный комплекс, мутации в этом белке влияют на устойчивость к аминогликозидам. Данный механизм устойчивости описан не только у *S. aureus*, но у других микроорганизмов [483]. Появление мутаций в гене *fusA*, обуславливающих значительное повышение МПК, является одним из распространённых механизмов устойчивости к фузидиевой кислоте. Несколько сайтов в гене *fusA* с нуклеотидными заменами участвуют в устойчивости к фузидиевой кислоте, но они не пересекаются с мутациями, влияющими на устойчивость к аминогликозидам. Так, производный штамм SA1037 с мутацией в *fusA* характеризовался чувствительностью к фузидиевой кислоте.

Вследствие быстрого формирования устойчивости, как в экспериментах *in vitro*, так и *in vivo*, гентамицин не используется в монотерапии. Чаще всего применяется комбинация гентамицин + даптомицин. Данная комбинация входит в рекомендации по лечению эндокардитов, остеомиелитов [473, 484]. Синергизм этих двух антибиотиков подтверждается многими *in vitro* исследованиями, так в работе Golikova и соавт. [485] было показано, что в динамической системе при моделировании процессов РК/PD комбинации гентамицина и даптомицина не происходит формирования устойчивых субпопуляций *S. aureus*. В настоящем исследовании были получены противоположные результаты: у одного из производных штаммов на фоне воздействия гентамицином произошло формирование устойчивости к даптомицину с образованием мутации в гене белка MrgF в положении P314L. Мутации в данном положении, как было продемонстрировано ранее, ассоциированы с устойчивостью к даптомицину. По всей видимости, такое несоответствие в результатах, объясняется возможным влиянием разных генетических особенностей используемых штаммов в двух различных экспериментах.

Воздействие аминогликозидными антибиотиками и триклозаном являются доказанными триггерными механизмами, влияющими на формировании фенотипа SCV [486-488]. Клиническое значение SCV фенотипов связано с хроническими, рецидивирующими инфекциями и сложностью их диагностики и терапии [488]. В настоящем исследовании после воздействия шокowymi концентрациями гентамицина у одного штамма была выявлена мутация в маркерном гене *tenA* ассоциированном с SCV. Еще у одного производного штамма SA0937,

который сформировал желтые колонии, была выявлена мутация в гене биосинтезе менахинона *hemS* [489]. Данный ген кодирует субъединицу фермента гептапренил-дифосфат синтазы, участвующей в метаболизме менахинона. У SCV варианта производного штамма SA0937 в гене *menA* было выявлено сразу несколько мутаций. Ген *menA* кодирует 1,4-диокси-2-нафтоат пренилтрансферазу, участвующей в биосинтезе менахинона. Ауксотрофность по менахинону является одним из признаков SCV вариантов *S. aureus*. В целом на формирование SCV фенотипов чаще всего влияют мутации в следующих генах: *menB*, *menD*, *hemA*, *hemB*, *hemG*, *hemH*, *cta*, *thyA* [488]. Стоит отметить, что на сегодняшний день отсутствуют как рекомендации по диагностике инфекций связанных с SCV, так и рекомендации по целенаправленной терапии. В этой связи, на основании полученных результатов, целесообразно проводить более детальную микробиологическую диагностику у пациентов, находящихся или получавших терапию аминогликозидами. Появление двойной зоны задержек роста при оценке чувствительности к гентамицину может служить косвенным признаком наличия SCV вариантов или альтернативных механизмов устойчивости к аминогликозидам.

ГЛАВА 7 ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ РАБОТЫ: ТРАЕКТОРИИ ЭВОЛЮЦИИ РЕЗИСТЕНТНОСТИ К АНТИБИОТИКАМ У *S. AUREUS*

7.1. Траектории эволюции клонов, ассоциированных с устойчивостью к антибиотикам

Эволюционные процессы являются отличительной чертой всех биологических систем на планете. В фундаментальной обзорной работе Вагнера и соавт. [16] обобщают накопленный опыт по изучению эволюции механизмов формирования и распространения устойчивости к антибиотикам среди микроорганизмов, имеющих клиническое значение. Авторы выделяют различные пути эволюции резистентности, направления (траектории) которых, зависят от множества факторов. На уровне генов эволюция может протекать, как случайным образом (через мутации и флуктуации генов), так и направленным образом через естественный отбор. Однако иногда можно наблюдать последовательные пути адаптивной изменчивости, и при фиксированных обстоятельствах на определенных ландшафтах приспособленности эволюция может быть предсказуемой (экспериментальные условия). На самом высоком организационном уровне живой материи, например, на уровне плазмид, клонов, видов или микробных сообществ, степени свободы эволюции систем резко возрастают и коррелируют со степенью сложности организации биологической системы. Это связано с переменным разбросом, фрагментацией, родством или слиянием бактериальных популяций в зависимости от гетерогенности и от изменения ниш обитания, а также избирательных градиентов в сложных факторах окружающей среды. Эволюционные траектории устойчивости к антибиотикам в меняющихся ландшафтах адаптивности имеют свой путь, подверженный случайным вариациям. Такие траектории становятся сильно энтропийными и, следовательно, непредсказуемыми. Однако, весь накопленный опыт экспериментального, филогенетического и экогенетического анализов показывают, что можно выделить наиболее часто «используемые» бактериями траектории эволюции устойчивости, что позволяет приблизиться к пониманию эволюционной динамики, моделированию и, возможно, разработки инструментов для вмешательства в микробную эволюцию, необходимых для управления процессами формирования и распространения антимикробной устойчивости.

В целом, траектории эволюции устойчивости к антимикробным препаратам проходят на разном уровне биологических систем, от генного уровня до уровня микробиомов, включая траектории эволюции клонов и видов. В популяционной структуре принято выделять клональные комплексы, представляющие собой группу генотипически схожих штаммов микроорганизмов, имеющих одинаковое адаптивное пространство или эволюционный

ландшафт (экотип) [490]. У разных экотипов в рамках вида существует свое направление эволюции, что отражается в генотипическом отличии разных клональных комплексов. Резкое численное увеличение количества определенных клонов внутри клонального комплекса приводит к появлению, так называемых, «пандемических клонов», «успешных клонов» или «клональных комплексов высокого эпидемического риска» [491, 492]. Такой относительный подъем численности определенного клона приводит к его быстрому распространению, а также ведет к клональному сдвигу (clonal fluctuations, clonal shifts) на географическом локальном или глобальном уровнях. Скачок численности клонов может быть временным (например, вспышка) или продолжительным. Можно также выделить волны или клональные колебания в структуре популяции. Факторы, влияющие на резкое повышение численности клонов разнообразны. К их числу можно отнести давление использования антимикробных препаратов, которое приводит к селекции в структуре популяции устойчивых клонов. Клональные колебания могут также быть связаны с такими массовыми вмешательствами, как внедрение программ массовой иммунизации населения. Одним из ярких примеров служит внедрение антипневмококковых вакцин, которые привели к замене или переключению серотипов и соответственно клонов в популяции *Streptococcus pneumoniae*. Другой пример, это смена ниш обитания, связанных с изменением биологии хозяина, или возникновение новых свободных ниш. Например, на клональные сдвиги *Salmonella* spp. или других представителей энтеропатогенных *Enterobacterales* сильно влияют события, связанные с безопасностью пищевых продуктов, продовольственными рынками и сельским хозяйством. Клональные флуктуации можно дифференцировать по отдельным хозяевам, группам популяций людей, в частности, по типу госпитализированных пациентов и групп людей в различных социально-средовых условиях. Так, у MRSA можно выделить три основных кластера клонов, которые ассоциированы с разными нишами: внутрибольничной средой (HA-MRSA), разобщенной популяцией человека (CA-MRSA) или популяцией животных (LA-MRSA). В истории изучения глобальной популяционной структуры *S. aureus* можно также выделить три основные волны появления новых клонов [493]. Первая волна - это появление и распространение HA-MRSA с доминированием представителей CC5 и CC8. Появление в 1990-х внебольничных MRSA, и в частности, крайне успешного клона ST8-USA300 на территории Северной Америки, можно связать со второй волной. И, наконец, третья волна, это появление MRSA, ассоциированных с инфекциями у животных (LA-MRSA), с распространением *S. aureus*, относящихся к CC398. Стоит отметить, что появление LA-MRSA изначально было ассоциировано с *mecC*-положительными изолятами. В недавнем исследовании Larsen и соавт. [23] была выдвинута интересная гипотеза о появлении и распространении *mecC*-положительных стафилококков. Как оказалось, популяция ежей европейского ареала (*Erinaceus europaeus*) является резервуаром

MRSA, и в частности, *mecC*-положительных изолятов. Более того, у ежей обнаруживали грибок дерматофит *Trichophyton erinacei*, который является продуцентом бета-лактамовых антибиотиков. Авторы предположили, что в процессе естественной ко-эволюции могли появиться *mecC*-положительные MRSA среди носителей в популяции ежей, которые распространены на всей территории Европы. А человеческий фактор, и в первую очередь, использование антибиотиков в сельском хозяйстве, опосредовало смену ниш обитания MRSA с появлением LA-MRSA. Ведь первые документированные случаи инфекций, вызванных LA-MRSA были зафиксированы именно среди животных, имеющих сельскохозяйственное значение. Клональные флуктуации напоминают волновую кинетику и возникают на индивидуальном уровне (внутри одного хозяина), в группах и в крупных сообществах хозяев, образуя ландшафты волн разной амплитуды. У индивидуума, и особенно, в открытых биотопах (таких как слизистые оболочки) видовая структура бактерий подразумевает сосуществование нескольких видов и клонов, каждый из которых адаптирован к конкретным условиям среды, обеспечивающей устойчивость вида: «оптимальный клональный состав» или клонобиом. Вагнер и соавт. в своей работе [16] задаются вопросом: сколько клонов внутри одного вида способны приобретать детерминанты устойчивости; либо приобретение признака устойчивости не зависит от генетического окружения и любой клон способен к формированию устойчивости? В отношении *S. aureus*, однозначным ответом на этот вопрос будет существование сильной связи между способностью к приобретению устойчивости к антибиотикам и принадлежностью к определенной генетической линии. В частности, на момент 2023 года в репозитории PubMLST представлено более 8600 клонов (определенных по классической схеме MLST), из которых менее 1% представлено *mecC*-положительными *S. aureus*, имеющими наивысший потенциал устойчивости к антибиотикам. Сосуществующие клоны можно рассматривать как альтернативные стадии популяции вида. Полученные в настоящем исследовании результаты говорят о стабильной циркуляции во внутрибольничной среде на территории РФ нескольких доминирующих клонов – ST8, ST239 и, в меньшей степени, ST228. Последний клон скорее имеет исключение, поскольку выявлялся только в определенных географических регионах в периоде одного временного диапазона. Стоит также отметить, что при сравнении абсолютного количества детерминант устойчивости среди разных генетических линий, представители ST8 занимают только третье место, что может объясняться ограничением в накоплении факторов устойчивости. В свою очередь, это ограничение связано с высокой биологической ценой сопротивления. Действительно, при сравнении доступных геномов, для ST8 характерно невысокое количество детерминант на геном, в отличие от ST239 или ST228. В свою очередь, гибридный клон ST239, который является быстро дивергирующей генетической линией, по

всей видимости, имеет высокую биологическую цену сопротивления. Более того, в опытах при селекции на среде без антибиотиков, ST239 теряли SCC_{mec} элемент, в отличие от ST8.

Клональная адаптация к новым нишам включает стратегии конкуренции и взаимодействия с другими микроорганизмами. В пределах одной и той же генетической линии можно ожидать определенного взаимодействия адаптивных процессов, включая мутации и рекомбинации [494]. Таким образом, клональная интерференция не является абсолютной, допуская сосуществование нескольких клонов с полезными (адаптивными) мутациями, которые могут стать актуальными с увеличением размера популяции. Это подтверждается примерами популяционной структуры *S. aureus*, так в рамках генотипа ST8 можно выделить несколько субвариантов, которые имеют свою эволюционную историю, что было продемонстрировано при анализе оценки времени филогенетической дивергенции. Детерминированность в нишах обитания была обнаружена в настоящем исследовании с выявлением среди здоровых носителей клона MRSA-ST22, который также характеризуется вариативностью в глобальном популяционном контексте. Анализ имеющихся опубликованных исследований [28, 30, 372] показывает, что MRSA-ST22 «Газа клон» достаточно хорошо адаптирован к существованию на поверхности слизистых оболочек человека. Такая особенность может рассматриваться в контексте того, что MRSA-ST22 может представлять собой молчащий клональный резервуар, «ожидающий» клональной экспансии, которая возможно может привести к очередному клональному сдвигу (локальному или глобальному).

В мировом масштабе существует определенная географическая детерминированность, обусловленная циркуляцией разных клонов в разных регионах. Биологическое доминирование определенных клонов складывается из множества факторов, это особенности хозяина, прежде всего генетические, межмикробное взаимодействие, влияние внешних средовых факторов в широком смысле (антропогенный фактор, климат, и другие факторы). Однако, ключевой аспект вопроса, почему на одной территории циркулируют одни клоны, а на другой – другие, остается открытым. Адаптивная генетическая изменчивость может давать преимущество нескольким популяциям, особенно для родственных клонов, а также для видов, занимающих одни и те же или соседние ниши, что приводит к «облаку» или «группе» одновременного отбора разных бактериальных экотипов. Горизонтальный перенос генов часто участвует в этом процессе, мобильные генетические элементы служат «транспортными средствами» для переноса генов резистентности. Такая «групповая» адаптация, как правило, устраняет дивергенцию за счет нейтральной эволюции, как внутри популяции, так и между популяциями, сохраняя при этом высокую идентичность геномов субклонов, филогенетических кластеров.

7.2. Траектории эволюции мутационных резистомов

Эксперименты по направленной эволюции бактерий – это эксперименты, которые предназначены для оценки возможности получения последовательных наиболее подходящих и устойчивых к антибиотикам вариантов при контролируемом воздействии антибиотиков. На сегодняшний день данные экспериментальные подходы с развитием технологий полногеномного секвенирования становятся все более значимыми и позволяют моделировать траектории эволюции. Такие методы в настоящее время выделяют в одну группу: (лабораторные) эксперименты по адаптивной эволюции ((laboratory) adaptive evolution experiments). Эти подходы часто основаны на серийных пассажах бактериальных культур, содержащих популяцию исходных штаммов с известными фенотипическими и генотипическими особенностями. Последовательные пассажи на средах с антибиотиками осуществляют в течение определенного времени. Существует большое количество различных стратегий селекции с разнообразными модификациями: короткие или длительные циклы селекции, вариации воздействия антибиотиками, селекция при моделировании РК/PD антибиотиков и прочие. Цель подобных подходов состоит в том, чтобы получить штаммы с высоким уровнем МПК (или измененным в большую сторону) и изучить мутационные события, которые привели к образованию таких фенотипов. В настоящей работе использовались две стратегии селекции – это длительные пассажи на возрастающих концентрациях антибиотиков и циклическое кратковременное воздействие высокими концентрациями антибиотиков. Соответственно, в первом случае все анализируемые штаммы *S. aureus* приобретали устойчивый фенотип, детерминированный мутационными событиями. Во втором случае, были получены фенотипы гетерорезистентности (к ванкомицину), устойчивости (при воздействии гентамицином) и толерантности (при воздействии ципрофлоксацином). Существует и другой подход - это прямое моделирование эволюции. Прямое моделирование формирования резистентности основано на направленном получении мутаций или их комбинаций с помощью широкого круга различных подходов (allele replacements methods), включающих сайт-направленный мутагенез. Прямая генетическая реконструкция доступных траекторий эволюции может учитывать не только механизмы устойчивости, но также и компенсаторную эволюцию и стабильность приобретенных признаков [495]. Наиболее мощным подходом в изучении механизмов устойчивости является комбинация методов эволюционного моделирования и сайт-направленного мутагенеза. В настоящем исследовании использовались подходы по изучению адаптивной эволюции устойчивости среди разных генотипов *S. aureus* и также был использован метод направленного мутагенеза для внесения делеций в ген *gdpP*.

Сложность сайт-направленного мутагенеза и геномного редактирования заключается в наличии в геноме *S. aureus* эффективных систем рестрикции-модификации, а также слабой способностью к формированию генетической компетентности [496]. В 1980-х годах Kreiswirth и соавт. был получен мутант *S. aureus* RN4220 с делецией в одном из генов рестриктаз [497]. В настоящее время этот модельный штамм используется в подавляющем большинстве экспериментальных работ, где применяются методы клонирования и мутагенеза. Использование транспозонов или элементов фагов в качестве векторов с последующей рекомбинацией, являются наиболее распространёнными методами мутагенеза для *S. aureus* [496]. Использование системы CRISPR/Cas9 также эффективно для геномного редактирования и данный метод характеризуется высокой воспроизводимостью [268, 498, 499]. Этот подход был использован в настоящем исследовании. При селекции на бета-лактамных антибиотиках, включая цефтаролин, довольно часто у разных штаммов выявлялись мутации в *gdpP*. Воспроизведение делеции на модельном штамме RN4220 приводило к незначительному увеличению МПК бета-лактамов. Интересен тот факт, что после селекции на бета-лактамах у производных штаммов практически не выявлялись мутации «в чистом виде» в *gdpP*, а как правило, в комбинации с другими мутационными событиями. Возможно, что такое формирование устойчивости связано с эпистазом.

Отдельного внимания заслуживают длительные эволюционные эксперименты (LTEE). Экспериментальная эволюция — это изучение эволюционных процессов, происходящих в экспериментальных популяциях в ответ на условия, воспроизводимые и контролируемые экспериментатором [500]. Фундаментальные аспекты таких экспериментов заключаются в оценке таких явлений как случайность или закономерность эволюционной направленности и ее изменения. В 1988 г. Ричардом Ленски (Richard Lenski) с целью проверки повторяемости эволюционной динамики в повторяющихся популяциях [501, 502] был начат, пожалуй, самый длительный, знаменитый и наиболее значимый эксперимент в микробиологии, который продолжается и в настоящее время. В этом эксперименте более десяти повторных популяций *E. coli* были помещены в минимальную жидкую среду, содержащую глюкозу в качестве единственного источника питания. Ежедневно осуществлялся (и осуществляется) пассаж на свежую среду и каждые 500 поколений штаммы замораживались для дальнейших исследований. В настоящее время достигнута точка в более чем 80000 поколений по достаточно простому сценарию – один ежедневный пересев на минимальной среде. Исследование показало, что эволюция, даже при таком простом сценарии, представляет собой комбинацию как случайных (мутации и дрейф), так и направленных (естественный отбор) процессов. Поколение мутантов может привести к негативным генетическим взаимодействиям, открывающим возможность появления новых полезных мутаций [503]. В целом, эти исследования показывают

бесконечную историю бактериальной эволюции: после стольких поколений в постоянной среде наблюдается устойчивый прирост приспособленности к изменчивости, что дает право на предположение о возможной бесконечности процессов адаптации и дивергенции [504]. Способность *E. coli* извлекать все возможности из культуральной среды (и продуктов, выделяемых в результате бактериального метаболизма) увеличивалась во время эксперимента, и траектории изменений (мутационные события), лежащие в основе изменения фенотипов, были схожими в биологических повторах, но не идентичными. Мутации последовательно фиксировались в ряде генов во всех 12 популяциях, хотя точечные мутации (нуклеотидные замены, микроинсерции) различались почти в каждом случае. Наряду с этим была также обнаружена и дивергентная эволюция. Так, появление способности использовать цитрат произошло только в одной из повторностей, у некоторых линий развилась неспособность использовать рибозу. В настоящем исследовании после 40 пассажей на средах без антибиотиков также были зафиксированы различные мутации, имеющие скорее направленность на адаптацию к росту в культивируемой среде за счет потери некоторых факторов резистентности (например, элемента *SCC_{mec}* у штамма SA0085-ST239).

Согласно теории нейтральной эволюции, случайные мутации являются ключевыми драйверами изменчивости, которые чаще всего являются «молчащими», то есть не приводящими к серьезным изменениям фенотипа. Как в случае с появлением нового свойства – использования цитрата, в экспериментах группы Lenski и соавт., молчащие мутации могут возникнуть в результате «исторических» случайностей, которые в конечном итоге способствуют возникновению значительных изменений в фенотипе. Такая траектория эволюции характерна и для механизмов резистентности. Молчащие мутации могут быть случайным образом распределены в популяции бактерий, таким образом, эволюционная история от предшественника до резистентного клона может являться ключевым явлением в формировании устойчивости. Это в свою очередь подчеркивает особую роль генетического окружения клона и, по всей видимости, предопределяет скорость изменения фенотипа (приобретения устойчивости) и биологическую цену сопротивления при воздействии антибиотиками в процессе селекции. В этом случае чрезвычайно сложно предсказывать и моделировать траектории эволюции устойчивости вне лабораторного эксперимента. Для более глубокого понимания процессов изменения фенотипов и генотипов с приобретением устойчивости возможно использование подходов оценки ландшафтов эволюции. Еще один из амбициозных проектов, где был реализован анализ ландшафтов эволюции, является исследование Ваун и соавт. с использованием гигантской «чашки Петри» (Megaplate) размером 120 на 60 см [36]. В этом эксперименте авторы впервые реализовали плавное разделение градиента концентраций антибиотика на большой площади агара с фиксацией в режиме

реального времени появления устойчивых клонов, микроколоний, росших по градиенту от минимальной к максимальной концентрации. В качестве тестируемой пары была использована культура *E. coli* и антибиотик триметоприм. Важным открытием стало то, что пути мутационных событий были разными среди разных клонов, но приводили к одному фенотипу – устойчивости. Авторы подчеркивали, что помимо ключевых генов, участвующих в устойчивости к триметоприму (метаболизм фолиевой кислоты, *folA*), большое число мутаций выявлялось и в разных метаболических путях бактериальной клетки. Результаты данного эксперимента также подчеркивают наличие «случайно-направленной» эволюции, приводящей к одному эффекту – появлению устойчивости и селекции клонов из них с минимальной ценой сопротивления. Это подтверждается появлением субпопуляций с разным уровнем устойчивости к триметоприму. Стоит отметить одну особенность при постоянном культивировании бактерий в присутствии антибиотиков: ступенчатое увеличение концентраций или воздействие субингибирующими концентрациями приводит к появлению устойчивости. В то же время, циклическое кратковременное воздействие с промежутками для культивирования без антибиотика приводит к толерантности. Граница, когда толерантность переходит в устойчивость – дискуссионный вопрос, некоторые исследователи выдвигают гипотезу о том, что эволюция устойчивости проходит изначально через этапы формирования сначала персистенции и толерантности [262, 263]. Как уже отмечалось, в подавляющем большинстве экспериментов, а также и в настоящем исследовании по изучению и моделированию траекторий эволюции, у производных штаммов после селекции формируются мутации в генах генерального метаболизма клетки. Недавнее экспериментальное исследование Lopatkin и соавт. [415] показывает, что устойчивость к антибиотикам под действием внешних стрессовых факторов (высокие/низкие значения кислотности, температуры, микроэлементное голодание и другие) может формироваться за счет альтернативных путей, без изменения ключевых генов-мишеней действия антибиотиков. Как уже отмечалось ранее, у *S. aureus* хорошо описан эффект повышения устойчивости к бета-лактамам на фоне аминокислотного голодания. В исследовании [415] авторы выдвигают гипотезу о том, что изменения в общем углеводном и энергетическом метаболизме снижают скорость цикла Кребса и интенсивность клеточного дыхания, что в свою очередь приводит к сниженному метаболическому и токсическому воздействию антибиотиков. Данное явление имеет определенные черты сходства с толерантностью, где механизм практически аналогичен.

Траектории эволюции устойчивости *S. aureus* к антибиотикам, которые использовались в данном исследовании, имеют множественную направленность (рис. 54А).

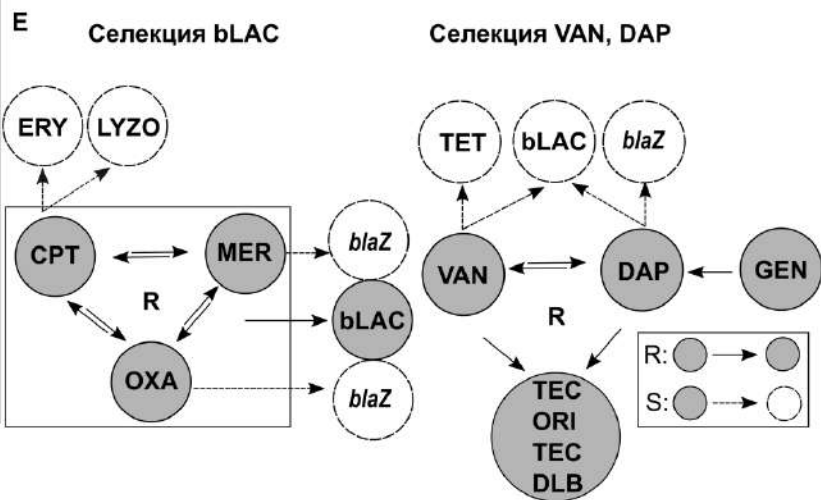
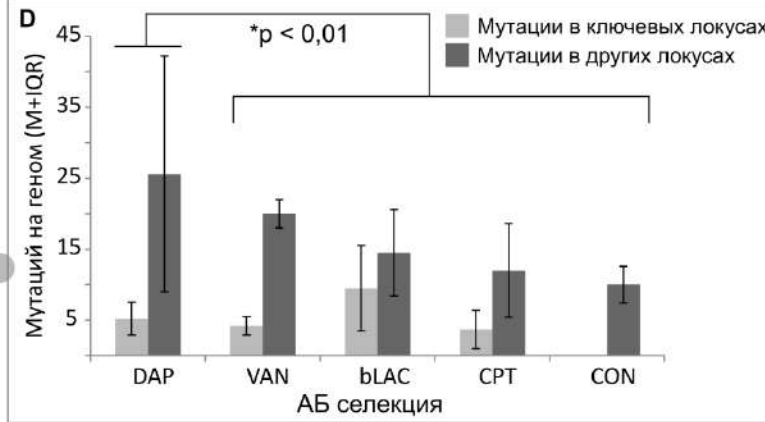
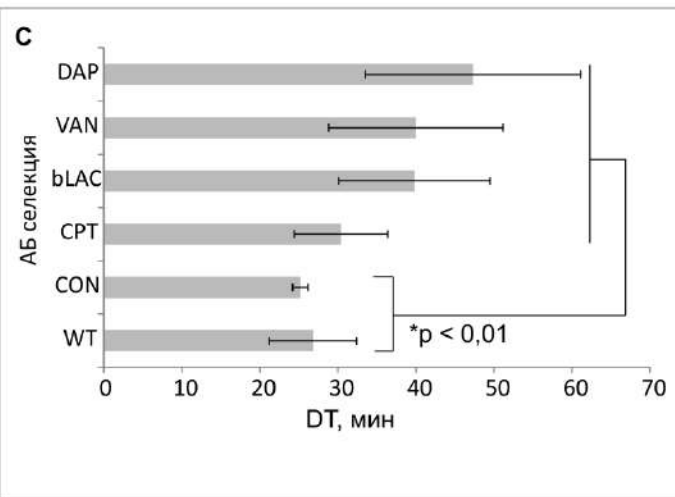
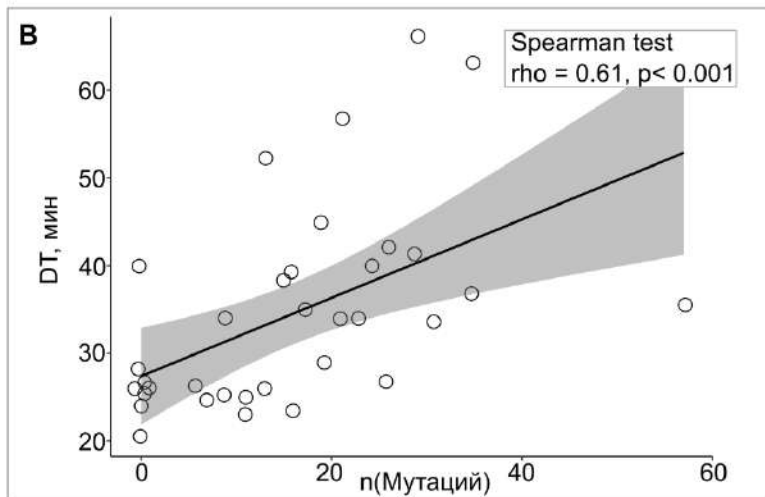
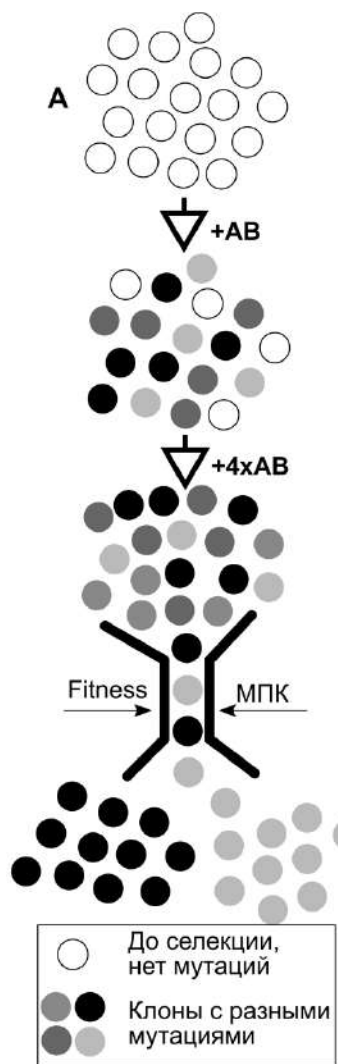


Рисунок 54 – Траектории эволюции устойчивости у *S. aureus*. А – Модель формирования множества клонов в популяции под воздействием антибиотиков (АВ), клональное разнообразие увеличивается по мере селекции и увеличения воздействующей концентрацией (4хАВ). По мере селекции возрастает биологическая цена сопротивления (Fitness) и в совокупности с воздействием высоких концентраций антибиотиков (МПК) образуется узкое горлышко адаптивной направленной селекции, где остаются только клоны с оптимальным соотношением уровня сопротивления и способностью преодолевать воздействие антибиотиков. В – анализ корреляции и линейное приближение между количеством уникальных мутационных событий (n(Мутаций)) и временем удвоения клеток (DT). С – медиана значений (IQR) показателя времени удвоения клеток после селекции на разных антибиотиках. D – сравнение количества уникальных мутационных событий (в ключевых и прочих локусах) в зависимости от селекции на различных антибиотиках. Е – ассоциированная и перекрестная устойчивость, а также восстановление чувствительности (Seesaw Effect) при после селекции на различных антибиотиках. Обозначения: DAP – даптомицин, VAN – ванкомицин, bLAC – бета-лактамы, CPT – цефтаролин, CIP – ципрофлоксацин, GEN – гентамицин, OXA – оксациллин, MER – меропенем, ERY – эритромицин, TEC- тейкопланин, ORI – оритаванцин, DAL – далбаванцин, TLV – телаванцин LYZO – лизоцим, CON – штаммы, которые пассировали на среде без антибиотиков, WT – исходные штаммы до селекции.

Было выявлено, что вне зависимости о того, на каком антибиотике идет селекция, происходит накопление разных мутаций, не только в ключевых генах/локусах-мишенях действия антибиотиков, но и в генах общего и специализированного метаболизма и белках с неизвестной функцией. Эти мутации могут рассматриваться как компенсаторные или же эпистатические. Так, количество «ключевых» мутаций было всегда меньше по сравнению с мутациями в других локусах (рис. 54D). В целом наибольшим количеством мутаций характеризовались производные штаммы после селекции на даптомицине. Стоит также отметить, что наблюдалась умеренная положительная корреляция (0,61; $p < 0,001$), между увеличением количества мутационных событий и увеличением времени удвоения клеток (рис. 54B).

Формирование устойчивости к антибиотикам проходит через этап формирования гетеромутаций, и в ходе селекции одни гетеромутации закрепляются в популяции и переходят в гомомутации, другие элиминируют. Разные варианты селекции опосредуют разные пути формирования устойчивости, что подтверждает гипотезу о том, что изначально в клеточной популяции формируется множество мутаций под воздействием антибиотиков, но какой путь формирования устойчивости в итоге будет закреплён в популяции, остается неизвестным (рис.

54А). Также остаются неизученными факторы, которые могут оказывать влияние на формирование того или иного пути устойчивости. Полученные данные свидетельствуют о том, что регулятор клеточной стенки WalK ассоциирован с формированием устойчивости не только к ванкомицину, даптомицину, но и цефтаролину. При разных вариантах селекции на ванкомицине у разных генотипов MRSA выявлялись мутации в гене *walK*, что еще раз подчеркивает роль этого гена в формировании устойчивости к гликопептидам. Также установлено, что при формировании устойчивости к цефтаролину задействована система GraSR, которая раньше рассматривалась только в контексте устойчивости к гликопептидам. Не было обнаружено каких-либо мутаций и гетеромутаций в гене *gdpP* у мутантов в ходе селекции на ванкомицине и даптомицине. Повышение внутриклеточной концентрации c-di-AMP (посредством мутаций в гене *gdpP*) ассоциировано только с устойчивостью к бета-лактамам антибиотикам. При анализе гетеромутаций были обнаружены гены, в которых часто детектировались мутации при селекции на ванкомицине и даптомицине. К их числу относились нижеперечисленные гены. Транспортный белок NtrA, входящий в комплекс транспортной системы переноса фосфатов, ранее не описывался как детерминанта, ассоциированная с устойчивостью к антибиотикам. Белок с неизвестной функцией – SACOL1927 (ген *yfhP*), содержащий аминокислотный паттерн суперсемейства YdjM. Белок FabF, участвующий в метаболизме липидов. Эти белки ранее были обнаружены при изучении гомомутаций у рассматриваемых мутантов. Данные детерминанты могут рассматриваться потенциальными новыми кандидатами, ассоциированными с устойчивостью к ванкомицину и даптомицину. Разные механизмы устойчивости опосредуют разную аутолитическую активность. В исследовании установлено, что при селекции на цефтаролине происходит увеличение аутолитической активности, при селекции на ванкомицине и даптомицине, наоборот, происходит снижение. При этом не было обнаружено каких-либо генетических изменений в генах муреиновых гидролаз. По-видимому, изменение аутолизиса является следствием изменения работы двух регуляторных сетей – биосинтеза пептидогликана и системы деления клетки.

Генотипическая гетерорезистентность была оценена с помощью поиска смешанных позиций в ридах, такой подход был ранее использован при анализе данных секвенирования производных штаммов в LTEE экспериментах [14, 505]. Помимо этого, в процессе селекции была выявлена и фенотипическая диссоциация, в частности, после селекции на даптомицине было обнаружено появление колоний двух типов у штамма SA0736, у штамма SA0937 после селекции на гентамицине выявлено три варианта колоний. В обоих случаях все морфотипы отличались разными мутационными паттернами. Формирование устойчивости – это разнонаправленный процесс, то есть приобретение устойчивости к одному антибиотику

сопровождается приобретением ассоциированной и/или перекрестной устойчивости. Например, устойчивость к ванкомицину может быть ассоциирована с устойчивостью ко всем липогликопептидам и даптомицину. Может наблюдаться и другой эффект – потеря какого-то механизма устойчивости (Seesaw Effect). Например, некоторые производные штаммы после селекции теряли плазмиды, несущие гены *blaZ* (устойчивость к пенициллину) или *ermC* (устойчивость к эритромицину). На рис. 54Е суммированы все варианты таких изменений в фенотипах после селекции на разных антибиотиках. Наконец, приобретение устойчивости всегда ассоциировано с биологической ценой сопротивления, однако, величина этой цены зависит от антибиотика (и приобретенных механизмов устойчивости), рис. 54С. Ранее было показано, что приобретение разных мобильных генетических элементов ассоциировано с высокой ценой сопротивления [506]. В настоящем исследовании, моделируя мутационный резистом, наибольшей ценой сопротивления характеризовались производные штаммы после селекции на даптомицине (рис. 54С). За основу оценки цены сопротивления был взят метод оценки скорости роста, и в частности, времени удвоения микробной клетки. Однако, этот подход является приблизительным, для детального исследования оценки цены сопротивления необходимы эксперименты по анализу конкурентного роста при сокультивировании производного мутантного штамма и его предшественника.

Таким образом, траектории эволюции устойчивости *S. aureus* имеют разнонаправленный характер. Среди клинических изолятов основных генетических линий (ST8, ST239), а также среди изолятов, выделенных от носителей (ST22, ST59), формирование устойчивости реализуется за счет мобильных генетических элементов, стафилококковых плазмид малого размера. Гетерорезистентность к бета-лактамам является одним из характерных признаков CA-MRSA. Формирование мутационного резистома в модельных экспериментах при селекции *in vitro* происходит через фенотипическую и генотипическую гетерорезистентность. В свою очередь, гетерорезистентность можно рассматривать как этап формирования резистентности. И, по всей видимости, такой путь будет являться универсальным для всех прокариот. Гетерорезистентность предполагает наличие в популяции клеток с разными мутациями, появление которых носит случайный характер, и случай определяет формирование совершенно разных путей устойчивости. В процессе существования такой смешанной популяции, невозможно предсказать, какая группа клеток с определённым мутационными событиями получит доминирование. Узким горлышком, которое является фильтром, будет выступать конкуренция и способность сопротивляться воздействию антибиотика. Таким образом, моделирование процессов адаптивной эволюции больше похоже на «ускоренную эволюцию в миниатюре». Стоит отметить, что полученные результаты нельзя напрямую экстраполировать на аналогичный сценарий формирования устойчивости *in vivo* в процессе инфекции. Поскольку

при проведении лабораторных экспериментов по адаптивной устойчивости не учитывается существенный фактор – селекционное давление, направленное на вирулентность и в целом на способность вызывать инфекцию. Это относится к главному минусу настоящей работы, поскольку не было исследовано влияния приобретения устойчивости на вирулентность. Данное направление требует дальнейшего изучения.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

План исследования включал характеристику доминирующих генетических линий MRSA, циркулирующих на территории РФ с оценкой особенностей устойчивости к различным антибиотикам. Для более детального описания механизмов устойчивости, моделирования и прогнозирования рисков формирования резистентности был использован эксперимент по адаптивной эволюции устойчивости с оценкой направленности (траекторий) мутационных событий (эволюции). Было использовано две стратегии селекции устойчивости *in vitro*. Первая стратегия заключалась в культивировании *S. aureus* при постоянно увеличивающихся концентрациях антибиотиков: бета-лактамов, ванкомицина и даптомицина. Эти антибиотики являются препаратами выбора при лечении инфекций, вызываемых стафилококками, включая MRSA, что аргументирует их включение в исследование. Вторая стратегия – циклическое воздействие шокowymi концентрациями ванкомицина, ципрофлоксацина и гентамицина. Используемые концентрации антибиотиков были близки к пиковым сывороточным концентрациям при использовании стандартных схем антибактериальной терапии данными препаратами. Таким образом, этот подход частично моделирует фармакодинамику данных антибиотиков. Результаты, полученные в диссертационном исследовании, носят как практическую, так и теоретически-фундаментальную значимость, относящуюся к пониманию механизмов распространения и формирования устойчивости у одного из наиболее значимых клинических патогенов – *S. aureus*.

Популяционная структура MRSA в России отличается от других географических регионов на нашей планете. На территории России длительный период времени циркулирует две основные генетические линии HA-MRSA: ST8 и ST239. Среди CA-MRSA в России доминирует «Газа клон» ST22. Проблема CA-MRSA в России практически не изучена. В настоящем исследовании были исследованы MRSA, выделенные от условно-здоровых носителей, не связанных с системой здравоохранения (амбулаторный визит и пребывание в стационаре менее 48 ч), что позволяет в полной мере отнести данные изоляты с эпидемиологической точки зрения к CA-MRSA. Следует отметить, что CA-MRSA были получены при скрининге на носительство *S. aureus* среди большого числа участников из двух мегаполисов Москвы и Санкт-Петербурга и представлены детской и взрослой популяциями. Уровень носительства как *S. aureus*, так и MRSA оказался сопоставим с результатами аналогичных исследований, проводимых в других странах. В работе было выявлено, что HA-MRSA и CA-MRSA различаются по чувствительности к антибиотикам, профилям резистентности. Наиболее устойчивые генетические линии представлены клонами ST239 и ST228, при этом снижение

чувствительности к ванкомицину отмечалось среди ST8. Использование филогенетического анализа с оценкой времени дивергенции и Байесовской кластеризации с включением геномов изолятов, собранных за десятилетний период 2011 – 2022 гг. (единичные изоляты были собраны с 1998 по 2008 гг.) позволило построить модель эволюции HA-MRSA-ST8 на территории России. Установлена циркуляция трех кластеров клонов, входящих в состав генетической линии ST8, которые имеют общего предка с европейскими клонами ST8. Начало дивергенции европейской и российской клад приходится на 1930–е годы, что позволяет сделать вывод об импорте этой линии с территории Европы. Также установлено, что циркулирующие MSSA относятся к другому кластеру и формируют отдельные субклоны, что исключает гипотезу самостоятельного формирования российского кластера стафилококков через приобретение SCC*mec* IVc циркулирующими MSSA. Геном HA-MRSA-ST8 характеризуется выраженной стабильностью, несмотря на длительность циркуляции. Уровень ассоциированной устойчивости HA-MRSA к антибиотикам разных групп остается высоким, но к таким препаратам как оксазолидиноны, даптомицин, тигециклин, липогликопептиды устойчивость не выявлена. Среди CA-MRSA в России доминирует «Газа клон» ST22, впервые описанный на территории Палестины. «Газа клон» формирует отдельный кластер ST22, который не связан с эпидемическим клоном EMRSA-15 и характеризуется наличием токсина TSST. Как уже подчеркивалось ранее, «Газа клон» ST22 может являться резервуаром для старта будущего клонального сдвига, что требует слежения за распространением и эволюции данной генетической линии. Другой представитель CA-MRSA - ST59, относится к Восточно-Азиатской сублинии ST59 и ранее не описывался на территории России. Наличие уникальных генетических маркеров свидетельствует о самостоятельной эволюции MRSA-ST59.

В целом, для CA-MRSA был характерен высокий уровень чувствительности (36% изолятов) к не бета-лактамам антибиотикам, а также среди этой группы были выявлены OS-MRSA фенотипы, проявляющие ложную чувствительность к оксациллину. Такой фенотип связан с мутациями в промоторной области гена *mecA* и гетерорезистентностью.

Основные результаты, полученные при селекции устойчивости *in vitro*, были следующие. Во-первых, при селекции появлялась ассоциированная и перекрестная устойчивость, что лежит в основе концепции «параллельного ущерба», при котором на фоне появления устойчивости к одному препарату происходит формирование устойчивости и к другим антибиотикам (формирование множественной устойчивости). Во-вторых, мутационные события, идентифицированные у мутантов после селекции, затрагивают не только ключевые гены, но и другие системы клетки. Данное наблюдение лежит в основе появляющейся в настоящее время концепции о формировании устойчивости к антибиотикам у прокариот посредством различных

стратегий, например, под влиянием изменения работы генерального метаболизма, что было продемонстрировано в экспериментальной работе Lopatkin и соавт. [271]. В-третьих, устойчивость формируется через гетерорезистентность и толерантность, что находит подтверждение в работах Valaban и соавт. (2014 – 2021). Для изучения гетерорезистентности в диссертационной работе было использовано два методологических подхода: это определение фенотипической гетерорезистентности с использованием РАР-анализа и геномного секвенирования с анализом глубины мутационных событий, то есть с определением количественной аллельной представленности той или иной мутации. Для этого использовался термин «гетеромутация» применительно к прокариотам. Выявлено, что формирование мутаций происходит не сразу во всей популяции микроорганизма (как считается в классической модели формирования устойчивости), а начинается с появления множества минорных мутаций. Гетеромутации можно было бы принять за артефакты секвенирования, однако, во-первых, они возникают в целевых генах. Во-вторых, многие мутации переходят в гомомутации, то есть при дальнейшей селекции закрепляются во всей популяции. В-третьих, у контрольных штаммов (селекция на среде без антибиотика) обнаруживается гораздо меньшее число гетеромутаций, и они носят хаотичный характер.

Выявлено, что мутации в *gdpP* связаны с повышением МПК к бета-лактамам с появлением фенотипической гетерогенности. Мутации в *gdpP* влияют на изменение экспрессии пенициллинсвязывающих белков, что может рассматриваться как одна из гипотез причин появления устойчивости через внутриклеточное повышение молекул c-di-AMP. Мутации в пептидил-тРНК-гидролазе (*pth*) способствуют формированию универсальной толерантности к широкому кругу бактерицидных антибиотиков. Триггерным механизмом формирования антибиотикотолерантности у *S. aureus* является воздействие фторхинолонами. Для экстраполяции полученных результатов на влияние толерантности при использовании стандартных схем дозирования на клинические исходы необходимо проведение экспериментов в динамических системах, моделирующих фармакокинетику и фармакодинамику бактерицидных антибиотиков. Данное направление является заделом для дальнейшего изучения феномена антибиотикотолерантности у клинически значимых бактерий. В свою очередь формирование устойчивости к гентамицину происходит через формирование SCV фенотипов с мутациями в генах метаболизма менахинона и электрон-транспортной цепи. При этом формирование устойчивости под действием гентамицина происходит достаточно быстро. Формирование фенотипов толерантности и устойчивости проходит через генотипическую и фенотипическую гетерогенность.

ВЫВОДЫ

1. Для внутрибольничных и внебольничных изолятов характерна различная клональная структура, среди HA-MRSA доминировали ST8 и ST239, среди CA-MRSA – ST22, ST8 и ST59. Для ST239 характерна более выраженная ассоциированная устойчивость, в то время как среди ST8 выше частота встречаемости сниженной чувствительности к гликопептидам. CA-MRSA изоляты характеризовались высоким уровнем чувствительности к не бета-лактамым антибиотикам. Среди HA-MRSA и CA-MRSA не было выявлено устойчивости к линезолиду, тигециклину и липогликопептидным антибиотикам.
2. Генетическая линия *S. aureus* ST8 на территории России представлена тремя кластерами геномов, имеющими общего гипотетического предшественника с геномами изолятов, циркулирующих в Европе (Германия). Расчетный временной период дивергенции европейской и российской клад датируется 1930–ми годами. Наличие множества субкластеров генетической линии ST239, без четкого выделения Российских геномов, свидетельствует о высоком клональном обмене или многократном импорте. Расчетное время появления локальных уникальных вариантов ST239_{Крас} и *hla/hly*-отрицательных ST239 датируется 1960 – 1970-ми годами. Доминирующая Российская генетическая линия CA-MRSA-ST22 относится к кластеру «Газа клона», отличительная черта которого – наличие генов, кодирующих токсин TSST. Российские изоляты CA-MRSA-ST59 относятся к Восточно-Азиатской сублинии ST59.
3. Ассоциированная устойчивость доминирующих генетических линий к антибиотикам разных классов реализуется за счет мобильных генетических элементов. Для ST228 и ST239 характерна высокая частота встречаемости сниженной чувствительности к цефтаролину за счет наличия мутаций в гене *tesA*. Сниженная чувствительность к ванкомицину у изолятов ST8 связана с различными мутациями в генах биосинтеза клеточной стенки. Для 26% CA-MRSA характерен фенотип ложной чувствительности к оксациллину (OS-MRSA) за счет мутаций в гене *tesA* и его промоторе, что приводит к сниженной экспрессии. OS-MRSA быстро трансформируются в MRSA с высоким уровнем устойчивости к бета-лактамам за счет формирования мутаций в генах ядерного генома (*relA*, *eno*, *pyk*, *gmk* и *prsA*), влияющих на чувствительность к бета-лактамам (auxiliary factors).
4. Получены серии производных штаммов MRSA и MSSA, устойчивых к ванкомицину (МПК 4 – 8 мкг/мл), даптомицину (32 – 128 мкг/мл), цефтаролину (32 – 128 мкг/мл), оксациллину (32 – 256 мкг/мл), меропенему (8 – 16 мкг/мл). Накопление мутаций коррелирует со снижением скорости роста. Наиболее выраженные изменения в характере роста наблюдаются при формировании устойчивости к даптомицину. Ванкомицин и даптомицин, в отличие от бета-лактамовых антибиотиков, приводят к устойчивости к индуцированному

аутолизису. Мутации в *gdpP*, *pbp4* и его промоторе являются основными причинами перекрестной устойчивости у MRSA и MSSA ко всем бета-лактамам антибиотикам, включая цефтаролин. У MSSA при селекции на бета-лактамах формируются мутации и в пенициллинсвязывающих белках (*pbp1*, *pbp2*, *pbp3*). При селекции на ванкомицине формируются мутации в регуляторных генах, ответственных за биосинтез клеточной стенки (*walk*, *yucH*, *yucI*, *rpoB*), которые приводят к появлению устойчивости к ванкомицину, липогликопептидам и даптомицину. При селекции на даптомицине формируются мутации в системах биосинтеза мембранных фосфолипидов (*mprF*, *cls2*, *pgsA*) и путях метаболизма глицерола (*fabF*, *glp*) приводящие к устойчивости к даптомицину, ванкомицину и липогликопептидам.

5. Воздействие шокowymi концентрациями ванкомицина приводит к формированию мутаций в *walk*, что опосредует появление гетерорезистентности и снижение чувствительности к даптомицину. Под воздействием шоковых концентраций ципрофлоксацина происходит формирование кросс-толерантности к бактерицидным антибиотикам разных групп (фторхинолонов, бета-лактамов, даптомицина и ванкомицина) без изменения уровня МПК. Кросс-толерантность обусловлена мутациями в пептидил-тРНК-гидролазе (*pth*). Воздействие гентамицином способствует быстрому появлению устойчивости к аминогликозидам (МПК 32 – 128 мкг/мл), фенотипической диссоциации и формированию SCV. Устойчивость к аминогликозидам обуславливается мутациями в генах электрон-транспортной цепи (*atpG*) и биосинтеза менахинона (*menA*). Воздействие шокowymi концентрациями не приводит к снижению скорости роста.

6. Формирование устойчивости (гоморезистентности) проходит через этап мультиклонального формирования различных мутаций в популяции, что приводит к появлению «смешанной культуры», клетки которой проявляют разный уровень чувствительности и устойчивости к антибиотикам. В процессе продолжительного воздействия антибиотиками одни клоны остаются в популяции, другие элиминируют. Направление мутационного процесса случайно, однако результат этого процесса всегда один – формирование устойчивости. Толерантность связана с увеличением времени, необходимого для эффективного киллинга 99% клеточной популяции, и является первичным этапом формирования резистентности.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

Для оценки чувствительности *S. aureus* к бета-лактамам необходимо проводить ПЦР на наличие *tes* генов и оценивать чувствительность к цефокситину. В случае неудовлетворительной терапии ванкомицином, даптомицином, бета-лактамами и при выделении клинических изолятов *S. aureus* с чувствительностью к данным антибиотикам необходимо использование РАР-анализа или проведение оценки кинетики отмирания для выявления возможной гетерорезистентности или толерантности. На фоне терапии ванкомицином при выявлении снижения чувствительности к данному антибиотику у клинических изолятов не целесообразно использовать в качестве альтернативы даптомицин или липогликопептиды.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

а.к. – Аминокислотные остатки

Ассоциированная устойчивость – Формирование устойчивости к разным классам антимикробных препаратов

ГДМ – Метод градиентной диффузии

ДДМ – Диско-диффузионный метод

КОЕ/мл – Колониеобразующие единицы на миллилитр

мг/л – Единица измерения концентрации, миллиграмм на литр

мкг/мл – Единица измерения концентрации, микрограмм на миллилитр

МПК – Минимальная подавляющая концентрация

Перекрестная устойчивость – Формирование устойчивости к антимикробным препаратам одного класса

п.н. (bp) – Пар нуклеотидов

AUC – Площадь под кривой, у.е.

BAPS – Bayesian Analysis of Population Structure, Байесовский анализ популяционной структуры, наименование кластеров

CA-MRSA – Community-acquired MRSA, внебольничные MRSA

CC – Clonal complex, клональный комплекс

Core-SNP – Однонуклеотидные полиморфизмы в ядерном геноме

Fitness cost – Биологическая цена сопротивления, при которой формирование устойчивости связано со снижением биологической конкуренции и скорости роста

HA-MRSA – Hospital-acquired MRSA, внутрибольничные MRSA

IQR, M – Interquartile range, межквартильный интервал, медиана

Kb – Тысячи пар нуклеотидов

LA-MRSA – Livestock-associated MRSA, MRSA, ассоциированные с инфекциями у животных

MDK – Minimum duration of killing, время эффективного киллинга

- MLST – Multi-locus sequence typing, мультилокусное сиквенс-типирование
- MPC – Mutant prevention concentration, концентрация антимикробного соединения, предотвращающая формирование мутантов с устойчивостью
- MRSA – Methicillin-resistant *S. aureus*, метициллинрезистентные *S. aureus*
- MSSA – Methicillin-susceptible *S. aureus*, метициллинчувствительные *S. aureus*
- MSW – Mutant selection window, окно селекции, диапазон концентраций антимикробного соединения, при котором могут формироваться устойчивые мутанты
- OS-MRSA – Oxacillin-susceptible MRSA, оксациллин-чувствительные MRSA
- PAP – Population analysis profile, популяционный анализ
- PVL – Токсин Пантон-Валентайна
- SCC_{mec} – Staphylococcal cassette chromosome *mec*, стафилококковая хромосомная кассета *mec*
- SCV – Small colony variants, мелкоколониальные варианты
- SEB – Энтеротоксин В
- Seesaw effect – Эффект качелей, формирование устойчивости к одному антимикробному препарату влечет за собой появление чувствительности к другому
- SNP – Однонуклеотидные полиморфизмы
- spa*-тип (типирование) – *Staphylococcus aureus* protein A, типирование по последовательности гена протеина А
- ST – Sequence type, сиквенс-тип
- TSST – Токсин, вызывающий развитие токсического шока
- WGS – Whole genome sequencing, полногеномное секвенирование

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Tong, S. Y. Staphylococcus aureus infections: epidemiology, pathophysiology, clinical manifestations, and management / S. Y. Tong, J. S. Davis, E. Eichenberger [et al.] // Clin Microbiol Rev. – 2015. – V. 28, № 3. – P. 603-61.
2. GBDAR Global mortality associated with 33 bacterial pathogens in 2019: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2019 / G. B. D. A. R. // Lancet. – 2022. – V. 400, № 10369. – P. 2221-2248.
3. Harkins, C. P. Methicillin-resistant Staphylococcus aureus emerged long before the introduction of methicillin into clinical practice / C. P. Harkins, B. Pichon, M. Doumith [et al.] // Genome Biol. – 2017. – V. 18, № 1. – P. 130.
4. Rolo, J. Evolutionary Origin of the Staphylococcal Cassette Chromosome mec (SCCmec) / J. Rolo, P. Worning, J. B. Nielsen [et al.] // Antimicrob Agents Chemother. – 2017. – V. 61, № 6.
5. Miragaia, M. Factors Contributing to the Evolution of mecA-Mediated beta-lactam Resistance in Staphylococci: Update and New Insights From Whole Genome Sequencing (WGS) / M. Miragaia // Front Microbiol. – 2018. – V. 9. – P. 2723.
6. Bilyk, B. L. An Interplay of Multiple Positive and Negative Factors Governs Methicillin Resistance in Staphylococcus aureus / B. L. Bilyk, V. V. Panchal, M. Tinajero-Trejo [et al.] // Microbiol Mol Biol Rev. – 2022. – V. 86, № 2. – P. e0015921.
7. Tenover, F. C. Is That Staphylococcus aureus Isolate Really Methicillin Susceptible? / F. C. Tenover, I. A. Tickler // Clinical Microbiology Newsletter. – 2015. – V. 37, № 10. – P. 79 - 84.
8. Gargis, A. S. Difficult-To-Detect Staphylococcus aureus: mecA-Positive Isolates Associated with Oxacillin and Cefoxitin False-Susceptible Results / A. S. Gargis, B. B. Yoo, D. R. Lonsway [et al.] // J Clin Microbiol. – 2020. – V. 58, № 4.
9. Wagner, T. M. Transiently silent acquired antimicrobial resistance: an emerging challenge in susceptibility testing / T. M. Wagner, B. P. Howden, A. Sundsfjord [et al.] // J Antimicrob Chemother. – 2023. – V. 78, № 3. – P. 586-598.
10. Commichau, F. M. Making and Breaking of an Essential Poison: the Cyclases and Phosphodiesterases That Produce and Degrade the Essential Second Messenger Cyclic di-AMP in Bacteria / F. M. Commichau, J. L. Heidemann, R. Ficner [et al.] // J Bacteriol. – 2019. – V. 201, № 1.
11. Heidarian, S. High prevalence of heteroresistance in Staphylococcus aureus is caused by a multitude of mutations in core genes / S. Heidarian, A. Guliaev, H. Nicoloff [et al.] // PLoS Biol. – 2024. – V. 22, № 1. – P. e3002457.

12. Band, V. I. Heteroresistance: A cause of unexplained antibiotic treatment failure? / V. I. Band, D. S. Weiss // *PLoS Pathog.* – 2019. – V. 15, № 6. – P. e1007726.
13. Card, K. J. Genomic evolution of antibiotic resistance is contingent on genetic background following a long-term experiment with *Escherichia coli* / K. J. Card, M. D. Thomas, J. L. Graves, Jr. [et al.] // *Proc Natl Acad Sci U S A.* – 2021. – V. 118, № 5.
14. Good, B. H. The dynamics of molecular evolution over 60,000 generations / B. H. Good, M. J. McDonald, J. E. Barrick [et al.] // *Nature.* – 2017. – V. 551, № 7678. – P. 45-50.
15. Bui, L. M. Antibiotic tolerance and the alternative lifestyles of *Staphylococcus aureus* / L. M. Bui, B. P. Conlon, S. P. Kidd // *Essays Biochem.* – 2017. – V. 61, № 1. – P. 71-79.
16. Baquero, F. Evolutionary Pathways and Trajectories in Antibiotic Resistance / F. Baquero, J. L. Martinez, F. L. V [et al.] // *Clin Microbiol Rev.* – 2021. – V. 34, № 4. – P. e0005019.
17. Lee, A. S. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* / A. S. Lee, H. de Lencastre, J. Garau [et al.] // *Nat Rev Dis Primers.* – 2018. – V. 4. – P. 18033.
18. Itani, K. M. Outcomes and management costs in patients hospitalized for skin and skin-structure infections / K. M. Itani, S. Merchant, S. J. Lin [et al.] // *Am J Infect Control.* – 2011. – V. 39, № 1. – P. 42-9.
19. Nelson, R. E. Reducing Time-dependent Bias in Estimates of the Attributable Cost of Health Care-associated Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* Infections: A Comparison of Three Estimation Strategies / R. E. Nelson, M. H. Samore, M. Jones [et al.] // *Med Care.* – 2015. – V. 53, № 9. – P. 827-34.
20. Khairullah, A. R. A review of new emerging livestock-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* from pig farms / A. R. Khairullah, S. C. Kurniawan, M. H. Effendi [et al.] // *Vet World.* – 2023. – V. 16, № 1. – P. 46-58.
21. Cuny, C. Livestock associated MRSA (LA-MRSA) and its relevance for humans in Germany / C. Cuny, R. Kock, W. Witte // *Int J Med Microbiol.* – 2013. – V. 303, № 6-7. – P. 331-7.
22. van Alen, S. In the centre of an epidemic: Fifteen years of LA-MRSA CC398 at the University Hospital Munster / S. van Alen, B. Ballhausen, G. Peters [et al.] // *Vet Microbiol.* – 2017. – V. 200. – P. 19-24.
23. Larsen, J. Emergence of methicillin resistance predates the clinical use of antibiotics / J. Larsen, C. L. Raisen, X. Ba [et al.] // *Nature.* – 2022. – V. 602, № 7895. – P. 135-141.
24. Jolley, K. A. Open-access bacterial population genomics: BIGSdb software, the PubMLST.org website and their applications / K. A. Jolley, J. E. Bray, M. C. J. Maiden // *Wellcome Open Res.* – 2018. – V. 3. – P. 124.
25. Strauss, L. Origin, evolution, and global transmission of community-acquired *Staphylococcus*

- aureus ST8 / L. Strauss, M. Stegger, P. E. Akpaka [et al.] // Proc Natl Acad Sci U S A. – 2017. – V. 114, № 49. – P. E10596-E10604.
26. Gill, J. L. Evolutionary Processes Driving the Rise and Fall of *Staphylococcus aureus* ST239, a Dominant Hybrid Pathogen / J. L. Gill, J. Hedge, D. J. Wilson [et al.] // mBio. – 2021. – V. 12, № 6. – P. e0216821.
27. Stegger, M. Origin and evolution of European community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* / M. Stegger, T. Wirth, P. S. Andersen [et al.] // mBio. – 2014. – V. 5, № 5. – P. e01044-14.
28. Zhao, H. Phenotypic and genomic analysis of the hypervirulent ST22 methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in China / H. Zhao, X. Wu, B. Wang [et al.] // mSystems. – 2023. – V. 8, № 3. – P. e0124222.
29. Abrudan, M. I. Novel multidrug-resistant sublineages of *Staphylococcus aureus* clonal complex 22 discovered in India / M. I. Abrudan, V. Shamanna, A. Prasanna [et al.] // mSphere. – 2023. – P. e0018523.
30. Chang, Q. Genomic epidemiology of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* ST22 widespread in communities of the Gaza Strip, 2009 / Q. Chang, I. Abuellaish, A. Biber [et al.] // Euro Surveill. – 2018. – V. 23, № 34.
31. Baranovich, T. The first isolation of Pantone-Valentine leukocidin (PVL) positive community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (CA-MRSA) in Russia / T. Baranovich, V. Potapov, T. Yamamoto // Euro Surveill. – 2007. – V. 12, № 11. – P. E070315 4.
32. Baranovich, T. Molecular characterization and susceptibility of methicillin-resistant and methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* isolates from hospitals and the community in Vladivostok, Russia / T. Baranovich, H. Zaraket, Shabana, II [et al.] // Clin Microbiol Infect. – 2010. – V. 16, № 6. – P. 575-82.
33. Corrigan, R. M. c-di-AMP is a new second messenger in *Staphylococcus aureus* with a role in controlling cell size and envelope stress / R. M. Corrigan, J. C. Abbott, H. Burhenne [et al.] // PLoS Pathog. – 2011. – V. 7, № 9. – P. e1002217.
34. Corrigan, R. M. Systematic identification of conserved bacterial c-di-AMP receptor proteins / R. M. Corrigan, I. Campeotto, T. Jeganathan [et al.] // Proc Natl Acad Sci U S A. – 2013. – V. 110, № 22. – P. 9084-9.
35. Kourtis, A. P. Vital Signs: Epidemiology and Recent Trends in Methicillin-Resistant and in Methicillin-Susceptible *Staphylococcus aureus* Bloodstream Infections - United States / A. P. Kourtis, K. Hatfield, J. Baggs [et al.] // MMWR Morb Mortal Wkly Rep. – 2019. – V. 68, № 9. – P. 214-219.

36. Baym, M. Spatiotemporal microbial evolution on antibiotic landscapes / M. Baym, T. D. Lieberman, E. D. Kelsic [et al.] // *Science*. – 2016. – V. 353, № 6304. – P. 1147-51.
37. Гостев, В. В. Метициллинрезистентные золотистые стафилококки: проблема распространения в мире и России / В. В. Гостев, С. В. Сидоренко // *Фарматека*. – 2015. – Т. 299, № 6. – С. 30-38.
38. Гостев, В. В. Современные представления об устойчивости *Staphylococcus aureus* к бета-лактамным антибиотикам / В. В. Гостев, О. Е. Пунченко, С. В. Сидоренко // *Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия*. – 2021. – Т. 23, № 4. – С. 375-387.
39. Гостев, В. В. Гетерорезистентность: клиническое значение и методы выявления (обзор литературы) / В. В. Гостев, С. В. Сидоренко // *Клиническая лабораторная диагностика*. – 2023. – Т. 68, № 7. – С. 418-427.
40. DeLeo, F. R. Molecular differentiation of historic phage-type 80/81 and contemporary epidemic *Staphylococcus aureus* / F. R. DeLeo, A. D. Kennedy, L. Chen [et al.] // *Proc Natl Acad Sci U S A*. – 2011. – V. 108, № 44. – P. 18091-6.
41. van Duijkeren, E. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in pigs with exudative epidermitis / E. van Duijkeren, M. D. Jansen, S. C. Flemming [et al.] // *Emerg Infect Dis*. – 2007. – V. 13, № 9. – P. 1408-10.
42. Anjum, M. F. Livestock-Associated Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* From Animals and Animal Products in the UK / M. F. Anjum, F. Marco-Jimenez, D. Duncan [et al.] // *Front Microbiol*. – 2019. – V. 10. – P. 2136.
43. Laupland, K. B. The changing epidemiology of *Staphylococcus aureus* bloodstream infection: a multinational population-based surveillance study / K. B. Laupland, O. Lyytikainen, M. Sogaard [et al.] // *Clin Microbiol Infect*. – 2013. – V. 19, № 5. – P. 465-71.
44. Kallen, A. J. Health care-associated invasive MRSA infections, 2005-2008 / A. J. Kallen, Y. Mu, S. Bulens [et al.] // *JAMA*. – 2010. – V. 304, № 6. – P. 641-8.
45. Kaasch, A. J. *Staphylococcus aureus* bloodstream infection: a pooled analysis of five prospective, observational studies / A. J. Kaasch, G. Barlow, J. D. Edgeworth [et al.] // *J Infect*. – 2014. – V. 68, № 3. – P. 242-51.
46. van Hal, S. J. Predictors of mortality in *Staphylococcus aureus* Bacteremia / S. J. van Hal, S. O. Jensen, V. L. Vaska [et al.] // *Clin Microbiol Rev*. – 2012. – V. 25, № 2. – P. 362-86.
47. Bai, A. D. *Staphylococcus aureus* bacteraemia mortality: a systematic review and meta-analysis / A. D. Bai, C. K. L. Lo, A. S. Komorowski [et al.] // *Clin Microbiol Infect*. – 2022. – V. 28, № 8. – P. 1076-1084.
48. Giulieri, S. G. A statistical genomics framework to trace bacterial genomic predictors of

- clinical outcomes in *Staphylococcus aureus* bacteremia / S. G. Giulieri, R. Guerillot, N. E. Holmes [et al.] // *Cell Rep.* – 2023. – V. 42, № 9. – P. 113069.
49. Holland, T. L. Infective endocarditis / T. L. Holland, L. M. Baddour, A. S. Bayer [et al.] // *Nat Rev Dis Primers.* – 2016. – V. 2. – P. 16059.
50. Bangert, S. Bacterial resistance and impetigo treatment trends: a review / S. Bangert, M. Levy, A. A. Hebert // *Pediatr Dermatol.* – 2012. – V. 29, № 3. – P. 243-8.
51. Steer, A. C. High burden of impetigo and scabies in a tropical country / A. C. Steer, A. W. Jenney, J. Kado [et al.] // *PLoS Negl Trop Dis.* – 2009. – V. 3, № 6. – P. e467.
52. Chambers, H. F. Cellulitis, by any other name / H. F. Chambers // *Clin Infect Dis.* – 2013. – V. 56, № 12. – P. 1763-4.
53. Chauhan, S. Tropical pyomyositis (*myositis tropicans*): current perspective / S. Chauhan, S. Jain, S. Varma [et al.] // *Postgrad Med J.* – 2004. – V. 80, № 943. – P. 267-70.
54. Lewis, S. S. Assessing the relative burden of hospital-acquired infections in a network of community hospitals / S. S. Lewis, R. W. Moehring, L. F. Chen [et al.] // *Infect Control Hosp Epidemiol.* – 2013. – V. 34, № 11. – P. 1229-30.
55. Sievert, D. M. Antimicrobial-resistant pathogens associated with healthcare-associated infections: summary of data reported to the National Healthcare Safety Network at the Centers for Disease Control and Prevention, 2009-2010 / D. M. Sievert, P. Ricks, J. R. Edwards [et al.] // *Infect Control Hosp Epidemiol.* – 2013. – V. 34, № 1. – P. 1-14.
56. Bukowski, M. Exfoliative toxins of *Staphylococcus aureus* / M. Bukowski, B. Wladyka, G. Dubin // *Toxins (Basel).* – 2010. – V. 2, № 5. – P. 1148-65.
57. Nusman, C. M. Staphylococcal Scalded Skin Syndrome in Neonates: Case Series and Overview of Outbreaks / C. M. Nusman, C. Blokhuis, D. Pajkrt [et al.] // *Antibiotics (Basel).* – 2022. – V. 12, № 1.
58. Liy-Wong, C. Staphylococcal scalded skin syndrome: An epidemiological and clinical review of 84 cases / C. Liy-Wong, E. Pope, M. Weinstein [et al.] // *Pediatr Dermatol.* – 2021. – V. 38, № 1. – P. 149-153.
59. Sheehy, S. H. The microbiology of chronic osteomyelitis: prevalence of resistance to common empirical anti-microbial regimens / S. H. Sheehy, B. A. Atkins, P. Bejon [et al.] // *J Infect.* – 2010. – V. 60, № 5. – P. 338-43.
60. Inoue, S. Comparison of clinical features and outcomes of *staphylococcus aureus* vertebral osteomyelitis caused by methicillin-resistant and methicillin-sensitive strains / S. Inoue, T. Moriyama, Y. Horinouchi [et al.] // *Springerplus.* – 2013. – V. 2, № 1. – P. 283.
61. Josse, J. Staphylococcal Adhesion and Host Cell Invasion: Fibronectin-Binding and Other

- Mechanisms / J. Josse, F. Laurent, A. Diot // *Front Microbiol.* – 2017. – V. 8. – P. 2433.
62. Foster, T. J. The MSCRAMM Family of Cell-Wall-Anchored Surface Proteins of Gram-Positive Cocci / T. J. Foster // *Trends Microbiol.* – 2019. – V. 27, № 11. – P. 927-941.
63. Urish, K. L. Staphylococcus aureus Osteomyelitis: Bone, Bugs, and Surgery / K. L. Urish, J. E. Cassat // *Infect Immun.* – 2020. – V. 88, № 7.
64. Gimza, B. D. Mechanisms of Antibiotic Failure During Staphylococcus aureus Osteomyelitis / B. D. Gimza, J. E. Cassat // *Front Immunol.* – 2021. – V. 12. – P. 638085.
65. Shi, S. Interaction of Staphylococcus aureus with osteoblasts (Review) / S. Shi, X. Zhang // *Exp Ther Med.* – 2012. – V. 3, № 3. – P. 367-370.
66. Kahl, B. C. Clinical Significance and Pathogenesis of Staphylococcal Small Colony Variants in Persistent Infections / B. C. Kahl, K. Becker, B. Löffler // *Clin Microbiol Rev.* – 2016. – V. 29, № 2. – P. 401-27.
67. Masters, E. A. Skeletal infections: microbial pathogenesis, immunity and clinical management / E. A. Masters, B. F. Ricciardi, K. L. M. Bentley [et al.] // *Nat Rev Microbiol.* – 2022. – V. 20, № 7. – P. 385-400.
68. Nasser, A. A comprehensive review of bacterial osteomyelitis with emphasis on Staphylococcus aureus / A. Nasser, T. Azimi, S. Ostadmohammadi [et al.] // *Microb Pathog.* – 2020. – V. 148. – P. 104431.
69. Balwit, J. M. Gentamicin-resistant menadione and hemin auxotrophic Staphylococcus aureus persist within cultured endothelial cells / J. M. Balwit, P. van Langevelde, J. M. Vann [et al.] // *J Infect Dis.* – 1994. – V. 170, № 4. – P. 1033-7.
70. Kriegeskorte, A. Thymidine-Dependent Staphylococcus aureus Small-Colony Variants Are Induced by Trimethoprim-Sulfamethoxazole (SXT) and Have Increased Fitness during SXT Challenge / A. Kriegeskorte, N. I. Lore, A. Bragonzi [et al.] // *Antimicrob Agents Chemother.* – 2015. – V. 59, № 12. – P. 7265-72.
71. Gadsby, N. J. Comprehensive Molecular Testing for Respiratory Pathogens in Community-Acquired Pneumonia / N. J. Gadsby, C. D. Russell, M. P. McHugh [et al.] // *Clin Infect Dis.* – 2016. – V. 62, № 7. – P. 817-823.
72. Jain, S. Community-Acquired Pneumonia Requiring Hospitalization among U.S. Adults / S. Jain, W. H. Self, R. G. Wunderink [et al.] // *N Engl J Med.* – 2015. – V. 373, № 5. – P. 415-27.
73. Jain, S. Community-acquired pneumonia requiring hospitalization among U.S. children / S. Jain, D. J. Williams, S. R. Arnold [et al.] // *N Engl J Med.* – 2015. – V. 372, № 9. – P. 835-45.
74. Cuquemelle, E. Can procalcitonin help identify associated bacterial infection in patients with severe influenza pneumonia? A multicentre study / E. Cuquemelle, F. Soulis, D. Villers [et al.] //

Intensive Care Med. – 2011. – V. 37, № 5. – P. 796-800.

75. Sicot, N. Methicillin resistance is not a predictor of severity in community-acquired *Staphylococcus aureus* necrotizing pneumonia--results of a prospective observational study / N. Sicot, N. Khanafer, V. Meyssonier [et al.] // *Clin Microbiol Infect.* – 2013. – V. 19, № 3. – P. E142-8.

76. DeRyke, C. A. Epidemiology, treatment, and outcomes of nosocomial bacteremic *Staphylococcus aureus* pneumonia / C. A. DeRyke, T. P. Lodise, Jr., M. J. Rybak [et al.] // *Chest.* – 2005. – V. 128, № 3. – P. 1414-22.

77. DeLeo, F. R. An antidote for *Staphylococcus aureus* pneumonia? / F. R. DeLeo, M. Otto // *J Exp Med.* – 2008. – V. 205, № 2. – P. 271-4.

78. Aguilar, J. *Staphylococcus aureus* meningitis: case series and literature review / J. Aguilar, V. Urday-Cornejo, S. Donabedian [et al.] // *Medicine (Baltimore).* – 2010. – V. 89, № 2. – P. 117-125.

79. Teh, B. W. *Staphylococcus aureus* meningitis: barriers to treatment / B. W. Teh, M. A. Slavin // *Leuk Lymphoma.* – 2012. – V. 53, № 8. – P. 1443-4.

80. Demir, A. How Safe Is the Use of Intrathecal Vancomycin? / A. Demir, M. Camlar, G. C. Kuscu [et al.] // *World Neurosurg.* – 2022. – V. 160. – P. e55-e60.

81. Jaber, R. H. Daptomycin for the treatment of acute bacterial meningitis: A narrative review / R. H. Jaber, N. P. Beahm // *Int J Antimicrob Agents.* – 2023. – V. 61, № 5. – P. 106770.

82. Berger, S. Menstrual toxic shock syndrome: case report and systematic review of the literature / S. Berger, A. Kunerl, S. Wasmuth [et al.] // *Lancet Infect Dis.* – 2019. – V. 19, № 9. – P. e313-e321.

83. Kalyan, S. Staphylococcal toxic shock syndrome toxin-1 induces the translocation and secretion of high mobility group-1 protein from both activated T cells and monocytes / S. Kalyan, A. W. Chow // *Mediators Inflamm.* – 2008. – V. 2008. – P. 512196.

84. Javouhey, E. Similarities and Differences Between Staphylococcal and Streptococcal Toxic Shock Syndromes in Children: Results From a 30-Case Cohort / E. Javouhey, P. A. Bolze, C. Jamen [et al.] // *Front Pediatr.* – 2018. – V. 6. – P. 360.

85. Silvestre, C. Toxic shock syndrome: diagnosis and management / C. Silvestre, H. Vyas // *Paediatrics and Child Health.* – 2022. – V. 32, № 6. – P. 226-228.

86. Grispoli, L. *Staphylococcus aureus* enterotoxin in food of animal origin and staphylococcal food poisoning risk assessment from farm to table / L. Grispoli, M. Karama, A. Armani [et al.] // *Italian Journal of Animal Science.* – 2021. – V. 20, № 1. – P. 677-690.

87. Fisher, E. L. Basis of Virulence in Enterotoxin-Mediated Staphylococcal Food Poisoning / E.

- L. Fisher, M. Otto, G. Y. C. Cheung // *Front Microbiol.* – 2018. – V. 9. – P. 436.
88. Enright, M. C. Multilocus sequence typing for characterization of methicillin-resistant and methicillin-susceptible clones of *Staphylococcus aureus* / M. C. Enright, N. P. Day, C. E. Davies [et al.] // *J Clin Microbiol.* – 2000. – V. 38, № 3. – P. 1008-15.
89. Schaumburg, F. New epidemiology of *Staphylococcus aureus* infection in Africa / F. Schaumburg, A. S. Alabi, G. Peters [et al.] // *Clin Microbiol Infect.* – 2014. – V. 20, № 7. – P. 589-96.
90. Chen, C. J. New epidemiology of *Staphylococcus aureus* infection in Asia / C. J. Chen, Y. C. Huang // *Clin Microbiol Infect.* – 2014. – V. 20, № 7. – P. 605-23.
91. Wang, X. Identification of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* ST8 isolates in China with potential high virulence / X. Wang, H. Zhao, B. Wang [et al.] // *Emerg Microbes Infect.* – 2022. – V. 11, № 1. – P. 507-518.
92. Rodriguez-Noriega, E. Evolution of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clones in Latin America / E. Rodriguez-Noriega, C. Seas, M. Guzman-Blanco [et al.] // *Int J Infect Dis.* – 2010. – V. 14, № 7. – P. e560-6.
93. Williamson, D. A. *Staphylococcus aureus* 'Down Under': contemporary epidemiology of *S. aureus* in Australia, New Zealand, and the South West Pacific / D. A. Williamson, G. W. Coombs, G. R. Nimmo // *Clin Microbiol Infect.* – 2014. – V. 20, № 7. – P. 597-604.
94. Khokhlova, O. E. 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 / O. E. Khokhlova, W. C. Hung, T. W. Wan [et al.] // *PLoS One.* – 2015. – V. 10, № 6. – P. e0128017.
95. Афанасьев, М. В. Молекулярно-генетическая характеристика метициллин-устойчивых штаммов *Staphylococcus aureus*, выделенных в стационарах г. Москвы / М. В. Афанасьев, С. В. Каракашев, Ильина Е.Н. [и др.] // *Молекулярная генетика, микробиология и вирусология.* – 2010. – Т. 25, № 2. – С. 20-24.
96. Романов, А. В. Молекулярная эпидемиология внутрибольничных золотистых стафилококков в стационарах различных регионов России / А. В. Романов, М. В. Чернов, М. В. Эйдельштейн // *Молекулярная медицина.* – 2013. № 4. – С. 55-64.
97. Романов, А. В. Молекулярная эпидемиология штаммов *Staphylococcus aureus* в детских стационарах России / А. В. Романов, А. В. Дехнич, М. В. Эйдельштейн // *Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия.* – 2012. – Т. 14, № 3. – С. 201-208.
98. Vorobieva, V. Clinical isolates of *Staphylococcus aureus* from the Arkhangelsk region,

- Russia: antimicrobial susceptibility, molecular epidemiology, and distribution of Panton-Valentine leukocidin genes / V. Vorobieva, T. Bazhukova, A. M. Hanssen [et al.] // *APMIS : acta pathologica, microbiologica, et immunologica Scandinavica*. – 2008. – V. 116, № 10. – P. 877-87.
99. Ferry, T. Toxin gene content of the Lyon methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clone compared with that of other pandemic clones / T. Ferry, M. Bes, O. Dauwalder [et al.] // *J Clin Microbiol*. – 2006. – V. 44, № 7. – P. 2642-4.
100. Aanensen, D. M. Whole-Genome Sequencing for Routine Pathogen Surveillance in Public Health: a Population Snapshot of Invasive *Staphylococcus aureus* in Europe / D. M. Aanensen, E. J. Feil, M. T. Holden [et al.] // *mBio*. – 2016. – V. 7, № 3.
101. Hetem, D. J. Molecular epidemiology of MRSA in 13 ICUs from eight European countries / D. J. Hetem, L. P. G. Derde, J. Empel [et al.] // *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. – 2016. – V. 71, № 1. – P. 45-52.
102. Grundmann, H. The dynamic changes of dominant clones of *Staphylococcus aureus* causing bloodstream infections in the European region: results of a second structured survey / H. Grundmann, L. M. Schouls, D. M. Aanensen [et al.] // *Euro Surveill*. – 2014. – V. 19, № 49.
103. Robinson, D. A. Evolutionary models of the emergence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* / D. A. Robinson, M. C. Enright // *Antimicrob Agents Chemother*. – 2003. – V. 47, № 12. – P. 3926-34.
104. Robinson, D. A. Evolution of *Staphylococcus aureus* by large chromosomal replacements / D. A. Robinson, M. C. Enright // *J Bacteriol*. – 2004. – V. 186, № 4. – P. 1060-4.
105. Harris, S. R. Evolution of MRSA During Hospital Transmission and Intercontinental Spread / S. R. Harris, E. J. Feil, M. T. G. Holden [et al.] // *Science*. – 2010. – V. 327, № 5964. – P. 469-474.
106. Knight, G. M. Shift in dominant hospital-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (HA-MRSA) clones over time / G. M. Knight, E. L. Budd, L. Whitney [et al.] // *J Antimicrob Chemother*. – 2012. – V. 67, № 10. – P. 2514-22.
107. Witte, W. Widespread dissemination of epidemic MRSA in German hospitals / W. Witte, C. Cuny, C. Bräulke [et al.] // *Euro Surveill*. – 1997. – V. 2, № 4. – P. 25-28.
108. Holden, M. T. G. A genomic portrait of the emergence, evolution, and global spread of a methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* pandemic / M. T. G. Holden, L.-Y. Hsu, K. Kurt [et al.] // *Genome Research*. – 2013. – V. 23, № 4. – P. 653-664.
109. Biber, A. A typical hospital-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clone is widespread in the community in the Gaza strip / A. Biber, I. Abuelaish, G. Rahav [et al.] // *PLoS One*. – 2012. – V. 7, № 8. – P. e42864.

110. Abou Shady, H. M. Staphylococcus aureus nasal carriage among outpatients attending primary health care centers: a comparative study of two cities in Saudi Arabia and Egypt / H. M. Abou Shady, A. E. Bakr, M. E. Hashad [et al.] // *Braz J Infect Dis.* – 2015. – V. 19, № 1. – P. 68-76.
111. Aqel, A. A. Molecular epidemiology of nasal isolates of methicillin-resistant Staphylococcus aureus from Jordan / A. A. Aqel, H. M. Alzoubi, A. Vickers [et al.] // *J Infect Public Health.* – 2015. – V. 8, № 1. – P. 90-7.
112. Senok, A. Diversity of methicillin-resistant Staphylococcus aureus CC22-MRSA-IV from Saudi Arabia and the Gulf region / A. Senok, A. Somily, A. Raji [et al.] // *Int J Infect Dis.* – 2016. – V. 51. – P. 31-35.
113. Monecke, S. Diversity of SCCmec Elements in Staphylococcus aureus as Observed in South-Eastern Germany / S. Monecke, L. Jatzwauk, E. Muller [et al.] // *PLoS One.* – 2016. – V. 11, № 9. – P. e0162654.
114. Geraci, D. M. Methicillin-resistant Staphylococcus aureus colonization: a three-year prospective study in a neonatal intensive care unit in Italy / D. M. Geraci, M. Giuffre, C. Bonura [et al.] // *PLoS One.* – 2014. – V. 9, № 2. – P. e87760.
115. Graveland, H. Livestock-associated methicillin-resistant Staphylococcus aureus in animals and humans / H. Graveland, B. Duim, E. van Duijkeren [et al.] // *International Journal of Medical Microbiology.* – 2011. – V. 301, № 8. – P. 630-634.
116. Spoor, L. E. Livestock origin for a human pandemic clone of community-associated methicillin-resistant Staphylococcus aureus / L. E. Spoor, P. R. McAdam, L. A. Weinert [et al.] // *MBio.* – 2013. – V. 4, № 4.
117. Huh, K. Changing epidemiology of community-associated methicillin-resistant Staphylococcus aureus in the Asia-Pacific region / K. Huh, D. R. Chung // *Expert Rev Anti Infect Ther.* – 2016. – P. 1-16.
118. Wan, T. W. Complete Circular Genome Sequence of Successful ST8/SCCmecIV Community-Associated Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus (OC8) in Russia: One-Megabase Genomic Inversion, IS256's Spread, and Evolution of Russia ST8-IV / T. W. Wan, O. E. Khokhlova, Y. Iwao [et al.] // *PLoS One.* – 2016. – V. 11, № 10. – P. e0164168.
119. Gorwitz, Rachel J. Changes in the Prevalence of Nasal Colonization with Staphylococcus aureus in the United States, 2001–2004 / Rachel J. Gorwitz, D. Kruszon-Moran, Sigrid K. McAllister [et al.] // *The Journal of Infectious Diseases.* – 2008. – V. 197, № 9. – P. 1226-1234.
120. Turner, N. A. Methicillin-resistant Staphylococcus aureus: an overview of basic and clinical research / N. A. Turner, B. K. Sharma-Kuinkel, S. A. Maskarinec [et al.] // *Nat Rev Microbiol.* –

2019. – V. 17, № 4. – P. 203-218.

121. Rohde, H. Newly identified risk factors for MRSA carriage in The Netherlands / H. Rohde, W. S. N. Lekkerkerk, A. Haenen [et al.] // *Plos One*. – 2017. – V. 12, № 11. – P. e0188502.

122. Schechter-Perkins, E. M. Prevalence and Predictors of Nasal and Extranasal Staphylococcal Colonization in Patients Presenting to the Emergency Department / E. M. Schechter-Perkins, P. M. Mitchell, K. A. Murray [et al.] // *Annals of Emergency Medicine*. – 2011. – V. 57, № 5. – P. 492-499.

123. Karanika, S. Colonization With Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and Risk for Infection Among Asymptomatic Athletes: A Systematic Review and Metaanalysis / S. Karanika, T. Kinamon, C. Grigoras [et al.] // *Clinical Infectious Diseases*. – 2016. – V. 63, № 2. – P. 195-204.

124. Huang, Susan S. Strain-Relatedness of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Isolates Recovered from Patients with Repeated Infection / Susan S. Huang, Daniel J. Diekema, David K. Warren [et al.] // *Clinical Infectious Diseases*. – 2008. – V. 46, № 8. – P. 1241-1247.

125. Calderwood, M. S. Staphylococcal Enterotoxin P Predicts Bacteremia in Hospitalized Patients Colonized With Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* / M. S. Calderwood, C. A. Desjardins, G. Sakoulas [et al.] // *Journal of Infectious Diseases*. – 2013. – V. 209, № 4. – P. 571-577.

126. Iwase, T. *Staphylococcus epidermidis* Esp inhibits *Staphylococcus aureus* biofilm formation and nasal colonization / T. Iwase, Y. Uehara, H. Shinji [et al.] // *Nature*. – 2010. – V. 465, № 7296. – P. 346-349.

127. Zipperer, A. Human commensals producing a novel antibiotic impair pathogen colonization / A. Zipperer, M. C. Konnerth, C. Laux [et al.] // *Nature*. – 2016. – V. 535, № 7613. – P. 511-516.

128. Matheson, A. Nasal Swab Screening for Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*—How Well Does It Perform? A Cross-Sectional Study / A. Matheson, P. Christie, T. Stari [et al.] // *Infection Control & Hospital Epidemiology*. – 2015. – V. 33, № 8. – P. 803-808.

129. McKinnell, J. A. Quantifying the Impact of Extranasal Testing of Body Sites for Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Colonization at the Time of Hospital or Intensive Care Unit Admission / J. A. McKinnell, S. S. Huang, S. J. Eells [et al.] // *Infection Control & Hospital Epidemiology*. – 2015. – V. 34, № 2. – P. 161-170.

130. Harbarth, S. Universal Screening for Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* at Hospital Admission and Nosocomial Infection in Surgical Patients / S. Harbarth // *Jama*. – 2008. – V. 299, № 10. – P. 1149.

131. Jog, S. Impact of preoperative screening for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by

- real-time polymerase chain reaction in patients undergoing cardiac surgery / S. Jog, R. Cunningham, S. Cooper [et al.] // *Journal of Hospital Infection*. – 2008. – V. 69, № 2. – P. 124-130.
132. Climo, M. W. Effect of Daily Chlorhexidine Bathing on Hospital-Acquired Infection / M. W. Climo, D. S. Yokoe, D. K. Warren [et al.] // *New England Journal of Medicine*. – 2013. – V. 368, № 6. – P. 533-542.
133. Kim, M. W. The association between community-associated *Staphylococcus aureus* colonization and disease: a meta-analysis / M. W. Kim, B. K. Greenfield, R. E. Snyder [et al.] // *BMC Infectious Diseases*. – 2018. – V. 18, № 1.
134. Paling, F. P. Association of *Staphylococcus aureus* Colonization and Pneumonia in the Intensive Care Unit / F. P. Paling, D. Hazard, M. J. M. Bonten [et al.] // *JAMA Network Open*. – 2020. – V. 3, № 9. – P. e2012741.
135. Huang, S. S. Targeted versus Universal Decolonization to Prevent ICU Infection / S. S. Huang, E. Septimus, K. Kleinman [et al.] // *New England Journal of Medicine*. – 2013. – V. 368, № 24. – P. 2255-2265.
136. Kirby, W. M. Extraction of a Highly Potent Penicillin Inactivator from Penicillin Resistant *Staphylococci* / W. M. Kirby // *Science*. – 1944. – V. 99, № 2579. – P. 452-3.
137. Jevons, M. P. “Celbenin” - resistant *Staphylococci* / M. P. Jevons // *Br Med J*. . – 1961. – V. 1(5219), № 14. – P. 124-125.
138. Acar, J. F. Methicillin-resistant staphylococcemia: bacteriological failure of treatment with cephalosporins / J. F. Acar, P. Courvalin, Y. A. Chabbert // *Antimicrob Agents Chemother (Bethesda)*. – 1970. – V. 10. – P. 280-5.
139. Ambler, R. P. The structure of beta-lactamases / R. P. Ambler // *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. – 1980. – V. 289, № 1036. – P. 321-31.
140. Bush, K. beta-Lactams and beta-Lactamase Inhibitors: An Overview / K. Bush, P. A. Bradford // *Cold Spring Harb Perspect Med*. – 2016. – V. 6, № 8.
141. Voladri, R. K. Characterization of a chromosomal gene encoding type B beta-lactamase in phage group II isolates of *Staphylococcus aureus* / R. K. Voladri, D. S. Kernodle // *Antimicrob Agents Chemother*. – 1998. – V. 42, № 12. – P. 3163-8.
142. Voladri, R. K. Structure-function relationships among wild-type variants of *Staphylococcus aureus* beta-lactamase: importance of amino acids 128 and 216 / R. K. Voladri, M. K. Tummuru, D. S. Kernodle // *J Bacteriol*. – 1996. – V. 178, № 24. – P. 7248-53.
143. Lenhard, J. R. Inoculum effect of beta-lactam antibiotics / J. R. Lenhard, Z. P. Bulman // *J Antimicrob Chemother*. – 2019. – V. 74, № 10. – P. 2825-2843.

144. Song, K. H. Characteristics of cefazolin inoculum effect-positive methicillin-susceptible staphylococcus aureus infection in a multicentre bacteraemia cohort / K. H. Song, S. I. Jung, S. Lee [et al.] // *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* – 2017. – V. 36, № 2. – P. 285-294.
145. Chong, Y. P. Prevalence of blaZ gene types and the cefazolin inoculum effect among methicillin-susceptible Staphylococcus aureus blood isolates and their association with multilocus sequence types and clinical outcome / Y. P. Chong, S. J. Park, E. S. Kim [et al.] // *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* – 2015. – V. 34, № 2. – P. 349-55.
146. Carvajal, L. P. Novel Insights into the Classification of Staphylococcal beta-Lactamases in Relation to the Cefazolin Inoculum Effect / L. P. Carvajal, S. Rincon, A. M. Echeverri [et al.] // *Antimicrob Agents Chemother.* – 2020. – V. 64, № 5.
147. Kaase, M. Comparison of phenotypic methods for penicillinase detection in Staphylococcus aureus / M. Kaase, S. Lenga, S. Friedrich [et al.] // *Clin Microbiol Infect.* – 2008. – V. 14, № 6. – P. 614-6.
148. El Feghaly, R. E. Presence of the bla(Z) beta-lactamase gene in isolates of Staphylococcus aureus that appear penicillin susceptible by conventional phenotypic methods / R. E. El Feghaly, J. E. Stamm, S. A. Fritz [et al.] // *Diagn Microbiol Infect Dis.* – 2012. – V. 74, № 4. – P. 388-93.
149. Rincon, S. A Test for the Rapid Detection of the Cefazolin Inoculum Effect in Methicillin-Susceptible Staphylococcus aureus / S. Rincon, L. P. Carvajal, S. I. Gomez-Villegas [et al.] // *J Clin Microbiol.* – 2021. – V. 59, № 4.
150. Becker, K. Plasmid-Encoded Transferable mecB-Mediated Methicillin Resistance in Staphylococcus aureus / K. Becker, S. van Alen, E. A. Idelevich [et al.] // *Emerg Infect Dis.* – 2018. – V. 24, № 2. – P. 242-248.
151. Garcia-Alvarez, L. Methicillin-resistant Staphylococcus aureus with a novel mecA homologue in human and bovine populations in the UK and Denmark: a descriptive study / L. Garcia-Alvarez, M. T. Holden, H. Lindsay [et al.] // *Lancet Infect Dis.* – 2011. – V. 11, № 8. – P. 595-603.
152. Gomez, P. Genomic Analysis of Staphylococcus aureus of the Lineage CC130, Including mecC-Carrying MRSA and MSSA Isolates Recovered of Animal, Human, and Environmental Origins / P. Gomez, L. Ruiz-Ripa, R. Fernandez-Fernandez [et al.] // *Front Microbiol.* – 2021. – V. 12. – P. 655994.
153. Lakhundi, S. Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus: Molecular Characterization, Evolution, and Epidemiology / S. Lakhundi, K. Zhang // *Clin Microbiol Rev.* – 2018. – V. 31, № 4.
154. Urushibara, N. Novel staphylococcal cassette chromosome mec (SCCmec) type XIV (5A) and a truncated SCCmec element in SCC composite islands carrying speG in ST5 MRSA in Japan

/ N. Urushibara, M. S. Aung, M. Kawaguchiya [et al.] // *J Antimicrob Chemother.* – 2020. – V. 75, № 1. – P. 46-50.

155. Wang, W. Novel SCCmec type XV (7A) and two pseudo-SCCmec variants in foodborne MRSA in China / W. Wang, Y. Hu, M. Baker [et al.] // *J Antimicrob Chemother.* – 2022. – V. 77, № 4. – P. 903-909.

156. Maslanova, I. Bacteriophages of *Staphylococcus aureus* efficiently package various bacterial genes and mobile genetic elements including SCCmec with different frequencies / I. Maslanova, J. Doskar, M. Varga [et al.] // *Environ Microbiol Rep.* – 2013. – V. 5, № 1. – P. 66-73.

157. Ray, M. D. Transfer of the methicillin resistance genomic island among staphylococci by conjugation / M. D. Ray, S. Boundy, G. L. Archer // *Mol Microbiol.* – 2016. – V. 100, № 4. – P. 675-85.

158. Tsubakishita, S. Origin and molecular evolution of the determinant of methicillin resistance in staphylococci / S. Tsubakishita, K. Kuwahara-Arai, T. Sasaki [et al.] // *Antimicrob Agents Chemother.* – 2010. – V. 54, № 10. – P. 4352-9.

159. Pardos de la Gandara, M. Genetic Determinants of High-Level Oxacillin Resistance in Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* / M. Pardos de la Gandara, V. Borges, M. Chung [et al.] // *Antimicrob Agents Chemother.* – 2018. – V. 62, № 6.

160. Dordel, J. Novel determinants of antibiotic resistance: identification of mutated loci in highly methicillin-resistant subpopulations of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* / J. Dordel, C. Kim, M. Chung [et al.] // *mBio.* – 2014. – V. 5, № 2. – P. e01000.

161. Gallagher, L. A. Tandem Amplification of the Staphylococcal Cassette Chromosome mec Element Can Drive High-Level Methicillin Resistance in Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* / L. A. Gallagher, S. Coughlan, N. S. Black [et al.] // *Antimicrob Agents Chemother.* – 2017. – V. 61, № 9.

162. Aiba, Y. Mutation of RNA polymerase beta-subunit gene promotes heterogeneous-to-homogeneous conversion of beta-lactam resistance in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* / Y. Aiba, Y. Katayama, T. Hishinuma [et al.] // *Antimicrob Agents Chemother.* – 2013. – V. 57, № 10. – P. 4861-71.

163. Hiramatsu, K. Analysis of borderline-resistant strains of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* using polymerase chain reaction / K. Hiramatsu, H. Kihara, T. Yokota // *Microbiol Immunol.* – 1992. – V. 36, № 5. – P. 445-53.

164. Hososaka, Y. Characterization of oxacillin-susceptible mecA-positive *Staphylococcus aureus*: a new type of MRSA / Y. Hososaka, H. Hanaki, H. Endo [et al.] // *J Infect Chemother.* – 2007. – V. 13, № 2. – P. 79-86.

165. Bignardi, G. E. Detection of the *mec-A* gene and phenotypic detection of resistance in *Staphylococcus aureus* isolates with borderline or low-level methicillin resistance / G. E. Bignardi, N. Woodford, A. Chapman [et al.] // *J Antimicrob Chemother.* – 1996. – V. 37, № 1. – P. 53-63.
166. Duarte, F. C. Fatal sepsis caused by *mecA*-positive oxacillin-susceptible *Staphylococcus aureus*: First report in a tertiary hospital of southern Brazil / F. C. Duarte, T. Danelli, E. R. Tavares [et al.] // *J Infect Chemother.* – 2019. – V. 25, № 4. – P. 293-297.
167. Kime, L. Transient Silencing of Antibiotic Resistance by Mutation Represents a Significant Potential Source of Unanticipated Therapeutic Failure / L. Kime, C. P. Randall, F. I. Banda [et al.] // *mBio.* – 2019. – V. 10, № 5.
168. Goering, R. V. Emergence of Oxacillin Resistance in Stealth Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Due to *mecA* Sequence Instability / R. V. Goering, E. A. Swartzendruber, A. E. Obradovich [et al.] // *Antimicrob Agents Chemother.* – 2019. – V. 63, № 8.
169. Sharff, K. A. Genotypic resistance testing creates new treatment challenges: two cases of oxacillin-susceptible methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* / K. A. Sharff, S. Monecke, S. Slaughter [et al.] // *J Clin Microbiol.* – 2012. – V. 50, № 12. – P. 4151-3.
170. Andrade-Figueiredo, M. Clonal diversity and epidemiological characteristics of *Staphylococcus aureus*: high prevalence of oxacillin-susceptible *mecA*-positive *Staphylococcus aureus* (OS-MRSA) associated with clinical isolates in Brazil / M. Andrade-Figueiredo, T. C. Leal-Balbino // *BMC Microbiol.* – 2016. – V. 16, № 1. – P. 115.
171. Saeed, K. Oxacillin-susceptible MRSA, the emerging MRSA clone in the UK? / K. Saeed, M. Dryden, R. Parnaby // *J Hosp Infect.* – 2010. – V. 76, № 3. – P. 267-8.
172. Saeed, K. Oxacillin-susceptible methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (OS-MRSA), a hidden resistant mechanism among clinically significant isolates in the Wessex region/UK / K. Saeed, N. Ahmad, M. Dryden [et al.] // *Infection.* – 2014. – V. 42, № 5. – P. 843-7.
173. Ikonomidis, A. In vitro and in vivo evaluations of oxacillin efficiency against *mecA*-positive oxacillin-susceptible *Staphylococcus aureus* / A. Ikonomidis, G. Michail, A. Vasdeki [et al.] // *Antimicrob Agents Chemother.* – 2008. – V. 52, № 11. – P. 3905-8.
174. Witte, W. Detection of low-level oxacillin resistance in *mecA*-positive *Staphylococcus aureus* / W. Witte, B. Pasemann, C. Cuny // *Clin Microbiol Infect.* – 2007. – V. 13, № 4. – P. 408-12.
175. Conceicao, T. Frequent occurrence of oxacillin-susceptible *mecA*-positive *Staphylococcus aureus* (OS-MRSA) strains in two African countries / T. Conceicao, C. Coelho, H. de Lencastre [et al.] // *J Antimicrob Chemother.* – 2015. – V. 70, № 12. – P. 3200-4.
176. Zeinalpour Ahrabi, S. Incidence of Oxacillin-Susceptible *mecA*-Positive *Staphylococcus*

- aureus (OS-MRSA) Isolates and TSST-1 Virulence Factor Among High School Students in Tabriz, Northwest of Iran / S. Zeinalpour Ahrabi, L. Rahbarnia, A. Dehnad [et al.] // . – 2019. – V. 14, № 4. – P. e85341.
177. Mistry, H. Prevalence and Characterization of Oxacillin Susceptible *mecA*-Positive Clinical Isolates of *Staphylococcus aureus* Causing Bovine Mastitis in India / H. Mistry, P. Sharma, S. Mahato [et al.] // PLoS One. – 2016. – V. 11, № 9. – P. e0162256.
178. Liu, J. L. Current status of oxacillin-susceptible *mecA*-positive *Staphylococcus aureus* infection in Shanghai, China: A multicenter study / J. L. Liu, T. M. Li, N. Zhong [et al.] // J Microbiol Immunol Infect. – 2021. – V. 54, № 6. – P. 1070-1077.
179. Ma, M. First Report of Oxacillin Susceptible *mecA*-Positive *Staphylococcus aureus* in a Children's Hospital in Kunming, China / M. Ma, M. Chu, L. Tao [et al.] // Infect Drug Resist. – 2021. – V. 14. – P. 2597-2606.
180. Song, Y. Characterisation of clinical isolates of oxacillin-susceptible *mecA*-positive *Staphylococcus aureus* in China from 2009 to 2014 / Y. Song, L. Cui, Y. Lv [et al.] // J Glob Antimicrob Resist. – 2017. – V. 11. – P. 1-3.
181. Fabri, F. V. First report of oxacillin-susceptible *mecA*-positive *Staphylococcus aureus* in healthy dogs and their owners in southern Brazil / F. V. Fabri, N. B. Pinto, M. S. F. Mattos [et al.] // Prev Vet Med. – 2021. – V. 189. – P. 105286.
182. Pu, W. High incidence of oxacillin-susceptible *mecA*-positive *Staphylococcus aureus* (OS-MRSA) associated with bovine mastitis in China / W. Pu, Y. Su, J. Li [et al.] // PLoS One. – 2014. – V. 9, № 2. – P. e88134.
183. Zhang, P. Characterization of Oxacillin-Susceptible *mecA*-Positive *Staphylococcus aureus* from Food Poisoning Outbreaks and Retail Foods in China / P. Zhang, X. Miao, L. Zhou [et al.] // Foodborne Pathog Dis. – 2020. – V. 17, № 11. – P. 728-734.
184. Luo, R. Characterization of an Oxacillin-Susceptible *mecA*-Positive *Staphylococcus aureus* Isolate from an Imported Meat Product / R. Luo, L. Zhao, P. Du [et al.] // Microb Drug Resist. – 2020. – V. 26, № 2. – P. 89-93.
185. Quijada, N. M. Oxacillin-susceptible *mecA*-positive *Staphylococcus aureus* associated with processed food in Europe / N. M. Quijada, M. Hernandez, E. A. Oniciuc [et al.] // Food Microbiol. – 2019. – V. 82. – P. 107-110.
186. Hryniewicz, M. M. Borderline oxacillin-resistant *Staphylococcus aureus* (BORSA) - a more common problem than expected? / M. M. Hryniewicz, K. Garbacz // J Med Microbiol. – 2017. – V. 66, № 10. – P. 1367-1373.
187. McDougal, L. K. The role of beta-lactamase in staphylococcal resistance to penicillinase-

- resistant penicillins and cephalosporins / L. K. McDougal, C. Thornsberry // *J Clin Microbiol.* – 1986. – V. 23, № 5. – P. 832-9.
188. Jorgensen, J. H. Mechanisms of methicillin resistance in *Staphylococcus aureus* and methods for laboratory detection / J. H. Jorgensen // *Infect Control Hosp Epidemiol.* – 1991. – V. 12, № 1. – P. 14-9.
189. Leahy, T. R. Epidemiology of borderline oxacillin-resistant *Staphylococcus aureus* in pediatric cystic fibrosis / T. R. Leahy, Y. C. Yau, E. Atenafu [et al.] // *Pediatr Pulmonol.* – 2011. – V. 46, № 5. – P. 489-96.
190. Sawhney, S. S. Comparative Genomics of Borderline Oxacillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Detected during a Pseudo-outbreak of Methicillin-Resistant *S. aureus* in a Neonatal Intensive Care Unit / S. S. Sawhney, E. M. Ransom, M. A. Wallace [et al.] // *mBio.* – 2022. – V. 13, № 1. – P. e0319621.
191. Balslev, U. An outbreak of borderline oxacillin-resistant *Staphylococcus aureus* (BORSA) in a dermatological unit / U. Balslev, A. Bremmelgaard, E. Svejgaard [et al.] // *Microb Drug Resist.* – 2005. – V. 11, № 1. – P. 78-81.
192. Skinner, S. Failure of cloxacillin in treatment of a patient with borderline oxacillin-resistant *Staphylococcus aureus* endocarditis / S. Skinner, M. Murray, T. Walus [et al.] // *J Clin Microbiol.* – 2009. – V. 47, № 3. – P. 859-61.
193. Brennan, G. I. Evaluation of commercial chromogenic media for the detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* / G. I. Brennan, C. Herra, D. C. Coleman [et al.] // *J Hosp Infect.* – 2016. – V. 92, № 3. – P. 287-92.
194. Yin, W. A decade of research on the second messenger c-di-AMP / W. Yin, X. Cai, H. Ma [et al.] // *FEMS Microbiol Rev.* – 2020. – V. 44, № 6. – P. 701-724.
195. Ba, X. Truncation of GdpP mediates beta-lactam resistance in clinical isolates of *Staphylococcus aureus* / X. Ba, L. Kalmar, N. F. Hadjirin [et al.] // *J Antimicrob Chemother.* – 2019. – V. 74, № 5. – P. 1182-1191.
196. Banerjee, R. A *mecA*-negative strain of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* with high-level beta-lactam resistance contains mutations in three genes / R. Banerjee, M. Gretes, C. Harlem [et al.] // *Antimicrob Agents Chemother.* – 2010. – V. 54, № 11. – P. 4900-2.
197. Argudin, M. A. In vitro activity of ceftaroline against clinical *Staphylococcus aureus* isolates collected during a national survey conducted in Belgian hospitals / M. A. Argudin, M. Dodemont, M. Taguemont [et al.] // *J Antimicrob Chemother.* – 2017. – V. 72, № 1. – P. 56-59.
198. Gostev, V. In Vitro Ceftaroline Resistance Selection of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Involves Different Genetic Pathways / V. Gostev, J. Sopova, O. Kalinogorskaya [et al.] //

Microb Drug Resist. – 2019. – V. 25, № 10. – P. 1401-1409.

199. Greninger, A. L. Whole-Genome Sequencing of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Resistant to Fifth-Generation Cephalosporins Reveals Potential Non-mecA Mechanisms of Resistance / A. L. Greninger, S. S. Chatterjee, L. C. Chan [et al.] // PLoS One. – 2016. – V. 11, № 2. – P. e0149541.

200. Dengler, V. Mutation in the C-di-AMP cyclase *dacA* affects fitness and resistance of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* / V. Dengler, N. McCallum, P. Kiefer [et al.] // PLoS One. – 2013. – V. 8, № 8. – P. e73512.

201. Chang, S. Infection with vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* containing the *vanA* resistance gene / S. Chang, D. M. Sievert, J. C. Hageman [et al.] // N Engl J Med. – 2003. – V. 348, № 14. – P. 1342-7.

202. Courvalin, P. Vancomycin resistance in gram-positive cocci / P. Courvalin // Clin Infect Dis. – 2006. – V. 42 Suppl 1. – P. S25-34.

203. Cong, Y. Vancomycin resistant *Staphylococcus aureus* infections: A review of case updating and clinical features / Y. Cong, S. Yang, X. Rao // J Adv Res. – 2020. – V. 21. – P. 169-176.

204. Hiramatsu, K. Vancomycin-intermediate resistance in *Staphylococcus aureus* / K. Hiramatsu, Y. Kayayama, M. Matsuo [et al.] // J Glob Antimicrob Resist. – 2014. – V. 2, № 4. – P. 213-224.

205. Casapao, A. M. Evaluation of vancomycin population susceptibility analysis profile as a predictor of outcomes for patients with infective endocarditis due to methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* / A. M. Casapao, S. L. Davis, J. P. McRoberts [et al.] // Antimicrob Agents Chemother. – 2014. – V. 58, № 8. – P. 4636-41.

206. van Hal, S. J. The clinical significance of vancomycin minimum inhibitory concentration in *Staphylococcus aureus* infections: a systematic review and meta-analysis / S. J. van Hal, T. P. Lodise, D. L. Paterson // Clin Infect Dis. – 2012. – V. 54, № 6. – P. 755-71.

207. Hu, Q. Molecular Events for Promotion of Vancomycin Resistance in Vancomycin Intermediate *Staphylococcus aureus* / Q. Hu, H. Peng, X. Rao // Front Microbiol. – 2016. – V. 7. – P. 1601.

208. Katayama, Y. Prevalence of Slow-Growth Vancomycin Nonsusceptibility in Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* / Y. Katayama, T. Azechi, M. Miyazaki [et al.] // Antimicrob Agents Chemother. – 2017. – V. 61, № 11.

209. Saito, M. "Slow VISA," a novel phenotype of vancomycin resistance, found in vitro in heterogeneous vancomycin-intermediate *Staphylococcus aureus* strain Mu3 / M. Saito, Y. Katayama, T. Hishinuma [et al.] // Antimicrob Agents Chemother. – 2014. – V. 58, № 9. – P. 5024-35.

210. Shariati, A. Global prevalence and distribution of vancomycin resistant, vancomycin intermediate and heterogeneously vancomycin intermediate *Staphylococcus aureus* clinical isolates: a systematic review and meta-analysis / A. Shariati, M. Dadashi, M. T. Moghadam [et al.] // *Sci Rep.* – 2020. – V. 10, № 1. – P. 12689.
211. Zhanel, G. G. New lipoglycopeptides: a comparative review of dalbavancin, oritavancin and telavancin / G. G. Zhanel, D. Calic, F. Schweizer [et al.] // *Drugs.* – 2010. – V. 70, № 7. – P. 859-86.
212. Zeng, D. Approved Glycopeptide Antibacterial Drugs: Mechanism of Action and Resistance / D. Zeng, D. Debabov, T. L. Hartsell [et al.] // *Cold Spring Harb Perspect Med.* – 2016. – V. 6, № 12.
213. Blaskovich, M. A. T. Developments in Glycopeptide Antibiotics / M. A. T. Blaskovich, K. A. Hansford, M. S. Butler [et al.] // *ACS Infect Dis.* – 2018. – V. 4, № 5. – P. 715-735.
214. Duncan, L. R. Telavancin activity in vitro tested against a worldwide collection of Gram-positive clinical isolates (2014) / L. R. Duncan, H. S. Sader, J. I. Smart [et al.] // *J Glob Antimicrob Resist.* – 2017. – V. 10. – P. 271-276.
215. Werth, B. J. Emergence of dalbavancin non-susceptible, vancomycin-intermediate *Staphylococcus aureus* (VISA) after treatment of MRSA central line-associated bloodstream infection with a dalbavancin- and vancomycin-containing regimen / B. J. Werth, R. Jain, A. Hahn [et al.] // *Clin Microbiol Infect.* – 2018. – V. 24, № 4. – P. 429 e1-429 e5.
216. Kussmann, M. Emergence of a dalbavancin induced glycopeptide/lipoglycopeptide non-susceptible *Staphylococcus aureus* during treatment of a cardiac device-related endocarditis / M. Kussmann, M. Karer, M. Obermueller [et al.] // *Emerg Microbes Infect.* – 2018. – V. 7, № 1. – P. 202.
217. Humphries, R. M. A current perspective on daptomycin for the clinical microbiologist / R. M. Humphries, S. Pollett, G. Sakoulas // *Clin Microbiol Rev.* – 2013. – V. 26, № 4. – P. 759-80.
218. Jones, T. Failures in clinical treatment of *Staphylococcus aureus* Infection with daptomycin are associated with alterations in surface charge, membrane phospholipid asymmetry, and drug binding / T. Jones, M. R. Yeaman, G. Sakoulas [et al.] // *Antimicrob Agents Chemother.* – 2008. – V. 52, № 1. – P. 269-78.
219. Saravolatz, L. D. Ceftaroline: a novel cephalosporin with activity against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* / L. D. Saravolatz, G. E. Stein, L. B. Johnson // *Clin Infect Dis.* – 2011. – V. 52, № 9. – P. 1156-63.
220. Abate, G. Ceftaroline: Systematic Review of Clinical Uses and Emerging Drug Resistance / G. Abate, G. Wang, J. Frisby // *Ann Pharmacother.* – 2022. – V. 56, № 12. – P. 1339-1348.

221. Chung, M. Comparative study of the susceptibilities of major epidemic clones of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* to oxacillin and to the new broad-spectrum cephalosporin ceftobiprole / M. Chung, A. Antignac, C. Kim [et al.] // *Antimicrob Agents Chemother.* – 2008. – V. 52, № 8. – P. 2709-17.
222. Sakoulas, G. Antimicrobial salvage therapy for persistent staphylococcal bacteremia using daptomycin plus ceftaroline / G. Sakoulas, P. A. Moise, A. M. Casapao [et al.] // *Clin Ther.* – 2014. – V. 36, № 10. – P. 1317-33.
223. Barber, K. E. Potent synergy of ceftobiprole plus daptomycin against multiple strains of *Staphylococcus aureus* with various resistance phenotypes / K. E. Barber, B. J. Werth, C. E. Ireland [et al.] // *J Antimicrob Chemother.* – 2014. – V. 69, № 11. – P. 3006-10.
224. Barber, K. E. Observation of "seesaw effect" with vancomycin, teicoplanin, daptomycin and ceftaroline in 150 unique MRSA strains / K. E. Barber, C. E. Ireland, N. Bukavyn [et al.] // *Infect Dis Ther.* – 2014. – V. 3, № 1. – P. 35-43.
225. Biedenbach, D. J. In Vitro Activity of Ceftaroline against *Staphylococcus aureus* Isolated in 2012 from Asia-Pacific Countries as Part of the AWARE Surveillance Program / D. J. Biedenbach, R. A. Alm, S. D. Lahiri [et al.] // *Antimicrob Agents Chemother.* – 2016. – V. 60, № 1. – P. 343-7.
226. Kuzmenkov, A. Y. AMRmap: An Interactive Web Platform for Analysis of Antimicrobial Resistance Surveillance Data in Russia / A. Y. Kuzmenkov, I. V. Trushin, A. G. Vinogradova [et al.] // *Front Microbiol.* – 2021. – V. 12. – P. 620002.
227. Гостев, В. В. Антибиотикорезистентность метициллинрезистентных *Staphylococcus aureus*, циркулирующих в Российской Федерации / В. В. Гостев, О. С. Калиногорская, Л. Н. Попенко [и др.] // *Антибиотики и химиотерапия.* – 2015. – Т. 60, № 1-2. – С. 3-9.
228. Watkins, R. R. Antimicrobial resistance in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* to newer antimicrobial agents / R. R. Watkins, M. Holubar, M. Z. David // *Antimicrob Agents Chemother.* – 2019.
229. Gostev, V. Characterisation of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* with reduced susceptibility to ceftaroline collected in Russia during 2010-2014 / V. Gostev, O. Kalinogorskaya, A. Kruglov [et al.] // *J Glob Antimicrob Resist.* – 2018. – V. 12. – P. 21-23.
230. Mendes, R. E. Characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* displaying increased MICs of ceftaroline / R. E. Mendes, A. Tsakris, H. S. Sader [et al.] // *J Antimicrob Chemother.* – 2012. – V. 67, № 6. – P. 1321-4.
231. Kelley, W. L. Missense mutations in PBP2A Affecting ceftaroline susceptibility detected in epidemic hospital-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clonotypes ST228 and

- ST247 in Western Switzerland archived since 1998 / W. L. Kelley, A. Jousselin, C. Barras [et al.] // *Antimicrob Agents Chemother.* – 2015. – V. 59, № 4. – P. 1922-30.
232. Vogel, V. Short term evolution of a highly transmissible methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clone (ST228) in a tertiary care hospital / V. Vogel, L. Falquet, S. P. Calderon-Copete [et al.] // *PLoS One.* – 2012. – V. 7, № 6. – P. e38969.
233. Senn, L. The Stealthy Superbug: the Role of Asymptomatic Enteric Carriage in Maintaining a Long-Term Hospital Outbreak of ST228 Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* / L. Senn, O. Clerc, G. Zanetti [et al.] // *mBio.* – 2016. – V. 7, № 1. – P. e02039-15.
234. da Costa, T. M. PBP4: A New Perspective on *Staphylococcus aureus* beta-Lactam Resistance / T. M. da Costa, C. R. de Oliveira, H. F. Chambers [et al.] // *Microorganisms.* – 2018. – V. 6, № 3.
235. Lahiri, S. D. Identification of non-PBP2a resistance mechanisms in *Staphylococcus aureus* after serial passage with ceftaroline: involvement of other PBPs / S. D. Lahiri, R. A. Alm // *J Antimicrob Chemother.* – 2016. – V. 71, № 11. – P. 3050-3057.
236. Pillai, S. K. Linezolid resistance in *Staphylococcus aureus*: characterization and stability of resistant phenotype / S. K. Pillai, G. Sakoulas, C. Wennersten [et al.] // *J Infect Dis.* – 2002. – V. 186, № 11. – P. 1603-7.
237. Gu, B. The emerging problem of linezolid-resistant *Staphylococcus* / B. Gu, T. Kelesidis, S. Tsiodras [et al.] // *J Antimicrob Chemother.* – 2013. – V. 68, № 1. – P. 4-11.
238. Wang, Y. A novel gene, *optrA*, that confers transferable resistance to oxazolidinones and phenicols and its presence in *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* of human and animal origin / Y. Wang, Y. Lv, J. Cai [et al.] // *J Antimicrob Chemother.* – 2015. – V. 70, № 8. – P. 2182-90.
239. Guerin, F. Molecular and functional analysis of the novel *cfr(D)* linezolid resistance gene identified in *Enterococcus faecium* / F. Guerin, M. Sassi, L. Dejoies [et al.] // *J Antimicrob Chemother.* – 2020. – V. 75, № 7. – P. 1699-1703.
240. Foster, T. J. Antibiotic resistance in *Staphylococcus aureus*. Current status and future prospects / T. J. Foster // *FEMS Microbiol Rev.* – 2017. – V. 41, № 3. – P. 430-449.
241. Antonelli, A. Characterization of *poxTA*, a novel phenicol-oxazolidinone-tetracycline resistance gene from an MRSA of clinical origin / A. Antonelli, M. M. D'Andrea, A. Brenciani [et al.] // *J Antimicrob Chemother.* – 2018. – V. 73, № 7. – P. 1763-1769.
242. Chopra, I. New developments in tetracycline antibiotics: glycylcyclines and tetracycline efflux pump inhibitors / I. Chopra // *Drug Resist Updat.* – 2002. – V. 5, № 3-4. – P. 119-25.
243. Dabul, A. N. G. Resistance in In Vitro Selected Tigecycline-Resistant Methicillin-Resistant

- Staphylococcus aureus Sequence Type 5 Is Driven by Mutations in mepR and mepA Genes / A. N. G. Dabul, J. S. Avaca-Crusca, D. Van Tyne [et al.] // *Microb Drug Resist.* – 2018. – V. 24, № 5. – P. 519-526.
244. Haim, M. S. First description of rpsJ and mepA mutations associated with tigecycline resistance in Staphylococcus aureus isolated from a cystic fibrosis patient during antibiotic therapy / M. S. Haim, S. Di Gregorio, L. Galanternik [et al.] // *Int J Antimicrob Agents.* – 2017. – V. 50, № 6. – P. 739-741.
245. Bai, B. In vitro Activity and Heteroresistance of Omadacycline Against Clinical Staphylococcus aureus Isolates From China Reveal the Impact of Omadacycline Susceptibility by Branched-Chain Amino Acid Transport System II Carrier Protein, Na/Pi Cotransporter Family Protein, and Fibronectin-Binding Protein / B. Bai, Z. Lin, Z. Pu [et al.] // *Front Microbiol.* – 2019. – V. 10. – P. 2546.
246. Shariati, A. The global prevalence of Daptomycin, Tigecycline, Quinupristin/Dalfopristin, and Linezolid-resistant Staphylococcus aureus and coagulase-negative staphylococci strains: a systematic review and meta-analysis / A. Shariati, M. Dadashi, Z. Chegini [et al.] // *Antimicrob Resist Infect Control.* – 2020. – V. 9, № 1. – P. 56.
247. Bigger, J. W. Treatment of Staphylococcal infections with penicillin by intermittent sterilisation / J. W. Bigger // *Lancet.* – 1944. – V. 244, № 6320. – P. 497-500.
248. Sabath, L. D. A new type of penicillin resistance of Staphylococcus aureus / L. D. Sabath, N. Wheeler, M. Laverdiere [et al.] // *Lancet.* – 1977. – V. 1, № 8009. – P. 443-7.
249. Kuehl, R. When antibiotics fail: a clinical and microbiological perspective on antibiotic tolerance and persistence of Staphylococcus aureus / R. Kuehl, L. Morata, S. Meylan [et al.] // *J Antimicrob Chemother.* – 2020. – V. 75, № 5. – P. 1071-1086.
250. Lechner, S. Staphylococcus aureus persists tolerant to bactericidal antibiotics / S. Lechner, K. Lewis, R. Bertram // *J Mol Microbiol Biotechnol.* – 2012. – V. 22, № 4. – P. 235-44.
251. Sulaiman, J. E. Evolution of Bacterial Tolerance Under Antibiotic Treatment and Its Implications on the Development of Resistance / J. E. Sulaiman, H. Lam // *Front Microbiol.* – 2021. – V. 12. – P. 617412.
252. Geiger, T. The stringent response of Staphylococcus aureus and its impact on survival after phagocytosis through the induction of intracellular PSMs expression / T. Geiger, P. Francois, M. Liebeke [et al.] // *PLoS Pathog.* – 2012. – V. 8, № 11. – P. e1003016.
253. Mechler, L. A novel point mutation promotes growth phase-dependent daptomycin tolerance in Staphylococcus aureus / L. Mechler, A. Herbig, K. Paprotka [et al.] // *Antimicrob Agents Chemother.* – 2015. – V. 59, № 9. – P. 5366-76.

254. Van den Bergh, B. Should we develop screens for multi-drug antibiotic tolerance? / B. Van den Bergh, J. E. Michiels, M. Fauvart [et al.] // *Expert Rev Anti Infect Ther.* – 2016. – V. 14, № 7. – P. 613-6.
255. Pfeltz, R. F. A microdilution plating method for population analysis of antibiotic-resistant staphylococci / R. F. Pfeltz, J. L. Schmidt, B. J. Wilkinson // *Microb Drug Resist.* – 2001. – V. 7, № 3. – P. 289-95.
256. Wootton, M. A modified population analysis profile (PAP) method to detect hetero-resistance to vancomycin in *Staphylococcus aureus* in a UK hospital / M. Wootton, R. A. Howe, R. Hillman [et al.] // *J Antimicrob Chemother.* – 2001. – V. 47, № 4. – P. 399-403.
257. El-Halfawy, O. M. Antimicrobial heteroresistance: an emerging field in need of clarity / O. M. El-Halfawy, M. A. Valvano // *Clin Microbiol Rev.* – 2015. – V. 28, № 1. – P. 191-207.
258. Sprouffske, K. Growthcurver: an R package for obtaining interpretable metrics from microbial growth curves / K. Sprouffske, A. Wagner // *BMC Bioinformatics.* – 2016. – V. 17. – P. 172.
259. Gustafson, J. E. Autolysis of methicillin-resistant and -susceptible *Staphylococcus aureus* / J. E. Gustafson, B. Berger-Bachi, A. Strassle [et al.] // *Antimicrob Agents Chemother.* – 1992. – V. 36, № 3. – P. 566-72.
260. Dong, Y. Fluoroquinolone action against mycobacteria: effects of C-8 substituents on growth, survival, and resistance / Y. Dong, C. Xu, X. Zhao [et al.] // *Antimicrob Agents Chemother.* – 1998. – V. 42, № 11. – P. 2978-84.
261. Blondeau, J. M. New concepts in antimicrobial susceptibility testing: the mutant prevention concentration and mutant selection window approach / J. M. Blondeau // *Vet Dermatol.* – 2009. – V. 20, № 5-6. – P. 383-96.
262. Fridman, O. Optimization of lag time underlies antibiotic tolerance in evolved bacterial populations / O. Fridman, A. Goldberg, I. Ronin [et al.] // *Nature.* – 2014. – V. 513, № 7518. – P. 418-21.
263. Brauner, A. Distinguishing between resistance, tolerance and persistence to antibiotic treatment / A. Brauner, O. Fridman, O. Gefen [et al.] // *Nat Rev Microbiol.* – 2016. – V. 14, № 5. – P. 320-30.
264. IWG-SCC. Classification of Staphylococcal Cassette Chromosome mec (SCCmec): Guidelines for Reporting Novel SCCmec Elements / IWG-SCC group // *Antimicrobial Agents and Chemotherapy.* – 2009. – V. 53, № 12. – P. 4961-4967.
265. Francisco, A. P. PHYLOViZ: phylogenetic inference and data visualization for sequence based typing methods / A. P. Francisco, C. Vaz, P. T. Monteiro [et al.] // *BMC Bioinformatics.* –

2012. – V. 13. – P. 87.

266. Сопова, Ю. В. Динамика протеома антибиотикорезистентных штаммов *Staphylococcus aureus* при воздействии субингибирующих концентраций бета-лактамных антибиотиков / Ю. В. Сопова, В. В. Гостев, А. Н. Лыхолай [и др.] // Экологическая генетика. – 2018. – Т. 16, № 2. – С. 4-10.

267. Livak, K. J. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method / K. J. Livak, T. D. Schmittgen // *Methods*. – 2001. – V. 25, № 4. – P. 402-8.

268. Penewit, K. Efficient and Scalable Precision Genome Editing in *Staphylococcus aureus* through Conditional Recombineering and CRISPR/Cas9-Mediated Counterselection / K. Penewit, E. A. Holmes, K. McLean [et al.] // *mBio*. – 2018. – V. 9, № 1.

269. Schneewind, O. Genetic manipulation of *Staphylococcus aureus* / O. Schneewind, D. Missiakas // *Curr Protoc Microbiol*. – 2014. – V. 32. – P. Unit 9C 3.

270. Bolger, A. M. Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data / A. M. Bolger, M. Lohse, B. Usadel // *Bioinformatics*. – 2014. – V. 30, № 15. – P. 2114-20.

271. Brown, J. FQC Dashboard: integrates FastQC results into a web-based, interactive, and extensible FASTQ quality control tool / J. Brown, M. Pirrung, L. A. McCue // *Bioinformatics*. – 2017.

272. Bankevich, A. SPAdes: a new genome assembly algorithm and its applications to single-cell sequencing / A. Bankevich, S. Nurk, D. Antipov [et al.] // *J Comput Biol*. – 2012. – V. 19, № 5. – P. 455-77.

273. Langmead, B. Fast gapped-read alignment with Bowtie 2 / B. Langmead, S. L. Salzberg // *Nat Methods*. – 2012. – V. 9, № 4. – P. 357-9.

274. Li, H. The Sequence Alignment/Map format and SAMtools / H. Li, B. Handsaker, A. Wysoker [et al.] // *Bioinformatics*. – 2009. – V. 25, № 16. – P. 2078-9.

275. Cingolani, P. A program for annotating and predicting the effects of single nucleotide polymorphisms, SnpEff: SNPs in the genome of *Drosophila melanogaster* strain w1118; iso-2; iso-3 / P. Cingolani, A. Platts, L. Wang le [et al.] // *Fly (Austin)*. – 2012. – V. 6, № 2. – P. 80-92.

276. Seemann, T. Prokka: rapid prokaryotic genome annotation / T. Seemann // *Bioinformatics*. – 2014. – V. 30, № 14. – P. 2068-9.

277. Wattam, A. R. Improvements to PATRIC, the all-bacterial Bioinformatics Database and Analysis Resource Center / A. R. Wattam, J. J. Davis, R. Assaf [et al.] // *Nucleic Acids Res*. – 2017. – V. 45, № D1. – P. D535-D542.

278. Page, A. J. Roary: rapid large-scale prokaryote pan genome analysis / A. J. Page, C. A.

- Cummins, M. Hunt [et al.] // *Bioinformatics*. – 2015. – V. 31, № 22. – P. 3691-3.
279. Brynildsrud, O. Rapid scoring of genes in microbial pan-genome-wide association studies with Scoary / O. Brynildsrud, J. Bohlin, L. Scheffer [et al.] // *Genome Biol.* – 2016. – V. 17, № 1. – P. 238.
280. Jolley, K. A. BIGSdb: Scalable analysis of bacterial genome variation at the population level / K. A. Jolley, M. C. Maiden // *BMC Bioinformatics*. – 2010. – V. 11. – P. 595.
281. Kurtz, S. Versatile and open software for comparing large genomes / S. Kurtz, A. Phillippy, A. L. Delcher [et al.] // *Genome Biol.* – 2004. – V. 5, № 2. – P. R12.
282. Croucher, N. J. Rapid phylogenetic analysis of large samples of recombinant bacterial whole genome sequences using Gubbins / N. J. Croucher, A. J. Page, T. R. Connor [et al.] // *Nucleic Acids Res.* – 2015. – V. 43, № 3. – P. e15.
283. Nguyen, L. T. IQ-TREE: a fast and effective stochastic algorithm for estimating maximum-likelihood phylogenies / L. T. Nguyen, H. A. Schmidt, A. von Haeseler [et al.] // *Mol Biol Evol.* – 2015. – V. 32, № 1. – P. 268-74.
284. Kalyaanamoorthy, S. ModelFinder: fast model selection for accurate phylogenetic estimates / S. Kalyaanamoorthy, B. Q. Minh, T. K. F. Wong [et al.] // *Nat Methods*. – 2017. – V. 14, № 6. – P. 587-589.
285. Hoang, D. T. UFBoot2: Improving the Ultrafast Bootstrap Approximation / D. T. Hoang, O. Chernomor, A. von Haeseler [et al.] // *Mol Biol Evol.* – 2018. – V. 35, № 2. – P. 518-522.
286. Cheng, L. Hierarchical and spatially explicit clustering of DNA sequences with BAPS software / L. Cheng, T. R. Connor, J. Siren [et al.] // *Mol Biol Evol.* – 2013. – V. 30, № 5. – P. 1224-8.
287. Tonkin-Hill, G. RhierBAPS: An R implementation of the population clustering algorithm hierBAPS / G. Tonkin-Hill, J. A. Lees, S. D. Bentley [et al.] // *Wellcome Open Res.* – 2018. – V. 3. – P. 93.
288. Suchard, M. A. Bayesian phylogenetic and phylodynamic data integration using BEAST 1.10 / M. A. Suchard, P. Lemey, G. Baele [et al.] // *Virus Evol.* – 2018. – V. 4, № 1. – P. vey016.
289. Katoh, K. MAFFT multiple sequence alignment software version 7: improvements in performance and usability / K. Katoh, D. M. Standley // *Molecular biology and evolution*. – 2013. – V. 30, № 4. – P. 772-780.
290. Okonechnikov, K. Unipro UGENE: a unified bioinformatics toolkit / K. Okonechnikov, M. Fursov, O. Golosova [et al.] // *Bioinformatics*. – 2012. – V. 28, № 8. – P. 1166-1167.
291. Letunic, I. Interactive tree of life (iTOL) v3: an online tool for the display and annotation of phylogenetic and other trees / I. Letunic, P. Bork // *Nucleic Acids Res.* – 2016. – V. 44, № W1. –

P. W242-5.

292. Deatherage, D. E. Detecting rare structural variation in evolving microbial populations from new sequence junctions using breseq / D. E. Deatherage, C. C. Traverse, L. N. Wolf [et al.] // *Front Genet.* – 2014. – V. 5. – P. 468.

293. Deatherage, D. E. Identification of mutations in laboratory-evolved microbes from next-generation sequencing data using breseq / D. E. Deatherage, J. E. Barrick // *Methods Mol Biol.* – 2014. – V. 1151. – P. 165-88.

294. Barrick, J. E. Identifying structural variation in haploid microbial genomes from short-read resequencing data using breseq / J. E. Barrick, G. Colburn, D. E. Deatherage [et al.] // *BMC Genomics.* – 2014. – V. 15. – P. 1039.

295. Козлов, Р. С. Чувствительность основных возбудителей бактериальных инфекций к цефтаролину в Российской Федерации / Р. С. Козлов, М. В. Сухорукова, С. В. Сидоренко [и др.] // *Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия.* – 2015. – Т. 17, № 3. – С. 217-226.

296. Гостев, В. В. Сравнительная активность липогликопептидных антибиотиков в отношении грамположительных бактерий / В. В. Гостев, О. С. Сулян, О. С. Калиногорская [и др.] // *Антибиотики и химиотерапия.* – 2022. – Т. 67, № 9-10. – С. 18-24.

297. Arhin, F. F. Effect of polysorbate 80 on oritavancin binding to plastic surfaces: implications for susceptibility testing / F. F. Arhin, I. Sarmiento, A. Belley [et al.] // *Antimicrob Agents Chemother.* – 2008. – V. 52, № 5. – P. 1597-603.

298. Kavanagh, A. Effects of Microplate Type and Broth Additives on Microdilution MIC Susceptibility Assays / A. Kavanagh, S. Ramu, Y. Gong [et al.] // *Antimicrob Agents Chemother.* – 2019. – V. 63, № 1.

299. Smith, J. R. Dalbavancin: A Novel Lipoglycopeptide Antibiotic with Extended Activity Against Gram-Positive Infections / J. R. Smith, K. D. Roberts, M. J. Rybak // *Infect Dis Ther.* – 2015. – V. 4, № 3. – P. 245-58.

300. Saravolatz, L. D. VISA-Daptomycin non-susceptible *Staphylococcus aureus* frequently demonstrate non-susceptibility to Telavancin / L. D. Saravolatz, J. Pawlak // *Diagn Microbiol Infect Dis.* – 2019. – V. 93, № 2. – P. 159-161.

301. Steele, J. M. Unsuccessful treatment of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* endocarditis with dalbavancin / J. M. Steele, R. W. Seabury, C. M. Hale [et al.] // *J Clin Pharm Ther.* – 2018. – V. 43, № 1. – P. 101-103.

302. Романов, А. В. Антибиотикорезистентность нозокомиальных штаммов *Staphylococcus aureus* в стационарах России: результаты многоцентрового эпидемиологического

исследования «МАРАФОН» в 2013-2014 / А. В. Романов, А. В. Дехнич, М. В. Сухорукова [и др.] // Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. – 2017. – Т. 19, № 1. – С. 57 - 62.

303. Bensaci, M. Surveillance of tedizolid activity and resistance: In vitro susceptibility of Gram-positive pathogens collected over 5 years from the United States and Europe / M. Bensaci, D. Sahn // *Diagn Microbiol Infect Dis.* – 2017. – V. 87, № 2. – P. 133-138.

304. Pfaller, M. A. Activities of Omadacycline and Comparator Agents against *Staphylococcus aureus* Isolates from a Surveillance Program Conducted in North America and Europe / M. A. Pfaller, P. R. Rhomberg, M. D. Huband [et al.] // *Antimicrob Agents Chemother.* – 2017. – V. 61, № 3.

305. Capone, A. In vivo development of daptomycin resistance in vancomycin-susceptible methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* severe infections previously treated with glycopeptides / A. Capone, V. Cafiso, F. Campanile [et al.] // *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* – 2016. – V. 35, № 4. – P. 625-31.

306. Mavros, M. N. Impact of vancomycin minimum inhibitory concentration on clinical outcomes of patients with vancomycin-susceptible *Staphylococcus aureus* infections: a meta-analysis and meta-regression / M. N. Mavros, G. S. Tansarli, K. Z. Vardakas [et al.] // *Int J Antimicrob Agents.* – 2012. – V. 40, № 6. – P. 496-509.

307. Musta, A. C. Vancomycin MIC plus heteroresistance and outcome of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* bacteremia: trends over 11 years / A. C. Musta, K. Riederer, S. Shemes [et al.] // *J Clin Microbiol.* – 2009. – V. 47, № 6. – P. 1640-4.

308. Liu, F. Antibacterial activity of recently approved antibiotics against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) strains: A systematic review and meta-analysis / F. Liu, S. Rajabi, C. Shi [et al.] // *Ann Clin Microbiol Antimicrob.* – 2022. – V. 21, № 1. – P. 37.

309. Farrell, D. J. Characterization of global patterns and the genetics of fusidic acid resistance / D. J. Farrell, M. Castanheira, I. Chopra // *Clin Infect Dis.* – 2011. – V. 52 Suppl 7. – P. S487-92.

310. den Heijer, C. D. Fusidic acid resistance in *Staphylococcus aureus* nasal carriage strains in nine European countries / C. D. den Heijer, E. M. van Bijnen, W. J. Paget [et al.] // *Future Microbiol.* – 2014. – V. 9, № 6. – P. 737-45.

311. Hetem, D. J. Clinical relevance of mupirocin resistance in *Staphylococcus aureus* / D. J. Hetem, M. J. Bonten // *J Hosp Infect.* – 2013. – V. 85, № 4. – P. 249-56.

312. Gostev, V. Molecular epidemiology and antibiotic resistance of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* circulating in the Russian Federation / V. Gostev, A. Kruglov, O. Kalinogorskaya [et al.] // *Infection, Genetics and Evolution.* – 2017. – V. 53. – P. 189-194.

313. Хохлова, О. Е. Микробиологический мониторинг гнойных осложнений у ожоговых больных и молекулярно-генетические особенности метициллинорезистентных *Staphylococcus aureus* (MRSA) / О. Е. Хохлова, О. В. Перьянова, И. В. Владимиров [и др.] // Антибиотики и химиотерапия. – 2017. – Т. 62, № 9-10. – С. 27-33.
314. Гостев, В. В. Молекулярные механизмы снижения чувствительностью к цефтаролину метициллинрезистентных *Staphylococcus aureus* / В. В. Гостев, О. С. Калиногорская, О. А. Дмитренко [и др.] // Антибиотики и химиотерапия. – 2016. – Т. 61, № 9-10. – С. 17-21.
315. Otero, L. H. How allosteric control of *Staphylococcus aureus* penicillin binding protein 2a enables methicillin resistance and physiological function / L. H. Otero, A. Rojas-Altuve, L. I. Llarrull [et al.] // Proc Natl Acad Sci U S A. – 2013. – V. 110, № 42. – P. 16808-13.
316. Van Wart, S. A. Pharmacokinetic-pharmacodynamic target attainment analyses to evaluate in vitro susceptibility test interpretive criteria for ceftaroline against *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus pneumoniae* / S. A. Van Wart, P. G. Ambrose, C. M. Rubino [et al.] // Antimicrob Agents Chemother. – 2014. – V. 58, № 2. – P. 885-91.
317. MacGowan, A. P. Pharmacodynamics of ceftaroline against *Staphylococcus aureus* studied in an in vitro pharmacokinetic model of infection / A. P. MacGowan, A. R. Noel, S. Tomaselli [et al.] // Antimicrob Agents Chemother. – 2013. – V. 57, № 6. – P. 2451-6.
318. Gostev, V. Phenotypic and genomic characteristics of oxacillin-susceptible *mecA*-positive *Staphylococcus aureus*, rapid selection of high-level resistance to beta-lactams / V. Gostev, K. Sabinova, J. Sopova [et al.] // Eur J Clin Microbiol Infect Dis. – 2023. – V. 42, № 9. – P. 1125-1133.
319. He, W. Prevalence and molecular typing of oxacillin-susceptible *mecA*-positive *Staphylococcus aureus* from multiple hospitals in China / W. He, H. Chen, C. Zhao [et al.] // Diagn Microbiol Infect Dis. – 2013. – V. 77, № 3. – P. 267-9.
320. Harrison, E. M. Genomic identification of cryptic susceptibility to penicillins and beta-lactamase inhibitors in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* / E. M. Harrison, X. Ba, F. Coll [et al.] // Nat Microbiol. – 2019. – V. 4, № 10. – P. 1680-1691.
321. Chen, F. J. Role of the *mecA* gene in oxacillin resistance in a *Staphylococcus aureus* clinical strain with a *pvl*-positive ST59 genetic background / F. J. Chen, C. H. Wang, C. Y. Chen [et al.] // Antimicrob Agents Chemother. – 2014. – V. 58, № 2. – P. 1047-54.
322. Graninger, W. Activity of clavulanate-potentiated penicillins against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* / W. Graninger, T. Leitha, K. Griffin [et al.] // J Antimicrob Chemother. – 1989. – V. 24 Suppl B. – P. 49-54.
323. Ba, X. Simultaneously screening for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and its

- susceptibility to potentiated penicillins / X. Ba, C. L. Raisen, Z. C. Zhou [et al.] // *J Med Microbiol.* – 2022. – V. 71, № 7.
324. Chung, M. Heterogeneous oxacillin-resistant phenotypes and production of PBP2A by oxacillin-susceptible/*mecA*-positive MRSA strains from Africa / M. Chung, C. K. Kim, T. Conceicao [et al.] // *J Antimicrob Chemother.* – 2016. – V. 71, № 10. – P. 2804-9.
325. Kumar, V. A. Detection of oxacillin-susceptible *mecA*-positive *Staphylococcus aureus* isolates by use of chromogenic medium MRSA ID / V. A. Kumar, K. Steffy, M. Chatterjee [et al.] // *J Clin Microbiol.* – 2013. – V. 51, № 1. – P. 318-9.
326. Mama, O. M. Penicillin susceptibility among invasive MSSA infections: a multicentre study in 16 Spanish hospitals / O. M. Mama, C. Aspiroz, C. Lozano [et al.] // *Journal of Antimicrobial Chemotherapy.* – 2021. – V. 76, № 10. – P. 2519-2527.
327. Liang, B. Genomic Basis of Occurrence of Cryptic Resistance among Oxacillin- and Cefoxitin-Susceptible *mecA*-Positive *Staphylococcus aureus* / B. Liang, Z. Xiong, Z. Liang [et al.] // *Microbiol Spectr.* – 2022. – V. 10, № 3. – P. e0029122.
328. Pardo, L. Phenotypic and genotypic characterization of oxacillin-susceptible and *mecA* positive *Staphylococcus aureus* strains isolated in Uruguay / L. Pardo, G. Giudice, M. I. Mota [et al.] // *Rev Argent Microbiol.* – 2022.
329. Guignard, B. Beta-lactams against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* / B. Guignard, J. M. Entenza, P. Moreillon // *Curr Opin Pharmacol.* – 2005. – V. 5, № 5. – P. 479-89.
330. Zhuang, H. A random forest model based on core genome allelic profiles of MRSA for penicillin plus potassium clavulanate susceptibility prediction / H. Zhuang, F. Zhu, P. Lan [et al.] // *Microb Genom.* – 2021. – V. 7, № 9.
331. Boonsiri, T. Identification and characterization of mutations responsible for the beta-lactam resistance in oxacillin-susceptible *mecA*-positive *Staphylococcus aureus* / T. Boonsiri, S. Watanabe, X. E. Tan [et al.] // *Sci Rep.* – 2020. – V. 10, № 1. – P. 16907.
332. Mwangi, M. M. Whole-genome sequencing reveals a link between beta-lactam resistance and synthetases of the alarmone (p)ppGpp in *Staphylococcus aureus* / M. M. Mwangi, C. Kim, M. Chung [et al.] // *Microb Drug Resist.* – 2013. – V. 19, № 3. – P. 153-9.
333. Holmes, N. E. Genetic and molecular predictors of high vancomycin MIC in *Staphylococcus aureus* bacteremia isolates / N. E. Holmes, J. D. Turnidge, W. J. Munckhof [et al.] // *J Clin Microbiol.* – 2014. – V. 52, № 9. – P. 3384-93.
334. Гостев, В. В. Полиморфизм генов, участвующих в сборке клеточной стенки у метициллинрезистентных *Staphylococcus aureus* со сниженной чувствительностью к ванкомицину / В. В. Гостев, О. С. Калиногорская, С. М. Юдин [и др.] // *Антибиотики и*

химиотерапия. – 2018. – Т. 63, № 7-8. – С. 11-16.

335. Matsuo, M. A mutation of RNA polymerase beta' subunit (RpoC) converts heterogeneously vancomycin-intermediate *Staphylococcus aureus* (hVISA) into "slow VISA" / M. Matsuo, T. Hishinuma, Y. Katayama [et al.] // *Antimicrob Agents Chemother.* – 2015. – V. 59, № 7. – P. 4215-25.

336. Katayama, Y. Complete Reconstitution of the Vancomycin-Intermediate *Staphylococcus aureus* Phenotype of Strain Mu50 in Vancomycin-Susceptible *S. aureus* / Y. Katayama, M. Sekine, T. Hishinuma [et al.] // *Antimicrob Agents Chemother.* – 2016. – V. 60, № 6. – P. 3730-42.

337. Matsuo, M. Comprehensive identification of mutations responsible for heterogeneous vancomycin-intermediate *Staphylococcus aureus* (hVISA)-to-VISA conversion in laboratory-generated VISA strains derived from hVISA clinical strain Mu3 / M. Matsuo, L. Cui, J. Kim [et al.] // *Antimicrob Agents Chemother.* – 2013. – V. 57, № 12. – P. 5843-53.

338. Udo, E. E. Genotyping of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in the Sultan Qaboos University Hospital, Oman reveals the dominance of Panton-Valentine leucocidin-negative ST6-IV/t304 clone / E. E. Udo, B. A. Al-Lawati, Z. Al-Muharmi [et al.] // *New Microbes New Infect.* – 2014. – V. 2, № 4. – P. 100-5.

339. Boswihi, S. S. Emerging variants of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* genotypes in Kuwait hospitals / S. S. Boswihi, E. E. Udo, S. Monecke [et al.] // *PLoS One.* – 2018. – V. 13, № 4. – P. e0195933.

340. Bartels, M. D. Repeated introduction and spread of the MRSA clone t304/ST6 in northern Europe / M. D. Bartels, P. Worning, L. P. Andersen [et al.] // *Clin Microbiol Infect.* – 2021. – V. 27, № 2. – P. 284 e1-284 e5.

341. Aro, T. High rates of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* among asylum seekers and refugees admitted to Helsinki University Hospital, 2010 to 2017 / T. Aro, A. Kantele // *Euro Surveill.* – 2018. – V. 23, № 45.

342. Takano, 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 / T. Takano, W. C. Hung, M. Shibuya [et al.] // *Antimicrob Agents Chemother.* – 2013. – V. 57, № 4. – P. 1589-95.

343. Zaraket, H. Molecular characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in hospitals in Niigata, Japan: divergence and transmission / H. Zaraket, T. Otsuka, K. Saito [et al.] // *Microbiol Immunol.* – 2007. – V. 51, № 2. – P. 171-6.

344. Wang, B. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in China: a multicentre longitudinal

- study and whole-genome sequencing / B. Wang, Y. Xu, H. Zhao [et al.] // *Emerg Microbes Infect.* – 2022. – V. 11, № 1. – P. 532-542.
345. Kondo, S. Molecular characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* genotype ST764-SCCmec type II in Thailand / S. Kondo, P. Phokhaphan, S. Tongsimma [et al.] // *Sci Rep.* – 2022. – V. 12, № 1. – P. 2085.
346. Uhlemann, A. C. Molecular tracing of the emergence, diversification, and transmission of *S. aureus* sequence type 8 in a New York community / A. C. Uhlemann, J. Dordel, J. R. Knox [et al.] // *Proc Natl Acad Sci U S A.* – 2014. – V. 111, № 18. – P. 6738-43.
347. David, M. Z. Community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: epidemiology and clinical consequences of an emerging epidemic / M. Z. David, R. S. Daum // *Clin Microbiol Rev.* – 2010. – V. 23, № 3. – P. 616-87.
348. Fridkin, S. K. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* disease in three communities / S. K. Fridkin, J. C. Hageman, M. Morrison [et al.] // *N Engl J Med.* – 2005. – V. 352, № 14. – P. 1436-44.
349. McDougal, L. K. Pulsed-field gel electrophoresis typing of oxacillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates from the United States: establishing a national database / L. K. McDougal, C. D. Steward, G. E. Killgore [et al.] // *J Clin Microbiol.* – 2003. – V. 41, № 11. – P. 5113-20.
350. Moran, G. J. Methicillin-resistant *S. aureus* infections among patients in the emergency department / G. J. Moran, A. Krishnadasan, R. J. Gorwitz [et al.] // *N Engl J Med.* – 2006. – V. 355, № 7. – P. 666-74.
351. Talan, D. A. Comparison of *Staphylococcus aureus* from skin and soft-tissue infections in US emergency department patients, 2004 and 2008 / D. A. Talan, A. Krishnadasan, R. J. Gorwitz [et al.] // *Clin Infect Dis.* – 2011. – V. 53, № 2. – P. 144-9.
352. Li, M. Comparative analysis of virulence and toxin expression of global community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains / M. Li, G. Y. Cheung, J. Hu [et al.] // *J Infect Dis.* – 2010. – V. 202, № 12. – P. 1866-76.
353. Li, M. Evolution of virulence in epidemic community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* / M. Li, B. A. Diep, A. E. Villaruz [et al.] // *Proc Natl Acad Sci U S A.* – 2009. – V. 106, № 14. – P. 5883-8.
354. Joshi, G. S. Arginine catabolic mobile element encoded *speG* abrogates the unique hypersensitivity of *Staphylococcus aureus* to exogenous polyamines / G. S. Joshi, J. S. Spontak, D. G. Klapper [et al.] // *Mol Microbiol.* – 2011. – V. 82, № 1. – P. 9-20.
355. Uhlemann, A. C. The environment as an unrecognized reservoir for community-associated methicillin resistant *Staphylococcus aureus* USA300: a case-control study / A. C. Uhlemann, J.

- Knox, M. Miller [et al.] // PLoS One. – 2011. – V. 6, № 7. – P. e22407.
356. Knox, J. Environmental contamination as a risk factor for intra-household *Staphylococcus aureus* transmission / J. Knox, A. C. Uhlemann, M. Miller [et al.] // PLoS One. – 2012. – V. 7, № 11. – P. e49900.
357. Glaser, P. Demography and Intercontinental Spread of the USA300 Community-Acquired Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Lineage / P. Glaser, P. Martins-Simoes, A. Villain [et al.] // mBio. – 2016. – V. 7, № 1. – P. e02183-15.
358. Boyle-Vavra, S. USA300 and USA500 clonal lineages of *Staphylococcus aureus* do not produce a capsular polysaccharide due to conserved mutations in the *cap5* locus / S. Boyle-Vavra, X. Li, M. T. Alam [et al.] // mBio. – 2015. – V. 6, № 2.
359. Planet, P. J. Parallel Epidemics of Community-Associated Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* USA300 Infection in North and South America / P. J. Planet, L. Diaz, S. O. Kolokotronis [et al.] // J Infect Dis. – 2015. – V. 212, № 12. – P. 1874-82.
360. Von Dach, E. Comparative Genomics of Community-Associated Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Shows the Emergence of Clone ST8-USA300 in Geneva, Switzerland / E. Von Dach, S. M. Diene, C. Fankhauser [et al.] // J Infect Dis. – 2016. – V. 213, № 9. – P. 1370-9.
361. Chadwick, S. G. Detection of epidemic USA300 community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains by use of a single allele-specific PCR assay targeting a novel polymorphism of *Staphylococcus aureus* *pbp3* / S. G. Chadwick, A. Prasad, W. L. Smith [et al.] // J Clin Microbiol. – 2013. – V. 51, № 8. – P. 2541-50.
362. Monecke, S. Molecular Typing of ST239-MRSA-III From Diverse Geographic Locations and the Evolution of the SCCmec III Element During Its Intercontinental Spread / S. Monecke, P. Slickers, D. Gawlik [et al.] // Front Microbiol. – 2018. – V. 9. – P. 1436.
363. Hsu, L. Y. Evolutionary dynamics of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* within a healthcare system / L. Y. Hsu, S. R. Harris, M. A. Chlebowicz [et al.] // Genome Biol. – 2015. – V. 16, № 1. – P. 81.
364. Feil, E. J. Rapid detection of the pandemic methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clone ST 239, a dominant strain in Asian hospitals / E. J. Feil, E. K. Nickerson, N. Chantratita [et al.] // J Clin Microbiol. – 2008. – V. 46, № 4. – P. 1520-2.
365. Hu, F. Current Status and Trends of Antibacterial Resistance in China / F. Hu, D. Zhu, F. Wang [et al.] // Clin Infect Dis. – 2018. – V. 67, № suppl_2. – P. S128-S134.
366. Baltrus, D. A. Exploring the costs of horizontal gene transfer / D. A. Baltrus // Trends Ecol Evol. – 2013. – V. 28, № 8. – P. 489-95.
367. Baines, S. L. Convergent adaptation in the dominant global hospital clone ST239 of

- methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* / S. L. Baines, K. E. Holt, M. B. Schultz [et al.] // *mBio*. – 2015. – V. 6, № 2. – P. e00080.
368. Harris, S. R. Evolution of MRSA during hospital transmission and intercontinental spread / S. R. Harris, E. J. Feil, M. T. Holden [et al.] // *Science*. – 2010. – V. 327, № 5964. – P. 469-74.
369. Castillo-Ramirez, S. Phylogeographic variation in recombination rates within a global clone of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* / S. Castillo-Ramirez, J. Corander, P. Marttinen [et al.] // *Genome Biol*. – 2012. – V. 13, № 12. – P. R126.
370. Botelho, A. M. N. Local Diversification of Methicillin- Resistant *Staphylococcus aureus* ST239 in South America After Its Rapid Worldwide Dissemination / A. M. N. Botelho, E. C. M. O. Cerqueira, A. M. Moustafa [et al.] // *Front Microbiol*. – 2019. – V. 10. – P. 82.
371. Хохлова, О. Е. Молекулярно-генетические особенности нозокомиальных и внебольничных MRSA и их роль в развитии инфекционных заболеваний различного генеза / О. Е. Хохлова // дис. ... докт. биол. наук. – 2018. – С. 1-415.
372. Gostev, V. Comparative genome analysis of global and Russian strains of community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* ST22, a 'Gaza clone' / V. Gostev, K. Ivanova, A. Kruglov [et al.] // *Int J Antimicrob Agents*. – 2021. – V. 57, № 2. – P. 106264.
373. Reuter, S. Building a genomic framework for prospective MRSA surveillance in the United Kingdom and the Republic of Ireland / S. Reuter, M. E. Torok, M. T. Holden [et al.] // *Genome Res*. – 2016. – V. 26, № 2. – P. 263-70.
374. Al Laham, N. MRSA clonal complex 22 strains harboring toxic shock syndrome toxin (TSST-1) are endemic in the primary hospital in Gaza, Palestine / N. Al Laham, J. R. Mediavilla, L. Chen [et al.] // *PLoS One*. – 2015. – V. 10, № 3. – P. e0120008.
375. Al-Bakri, A. G. The epidemiology and molecular characterization of methicillin-resistant staphylococci sampled from a healthy Jordanian population / A. G. Al-Bakri, H. Al-Hadithi, V. Kasabri [et al.] // *Epidemiol Infect*. – 2013. – V. 141, № 11. – P. 2384-91.
376. Geraci, D. M. *tst1*-positive ST22-MRSA-IVa in healthy Italian preschool children / D. M. Geraci, C. Bonura, M. Giuffre [et al.] // *Infection*. – 2014. – V. 42, № 3. – P. 535-8.
377. Mir-Sanchis, I. Crystal Structure of an Unusual Single-Stranded DNA-Binding Protein Encoded by Staphylococcal Cassette Chromosome Elements / I. Mir-Sanchis, Y. Z. Pigli, P. A. Rice // *Structure*. – 2018. – V. 26, № 8. – P. 1144-1150 e3.
378. Xiong, Y. Q. Endovascular infections caused by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* are linked to clonal complex-specific alterations in binding and invasion domains of fibronectin-binding protein A as well as the occurrence of *fnbB* / Y. Q. Xiong, B. K. Sharma-Kuinkel, N. N. Casillas-Ituarte [et al.] // *Infect Immun*. – 2015. – V. 83, № 12. – P. 4772-80.

379. Yamaguchi, T. Changes in the Genotypic Characteristics of Community-Acquired Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Collected in 244 Medical Facilities in Japan between 2010 and 2018: a Nationwide Surveillance / T. Yamaguchi, I. Nakamura, T. Sato [et al.] // *Microbiol Spectr.* – 2022. – V. 10, № 4. – P. e0227221.
380. Boswihi, S. S. Diversity of clonal complex 22 methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates in Kuwait hospitals / S. S. Boswihi, T. Verghese, E. E. Udo // *Front Microbiol.* – 2022. – V. 13. – P. 970924.
381. Kaneko, H. The emerging threat of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) clone ST22-PT, carrying both Panton-Valentine leucocidin and toxic shock syndrome toxin 1 genes / H. Kaneko, Y. Yanagi, S. Otake [et al.] // *J Antimicrob Chemother.* – 2023.
382. Гостев, В. В. Геномная характеристика mecA-положительных *Staphylococcus aureus* ST59, проявляющих чувствительность к оксацилину / В. В. Гостев, О. С. Сулян, П. А. Павлова [и др.] // *Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия.* – 2023. – Т. 25, № 2. – С. 116-122.
383. McClure, J. A. *Staphylococcus aureus* ST59: Concurrent but Separate Evolution of North American and East Asian Lineages / J. A. McClure, S. Lakhundi, A. Niazy [et al.] // *Front Microbiol.* – 2021. – V. 12. – P. 631845.
384. Ward, M. J. Identification of source and sink populations for the emergence and global spread of the East-Asia clone of community-associated MRSA / M. J. Ward, M. Goncheva, E. Richardson [et al.] // *Genome Biol.* – 2016. – V. 17, № 1. – P. 160.
385. Takano, T. Spread of community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in hospitals in Taipei, Taiwan in 2005, and comparison of its drug resistance with previous hospital-acquired MRSA / T. Takano, K. Saito, L. J. Teng [et al.] // *Microbiol Immunol.* – 2007. – V. 51, № 6. – P. 627-32.
386. Chen, C. J. Characterization and comparison of 2 distinct epidemic community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clones of ST59 lineage / C. J. Chen, C. Unger, W. Hoffmann [et al.] // *PLoS One.* – 2013. – V. 8, № 9. – P. e63210.
387. Chuang, Y. Y. Molecular epidemiology of community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Asia / Y. Y. Chuang, Y. C. Huang // *Lancet Infect Dis.* – 2013. – V. 13, № 8. – P. 698-708.
388. Li, S. The Changing Pattern of Population Structure of *Staphylococcus aureus* from Bacteremia in China from 2013 to 2016: ST239-030-MRSA Replaced by ST59-t437 / S. Li, S. Sun, C. Yang [et al.] // *Front Microbiol.* – 2018. – V. 9. – P. 332.
389. Pang, R. The Genomic Context for the Evolution and Transmission of Community-

- Associated *Staphylococcus aureus* ST59 Through the Food Chain / R. Pang, S. Wu, F. Zhang [et al.] // *Front Microbiol.* – 2020. – V. 11. – P. 422.
390. Huang, Y. C. Comparative molecular analysis of community-associated and healthcare-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates from children in northern Taiwan / Y. C. Huang, C. F. Ho, C. J. Chen [et al.] // *Clin Microbiol Infect.* – 2008. – V. 14, № 12. – P. 1167-72.
391. Gostev, V. In Vitro Selection of High-Level Beta-Lactam Resistance in Methicillin-Susceptible *Staphylococcus aureus* / V. Gostev, O. Kalinogorskaya, K. Ivanova [et al.] // *Antibiotics (Basel).* – 2021. – V. 10, № 6.
392. Gostev, V. Adaptive Laboratory Evolution of *Staphylococcus aureus* Resistance to Vancomycin and Daptomycin: Mutation Patterns and Cross-Resistance / V. Gostev, O. Kalinogorskaya, J. Sopova [et al.] // *Antibiotics (Basel).* – 2023. – V. 12, № 5.
393. Гостев, В. В. Селекция устойчивости к даптомицину метициллин-резистентного *Staphylococcus aureus*: роль гомо- и гетеро-мутаций / В. В. Гостев, Ю. В. Сопова, О. С. Калиногорская [и др.] // *Генетика.* – 2020. – Т. 56, № 3. – С. 282-291.
394. Long, S. W. PBP2a mutations causing high-level Ceftaroline resistance in clinical methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates / S. W. Long, R. J. Olsen, S. C. Mehta [et al.] // *Antimicrob Agents Chemother.* – 2014. – V. 58, № 11. – P. 6668-74.
395. Kato, Y. Genetic changes associated with glycopeptide resistance in *Staphylococcus aureus*: predominance of amino acid substitutions in YvqF/VraSR / Y. Kato, T. Suzuki, T. Ida [et al.] // *J Antimicrob Chemother.* – 2010. – V. 65, № 1. – P. 37-45.
396. Gardete, S. Genetic pathway in acquisition and loss of vancomycin resistance in a methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) strain of clonal type USA300 / S. Gardete, C. Kim, B. M. Hartmann [et al.] // *PLoS Pathog.* – 2012. – V. 8, № 2. – P. e1002505.
397. Neoh, H. M. Mutated response regulator *graR* is responsible for phenotypic conversion of *Staphylococcus aureus* from heterogeneous vancomycin-intermediate resistance to vancomycin-intermediate resistance / H. M. Neoh, L. Cui, H. Yuzawa [et al.] // *Antimicrob Agents Chemother.* – 2008. – V. 52, № 1. – P. 45-53.
398. Griffiths, J. M. Loss of function of the *gdpP* protein leads to joint beta-lactam/glycopeptide tolerance in *Staphylococcus aureus* / J. M. Griffiths, A. J. O'Neill // *Antimicrob Agents Chemother.* – 2012. – V. 56, № 1. – P. 579-81.
399. Chan, L. C. Ceftobiprole- and ceftaroline-resistant methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* / L. C. Chan, L. Basuino, B. Diep [et al.] // *Antimicrob Agents Chemother.* – 2015. – V. 59, № 5. – P. 2960-3.

400. Brown, S. Wall teichoic acids of gram-positive bacteria / S. Brown, J. P. Santa Maria, Jr., S. Walker // *Annu Rev Microbiol.* – 2013. – V. 67. – P. 313-36.
401. Bera, A. Why are pathogenic staphylococci so lysozyme resistant? The peptidoglycan O-acetyltransferase OatA is the major determinant for lysozyme resistance of *Staphylococcus aureus* / A. Bera, S. Herbert, A. Jakob [et al.] // *Mol Microbiol.* – 2005. – V. 55, № 3. – P. 778-87.
402. Bera, A. The presence of peptidoglycan O-acetyltransferase in various staphylococcal species correlates with lysozyme resistance and pathogenicity / A. Bera, R. Biswas, S. Herbert [et al.] // *Infect Immun.* – 2006. – V. 74, № 8. – P. 4598-604.
403. Сопова, Ю. В. Влияние делеции в некаталитическом домене GdpP на фенотип *Staphylococcus aureus* посредством направленного геномного редактирования с помощью системы CRISPR/Cas9 / Ю. В. Сопова, М. Е. Велижанина, Д. А. Кандина [и др.] // *Генетика.* – 2023. – Т. 59, № 9. – С. 1094-1098.
404. Zarrella, T. M. The Many Roles of the Bacterial Second Messenger Cyclic di-AMP in Adapting to Stress Cues / T. M. Zarrella, G. Bai // *J Bacteriol.* – 2020. – V. 203, № 1.
405. Poon, R. Loss of GdpP Function in *Staphylococcus aureus* Leads to beta-Lactam Tolerance and Enhanced Evolution of beta-Lactam Resistance / R. Poon, L. Basuino, N. Satishkumar [et al.] // *Antimicrob Agents Chemother.* – 2022. – V. 66, № 2. – P. e0143121.
406. Argudin, M. A. Genetic Diversity among *Staphylococcus aureus* Isolates Showing Oxacillin and/or Cefoxitin Resistance Not Linked to the Presence of mec Genes / M. A. Argudin, S. Roisin, L. Nienhaus [et al.] // *Antimicrob Agents Chemother.* – 2018. – V. 62, № 7.
407. Speck, S. Borderline resistance to oxacillin in *Staphylococcus aureus* after treatment with sub-lethal sodium hypochlorite concentrations / S. Speck, C. Wenke, A. T. Fessler [et al.] // *Heliyon.* – 2020. – V. 6, № 6. – P. e04070.
408. Varela, M. C. Carbapenems drive the collateral resistance to ceftaroline in cystic fibrosis patients with MRSA / M. C. Varela, M. Roch, A. Taglialegna [et al.] // *Commun Biol.* – 2020. – V. 3, № 1. – P. 599.
409. Giulieri, S. G. Comprehensive Genomic Investigation of Adaptive Mutations Driving the Low-Level Oxacillin Resistance Phenotype in *Staphylococcus aureus* / S. G. Giulieri, R. Guerillot, J. C. Kwong [et al.] // *mBio.* – 2020. – V. 11, № 6.
410. Chatterjee, A. Stp1 Loss of Function Promotes beta-Lactam Resistance in *Staphylococcus aureus* That Is Independent of Classical Genes / A. Chatterjee, R. Poon, S. S. Chatterjee // *Antimicrob Agents Chemother.* – 2020. – V. 64, № 6.
411. Karinou, E. Inactivation of the Monofunctional Peptidoglycan Glycosyltransferase SgtB Allows *Staphylococcus aureus* To Survive in the Absence of Lipoteichoic Acid / E. Karinou, C. F.

- Schuster, M. Pazos [et al.] // *J Bacteriol.* – 2019. – V. 201, № 1.
412. Cafiso, V. *dltA* overexpression: A strain-independent keystone of daptomycin resistance in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* / V. Cafiso, T. Bertuccio, S. Purrello [et al.] // *Int J Antimicrob Agents.* – 2014. – V. 43, № 1. – P. 26-31.
413. Blake, K. L. The nature of *Staphylococcus aureus* MurA and MurZ and approaches for detection of peptidoglycan biosynthesis inhibitors / K. L. Blake, A. J. O'Neill, D. Mengin-Lecreulx [et al.] // *Mol Microbiol.* – 2009. – V. 72, № 2. – P. 335-43.
414. Tran, T. T. Mechanisms of drug resistance: daptomycin resistance / T. T. Tran, J. M. Munita, C. A. Arias // *Ann N Y Acad Sci.* – 2015. – V. 1354. – P. 32-53.
415. Lopatkin, A. J. Clinically relevant mutations in core metabolic genes confer antibiotic resistance / A. J. Lopatkin, S. C. Bening, A. L. Manson [et al.] // *Science.* – 2021. – V. 371, № 6531.
416. Barrick, J. E. Genome evolution and adaptation in a long-term experiment with *Escherichia coli* / J. E. Barrick, D. S. Yu, S. H. Yoon [et al.] // *Nature.* – 2009. – V. 461, № 7268. – P. 1243-7.
417. Moreillon, P. New and emerging treatment of *Staphylococcus aureus* infections in the hospital setting / P. Moreillon // *Clin Microbiol Infect.* – 2008. – V. 14 Suppl 3. – P. 32-41.
418. Gajdacs, M. The Continuing Threat of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* / M. Gajdacs // *Antibiotics (Basel).* – 2019. – V. 8, № 2.
419. Bayer, A. S. Mechanisms of daptomycin resistance in *Staphylococcus aureus*: role of the cell membrane and cell wall / A. S. Bayer, T. Schneider, H. G. Sahl // *Ann N Y Acad Sci.* – 2013. – V. 1277. – P. 139-58.
420. Hines, K. M. Occurrence of cross-resistance and beta-lactam seesaw effect in glycopeptide-, lipopeptide- and lipoglycopeptide-resistant MRSA correlates with membrane phosphatidylglycerol levels / K. M. Hines, T. Shen, N. K. Ashford [et al.] // *J Antimicrob Chemother.* – 2020. – V. 75, № 5. – P. 1182-1186.
421. Song, Y. Studies on the mechanism of telavancin decreased susceptibility in a laboratory-derived mutant / Y. Song, C. S. Lunde, B. M. Benton [et al.] // *Microb Drug Resist.* – 2013. – V. 19, № 4. – P. 247-55.
422. Werth, B. J. Dalbavancin exposure in vitro selects for dalbavancin-non-susceptible and vancomycin-intermediate strains of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* / B. J. Werth, N. K. Ashford, K. Penewit [et al.] // *Clin Microbiol Infect.* – 2021. – V. 27, № 6. – P. 910 e1-910 e8.
423. Rishishwar, L. Population Genomics of Reduced Vancomycin Susceptibility in *Staphylococcus aureus* / L. Rishishwar, C. S. Kraft, I. K. Jordan // *mSphere.* – 2016. – V. 1, № 4.
424. Li, S. Fitness Cost of Daptomycin-Resistant *Staphylococcus aureus* Obtained from in Vitro

- Daptomycin Selection Pressure / S. Li, Y. Yin, H. Chen [et al.] // *Front Microbiol.* – 2017. – V. 8. – P. 2199.
425. Wang, Y. Novel Mutation Sites in the Development of Vancomycin- Intermediate Resistance in *Staphylococcus aureus* / Y. Wang, X. Li, L. Jiang [et al.] // *Front Microbiol.* – 2016. – V. 7. – P. 2163.
426. Cui, L. An RpoB mutation confers dual heteroresistance to daptomycin and vancomycin in *Staphylococcus aureus* / L. Cui, T. Isii, M. Fukuda [et al.] // *Antimicrob Agents Chemother.* – 2010. – V. 54, № 12. – P. 5222-33.
427. Thitianapakorn, K. Association of mprF mutations with cross-resistance to daptomycin and vancomycin in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) / K. Thitianapakorn, Y. Aiba, X. E. Tan [et al.] // *Sci Rep.* – 2020. – V. 10, № 1. – P. 16107.
428. Hu, J. Mechanism of reduced vancomycin susceptibility conferred by walK mutation in community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strain MW2 / J. Hu, X. Zhang, X. Liu [et al.] // *Antimicrob Agents Chemother.* – 2015. – V. 59, № 2. – P. 1352-5.
429. Mehta, S. VraSR two-component regulatory system contributes to mprF-mediated decreased susceptibility to daptomycin in in vivo-selected clinical strains of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* / S. Mehta, A. X. Cuirolo, K. B. Plata [et al.] // *Antimicrob Agents Chemother.* – 2012. – V. 56, № 1. – P. 92-102.
430. Ernst, C. M. Gain-of-Function Mutations in the Phospholipid Flippase MprF Confer Specific Daptomycin Resistance / C. M. Ernst, C. J. Slavetinsky, S. Kuhn [et al.] // *mBio.* – 2018. – V. 9, № 6.
431. Sulaiman, J. E. Mutation in the Two-Component System Regulator YycH Leads to Daptomycin Tolerance in Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* upon Evolution with a Population Bottleneck / J. E. Sulaiman, L. Wu, H. Lam // *Microbiol Spectr.* – 2022. – P. e0168722.
432. Cameron, D. R. Vancomycin susceptibility in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* is mediated by YycHI activation of the WalRK essential two-component regulatory system / D. R. Cameron, J. H. Jiang, X. Kostoulias [et al.] // *Sci Rep.* – 2016. – V. 6. – P. 30823.
433. Friedman, L. Genetic changes that correlate with reduced susceptibility to daptomycin in *Staphylococcus aureus* / L. Friedman, J. D. Alder, J. A. Silverman // *Antimicrob Agents Chemother.* – 2006. – V. 50, № 6. – P. 2137-45.
434. Roch, M. Daptomycin Resistance in Clinical MRSA Strains Is Associated with a High Biological Fitness Cost / M. Roch, P. Gagetti, J. Davis [et al.] // *Front Microbiol.* – 2017. – V. 8. – P. 2303.

435. Peleg, A. Y. Whole genome characterization of the mechanisms of daptomycin resistance in clinical and laboratory derived isolates of *Staphylococcus aureus* / A. Y. Peleg, S. Miyakis, D. V. Ward [et al.] // *PLoS One*. – 2012. – V. 7, № 1. – P. e28316.
436. Bayer, A. S. Frequency and Distribution of Single-Nucleotide Polymorphisms within *mprF* in Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Clinical Isolates and Their Role in Cross-Resistance to Daptomycin and Host Defense Antimicrobial Peptides / A. S. Bayer, N. N. Mishra, L. Chen [et al.] // *Antimicrob Agents Chemother*. – 2015. – V. 59, № 8. – P. 4930-7.
437. Lin, Y. T. Emergence of a small colony variant of vancomycin-intermediate *Staphylococcus aureus* in a patient with septic arthritis during long-term treatment with daptomycin / Y. T. Lin, J. C. Tsai, T. Yamamoto [et al.] // *J Antimicrob Chemother*. – 2016. – V. 71, № 7. – P. 1807-14.
438. Zhang, T. Cardiolipin prevents membrane translocation and permeabilization by daptomycin / T. Zhang, J. K. Muraih, N. Tishbi [et al.] // *Journal of Biological Chemistry*. – 2014. – V. 289, № 17. – P. 11584-91.
439. Camargo, I. L. Serial daptomycin selection generates daptomycin-nonsusceptible *Staphylococcus aureus* strains with a heterogeneous vancomycin-intermediate phenotype / I. L. Camargo, H. M. Neoh, L. Cui [et al.] // *Antimicrob Agents Chemother*. – 2008. – V. 52, № 12. – P. 4289-99.
440. Howden, B. P. Evolution of multidrug resistance during *Staphylococcus aureus* infection involves mutation of the essential two component regulator WalKR / B. P. Howden, C. R. McEvoy, D. L. Allen [et al.] // *PLoS Pathog*. – 2011. – V. 7, № 11. – P. e1002359.
441. Fait, A. Adaptive laboratory evolution and independent component analysis disentangle complex vancomycin adaptation trajectories / A. Fait, Y. Seif, K. Mikkelsen [et al.] // *Proc Natl Acad Sci U S A*. – 2022. – V. 119, № 30. – P. e2118262119.
442. Mechler, L. Daptomycin Tolerance in the *Staphylococcus aureus* *pitA6* Mutant Is Due to Upregulation of the *dlt* Operon / L. Mechler, E. J. Bonetti, S. Reichert [et al.] // *Antimicrob Agents Chemother*. – 2016. – V. 60, № 5. – P. 2684-91.
443. de Carvalho, C. Impact of PrsA on membrane lipid composition during daptomycin-resistance-mediated beta-lactam sensitization in clinical MRSA strains / C. de Carvalho, A. Taglialegna, A. E. Rosato // *J Antimicrob Chemother*. – 2021. – V. 77, № 1. – P. 135-147.
444. Gries, C. M. The Ktr potassium transport system in *Staphylococcus aureus* and its role in cell physiology, antimicrobial resistance and pathogenesis / C. M. Gries, J. L. Bose, A. S. Nuxoll [et al.] // *Mol Microbiol*. – 2013. – V. 89, № 4. – P. 760-73.
445. Muller, A. Differential daptomycin resistance development in *Staphylococcus aureus* strains with active and mutated *gra* regulatory systems / A. Muller, F. Grein, A. Otto [et al.] // *Int J Med*

Microbiol. – 2018. – V. 308, № 3. – P. 335-348.

446. Cameron, D. R. Impact of daptomycin resistance on *Staphylococcus aureus* virulence / D. R. Cameron, L. I. Mortin, A. Rubio [et al.] // *Virulence*. – 2015. – V. 6, № 2. – P. 127-31.

447. Boyle-Vavra, S. Resistance to autolysis in vancomycin-selected *Staphylococcus aureus* isolates precedes vancomycin-intermediate resistance / S. Boyle-Vavra, M. Challapalli, R. S. Daum // *Antimicrob Agents Chemother*. – 2003. – V. 47, № 6. – P. 2036-9.

448. Гостев, В. В. Влияние шоковых концентраций ванкомицина на формирование гетерорезистентности у *Staphylococcus aureus* / В. В. Гостев, Ю. В. Сопова, О. С. Калиногорская [и др.] // *Антибиотики и химиотерапия*. – 2020. – Т. 65, № 9-10. – С. 3-7.

449. Ji, Q. Structure and mechanism of the essential two-component signal-transduction system WalkR in *Staphylococcus aureus* / Q. Ji, P. J. Chen, G. Qin [et al.] // *Nat Commun*. – 2016. – V. 7. – P. 11000.

450. Yin, Y. Daptomycin resistance in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* is conferred by IS256 insertion in the promoter of *mprF* along with mutations in *mprF* and *walkK* / Y. Yin, H. Chen, S. Li [et al.] // *Int J Antimicrob Agents*. – 2019. – V. 54, № 6. – P. 673-680.

451. LaMarre, J. M. Inactivation of the indigenous methyltransferase RlmN in *Staphylococcus aureus* increases linezolid resistance / J. M. LaMarre, B. P. Howden, A. S. Mankin // *Antimicrob Agents Chemother*. – 2011. – V. 55, № 6. – P. 2989-91.

452. Gao, W. Two novel point mutations in clinical *Staphylococcus aureus* reduce linezolid susceptibility and switch on the stringent response to promote persistent infection / W. Gao, K. Chua, J. K. Davies [et al.] // *PLoS Pathog*. – 2010. – V. 6, № 6. – P. e1000944.

453. van Hal, S. J. In vivo evolution of antimicrobial resistance in a series of *Staphylococcus aureus* patient isolates: the entire picture or a cautionary tale? / S. J. van Hal, J. A. Steen, B. A. Espedido [et al.] // *J Antimicrob Chemother*. – 2014. – V. 69, № 2. – P. 363-7.

454. Laureti, L. Bacterial Responses and Genome Instability Induced by Subinhibitory Concentrations of Antibiotics / L. Laureti, I. Matic, A. Gutierrez // *Antibiotics (Basel)*. – 2013. – V. 2, № 1. – P. 100-14.

455. Giuliano, C. Use of vancomycin pharmacokinetic-pharmacodynamic properties in the treatment of MRSA infections / C. Giuliano, K. K. Haase, R. Hall // *Expert Rev Anti Infect Ther*. – 2010. – V. 8, № 1. – P. 95-106.

456. Watanabe, Y. Impact of *rpoB* mutations on reduced vancomycin susceptibility in *Staphylococcus aureus* / Y. Watanabe, L. Cui, Y. Katayama [et al.] // *J Clin Microbiol*. – 2011. – V. 49, № 7. – P. 2680-4.

457. Howden, B. P. Different bacterial gene expression patterns and attenuated host immune

- responses are associated with the evolution of low-level vancomycin resistance during persistent methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* bacteraemia / B. P. Howden, D. J. Smith, A. Mansell [et al.] // *BMC Microbiol.* – 2008. – V. 8. – P. 39.
458. Cui, L. Correlation between Reduced Daptomycin Susceptibility and Vancomycin Resistance in Vancomycin-Intermediate *Staphylococcus aureus* / L. Cui, E. Tominaga, H. M. Neoh [et al.] // *Antimicrob Agents Chemother.* – 2006. – V. 50, № 3. – P. 1079-82.
459. Kuhn, M. L. Structure and protective efficacy of the *Staphylococcus aureus* autocleaving protease EpiP / M. L. Kuhn, P. Prachi, G. Minasov [et al.] // *FASEB J.* – 2014. – V. 28, № 4. – P. 1780-93.
460. Subramanian, C. Lysophosphatidylglycerol (LPG) phospholipase D maintains membrane homeostasis in *Staphylococcus aureus* by converting LPG to lysophosphatidic acid / C. Subramanian, M. K. Yun, M. M. Frank [et al.] // *J Biol Chem.* – 2023. – V. 299, № 7. – P. 104863.
461. Cheng, A. G. The giant protein Ebh is a determinant of *Staphylococcus aureus* cell size and complement resistance / A. G. Cheng, D. Missiakas, O. Schneewind // *J Bacteriol.* – 2014. – V. 196, № 5. – P. 971-81.
462. Mesak, L. R. Phenotypic changes in ciprofloxacin-resistant *Staphylococcus aureus* / L. R. Mesak, J. Davies // *Res Microbiol.* – 2009. – V. 160, № 10. – P. 785-91.
463. Champion, J. J. Evolution of ciprofloxacin-resistant *Staphylococcus aureus* in in vitro pharmacokinetic environments / J. J. Champion, P. J. McNamara, M. E. Evans // *Antimicrob Agents Chemother.* – 2004. – V. 48, № 12. – P. 4733-44.
464. Didier, J. P. Impact of ciprofloxacin exposure on *Staphylococcus aureus* genomic alterations linked with emergence of rifampin resistance / J. P. Didier, R. Villet, E. Huggler [et al.] // *Antimicrob Agents Chemother.* – 2011. – V. 55, № 5. – P. 1946-52.
465. Matsuo, M. Genetic and Transcriptomic Analyses of Ciprofloxacin-Tolerant *Staphylococcus aureus* Isolated by the Replica Plating Tolerance Isolation System (REPTIS) / M. Matsuo, M. Hiramatsu, M. Singh [et al.] // *Antimicrob Agents Chemother.* – 2019. – V. 63, № 2.
466. Zhang, F. Crystal structure of *Staphylococcus aureus* peptidyl-tRNA hydrolase at a 2.25 Å resolution / F. Zhang, Y. Song, L. Niu [et al.] // *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai).* – 2015. – V. 47, № 12. – P. 1005-10.
467. Das, G. Peptidyl-tRNA hydrolase and its critical role in protein biosynthesis / G. Das, U. Varshney // *Microbiology (Reading).* – 2006. – V. 152, № Pt 8. – P. 2191-2195.
468. Garcia-Villegas, M. R. Peptidyl-tRNA hydrolase is involved in lambda inhibition of host protein synthesis / M. R. Garcia-Villegas, F. M. De La Vega, J. M. Galindo [et al.] // *EMBO J.* –

1991. – V. 10, № 11. – P. 3549-55.

469. Khare, A. Extreme Antibiotic Persistence via Heterogeneity-Generating Mutations Targeting Translation / A. Khare, S. Tavazoie // *mSystems*. – 2020. – V. 5, № 1.

470. Bryson, D. Clinical Mutations That Partially Activate the Stringent Response Confer Multidrug Tolerance in *Staphylococcus aureus* / D. Bryson, A. G. Hettle, A. B. Boraston [et al.] // *Antimicrob Agents Chemother*. – 2020. – V. 64, № 3.

471. Elgrail, M. M. Convergent Evolution of Antibiotic Tolerance in Patients with Persistent Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Bacteremia / M. M. Elgrail, E. Chen, M. G. Shaffer [et al.] // *Infect Immun*. – 2022. – V. 90, № 4. – P. e0000122.

472. Zalis, E. A. Stochastic Variation in Expression of the Tricarboxylic Acid Cycle Produces Persister Cells / E. A. Zalis, A. S. Nuxoll, S. Manuse [et al.] // *mBio*. – 2019. – V. 10, № 5.

473. Гостев, В. В. Влияние шоковых концентраций гентамицина на формирование устойчивости и мелкоколониальных фенотипов у *Staphylococcus aureus* / В. В. Гостев, О. С. Калиногорская, О. С. Сулян [и др.] // *Антибиотики и химиотерапия*. – 2023. – Т. 68, № 9-10. – С. 25-33.

474. Dixon, S. Stability of aminoglycoside resistance in vitro in gentamicin-resistant *Staphylococcus aureus* / S. Dixon, W. Brumfitt, J. M. Hamilton-Miller // *J Hyg (Lond)*. – 1984. – V. 93, № 1. – P. 43-9.

475. Hodiamont, C. J. Clinical Pharmacokinetics of Gentamicin in Various Patient Populations and Consequences for Optimal Dosing for Gram-Negative Infections: An Updated Review / C. J. Hodiamont, A. K. van den Broek, S. L. de Vroom [et al.] // *Clin Pharmacokinet*. – 2022. – V. 61, № 8. – P. 1075-1094.

476. Vestergaard, M. Genome-Wide Identification of Antimicrobial Intrinsic Resistance Determinants in *Staphylococcus aureus* / M. Vestergaard, B. Leng, J. Haaber [et al.] // *Front Microbiol*. – 2016. – V. 7. – P. 2018.

477. Ibacache-Quiroga, C. Parallel Evolution of High-Level Aminoglycoside Resistance in *Escherichia coli* Under Low and High Mutation Supply Rates / C. Ibacache-Quiroga, J. C. Oliveros, A. Couce [et al.] // *Front Microbiol*. – 2018. – V. 9. – P. 427.

478. Ng, J. M. L. Mutations in *atpG2* may confer resistance to gentamicin in *Listeria monocytogenes* / J. M. L. Ng, Y. F. Ngeow, S. H. Saw [et al.] // *J Med Microbiol*. – 2022. – V. 71, № 12.

479. Vestergaard, M. Inhibition of the ATP Synthase Eliminates the Intrinsic Resistance of *Staphylococcus aureus* towards Polymyxins / M. Vestergaard, K. Nohr-Meldgaard, M. S. Bojer [et al.] // *mBio*. – 2017. – V. 8, № 5.

480. Liu, L. Inhibition of the ATP synthase sensitizes *Staphylococcus aureus* towards human antimicrobial peptides / L. Liu, C. Beck, K. Nohr-Meldgaard [et al.] // *Sci Rep.* – 2020. – V. 10, № 1. – P. 11391.
481. Lobritz, M. A. Antibiotic efficacy is linked to bacterial cellular respiration / M. A. Lobritz, P. Belenky, C. B. Porter [et al.] // *Proc Natl Acad Sci U S A.* – 2015. – V. 112, № 27. – P. 8173-80.
482. Rodriguez de Evgrafov, M. C. Systematic Investigation of Resistance Evolution to Common Antibiotics Reveals Conserved Collateral Responses across Common Human Pathogens / M. C. Rodriguez de Evgrafov, M. Faza, K. Asimakopoulos [et al.] // *Antimicrob Agents Chemother.* – 2020. – V. 65, № 1.
483. Golparian, D. High-level in vitro resistance to gentamicin acquired in a stepwise manner in *Neisseria gonorrhoeae* / D. Golparian, S. Jacobsson, C. L. Holley [et al.] // *J Antimicrob Chemother.* – 2023. – V. 78, № 7. – P. 1769-1778.
484. Rice, D. A. Daptomycin in bone and joint infections: a review of the literature / D. A. Rice, L. Mendez-Vigo // *Arch Orthop Trauma Surg.* – 2009. – V. 129, № 11. – P. 1495-504.
485. Golikova, M. V. MPC-Based Prediction of Anti-Mutant Effectiveness of Antibiotic Combinations: In Vitro Model Study with Daptomycin and Gentamicin against *Staphylococcus aureus* / M. V. Golikova, E. N. Strukova, Y. A. Portnoy [et al.] // *Antibiotics (Basel).* – 2021. – V. 10, № 10.
486. Schaaff, F. Mutations are involved in emergence of aminoglycoside-induced small colony variants of *Staphylococcus aureus* / F. Schaaff, G. Bierbaum, N. Baumert [et al.] // *Int J Med Microbiol.* – 2003. – V. 293, № 6. – P. 427-35.
487. Tuchscher, L. *Staphylococcus aureus* develops increased resistance to antibiotics by forming dynamic small colony variants during chronic osteomyelitis / L. Tuchscher, C. A. Kreis, V. Hoerr [et al.] // *J Antimicrob Chemother.* – 2016. – V. 71, № 2. – P. 438-48.
488. Becker, K. Detection, Identification and Diagnostic Characterization of the Staphylococcal Small Colony-Variant (SCV) Phenotype / K. Becker // *Antibiotics (Basel).* – 2023. – V. 12, № 9.
489. Desai, J. Structure, Function, and Inhibition of *Staphylococcus aureus* Heptaprenyl Diphosphate Synthase / J. Desai, Y. L. Liu, H. Wei [et al.] // *ChemMedChem.* – 2016. – V. 11, № 17. – P. 1915-23.
490. Gevers, D. Opinion: Re-evaluating prokaryotic species / D. Gevers, F. M. Cohan, J. G. Lawrence [et al.] // *Nat Rev Microbiol.* – 2005. – V. 3, № 9. – P. 733-9.
491. Woodford, N. Multiresistant Gram-negative bacteria: the role of high-risk clones in the dissemination of antibiotic resistance / N. Woodford, J. F. Turton, D. M. Livermore // *FEMS Microbiol Rev.* – 2011. – V. 35, № 5. – P. 736-55.

492. Guzman Prieto, A. M. Global Emergence and Dissemination of Enterococci as Nosocomial Pathogens: Attack of the Clones? / A. M. Guzman Prieto, W. van Schaik, M. R. Rogers [et al.] // *Front Microbiol.* – 2016. – V. 7. – P. 788.
493. Chambers, H. F. Waves of resistance: *Staphylococcus aureus* in the antibiotic era / H. F. Chambers, F. R. Deleo // *Nat Rev Microbiol.* – 2009. – V. 7, № 9. – P. 629-41.
494. Vos, M. A comparison of homologous recombination rates in bacteria and archaea / M. Vos, X. Didelot // *ISME J.* – 2009. – V. 3, № 2. – P. 199-208.
495. Shcherbakov, D. Directed mutagenesis of *Mycobacterium smegmatis* 16S rRNA to reconstruct the in vivo evolution of aminoglycoside resistance in *Mycobacterium tuberculosis* / D. Shcherbakov, R. Akbergenov, T. Matt [et al.] // *Mol Microbiol.* – 2010. – V. 77, № 4. – P. 830-40.
496. Monk, I. R. Genetic manipulation of *Staphylococci*-breaking through the barrier / I. R. Monk, T. J. Foster // *Front Cell Infect Microbiol.* – 2012. – V. 2. – P. 49.
497. Kreiswirth, B. N. The toxic shock syndrome exotoxin structural gene is not detectably transmitted by a prophage / B. N. Kreiswirth, S. Lofdahl, M. J. Betley [et al.] // *Nature.* – 1983. – V. 305, № 5936. – P. 709-12.
498. Chen, W. Rapid and Efficient Genome Editing in *Staphylococcus aureus* by Using an Engineered CRISPR/Cas9 System / W. Chen, Y. Zhang, W. S. Yeo [et al.] // *J Am Chem Soc.* – 2017. – V. 139, № 10. – P. 3790-3795.
499. Liu, Q. CRISPR/Cas9-based efficient genome editing in *Staphylococcus aureus* / Q. Liu, Y. Jiang, L. Shao [et al.] // *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai).* – 2017. – V. 49, № 9. – P. 764-770.
500. Tenailon, O. The molecular diversity of adaptive convergence / O. Tenailon, A. Rodriguez-Verdugo, R. L. Gaut [et al.] // *Science.* – 2012. – V. 335, № 6067. – P. 457-61.
501. Elena, S. F. Evolution experiments with microorganisms: the dynamics and genetic bases of adaptation / S. F. Elena, R. E. Lenski // *Nat Rev Genet.* – 2003. – V. 4, № 6. – P. 457-69.
502. Fox, J. W. From Here to Eternity--The Theory and Practice of a Really Long Experiment / J. W. Fox, R. E. Lenski // *PLoS Biol.* – 2015. – V. 13, № 6. – P. e1002185.
503. Draghi, J. A. Selection biases the prevalence and type of epistasis along adaptive trajectories / J. A. Draghi, J. B. Plotkin // *Evolution.* – 2013. – V. 67, № 11. – P. 3120-31.
504. Lenski, R. E. Sustained fitness gains and variability in fitness trajectories in the long-term evolution experiment with *Escherichia coli* / R. E. Lenski, M. J. Wisner, N. Ribeck [et al.] // *Proc Biol Sci.* – 2015. – V. 282, № 1821. – P. 20152292.
505. Maddamsetti, R. Divergent Evolution of Mutation Rates and Biases in the Long-Term Evolution Experiment with *Escherichia coli* / R. Maddamsetti, N. A. Grant // *Genome Biol Evol.* –

2020. – V. 12, № 9. – P. 1591-1603.

506. Gallet, R. Measuring selection coefficients below 10(-3): method, questions, and prospects /

R. Gallet, T. F. Cooper, S. F. Elena [et al.] // Genetics. – 2012. – V. 190, № 1. – P. 175-86.

ПРИЛОЖЕНИЕ 1. ПАТЕНТЫ НА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Гостев В.В., Калиногорская О.С., Сопова Ю.В., Велижанина М.Е., Цветкова И.А., Сидоренко С.В. Штамм метициллинрезистентного *Staphylococcus aureus* (MRSA), характеризующийся устойчивостью к цефтаролину и используемый в качестве контрольной тест-культуры для определения чувствительности к бета-лактамам антибиотикам (варианты). Тип: патент на изобретение, номер патента: RU2798788C1, номер заявки: 2022122669, дата регистрации: 22.08.2022, дата публикации: 27.06.2023
2. Гостев В.В., Калиногорская О.С., Сопова Ю.В., Велижанина М.Е., Агеевец И.В., Агеевец В.А., Сидоренко С.В. Штаммы *Staphylococcus aureus* (MSSA), характеризующиеся тесно-независимыми механизмами устойчивости к бета-лактамам и используемые в качестве контрольных тест-культур для определения чувствительности к бета-лактамам антибиотикам. Тип: патент на изобретение, номер патента: RU2802895C1, номер заявки: 2022120909, дата регистрации: 29.07.2022, дата публикации: 05.09.2023
3. Гостев В.В., Калиногорская О.С., Сопова Ю.В., Велижанина М.Е., Сидоренко С.В. Штаммы *Staphylococcus aureus*, характеризующиеся устойчивостью к ванкомицину и используемые в качестве контрольных тест-культур для определения чувствительности к гликопептидным антибиотикам. Тип: патент на изобретение, номер патента: RU2802896C1, номер заявки: 2022122329, дата регистрации: 16.08.2022, дата публикации: 05.09.2023
4. Гостев В.В., Калиногорская О.С., Сопова Ю.В., Велижанина М.Е., Сидоренко С.В. Штамм *Staphylococcus aureus*, характеризующийся устойчивостью к даптомицину и используемый в качестве контрольной тест-культуры для определения чувствительности к антибиотикам. Тип: патент на изобретение, номер патента: RU2809847C1, номер заявки: 2022122330, дата регистрации: 16.08.2022, дата публикации: 19.12.2023
5. Гостев В.В., Калиногорская О.С., Сулян О.С., Чулкова П.С., Сопова Ю.В., Велижанина М.Е., Сидоренко С.В. Штамм *Staphylococcus aureus* A9, характеризующийся толерантностью к ципрофлоксацину и используемый в качестве контрольной тест-культуры для определения чувствительности к антибиотикам. Тип: патент на изобретение, номер патента: RU2809538C1, номер заявки: 2022122666, дата регистрации: 22.08.2022, дата публикации: 12.12.2023

ПРИЛОЖЕНИЕ 2. СВИДЕТЕЛЬСТВА О ДЕПОНИРОВАНИИ ШТАММОВ

ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА ПО НАДЗОРУ В СФЕРЕ ЗАЩИТЫ ПРАВ ПОТРЕБИТЕЛЕЙ
И БЛАГОПОЛУЧИЯ ЧЕЛОВЕКА

**ГОСУДАРСТВЕННАЯ КОЛЛЕКЦИЯ ПАТОГЕННЫХ
МИКРООРГАНИЗМОВ И КЛЕТОЧНЫХ КУЛЬТУР
«ГКПМ – ОБОЛЕНСК»**

ФЕДЕРАЛЬНОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ НАУКИ
«ГОСУДАРСТВЕННЫЙ НАУЧНЫЙ ЦЕНТР ПРИКЛАДНОЙ МИКРОБИОЛОГИИ И БИОТЕХНОЛОГИИ»
(ФБУН ГНЦ ГИМБ)

142279, Московская область, г.о. Серпухов, п. Оболенск, Территория «Квартал А», д. 24
Тел. 36-00-03, факс 36-00-10, код (4967), E-mail: info@obolensk.org, http://www.obolensk.org

**СВИДЕТЕЛЬСТВО
О ДЕПОНИРОВАНИИ**

№ 335 «06» июня 2022 года

Государственная коллекция патогенных микроорганизмов и клеточных культур «ГКПМ-Оболенск» депонировала для целей национальной патентной процедуры **06 июня 2022 года** авторский штамм микроорганизма *Staphylococcus aureus S40422 sp.*

Область применения штамма: изобретение относится к медицинской микробиологии. Метциллинорезистентный штамм *Staphylococcus aureus (MRSA) S40422 sp.* характеризуется независимым механизмом устойчивостью к цефтаролину; может быть использован в качестве тест-культуры для оценки чувствительности к антибактериальным препаратам; для поиска новых мишеней в клетке с целью разработки новых антибактериальных препаратов; для тестирования новых потенциальных антимикробных соединений.

Депозитор: Федеральное государственное бюджетное учреждение «Детский научно-клинический центр инфекционных болезней Федерального медико-биологического агентства» (ФГБУ ДНКЦИБ ФМБА России).

197022, г. Санкт-Петербург, ул. Профессора Попова, д. 9. Тел./Факс (812) 234 60 04/234 96 91. E-mail: niidi@niidi.ru ; ni_i_detinf@fmba@mail.ru

Автор (ы): Гостев В.В., к.б.н.; Калининская О.С., к.м.н.; Согова Ю.В., к.б.н.; Велижанна М.Е.; Цветкова И.А., к.б.н.; Сидоренко С.В., д.м.н.

Штамму присвоен регистрационный номер: В-9991

Свидетельство выдано для подачи заявки на изобретение.

Директор  И.А. Дятлов

Заведующий отделом коллекционных культур  А.Г. Богун



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА ПО НАДЗОРУ В СФЕРЕ ЗАЩИТЫ ПРАВ ПОТРЕБИТЕЛЕЙ
И БЛАГОПОЛУЧИЯ ЧЕЛОВЕКА

**ГОСУДАРСТВЕННАЯ КОЛЛЕКЦИЯ ПАТОГЕННЫХ
МИКРООРГАНИЗМОВ И КЛЕТОЧНЫХ КУЛЬТУР
«ГКПМ – ОБОЛЕНСК»**

ФЕДЕРАЛЬНОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ НАУКИ
«ГОСУДАРСТВЕННЫЙ НАУЧНЫЙ ЦЕНТР ПРИКЛАДНОЙ МИКРОБИОЛОГИИ И БИОТЕХНОЛОГИИ»
(ФБУН ГНЦ ГИМБ)

142279, Московская область, г.о. Серпухов, п. Оболенск, Территория «Квартал А», д. 24
Тел. 36-00-03, факс 36-00-10, код (4967), E-mail: info@obolensk.org, http://www.obolensk.org

**СВИДЕТЕЛЬСТВО
О ДЕПОНИРОВАНИИ**

№ 334 «06» июня 2022 года

Государственная коллекция патогенных микроорганизмов и клеточных культур «ГКПМ-Оболенск» депонировала для целей национальной патентной процедуры **06 июня 2022 года** авторский штамм микроорганизма *Staphylococcus aureus S40146 sp.*

Область применения штамма: изобретение относится к медицинской микробиологии. Метциллинорезистентный штамм *Staphylococcus aureus (MRSA) S40146 sp.* характеризуется устойчивостью к цефтаролину за счет мутаций в гене mecA; может быть использован в качестве тест-культуры для оценки чувствительности к цефтаролину; для поиска новых мишеней в клетке с целью разработки новых антибактериальных препаратов; для тестирования новых потенциальных антимикробных соединений.

Депозитор: Федеральное государственное бюджетное учреждение «Детский научно-клинический центр инфекционных болезней Федерального медико-биологического агентства» (ФГБУ ДНКЦИБ ФМБА России).

197022, г. Санкт-Петербург, ул. Профессора Попова, д. 9. Тел./Факс (812) 234 60 04/234 96 91. E-mail: niidi@niidi.ru ; ni_i_detinf@fmba@mail.ru

Автор (ы): Гостев В.В., к.б.н.; Калининская О.С., к.м.н.; Согова Ю.В., к.б.н.; Велижанна М.Е.; Цветкова И.А., к.б.н.; Сидоренко С.В., д.м.н.

Штамму присвоен регистрационный номер: В-9990

Свидетельство выдано для подачи заявки на изобретение.

Директор  И.А. Дятлов

Заведующий отделом коллекционных культур  А.Г. Богун



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА ПО НАДЗОРУ В СФЕРЕ ЗАЩИТЫ ПРАВ ПОТРЕБИТЕЛЕЙ
И БЛАГОПОЛУЧИЯ ЧЕЛОВЕКА

**ГОСУДАРСТВЕННАЯ КОЛЛЕКЦИЯ ПАТОГЕННЫХ
МИКРООРГАНИЗМОВ И КЛЕТОЧНЫХ КУЛЬТУР
«ГКПМ – ОБОЛЕНСК»**

ФЕДЕРАЛЬНОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ НАУКИ
«ГОСУДАРСТВЕННЫЙ НАУЧНЫЙ ЦЕНТР ПРИКЛАДНОЙ МИКРОБИОЛОГИИ И БИОТЕХНОЛОГИИ»
(ФБУН ГНЦ ПМБ)

142279, Московская область, г.о. Серпухов, п. Оболенск, Территория «Квартаз А», д. 24
Тел. 36-00-03, факс 36-00-10, код (4967), E-mail: info@obolensk.org, http://www.obolensk.org

**СВИДЕТЕЛЬСТВО
О ДЕПОНИРОВАНИИ**

№ 329 «06» июня 2022 года

Государственная коллекция патогенных микроорганизмов и клеточных культур «ГКПМ-Оболенск» депонировала для целей национальной патентной процедуры **06 июня 2022 года** авторский штамм микроорганизма *Staphylococcus aureus B 19*.

Область применения штамма: изобретение относится к медицинской микробиологии. Штамм *Staphylococcus aureus B 19*, характеризуется толерантностью действию к гентамицину, может быть использован в опытах по моделированию фармакодинамических параметров при использовании аминогликозидных антибиотиков; для тестирования новых потенциальных антимикробных соединений; как референс-штамм для изучения феномена антибиотикотолерантности.

Депозитор: Федеральное государственное бюджетное учреждение «Детский научно-клинический центр инфекционных болезней Федерального медико-биологического агентства» (ФГБУ ДНКЦИБ ФМБА России).

197022, г. Санкт-Петербург, ул. Профессора Попова, д. 9. Тел./Факс (812) 234 60 04/234 96 91. E-mail: niidi@niidi.ru; ni_i_detinf@fmba@mail.ru

Автор (ы): Гостев В.В., к.б.н.; Калининская О.С., к.м.н.; Суляев О.С.; Чулкова П.С.; Сопова Ю.В., к.б.н.; Велижанкина М.Е.; Сидоренко С.В., д.м.н.

Штамму присвоен регистрационный номер: В-9985

Свидетельство выдано для подачи заявки на изобретение.

Директор  И.А. Детлов
Заведующий отделом коллекционных культур  А.Г. Богун

ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА ПО НАДЗОРУ В СФЕРЕ ЗАЩИТЫ ПРАВ ПОТРЕБИТЕЛЕЙ
И БЛАГОПОЛУЧИЯ ЧЕЛОВЕКА

**ГОСУДАРСТВЕННАЯ КОЛЛЕКЦИЯ ПАТОГЕННЫХ
МИКРООРГАНИЗМОВ И КЛЕТОЧНЫХ КУЛЬТУР
«ГКПМ – ОБОЛЕНСК»**

ФЕДЕРАЛЬНОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ НАУКИ
«ГОСУДАРСТВЕННЫЙ НАУЧНЫЙ ЦЕНТР ПРИКЛАДНОЙ МИКРОБИОЛОГИИ И БИОТЕХНОЛОГИИ»
(ФБУН ГНЦ ПМБ)

142279, Московская область, г.о. Серпухов, п. Оболенск, Территория «Квартаз А», д. 24
Тел. 36-00-03, факс 36-00-10, код (4967), E-mail: info@obolensk.org, http://www.obolensk.org

**СВИДЕТЕЛЬСТВО
О ДЕПОНИРОВАНИИ**

№ 330 «06» июня 2022 года

Государственная коллекция патогенных микроорганизмов и клеточных культур «ГКПМ-Оболенск» депонировала для целей национальной патентной процедуры **06 июня 2022 года** авторский штамм микроорганизма *Staphylococcus aureus OXA 45*.

Область применения штамма: изобретение относится к медицинской микробиологии. Штамм *Staphylococcus aureus OXA 45*, характеризуется тесно-независимыми механизмами устойчивости к бета-лактамным антибиотикам; может быть использован в качестве тест-культуры для оценки чувствительности к антимикробным препаратам; для поиска новых мишеней в клетке с целью разработки новых антибактериальных препаратов; для тестирования новых потенциальных антимикробных соединений.

Депозитор: Федеральное государственное бюджетное учреждение «Детский научно-клинический центр инфекционных болезней Федерального медико-биологического агентства» (ФГБУ ДНКЦИБ ФМБА России).

197022, г. Санкт-Петербург, ул. Профессора Попова, д. 9. Тел./Факс (812) 234 60 04/234 96 91. E-mail: niidi@niidi.ru; ni_i_detinf@fmba@mail.ru

Автор (ы): Гостев В.В., к.б.н.; Калининская О.С., к.м.н.; Суляев О.С.; Чулкова П.С.; Сопова Ю.В., к.б.н.; Велижанкина М.Е.; Сидоренко С.В., д.м.н.

Штамму присвоен регистрационный номер: В-9986

Свидетельство выдано для подачи заявки на изобретение.

Директор  И.А. Детлов
Заведующий отделом коллекционных культур  А.Г. Богун

ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА ПО НАДЗОРУ В СФЕРЕ ЗАЩИТЫ ПРАВ ПОТРЕБИТЕЛЕЙ
И БЛАГОПОЛУЧИЯ ЧЕЛОВЕКА

**ГОСУДАРСТВЕННАЯ КОЛЛЕКЦИЯ ПАТОГЕННЫХ
МИКРООРГАНИЗМОВ И КЛЕТОЧНЫХ КУЛЬТУР
«ГКПМ – ОБОЛЕНСК»**

ФЕДЕРАЛЬНОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ НАУКИ
«ГОСУДАРСТВЕННЫЙ НАУЧНЫЙ ЦЕНТР ПРИКЛАДНОЙ МИКРОБИОЛОГИИ И БИОТЕХНОЛОГИИ»
(ФБУН ГНЦ ПМБ)

142279, Московская область, г.о. Серпухов, п. Оболенск, Территория «Квартаз А», д. 24
Тел. 36-00-03, факс 36-00-10, код (4967), E-mail: info@obolensk.org, http://www.obolensk.org

**СВИДЕТЕЛЬСТВО
О ДЕПОНИРОВАНИИ**

№ 331 «06» июня 2022 года

Государственная коллекция патогенных микроорганизмов и клеточных культур «ГКПМ-Оболенск» депонировала для целей национальной патентной процедуры **06 июня 2022 года** авторский штамм микроорганизма *Staphylococcus aureus OXA 68*.

Область применения штамма: изобретение относится к медицинской микробиологии. Штамм *Staphylococcus aureus OXA 68*, характеризуется тесно-независимыми механизмами устойчивости к бета-лактамным антибиотикам; может быть использован в качестве тест-культуры для оценки чувствительности к антимикробным препаратам; для поиска новых мишеней в клетке с целью разработки новых антибактериальных препаратов; для тестирования новых потенциальных антимикробных соединений.

Депозитор: Федеральное государственное бюджетное учреждение «Детский научно-клинический центр инфекционных болезней Федерального медико-биологического агентства» (ФГБУ ДНКЦИБ ФМБА России).

197022, г. Санкт-Петербург, ул. Профессора Попова, д. 9. Тел./Факс (812) 234 60 04/234 96 91. E-mail: niidi@niidi.ru; ni_i_detinf@fmba@mail.ru

Автор (ы): Гостев В.В., к.б.н.; Калининская О.С., к.м.н.; Суляев О.С.; Чулкова П.С.; Сопова Ю.В., к.б.н.; Велижанкина М.Е.; Сидоренко С.В., д.м.н.

Штамму присвоен регистрационный номер: В-9987

Свидетельство выдано для подачи заявки на изобретение.

Директор  И.А. Детлов
Заведующий отделом коллекционных культур  А.Г. Богун

ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА ПО НАДЗОРУ В СФЕРЕ ЗАЩИТЫ ПРАВ ПОТРЕБИТЕЛЕЙ
И БЛАГОПОЛУЧИЯ ЧЕЛОВЕКА

**ГОСУДАРСТВЕННАЯ КОЛЛЕКЦИЯ ПАТОГЕННЫХ
МИКРООРГАНИЗМОВ И КЛЕТОЧНЫХ КУЛЬТУР
«ГКПМ – ОБОЛЕНСК»**

ФЕДЕРАЛЬНОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ НАУКИ
«ГОСУДАРСТВЕННЫЙ НАУЧНЫЙ ЦЕНТР ПРИКЛАДНОЙ МИКРОБИОЛОГИИ И БИОТЕХНОЛОГИИ»
(ФБУН ГНЦ ПМБ)

142279, Московская область, г.о. Серпухов, п. Оболенск, Территория «Квартаз А», д. 24
Тел. 36-00-03, факс 36-00-10, код (4967), E-mail: info@obolensk.org, http://www.obolensk.org

**СВИДЕТЕЛЬСТВО
О ДЕПОНИРОВАНИИ**

№ 333 «06» июня 2022 года

Государственная коллекция патогенных микроорганизмов и клеточных культур «ГКПМ-Оболенск» депонировала для целей национальной патентной процедуры **06 июня 2022 года** авторский штамм микроорганизма *Staphylococcus aureus SA0077 var.*

Область применения штамма: изобретение относится к медицинской микробиологии. Штамм *Staphylococcus aureus SA0077 var.*, характеризуется гетерорезистентностью к ванкомицину; может быть использован в качестве тест-культуры для оценки чувствительности к гликопептидным антибиотикам или как референс-штамм для постановки РАР анализа; для поиска новых мишеней в клетке с целью разработки новых потенциальных антибактериальных препаратов; для тестирования новых потенциальных антимикробных соединений.

Депозитор: Федеральное государственное бюджетное учреждение «Детский научно-клинический центр инфекционных болезней Федерального медико-биологического агентства» (ФГБУ ДНКЦИБ ФМБА России).

197022, г. Санкт-Петербург, ул. Профессора Попова, д. 9. Тел./Факс (812) 234 60 04/234 96 91. E-mail: niidi@niidi.ru; ni_i_detinf@fmba@mail.ru

Автор (ы): Гостев В.В., к.б.н.; Калининская О.С., к.м.н.; Сопова Ю.В., к.б.н.; Велижанкина М.Е.; Сидоренко С.В., д.м.н.

Штамму присвоен регистрационный номер: В-9989

Свидетельство выдано для подачи заявки на изобретение.

Директор  И.А. Детлов
Заведующий отделом коллекционных культур  А.Г. Богун

ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА ПО НАДЗОРУ В СФЕРЕ ЗАЩИТЫ ПРАВ ПОТРЕБИТЕЛЕЙ
И БЛАГОПОЛУЧИЯ ЧЕЛОВЕКА

**ГОСУДАРСТВЕННАЯ КОЛЛЕКЦИЯ ПАТОГЕННЫХ
МИКРООРГАНИЗМОВ И КЛЕТОЧНЫХ КУЛЬТУР
«ГКПМ – ОБОЛЕНСК»**

ФЕДЕРАЛЬНОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ НАУКИ
«ГОСУДАРСТВЕННЫЙ НАУЧНЫЙ ЦЕНТР ПРИКЛАДНОЙ МИКРОБИОЛОГИИ И БИОТЕХНОЛОГИИ»
(ФБУН ГНЦ ПМБ)

142279, Московская область, г.о. Серпухов, п. Оболенск, Территория «Квартал А», д. 24
Тел. 36-00-03, факс 36-00-10, код (4967), E-mail: info@obolensk.org, http://www.obolensk.org

**СВИДЕТЕЛЬСТВО
О ДЕПОНИРОВАНИИ**

№ 332 «06» июня 2022 года

Государственная коллекция
патогенных микроорганизмов и клеточных культур «ГКПМ-Оболенск» депонировала для целей
национальной патентной процедуры
06 июня 2022 года
авторский штамм микроорганизма
Staphylococcus aureus S40077 dep.

Область применения штамма: изобретение относится к медицинской микробиологии. Штамм *Staphylococcus aureus S40077 dep.* характеризуется устойчивостью к даптомицину, может быть использован в качестве тест-культуры для оценки чувствительности к даптомицину, а также препаратов, действующих на цитоплазматическую мембрану, противомикробных пептидов; для поиска новых мишеней в клетке с целью разработки новых потенциальных антимикробных соединений.

Депозитор: Федеральное государственное бюджетное учреждение «Детский научно-клинический центр инфекционных болезней Федерального медико-биологического агентства» (ФГБУ ДНКЦИБ ФМБА России).
197022, г. Санкт-Петербург, ул. Профессора Попова, д. 9. Тел./Факс (812) 234 60 04/234 96 91. E-mail: nidi@nidi.ru; ni_detin@fmba@mail.ru

Автор (ы): Гостев В.В., к.б.н.; Калининская О.С., к.м.н.; Солова Ю.В., к.б.н.; Велижанкина М.Е.; Сидоренко С.В., д.м.н.

Штамму присвоен регистрационный номер: В-9985
Свидетельство выдано для подачи заявки на изобретение.

Директор  И.А. Детлов

Заведующий отделом
коллекционных культур  А.Г. Богун



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА ПО НАДЗОРУ В СФЕРЕ ЗАЩИТЫ ПРАВ ПОТРЕБИТЕЛЕЙ
И БЛАГОПОЛУЧИЯ ЧЕЛОВЕКА

**ГОСУДАРСТВЕННАЯ КОЛЛЕКЦИЯ ПАТОГЕННЫХ
МИКРООРГАНИЗМОВ И КЛЕТОЧНЫХ КУЛЬТУР
«ГКПМ – ОБОЛЕНСК»**

ФЕДЕРАЛЬНОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ НАУКИ
«ГОСУДАРСТВЕННЫЙ НАУЧНЫЙ ЦЕНТР ПРИКЛАДНОЙ МИКРОБИОЛОГИИ И БИОТЕХНОЛОГИИ»
(ФБУН ГНЦ ПМБ)

142279, Московская область, г.о. Серпухов, п. Оболенск, Территория «Квартал А», д. 24
Тел. 36-00-03, факс 36-00-10, код (4967), E-mail: info@obolensk.org, http://www.obolensk.org

**СВИДЕТЕЛЬСТВО
О ДЕПОНИРОВАНИИ**

№ 327 «06» июня 2022 года

Государственная коллекция
патогенных микроорганизмов и клеточных культур «ГКПМ-Оболенск» депонировала для целей
национальной патентной процедуры
06 июня 2022 года
авторский штамм микроорганизма
Staphylococcus aureus A dep/40.

Область применения штамма: изобретение относится к медицинской микробиологии. Штамм *Staphylococcus aureus A dep/40.* характеризуется устойчивостью к даптомицину, может быть использован в качестве тест-культуры для оценки чувствительности к даптомицину, а также препаратов, действующих на цитоплазматическую мембрану, противомикробных пептидов; для поиска новых мишеней в клетке с целью разработки новых потенциальных антимикробных соединений.

Депозитор: Федеральное государственное бюджетное учреждение «Детский научно-клинический центр инфекционных болезней Федерального медико-биологического агентства» (ФГБУ ДНКЦИБ ФМБА России).
197022, г. Санкт-Петербург, ул. Профессора Попова, д. 9. Тел./Факс (812) 234 60 04/234 96 91. E-mail: nidi@nidi.ru; ni_detin@fmba@mail.ru

Автор (ы): Гостев В.В., к.б.н.; Калининская О.С., к.м.н.; Солова Ю.В., к.б.н.; Велижанкина М.Е.; Сидоренко С.В., д.м.н.

Штамму присвоен регистрационный номер: В-9983
Свидетельство выдано для подачи заявки на изобретение.

Директор  И.А. Детлов

Заведующий отделом
коллекционных культур  А.Г. Богун



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА ПО НАДЗОРУ В СФЕРЕ ЗАЩИТЫ ПРАВ ПОТРЕБИТЕЛЕЙ
И БЛАГОПОЛУЧИЯ ЧЕЛОВЕКА

**ГОСУДАРСТВЕННАЯ КОЛЛЕКЦИЯ ПАТОГЕННЫХ
МИКРООРГАНИЗМОВ И КЛЕТОЧНЫХ КУЛЬТУР
«ГКПМ – ОБОЛЕНСК»**

ФЕДЕРАЛЬНОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ НАУКИ
«ГОСУДАРСТВЕННЫЙ НАУЧНЫЙ ЦЕНТР ПРИКЛАДНОЙ МИКРОБИОЛОГИИ И БИОТЕХНОЛОГИИ»
(ФБУН ГНЦ ПМБ)

142279, Московская область, г.о. Серпухов, п. Оболенск, Территория «Квартал А», д. 24
Тел. 36-00-03, факс 36-00-10, код (4967), E-mail: info@obolensk.org, http://www.obolensk.org

**СВИДЕТЕЛЬСТВО
О ДЕПОНИРОВАНИИ**

№ 326 «06» июня 2022 года

Государственная коллекция
патогенных микроорганизмов и клеточных культур «ГКПМ-Оболенск» депонировала для целей
национальной патентной процедуры
06 июня 2022 года
авторский штамм микроорганизма
Staphylococcus aureus A9.

Область применения штамма: изобретение относится к медицинской микробиологии. Штамм *Staphylococcus aureus A9.* характеризуется толерантностью к действию ципрофлоксацина и может быть использован в опытах по моделированию фармакодинамических параметров при использовании фторхинолоновых антибиотиков; для тестирования новых потенциальных антимикробных соединений; как референс-штамм для изучения феномена антибиотикотолерантности.

Депозитор: Федеральное государственное бюджетное учреждение «Детский научно-клинический центр инфекционных болезней Федерального медико-биологического агентства» (ФГБУ ДНКЦИБ ФМБА России).
197022, г. Санкт-Петербург, ул. Профессора Попова, д. 9. Тел./Факс (812) 234 60 04/234 96 91. E-mail: nidi@nidi.ru; ni_detin@fmba@mail.ru

Автор (ы): Гостев В.В., к.б.н.; Калининская О.С., к.м.н.; Суляк О.С.; Чулкова П.С.; Солова Ю.В., к.б.н.; Велижанкина М.Е.; Сидоренко С.В., д.м.н.

Штамму присвоен регистрационный номер: В-9982
Свидетельство выдано для подачи заявки на изобретение.

Директор  И.А. Детлов

Заведующий отделом
коллекционных культур  А.Г. Богун



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА ПО НАДЗОРУ В СФЕРЕ ЗАЩИТЫ ПРАВ ПОТРЕБИТЕЛЕЙ
И БЛАГОПОЛУЧИЯ ЧЕЛОВЕКА

**ГОСУДАРСТВЕННАЯ КОЛЛЕКЦИЯ ПАТОГЕННЫХ
МИКРООРГАНИЗМОВ И КЛЕТОЧНЫХ КУЛЬТУР
«ГКПМ – ОБОЛЕНСК»**

ФЕДЕРАЛЬНОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ НАУКИ
«ГОСУДАРСТВЕННЫЙ НАУЧНЫЙ ЦЕНТР ПРИКЛАДНОЙ МИКРОБИОЛОГИИ И БИОТЕХНОЛОГИИ»
(ФБУН ГНЦ ПМБ)

142279, Московская область, г.о. Серпухов, п. Оболенск, Территория «Квартал А», д. 24
Тел. 36-00-03, факс 36-00-10, код (4967), E-mail: info@obolensk.org, http://www.obolensk.org

**СВИДЕТЕЛЬСТВО
О ДЕПОНИРОВАНИИ**

№ 328 «06» июня 2022 года

Государственная коллекция
патогенных микроорганизмов и клеточных культур «ГКПМ-Оболенск» депонировала для целей
национальной патентной процедуры
06 июня 2022 года
авторский штамм микроорганизма
Staphylococcus aureus A van/40.

Область применения штамма: изобретение относится к медицинской микробиологии. Штамм *Staphylococcus aureus A van/40.* характеризуется гетерорезистентностью к ванкомицину, может быть использован в качестве тест-культуры для оценки чувствительности к гликопептидным антибиотикам или как референс-штамм для постановки RAP анализа; для поиска новых мишеней в клетке с целью разработки новых антибактериальных препаратов; для тестирования новых потенциальных антимикробных соединений.

Депозитор: Федеральное государственное бюджетное учреждение «Детский научно-клинический центр инфекционных болезней Федерального медико-биологического агентства» (ФГБУ ДНКЦИБ ФМБА России).
197022, г. Санкт-Петербург, ул. Профессора Попова, д. 9. Тел./Факс (812) 234 60 04/234 96 91. E-mail: nidi@nidi.ru; ni_detin@fmba@mail.ru

Автор (ы): Гостев В.В., к.б.н.; Калининская О.С., к.м.н.; Солова Ю.В., к.б.н.; Велижанкина М.Е.; Сидоренко С.В., д.м.н.

Штамму присвоен регистрационный номер: В-9984
Свидетельство выдано для подачи заявки на изобретение.

Директор  И.А. Детлов

Заведующий отделом
коллекционных культур  А.Г. Богун



**ПРИЛОЖЕНИЕ 3. СПИСОК ОСНОВНЫХ РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ
ДИССЕРТАЦИИ**

Глава 1.

1. Гостев, В. В. Метициллинрезистентные золотистые стафилококки: проблема распространения в мире и России / В. В. Гостев, С. В. Сидоренко // Фарматека. – 2015. – Т. 299, № 6. – С. 30-38.
2. Гостев, В. В. Гетерорезистентность: клиническое значение и методы выявления (обзор литературы) / В. В. Гостев, С. В. Сидоренко // Клиническая лабораторная диагностика. – 2023. – Т. 68, № 7. – С. 418-427.
3. Гостев, В. В. Современные представления об устойчивости *Staphylococcus aureus* к бета-лактамам антибиотикам / В. В. Гостев, О. Е. Пунченко, С. В. Сидоренко // Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. – 2021. – Т. 23, № 4. – С. 375-387.

Глава 3.

4. Гостев, В. В. Сравнительная активность липогликопептидных антибиотиков в отношении грамположительных бактерий / В. В. Гостев, О. С. Сулян, О. С. Калиногорская, [и др.] // Антибиотики и химиотерапия. – 2022. – Т. 67, № 9-10. – С. 18-24.
5. Козлов, Р. С. Чувствительность основных возбудителей бактериальных инфекций к цефтаролину в Российской Федерации / Р. С. Козлов, М. В. Сухорукова, С. В. Сидоренко, [и др.] // Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. – 2015. – Т. 17, № 3. – С. 217-226.
6. Гостев, В. В. Антибиотикорезистентность метициллинрезистентных *Staphylococcus aureus*, циркулирующих в Российской Федерации / В. В. Гостев, О. С. Калиногорская, Л. Н. Попенко, [и др.] // Антибиотики и химиотерапия. – 2015. – Т. 60, № 1-2. – С. 3-9.

Глава 4.

7. **Gostev, V. Phenotypic and genomic characteristics of oxacillin-susceptible *mecA*-positive *Staphylococcus aureus*, rapid selection of high-level resistance to beta-lactams / V. Gostev, K. Sabinova, J. Sopova, [et al.] // Eur J Clin Microbiol Infect Dis. – 2023. – V. 42, № 9. – P. 1125-1133.**
8. **Wan T.-W. Complete Circular Genome Sequence Of Successful ST8/SCCmec IV Community-Associated Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (OC8) In Russia: One-Megabase Genomic Inversion, IS256's Spread, And Evolution Of Russia ST8-IV / T.-W. Wan, O.E. Khokhlova, Y. Iwao [et al.] // PLOS One. – 2017. – V. 11, № 10. – P. 164168.**
9. **Gostev, V. Molecular epidemiology and antibiotic resistance of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* circulating in the Russian Federation / V. Gostev, A. Kruglov, O. Kalinogorskaya, [et al.] // Infection, Genetics and Evolution. – 2017. – V. 53. – P. 189-194.**
10. Gostev, V. Characterisation of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* with reduced susceptibility to ceftaroline collected in Russia during 2010-2014 / V. Gostev, O. Kalinogorskaya, A. Kruglov, [et al.] // J Glob Antimicrob Resist. – 2018. – V. 12. – P. 21-23.
11. Гостев, В. В. Молекулярные механизмы снижения чувствительностью к цефтаролину метициллинрезистентных *Staphylococcus aureus* / В. В. Гостев, О. С. Калиногорская, О. А. Дмитренко, [и др.] // Антибиотики и химиотерапия. – 2016. – Т. 61, № 9-10. – С. 17-21.
12. Гостев, В. В. Полиморфизм генов, участвующих в сборке клеточной стенки у метициллинрезистентных *Staphylococcus aureus* со сниженной чувствительностью к

ванкомицину / В. В. Гостев, О. С. Калиногорская, С. М. Юдин, [и др.] // Антибиотики и химиотерапия. – 2018. – Т. 63, № 7-8. – С. 11-16.

13. Хохлова, О. Е. Микробиологический мониторинг гнойных осложнений у ожоговых больных и молекулярно-генетические особенности метициллинорезистентных *Staphylococcus aureus* (MRSA) / О. Е. Хохлова, О. В. Перьянова, И. В. Владимиров, [и др.] // Антибиотики и химиотерапия. – 2017. – Т. 62, № 9-10. – С. 27-33.

Глава 5.

14. Gostev, V. Comparative genome analysis of global and Russian strains of community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* ST22, a 'Gaza clone' / V. Gostev, K. Ivanova, A. Kruglov, [et al.] // *Int J Antimicrob Agents*. – 2021. – V. 57, № 2. – P. 106264.
15. Monecke, S. Molecular Typing of ST239-MRSA-III From Diverse Geographic Locations and the Evolution of the SCCmec III Element During Its Intercontinental Spread / S. Monecke, P. Slickers, D. Gawlik, [et al.] // *Front Microbiol*. – 2018. – V. 9. – P. 1436.
16. Гостев, В. В. Геномная характеристика mecA-положительных *Staphylococcus aureus* ST59, проявляющих чувствительность к оксациллину / В. В. Гостев, О. С. Сулян, П. А. Павлова, [и др.] // Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. – 2023. – Т. 25, № 2. – С. 116-122.

Глава 6.

17. Gostev, V. Adaptive Laboratory Evolution of *Staphylococcus aureus* Resistance to Vancomycin and Daptomycin: Mutation Patterns and Cross-Resistance / V. Gostev, O. Kalinogorskaya, J. Sopova, [et al.] // *Antibiotics (Basel)*. – 2023. – V. 12, № 5.
18. Gostev, V. In Vitro Selection of High-Level Beta-Lactam Resistance in Methicillin-Susceptible *Staphylococcus aureus* / V. Gostev, O. Kalinogorskaya, K. Ivanova, [et al.] // *Antibiotics (Basel)*. – 2021. – V. 10, № 6.
19. Gostev, V. In Vitro Ceftaroline Resistance Selection of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Involves Different Genetic Pathways / V. Gostev, J. Sopova, O. Kalinogorskaya, [et al.] // *Microb Drug Resist*. – 2019. – V. 25, № 10. – P. 1401-1409.
20. Гостев, В. В. Влияние шоковых концентраций гентамицина на формирование устойчивости и мелкоколониевых фенотипов у *Staphylococcus aureus* / В. В. Гостев, О. С. Калиногорская, О. С. Сулян, [и др.] // Антибиотики и химиотерапия. – 2023. – Т. 68, № 9-10. – С. 25-33.
21. Сопова, Ю. В. Влияние делеции в некаталитическом домене GdpP на фенотип *Staphylococcus aureus* посредством направленного геномного редактирования с помощью системы CRISPR/Cas9 / Ю. В. Сопова, М. Е. Велижанина, Д. А. Кандина, [и др.] // *Генетика*. – 2023. – Т. 59, № 9. – С. 1094-1098.
22. Гостев, В. В. Влияние шоковых концентраций ванкомицина на формирование гетерорезистентности у *Staphylococcus aureus* / В. В. Гостев, Ю. В. Сопова, О. С. Калиногорская, [и др.] // Антибиотики и химиотерапия. – 2020. – Т. 65, № 9-10. – С. 3-7.
23. Гостев, В. В. Селекция устойчивости к даптомицину метициллин-резистентного *Staphylococcus aureus*: роль гомо- и гетеро-мутаций / В. В. Гостев, Ю. В. Сопова, О. С. Калиногорская, [и др.] // *Генетика*. – 2020. – Т. 56, № 3. – С. 282-291.
24. Сопова, Ю. В. Динамика протеома антибиотикорезистентных штаммов *Staphylococcus aureus* при воздействии субингибирующих концентраций бета-лактамных антибиотиков / Ю. В. Сопова, В. В. Гостев, А. Н. Лыхолай, [и др.] // *Экологическая генетика*. – 2018. – Т. 16, № 2. – С. 4-10.

ПРИЛОЖЕНИЕ 4. ГЕОГРАФИЯ СБОРА ИЗОЛЯТОВ MRSA



География сбора изолятов MRSA. Обозначения: МУР – Мурманск, СГЖ – Сегежа, ПТЗ – Петрозаводск, СПБ – Санкт-Петербург, МСК – Москва, ЯРЛ – Ярославль, ЕСК – Ессентуки, СМР – Самара, ПЕМ – Пермь, ЧЕЛ – Челябинск, КУГ – Курган, ХМН – Ханты-Мансийск, КРР – Красноярск, ИРК – Иркутск; номера указанные на точках соответствуют количеству медицинских центров в каждом городе, где были собраны изоляты MRSA; тепловая карта точек соответствует доле изолятов в коллекции.

Мупироцин	1	1	1	0,5	1	0,5	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0,5	1
Фузид. к-та	0,25	0,25	0,125	0,06	0,06	0,06	0,06	0,125	0,125	0,125	0,125	0,125	0,06	0,06	0,06	0,125	0,06	0,06
Эритромицин	0,25	0,5	0,125	>128	>128	>128	>128	>128	>128	>128	>128	0,125	0,5	0,125	0,125	0,5	0,125	0,125
Клиндамицин	0,06	0,06	0,06	>64	>64	>64	>64	>64	>64	>64	>64	0,06	0,06	0,06	0,06	0,06	0,06	0,06
Трим./Сульф.	0,125	0,125	0,06	0,03	0,06	0,06	0,125	0,25	0,5	0,25	0,25	0,06	0,125	0,125	0,06	0,125	0,125	0,125

Примечание: Серая заливка соответствует изменению МПК; Селекция: WT – штаммы до селекции, VAN – после селекции на ванкомицине или даптомицине (DAP); DAP-Y/W – колонии желтого или белого цвета соответственно, после селекции на даптомицине. Без АБ – селекция на среде без антибиотика.

**ПРИЛОЖЕНИЕ 6. МУТАЦИИ И ГЕТЕРОМУТАЦИИ, ВЫЯВЛЕННЫЕ У ШТАММОВ *S. AUREUS* ПРИ СЕЛЕКЦИИ НА
ОКСАЦИЛЛИНЕ, МЕРОПЕНЕМЕ, ЦЕФТАРОЛИНЕ**

Штамм	Селекция на антибиотике:	Пассаж, глубина покрытия мутации (%)				Мутации, тип мутации	Локус в референс - геноме
		5	15	30	40		
SA0707	OXA	0,0	0,0	100,0	100,0	Делеция	blaZ (плазмида)
SA0707	OXA	0,0	0,0	24,4	0,0	L255* (T <u>T</u> A→T <u>A</u> A)	SACOL0534
SA0707	OXA	0,0	100,0	100,0	100,0	W119R (T <u>G</u> G→C <u>G</u> G)	SACOL1944
SA0707	OXA	0,0	0,0	0,0	11,3	A402T (G <u>C</u> A→A <u>C</u> A)	SACOL0495
SA0707	OXA	36,4	0,0	0,0	0,0	L181* (T <u>T</u> A→T <u>A</u> A)	lgt
SA0707	OXA	35,6	0,0	0,0	0,0	G164D (G <u>G</u> C→G <u>A</u> C)	SACOL1967
SA0707	OXA	0,0	0,0	0,0	38,4	A95P (G <u>C</u> T→C <u>C</u> T)	murAB
SA0707	OXA	0,0	0,0	0,0	22,1	P192R (C <u>C</u> G→C <u>G</u> G)	murAB
SA0707	OXA	0,0	0,0	0,0	24,4	A384V (G <u>C</u> T→G <u>T</u> T)	murAB
SA0707	OXA	0,0	100,0	100,0	100,0	L323* (T <u>T</u> A→T <u>G</u> A)	SACOL0810
SA0707	OXA	0,0	100,0	100,0	100,0	A450D (G <u>C</u> T→G <u>A</u> T)	pbp2
SA0707	OXA	0,0	100,0	100,0	100,0	G90D (G <u>G</u> T→G <u>A</u> T)	fabZ
SA0707	OXA	0,0	0,0	12,2	0,0	I53N (A <u>T</u> C→A <u>A</u> C)	argB
SA0707	OXA	0,0	0,0	100,0	100,0	G59E (G <u>G</u> G→G <u>A</u> G)	SACOL0716
SA0707	OXA	0,0	0,0	22,0	0,0	E297K (G <u>A</u> G→A <u>A</u> G)	pbp4
SA0707	OXA	19,0	0,0	0,0	0,0	W679R (T <u>G</u> G→A <u>G</u> G)	fmtC
SA0707	OXA	0,0	0,0	0,0	100	Делеция 9 генов (22,548bp)	SACOL1339 – rpmG1
SA0707	OXA	7,3	0,0	0,0	0,0	Y475C (T <u>A</u> T→T <u>G</u> T)	SACOL0014
SA0707	OXA	18,2	0,0	0,0	0,0	Q281* (C <u>A</u> A→T <u>A</u> A)	SACOL1066
SA0707	OXA	0,0	0,0	100,0	100,0	Делеция	pbp4
SA0707	OXA	0,0	0,0	72,8	100,0	Промотор	pbp4
SA0707	OXA	0,0	0,0	100,0	100,0	Делеция	murAB
SA0707	CPT	0,0	14,5	0,0	0,0	I276N (A <u>T</u> C→A <u>A</u> C)	fpg
SA0707	CPT	0,0	100,0	100,0	100,0	P599L (C <u>C</u> G→C <u>T</u> G)	SACOL0495

SA0707	CPT	0,0	11,1	0,0	0,0	M604K (A <u>T</u> G→A <u>A</u> G)	lepA
SA0707	CPT	0,0	0,0	12,9	0,0	L41I (T <u>T</u> A→A <u>T</u> A)	SACOL0810
SA0707	CPT	0,0	100,0	100,0	100,0	Делеция	SACOL0716
SA0707	CPT	11,8	100,0	100,0	100,0	Q25K (C <u>A</u> A→A <u>A</u> A)	SACOL1904
SA0707	CPT	0,0	11,7	0,0	0,0	A201E (G <u>C</u> G→G <u>A</u> G)	SACOL1240
SA0707	CPT	0,0	0,0	100,0	100,0	K426* (A <u>A</u> A→T <u>A</u> A)	SACOL2582
SA0707	CPT	0,0	15,0	15,5	0,0	V149M (G <u>T</u> G→A <u>T</u> G)	SACOL2469
SA0707	CPT	0,0	0,0	11,8	0,0	P155T (C <u>C</u> G→A <u>C</u> G)	SACOL2469
SA0707	CPT	0,0	10,2	0,0	0,0	P155Q (C <u>C</u> G→C <u>A</u> G)	SACOL2469
SA0707	CPT	0,0	17,8	0,0	0,0	G564C (G <u>G</u> T→T <u>G</u> T)	SACOL2378
SA0707	CPT	0,0	100,0	100,0	100,0	Промотор	pbp4
SA0707	CPT	0,0	100,0	100,0	100,0	Делеция	pbp4
SA0707	CPT	0,0	100,0	100,0	100,0	Делеция	murAB
SA0707	MER	0,0	0,0	100,0	100,0	Делеция	
SA0707	MER	0,0	0,0	100,0	100,0	Q65* (C <u>A</u> A→T <u>A</u> A)	SACOL1929
SA0707	MER	0,0	0,0	66,9	66,9	D59N (G <u>A</u> C→A <u>A</u> C)	SACOL1897
SA0707	MER	5,1	0,0	0,0	0,0	G226V (G <u>G</u> A→G <u>T</u> A)	SACOL1944
SA0707	MER	0,0	100,0	100,0	100,0	Y94C (T <u>A</u> T→T <u>G</u> T)	accD
SA0707	MER	0,0	0,0	22,0	23,6	S119P (T <u>C</u> A→C <u>C</u> A)	SACOL0470
SA0707	MER	100,0	100,0	100,0	100,0	T552I (A <u>C</u> T→A <u>T</u> T)	pbp2
SA0707	MER	0,0	100,0	100,0	100,0	A416T (G <u>C</u> A→A <u>C</u> A)	pbp2
SA0707	MER	0,0	0,0	0,0	10,0	P159L (C <u>C</u> A→C <u>T</u> A)	rsbU
SA0707	MER	0,0	0,0	18,5	0,0	N40K (A <u>A</u> C→A <u>A</u> A)	SACOL1459
SA0707	MER	0,0	0,0	0,0	10,3	S33* (T <u>C</u> A→T <u>A</u> A)	SACOL0088
SA0707	MER	0,0	100,0	100,0	100,0	I89T (A <u>T</u> C→A <u>C</u> C)	mvk
SA0707	MER	0,0	0,0	100,0	100,0	R289C (C <u>G</u> C→T <u>G</u> C)	SACOL0014
SA0707	MER	0,0	0,0	46,9	0,0	Делеция	SACOL1240
SA0707	MER	0,0	48,8	0,0	0,0	P431L (C <u>C</u> T→C <u>T</u> T)	pbp1
SA0707	MER	0,0	0,0	35,2	31,7	H375D (C <u>A</u> T→G <u>A</u> T)	pbp1
SA0707	MER	57,0	0,0	0,0	0,0	W351K (T <u>G</u> G→T <u>A</u> G)	pbp1

SA0707	MER	0,0	100,0	100,0	100,0	A482V (<u>G</u> CT→ <u>G</u> TT)	pbp1
SA0707	MER	0,0	0,0	100,0	100,0	L18F (<u>C</u> TT→ <u>T</u> TT)	pbp1
SA0707	MER	10,7	0,0	0,0	0,0	T190P (<u>A</u> CA→ <u>C</u> CA)	SACOL2242
SA0937	OXA	18,30	100,00	100,00	100,00	A451E (<u>G</u> CG→ <u>G</u> AG)	SACOL1924
SA0937	OXA	79,00	0,00	0,00	0,00	T274K (<u>A</u> CA→ <u>A</u> AA)	vraS
SA0937	OXA	21,00	100,00	100,00	100,00	P174Q (<u>C</u> CG→ <u>C</u> AG)	SACOL1944
SA0937	OXA	0,00	0,00	17,00	0,00	P106T (<u>C</u> CT→ <u>A</u> CT)	fpg
SA0937	OXA	0,00	0,00	10,20	0,00	N120K (<u>A</u> AT→ <u>A</u> AA)	fpg
SA0937	OXA	0,00	100,00	100,00	100,00	Делеция	Dltd
SA0937	OXA	0,00	0,00	0,00	18,00	E29G (<u>G</u> AG→ <u>G</u> GG)	SACOL2476
SA0937	OXA	0,00	0,00	0,00	21,40	I37N (<u>A</u> TC→ <u>A</u> AC)	SACOL1846
SA0937	OXA	0,00	100,00	0,00	0,00	D213G (<u>G</u> AT→ <u>G</u> GT)	SACOL1667
SA0937	OXA	0,00	0,00	0,00	77,10	L81I (<u>T</u> TA→ <u>A</u> TA)	SACOL2153
SA0937	OXA	0,00	0,00	12,00	0,00	S569R (<u>A</u> GC→ <u>A</u> GA)	lepA
SA0937	OXA	0,00	0,00	11,40	0,00	T123N (<u>A</u> CC→ <u>A</u> AC)	SACOL2551
SA0937	OXA	0,00	0,00	0,00	15,10	L41I (<u>T</u> TA→ <u>A</u> TA)	SACOL0737
SA0937	OXA	0,00	0,00	0,00	14,60	L55I (<u>T</u> TA→ <u>A</u> TA)	SACOL0737
SA0937	OXA	0,00	0,00	0,00	11,60	A56T (<u>G</u> CA→ <u>A</u> CA)	SACOL0737
SA0937	OXA	23,10	100,00	100,00	100,00	Делеция	SACOL0014
SA0937	OXA	0,00	0,00	0,00	15,80	L38I (<u>C</u> TA→ <u>A</u> TA)	SACOL0088
SA0937	OXA	0,00	12,30	0,00	0,00	R37S (<u>A</u> GG→ <u>A</u> GC)	SACOL0088
SA0937	OXA	0,00	0,00	0,00	12,60	G35E (<u>G</u> GA→ <u>G</u> AA)	SACOL0088
SA0937	OXA	0,00	11,20	0,00	0,00	A32S (<u>G</u> CA→ <u>T</u> CA)	SACOL0088
SA0937	OXA	0,00	0,00	0,00	17,80	L173F (<u>T</u> TA→ <u>T</u> TT)	SACOL0093
SA0937	OXA	0,00	0,00	13,90	0,00	I142N (<u>A</u> TT→ <u>A</u> AT)	SACOL0126
SA0937	OXA	75,40	0,00	0,00	0,00	G38S (<u>G</u> GT→ <u>A</u> GT)	SACOL1231
SA0937	OXA	25,20	100,00	100,00	100,00	A20P (<u>G</u> CG→ <u>C</u> CG)	SACOL1231
SA0937	OXA	0,00	11,70	0,00	0,00	L156F (<u>T</u> TA→ <u>T</u> TT)	SACOL0398
SA0937	OXA	0,00	0,00	16,40	0,00	T41S (<u>A</u> CT→ <u>T</u> CT)	pdhB
SA0937	OXA	0,00	100,00	100,00	100,00	G109C (<u>G</u> GT→ <u>T</u> GT)	guaA

SA0937	OXA	0,00	0,00	0,00	26,40	S125P (<u>T</u> CC→ <u>C</u> CC)	SACOL0470
SA0937	OXA	0,00	100,00	100,00	100,00	Делеция	pbp4
SA0937	CPT	0,00	100,00	100,00	100,00	H259R (<u>C</u> AT→ <u>C</u> GT)	cydA
SA0937	CPT	0,00	100,00	100,00	100,00	Делеция	sgtB
SA0937	CPT	0,00	0,00	0,00	100,00	Делеция	vraS
SA0937	CPT	10,60	0,00	0,00	0,00	R739C (<u>C</u> GT→ <u>T</u> GT)	rpoC
SA0937	CPT	11,80	0,00	0,00	0,00	I276N (<u>A</u> TC→ <u>A</u> AC)	fpg
SA0937	CPT	5,80	0,00	0,00	0,00	A184V (<u>G</u> CG→ <u>G</u> TG)	dltA
SA0937	CPT	0,00	0,00	13,30	0,00	L216W (<u>T</u> TG→ <u>T</u> GG)	SACOL1979
SA0937	CPT	0,00	14,60	0,00	0,00	N48K (<u>A</u> AC→ <u>A</u> AA)	SACOL2476
SA0937	CPT	0,00	0,00	17,30	0,00	L19I (<u>C</u> TA→ <u>A</u> TA)	SACOL0948
SA0937	CPT	0,00	100,00	100,00	100,00	G60A (<u>G</u> GC→ <u>G</u> CC)	ruvB
SA0937	CPT	0,00	0,00	0,00	100,00	Делеция	SACOL0650
SA0937	CPT	0,00	100,00	100,00	100,00	N48D (<u>A</u> AC→ <u>G</u> AC)	greA
SA0937	CPT	0,00	0,00	0,00	100,00	E228G (<u>G</u> AA→ <u>G</u> GA)	SACOL2153
SA0937	CPT	0,00	0,00	17,40	0,00	Q249* (<u>C</u> AA→ <u>T</u> AA)	SACOL1644
SA0937	CPT	6,50	100,00	100,00	100,00	Q122* (<u>C</u> AA→ <u>T</u> AA)	SACOL1002
SA0937	CPT	0,00	100,00	100,00	100,00	G171E (<u>G</u> GA→ <u>G</u> AA)	tagA
SA0937	CPT	0,00	0,00	25,50	100,00	T201A (<u>A</u> CT→ <u>G</u> CT)	pbp4
SA0937	CPT	0,00	0,00	25,50	100,00	N138I (<u>A</u> AT→ <u>A</u> TT)	pbp4
SA0937	CPT	0,00	0,00	0,00	11,10	G229S (<u>G</u> GC→ <u>A</u> GC)	SACOL2569
SA0937	CPT	0,00	0,00	0,00	100,00	Делеция	SACOL2346
SA0937	CPT	10,80	0,00	0,00	0,00	L549I (<u>T</u> TA→ <u>A</u> TA)	SACOL2378
SA0937	CPT	0,00	18,10	0,00	0,00	N40K (<u>A</u> AC→ <u>A</u> AA)	SACOL1459
SA0937	CPT	0,00	0,00	0,00	100,00	Q219R (<u>C</u> AA→ <u>C</u> GA)	SACOL2724
SA0937	CPT	72,20	0,00	0,00	0,00	G692V (<u>G</u> GT→ <u>G</u> TT)	gyrA
SA0937	CPT	70,50	0,00	0,00	0,00	R540* (<u>C</u> GA→ <u>T</u> GA)	SACOL0014
SA0937	CPT	30,80	100,00	100,00	100,00	H621Y (<u>C</u> AT→ <u>T</u> AT)	SACOL0014
SA0937	CPT	0,00	12,50	0,00	0,00	A32S (<u>G</u> CA→ <u>T</u> CA)	SACOL0088
SA0937	CPT	0,00	16,60	0,00	0,00	L173F (<u>T</u> TA→ <u>T</u> TT)	SACOL0093

SA0937	CPT	0,00	0,00	13,10	0,00	L146F (ТТА→ТТТ)	SACOL0126
SA0937	CPT	0,00	100,00	100,00	100,00	Делеция	hexB
SA0937	CPT	0,00	0,00	65,10	100,00	I156F (АТТ→ТТТ)	SACOL0214
SA0937	CPT	61,50	0,00	0,00	0,00	Делеция	SACOL1232
SA0937	CPT	100,00	100,00	100,00	100,00	H499R (САС→СГС)	pbp1
SA0937	CPT	0,00	100,00	100,00	100,00	G160D (GGC→GAC)	hly
SA0937	CPT	0,00	0,00	0,00	12,00	S309F (ТСТ→ТТТ)	SACOL0392
SA0937	CPT	0,00	0,00	0,00	11,20	P170T (ССТ→АСТ)	SACOL0398
SA0937	CPT	0,00	0,00	0,00	10,10	S96P (ТСА→ССА)	SACOL0470
SA0937	CPT	13,70	0,00	0,00	0,00	S109P (ТСА→ССА)	SACOL0470
SA0937	CPT	0,00	100,00	0,00	0,00	Промотор	pbp4
SA0937	CPT	0,00	0,00	26,00	100,00	Делеция	pbp4
SA0937	MER	40,60	74,00	100,00	100,00	C60Y (ТГТ→ТАТ)	vraS
SA0937	MER	0,00	0,00	100,00	100,00	H343R (САТ→СГТ)	acuC
SA0937	MER	0,00	0,00	100,00	100,00	T66I (АСА→АТА)	dltA
SA0937	MER	0,00	0,00	70,20	100,00	H115R (САС→СГС)	SACOL1840
SA0937	MER	0,00	0,00	7,70	0,00	W434L (ТГГ→ТТГ)	SACOL1844
SA0937	MER	0,00	0,00	0,00	77,10	A211V (GCT→GTT)	SACOL2153
SA0937	MER	0,00	0,00	100,00	100,00	Делеция	SACOL2297
SA0937	MER	0,00	0,00	100,00	100,00	F241L (ТТС→СТС)	pbp4
SA0937	MER	0,00	0,00	100,00	100,00	N141T (ААТ→АСТ)	pbp4
SA0937	MER	0,00	0,00	100,00	100,00	K166E (ААА→GAA)	SACOL1621
SA0937	MER	0,00	26,70	0,00	0,00	G286V (GGT→GTT)	pbp3
SA0937	MER	0,00	100,00	100,00	100,00	S634F (ТСТ→ТТТ)	pbp3
SA0937	MER	0,00	0,00	42,70	20,70	Делеция	agrA
SA0937	MER	100,00	100,00	100,00	100,00	D279Y (GAT→TAT)	cscA
SA0937	MER	0,00	0,00	18,00	0,00	V245G (GTC→GGC)	SACOL1555
SA0937	MER	0,00	0,00	100,00	100,00	Делеция	SACOL2376
SA0937	MER	0,00	0,00	0,00	28,10	I19N (АТС→ААС)	nirB
SA0937	MER	0,00	27,20	0,00	0,00	G587S (GGT→AGT)	pbp2

SA0937	MER	0,00	76,50	0,00	0,00	M559I (ATG→ATT)	pbp2
SA0937	MER	81,70	75,80	100,00	100,00	T552I (ACT→ATT)	pbp2
SA0937	MER	0,00	0,00	100,00	100,00	A416E (GCA→GAA)	pbp2
SA0937	MER	13,30	26,00	0,00	0,00	G142S (GGT→AGT)	pbp2
SA0937	MER	0,00	0,00	79,10	62,50	Делеция	SACOL1484
SA0937	MER	0,00	0,00	100,00	100,00	A87V (GCG→GTG)	SACOL2674
SA0937	MER	28,20	0,00	0,00	0,00	M1K (ATG→AAG)	SACOL1437
SA0937	MER	100,00	100,00	100,00	100,00	E108* (GAA→TAA)	SACOL0014
SA0937	MER	0,00	0,00	0,00	72,60	D430G (GAT→GGT)	SACOL1250
SA0937	MER	0,00	16,80	0,00	0,00	G408V (GGT→GTT)	pbp1
SA0937	MER	80,80	100,00	100,00	100,00	W351L (TGG→TTG)	pbp1
SA0937	MER	13,80	0,00	0,00	0,00	W351R (TGG→AGG)	pbp1
SA0937	MER	0,00	0,00	27,10	5,40	P952L (CCA→CTA)	yukA
SA0937	MER	0,00	0,00	100,00	100,00	P33L (CCG→CTG)	SACOL0313
SA0937	MER	0,00	20,00	100,00	100,00	Делеция	pbp4
SA0937	MER	0,00	0,00	100,00	100,00	Делеция	pbp4
SA0937	MER	0,00	0,00	80,00	100,00	Промотор	pbp4

Примечание: СРТ – селекция на цефтаролине, MER – селекция на меропенеме, ОХА – селекция на оксациллине.

**ПРИЛОЖЕНИЕ 7. МУТАЦИИ И ГЕТЕРОМУТАЦИИ, ВЫЯВЛЕННЫЕ У ШТАММОВ *S. AUREUS* ПРИ СЕЛЕКЦИИ НА
ВАНКОМИЦИНЕ И ДАПТОМИЦИНЕ**

Штамм	Селекция на антибиотике:	Мутации, тип мутации	Локус, область ген, в которой выявлена мутация	Пассажи, глубина покрытия мутации (%)			Позиция в референс-геноме
				5-ый	20-ый	40-ый	
ATCC29213	DAP	Δ25,224 bp	Плазмидные элементы	0	100	100	blaZ
ATCC29213	DAP	Δ7,040 bp	Плазмидные элементы	0	100	100	Плазмидные элементы
ATCC29213	DAP	Δ3,924 bp	Плазмидные элементы	0	100	100	Плазмидные элементы
ATCC29213	DAP	Δ3,588 bp	Плазмидные элементы	0	100	100	Плазмидные элементы
ATCC29213	DAP	Δ1,976 bp	Плазмидные элементы	0	100	100	Плазмидные элементы
ATCC29213	DAP	Δ1,488 bp	Плазмидные элементы	0	100	100	Плазмидные элементы
ATCC29213	DAP	Δ788 bp	sa29213_0_02718	0	100	100	Плазмидные элементы
ATCC29213	DAP	E362G (GAA→GGA)	dnaX ←	0	0	5	dnaX
ATCC29213	DAP	V127A (GTT→GCT)	typA →	0	100	100	typA
ATCC29213	DAP	G188R (GGA→AGA)	aldH →	0	36	0	aldA2
ATCC29213	DAP	P45S (CCA→TCA)	sa29213_0_02526 →	0	29	0	SACOL2179
ATCC29213	DAP	A218E (GCA→GAA)	hemY ←	7	8	0	hemG
ATCC29213	DAP	Δ1 bp	sa29213_0_02475 ←	0	100	0	SACOL1947
ATCC29213	DAP	A23V (GCA→GTA)	cls2 →	0	0	100	SACOL2079 (cls2)
ATCC29213	DAP	A145E (GCA→GAA)	isdB ←	6	0	0	SACOL1138
ATCC29213	DAP	A348V (GCT→GTT)	clpX ←	0	0	35	clpX
ATCC29213	DAP	S45G (AGT→GGT)	mnhB_2 ←	0	19	0	SACOL0680
ATCC29213	DAP	E163G (GAG→GGG)	sa29213_0_02540 →	6	0	0	SACOL2164
ATCC29213	DAP	E190G (GAG→GGG)	yfhP ←	0	6	0	SACOL1927
ATCC29213	DAP	R459* (CGA→TGA)	sa29213_0_02325 →	5	0	0	SACOL1153
ATCC29213	DAP	Δ1 bp	cap5E ←	0	0	100	SACOL0140 (cap5E)
ATCC29213	DAP	E132G (GAG→GGG)	lplA2 ←	6	0	0	SACOL0635
ATCC29213	DAP	Δ1 bp	deoD →	0	0	100	deoD2

ATCC29213	DAP	L71S (T <u>T</u> A→T <u>C</u> A)	proP ←	0	18	0	proP
ATCC29213	DAP	M198I (A <u>T</u> G→A <u>T</u> A)	sa29213_0_00071 ←	0	0	40	SACOL0115
ATCC29213	DAP	T51A (A <u>C</u> A→G <u>C</u> A)	nrgA ←	0	0	8	SACOL2031
ATCC29213	DAP	V394A (G <u>T</u> A→G <u>C</u> A)	uvrB →	0	13	0	uvrB
ATCC29213	DAP	P124S (C <u>C</u> A→T <u>C</u> A)	clpQ →	0	0	100	SACOL1270
ATCC29213	DAP	V204A (G <u>T</u> G→G <u>C</u> G)	sa29213_0_00514 ←	0	11	5	SACOL1788
ATCC29213	DAP	D171E (G <u>A</u> C→G <u>A</u> A)	sa29213_0_00514 ←	6	0	0	SACOL1788
ATCC29213	DAP	V155E (G <u>T</u> A→G <u>A</u> A)	sa29213_0_00514 ←	0	0	5	SACOL1788
ATCC29213	DAP	S151A (T <u>C</u> G→G <u>C</u> G)	sa29213_0_00514 ←	9	0	5	SACOL1788
ATCC29213	DAP	S144T (T <u>C</u> A→A <u>C</u> A)	sa29213_0_00514 ←	11	0	6	SACOL1788
ATCC29213	DAP	A137T (G <u>C</u> G→A <u>C</u> G) ‡	sa29213_0_00514 ←	10	0	0	SACOL1788
ATCC29213	DAP	N12S (A <u>A</u> T→A <u>G</u> T)	kbl ←	0	0	11	SACOL0596
ATCC29213	DAP	G170D (G <u>G</u> C→G <u>A</u> C)	pgsA →	100	100	100	pgsA
ATCC29213	DAP	Δ4,565 bp	mutL_glpD	0	100	100	mutL_glpD
ATCC29213	DAP	S356F (T <u>C</u> T→T <u>T</u> T)	glpD →	11	0	0	glpD
ATCC29213	DAP	G414D (G <u>G</u> T→G <u>A</u> T)	glpD →	26	0	0	glpD
ATCC29213	DAP	Δ1 bp	bsaA ←	0	0	100	SACOL1325
ATCC29213	DAP	A48E (G <u>C</u> A→G <u>A</u> A)	rplC →	0	9	0	rplC
ATCC29213	DAP	A58T (G <u>C</u> A→A <u>C</u> A)	sa29213_0_01019 ←	0	23	0	SACOL0908
ATCC29213	DAP	K287E (A <u>A</u> A→G <u>A</u> A)	rpoA →	0	20	0	rpoA
ATCC29213	DAP	S136L (T <u>C</u> A→T <u>T</u> A)	mprF	0	0	15	SACOL1396
ATCC29213	DAP	L826F (C <u>T</u> T→T <u>T</u> T)	mprF	0	100	100	SACOL1396
ATCC29213	DAP	E95G (G <u>A</u> A→G <u>G</u> A)	sa29213_0_01056 →	0	79	0	SACOL0958
ATCC29213	DAP	H368R (C <u>A</u> T→C <u>G</u> T)	fabB →	0	0	100	fabF
ATCC29213	DAP	Δ1 bp	sa29213_0_01465 ←	0	10	92	SACOL1455
ATCC29213	DAP	I35V (A <u>T</u> A→G <u>T</u> A)	yezG_4 ←	7	0	0	SACOL0286
ATCC29213	DAP	M32I (A <u>T</u> G→A <u>T</u> T)	yezG_4 ←	7	0	0	SACOL0286
ATCC29213	DAP	S20R (A <u>G</u> C→A <u>G</u> G)	yezG_4 ←	7	0	0	SACOL0286
ATCC29213	DAP	S20G (A <u>G</u> C→G <u>G</u> C)	yezG_4 ←	7	0	0	SACOL0286
ATCC29213	DAP	K17E (A <u>A</u> G→G <u>A</u> G)	yezG_4 ←	7	0	0	SACOL0286

ATCC29213	DAP	D9892E (GAT→GAA)	sa29213_0_01479 ←	5	0	0	ebh
ATCC29213	DAP	P50L (CCA→CTA)	sa29213_0_00262 →	0	94	0	SAV2595
ATCC29213	DAP	T151A (ACA→GCA)	gpsA ←	0	10	0	gpsA
ATCC29213	DAP	T112A (ACG→GCG)	gpsA ←	0	8	0	gpsA
ATCC29213	DAP	D115E (GAT→GAA)	sa29213_0_00781 →	8	0	0	SACOL0189
ATCC29213	DAP	H65Y (CAC→TAC)	gntP →	0	13	0	gntP
ATCC29213	DAP	E45A (GAG→GCG)	sa29213_0_00385 →	0	7	0	SACOL2408
ATCC29213	DAP	K56I (AAA→ATA)	sa29213_0_00385 →	0	6	0	SACOL2408
ATCC29213	DAP	Q196K (CAA→AAA)	sa29213_0_00392 →	6	0	0	SACOL2477
ATCC29213	DAP	S211I (AGT→ATT)	sa29213_0_00392 →	6	0	0	SACOL2477
ATCC29213	DAP	C→T	rpsU ← / ← sa29213_0_02144	0	100	100	Промотор rpsU
ATCC29213	DAP	Δ1 bp	fabI → / ← sa29213_0_01114	0	0	100	Промотор fabI
ATCC29213	VAN	S173T (TCA→ACA)	cap5E ←	6	6	0	SACOL0140 (cap5E)
ATCC29213	VAN	Y87* (TAT→TAA)	hisD →	6	0	0	hisD
ATCC29213	VAN	Q196K (CAA→AAA)	sa29213_0_00392 →	8	0	0	SACOL2477
ATCC29213	VAN	V13L (GTG→CTG)	yycI ←	0	100	100	yycI
ATCC29213	VAN	A37S (GCA→TCA)	sa29213_0_00385 →	0	0	6	SACOL2487
ATCC29213	VAN	E661G (GAG→GGG)	pheT →	5	0	0	pheT
ATCC29213	VAN	S5T (TCA→ACA)	sdhB →	6	0	0	sdhB
ATCC29213	VAN	A218E (GCA→GAA)	hemY ←	8	12	0	hemG
ATCC29213	VAN	P126S (CCA→TCA)	sa29213_0_02478 →	0	26	77	SACOL1944
ATCC29213	VAN	Y187D (TAT→GAT)	sa29213_0_02478 →	0	22	0	SACOL1944
ATCC29213	VAN	E239K (GAA→AAA)	vraS →	0	38	0	vraS
ATCC29213	VAN	T212I (ACA→ATA)	sgtB →	0	9	0	SACOL1932
ATCC29213	VAN	Δ2 bp	sa29213_0_02538 →	100	100	100	SACOL2166
ATCC29213	VAN	Δ6 bp	yaaQ ←	0	0	70	SACOL0525
ATCC29213	VAN	Δ25,224 bp	sa29213_0_02628– sa29213_0_02658	100	100	100	Плазмида blaZ plasmid
ATCC29213	VAN	Δ7,040 bp	sa29213_0_02659– sa29213_0_02668	0	100	100	Плазмидные элементы
ATCC29213	VAN	V385L (GTA→TTA)	harA ←	0	0	5	SACOL1781

ATCC29213	VAN	Δ 3,924 bp	sa29213_0_02673– sa29213_0_02675	100	100	100	Плазмидные элементы
ATCC29213	VAN	Δ 3,588 bp	sa29213_0_02676–agrA_2	100	100	100	Плазмидные элементы
ATCC29213	VAN	Δ 1,976 bp	sa29213_0_02713– sa29213_0_02714	100	100	100	Плазмидные элементы
ATCC29213	VAN	Δ 1,488 bp	sep_4	100	100	100	Плазмидные элементы
ATCC29213	VAN	Δ 788 bp	sa29213_0_02718	100	100	100	Плазмидные элементы
ATCC29213	VAN	E125G (<u>GAG</u> → <u>GGG</u>)	lipA →	0	6	0	lipA
ATCC29213	VAN	A1298S (<u>GCG</u> → <u>TCG</u>)	polC →	7	0	0	SACOL1283
ATCC29213	VAN	D9920E (<u>GAT</u> → <u>GAA</u>)	sa29213_0_01479 ←	6	8	0	ebh
ATCC29213	VAN	Δ 24 bp	rpsO →	0	5	0	rpsO
ATCC29213	VAN	S87L (<u>TCA</u> → <u>TTA</u>)	bioA →	0	0	6	bioA
ATCC29213	VAN	S308R (<u>AGT</u> → <u>AGA</u>)	sa29213_0_01769 ←	0	100	100	SACOL0720
ATCC29213	VAN	S102I (<u>AGT</u> → <u>ATT</u>)	sa29213_0_01816 ←	0	100	100	SACOL0670
ATCC29213	VAN	E253G (<u>GAA</u> → <u>GGA</u>)	sa29213_0_01941 ←	0	6	0	SACOL1996
ATCC29213	VAN	T80I (<u>ACT</u> → <u>ATT</u>)	srrA ←	0	100	100	srrA
ATCC29213	VAN	Q71L (<u>CAA</u> → <u>CTA</u>)	rho ←	0	0	59	rho
SA0077	DAP	I469V (<u>ATA</u> → <u>GTA</u>)	sa77_0_00016 ←	0	0	100	SACOL2290
SA0077	DAP	I719V (<u>ATC</u> → <u>GTC</u>)	sa77_0_01022 →	0	0	9	SACOL0084
SA0077	DAP	I719M (<u>ATC</u> → <u>ATG</u>)	sa77_0_01022 →	0	0	9	SACOL0084
SA0077	DAP	E143* (<u>GAA</u> → <u>TAA</u>)	mnhE_2 ←	0	100	0	SACOL0951 (mnhE)
SA0077	DAP	L52F (<u>TTA</u> → <u>TTC</u>)	cls2 →	0	0	100	SACOL2079 (cls2)
SA0077	DAP	D82Y (<u>GAT</u> → <u>TAT</u>)	cls2 →	0	100	0	SACOL2079 (cls2)
SA0077	DAP	A280T (<u>GCA</u> → <u>ACA</u>)	cls2 →	0	0	100	SACOL2079 (cls2)
SA0077	DAP	S144T (<u>TCA</u> → <u>ACA</u>)	sa77_0_01701 →	6	14	0	SACOL1788
SA0077	DAP	S148T (<u>TCA</u> → <u>ACA</u>)	sa77_0_01701 →	5	6	0	SACOL1788
SA0077	DAP	S197T (<u>TCA</u> → <u>ACA</u>)	sa77_0_01701 →	10	12	9	SACOL1788
SA0077	DAP	Δ 1 bp	sa77_0_00309 →	0	100	100	SACOL0038
SA0077	DAP	D95E (<u>GAT</u> → <u>GAA</u>)	sa77_0_01975 ←	6	0	0	SACOL0288
SA0077	DAP	L826F (<u>CTT</u> → <u>TTT</u>)	mprF	0	100	100	SACOL1396
SA0077	DAP	E224D (<u>GAA</u> → <u>GAT</u>)	pbp2	0	100	100	SACOL1490 (pbp2)

SA0077	DAP	I303S (<u>A</u> TT→ <u>A</u> GT)	sa77_0_01998 →	0	0	9	SACOL0265
SA0077	DAP	V432L (<u>G</u> TA→ <u>C</u> TA)	sa77_0_02002 →	0	100	100	SACOL0261
SA0077	DAP	S173T (<u>T</u> CA→ <u>A</u> CA)	cap5E →	9	8	0	SACOL0140 (cap5E)
SA0077	DAP	E15D (<u>G</u> AA→ <u>G</u> AC)	sa77_0_01100 →	0	0	7	SACOL0162
SA0077	DAP	V41A (<u>G</u> TT→ <u>G</u> CT)	sa77_0_01112 ←	0	0	6	SACOL0172 (entB)
SA0077	DAP	D40E (<u>G</u> AT→ <u>G</u> AA)	sa77_0_01112 ←	0	0	5	SACOL0172 (entB)
SA0077	DAP	N218D (<u>A</u> AC→ <u>G</u> AC)	lip →	0	0	8	geh
SA0077	DAP	Y219H (<u>T</u> AC→ <u>C</u> AC)	lip →	0	0	8	geh
SA0077	DAP	S230P (<u>T</u> CA→ <u>C</u> CA)	cap1C →	0	0	100	SACOL2685 (Cap1C)
SA0077	DAP	L220I (<u>T</u> TA→ <u>A</u> TA)	uppP →	0	0	6	SACOL0743 (bacA)
SA0077	DAP	P155Q (<u>C</u> CG→ <u>C</u> AG)	gltB2 ←	0	12	0	SACOL2469
SA0077	DAP	D154E (<u>G</u> AT→ <u>G</u> AA)	gltB2 ←	0	16	0	SACOL2469
SA0077	DAP	L123V (<u>T</u> TA→ <u>G</u> TA)	sa77_0_00500 →	0	0	8	SACOL2580
SA0077	DAP	I288L (<u>A</u> TT→ <u>C</u> TT)	crtI →	0	0	8	SACOL2578
SA0077	DAP	Δ1 bp	sa77_0_02190 → / ← hld	0	100	100	Позиция 2082519
SA0077	Контроль	L137S (<u>T</u> TA→ <u>T</u> CA)	cobI →	НД	НД	25	SACOL2375
SA0077	Контроль	S144T (<u>T</u> CA→ <u>A</u> CA)	sa77_0_01701 →	НД	НД	6	SACOL1788
SA0077	Контроль	S197T (<u>T</u> CA→ <u>A</u> CA)	sa77_0_01701 →	НД	НД	7	SACOL1788
SA0077	Контроль	Y119H (<u>T</u> AT→ <u>C</u> AT)	sa77_0_02061 ←	НД	НД	16	SACOL1945
SA0077	Контроль	C55Y (<u>T</u> GT→ <u>T</u> AT)	agrA →	НД	НД	8	agrA
SA0077	Контроль	I97T (<u>A</u> TT→ <u>A</u> CT)	sa77_0_00420 →	НД	НД	8	SACOL2667
SA0077	Контроль	A450T (<u>G</u> CT→ <u>A</u> CT)	copA ←	НД	НД	7	SACOL2572
SA0077	Контроль	D214V (<u>G</u> AT→ <u>G</u> TT)	mreC →	НД	НД	8	mreC
SA0077	Контроль	V192E (<u>G</u> TG→ <u>G</u> AG)	sa77_0_00722 →	НД	НД	13	SACOL1531
SA0077	Контроль	Δ1 bp	arlR →	НД	НД	21	arlR
SA0077	Контроль	I229V (<u>A</u> TT→ <u>G</u> TT)	sa77_0_00998 ←	НД	НД	7	SACOL0666
SA0077	Контроль	P160L (<u>C</u> CA→ <u>C</u> TA)	sa77_0_01596 →	НД	НД	8	SACOL0573
SA0077	Контроль	V317L (<u>G</u> TA→ <u>T</u> TA)	sa77_0_01596 →	НД	НД	6	SACOL0573
SA0077	Контроль	M42I (<u>A</u> TG→ <u>A</u> TA)	hutG ←	НД	НД	9	hutG
SA0077	Контроль	I755V (<u>A</u> TT→ <u>G</u> TT)	sa77_0_00211 ←	НД	НД	19	SACOL2499

SA0077	Контроль	D110G (G <u>A</u> T→G <u>G</u> T)	sa77_0_01963 ←	HD	HD	30	SACOL0303
SA0077	Контроль	A184T (G <u>C</u> A→A <u>C</u> A)	ald1 ←	HD	HD	35	ald1
SA0077	Контроль	C55Y (T <u>G</u> T→T <u>A</u> T)	agrA →	HD	HD	24	agrA
SA0077	Контроль	A450T (G <u>C</u> T→A <u>C</u> T)	copA ←	HD	HD	32	SACOL2572
SA0077	Контроль	W64C (T <u>G</u> G→T <u>G</u> T)	dltC →	HD	HD	56	dltC
SA0077	Контроль	M214T (A <u>T</u> G→A <u>C</u> G)	sa77_0_02471 ←	HD	HD	5	SACOL1520
SA0077	Контроль	L590S (T <u>T</u> A→T <u>C</u> A)	sa77_0_00947 ←	HD	HD	12	SACOL0720
SA0077	Контроль	G75V (G <u>G</u> T→G <u>T</u> T)	sa77_0_01012 ←	HD	HD	9	SACOL0653
SA0077	Контроль	G301S (G <u>G</u> T→A <u>G</u> T)	sa77_0_01596 →	HD	HD	37	SACOL0573
SA0085	Контроль	P191S (C <u>C</u> T→T <u>C</u> T)	sa85_0_02001 ←	HD	HD	81	pepF
SA0085	Контроль	T66K (A <u>C</u> A→A <u>A</u> A)	dltC ←	HD	HD	13	dltC
SA0085	Контроль	T66A (A <u>C</u> A→G <u>C</u> A)	dltC ←	HD	HD	35	dltC
SA0085	Контроль	P457T (C <u>C</u> T→A <u>C</u> T)	dltA ←	HD	HD	34	dltA
SA0085	Контроль	K79E (A <u>A</u> A→G <u>A</u> A)	sucC ←	HD	HD	84	sucC
SA0085	Контроль	Δ16,210 bp	cadX-sa85_0_02628	HD	HD	100	SACOL0033
SA0085	Контроль	N233S (A <u>A</u> C→A <u>G</u> C)	sa85_0_00807 ←	HD	HD	80	SACOL0414
SA0085	Контроль	N268Y (A <u>A</u> T→T <u>A</u> T)	harA ←	HD	HD	9	SACOL1781
SA0085	Контроль	S197T (T <u>C</u> A→A <u>C</u> A)	sa85_0_01815 ←	HD	HD	6	SACOL1788
SA0085	Контроль	S144T (T <u>C</u> A→A <u>C</u> A)	sa85_0_01815 ←	HD	HD	7	SACOL1788
SA0085	Контроль	A157E (G <u>C</u> G→G <u>A</u> G)	sa85_0_02083 ←	HD	HD	17	SACOL0511
SA0085	Контроль	L265I (T <u>T</u> A→A <u>T</u> A)	dltD ←	HD	HD	5	dltD
SA0085	Контроль	N17I (A <u>A</u> T→A <u>T</u> T)	dltC ←	HD	HD	58	dltC
SA0085	Контроль	Δ16,210 bp	cadX-sa85_0_02628	HD	HD	100	SACOL0033
SA0085	Контроль	Q591H (C <u>A</u> A→C <u>A</u> T)	rlp →	HD	HD	64	SACOL0187
SA0085	Контроль	Y180D (T <u>A</u> T→G <u>A</u> T)	sa85_0_01270 ←	HD	HD	44	SACOL1066
SA0085	DAP	P155T (C <u>C</u> G→A <u>C</u> G)	glbB2 ←	0	17,1	0	SACOL2469
SA0085	DAP	F258S (T <u>T</u> T→T <u>C</u> T)	aroC →	5,1	0	0	aroC
SA0085	DAP	A137T (G <u>C</u> G→A <u>C</u> G)	sa85_0_01815 ←	6,1	0	0	sacol1788
SA0085	DAP	S144T (T <u>C</u> A→A <u>C</u> A)	sa85_0_01815 ←	5,7	9,8	0	sacol1788
SA0085	DAP	S197T (T <u>C</u> A→A <u>C</u> A)	sa85_0_01815 ←	5,6	9,5	5,6	SACOL1788

SA0085	DAP	P191S (CCT→TCT)	sa85_0_02001 ←	7,7	0	0	pepF
SA0085	DAP	S295L (TCA→TTA)	mprF	0	1	1	SACOL1396 (mprF)
SA0085	DAP	G69S (GGT→AGT)	gap ←	0	0	10,1	SACOL0838
SA0085	DAP	Y119* (TAT→TAA)	sa85_0_00400 ←	0	0	29,5	recQ1
SA0085	DAP	Δ1 bp	sa85_0_00661 ←	0	1	100	SACOL1201
SA0085	DAP	K79E (AAA→GAA)	sucC ←	12,7	0	0	sucC
SA0085	DAP	G113D (GGT→GAT)	yfhP →	0	6,2	0	SACOL1927 (yfhP)
SA0085	DAP	W265* (TGG→TGA)	yfhP →	0	90	1	SACOL1927 (yfhP)
SA0085	DAP	Δ1 bp	gerCC →	0	0	1	SACOL1510 (gerCC)
SA0085	DAP	K234* (AAG→TAG)	sa85_0_01306 ←	0	0	5,7	SACOL1028
SA0085	DAP	T33N (ACC→AAC)	cls2 →	0	100	1	SACOL2079 (cls2)
SA0077	VAN	I289T (ATA→ACA)	sa77_0_02648 ←	7	0	0	menE
SA0077	VAN	E15G (GAG→GGG)	sa77_0_02316 ←	0	10	0	SACOL0556
SA0077	VAN	Q261* (CAA→TAA)	kdpD →	0	0	100	kdpD
SA0077	VAN	Y353C (TAC→TGC)	rpoC →	5	0	0	rpoC
SA0077	VAN	A949S (GCA→TCA)	rpoC →	0	100	100	rpoC
SA0077	VAN	S144T (TCA→ACA)	sa77_0_01701 →	0	0	6	sacol1788
SA0077	VAN	S197T (TCA→ACA)	sa77_0_01701 →	0	10	6	sacol1788
SA0077	VAN	L99Q (CTA→CAA)	sa77_0_01975 ←	0	6	0	sacol0288
SA0077	VAN	D95E (GAT→GAA)	sa77_0_01975 ←	0	6	0	sacol0288
SA0077	VAN	Y505H (TAT→CAT)	walK ←	0	100	100	yycG
SA0077	VAN	G223D (GGT→GAT)	walK ←	8	0	0	yycG
SA0077	VAN	K13R (AAA→AGA)	walK ←	9	0	0	yycG
SA0077	VAN	D83G (GAT→GGT)	walR ←	9	0	0	yycF
SA0077	VAN	E184G (GAG→GGG)	aldA ←	0	6	0	SACOL2114
SA0077	VAN	M222I (ATG→ATA)	sa77_0_01920 ←	6	0	0	SACOL0394
SA0077	VAN	D271E (GAT→GAA)	sa77_0_00601 →	0	13	0	SACOL1668
SA0077	VAN	Y87* (TAT→TAA)	hisD →	0	11	0	hisD
SA0077	VAN	H402Y (CAT→TAT)	asp2 →	100	100	100	SACOL2673
SA0077	VAN	V81I (GTA→ATA)	sa77_0_02856 ←	0	13	0	sacol0387

SA0077	VAN	Y156* (TAT→TAA)	gltB2 ←	0	11	0	SACOL2469
SA0077	VAN	P155Q (CCG→CAG)	gltB2 ←	0	17	0	SACOL2469
SA0077	VAN	P155T (CCG→ACG)	gltB2 ←	0	15	0	SACOL2469
SA0077	VAN	P142R (CCG→CGG)	panC →	7	0	0	panC
SA0077	VAN	intergenic (+170/-186)	yhcR → / → sa77_0_02272	100	100	100	SACOL1904
SA0422	VAN	S33P (TCA→CCA)	nptA →	27	0	0	SACOL0088
SA0422	VAN	G92* (GGA→TGA)	yycI ←	7	0	0	yycI
SA0422	VAN	L325* (TTA→TGA)	yycH ←	13	0	0	yycH
SA0422	VAN	G76* (GGA→TGA)	yycH ←	43	0	0	yycH
SA0422	VAN	Δ23 bp	yycH ←	0	100	100	yycH
SA0422	VAN	L429Q (CTG→CAG)	walk ←	31	0	0	yycG
SA0422	VAN	Y87* (TAT→TAA)	hisD →	8	0	0	hisD
SA0422	VAN	S60T (TCG→ACG)	yacP ←	7	0	0	SACOL0579
SA0422	VAN	A166P (GCA→CCA)	pitA →	0	100	100	SACOL0722
SA0422	VAN	D55Y (GAC→TAC)	clpP →	0	0	7	clpP
SA0422	VAN	G36D (GGC→GAC)	sa422_0_00489 ←	0	6	0	SACOL0863
SA0422	VAN	Y263H (TAT→CAT)	cls1 ←	0	0	5	cls1
SA0422	VAN	S173T (TCA→ACA)	cap5E ←	5	0	0	SACOL0140 (cap5E)
SA0422	VAN	P291T (CCT→ACT)	sa422_0_00944 ←	6	0	0	SACOL1668
SA0422	VAN	Y156* (TAT→TAA)	gltB2 ←	0	0	5	SACOL2469
SA0422	VAN	P155Q (CCG→CAG)	gltB2 ←	0	0	7	SACOL2469
SA0422	VAN	P155T (CCG→ACG)	gltB2 ←	0	0	11	SACOL2469
SA0422	VAN	I153V (ATT→GTT)	gltB2 ←	0	9	0	SACOL2469
SA0422	VAN	E627* (GAA→TAA)	sa422_0_01274 ←	0	12	0	SACOL2290
SA0422	VAN	A137T (GCG→ACG)	sa422_0_01339 →	9	0	0	SACOL1788
SA0422	VAN	S144T (TCA→ACA)	sa422_0_01339 →	11	11	0	SACOL1788
SA0422	VAN	S148T (TCA→ACA)	sa422_0_01339 →	7	0	0	SACOL1788
SA0422	VAN	S197T (TCA→ACA)	sa422_0_01339 →	11	9	8	SACOL1788
SA0736	VAN	R442K (AGG→AAG)	yycH ←	6	0	0	yycH
SA0736	VAN	G223D (GGT→GAT)	walk ←	0	100	100	yycG

SA0736	VAN	D9640E (GAT→GAA)	sa736_0_01197 →	6	0	0	ebh
SA0736	VAN	R406H (CGT→CAT)	rpoB →	0	100	100	rpoB
SA0736	VAN	T1134I (ACA→ATA)	rpoC →	31	0	0	rpoC
SA0736	VAN	R37S (AGG→AGC)	nptA ←	0	0	7	SACOL0088
SA0736	VAN	S33P (TCA→CCA)	nptA ←	0	0	8	SACOL0088
SA0736	VAN	Y84H (TAT→CAT)	ampA →	0	0	6	SACOL0945
SA0736	VAN	K95* (AAA→TAA)	ywqG →	5	0	0	SACOL0879
SA0736	VAN	V149M (GTG→ATG)	gltB2 →	0	0	12	SACOL2469
SA0736	VAN	T151S (ACA→TCA)	gltB2 →	0	11	0	SACOL2469
SA0736	VAN	I153V (ATT→GTT)	gltB2 →	16	0	0	SACOL2469
SA0736	VAN	D154G (GAT→GGT)	gltB2 →	11	0	0	SACOL2469
SA0736	VAN	P155Q (CCG→CAG)	gltB2 →	0	0	7	SACOL2469
SA0736	VAN	W315* (TGG→TAG)	flp ←	0	0	8	SACOL2445
SA0736	VAN	S144P (TCA→CCA)	nreB →	0	7	0	SACOL2390
SA0736	VAN	I74L (ATA→TTA)	sa736_0_02768 ←	0	10	17	SACOL0288
SA0736	VAN	I45F (ATC→TTC)	clpX →	0	0	25	clpX
SA0736	VAN	S197T (TCA→ACA)	sa736_0_00879 ←	13	13	11	SACOL1788
SA0736	VAN	S144T (TCA→ACA)	sa736_0_00879 ←	14	0	0	SACOL1788
SA0736	VAN	intergenic (+141/-10)	tig → / → clpX	0	0	67	clpX
SA0085	VAN	I153V (ATT→GTT)	gltB2 ←	0	14	8	SACOL2469
SA0085	VAN	V149M (GTG→ATG)	gltB2 ←	0	0	8	SACOL2469
SA0085	VAN	D7489E (GAT→GAA)	sa85_0_01771 →	6	0	0	ebh
SA0085	VAN	D9689E (GAT→GAA)	sa85_0_01771 →	6	0	0	ebh
SA0085	VAN	S197T (TCA→ACA)	sa85_0_01815 ←	13	10	8	sacol1788
SA0085	VAN	S144T (TCA→ACA)	sa85_0_01815 ←	13	12	0	sacol1788
SA0085	VAN	S59L (TCA→TTA)	prsA →	0	0	77	SACOL_RS09770
SA0085	VAN	P191S (CCT→TCT)	sa85_0_02001 ←	100	100	100	pepF
SA0085	VAN	P314L (CCT→CTT)	mprF	0	100	100	SACOL1396
SA0085	VAN	D345Y (GAT→TAT)	sa85_0_02070 ←	9	0	0	SACOL_RS08885
SA0085	VAN	Δ11 bp	pitA ←	0	37	0	SACOL0722

SA0085	VAN	Δ 12 bp	pitA ←	0	21	0	SACOL0722
SA0085	VAN	T345K (ACA→AAA)	pdhC ←	100	100	100	SACOL_RS05640
SA0085	VAN	D102E (GAT→GAA)	sa85_0_00560 ←	8	0	0	SACOL1305
SA0085	VAN	K79E (AAA→GAA)	sucC ←	100	100	100	sucC
SA0085	VAN	A399S (GCG→TCG)	pnpA ←	0	9	0	pnp
SA0085	VAN	A286V (GCC→GTC)	sa85_0_02531 →	5	0	0	SACOL1844
SA0085	VAN	M288L (ATG→CTG)	sa85_0_02531 →	6	0	0	SACOL1844
SA0085	VAN	E188G (GAG→GGG)	sa85_0_02607 →	5	0	0	SACOL2178
SA0085	VAN	N233S (AAC→AGC)	sa85_0_00807 ←	100	100	100	SACOL0414
SA0085	VAN	E65G (GAG→GGG)	norB ←	6	0	0	SACOL1475
SA0085	VAN	E27G (GAG→GGG)	bglA_1 ←	0	6	0	bglA
SA0085	VAN	Q31* (CAA→TAA)	nptA ←	15	0	0	SACOL0088
SA0085	VAN	T197I (ACA→ATA)	walR ←	49	0	0	yycF
SA0085	VAN	V186L (GTA→TTA)	walR ←	19	0	0	yycF
SA0085	VAN	T95K (ACA→AAA)	kdpD →	6	0	0	kdpD
SA0085	VAN	intergenic (-39/+1068)	walR ← / ← purA	0	0	100	walR promoter
SA0422	DAP	I270N (ATT→AAT)	fabB →	0	0	25	fabF
SA0422	DAP	Δ 1 bp	yfhP ←	0	0	9	SACOL1927
SA0422	DAP	N52I (AAT→ATT)	yfhP ←	0	0	67	SACOL1927
SA0422	DAP	Δ 1,241 bp	sepA-sa422_0_02620	0	0	100	SACOL2158- SACOL2157
SA0422	DAP	R295C (CGT→TGT)	cls2 →	0	0	100	SACOL2079 (cls2)
SA0422	DAP	A137T (GCG→ACG)	sa422_0_01339 →	9	0	0	SACOL1788
SA0422	DAP	S144T (TCA→ACA)	sa422_0_01339 →	8	12	5	SACOL1788
SA0422	DAP	S148T (TCA→ACA)	sa422_0_01339 →	6	0	0	SACOL1788
SA0422	DAP	V151E (GTG→GAG)	sa422_0_01339 →	0	6	0	SACOL1788
SA0422	DAP	S197T (TCA→ACA)	sa422_0_01339 →	9	11	6	SACOL1788
SA0422	DAP	S226T (TCA→ACA)	sa422_0_01339 →	0	6	0	SACOL1788
SA0422	DAP	S295L (TCA→TTA)	mprF	100	100	100	SACOL1396
SA0422	DAP	R50H (CGT→CAT)	mprF	0	15	0	SACOL1396
SA0422	DAP	R579L (CGT→CTT)	walK ←	0	100	100	yycG

SA0422	DAP	D596E (GAT→GAA)	uvrB →	11	0	0	uvrB
SA0422	DAP	S177F (TCT→TTT)	pgsA →	0	0	100	pgsA
SA0422	DAP	Δ18 bp	sa422_0_00541 →	94	100	100	SACOL0944
SA0736	DAP	I74L (ATA→TTA)	sa736_0_02768 ←	0	0	11	SACOL0288
SA0736	DAP	M201R (ATG→AGG)	guaA ←	0	100	100	guaA
SA0736	DAP	T58K (ACG→AAG)	mtlD →	0	0	93	mtlD
SA0736	DAP	A345T (GCA→ACA)	fabB ←	0	34	0	fabF
SA0736	DAP	A144T (GCA→ACA)	fabB ←	0	67	100	fabF
SA0736	DAP	D126V (GAT→GTT)	sepA →	0	0	100	SACOL2158
SA0736	DAP	S309L (TCA→TTA)	mprF	0	100	100	SACOL1396
SA0736	DAP	G48V (GGT→GTT)	sa736_0_02315 ←	0	0	7	SACOL1017
SA0736	DAP	Y238C (TAT→TGT)	prsA →	0	8	0	SACOL1897
SA0736	DAP	D154G (GAT→GGT)	glbB2 →	10	0	0	SACOL2469
SA0736	DAP	D154E (GAT→GAA)	glbB2 →	0	17	0	SACOL2469
SA0736	DAP	Y156* (TAT→TAA)	glbB2 →	0	0	6	SACOL2469
SA0736	DAP	N193K (AAT→AAA)	sa736_0_01510 →	0	21	0	SACOL0101
SA0736	DAP	Δ1 bp	sa736_0_01415 ←	0	100	100	moaA
SA0736	DAP	E95G (GAG→GGG)	fhs ←	0	5	0	fhs
SA0736	DAP	S197T (TCA→ACA)	sa736_0_00879 ←	11	11	10	SACOL1788
SA0736	DAP	V151A (GTG→GCG)	sa736_0_00879 ←	5	0	0	SACOL1788
SA0736	DAP	V151E (GTG→GAG)	sa736_0_00879 ←	0	5	0	SACOL1788
SA0736	DAP	S144T (TCA→ACA)	sa736_0_00879 ←	10	10	0	SACOL1788
SA0736	DAP	E168G (GAG→GGG)	purD ←	6	0	0	purD
SA0736	DAP	A23V (GCA→GTA)	cls2 ←	0	100	100	SACOL2079 (cls2)
SA0736	DAP	A112G (GCG→GGG)	menB ←	5	0	0	menB
SA0736	DAP	G70* (GGA→TGA)	mutL →	0	9	0	mutL
SA0736	DAP	L173S (TTA→TCA)	cls1 →	0	25	0	cls1
SA0736	DAP	intergenic (-14/+8)	pykA ← / ← pfkA	0	0	100	pyk
SA0736	DAP_Y	I74L (ATA→TTA)	sa736_0_02768 ←	НД	НД	13	SACOL0288
SA0736	DAP_Y	N94K (AAT→AAG)	sa736_0_00910 →	НД	НД	8	SACOL0389

SA0736	DAP_Y	M201R (<u>A</u> TG→ <u>A</u> GG)	guaA ←	НД	НД	100	guaA
SA0736	DAP_Y	A144T (<u>G</u> CA→ <u>A</u> CA)	fabB ←	НД	НД	100	fabF
SA0736	DAP_Y	S309L (<u>T</u> CA→ <u>T</u> TA)	mprF	НД	НД	100	SACOL1396
SA0736	DAP_Y	Δ1 bp	sa736_0_02429 →	НД	НД	100	SACOL1511
SA0736	DAP_Y	Y156N (<u>T</u> AT→ <u>A</u> AT)	gltB2 →	НД	НД	7	SACOL2469
SA0736	DAP_Y	Δ1 bp	sa736_0_01415 ←	НД	НД	100	moaA
SA0736	DAP_Y	W66* (<u>T</u> GG→ <u>T</u> GA)	mnhD_2 ←	НД	НД	100	mnhD
SA0736	DAP_Y	S197T (<u>T</u> CA→ <u>A</u> CA)	sa736_0_00879 ←	НД	НД	9	SACOL1788
SA0736	DAP_Y	A23V (<u>G</u> CA→ <u>G</u> TA)	cls2 ←	НД	НД	100	SACOL2079 (cls2)

Примечание: VAN – селекция на ванкомицине, DAP – селекция на даптомицине (DAP-Y, колонии желтого цвета), контроль – селекция на среде без антибиотиков, НД – нет данных, Δ – делеция, стрелками отмечено направление цепи, знаком «/» отмечены мутации в потенциальных промоторах или межгенном пространстве (intergenic).