

ХОХЛОВА ОЛЬГА ЕВГЕНЬЕВНА

**МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ НОЗОКОМИАЛЬНЫХ И
ВНЕБОЛЬНИЧНЫХ MRSA И ИХ РОЛЬ В РАЗВИТИИ ИНФЕКЦИОННЫХ
ЗАБОЛЕВАНИЙ РАЗЛИЧНОГО ГЕНЕЗА**

03.02.03 – микробиология

Автореферат

диссертации на соискание ученой степени
доктора биологических наук

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего образования «Красноярский государственный медицинский университет имени профессора В.Ф.Войно-Ясенецкого» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Научные консультанты:

Сидоренко Сергей Владимирович, доктор медицинских наук, профессор Федеральное Государственное бюджетное учреждение «Детский научно-клинический центр инфекционных болезней Федерального медико-биологического агентства», отдел молекулярной микробиологии и эпидемиологии, руководитель

Ямамото Татсуо, M.D., Ph.D. профессор, Международный медицинский образовательно-исследовательский центр (IMERC) Ниигата, Япония, руководитель; департамент международных связей, отделение бактериологии и контроля за инфекционными заболеваниями Медицинской школы Университета г. Ниигата, Япония, руководитель, заведующий (до 2012 г. включительно)

Официальные оппоненты:

Припутневич Татьяна Валерьевна, доктор медицинских наук, Федеральное Государственное бюджетное учреждение «Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии имени академика В.И. Кулакова» Министерства здравоохранения РФ, отдел микробиологии и клинической фармакологии, заведующая

Афанасьев Станислав Степанович, Заслуженный деятель науки РФ, доктор медицинских наук, профессор, Федеральное бюджетное учреждение науки «Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им.Г.Н.Габричевского» Роспотребнадзора, главный научный сотрудник

Краева Людмила Александровна, доктор медицинских наук, Федеральное бюджетное учреждение науки «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Пастера» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, лаборатория медицинской бактериологии, заведующая

Ведущая организация:

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Институт экспериментальной медицины» Министерства науки и высшего образования Российской Федерации, г. Санкт-Петербург

Защита диссертации состоится «17» мая 2019 г. в 11 часов на заседании диссертационного совета Д 350.002.01 на базе Федерального бюджетного учреждения науки «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека по адресу: 142279, Московская область, Серпуховский район, пос. Оболенск

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Федерального государственного учреждения науки «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека

Автореферат разослан « _____ » _____ 2019 г.

Ученый секретарь диссертационного совета,
кандидат биологических наук



Фурсова Надежда Константиновна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность исследований. *Staphylococcus aureus* - актуальный возбудитель инфекционных заболеваний. Он является одним из основных патогенов человека, вызывающих значительный уровень заболеваемости и смертности во всем мире (CDC, 2018). Инфекции, вызванные *S. aureus*, варьируют от неинвазивных заболеваний, таких как инфекции кожи и мягких тканей, до тяжелых состояний, таких как остеомиелит, эндокардит и сепсис. *S. aureus* часто колонизирует организм и обнаруживается примерно у 20-30 % здоровых людей (Dantes R. et al., 2013; Williamson D.A. et al., 2015). Так, в США около 20 % взрослого населения являются постоянными носителями *S. aureus*, около 30 % населения периодически колонизируется *S. aureus* (Wertheim H.F.L. et al., 2005). Назальное носительство *S. aureus* у детей значительно выше - от 45 % до 70 % (Wertheim H.F.L. et al., 2005). Колонизация *S. aureus* при определенных условиях приводит к развитию поверхностных и инвазивных инфекций (Tong S.Y.C. et al., 2015). Например, *S. aureus* часто вызывает инфекции кожи и мягких тканей, такие как импетиго, фолликулит и кожные абсцессы. Более редкие, но тяжелые инфекции во внебольничных условиях включают пиомиозит, некротический фасциит и некротизирующую пневмонию (Lakhundi S. et al., 2018). В условиях стационаров *S. aureus* вызывает хирургические инфекции и инфекции, связанные с имплантацией (искусственные клапаны сердца, катетеры, протезные суставы и ортопедические имплантаты) (Brooks J.L. et al., 2012; Tong S.Y.C. et al., 2015). При бактериемии *S. aureus* приводит к возникновению таких инфекций, как эндокардит, остеомиелит и др. (Archer N.K. et al., 2011; Murray R., 2005; Wertheim H.F.L. et al., 2005). Например, в США в 2014 году зарегистрировано 72444 случая инвазивных инфекций, вызванных MRSA (CDC, 2014). При этом ряд факторов определяют роль *S. aureus* как комменсала, так и патогена. К ним относятся множество детерминант вирулентности, а также способность приобретать множественную резистентность к антимикробным химиопрепаратам (Lee A.S. et al., 2018).

Инфекции, вызванные *S. aureus*, имеют также высокую социально-экономическую значимость и являются проблемой здравоохранения, как в развитых, так и в развивающихся странах (Ortwine J.K. et al., 2018). Особо актуальны инфекции вызванные штаммами *S. aureus* с множественной устойчивостью к антимикробным химиопрепаратам, таким как метициллинрезистентные и ванкомицинрезистентные *S. aureus* (MRSA и VRSA соответственно) (Брусина Е.Б. и др., 2014; Bassetti M. Et al., 2018; CDC, 2013). Количество инфекций, вызванных MRSA в США, составляет в среднем 80000 случаев в год, со смертностью примерно 11000 случаев (CDC, 2014; Klevens R.M. et al, 2007; Malani P.N.,

2014). Исследования показывают, что общие затраты на лечение MRSA-инфекций на порядок выше, чем на лечение инфекций, вызванных MSSA (Balasubramanian D. et al., 2017; Filice G.A. et al, 2010).

В 1980-х и начале 1990-х годов MRSA возникла как серьезная проблема в медицинских учреждениях, в основном из-за распространения эпидемических клонов связанных с оказанием медицинской помощи (HA-MRSA) (Aguayo-Reyes A., 2018; Enright M.C. et al., 2002; Гасретова Т.Д. и др., 2013). Однако, с середины 1990-х годов получили распространение инфекции, вызванные эпидемическими амбулаторными штаммами MRSA среди молодых пациентов без предшествующей госпитализации (CA-MRSA) (David M.Z. et al., 2010; Yamamoto T. et al., 2010). Позднее возникли инфекции, связанные с животноводством, вызванные LA-MRSA (Cuny C. et al., 2015). Совершенствование методов молекулярной диагностики, особенно методов молекулярного типирования, привели к новым представлениям о передаче и распространении *S. aureus* как во внебольничных условиях, так и в условиях стационаров. В разных странах отмечено распространение разных генетических клонов MRSA. Некоторые клональные комплексы MRSA широко распространились во всем мире, к таким относятся CC239 ST239 и CC8 ST8 (Monaco M. et al., 2017). Информацию о распространении клональных комплексов MRSA в одних странах нельзя экстраполировать на другие страны, в частности на РФ. Поэтому крайне актуальным является исследование клональной принадлежности MRSA, циркулирующих на территории Красноярского края и РФ, и изучение их роли в развитии инфекционных заболеваний.

Штаммы MRSA характеризуются формированием резистентности ко многим группам антимикробных химиопрепаратов. Долгое время препаратом выбора для лечения инфекций, вызванных MRSA, был ванкомицин (Lakhundi S. et al., 2018). Однако с середины 1990-х годов появились штаммы со сниженной чувствительностью к ванкомицину. В 2002 г. были впервые выделены штаммы резистентные к ванкомицину (McGuinness W.A. et al., 2017). Это послужило стимулом для разработки и внедрения новых анти-MRSA препаратов, таких как оксазолидиноны, глицилциклиды, липопептиды, новые цефалоспорины (Lakhundi S. et al., 2018). Но с момента внедрения их в клиническую практику появились штаммы устойчивые к новым анти-MRSA препаратам (Berti A.D. et al., 2015; Lee H. et al., 2018). При этом, профиль антибиотикорезистентности и механизмы могут варьировать в зависимости от того, к какой линии принадлежит MRSA, а также к какому клону он относится. Данные по профилю антибиотикорезистентности штаммов, распространенных за рубежом, могут не совпадать профилем антибиотикорезистентности штаммов, распространенных в Красноярском крае и РФ.

Таким образом, существует необходимость в новой стратегии лечения инфекций, вызванных *S. aureus*, особенно вызванных MRSA. Важно отметить, что инфекции *S. aureus* могут быть вызваны штаммами, колонизирующими слизистые оболочки или кожу (Wertheim H.F.L. et al., 2005). Поскольку комменсальный и инвазивный образ жизни радикально различны, вполне вероятно, что микроорганизмы адаптационно изменяются. Таким образом, выявление особенностей структурной организации генома, факторов вирулентности MRSA и механизмов их регуляции в ответ на среду пребывания, а также выявление механизмов резистентности к антимикробным химиопрепаратам имеют значение для разработки эффективной стратегии лечения и прогноза формирования резистентности в будущем.

Молекулярные механизмы определяют функционирование живых систем, и позволяют выявлять возможность развития инфекционного процесса, особенности его течения. Изучение молекулярных механизмов позволит в последующем корректировать антимикробную химиотерапию. Для этого применяются молекулярно-генетические методы, основанные на установлении последовательностей нуклеотидов генома микроорганизмов, в частности штаммов MRSA. Используются амплификация нуклеиновых кислот, в первую очередь, полимеразная цепная реакция (ПЦР), секвенирование, в том числе третьего поколения. Для определения клональной принадлежности штаммов MRSA используется *spa* типирование, SCCmec типирование, *agr* типирование, MLST (Yamamoto T. et al., 2012). Данные методы типирования имеют свои достоинства и недостатки. Основным недостатком является их недоступность в рутинной практике. Поэтому важна разработка методов доступного типирования и дифференциации HA-MRSA и CA-MRSA в клинической практике.

Степень разработанности темы исследования

Проблема инфекций, вызываемых MRSA, является крайне актуальной во всем мире (Шляпников С.А. и др., 2010; Сухорукова М.В. и др., 2014, Lakhundi S. et al., 2018). Штаммы MRSA характеризуются изменчивостью генома, что приводит к изменению вирулентности и формированию устойчивости к антимикробным химиопрепаратам. Исследования молекулярно-генетических особенностей штаммов MRSA, распространенных среди здоровых носителей, а также как актуальных возбудителей гнойно-воспалительных заболеваний, активно проводятся во всем мире, начиная с момента их появления (de Lencastre H. et al., 1993; Dornbusch K. et al., 1969; Kayser F.H. et al., 1976; Struelens M.J., 1993).

В связи с генетическим разнообразием микроорганизмов, клоны MRSA, распространенные в других странах, могут отличаться от генетических вариантов,

распространенных на территории РФ или могут характеризоваться сходством между генетическими линиями, распространенными в разных странах (Тюрин Ю.А. и др., 2013). Следовательно, данные по распространению генетических вариантов, распространенных на территории других стран, невозможно экстраполировать на РФ.

Быстрая идентификация различных генетических вариантов штаммов MRSA крайне важна для эпидемиологического контроля распространения и профилактики инфекций, вызванных MRSA. Особенно важное значение имеет получение результатов в реальном времени (Asadollahi P. et al., 2018). Генотипирование штаммов MRSA по типу SCCmec применяется в эпидемиологических исследованиях. Фаготипирование первоначально использовалось для формальной типизации изолятов *S. aureus*, но оно постепенно вытеснилось и было заменено на гель-электрофорез в пульсирующем поле (PFGE). Последний метод является золотым стандартом для типирования изолятов *S. aureus* (Asadollahi P. et al., 2018). Однако из-за его трудоемкости, продолжительности и достаточно высокой стоимости, а также трудности в обмене данными между лабораториями и требованиями к межлабораторной стандартизации PFGE, данный метод был заменен на генотипирование по генам «домашнего хозяйства» (MLST) и генотипирование стафилококкового белка A (*spa*) (Asadollahi P. et al., 2018; Bosch T. et al., 2015; O'Hara F.P. et al., 2016). Agr типирование, предложенное в 2001 г., широко применяется для эпидемиологического расследования и мониторинга MRSA (Miao J. et al., 2017). Коагулазотипирование также используется в эпидемиологии MRSA, при этом помимо серотипирования используется амплификация гена *coa*, основанная на применении ПЦП с праймерами, нацеленными на вариабельную область коагулазной последовательности (Miao J. et al., 2017). В настоящее время наиболее часто для генотипирования штаммов MRSA проводится комплексное генотипирование, включающее SCCmec, *spa* и MLST типирования с целью обеспечения точности результатов (Miao J. et al., 2017).

Применение полногеномного секвенирования генома бактериальных агентов ознаменовало прогресс в клинической микробиологии и эпидемиологии (Lee A.S. et al., 2018; Chin C.S. et al., 2013). Однако применение полногеномного секвенирования первого и второго поколений в рутинной практике остается ограниченным. В первую очередь это связано с технологическими ограничениями во времени получения результатов, что влияет на эффективность лечения и своевременность проведения противоэпидемических мероприятий. Кроме того, необходимым условием эффективности данного исследования является наличие стандартизированных протоколов и автоматизированной системы интерпретации данных. Введение секвенирования третьего поколения (например, таких

как Oxford Nanopore MinION от Pacific BioSciences и Oxford Nanopore, Oxford, UK; SMRT) привело к более протяженному считыванию последовательностей, охватывающему повторяющиеся области и обеспечивающему сборку полного бактериального генома с меньшей частотой ошибок (Lee A.S. et al., 2018). Важным преимуществом секвенирования третьего поколения для клинической диагностики является то, что результаты секвенирования могут быть проанализированы в реальном времени и позволяют идентифицировать микроорганизмы в течение 30 минут, выявлять профиль антибиотикорезистентности в течение 10 часов после начала пробега (Cao M.D. et al., 2016). В настоящее время полногеномное секвенирование широко используется в расследовании вспышек, вызванных MRSA как в стационарах, так и во внебольничных условиях. Кроме того, этот метод имеет большое значение для изучения популяционной биологии MRSA. Также то, что действительно отличает секвенирование третьего поколения в частности SMRT, в отличие от секвенирования второго поколения, позволяет напрямую определять эпигенетику MRSA (Monaco M. et al., 2017; Ardui S. et al., 2018).

Таким образом, необходимо регулярно проводить мониторинг распространения генетических вариантов, спектра генов вирулентности и механизмов резистентности штаммов MRSA как на территории Красноярского края, так и на территории РФ. Необходимо изучать структуру генома штаммов MRSA в целях определения особенностей и взаимосвязи с тяжестью патологических процессов, вызываемых MRSA, а также прогноза изменчивости генома штаммов. При этом имеющиеся на сегодняшний день и применяемые методы изучения молекулярно-генетических особенностей MRSA крайне многочисленны и разнообразны, трудоемки, достаточно дороги, не всегда доступны в клинической практике. Разработка доступных методов типирования, применимых в ПЦР-лаборатории и направленных на выявление наиболее часто встречающихся генетических вариантов MRSA, распространенных на территории Красноярского края, позволит значительно упростить и удешевить процедуру определения клональной принадлежности штаммов MRSA, а также основного профиля вирулентности и антибиотикорезистентности.

Цель и задачи исследования.

Цель исследования - охарактеризовать популяционную структуру штаммов MRSA, циркулирующих на территории г. Красноярска и Красноярского края, оценить их роль в развитии заболеваний разного генеза.

Задачи исследования:

1. Выявить частоту встречаемости MRSA среди здоровых жителей г. Красноярск и Красноярского края и больных с разными нозологиями и оценить их роль в развитии заболеваний разного генеза.
2. Определить клональную принадлежность штаммов MRSA, участвующих в развитии заболеваний разного генеза и их эпидемическую значимость.
3. Изучить молекулярно-генетические маркеры вирулентности, гены регуляторы и уровень экспрессии генов вирулентности и регуляторных генов.
4. Изучить антибиотикочувствительность и механизмы резистентности к антимикробным химиопрепаратам штаммов MRSA, выделенных от здоровых жителей и больных г. Красноярск и Красноярского края.
5. Изучить полную структуру генома двух штаммов MRSA, являющихся основными представителями наиболее распространенных генетических вариантов, и выделенных от больных с внебольничной и госпитальной инфекциями.
6. Определить генетические связи между штаммами MRSA, циркулирующими на территории г. Красноярск и Красноярского края, и представителями российской и глобальной популяции; оценить их эпидемическую значимость.
7. Определить маркеры и разработать методы быстрого скрининга генетических вариантов MRSA, распространенных в г. Красноярске и Красноярском крае и на территории РФ.

Научная новизна. Оценена значимость *S. aureus*, включая MRSA в развитии инфекционных заболеваний разной нозологии. Изучена микрофлора и ее антибиотикорезистентность, а также роль *S. aureus*, включая MRSA в развитии ИКМТ, остеомиелита, пневмонии, сепсиса, инфекционных осложнений у онкологических больных. Оценено современное состояние уровня носительства *S. aureus*, включая MRSA в популяции практически здоровых жителей г. Красноярск, Красноярского края.

Охарактеризована клональная структура штаммов MRSA, выделенных от пациентов с различными нозологиями и от практически здоровых жителей г. Красноярск, Красноярского края, и выявлена их связь с российскими и глобальными клонами MRSA. Оценена эпидемическая значимость выделенных штаммов для территории г. Красноярск и Красноярского края, РФ, мира.

Получены сведения о генетическом профиле вирулентности и механизмах антибиотикорезистентности штаммов MRSA, выделенных от госпитализированных пациентов и здоровых носителей г. Красноярск, Красноярского края. Установлена частота горизонтального переноса мобильных генетических элементов, детерминирующих резистентность к антимикробным химиопрепаратам. Получены

данные об уровне экспрессии генов вирулентности и регуляторных генов штаммов MRSA, выделенных от госпитализированных пациентов и здоровых носителей г. Красноярска, Красноярского края.

Получены данные о полной структуре генома двух штаммов MRSA: внебольничного представителя линии ST8, выделенного от больного, госпитализированного в стационар г. Красноярска; госпитального представителя линии ST239, выделенного от больного, госпитализированного в стационар г. Красноярска. Установлены особенности структуры генома данных штаммов и их взаимосвязь с эволюцией MRSA и их вирулентностью и антибиотикорезистентностью.

Определены маркеры и разработаны варианты мультиплексной ПЦР и ПЦР для быстрого скрининга генетических вариантов MRSA, наиболее распространенных в г. Красноярске и Красноярском крае, а также и на территории РФ.

Теоретическая значимость исследования заключается в научном обосновании целесообразности постоянного мониторинга распространения MRSA; определения клональной принадлежности; установления роли молекулярно-генетических особенностей штаммов MRSA в развитии инфекционных заболеваний различного генеза. Представленный в работе экспериментально-практический материал является теоретической основой для совершенствования доступных методик выявления клональной принадлежности штаммов MRSA; профилактики, лечения инфекций, вызванных MRSA; исследований эволюции MRSA. Материалы диссертации используются при чтении лекций и проведении практических занятий в обучении студентов ФГБОУ ВО КрасГМУ им. проф. В.Ф.Войно-Ясенецкого Минздрава России, а также при проведении научных семинаров для усовершенствования подготовки врачей и бактериологов.

Практическая значимость. Настоящее исследование имеет не только фундаментальное, но и выраженное прикладное значение и направлено на разработку современных генетических решений по оптимизации существующих методов определения клональной принадлежности штаммов MRSA, распространенных на территории г. Красноярска, Красноярского края. Разработан и предложен вариант М-ПЦР для детекции принадлежности к варианту ST239 и вариант ПЦР для детекции принадлежности к варианту ST8. Созданные методики более доступны по сравнению с методами генотипирования и могут быть внедрены и использованы в клинической практике. Проведенные научные исследования позволили выявить молекулярные мишени, а также эффекторные молекулы, которые могут быть использованы для диагностики, лечения и профилактики заболеваний, вызванных MRSA.

Создана уникальная коллекция штаммов нозокомиальных и внебольничных MRSA, в том числе штаммов, которые могут быть использованы как контрольные на международном уровне. Полные последовательности геномов включены в GeneBank: уникальный штамм OC3 - номера доступа GenBank BBKC01000001-BBKC01000144; уникальный штамм OC8 - номер доступа GenBank AP017377. Полученная научная информация о структуре геномов штаммов MRSA - представителей двух распространенных клональных линий позволяет отслеживать эволюцию глобальных линий MRSA, распространенных во всем мире.

Полученные научные данные о выявлении 10,4 % штаммов MRSA, относящихся к hVISA и VISA, свидетельствует о необходимости определения МПК к ванкомицину в рутинной практике, в частности, с помощью метода E-теста с целью определения возможности использования ванкомицина для лечения инфекций, вызванных MRSA.

Проведенные научные исследования явились важным основанием для оптимизации профилактики и лечения инфекций, вызванных MRSA. Полученные данные о микрофлоре гнойно-воспалительных заболеваний, антибиотикорезистентности и роли MRSA используются в клинической практике КГБУЗ «Краевая клиническая больница»; КГБУЗ «Красноярская межрайонная клиническая больница скорой медицинской помощи им. Н.С. Карповича»; КГБУЗ «Красноярский краевой клинический онкологический диспансер имени А.И. Крыжановского» при выборе антимикробных препаратов для эмпирической терапии и при проведении этиотропной терапии, а также для совершенствования мер профилактики инфекций, вызванных MRSA.

Полученные данные о распространенности MRSA, их молекулярно-генетических особенностях и механизмах антибиотикорезистентности используются для прогноза эволюции резистентности MRSA, циркулирующих на территории г. Красноярск, Красноярского края, РФ, а также в разработке противоэпидемических мероприятий.

Методология и методы исследования. Предметом исследования явились метициллинрезистентные штаммы *S. aureus*, их молекулярно-генетические особенности и роль в развитии различных заболеваний.

Теоретической базой диссертационного исследования явились труды отечественных и зарубежных ученых по вопросам носительства *S. aureus*, включая MRSA, роли данных микроорганизмов в развитии различных инфекционных заболеваний, диагностики, лечения и профилактики инфекций, вызванных MRSA, определения клональной принадлежности MRSA, изучении молекулярно-генетических особенностей MRSA, изучении структуры генома микроорганизмов, вопросам эволюции MRSA.

В соответствии с поставленной целью спланирована методология данной работы с применением общенаучных методов и специфических методов, таких как бактериологический, молекулярно-генетические, серологические, биоинформационные и методы статистической обработки результатов.

Положения, выносимые на защиту

1. Установлено, что уровень носительства MRSA среди здоровых жителей г. Красноярск, Красноярского края составил 0,3 %, что свидетельствует об эпидемиологическом благополучии в плане распространения CA-MRSA. Установлено, что на фоне снижения доли MRSA в Европейских странах, благодаря проведению жестких противоэпидемических мероприятий, в г. Красноярск, Красноярском крае в 2010-2016 гг. сохранялся достаточно высокий уровень доли MRSA у госпитализированных пациентов - до 62,2 %.

2. Клональная структура популяции MRSA на территории г. Красноярск, Красноярского края представлена двумя доминирующими линиями ST239, ST8, относящимся к глобальным, и двумя минорными линиями ST30, ST12.

3. Наряду со штаммами, относящимся к классическому варианту глобальной линии ST239, на территории г. Красноярск, Красноярского края установлено распространение уникальных вариантов, названных ST239_{Kras} и ST8_{Kras}.

4. Установлено, что штаммы линии ST239, распространенные на территории г. Красноярск, Красноярского края относятся к госпитальным HA-MRSA, характеризуются высоким уровнем вирулентности и антибиотикорезистентности, высоким уровнем частоты передачи генов резистентности. Штаммы линии ST8 относятся к внебольничным CA-MRSA, циркулирующим также и в стационарах г. Красноярск, Красноярского края, характеризуются высоким уровнем вирулентности с уровнем частоты передачи генов резистентности от 10^{-4} до 10^{-8} .

5. Обнаружение на территории г. Красноярск, Красноярского края особенностей в структуре геномов двух наиболее распространенных в мире генетических линий MRSA ST239 и ST8 свидетельствует об активной эволюции в направлении повышения вирулентности и антибиотикорезистентности.

6. Предложены молекулярные мишени для детекции принадлежности к генетическим вариантам MRSA ST239_{Kras} и ST8_{Kras}, распространенным на территории г. Красноярск, Красноярского края.

Степень достоверности работы основана на значительном объеме экспериментальных исследований и полученных результатов, проведением исследований на сертифицированном оборудовании с использованием методов исследования,

соответствующих современным требованиям и общемировым стандартам с высоким уровнем чувствительности, объективности, а также использование программного обеспечения, необходимого для проведения биоинформационного и статистического анализа экспериментальных данных; показана воспроизводимость результатов в разных условиях экспериментов. Выводы диссертации теоретически и экспериментально обоснованы и соответствуют цели и задачам исследования.

Апробация результатов. Основные положения работы были доложены и обсуждены на 8 российских и 15 международных конференциях в виде устных и стендовых докладов: Международная школа-семинар ГБОУ ВПО КрасГМУ им. проф. В.Ф.Войно-Ясенецкого Минздрава России, 2010 г., г. Красноярск; The Russia 54th ISTC Japan Workshop, 29-30 мая 2010 г., г. Токио (Япония); The Japan-International Workshop, 01-02 июня 2010 г. Ниигата (Япония); The 47th the Japanese Society for Bacteriology Chubu Annual Meeting, 22-23 октября 2010 г., г. Ниигата (Япония); IV международный молодежный медицинский конгресс «Санкт-Петербургские научные чтения – 2011», 7–9 декабря 2011 г. – г. Санкт-Петербург; Научно-практическая конференция молодых ученых и студентов с международным участием ГБОУ ВПО КрасГМУ им. проф. В.Ф.Войно-Ясенецкого Минздрава России, 15 декабря 2011 г., г. Красноярск; XIV Международный конгресс по антимикробной терапии МАКМАХ/ESCMID, 25 мая 2012 г., г. Москва; Международный семинар Российско-Японского центра микробиологии, эпидемиологии, инфекционных заболеваний ГБОУ ВПО КрасГМУ им. проф. В.Ф.Войно-Ясенецкого Минздрава России, 06 июня 2012 г., г. Красноярск; II Всероссийская научная конференция молодых ученых «Проблемы биомедицинской науки третьего тысячелетия», 12 – 14 ноября 2012 г., г. Санкт-Петербург (ФГБУ НИИ экспериментальной медицины СЗО РАМН); 2-я школа-семинар «Поддержка развития внутрироссийской мобильности научных и научно-педагогических кадров путем выполнения научных исследований молодыми учеными и преподавателями в научно-образовательных центрах», Тольяттинский государственный университет, 21 декабря 2012 г., г. Тольятти; I международная школа - семинар «Актуальные вопросы международной интеграции в образовании» ГБОУ ВПО КрасГМУ им. проф. В.Ф.Войно-Ясенецкого Минздрава России, 03 июня 2013 г., г. Красноярск; XV Международный конгресс МАКМАХ/ESCMID по антимикробной терапии", 22-24 мая 2013 г., г. Москва; 53RD Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy (ICAAC 2013), 10-13 сентября 2013 г., г. Денвер (США); The Japan-Russia International Workshop, (National Center for Global Health and Medicine), 26 октября 2013 г., г. Токио (Япония); The Japan-Russia International Workshop (Kyoto University), 30 октября 2013, г. Киото (Япония); Всероссийская научно-практическая конференция "Научно-практические

аспекты современной онкологии", 31 октября 2013 г., г. Красноярск; XVI международный конгресс МАКМАХ по антимикробной терапии, 21-23 мая 2014, г. Москва; Фестиваль "Молодежная наука" ФГБОУ ВО КрасГМУ им. проф. В.Ф.Войно-Ясенецкого Минздрава России, 20 апреля 2015, г. Красноярск; XVII международный конгресс МАКМАХ по антимикробной терапии 20-22 мая 2015 г., г. Москва; XVIII Международный конгресс МАКМАХ по антимикробной терапии 25-27 мая 2016 г., г. Москва; Российско-Японский форум G-MedEx, 8-9 сентября 2016 г., г. Красноярск; Российская научно-практическая конференция "Актуальные проблемы инфекционной патологии (к 90-летию Научно-исследовательского института детских инфекций)", 1-3 марта 2017 г., г. Санкт-Петербург; XIX Международный конгресс МАКМАХ по антимикробной терапии 17-19 мая 2017 г., г. Москва; IV национальный конгресс бактериологов и международный симпозиум "Микроорганизмы и биосфера" MICROBIOS-2018, 12-13 сентября 2018 г., г. Омск. Диссертация обсуждена и одобрена проблемной комиссией «Фундаментальная медицина» Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования "Красноярский государственный медицинский университет имени профессора В.Ф.Войно-Ясенецкого" Министерства здравоохранения Российской Федерации (протокол № 3 от 13 июня 2018 г.).

Личное участие автора в получении результатов

Личный вклад автора заключается в персональном участии при определении темы диссертационного исследования, планировании и выполнении научных исследований, формулировке цели и задач, создании и обосновании дизайна исследования, проведении аналитического обзора литературы, проведении экспериментальной части работы, анализе и систематизации полученных результатов, создании рукописного варианта диссертации, создании и представлении публикаций к печати по основным результатам работы, создании и подаче заявок на получение грантов, государственного задания для проведения запланированных работ. Данная диссертация – это обобщение обработанных статистически данных, полученных автором лично и представленных системно и логически обоснованно. Часть исследований выполнена в соавторстве с научными консультантами д.м.н. С.В. Сидоренко и M.D., Ph.D Т. Ямамото. Отдельные разделы работы выполнены в сотрудничестве с PhD Я. Ивао, к.б.н. О.В. Перьяновой, Н.К. Поткиной, О.Я. Оседко, к.б.н. В.В. Камшиловой, С.В. Яценко, к.м.н. О.В. Тепляковой; к.м.н. А.И. Дробушевской; д.м.н. Д.Э. Здзитовецким, А.И. Мотовой; О.Г. Еремеевой, С.М. Селиным, И.В. Владимировым, к.м.н. И.Т. Решетневой, к.п.н. О.Б. Завьяловой, Н.В. Бахаревой.

Связь работы с научными программами. Исследования выполнены в Федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего образования «Красноярский государственный медицинский университет имени профессора В.Ф. Войно-Ясенецкого» Министерства здравоохранения Российской Федерации в период с 2007 по 2017 гг. Исследования поддержаны грантами и государственными заданиями: два персональных гранта - грант JREX «Young Exchange» для прохождения стажировки в Японии, май-июнь 2010 г. и октябрь 2010 г.; два гранта КГАУ ККФПНиНТД, 2010 г. и 2011 г.; грант ФЦП «Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России на 2007-2012 годы» (мероприятие 1.2 –V очередь); грант ISTC (Международный научно-технический центр) - прохождение стажировки за рубежом в Университете г. Ниигата (Япония), 11.01.2012 - 23.03.2012 г.; грант КГАУ ККФПНиНТД, конкурс социальных и гуманитарных исследований, разработок и инноваций, 2012 г.; грант КГАУ ККФПНиНТД, конкурс индивидуальных проектов молодых ученых, 2012 г.; грант ФЦП «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» на 2009-2013 годы совместно с Тольяттинским государственным университетом, № гос. регистрации 01201281879; грант КГАУ ККФПНиНТД, конкурс по организации участия студентов, аспирантов и молодых ученых во всероссийских, международных и научных мероприятиях, 2013 г.; государственное задание от Министерства образования РФ по теме "Молекулярно-генетические исследования в клинической микробиологии и эпидемиологии", 2012-2015 гг.; грант КГАУ ККФПНиНТД, конкурс авторских коллективов студентов и аспирантов под руководством молодых ученых, 2015 г.; грант КГАУ ККФПНиНТД, конкурс социальных и гуманитарных исследований, разработок и инноваций, 2015 г.; государственное задание Министерства здравоохранения РФ по теме "Молекулярно-генетические основы патогенности и антибиотикорезистентности актуальных нозокомиальных и внебольничных возбудителей гнойно-воспалительных заболеваний различного генеза", 2015-2017 гг. и 2017-2019 гг.

Публикации научных трудов. По теме диссертации опубликовано 59 работ, в том числе 23 статьи в журналах, включенных в «Перечень ведущих рецензируемых научных журналов и изданий, в которых должны быть опубликованы основные научные результаты диссертации на соискание ученой степени доктора и кандидата наук». Получен 1 патент на изобретение.

Объем и структура диссертации. Материалы диссертационной работы изложены на 415 страницах машинописного текста и иллюстрированы 44 таблицами, 58 рисунками. Диссертация состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов, 6 глав

собственных исследований, заключения, выводов, практических рекомендаций, перспективы дальнейшей разработки темы, списка сокращений и списка литературы, включающего 543 источника, из которых 69 – отечественных, 474 – зарубежных авторов.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Обзор литературы (глава 1)

В обзоре литературы представлен анализ опубликованных трудов отечественных и зарубежных ученых по вопросам носительства *S. aureus*, включая MRSA, роли данных микроорганизмов в развитии различных инфекционных заболеваний, диагностики, лечения и профилактики инфекций, вызванных MRSA, определения клональной принадлежности MRSA, изучения молекулярно-генетических особенностей MRSA, исследования структуры генома микроорганизмов, вопросам эволюции MRSA.

Материалы и методы исследования (глава 2)

Объектами исследования в данной работе явились 183 штамма метициллинрезистентных *S. aureus*, выделенные как от здоровых бактерионосителей, так и из патологических материалов больных, находящихся на стационарном лечении в больницах г. Красноярска в период с 2007 по 2017 годы (Рисунок 1, 2). В работе использованы типовые коллекционные штаммы микроорганизмов: 5 референс-штаммов, полученные из Американской коллекции типовых культур (ATCC), 9 штаммов из коллекции International Working Group on SCCmec (IWG-SCC), 11 штаммов из коллекции T. Yamamoto, 3 штамма из коллекции K. Hiramatsu, 4 штамма из коллекции H. de Lancastre. Работа со штаммами микроорганизмов выполнялась в соответствии с санитарно-эпидемиологическими правилами (СП 1.3.2322-08, 2008). Работу проводили в соответствии с биомедицинской этикой согласно требованиям Женевской конвенции о правах человека (1997 г.) и Хельсинской декларации Всемирной медицинской ассоциации (2000 г.) при одобрении локального этического комитета ГБОУ ВПО КрасГМУ им. проф. В.Ф.Войно-Ясенецкого Минздрава России (№ 28/2010).

Микробиологические методы. Выявление частоты встречаемости *S. aureus*, включая MRSA среди здоровых жителей г. Красноярска, Красноярского края и больных с разными нозологиями, и роли MRSA в развитии заболеваний разного генеза осуществляли с помощью бактериологического метода, с забором материала от обследованных и его посевом на питательные среды в соответствии с требованиями. Для культивирования микроорганизмов использовали плотные и жидкие питательные среды. Условия инкубации: температура 35-37 °С, 18-24-48 часов. Выделенные изоляты хранились при -80 °С в низкотемпературном холодильнике (Sanyo, Япония) на среде, содержащей 70 % триптиказо-соевого бульона (Becton Dickinson, США) и 30 % глицерина (Pharm grade

Panreas, Испания), разлитой в пробирки для криоконсервации. Выявление чувствительности к антимикробным химиопрепаратам проводили фенотипическими методами: диско-диффузионным методом; определение чувствительности стафилококков к оксациллину (Sigma-Aldrich, США), цефокситину (OXOID, Великобритания) методом скрининга; МПК для антимикробных химиопрепаратов у стафилококков определяли методом серийных разведений, методом Е-теста; наличие бета-лактамаз расширенного спектра (БЛРС) у грамотрицательных микроорганизмов определяли методом «двойных дисков», методом с дисками от компании MAST, содержащих цефподоксим 10 мг и ингибиторы БЛРС и AmpC на среде Мюллера-Хинтона (Becton Dickinson and Co., Madison, Wis., США); продукцию металло- β -лактамаз (МБЛ) у грамотрицательных микроорганизмов проводили методом инактивации карбапенемов (СІМ).

Молекулярно-генетические и серологические методы. Хромосомную ДНК из штаммов MRSA выделяли кипячением (Маниатис Т., 1984) и с помощью набора реагентов GenElute™ Bacterial Genomic DNA Kits (Sigma-Aldrich, США). Плазмидную ДНК из штаммов MRSA получали с использованием набора Plasmid Midi Kit (QIAGEN Sciences, Токуо) в соответствии с модифицированным методом Kado и Liu (Kado C.I. et al., 1981) с применением лизостафина. РНК из штаммов MRSA выделяли с помощью RNeasy Mini Kit (QIAGEN, Германия). Для выделения тотальной ДНК для полногеномного секвенирования использовали набор PureLink™ Mini (Thermo Fisher Scientific, США). Олигонуклеотидные праймеры были синтезированы в «Синтол» (г. Москва, Россия) и ЗАО «Евроген» (г. Москва, Россия). Дизайн и вычисление температуры отжига праймеров проводились с помощью программ «Primer Premier 5.00», «PyroMark Assay Design 2.0».

Для типирования штаммов использовали гель-электрофорез в пульсирующем поле с применением рестрикционного фермента SmaI (New England BioLabs, Beverly, Mass). MLST типирование проводили в соответствии с международными стандартами (Enright M.C. et al., 2000); после секвенирования очищенного ПЦР-продукта определяли аллельный профиль семи генов «домашнего хозяйства» (<http://www.mlst.net/>). Для *spa* типирования проводили секвенирование очищенного ПЦР-продукта и анализировали на базе eGenomics (<http://tools.egenomics.com/>) или базе Ridom SpaServer (<http://spaserver.ridom.de/>). Типирование *agr* регуляторного гена осуществляли методом ПЦР. Коагулазотипирование (Coa) проводили с использованием стафилококковых антикоагулазных сывороток Coagulase Typing Antisera "SEIKEN" (Denka Seiken, Токуо, Japan). Для определения типа SCCmec в соответствии с рекомендациями международной группы http://www.sccmec.org/Pages/SCC_HomeEN.html использовали ПЦР, мультиплексную ПЦР (Oliveira D.C. et al., 2002; Zhang K, et al. 2005). Выявление 49 генов

вирулентности и 22 генов антибиотикорезистентности осуществляли методом ПЦР (в случае необходимости секвенировали).

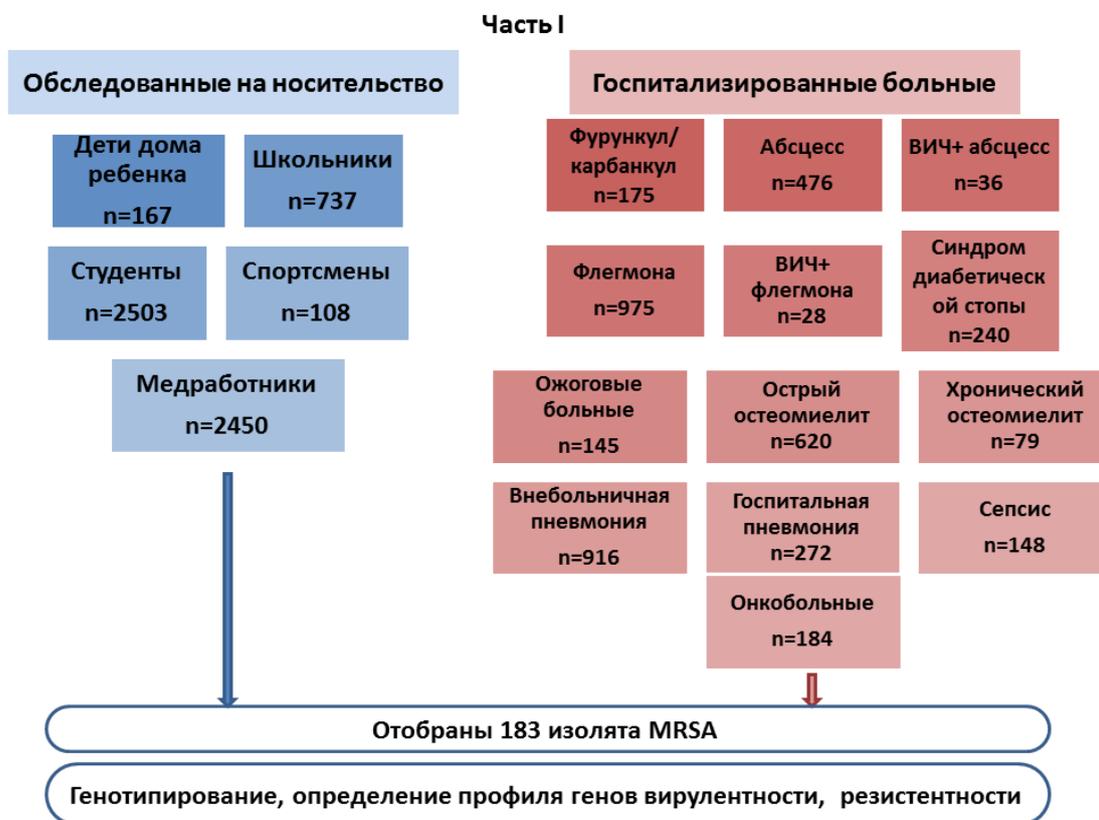


Рисунок 1 - Дизайн блока исследовательской работы – часть I



Рисунок 2 - Дизайн блока исследовательской работы – часть II

Выявление ПЦР-продуктов проводили с применением электрофореза в 1,5% геле с добавлением этидия бромида. Определение молекулярной массы ПЦР-продуктов проводили с использованием 100 п.н. DNA маркера (Sigma-Aldrich Japan, Tokyo).

Выявление уровня продукции факторов вирулентности, а именно токсина TSST-1 осуществляли с помощью реакции латекс-агглютинации с набором TST-RPLA (Denka Seiken); продукцию токсина SEA - реакции латекс-агглютинации с SET-RPLA (Denka Seiken), в соответствии с инструкцией производителя. Уровни экспрессии мРНК генов цитолитических пептидов PSM α и Hld (*psm α* и *hld*), а также генов транскрипционной регуляции (*sarA*, *sarR*, *mgrA*, *saeR*, *saeS*, *sarX*, *rot* и *srrAB*) исследовали методом RT-PCR с набором SuperScript (Invitrogen, США) (Takano T. et al., 2013).

Для определения плазмидного профиля плазмидную ДНК (Plasmid Midi Kit, QIAGEN Sciences, Токио), полученную из штаммов MRSA, анализировали с помощью горизонтального электрофореза в агарозе (0,6-1,0 %). Определяли размеры плазмид с использованием ДНК маркеров (Yamamoto T. et al., 2012). Круговое промежуточное соединение Tn554 выявляли с помощью ПЦР (Higuchi W. et al., 2010). Для проведения трансконъюгации (перенос плазмид, транспозонов, несущих гены антибиотикорезистентности) соединяли штаммы-доноры MRSA со штаммами-реципиентами *S. aureus* RN2677 на мембранных фильтрах, с использованием триптиказо-соевого агара (Difco, Sparks, MD, США), а также на триптиказо-соевом агаре без фильтров и в триптиказо-соевом бульоне (Difco). Гены резистентности донорских штаммов и трансконъюгатов исследовали с помощью ПЦР (Yamamoto T. et al., 1988).

Биоинформационные методы. Полногеномный анализ штамма MRSA OC3, относящегося к варианту ST239, провели пиросеквенированием с помощью системы FLX и программного обеспечения GS *de Novo* Assembler, вариант версии 2.0 (Roche Diagnostics, Branford, CT, USA). Для выявления открытой рамки считывания (*orf*) использовали программное обеспечение MolecularCloning (версия 4.2) (Silico Biology, Yokohama, Япония). Геномные последовательности выравнивали с помощью программного обеспечения ClustalW (версия 2.1). Разрывы между контигами, связанные с мобильными элементами, плазмидами, соединили с помощью ПЦР и секвенирования. Также контиги собирали, используя «удлиняющую» (long-range) ПЦР *in vitro* с помощью набора (Takara Bio, Otsu, Japan). Номера доступа в GenBank для генома OC3 (144 континга) - BVKC01000001-BVKC01000144.

Геном штамма MRSA OC8 исследовали методом секвенирования SMRT PacBio RS II (Pacific Biosciences, Menlo Park, CA, США) с применением P5/C3. Результаты анализировали с помощью программного обеспечения SMRT Analysis v2.3.0/иерархический процесс сборки генома (HGAP) (Chin C.S. et al., 2013). Окончательное конструирование полной кольцевой последовательности генома проводили с помощью ПЦР и секвенирования. В анализе инверсий парные сравнения

между двумя последовательностями генома MRSA выполняли с использованием WebACT (<http://www.webact.org/WebACT/home>). Номер доступа в GenBank для полной кольцевой последовательности генома OC8 - AP017377. Филогенетическое дерево построили с помощью программного обеспечения TreeViewX (версия 0.5.0) (<http://taxonomy.zoology.gla.ac.uk/rod/treeview.html>). Анализ гомологий сделали с применением BLAST (<http://blast.ddbj.nig.ac.jp/top-e.html>) и FASTA (<http://fasta.ddbj.nig.ac.jp/top-j.html>).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В главе 3 представлены результаты выявления частоты встречаемости *S. aureus*, включая MRSA среди здоровых жителей г. Красноярск, Красноярского края и больных с разными нозологиями, а также роль MRSA в развитии заболеваний разного генеза. Уровень носительства *S. aureus* от числа обследованных составил 20,6 % и варьировал от 15 % среди медицинских работников до 42,5 % среди школьников начальных классов. Полученные данные согласуются с общемировыми (Wertheim H.F.L et al., 2005; Witte W., 2009; Брусина Е.Б. и др., 2014). Уровень носительства MRSA от числа обследованных составил 0,3 % и варьировал от 0 % среди школьников и спортсменов, занимающихся контактными видами спорта до 4,2 % среди детей, находящихся в доме ребенка. Полученные данные отражают благополучную эпидемиологическую ситуацию по распространенности внебольничных штаммов MRSA среди здоровых жителей г. Красноярск, Красноярского края, не имевших факторов риска колонизации госпитальными штаммами.

При изучении роли *S. aureus*, включая MRSA в развитии инфекций кожи и мягких тканей установили, что доля *S. aureus* в структуре микрофлоры варьировала от 18,4 % у пациентов с гнойно-некротическими осложнениями синдрома диабетической стопы (в первые 48 часов госпитализации) до 78,1 % у пациентов, госпитализированных с фурункулами/карбункулами (Рисунок 3, 4, 5). У больных с инфекциями кожи и мягких тканей без риска колонизации госпитальными штаммами среди *S. aureus* доля MRSA составила от 8,3 % у пациентов с фурункулами/карбункулами до 21,6 % у больных с флегмонами (Рисунок 3, 4). При сравнении с результатами микробиологического исследования патологических материалов, полученных от пациентов без ВИЧ и от ВИЧ-инфицированных с абсцессами, установили отсутствие достоверных различий в доли MRSA - 16,7 % ($p=1,000$); с флегмонами - установили достоверные различия в доли MRSA – 33,3 % ($p=0,781$). У пациентов с ожогами IIIA, IIIB и IV степенью в г. Красноярске на 10-50 сутки госпитализации отмечено снижение доли *S. aureus* в структуре микрофлоры и достоверное увеличение доли MRSA до 62,2 % ($p<0,001$), что, возможно, связано с

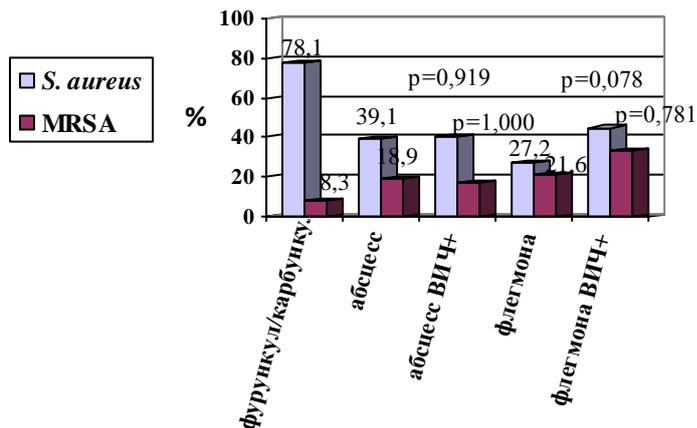


Рисунок 3 - Доля *S. aureus*, MRSA при ИКМТ

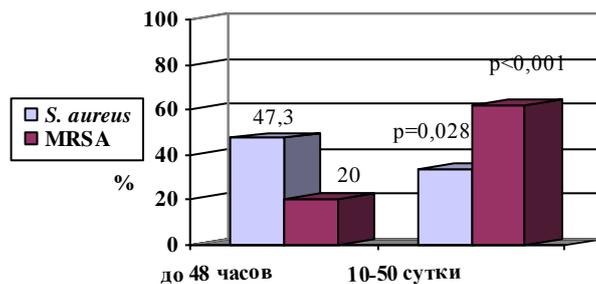


Рисунок 4 - Доля *S. aureus*, MRSA у ожоговых больных в разные сроки госпитализации

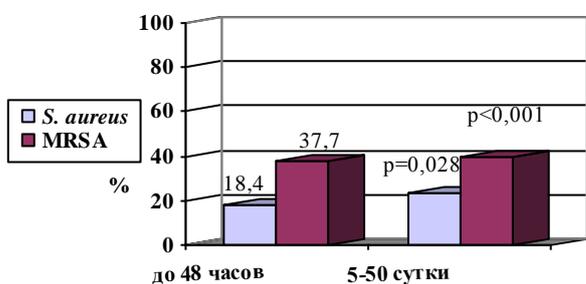


Рисунок 5 - Доля *S. aureus*, MRSA у больных СДС в разные сроки госпитализации

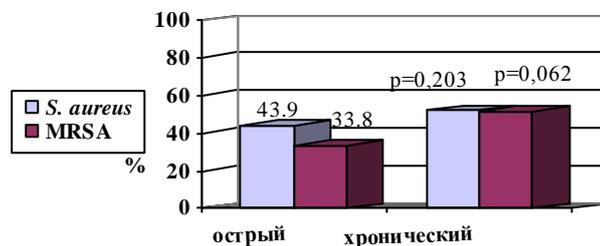


Рисунок 6 - Доля *S. aureus*, MRSA у больных с посттравматическим остеомиелитом

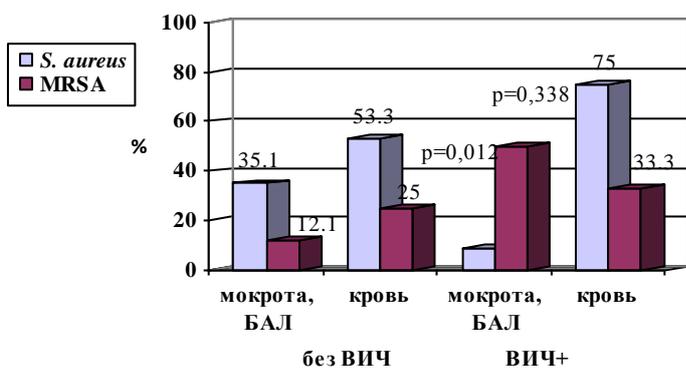


Рисунок 7 - Доля *S. aureus*, MRSA у больных с внебольничной пневмонией

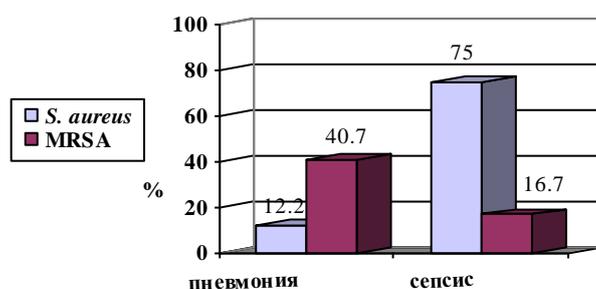


Рисунок 8 - Доля *S. aureus*, MRSA у больных с госпитальной пневмонией и сепсисом

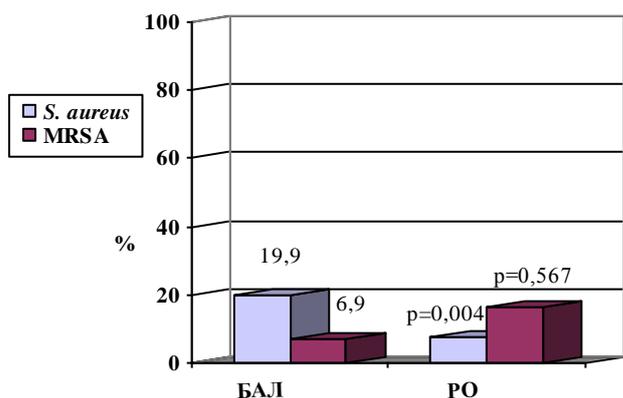


Рисунок 9 - Доля *S. aureus*, MRSA у онкологических больных

присоединением госпитальной микрофлоры (Рисунок 4). У пациентов с гнойно-некротическими осложнениями синдрома диабетической стопы при поступлении в стационары г. Красноярска и при дальнейшем пребывании в стационаре значение *S. aureus*, в том числе MRSA достоверно не менялось ($p=0,142$, $p=0,836$), что возможно связано с наличием долго не заживающих язв и необходимостью частой госпитализации (Рисунок 5). При сравнении роли *S. aureus*, включая MRSA у больных с острым и хроническим посттравматическим остеомиелитом не установлено достоверных различий ($p=0,203$ и $p=0,062$ соответственно) (Рисунок 6). В развитии внебольничной пневмонии у больных г. Красноярска доля *S. aureus* составила 35,1 %, доля MRSA - 12,1 % (Рисунок 7), что возможно связано с возрастом пациентов (средний возраст $55,0 \pm 18,6$). При сравнении с ВИЧ-инфицированными, госпитализированными с внебольничной пневмонией, установили, что доля *S. aureus* в составе микрофлоры достоверно ниже ($p=0,012$), доля MRSA достоверно не отличается ($p=0,338$). Установлено, что у пациентов с госпитальной пневмонией, госпитализированных в ОПИТ крупных стационаров г. Красноярска, доля *S. aureus* - 12,2 %, доля MRSA - 40,7 %, что связано с присоединением госпитальной флоры. У больных с сепсисом, госпитализированных в крупные стационары г. Красноярска, установлен высокий уровень *S. aureus* - 75 %, доля MRSA - 16,7 %. У онкобольных с госпитальной пневмонией, находящихся в ОПИТ в г. Красноярске, доля *S. aureus* в составе микрофлоры составила 19,9 %, доля MRSA - 6,9 %. У онкобольных с послеоперационными осложнениями, госпитализированных в отделение онкоабдоминальной хирургии имени Н.А. Рыкованова в г. Красноярске, доля *S. aureus* - 7,9 % ($p=0,004$), доля MRSA - 16,7 % ($p=0,567$). Таким образом, установлено, что доля MRSA среди госпитализированных больных с внебольничными инфекциями варьировала от 8,3 % у больных с фурункулами/карбункулами до 21,6 % у больных с флегмонами (Рисунок 3, 4, 7). У пациентов с риском колонизации госпитальными штаммами доля MRSA варьировала от 6,9 % у онкобольных до 62,2 % у больных с термическими ожогами на 10-50 сутки госпитализации (Рисунок 3-9).

В главе 4 представлены молекулярно-генетическая характеристика, продукция факторов вирулентности и механизмы резистентности штаммов MRSA, выделенных в г. Красноярске, Красноярском крае. Из выделенных штаммов MRSA 41 % относились к уникальному варианту ST239/spa3(t037)/agr1/SCCmecIII.1.1.2(IIIА)/coaIV/tst+, обозначенных как ST239_{Kras}. Штаммы характеризовались высоким уровнем продукции TSST-1, а также на высоких уровнях экспрессировали гены *psma* и *hld*, регуляторные гены *sarR*, *mgrA*, *saeR*, *saeS*, *sarX*, *rot* и *srrAB* (Таблица 1, Рисунок 10). Штаммы ST239_{Kras} относились к MDR, характеризовались резистентностью к аминогликозидам (ген *aacA*-

aphD в транспозоне Tn4001, *aadD* в плазмиде pSK41 вместе с геном *ble*), макролидам, линкозамидам (гены *ermA* в транспозоне Tn554), тетрациклинам (ген *tetM* в транспозоне Tn5801), фторхинолонам (мутации в генах *GyrA*, *GrlA*), хлорамфениколу (ген *cat* в плазмиде Cpr), рифампицину (мутации в гене *rpoB*), сульфаметоксазол/триметоприму, ампициллину и пенициллину (ген *blaZ* в транспозоне Tn552), акрифлавины, бензалконию хлориду, бензотоний хлориду, хлоргексидину (ген *qacA*) и кадмию (ген *cadD*). Штаммы ST239_{Kras} характеризовались высоким уровнем МПК к имипенему и оксациллину. Все выделенные штаммы MRSA ST239_{Kras} были чувствительны к фузидиновой кислоте, ванкомицину, тейкопланину, линезолиду и мупироцину. В анализе данных PFGE выявили несколько расходящихся с основным кластером подкластеров (Рисунок 11). Штаммы ST239_{Kras} были выделены в основном от госпитализированных пациентов – с ИКМТ, в том числе от пациентов с синдромом диабетической стопы, от ожоговых пациентов; от пациентов с острым и хроническим остеомиелитом; от пациентов с госпитальной пневмонией, в том числе с фатальным исходом (например, штаммы OC3, OC8C и OC76); от пациентов с сепсисом; онкологических больных; ВИЧ-инфицированных, госпитализированных с разными нозологиями; от носителей – медицинского персонала стационаров г. Красноярска. Штаммы характеризовались высоким уровнем частоты (10^{-7}) передачи генов антибиотикорезистентности, локализованных в мобильных генетических элементах, что способствует распространению глобальной резистентности.

Из изученных 7,4 % штаммов MRSA относились к классическому варианту глобальной линии ST239 - ST239/*spa3*(t037)/*agr1*/SCCmecIII.1.1.1/*coaIV*/*sea+*; характеризовались антибиотикорезистентностью к макролидам, линкозамидам, сульфаметоксазол/триметоприму. Все штаммы были чувствительны к триметоприму, фузидиновой кислоте, ванкомицину, тейкопланину, линезолиду и мупироцину. Данные штаммы являются достаточно распространенным вариантом HA-MRSA ST239 в России.

Таблица 1 - Молекулярно-генетическая характеристика штаммов MRSA, изолированных от здоровых бактерионосителей и больных с разными нозологиями

| Определяемые характеристики | Результаты типирования штаммов MRSA, n=183 | | | | |
|-----------------------------|---|-----------------------|----------------|-----------------|----------------|
| | ГруппаА | | ГруппаВ | ГруппаС | ГруппаD |
| | A ₁ , n=75 | A ₂ , n=14 | n=90 | n=2 | n=2 |
| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 |
| CC | 239 | 239 | 8 | 12 | 30 |
| ST | 239 | 239 | 8 | 12 | 30 |
| <i>spa</i> | 3 (t037) | 3 (t037) | 1 (t008) | (t156) | 19 (t019) |
| SCCmec | III.1.1.2 (IIIА) | III.1.1.2 (IIIА) | IV.3.1.1 (IVc) | nt ¹ | IV.3.1.1 (IVc) |
| <i>agr</i> | 1 | 1 | 1 | 1 | 3 |

| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 |
|--|---------------|------|-------------------|-------------|--------------|
| <i>coa</i> | IV | IV | III | I, VII | IV |
| Токсины: | | | | | |
| <i>Лейкоцидины</i> | | | | | |
| <i>luk_{PV}SF</i> | - | - | - | - | + |
| <i>lukE-lukD</i> | + | + | + | + | - |
| <i>lukM</i> | - | - | - | - | - |
| <i>Гемолизины</i> | | | | | |
| <i>hla, hlg, hlg-v</i> | + | + | + | + | + |
| <i>hlb (split)</i> | (+) | (+) | (+) | (+) | - |
| <i>Пептидные цитоллизины</i> | | | | | |
| <i>psma, hld</i> | + | + | + | + | + |
| <i>Энтеротоксины</i> | | | | | |
| <i>sea</i> | - | - | + (77/90) | - | - |
| <i>tst</i> | + | + | - | - | 1/2 |
| <i>sel</i> | - | - | - | - | 1/2 |
| <i>sec, sep, seb, sed, see, seh, set</i> | - | - | - | - | - |
| <i>Sap15 (sek, seq)</i> | + | + | - | + | - |
| <i>sej, seu</i> | - | - | - | - | - |
| <i>egc*</i> | - | - | - | - | + |
| <i>Эксфолиатины</i> | | | | | |
| <i>eta, etb, etd</i> | - | - | - | - | - |
| <i>Адгезины:</i> | | | | | |
| <i>c12ag'</i> | + | + | + | + | + |
| <i>cna</i> | + | + | - | + | + |
| <i>bbp</i> | - | - | - | - | + |
| <i>Другие</i> | | | | | |
| <i>АСМЕ (arcA)</i> | - | - | - | - | - |
| <i>ssl</i> | + | + | + | + | + |
| <i>edin</i> | - | - | - | - | - |
| Резистентность | | | | | |
| Имипенем (МПК, мкг/мл) | 32-64 | 16 | 0,125-0,5 | 0,5 | 0,125-0,75 |
| Оксациллин (МПК, мкг/мл) | >128 | 128 | 4-32 | 64 | 4 |
| Ампициллин (МПК, мкг/мл) | 32-64 | 32 | 4-16 | 8 | - |
| Аминогликозиды | 97,3% | 0% | 16,7 % (15/90) | 0% | 0 % |
| Тетрациклины | 98,7% | 100% | 4,4 % (4/90) | 0% | 0 % |
| Макролиды | 97,3% | 100% | 7,8 % (7/90) | 0% | 50 % |
| Линкозамиды | 97,3% | 100% | 1,1 % (1/90) | 0% | 0 % |
| Фторхинолоны | 97,3% | 0% | 91,1 % (82/90) | 0% | 0 % |
| Рифампицин (МПК, мкг/мл) | 97,3% >128 | 0% | 0 % 0,008 | 0% 0,008 | 0 % 0,008 |
| Хлорамфеникол | 94,7% | 0% | 95,6 % (86/90) | 100% | 0 % |
| Сульфаметоксазол/Триметоприм | 96,0% | 100% | 0% | 0% | - |
| Гликопептиды | 0% | 0% | 0% | 0% | 0 % |
| Ванкомицин (МПК, мкг/мл) | 0,5-2 | 2 | 0,5-2 | 0,5 | 2 |
| Оксазолидиноны | 0% | 0% | 0% | 0% | 0 % |
| Мупиноцин | 0% | 0% | 0% | 0% | 0 % |
| Плазмиды (т.п.н.) | 2,9(71/75) | | 2,9(66/90) | 4,5(2/2) | |
| | | | 2,4(5/90) | | |
| | | | 2,5(2/90) | | |
| | | | 25(6/90) | | |
| | | | 27(5/90) | | |

Из изученных штаммов MRSA 49,1 % принадлежали к линии ST8/spa1(t008)/agr1/SCCmecIV.3.1.1/CoaIII/sea+, продуцировали энтеротоксин SEA на высоких уровнях; экспрессировали на высоких уровнях гены *psma* и *hld*, имели гены уклонения от иммунного надзора (*spa*, *ebh*, *map*, *scn*, *sak*, *sbi*, *fnbA* и *fnbB*) (Таблица 1, Рисунок 10). Часть штаммов ST8 резистентны к фторхинолонам (мутации в генах *GyrA*, *GrlA*), хлорамфениколу (ген *cat* в Cpg плазмиде 2,9 т.п.н.), аминогликозидам (16,7 %, *aadD* в плазмиде pSK41 вместе с геном *ble* 25 и 27 т.п.н.), макролидам, линкозамидам (7,8 %, ген *ermC* в плаزمиде pEmr/Clir 2,4 или 2,5 т.п.н.), тетрациклином (4,4 % ген *tetK* в плазмиде), эритромицину и клиндамицину (14,7 % ген *ermC* в плазмиде pEmr/Clir 2,4 или 2,5 т.п.н.), ампициллину и пенициллину (ген *blaZ* в плазмиде 25 т.п.н.). Штаммы ST8_{Kras} имели низкий уровень МПК для имипенема и оксациллина, что согласуется с характеристиками CA-MRSA (Takano T. et al., 2009). У штаммов ST8_{Kras} со схожими результатами PFGE - выделили два подтипа, принадлежащих к одному и тому же клону. Штаммы были выделены от носителей: детей дома ребенка, детей, обследованных на дисбактериоз, студента, медицинских работников; также были выделены от пациентов с ИКМТ, внебольничной пневмонией, в том числе закончившейся фатально (например, штаммы OC8, OC22, OC23 и OC59). Один штамм ST8_{Kras} (OC11) способствовал фатальному исходу у пациента с госпитальной пневмонией. Штаммы ST8_{Kras} были выделены как во внебольничных условиях – от здоровых бактерионосителей, так и от пациентов, не имевших риска колонизации госпитальными штаммами, так и от пациентов, находящихся в стационарах более 48 часов, имевших риск колонизации госпитальной флорой.

Два штамма (1,1 %), относящиеся к ST12/spaNew (t156)/нетипируемый SCCmec, характеризовались устойчивостью к хлорамфениколу (ген *cat* плазмиде 4,5 т.п.н.) были выделены от пациентов с синдромом диабетической стопы после 48 часов пребывания в стационаре.

Два штамма MRSA (1,1 %), выделенные от медицинских работников в 2016 г., относились к PVL позитивным ST30/spa19(t019)/SCCmecIV.3.1.1/coaIV/agr1. Вирулентность штаммов MRSA ST30, выделенных в г. Красноярске, Красноярском крае связана с продукцией PVL, энтеротоксинов, адгезинов, включая Spa и Vbp. Один красноярский PVL позитивный штамм MRSA, помимо резистентности к β-лактамам антибиотикам был устойчив к макролидам. Установлено, что сотрудники проработали санитарками очень короткий период (менее 1 месяца) в кардиологическом отделении и в отделении для больных с острыми отравлениями в одном крупном стационаре г. Красноярска. Одна из сотрудниц приехала из Республики Тыва. При этом ни у одного из

пациентов данного стационара не выявлено распространение подобных штаммов MRSA. Штаммы MRSA ST30 SCCmecIV с вариантами *sra* t012, t018, t019, t021, t030, t043, t318 выделяли в Австралии, Соединенных Штатах, Японии, Латинской Америке, Турции, Египте, Ближнем Востоке, Европе и были названы SWP клон, WA MRSA, USA1100 (David M.Z. et al., 2010). Один внебольничный штамм MRSA ST30 PVL+ был выделен в г. Владивостоке (Baranovich T. et al., 2010).

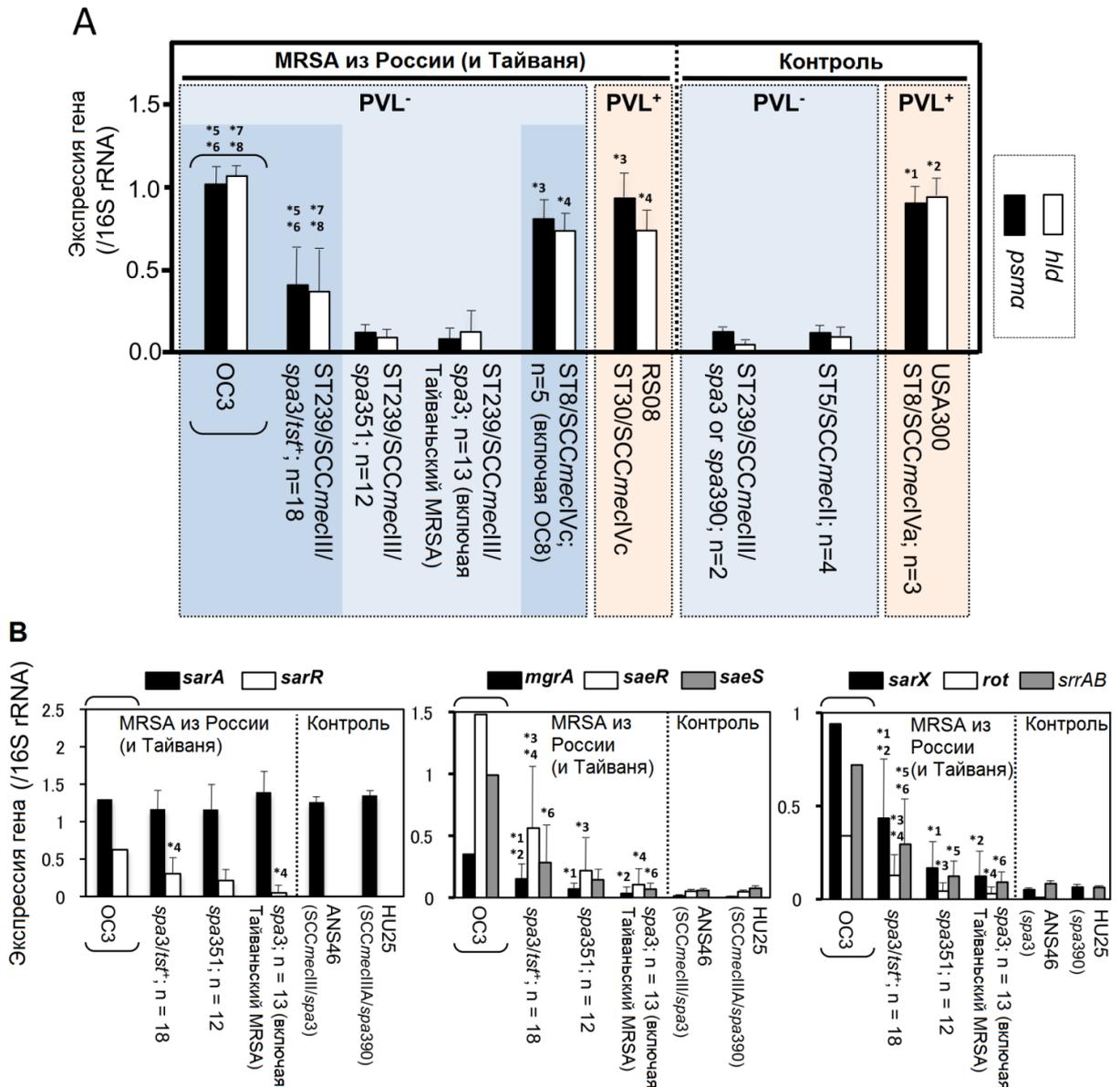


Рисунок 10 - Уровни экспрессии мРНК генов цитолитических пептидов (*psmA* и *hld*) у штаммов ST239_{Kras} и ST8_{Kras} (A) и регуляторных генов в ST239_{Kras} штаммы (B), по сравнению с контрольными штаммами CA- и HA-MRSA и другими штаммами MRSA ST239

Штаммы ST12 и ST30 характеризовались чувствительностью к аминогликозидам, макролидам, тетрациклинам, фторхинолонам, рифампицину, сульфаметоксазол/триметоприму, гликопептидам, оксазолидинонам, мупироцину, фосфомицину, фузидиевой кислоте.

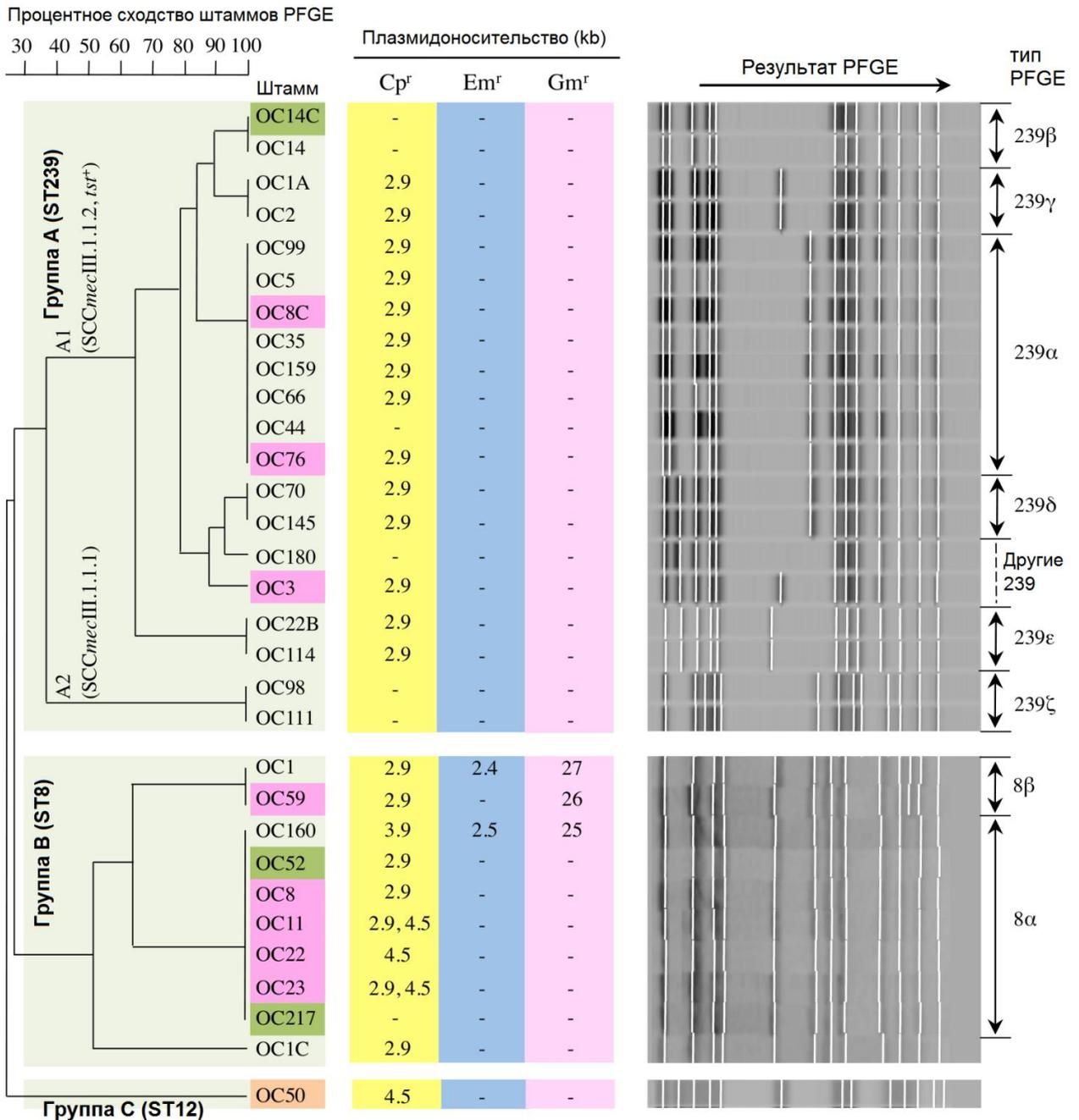


Рисунок 11 - Данные гель-электрофореза в пульсирующем поле (PFGE) и плазмидного профиля штаммов MRSA, изолированных в г. Красноярске. Выделение цветом названия штамма указывает происхождение штамма, например, красным - штаммы, изолированные от пациентов с фатальной пневмонией, коричневым - штаммы, выделенные от пациентов с сепсисом, зеленым - штаммы, выделенные от носителей. Штаммы OC3, OC8C, OC11, OC76 были изолированы от пациентов с фатальной госпитальной пневмонией, тогда как OC8, OC22, OC23 и OC59 были изолированы от пациентов с внебольничной пневмонией. Штаммы OC14C и OC52 были изолированы от медицинских работников, а штамм OC217 - от студента

Среди изученных штаммов MRSA выявлено 10,4 % hVISA с уровнем МПК 2-3 мкг/мл. В 2016 г. от медицинского сотрудника изолирован 1 штамм MRSA, принадлежащий к группе VISA с уровнем МПК 4 мкг/мл.

Таким образом, установлено распространение двух доминантных линий MRSA на территории г. Красноярска, Красноярского края ST239 и ST8. При этом штаммы, относящиеся к линии ST239 являются госпитальными, а штаммы линии ST8 являются внебольничными, но выявлены и в условиях стационара. Минорными генетическими вариантами MRSA, выделенными на территории Красноярского края, являются ST12 и ST30.

Распределение плазмид, несущих гены резистентности к антимикробным препаратам у штаммов MRSA, изолированных в г. Красноярске, является уникальным. В отличие от штаммов MRSA, распространенных в других странах мира (не имеющих плазмиды pCp^f) или штаммов из г. Владивостока (с несколькими плазмидами), многие красноярские штаммы MRSA имели плазмиду pCp^f , несущую гены резистентности к хлорамфениколу, а часть штаммов имели две плазмиды pCp^f (Holden M.T.G. et al., 2010; Diep V.A. et al., 2006; Takano T. et al., 2008; Hung W.C. et al., 2012; Iwao Y. et al., 2012; Yamamoto T. et al., 2012). Плазмиды pCp^f размером 2,9 т.п.н. могут легко передаваться, например, при репликации (Simpson A.E. et al., 2003; Khan S.A., 1997; Berg T. et al., 1998), при конъюгации (Lyon V.R. et al., 1987; Becker E.C. et al., 2012). Особенности структуры плазмиды $pEMg$ и транспозона Tn554 способствуют высокой вероятности горизонтального переноса, подобно плазмиде pCp^f (Yamamoto T. et al., 2012). Штаммы ST239_{Крас} демонстрировали высокий уровень частоты передачи плазмиды pCp^f , имеющей гены резистентности к хлорамфениколу (10^{-7}) (Рисунок 12). Штаммы ST8_{Крас} демонстрировали уровень частоты передачи плазмид резистентности от 10^{-4} до 10^{-8} (Рисунок 12).

В главе 5 представлена структура геномов штаммов - представителей основных клонов MRSA, распространенных в г. Красноярске, Красноярском крае. Изучен геном наиболее распространенного в г. Красноярске клона ST239, штамма OC3, выделенного в г. Красноярске, от ВИЧ-инфицированного 46-летнего мужчины. Размер генома штамма OC3 составил 2,93 млн.п.н., проведенный сравнительный анализ генома штамма OC3 с геномом штамма TW20, также относящегося к линии ST239 свидетельствует о его уникальной структуре (Рисунок 13). Отличительным признаком генома штамма OC3 явилось большое количество копий инсерционных последовательностей IS256 (более 22 копий в геноме), возможно, для регуляции транскрипции и/или регуляции образования факторов вирулентности, в том числе токсинообразования. Идентифицировали гены резистентности: *mecA* в структуре SCCmecIII.1.1.2, *ermA* и *spc* на Tn554, *blaZ* на Tn552/ICE6013, *aacA-aphD* на Tn4001, *tetM* на Tn5801, *cat* на pOC3, *ble* и *aadD* в структуре pSK41, два гена устойчивости к тяжелым металлам: *mer* и *cadA* в структуре SCCmecIII.1.1.2.

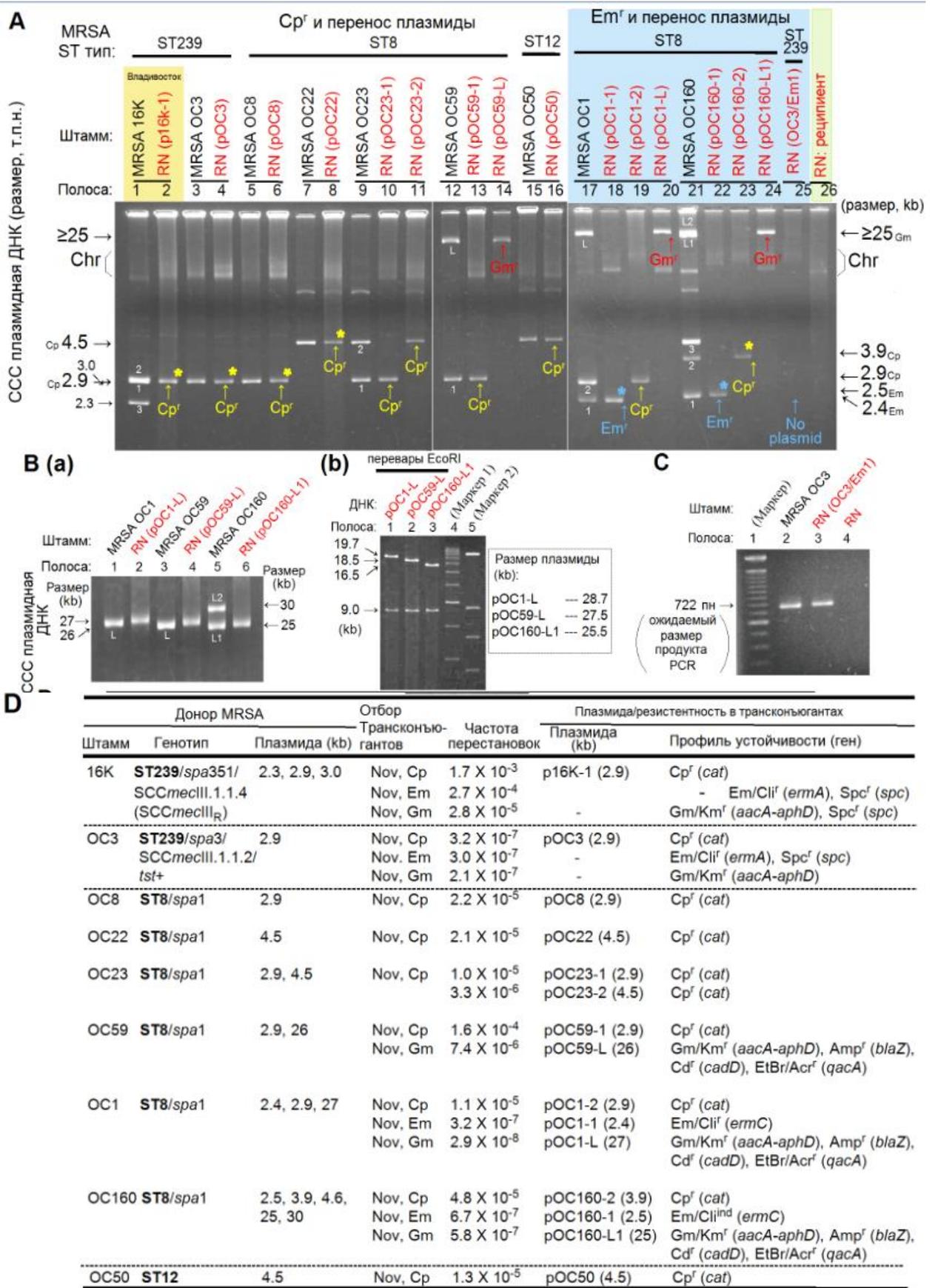


Рисунок 12 - Анализ плазмидного профиля (от А до С) и перенос плазмиды в смешанной бактериальной культуре (D) MRSA из Красноярска, по сравнению со штаммом ST239 MRSA 16K из Владивостока. В; RN, RN2677 (реципиент)

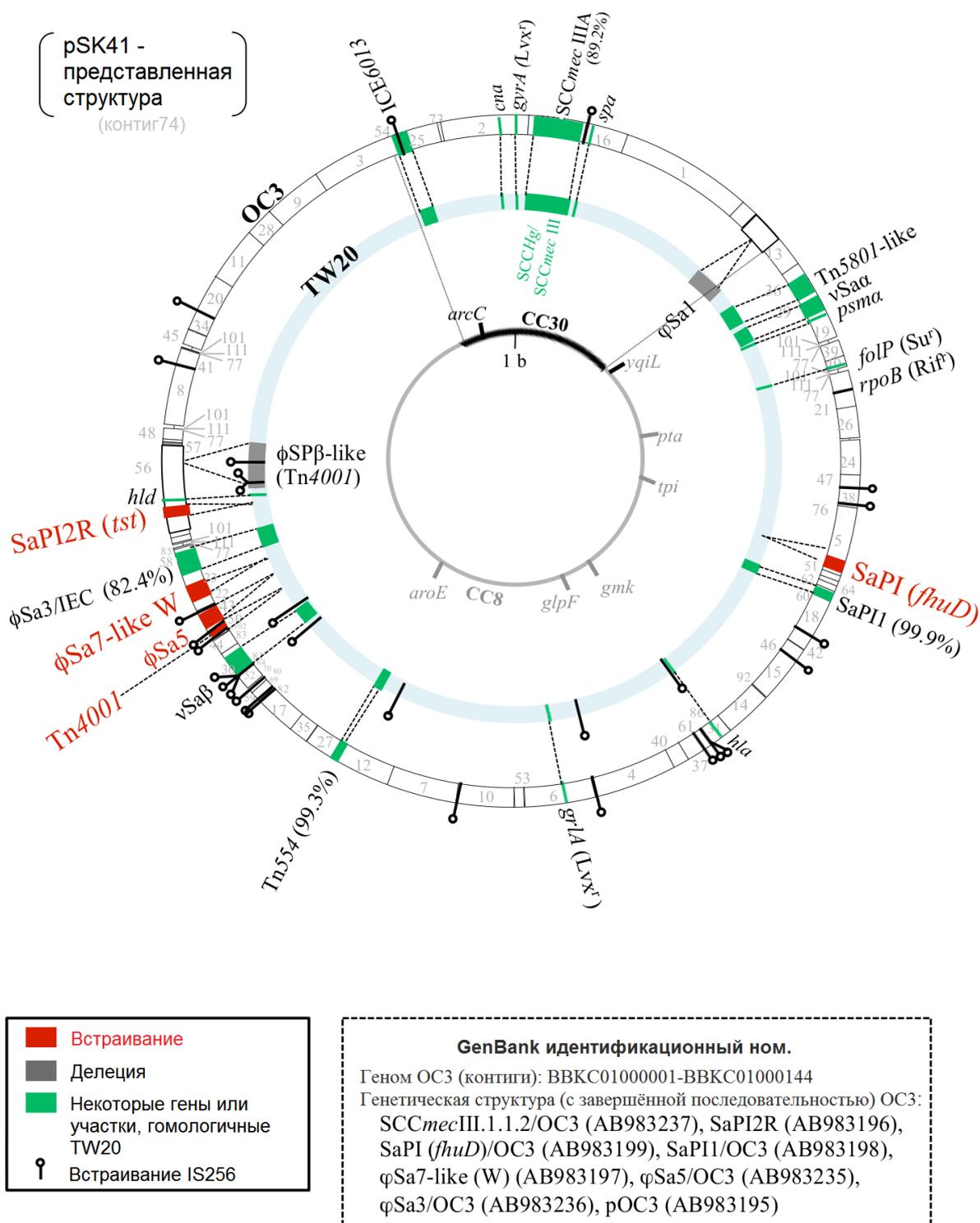


Рисунок 13 - Структура генома штамма MRSA OC3 ST239_{Kras} по сравнению со штаммом MRSA TW20 ST239

Выявили четыре мутации устойчивости к лекарственным средствам: *gyrA* (S84L) и *gylA* (S80F) для левофлоксацина, *rpoB* (H481N, I527M) для рифампицина; *folP*, (F17L, V30I, T31N, M37I, I58V, T59S, V60L, L64M, I101M, V117I, V126I). Выявленные замены в гене *folP*, кодирующем фермент дигидроптеоратсинтетазу (DHPS), вызвали увеличение МПК к сульфаметоксазолу до 512 мкг/мл.

В составе генома выявили три острова патогенности SaPIs: уникальный *tst*+ SaPI2R, SaPI, имеющий ген *fhuD* и SaPI, переносящий гены *sek* и *seq*; профаги: фSa7-like W; фSa5, фSa3; пять транспозонов (Tns): две копии транспозона Tn554; Tn5801-like, транспозон Tn4001, транспозон Tn552; 1 генетическую структуру pSK41; 1 автономную плазмиду pCrg. Уникальный остров патогенности SaPI2R штамма OC3 ST239_{Kras}, имел размер 14819 п.н., фланкированный повторяющимися *att* последовательностями (*attL* и *attR*) протяженностью 20 п.н. (Рисунок 14). У SaPI2R выявили высокую гомологию (91 %) с участком, не имеющим ген *tst* острова патогенности SaPI2 штамма *S. aureus* ATCC25923, а левая боковая *tst* + область SaPI2R обладала высокой гомологией (99 %) с *tst* + SaPI2 штамма RN3984 (Рисунок 14). Хотя структура SaPI2R была схожа со структурой *tst*- SaPI2 штамма ATCC25923, структура SaPI2R заметно отличалась от других *tst* + SaPI. Таким образом, данный остров имел уникальную мозаичную структуру и был назван SaPI2R. Штаммы MRSA ST239, циркулирующие в г. Красноярске, Красноярском крае отличались от штаммов клонального комплекса CC239, распространенных в других городах России и штаммов, распространенных в других странах мира. Полученные данные подтвердили гипотезу о том, что даже в пределах одной линии MRSA и в пределах одной страны изоляты могут иметь отчетливые особенности в процессе динамических эволюционных изменений в течение определенного периода времени.

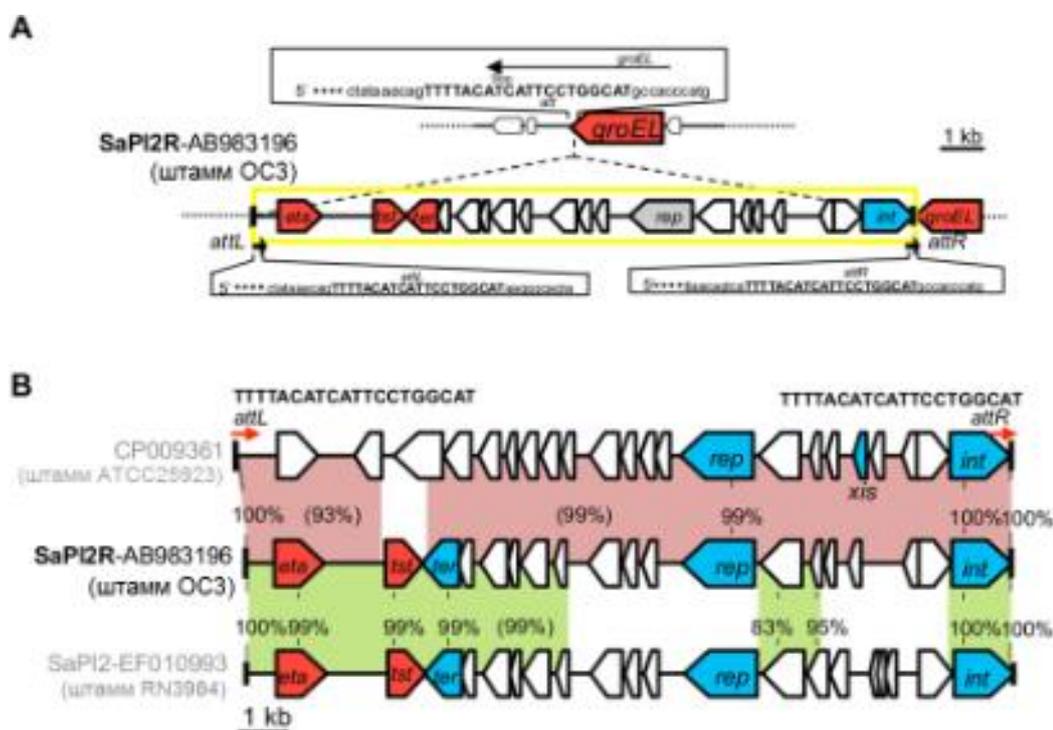


Рисунок 14 - Анализ структуры *tst* + SaPI (SaPI2R) и *tst* нуклеотида и выведенных аминокислотных последовательностей штамма ST239_{Kras} OC3

Штамм OC8 был выделен из мокроты, забранной при поступлении от мальчика, в возрасте один год. Размер генома штамма MRSA OC8 составил 2,9 млн.п.н., степень гомологии данного штамма с коровым участком генома штамма FPR3757 USA300 (номер доступа в GenBank CP000255) составил 99,9 %. Но при этом он имел отличающиеся участки генома, такие как фаги и мобильные генетические элементы (Рисунок 15). Геном штамма OC8 имел плазмиду резистентности к хлорамфениколу (pOC8), не имел транспозонов резистентности к лекарственным средствам. В состав генома штамма OC8 входил ϕ Sa2 типа с 86,5 % гомологией с PVL+ ϕ Sa2 типа (штамм FPR3757 USA300), но не имел гена, кодирующего синтез PVL. Фаг ϕ Sa7 типа не имел генов вирулентности. Фаг ϕ Sa3 типа имел кластер генов ускользания от иммунного надзора (IEC), включающий гены *scn* (стафилококковый ингибитор комплемента, SCIN) и *sak* (стафилокиназа, SAK), а также ген *sea*. В состав генома штамма OC8 входил SaPI6 Δ без генов, кодирующих суперантигены, но отсутствовал SaPI5, несущий гены *sek* и *seq*, который присутствовал у штаммов клона USA300. Также в геноме выявили геномный остров vSA α с вставкой IS256, геномный остров vSA β , геномный остров vSA γ с вставкой IS256. Выявлены гены, кодирующие токсинообразование - *psma*, *hla* (в vSA γ), *sea* (в ϕ Sa3), *hld* и *hlg*. Гены, кодирующие факторы ускользания от иммунного надзора - *cna*, *ebh*, *map*, *scn* и *sak* (в ϕ Sa3), *sbi* и *fnbA,B*; из них ген *ebh* (кодирующий гигантский белок Ebh) имел нонсенс-мутацию. Выявлено 19 копий инсерционных элементов IS256, которые были распределены вдоль всего генома штамма OC8, при этом распределение было не случайным; участки, обогащенные IS256, могут служить рекомбинационными горячими точками. Возможно, наличие большого количества копий IS256 необходимо штаммам, так как это определяет высокий потенциал их трансмиссии, что дает штаммам эпидемиологические преимущества. Элементы IS256 имели гибкие механизмы на стадии интеграции и стадии экстрахромосомной ДНК и выступали в качестве мощного триггера эволюции MRSA. У штамма OC8 впервые выявили самую большую геномную инверсию (MbIN) среди штаммов MRSA, размером 1 млн.п.н., охватывающую 36,0 % от всего генома. Такой геномной инверсии не было выявлено ранее у других штаммов MRSA, включая штамм FPR3757 US300. Это привело к расколу геномного острова vSA β . При этом наличие большой геномной инверсии MbIN является уникальной особенностью, характерной для штаммов ST8, распространенных как на территории г. Красноярск, Красноярского края, так и в других городах России (Рисунок 15). Наличие геномной инверсии MbIN было подтверждено с помощью ПЦР. Инверсии происходят при гомологичной рекомбинации, в которой две генетические структуры с гомологичными последовательностями 300 п.н. или более присутствуют в противоположных ориентациях

(как IR) (Grindley N.D. et al., 2006). Эти геномные инверсии (внутрихромосомная рекомбинация) являются событиями, участвующими в эволюции; гены в перевернутом сегменте являются функциональными, а инверсии могут создавать избирательное преимущество для вирулентности бактерий (Kresse A.U. et al., 2003).

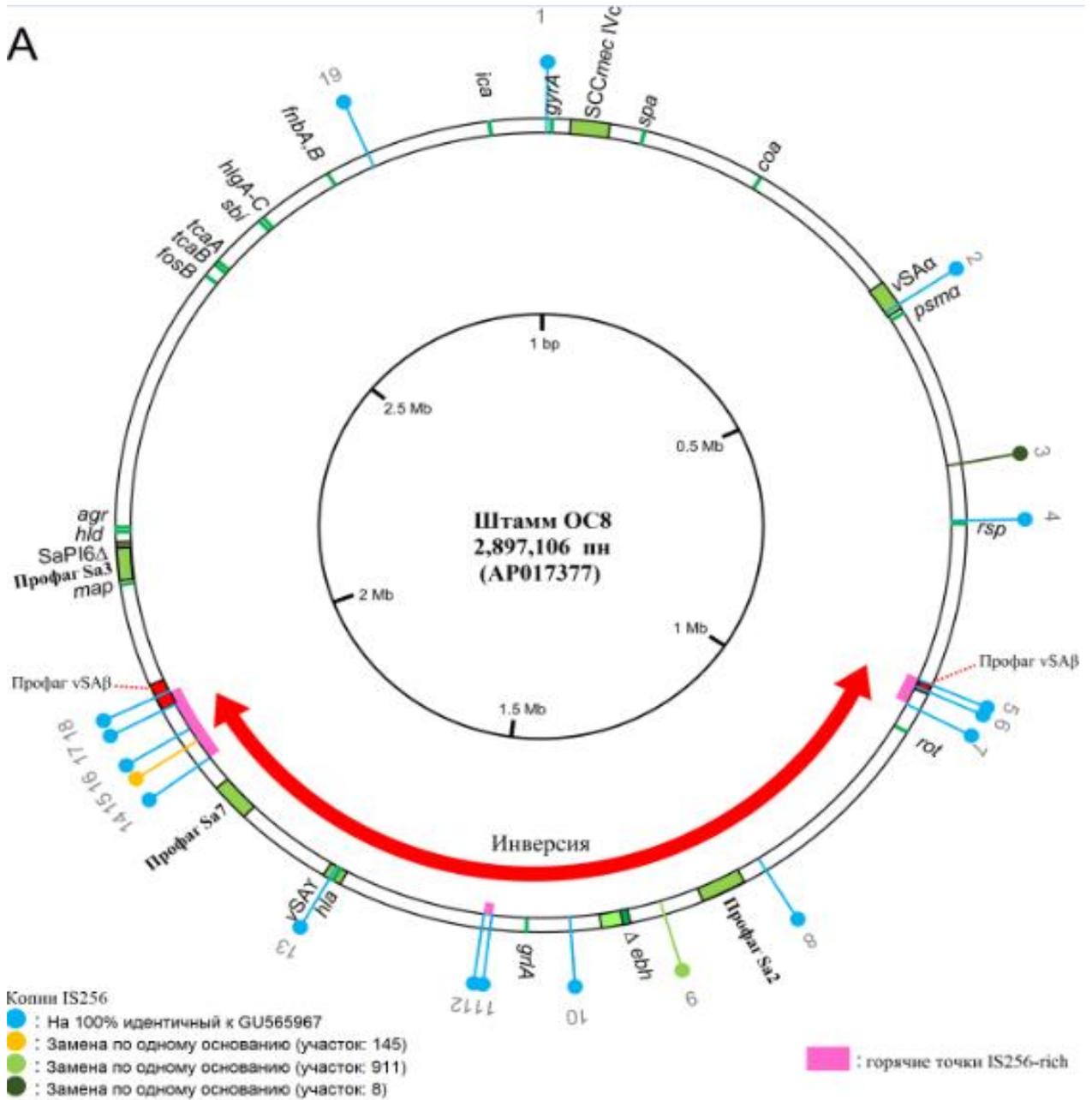


Рисунок 15 - Структура генома штамма MRSA OC8 ST8_{Kras}

Таким образом, у штаммов MRSA обнаружены уникальные особенности структуры генома, которые важны как с позиции повышенного уровня вирулентности штаммов MRSA, так и эволюционных изменений. В России штаммы варианта ST8 имеют большую инверсию MbIN, множество копий IS256, множество факторов вирулентности, что дает

штаммам избирательное преимущество. Вариант ST239 имеет острова патогенности и бактериофаги с уникальной мозаичной структурой, содержащих множество факторов вирулентности и генов резистентности, а также большое количество копий IS256, что определяет высокий уровень вирулентности и антибиотикорезистентности данного генетического варианта.

В главе 6 сопоставили генетические варианты и эволюцию MRSA, распространенных в г. Красноярске, Красноярском крае со штаммами MRSA, распространенными в других регионах России и за рубежом. Штаммы HA-MRSA с генотипом ST239 широко распространены во многих странах мира. Линия CC239 ST239/SCCmecIII является глобальной линией HA-MRSA и состоит из нескольких кладов, названных “Европейский”, “Южно-Американский/Средне-Восточный”, “Евразийский” (ранее «Турецкий»), “Азиатский” (Harris S.R. et al., 2010; Monecke S. et al., 2018). Линия CC239 ST239 SCCmecIII также обозначается как Бразильский клон, Венгерский клон, Венский клон, UK-EMRSA-1, -4, -7, -9 или -11, Ирландский фенотип III, Ирландский AR01, -09, -44 и -23, Австралийский эпидемический MRSA-2 и -3, Канадский MRSA-3 или -6 (Monecke S. et al., 2018). Линия CC239-MRSA-III одна из давно циркулирующих в мире пандемических линий MRSA, ставшая повсеместно распространенной в разных частях мира. Вариант ST239/spa351(t030)/SCCmecIII.1.1.4 распространен в Европейской части России (г. Москва, г. Санкт-Петербург), Зауралье (г. Курган) и в Дальневосточном округе (г. Владивосток). Генетический вариант с новым *spa*, *spaNew* (t632), распространен в Европейской части России (г. Санкт-Петербург). Три основных отличающихся кластера распространены в РФ, а именно большой кластер *spa351*/SCCmecIII.1.1.4 распространен в Дальневосточном округе, большой кластер *spa351-New* (t632)/SCCmecIII.1.1.4 в основном распространен в Зауралье, а также в Дальневосточном округе и большой кластер *spa3*/SCCmecIII.1.1.1-III.1.1.2 распространен в Сибири и Дальневосточном округе (Рисунок 16). Вариант ST239/*spa351*(t030)-*spaNew*(t632)/SCCmecIII.1.1.4 несколько отличается от вариантов, циркулирующих в Европейском/Уральском регионах и в Дальневосточном округе. Вариант ST239_{Kras}, циркулирующий на территории г. Красноярска, Красноярского края, отличается наличием уникального острова патогенности, имеющего в составе ген *tst* от вариантов, циркулирующих в других городах России, а также от штаммов, распространенных в других странах (Рисунок 16). Генетические отличия и сходства по результатам PFGE анализа свидетельствует о том, что штаммы ST239_{Kras} сохранялись и распространялись среди пациентов и носителей (медицинских работников), по крайней мере, с 2007 года. Возможно, эволюционно

ST239_{Kras} возникли на основе Бразильского клона с возможным маршрутом передачи Бразилия - Европа - Россия.

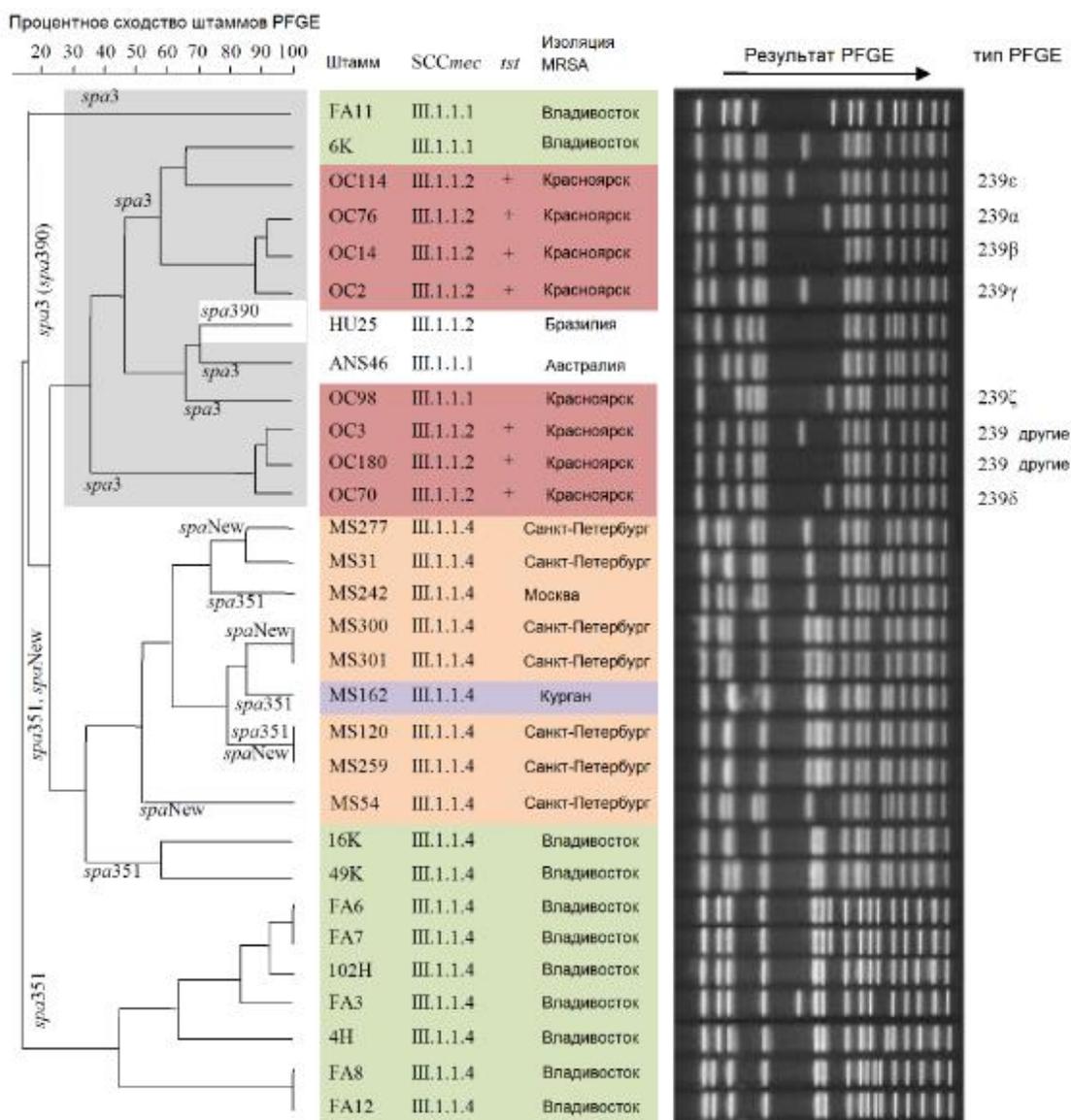


Рисунок 16 - Результаты гель-электрофореза в пульсирующем поле (PFGE) штаммов ST239 MRSA из Европейской части РФ (г. Москва, г. Санкт-Петербург), из Зауралья (г. Курган) и Дальневосточного региона (г. Владивосток) по сравнению с ST239_{Kras}

Одним из наиболее эволюционно конкурентных международных эпидемических клонов является клон ST8, *spa1* (t008), который распространен во всем мире. При этом, распространены как внутрибольничные, так и внебольничные варианты данной клональной линии. К этой генетической линии относится известный внебольничный клон USA-300, распространенный также в стационарах. Штаммы ST8 MRSA распространены на территории РФ, в частности в Сибири и Европейской части России, на Дальнем Востоке. В настоящем исследовании выявили российский вариант линии ST8/SCCmecIV CA-MRSA, имеющий уникальный генетический маркер – большую геномную инверсию MbIN. Такие штаммы широко распространены в Европейской, Сибирской и

Дальневосточной регионах России с географической микроэволюцией, включая типы *sra*, и вызывают не только ИКМТ, но и инвазивные инфекции, такие как пневмония, сепсис, как во внебольничных условиях, так и в условиях стационаров. Глобальное эволюционное происхождение Российских штаммов ST8 еще предстоит выяснить.

Российские штаммы ST8, распространенные в Европейской части и Сибирском регионе РФ, демонстрировали резистентность к левофлоксацину (ципрофлоксацину), обеспечивающую избирательное преимущество, аналогично случаям линии USA300. Резистентность к хлорамфениколу также обеспечивает селективное преимущество российскому варианту ST8. Штаммы линии ST8 сохранялись и распространялись на территории г. Красноярска, Красноярского края, по крайней мере, с 2007 года и относились к уникальному клону MRSA ST8_{Kras} с очень похожими результатами PFGE.

Таким образом, впервые выявили новые региональные варианты линий ST239_{Kras} и ST8_{Kras}, циркулирующие в Сибири (Красноярский край). В российских и международных работах ранее такие штаммы MRSA не были описаны и ранее данные варианты ST239_{Kras} и ST8_{Kras} не выделяли от пациентов с инвазивными инфекциями.

В главе 7 представлены результаты разработки варианта ПЦР для детекции линий ST239 и ST8, распространенных в России. Впервые предложили использовать вариант М-ПЦР с применением разработанных праймеров и условий реакции для быстрой детекции штаммов MRSA линии ST239, распространенных в России. Для этого изучили молекулярно-генетические особенности разных клонов MRSA и установили, что комбинация трех генов (*sea*, *seq*, *cna*) были специфическими для штаммов MRSA линии ST239, распространенных в России. Дополнительно предложили выявлять ген *tecA* для идентификации MRSA и ген *nuc* - для дифференциации *S. aureus* от коагулазонегативных стафилококков (Рисунок 17).

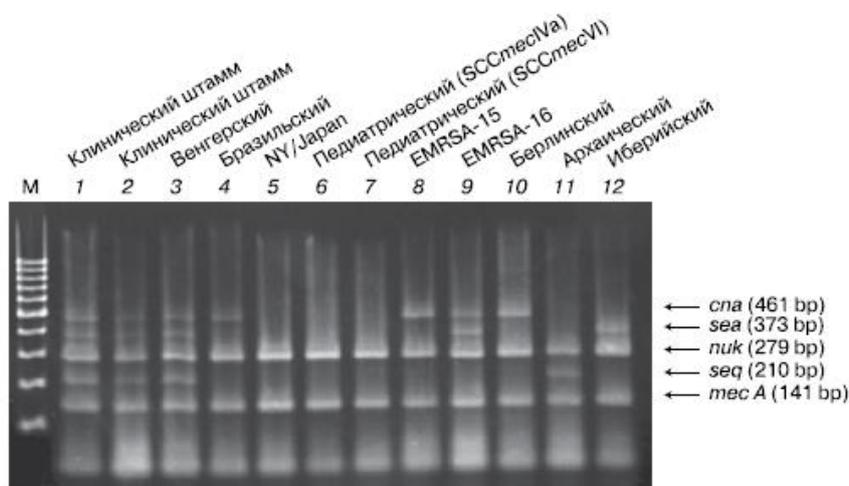


Рисунок 17 – Результаты М-ПЦР для детекции штаммов линии ST239, распространенных в России

В геноме штамма OC8, относящегося к генетической линии ST8, выявили наличие большой инверсии MbIN. Установлено, что наличие MbIN характерно для штаммов, распространенных не только в Красноярском крае, но и в других регионах РФ. Для выявления MbIN сконструировали праймеры и разработали условия ПЦР (Рисунок 19).

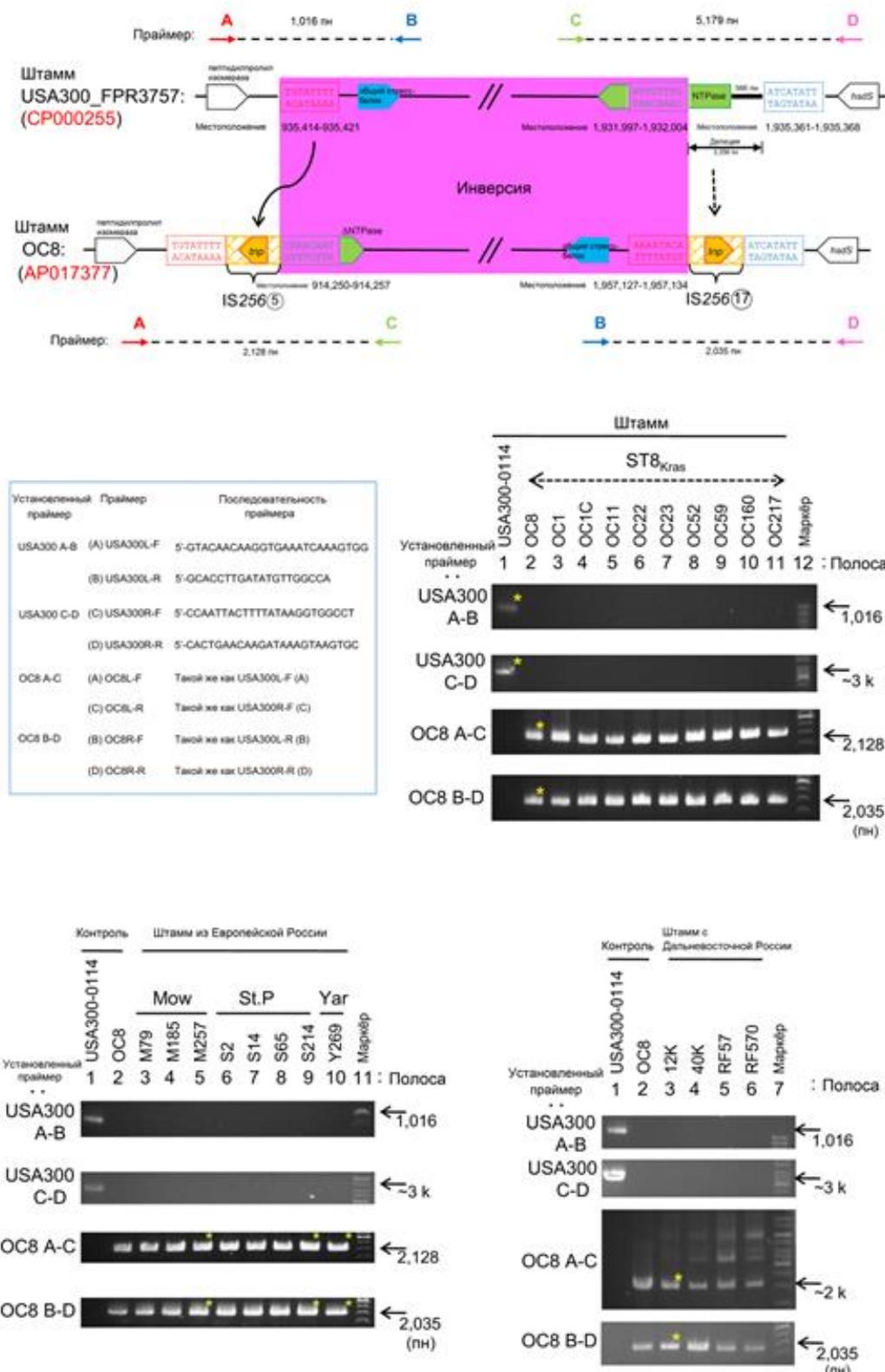


Рисунок 18 – Результаты ПЦР, подтверждающие наличие большой геномной инверсии (MbIN) у штамма OC8 MRSA

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Актуальность изучения особенностей штаммов MRSA, распространенных на территории Красноярского края, РФ и их роли в развитии гнойно-воспалительных заболеваний по-прежнему сохраняется. В результате исследования был выявлен уровень носительства *S. aureus*, MRSA среди жителей г. Красноярска, Красноярского края. Установлена роль *S. aureus*, MRSA в развитии гнойно-воспалительных заболеваний разного генеза.

Впервые установили распространение на территории г. Красноярска, Красноярского края клона HA-MRSA ST239-III-t037 (ST239_{Kras}). Наиболее распространенными клонами CA-MRSA в Красноярском крае были ST8-IV-t008 (ST8_{Kras}), циркулирующими и в условиях стационаров. Широко распространены штаммами ST239_{Kras} были MDR, а штаммы ST8_{Kras} характеризовались меньшим профилем антибиотикорезистентности. Штаммы ST239_{Kras} и ST8_{Kras} способствовали развитию фатальных случаев госпитальной и внебольничной пневмоний, сопровождающихся бактериемией. Предположили, что фатальные случаи госпитальной пневмонии, вызванной ST239_{Kras}, обусловлены уникальной комбинацией TSST-1, высокой экспрессией PSM α /Hld, Hla, SEK/SEQ, SAK/SCIN и Spa. Сравнительная геномика, основанная на сборке *de novo* и изучения геномной последовательности, позволила впервые выявить уникальные особенности структуры генома представителя линии ST239_{Kras} HA-MRSA. В составе генома выявили уникальный SaPI2R, имеющий в составе ген *tst*, остров патогенности SaPI, имеющий ген *fhuD* с мозаичной структурой и более 22 копий IS256. Установлен высокий уровень передачи мобильных генетических элементов, несущих гены резистентности у штаммов линии ST239_{Kras}. Большое количество копий IS256 в геноме у штаммов ST239_{Kras}, возможно, связано с их участием в регуляции транскрипции. Штаммы MRSA ST239, циркулирующие в г. Красноярске, Красноярском крае, отличаются от штаммов клонального комплекса CC239, распространенных в других городах России и штаммов распространенных в других странах мира. Полученные данные подтвердили гипотезу о том, что даже в пределах одной линии MRSA и в пределах одной страны изоляты могут иметь отличительные особенности, сформировавшиеся в процессе динамических эволюционных изменений в течение определенного периода времени. Штаммы ST239_{Kras} имели мобильные генетические элементы и демонстрировали уникальные фенотипы вирулентности. Плазмиды резистентности обеспечивают широкое распространение антибиотикорезистентности среди штаммов MRSA. Поэтому ST239_{Kras} представляли собой новый клад линии ST239, который был создан посредством

ступенчатой эволюции во время возможной трансмиссии между Бразилией, Европой и Россией.

У штаммов ST8-IV MRSA циркулирующих на территории России (включая штамм OC8) имеются множественные факторы вирулентности. Они не имеют PVL и ACME в отличие от штаммов USA300, но имеют ген *sea*, кодирующий продукцию SEA, относящегося к суперантигенам, гены уклонения от иммунного надзора, такие как *sra*, *ebh*, *map*, *scn*, *sak*, *sbi*, *fnbA* и *fnbB*, характеризуются повышенным уровнем экспрессии генов *psma*, *hla*. Фатальные случаи внебольничной пневмонии, вызванной ST8_{Kras}, обусловлены комбинацией SEA, высокой экспрессией PSM α /Hld, Hla и SAK/SCIN. Впервые установили уникальную особенность структуры генома представителя линии ST8_{Kras} CA-MRSA. Выявили самую большую геномную инверсию MbIN протяженностью 1 млн.п.н., что привело к расколу геномного острова vSA β . При этом наличие большой геномной инверсии MbIN является уникальной особенностью, характерной для штаммов ST8-IV, распространенных как в г. Красноярске, так и в других городах России. Результаты настоящего исследования также показывают, что для большой геномной инверсии (MbIN), в дополнение к наличию IR длинных гомологичных последовательностей, необходим дополнительный фактор, а именно обогащенные IS256 горячие рекомбинационные точки. В геноме штаммов линии ST8 MRSA, распространенных в г. Красноярске и других городах России, выявили множество копий IS256. Множество копий элемента IS256 влияло на регуляцию генов вирулентности, например, одна копия элемента IS256 была расположена 521 п.н. выше гена *rsp* (ген регулятор транскрипции из семейства AraC), что определило регуляцию генов вирулентности. Элементы IS256 имели гибкие механизмы на стадии интеграции и стадии экстрахромосомной ДНК и выступали в качестве мощного триггера эволюции MRSA. Возможно, что наличие большого количества копий IS256 необходимо штаммам, так как благодаря этому штаммы обладают высоким потенциалом трансмиссии и имеют эпидемиологические преимущества. У штамма OC8 ST8-IV MRSA выявили наличие гена *ebh* (кодирует гигантский белок Ebh), который имел преждевременный стоп-кодон и N-концевой сигнальный пептид, что определяло продукцию усеченного белка Ebh (Ebh Δ). Мутация в гене *ebh* является уникальной для штаммов MRSA. Мутации, приводящие к изменению кодирующих белков, сыграли важную роль в повышении вирулентности и резистентности к антимикробным препаратам. Факторы, способствующие успешному клональному распространению штаммов CA-MRSA, включают: способность к адгезии, колонизации и распространению, наличие множественных факторов вирулентности. Эти факторы были выявлены у штаммов ST8_{Kras}.

Таким образом, анализ структуры генома штаммов MRSA выявил различное их происхождение и изменения в пределах линий, дал представление дальнейшей динамики эволюции MRSA, распространенных на территории г. Красноярска, Красноярского края и РФ. Доступность технологии секвенирования следующего поколения в более широких масштабах еще больше повысит понимание особенностей широко распространенных MRSA с множественной лекарственной устойчивостью и позволит усилить контроль противоэпидемических мероприятий и профилактику инфекций.

Таким образом, в России выявили два основных клона MRSA, у которых обнаружены уникальные особенности структуры генома. Такие особенности важны как с позиции повышенного уровня вирулентности штаммов MRSA, так и эволюционных изменений. Полученные данные позволяют идентифицировать новые молекулы-мишени для дифференциации изолятов MRSA, относящихся к разным генетическим вариантам.

В ходе проведения исследований молекулярно-генетических особенностей штаммов MRSA, распространенных на территории г. Красноярска, Красноярского края, был предложен метод М-ПЦР и ПЦР для детекции штаммов MRSA, относящихся к генетическим вариантам ST239_{Kras} и ST8_{Kras}, который может быть применим для использования в обычной диагностической лаборатории. Этот метод также позволит быстро обнаруживать ключевые факторы вирулентности, такие как SEA, SEQ, ген *spa*, связанные с развитием MRSA инфекций. Однако предложенные методики не позволяют выявить принадлежность штаммов MRSA к другим генетическим вариантам. Таким образом, предложенные ускоренные методы выявления основных генетических вариантов MRSA позволяют с новых позиций подойти к совершенствованию лабораторной диагностики, лечению и профилактики инфекций, вызванных MRSA и расширят возможности практических лабораторий по выявлению возбудителей этих заболеваний.

Подводя итог диссертационной работы, считаем возможным заключить, что получены новые данные о молекулярно-генетических особенностях нозокомиальных и внебольничных MRSA и их роли в развитии инфекционных заболеваний различного генеза, которые можно квалифицировать как научное достижение, имеющее важное значение для здравоохранения Российской Федерации.

ВЫВОДЫ

1. Уровень носительства MRSA варьировал от 0,04 % среди студентов до 4,2 % среди детей, находящихся в доме ребенка. Наибольшую роль MRSA играет в развитии внебольничных инфекций у пациентов с флегмонами (21,6 %), с термическими ожогами (20 %), с абсцессами (18,9 %), а также у пациентов с тяжелой внебольничной пневмонией (при исследовании крови – 25 %). Наибольшую роль MRSA играет в развитии инфекций,

связанных с оказанием медицинской помощи у пациентов с ожогами (10-50-е сутки госпитализации – 62,2 %), с хроническим остеомиелитом (51,4 %), ВИЧ-инфицированных с пневмонией (50 %), больных с госпитальной пневмонией (49,7 %), с гнойно-некротическими осложнениями синдрома диабетической стопы (39,7 %).

2. Клональная структура популяции MRSA на территории г. Красноярска, Красноярского края представлена двумя доминирующими линиями ST239, ST8, относящиеся к глобальным и двумя минорными линиями ST30, ST12, также относящиеся к глобальным. Из изученных 41 % штаммов принадлежат к уникальному варианту ST239/spa3(t037)/agr1/SCCmecIII.1.1.2(IIIА)/coaIV/*tst*+, названному ST239_{Крас}. Штаммы ST239_{Крас} выделены от носителей, имевших факторы риска колонизации госпитальными штаммами, от госпитализированных пациентов с ИКМТ, ВИЧ-инфицированных, ожоговых больных (10-50 сутки), онкобольных, больных с остеомиелитом, сепсисом, госпитальной пневмонией. Из изученных 49,1 % штаммов MRSA принадлежат к линии ST8/spa1(t008)/agr1/SCCmecIV.3.1.1/CoaIII/*sea*+, названы ST8_{Крас}. Штаммы ST8_{Крас} выделены от носителей, больных с ИКМТ, внебольничной и госпитальной пневмонией.

3. Штаммы ST239_{Крас} MRSA характеризуются наличием гена *tst* с высоким уровнем продукции TSST-1, а также высоким уровнем экспрессии генов *psma* и *hld*, регуляторных генов *sarR*, *mgrA*, *saeR*, *saeS*, *sarX*, *rot* и *srrAB*. Штаммы ST8_{Крас} MRSA характеризуются наличием гена *sea* с высоким уровнем продукции SEA, а также высоким уровнем экспрессии генов *psma* и *hld*, имеют гены уклонения от иммунного надзора (*spa*, *ebh*, *map*, *scn*, *sak*, *sbi*, *fnbA* и *fnbB*).

4. Штаммы ST239_{Крас} относятся к MDR с высоким уровнем МПК к имипенему и оксациллину, резистентны к аминогликозидам (97,3 % штаммов, *aacA-aphD* в транспозоне Tn4001, *aadD* в плазмиде pSK41), макролидам, линкозамидам (97,3 %, *ermA* в транспозоне Tn554), тетрациклинам (98,7 %, *tetM* в транспозоне Tn5801), фторхинолонам (97,3 %, мутации в генах *GyrA*, *GrlA*), хлорамфениколу (*cat* в плазмиде Cpr), рифампицину (97,3 %, мутации в гене *rpoB*), сульфаметоксазол/триметоприму, к ампициллину и пенициллину (ген *blaZ* в транспозоне Tn552), к акрифлавину, бензалконию хлориду, бензотониум хлориду, хлоргексидину (ген *qacA*) и кадмию (ген *cadD*). Штаммы ST8_{Крас} резистентны к фторхинолонам (91,1 %, мутации в генах *GyrA*, *GrlA*), хлорамфениколу (69,5%, *cat* в плазмиде Cpr), аминогликозидам (16,7 % , *aadD* в плазмиде pSK41), макролидам и линкозамидам (7,8 %, *ermC* в плаزمидах pEmr/Ctir), тетрациклинам (4,4 %, *tetK* в плазмиде), ампициллину и пенициллину (12,6%, *blaZ* в плазмиде). Все штаммы были чувствительны к фузидиновой кислоте, к ванкомицину (10,4 % штаммов hVISA с уровнем МПК 2-3 мкг/мл; 0,5 % VISA с уровнем МПК 4 мкг/мл), тейкопланину, линезолиду и

мупиноцину. Плазмиды рСр^r штаммов ST239_{Kras} демонстрировали высокий уровень частоты передачи - 10^{-7} . Плазмиды штаммов ST8_{Kras} демонстрировали уровень частоты передачи от 10^{-4} до 10^{-8} .

5. Установлена уникальность структуры генома штамма OC3 ST239, размер которого составил 2,93 млн.п.н.; в составе генома впервые выявлены *tst+* SaPI2R и более 22 копий инсерционных элементов IS256. Геном штамма OC8 представителя распространенного клона ST8 имеет уникальную структуру размером 2,88 млн.п.н.; в составе генома, помимо геномных островов, профагов, имеются 19 копий инсерционных элементов IS256; большая геномная инверсия (1 млн.п.н.), ген *ebh*, кодирующий усеченный гигантский белок. Такие особенности структур генома двух наиболее распространенных линий важны как с позиции повышенного уровня вирулентности штаммов MRSA, так и в эволюционных изменениях.

6. Штаммы HA-MRSA с генотипом ST239 являются одной из доминирующих генетических линий в РФ и в мире. Установлено распространение генетического варианта ST239_{Kras} MRSA только на территории г. Красноярска, Красноярского края. Штаммы MRSA с генотипом ST8 широко распространены в мире, в основном как CA-MRSA. В условиях стационаров в России широко распространен вариант ST8/*spa1*(t008)/SCCmecIVc. В г. Красноярске, Красноярском крае вариант ST239_{Kras} распространен как во внебольничных условиях, так и в условиях стационаров.

7. Разработаны и предложены вариант М-ПЦР для детекции принадлежности к варианту ST239 и вариант ПЦР для детекции принадлежности к варианту ST8.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Публикации в изданиях, рекомендованных ВАК Минобрнауки РФ:

1. **Хохлова, О.Е.** Микробиологический мониторинг гнойных осложнений у онкологических больных / **О.Е. Хохлова**, О.В. Перьянова, О.П. Боброва, В.В. Сергеева, А.А. Модестов, О.Г. Еремеева, Н.К. Поткина, Д.Н. Капшук, А.В. Алабушева, Ю.А. Дыхно, Т. Ямамото // **Вопросы онкологии**.- 2018.- Т. 64. - №1. - С. 121-125. (Scopus, РИНЦ; ИФ РИНЦ: 0.459; цит. 0)
2. Ishitobi N. Fatal case of ST8/SCCmecIV community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection in Japan / Ishitobi N., Wan T.W., **Khokhlova O.E.**, Teng L.J., Yamamori Y., Yamamoto T. // **New Microbes and New Infections**. - 2018. - V.26. - P.30-36. (Scopus, Web of Science; ИФ 0,79; цит. 0)
3. Baker, S. Bio-hybridisation of nanobactericidins with cellulose films for effective treatment against members of ESKAPE multi-drug-resistance pathogens / S. Baker, T. Volova, S.V. Prudnikova, A.A. Shumilova, O.V. Perianova, S.M. Zharkov, A. Kuzmin, O. Kondratenka, B. Kiryukhin, I.P. Shidlovskiy, Z.K. Potkina, **O. Khokhlova**, T.I. Lobova // **Applied Nanoscience**.- 2018. - P.1-10. (Web of Science; ИФ 2,951; цит. 0)
4. **Хохлова, О.Е.** Микробиологический мониторинг гнойных осложнений у ожоговых больных и молекулярно-генетические особенности метициллинрезистентных

- Staphylococcus aureus* (MRSA) / **О.Е. Хохлова**, О.В. Перьянова, И.В. Владимиров, В.А. Мацкевич, Н.К. Поткина, Д.Н. Капшук, Л.Н. Копытко, В.В. Гостев, С.В. Сидоренко, Я. Ивао, Т. Ямамото // **Антибиотики и химиотерапия.** - 2017.- Т. 62.- № 9-10. - С. 27-33. (Scopus, Web of Science, РИНЦ; ИФ 0,415; цит. 0)
5. **Хохлова, О.Е.** Молекулярно-генетические особенности метициллин-резистентных *Staphylococcus aureus* (MRSA) - возбудителей гнойно-воспалительных заболеваний у онкологических больных / **О.Е. Хохлова**, О.В. Перьянова, О.П. Боброва, В.В. Сергеева, А.А. Модестов, О.Г. Еремеева, Н.К. Поткина, Д.Н. Капшук, А.В. Алабушева, Т. Ямамото // **Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии.** - 2017. - № 6. - С. 15-20. (Scopus, РИНЦ; ИФ 0,481; цит. 0)
6. Wan, T.W. Genomic comparison between *Staphylococcus aureus* GN strains clinically isolated from a familial infection case: IS1272 transposition through a novel inverted repeat-replacing mechanism / T.W. Wan, W. Higuchi, **О.Е. Khokhlova**, W.C. Hung, Y. Iwao, M. Wakayama, N. Inomata, T. Takano, Y.T. Lyn, O.V. Peryanova, K.K. Kojima, A.B. Salmina, L.J. Teng, T. Yamamoto // **PLoS One.** - 2017. - № 12. - P. 1-29. (Scopus, Web of Science; ИФ 3,54; цит. 0)
7. Gostev, V. Molecular epidemiology and antibiotic resistance of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* circulating in the Russian Federation / V. Gostev, A. Kruglov, O. Kalinogorskaya, O. Dmitrenko, **О.Е. Khokhlova**, T. Yamamoto, Y. Lobzin, I. Ryabchenko, S. Sidorenko // **Infection, Genetics and Evolution.** - 2017. - Vol. 53. - P. 189-194. (Scopus, Web of Science; ИФ 2,26; цит. 5)
8. Wan, T.W. Complete circular genome sequence of successful ST8/SCCmecIV community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (OC8) in Russia: one megabase genomic inversion, IS256s spread, and evolution of Russia ST8-IV / T.W. Wan, **О.Е. Khokhlova**, Y. Iwao, W. Higuchi, W.C. Hung, I.V. Reva, O.A. Singur, V.V. Gostev, S.V. Sidorenko, O.V. Peryanova, A.B. Salmina, G.V. Reva, L.J. Teng, T. Yamamoto // **PLoS One.** - 2016. - № 11. - P. 1-5. (Scopus, Web of Science; ИФ 3,54; цит. 4)
9. Гостев, В.В. Антибиотикорезистентность метициллинорезистентных *Staphylococcus aureus*, циркулирующих в Российской Федерации / В.В. Гостев, О.С. Калиногорская, Л.Н. Попенко, Т.В. Черненькая, З.С. Науменко, Т.М. Ворошилова, Ю.А. Захарова, **О.Е. Хохлова**, А.Н. Круглов, М.Г. Ершова, И.В. Молчанова, С.В. Сидоренко // **Антибиотики и химиотерапия.** - 2015. - Т. 60. - № 1-2. - С. 3-9. (Scopus, Web of Science, РИНЦ; ИФ 0,415; цит. 2)
10. **Khokhlova, О.Е.** Healthcare- and Community-associated Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) and Fatal Pneumonia with Pediatric Deaths in Krasnoyarsk, Siberian Russia: Unique MRSA Multiple Virulence Factors, Genome, and Stepwise Evolution / **О.Е. Khokhlova**, W.C. Hung, T.W. Wan, Y. Iwao, T. Takano, W. Higuchi, S.V. Yachenko, O.V. Terlyakova, V.V. Kamshilova, Y.V. Kotlovsky, A. Nishiyama, I.V. Reva, S.V. Sidorenko, O.V. Peryanova, G.V. Reva, L.J. Teng, A.B. Salmina, T. Yamamoto // **PLoS One.** - 2015. - № 1. - P. 1-30. (Scopus, Web of Science; ИФ 3,54; цит. 19)
11. Гостев, В.В. Оценка чувствительности MRSA к оксациллину, цефокситину, ванкомицину и даптомицину / В.В. Гостев, Л.Н. Попенко, Т.В. Черненькая, З.С. Науменко, Т.М. Ворошилова, Ю.А. Захарова, **О.Е. Хохлова**, А.Н. Круглов, М.Г. Ершова, С.Н. Ангелова, Е.Д. Полетаева, И.В. Молчанова, С.В. Сидоренко // **Антибиотики и химиотерапия.** - 2013. - Т. 58. № 9-10. - С. 13-20. (Scopus, Web of Science, РИНЦ; ИФ 0,415; цит. 0)
12. **Khokhlova, О.Е.** Elderly infection in the community due to ST5/SCCmecII methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (the New York/Japan clone) in Japan: Pantone-Valentine leukocidin-negative necrotizing pneumonia / **О.Е. Khokhlova**, Y. Tomita, W.C. Hung, T. Takano, Y. Iwao, W. Higuchi, A. Nishiyama, I. Reva, T. Yamamoto // **Journal of Microbiology, Immunology and Infection.** - 2015. - Vol. 48. - P. 335-339. (Scopus, Web of Science; ИФ 2,955; цит. 8)

13. 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, W. Higuchi, Y. Iwao, A. Nishiyama, I. Reva, **O.E. Khokhlova**, S. Yabe, K. Ozaki, M. Takano, T. Yamamoto // **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. - 2013. – Vol. 57. - P. 1589-1595. (Scopus, Web of Science; ИФ 5,06; цит. 23)
14. Isobe, H. Recurrence of pelvic abscess from Panton-Valentine leukocidin-positive community-acquired ST30 methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* / H. Isobe, D. Miyasaka, T. Ito, T. Takano, A. Nishiyama, Y. Iwao, **O.E. Khokhlova**, T. Okubo, N. Endo, T. Yamamoto // **Pediatrics International**. - 2013. – Vol. 55. - P. 120-123. (Scopus, Web of Science; ИФ 0,86; цит. 1)
15. Hung, W. Comparative genomics of community-acquired ST59 methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Taiwan: novel mobile resistance structures with IS1216V / W. Hung, T. Takano, W. Higuchi, Y. Iwao, **O.E. Khokhlova**, L. Teng, T. Yamamoto // **PLoS One**. – 2012. – Vol. 7. - P. 1-11. (Scopus, Web of Science; ИФ 4,82; цит. 16)
16. **Хохлова, О.Е.** Роль MRSA в развитии гнойно-воспалительных заболеваний у онкологических больных / **О.Е. Хохлова**, О.В. Перьянова, В.В. Сергеева, Ю.А. Дыхно, О.Г. Еремеева, А.А. Модестов // **Вестник Сибирского государственного аэрокосмического университета имени академика М.Ф. Решетнева**. – 2012. - № 6. - С. 221-223. (БАК; ИФ нет; цит. 0)
17. Ивао, Я. Выявление нового варианта ST239 MRSA – продуцента токсина синдрома токсического шока у ВИЧ-инфицированных пациентов, больных пневмонией / Я. Ивао, **О.Е. Хохлова**, Т. Такано, О.В. Перьянова, А.Б. Салмина, Т. Ямамото, С.В. Яценко, Л.А. Рузаева // **Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия**. – 2011. - Т. 13. - № 4. - С. 346-352. (БАК, РИНЦ; ИФ 1,329; цит. 0)
18. Iwao, Y. Fatal pneumonia in HIV-infected patients from a novel ST239 methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* carrying the toxic shock syndrome toxin-1 gene in Krasnoyarsk, Siberian Russia / Y. Iwao, **O.E. Khokhlova**, T. Takano, H. Isobe, O.V. Peryanova, A.B. Salmina, T. Yamamoto // **Japanese journal of infectious diseases**. - 2012. – Vol. 65. - P. 184-186. (Scopus, Web of Science; ИФ 2,11; цит. 4)
19. Isobe, H. Evolution and virulence of Panton-Valentine leukocidin-positive ST30 methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in the past 30 years in Japan / H. Isobe, T. Takano, A. Nishiyama, W.C. Hung, S. Kuniyuki, Y. Shibuya, I. Reva, S. Yabe, Y. Iwao, W. Higuchi, **O.E. Khokhlova**, T. Okubo, T. Yamamoto // **Biomedical Research**. - 2012. – Vol. 33. - P. 97-109. (Scopus, Web of Science; ИФ 0,61; цит. 15)
20. Iwao, Y. The emerging ST8 methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clone in the community in Japan: associated infections, genetic diversity, and comparative genomics / Y. Iwao, R. Ishii, Y. Tomita, Y. Shibuya, T. Takano, W.C. Hung, W. Higuchi, H. Isobe, A. Nishiyama, M. Yano, T. Matsumoto, K. Ogata, T. Okubo, **O.E. Khokhlova**, T. Yamamoto // **Journal of Infection and Chemotherapy**. - 2012. – Vol. 18. - P. 228-240. (Scopus, Web of Science; ИФ 2,397; цит. 30)
21. **Хохлова, О.Е.** Выявление венгерского пандемического клона MRSA в России / **О.Е. Хохлова**, Ч.Х. Вей, В. Хигучи, Т. Такано, О.В. Перьянова, А.Б. Салмина, Т. Ямамото // **Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия**. - 2011.- Т. 13 - № 2. - С. 188-195. (БАК, РИНЦ; ИФ 1,329; цит. 0)
22. **Хохлова, О.Е.** Роль *S.aureus*, MRSA в развитии инфекций кожи и мягких тканей / **О.Е. Хохлова**, А.И. Дробушевская, О.В. Теплякова, О.В. Перьянова, Ю.С. Винник // **Вестник Сибирского государственного аэрокосмического университета имени академика М.Ф. Решетнёва**. - 2011. - №7. - С. 15-19. (БАК; ИФ нет; цит. 0)
23. **Хохлова, О.Е.** Частота выявления *S. aureus*, MRSA среди различных групп населения / **О.Е. Хохлова**, И.Т. Решетнева, О.В. Перьянова, О.Б. Завьялова // **Вестник**

Сибирского государственного аэрокосмического университета имени академика М.Ф. Решетнёва. – 2011. - №7. - С. 20-23. (ВАК; ИФ нет; цит. 0)

Патенты:

24. Теплякова, О.В. Способ определения функциональной способности фагоцитирующих клеток / О.В. Теплякова, Ю.С. Винник, А.А. Савченко, О.А. Коленчукова, Н.И. Цедрик, О.В. Перьянова, **О.Е. Хохлова**, М.Ю. Юрьева // Патент на изобретение №2445626 от 20.03.2012.

Монографии:

25. Yamamoto T., Pathogens and Infections / T. Yamamoto, T. Wan, I. Reva, Y. Iwao, W. Higuchi, S. Yamamoto, A. Salmina, O. Peryanova, **O. Khokhlova**, I. Protasova, G. Reva, L. Teng // Medical Textbook (vol. 2. 2nd Edition). International Medical Education and Research Center. - Niigata (Japan): WITH Up Co. Ltd. Niigata printing company. - 2017. - 226 p.

Статьи в других изданиях:

26. **Хохлова, О.Е.** Молекулярно-генетические особенности метициллинрезистентных *S. aureus*, выделенных от лиц пенитенциарной системы, инфицированных ВИЧ / **О.Е. Хохлова**, Д.Н. Акушева, О.В. Перьянова, Н.М. Корецкая, О.В. Абарникова, Е.К. Королькова, Ю.Н. Белоусова, О.В. Саламатина, Т.Н. Безручкина, К.М. Князева, И.С. Шогжал, Н.К. Поткина, В.Ф. Элярт, Т. Ямамото // Сибирское медицинское обозрение. - 2018. - №2. - С. 13-18.

27. **Khokhlova, O.E.** Multiplex PCR Assay of the MRSA Hungarian Clone, a Major clone spreading in Asia and Russia / **O.E. Khokhlova**, C.H. Wei, L.J. Teng, O. Razvina, N. Korshunova, O. Peryanova, A. Salmina // Niigata Medical Journal. - 2010. - P. 167-170.

28. Владимиров, И.В. Опыт применения современных раневых покрытий для лечения ожоговых ран / И.В. Владимиров, Д.В. Черданцев, **О.Е. Хохлова**, Д.В. Владимиров, Т.П. Ванюхина // Вестник Клинической больницы. – 2013. - Т. 5. - № 5. - С. 29-31.

29. Теплякова, О.В. Состояние и свойства микрофлоры инфицированного панкреонекроза / О.В. Теплякова, О.В. Перьянова, Ю.С. Винник, **О.Е. Хохлова** // Вестник клуба панкреатологов. - 2012. - № 4. - С. 23-26.

Публикации в сборниках научных и научно-практических конференций:

30. Винник, Ю.С. Анализ результатов мониторинга состава и антибиотикочувствительности микрофлоры инфицированного панкреонекроза / Ю.С. Винник, О.В. Перьянова, О.В. Теплякова, Н.П. Осипова, **О.Е. Хохлова**, А.И. Дробушевская, Е.В. Онзуль // Актуальные вопросы хирургической гастроэнтерологии: сборник трудов Всероссийской конференции, посвященной 100-летию со дня рождения профессора А.А.Русанова. – 2009, г. Санкт-Петербург. - С. 90-92.

31. **Хохлова, О.Е.** Фенотип лекарственной резистентности возбудителей хирургических инфекций кожи и мягких тканей / **О.Е. Хохлова**, О.В. Теплякова, А.И. Дробушевская, А.А. Аверьянов, Д.Н. Пашкова, Т.В. Новикова // Молодой организатор здравоохранения: сборник научных статей, посвященный памяти профессора В.К. Сологуба. – 2010, г. Красноярск. - С. 475-480.

32. Винник, Ю.С. Этиологический состав неосложненных хирургических инфекций кожи и мягких тканей / Ю.С. Винник, О.В. Перьянова, А.И. Дробушевская, **О.Е. Хохлова**, Д.Ю. Лопатин, О.В. Теплякова // Пироговская хирургическая неделя: материалы Всероссийского форума. – 2010, г. Санкт-Петербург. - С. 740.

33. **Khokhlova, O.E.** Molecular characteristics of MRSA from Russia dynamic evolution / **O.E. Khokhlova** // Abstract of Materials of the 47th the Japanese Society for Bacteriology Chubu Annual Meeting. – 2010, Niigata, Japan. - P. 16. – устный доклад.

34. **Khokhlova, O.E.** Molecular characteristics of MRSA isolated in the Krasnoyarsk region / **O.E. Khokhlova**, Y. Iwao, O.Ya. Osedko, S.V. Yachenko, V.V. Kamshilova, T. Yamamoto, Yu.V. Kotlovskiy, O.V. Peryanova // The 54th ISTC Japan Workshop, JRIW. - 2010, Tokyo, Japan. - P. 39. – устный доклад.

35. **Khokhlova, O.E.** Molecular characteristics of MRSA isolated in the Krasnoyarsk region / **O.E. Khokhlova**, Y. Iwao, O.Ya. Osedko, S.V. Yachenko, V.V. Kamshilova, T. Yamamoto, Yu.V. Kotlovskiy, O.V. Peryanova // The 54th ISTC Japan Workshop, JRIW (Part 2). - 2010, Tokyo, Japan. - P. 187-191.
36. Перьянова, О.В. Метод быстрого скрининга венгерского клона MRSA / О.В. Перьянова, **O.E. Хохлова**, Вей-Чун Хунг, В. Хигучи, Т. Такано, А.Б. Салмина, Т. Ямамото // Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. - 2010. - Т. 12. - №2/1. - С.41.
37. **Хохлова, O.E.** Выявление распространения внебольничных метициллинрезистентных *S. aureus* / **O.E. Хохлова**, Я. Ивао, О.В. Перьянова, О.В. Теплякова, А.Н. Дробушевская, С.В. Яценко, Л.А. Рузаева, Т. Ямамото, И.Т. Решетнева // Материалы X съезда Всероссийского научно-практического общества эпидемиологов, микробиологов и паразитологов. – 2012, г. Санкт-Петербург, НИИЭМ имени Пастера. - С. 337-338.
38. **Хохлова O.E.** Молекулярно-генетическая характеристика MRSA / **O.E. Хохлова**, Я. Ивао, О.В. Перьянова, О.В. Теплякова, А.Н. Дробушевская, С.В. Яценко, Л.А. Рузаева, Т. Ямамото // Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. - 2012. - Т. 14. - № 2/1. - С. 54-55. – устный доклад на XIV Международном конгрессе по антимикробной химиотерапии МАКМАХ.
39. **Хохлова, O.E.** Молекулярно-генетические особенности MRSA, циркулирующих на территории г. Красноярск и Красноярского края / **O.E. Хохлова**, Я. Ивао, О.В. Перьянова, С.В. Сидоренко, В.В. Камшилова, О.В. Теплякова, С.В. Яценко, Л.А. Рузаева, Т. Ямамото // Медицинский академический журнал. - 2012. - Т. 12. - №4. - С. 59-61. – устный доклад.
40. **Хохлова, O.E.** Генотипирование штаммов MRSA, выделенных в г. Красноярске / **O.E. Хохлова**, Я. Ивао, О.В. Перьянова, С.В. Сидоренко, В.В. Камшилова, О.В. Теплякова, А.Н. Дробушевская, С.В. Яценко, Л.А. Рузаева, Т. Ямамото // Материалы 2-й научно-практической школы-семинара молодых ученых. – 2012, г. Тольятти, ТГУ. - С. 252-257. – устный доклад.
41. Perianova, O. Extended-spectrum beta-lactamase (ESBL) producing Enterobacteria from patients with cancer of the gastrointestinal tract / O. Perianova, **O.E. Khokhlova**, S.V. Sidorenko, N.K. Potkina, Yu.A. Dykhno, D.V. Gavrilyuk, O.G. Ereemeeva // Abstract of the Japan-Russia International Workshop. – 2013, Tokyo, Japan, IMERC. - P. 27. – устный доклад.
42. **Khokhlova, O.E.** Spread of ST239 and ST8 methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Krasnoyarsk, Russia and their molecular characterization / **O.E. Khokhlova**, Y. Iwao, T. Takano, W-C. Hung, A. Nishiyama, O. Peryanova, S. Sidorenko, S.V. Yashenko, V.V. Kamshilova, Y.V. Kotlovsky, O.V. Teplyakova, I. Reva, A. Salmina, T. Yamamoto // Abstract of the Japan-Russia International Workshop. – 2013, Tokyo, Japan, IMERC. - P.62. – стендовый доклад.
43. **Khokhlova, O.E.** Molecular characterization of MRSA, *H. pylori* and *S. pneumoniae* in Russia / **O.E. Khokhlova**, I. Reva, I. Protasova, W. Hung // Abstract of the Japan-Russia International Workshop. – 2013, Tokyo, Japan, IMERC. - P. 70. – устный доклад.
44. **Хохлова, O.E.** Молекулярно-генетическая характеристика MRSA, выделенных от онкологических больных / **O.E. Хохлова**, Я. Ивао, О.В. Перьянова, Ю.А. Дыхно, Д.В. Гаврилюк, В.В. Сергеева, Н.К. Поткина, О.Г. Еремеева, А.И. Алабушева, Т. Ямамото // Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. - 2013. - Т. 15. - №2/1. - С. 47. – стендовый доклад.
45. Перьянова, О.В. Роль энтеробактерий - продуцентов БЛРС в развитии гнойно-воспалительных осложнений у онкологических больных / О.В. Перьянова, **O.E. Хохлова**, Н.К. Поткина, Ю.А. Дыхно, Д.В. Гаврилюк, О.Г. Еремеева // Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. - 2013. - Т. 15. - №2/1. - С. 34-35. – стендовый доклад.
46. Алабушева, А.В. Этиологическая структура и антибиотикорезистентность актуальных возбудителей гнойно-воспалительных осложнений у онкологических больных

- / А.В. Алабушева, **О.Е. Хохлова**, Т.А. Пирева, О.И. Иванова, М.В. Данжаев // Инфекция и иммунитет. - 2014. - Т. 4. - №1. - С. 50-51. – устный доклад.
47. Перьянова, О.В. Полирезистентные микроорганизмы у онкологических больных в условиях ОРИТ / О.В. Перьянова, **О.Е. Хохлова**, Н.К. Поткина, О.Г. Еремеева, О.П. Боброва, А.В. Алабушева // Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. - 2014. - Т. 16. - №2. - С. 31. – стендовый доклад.
48. Перьянова, О.В. Этиологическая структура и антибиотикорезистентность возбудителей пневмоний у онкологических больных с опухолями желудочно-кишечного тракта / О.В. Перьянова, **О.Е. Хохлова**, А.В. Алабушева, О.Г. Еремеева, О.П. Боброва // Проблемы медицинской микологии. – 2014. – Т. 16. - №2. – С. 112.
49. **Хохлова, О.Е.** ST239 MRSA у ВИЧ-инфицированного пациента г. Красноярска / **О.Е. Хохлова**, Я. Ивао, О.В. Перьянова, Н.К. Поткина, Л.А. Рузаева, С.В. Яценко, Т. Ямамото // Актуальные проблемы ВИЧ-инфекции. Стратегия профилактики передачи ВИЧ от матери ребенку. – 2015, г. Красноярск: Красноярский краевой центр СПИД. - С. 69-70.
50. Перьянова, О.В. Этиологическая структура и антибиотикорезистентность возбудителей пневмоний у онкологических больных / О.В. Перьянова, **О.Е. Хохлова**, Н.К. Поткина, О.Г. Еремеева, О.П. Боброва, А.В. Алабушева // Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. - 2015. - Т. 17. - №2. - С. 39. – стендовый доклад.
51. **Хохлова, О.Е.** Распространение ST239 и ST8 MRSA в Красноярске и их молекулярно-генетическая характеристика / **О.Е. Хохлова**, О.В. Перьянова, Н.К. Поткина, О.В. Теплякова, А.Н. Дробушевская, В.В. Камшилова, С.В. Яценко, Л.А. Рузаева, А.В. Алабушева, Я. Ивао, Т. Ямамото // Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. - 2015. - Т. 17. - №2. - С. 49. – стендовый доклад.
52. **Khokhlova, O.E.** Spread of ST8/SCCmecIV methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Krasnoyarsk, Russia / **O.E. Khokhlova**, O.V. Peryanova, Y. Iwao, N.K. Potkina, V.V. Kamshilova, V.V. Gostev, S.V. Sidorenko, A.B. Salmina, T. Yamamoto // Materials of Wu Lien-Tech Forum & The 3-rd CRICMID. – 2016, Beijing, Harbin, China: Lenovo. - P. 88-89.
53. **Хохлова, О.Е.** Молекулярно-генетические особенности внебольничных метициллинорезистентных *Staphylococcus aureus* / **О.Е. Хохлова**, О.В. Перьянова, Н.К. Поткина, О.И. Зенкина, А.Г. Тарараева, Я. Ивао, Т. Ямамото // Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. - 2016. - Т. 18. - №2. - С. 44. – стендовый доклад.
54. Перьянова, О.В. Структура и антибиотикорезистентность возбудителей гнойно-воспалительных осложнений у онкологических больных / О.В. Перьянова, **О.Е. Хохлова**, Н.К. Поткина, О.Г. Еремеева, О.П. Боброва, Л.Н. Копытко, Д.С. Бомбоева // Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. - 2016. - Т. 18. - №2. - С. 34. – стендовый доклад.
55. **Khokhlova, O.E.** Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, isolated from HIV-infected in Krasnoyarsk, Russia / **O.E. Khokhlova**, O.V. Peryanova, Y. Iwao, N.K. Potkina, V.V. Kamshilova, O.V. Abarnikova, V.F. Elyart, D.N. Kapshuk, V.V. Gostev, S.V. Sidorenko, T. Yamamoto // Japan-Russia G-MedEX Project: International Symposium on Educational and Scientific Development. – 2016, Krasnoyarsk: KrasSMU. - P. 16. – устный доклад.
56. Peryanova, O.V. Etiology and antibiotic resistance of main agents in inflammatory complications in cancer patients / O.V. Peryanova, **O.Ye. Khokhlova**, N.K. Potkina, O.G. Eremeeva, O.P. Bobrova, L.N. Kopytko, D.S. Bomboeva, A.A. Modestov // Japan-Russia G-MedEx Project: International Symposium on Educational and Scientific Development. – 2016, Krasnoyarsk: KrasSMU. - P. 25.
57. **Хохлова, О.Е.** Выявление колонизации *Staphylococcus aureus*, MRSA и их молекулярно-генетических особенностей у лиц пенитенциарной системы, инфицированных ВИЧ / **О.Е. Хохлова**, Д.Н. Капшук, О.В. Перьянова, Н.М. Корецкая, О.В. Абарникова, Е.К. Королькова, Ю.Н. Белоусова, Т.Н. Безручкина, К.М. Князева, И.С.

- Шогжал, Н.К. Поткина, В.Ф. Элярт, Т. Ямамото // Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. - 2017. - Т. 19. - С. 38-39. – стендовый доклад.
58. Перьянова, О.В. Микрофлора гнойно-воспалительных осложнений у ожоговых больных / О.В. Перьянова, **О.Е. Хохлова**, Н.К. Поткина, И.В. Владимиров, Л.Н. Копытко, Е.М. Курц, Е.Н. Бочанова, Д.С. Бомбоева, В.А. Мацкевич // Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. - 2017. - Т. 19. - №1. - С. 33. – стендовый доклад.
59. **Хохлова, О.Е.** Механизмы резистентности MRSA, выделенных в г. Красноярске / **О.Е. Хохлова**, О.В. Перьянова, В.В. Гостев, С.В. Сидоренко, Н.К. Поткина, О.В. Теплякова, В.В. Камшилова, Д.Н. Капшук, Я. Ивао, Т. Ямамото // Журнал инфектологии. - 2017. - Т. 9. - №1. - С. 139-140. – устный доклад на Российской научно-практической конференции «Актуальные проблемы инфекционной патологии». – 1-3 марта 2017, г. Санкт-Петербург.

ОСНОВНЫЕ СОКРАЩЕНИЯ

| | | |
|------------------|---|---|
| MRSA | — | метициллинрезистентные <i>S. aureus</i> |
| HA-MRSA | — | MRSA, связанные с оказанием медицинской помощи |
| CA-MRSA | — | внебольничные MRSA |
| LA-MRSA | — | MRSA, связанные с животноводством |
| CC | — | клональный комплекс |
| ST | — | сиквенс тип |
| ПЦР | — | полимеразная цепная реакция |
| <i>sra</i> | — | ген, кодирующий белок А |
| SCCmec | — | стафилококковая хромосомная кассета |
| <i>agr</i> | — | ген, кодирующий регуляторную систему |
| PFGE | — | гель-электрофорез в пульсирующем поле |
| MLST | — | генотипирование по генам «домашнего хозяйства» |
| SMRT | — | метод секвенирования long-read single-molecule real-time |
| М-ПЦР | — | мультиплексная полимеразная цепная реакция |
| МПК | — | минимальная подавляющая концентрация |
| ИКМТ | — | инфекции кожи и мягких тканей |
| hVISA | — | гетерогенная промежуточная категория резистентности к ванкомицину с уровнем МПК 2-4 мкг / мл |
| VISA | — | промежуточная категория резистентности к ванкомицину с уровнем МПК 4-8 мкг / мл |
| т.п.н. | — | тысяч пар нуклеотидов |
| п.н. | — | пара нуклеотидов |
| SaPIs | — | стафилококковые острова патогенности |
| Tn | — | транспозоны |
| IS | — | инсерционные элементы |
| <i>egc</i> | — | кластер генов <i>seg</i> , <i>sei</i> , <i>sem</i> , <i>sen</i> , <i>seo</i> , обеспечивающих синтез энтеротоксинов, |
| <i>c12ag</i> | — | кластер генов <i>icaA</i> , <i>icaD</i> , <i>eno</i> , <i>fnbA</i> , <i>fnbB</i> , <i>ebpS</i> , <i>clfA</i> , <i>clfB</i> , <i>fib</i> , <i>sdrC</i> , <i>sdrD</i> , <i>sdrE</i> , обеспечивающих синтез адгезинов |
| MDR | — | микроорганизмы, резистентные к 3 и более классам антибактериальных препаратов (мультирезистентные) |
| СДС | — | синдром диабетической стопы |
| БАЛ | — | бронхоальвеолярный лаваж |
| pCp ^r | — | плазмиды резистентности к хлорамфениколу |
| MbIN | — | одно миллионная геномная инверсия |