

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Красноярский государственный медицинский университет имени профессора В.Ф.Войно-Ясенецкого» Министерства здравоохранения Российской Федерации

На правах рукописи

Хохлова Ольга Евгеньевна

Молекулярно-генетические особенности нозокомиальных и внебольничных MRSA и их роль в развитии инфекционных заболеваний различного генеза

03.02.03 – микробиология

Диссертация на соискание ученой степени доктора биологических наук

Научные консультанты:

доктор медицинских наук, профессор

Сидоренко Сергей Владимирович

M.D., Ph.D., профессор Ямамото Татсуо

Красноярск – 2018

СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	8
ГЛАВА 1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	26
1.1 Эпидемиология метициллинрезистентных <i>S. aureus</i>	26
1.1.1 Общие сведения об MRSA.....	26
1.1.2 Эпидемиология MRSA. Распространение основных клонов и линий в мире.....	28
1.1.3 Эпидемиология HA-MRSA.....	31
1.1.4 Эпидемиология CA-MRSA.....	39
1.1.5 Эпидемиология LA-MRSA.....	44
1.2 Вирулентность <i>S. aureus</i>	45
1.3 Резистентность MRSA к антимикробным химиопрепаратам....	53
1.4 Особенности структуры генома штаммов MRSA.....	57
1.4.1 Структура стафилококковой хромосомной кассеты SCCmec.....	58
1.4.2 Структура островов патогенности и геномных островов.....	65
1.4.3 Структура плазмид.....	67
1.4.4 Структура IS-последовательностей, транспозонов (Tn).....	69
1.4.5 Структура бактериофагов.....	71
1.5 Определение принадлежности MRSA.....	73
1.6 Генетические методы типирования MRSA, полногеномное секвенирование.....	75
ОСНОВНАЯ ЧАСТЬ.....	84
ГЛАВА 2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ.....	84
2.1 Материалы.....	84
2.1.1 Штаммы микроорганизмов.....	84
2.1.2 Образцы клинического материала. Клинический материал, полученный при обследовании здоровых бактерионосителей и больных с разными нозологиями.....	87

2.2 Методы.....	96
2.2.1 Микробиологические методы исследования.....	96
2.2.1.1 Посев клинического материала, идентификация микроорганизмов.....	96
2.2.1.2 Выявление чувствительности к антимикробным химиопрепаратам.....	98
2.2.2 Молекулярно-биологические и серологические методы.....	100
2.2.2.1 Выделение нуклеиновых кислот.....	100
2.2.2.2 Праймеры.....	101
2.2.2.3 Метод ПЦР для выявления фрагментов генов <i>nuc</i> и <i>mecA</i>	101
2.2.2.4 Генотипирование штаммов MRSA. Гель-электрофорез в пульсирующем поле (PFGE).....	102
2.2.2.5 Молекулярное МЛСТ типирование штаммов MRSA.....	104
2.2.2.6 <i>Spa</i> типирование.....	106
2.2.2.7 Типирование <i>agr</i> регуляторного гена.....	107
2.2.2.8 Коагулазотипирование (Coa).....	108
2.2.2.9 Типирование стафилококковой хромосомной кассеты (SCCmec).....	108
2.2.2.10 Определение генов вирулентности у штаммов MRSA....	110
2.2.2.11 Определение уровня продукции токсинов TSST-1 и SEA у штаммов MRSA.....	114
2.2.2.12 Определение механизмов резистентности к антимикробным препаратам у штаммов MRSA.....	115
2.2.2.13 Определение плазмидного профиля у штаммов MRSA...	117
2.2.2.14 Трансконъюгация штаммов MRSA.....	117
2.2.2.15 Анализ экспрессии мРНК у штаммов MRSA.....	118
2.2.2.16 Геномный анализ.....	119
2.2.2.17 Разработка ПЦР для детекции основных клональных линий MRSA.....	120

2.2.3	Биоинформационные и статистические методы исследования.....	121
	РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ.....	122
	ГЛАВА 3 ВЫЯВЛЕНИЕ ЧАСТОТЫ ВСТРЕЧАЕМОСТИ <i>S. AUREUS</i> , ВКЛЮЧАЯ MRSA СРЕДИ ЗДОРОВЫХ ЖИТЕЛЕЙ Г. КРАСНОЯРСКА, КРАСНОЯРСКОГО КРАЯ И БОЛЬНЫХ С РАЗНЫМИ НОЗОЛОГИЯМИ, И РОЛЬ MRSA В РАЗВИТИИ ЗАБОЛЕВАНИЙ РАЗНОГО ГЕНЕЗА.....	122
3.1	Выявление частоты колонизации <i>S. aureus</i> , включая MRSA среди групп населения, не имеющих риска колонизации госпитальными штаммами.....	122
3.1.1	Выявление частоты колонизации <i>S. aureus</i> , включая MRSA среди детей дома ребенка, школьников.....	122
3.1.2	Выявление частоты колонизации <i>S. aureus</i> , включая MRSA среди спортсменов, студентов.....	127
3.1.3	Выявление частоты колонизации <i>S. aureus</i> , включая MRSA среди медицинских работников.....	132
3.2	Выявление роли MRSA в развитии заболеваний разного генеза	141
3.2.1.	Выявление роли MRSA в развитии первичных неосложненных ИКМТ: фурункула, карбункула, неосложненного абсцесса, флегмоны.....	141
3.2.2	Выявление роли метициллинрезистентных <i>Staphylococcus aureus</i> и их молекулярно-генетических особенностей в развитии гнойно-некротических форм синдрома диабетической стопы.....	150
3.2.3	Выявление роли MRSA в развитии вторичных осложненных ИКМТ – инфицированных ожоговых ран....	162
3.2.4	Выявление роли MRSA в развитии посттравматического	

остеомиелита.....	172
3.2.5 Выявление роли MRSA в развитии внебольничной пневмонии.....	179
3.2.6 Выявление роли MRSA в развитии госпитальной пневмонии.....	189
3.2.7 Выявление роли MRSA в развитии синдрома системного воспалительного ответа.....	197
3.2.8 Выявление роли MRSA в развитии гнойно-воспалительных заболеваний у онкологических больных.....	200
3.2.9 Выявление роли MRSA в развитии гнойно-воспалительных заболеваний у ВИЧ-инфицированных.....	211
ГЛАВА 4 МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА И МЕХАНИЗМЫ РЕЗИСТЕНТНОСТИ ШТАММОВ MRSA, ВЫДЕЛЕННЫХ В Г. КРАСНОЯРСКЕ, КРАСНОЯРСКОМ КРАЕ.....	232
4.1 Молекулярно-генетическая характеристика штаммов MRSA, выделенных в г. Красноярске, Красноярском крае.....	232
4.2 Уровень продукции токсина синдрома токсического шока и энтеротоксина SEА. Уровень экспрессии мРНК генов цитолитических пептидов и регуляторных генов у штаммов MRSA.....	239
4.3 Механизмы резистентности к антимикробным препаратам, плазмидный профиль у штаммов MRSA, изолированных в г. Красноярске.....	244
4.4 Перенос плазмид лекарственной устойчивости у штаммов MRSA, изолированных в г. Красноярске.....	249
ГЛАВА 5 СТРУКТУРА ГЕНОМА ШТАММОВ ПРЕДСТАВИТЕЛЕЙ ОСНОВНЫХ КЛООНОВ MRSA, РАСПРОСТРАНЕННЫХ В Г. КРАСНОЯРСКЕ, КРАСНОЯРСКОМ КРАЕ.....	255

5.1 Структура генома штамма представителя варианта ST239 _{Kras} ...	255
5.1.1 Результаты полногеномного анализа штамма OC3 ST239 _{Kras} , выделенного в г. Красноярске.....	255
5.1.2 Структура SCCmecIII.1.1.2 штамма MRSA OC3 ST239 _{Kras} ...	259
5.1.3 Структура профага φSa7- like W в составе генома штамма OC3 ST239 _{Kras}	264
5.1.4 Структура острова патогенности SaPI2R, имеющего ген <i>tst</i> у штамма OC3 ST239 _{Kras}	266
5.1.5 Структура SaPI1, имеющего гены <i>sek</i> , <i>seq</i> штамма OC3 ST239 _{Kras}	269
5.1.6 Структура SaPI, несущего ген <i>fhuD</i> штамма OC3 ST239 _{Kras} ..	269
5.1.7 Структура φSa3 штамма OC3 ST239 _{Kras} , несущего гены ускользания от иммунного надзора.....	271
5.1.8 Структура бактериофага φSa5 штамма OC3 ST239 _{Kras}	273
5.1.9 Другие генетические структуры.....	273
5.2. Структура генома штамма MRSA OC8 представителя варианта ST8 _{Kras}	274
5.2.1 Результаты полногеномного анализа штамма MRSA OC8 ST8 _{Kras}	274
5.2.2 Положение нескольких копий IS256 в геноме штамма OC8	283
5.2.3 Геномные инверсии и делеции, связанные с IS256.....	286
5.2.4 Детекция и определение положения MbIN у штамма OC8...	290
5.2.5 Выявление протяженной инверсии MbIN, особенностей элементов IS256 среди штаммов одной из распространенных в России линий ST239 HA-MRSA.....	293

ГЛАВА 6 СОПОСТАВЛЕНИЕ ГЕНЕТИЧЕСКИХ ВАРИАНТОВ MRSA И ИХ ЭВОЛЮЦИИ, РАСПРОСТРАНЕННЫХ В Г. КРАСНОЯРСКЕ, КРАСНОЯРСКОМ КРАЕ С MRSA, РАСПРОСТРАНЕННЫМИ В ДРУГИХ РЕГИОНАХ РОССИИ

И ЗА РУБЕЖОМ.....	301
6.1 Сравнение штаммов MRSA ST239 _{Kras} и штаммов ST239 из других регионов России.....	301
6.2 Молекулярные характеристики ST8 MRSA в России.....	304
ГЛАВА 7 РАЗРАБОТКА ВАРИАНТОВ ПЦР ДЛЯ ДЕТЕКЦИИ ЛИНИЙ ST239 И ST8, РАСПРОСТРАНЕННЫХ В РОССИИ.....	315
7.1 Разработка М-ПЦР для определения штаммов MRSA линии ST239, распространенных в России.....	315
7.2 Разработка ПЦР для определения штаммов MRSA линии ST8, распространенных в России.....	321
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	324
ВЫВОДЫ.....	328
ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ.....	331
ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШЕЙ РАЗРАБОТКИ ТЕМЫ.....	332
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ.....	333
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	337

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования.

Staphylococcus aureus - это актуальный возбудитель инфекционных заболеваний. Он является одним из основных патогенов человека, вызывающих значительный уровень заболеваемости и смертности во всем мире [78]. 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 [166, 517]. Так, в США около 20 % взрослого населения являются постоянными носителями *S. aureus*, около 30 % населения периодически колонизируется *S. aureus* [513]. Назальное носительство *S. aureus* у детей значительно выше - от 45 % до 70 % [513]. Колонизация *S. aureus* при определенных условиях приводит к развитию поверхностных и инвазивных инфекций [487]. 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 [307]. В условиях стационаров *S. aureus* вызывает хирургические инфекции и инфекции, связанные с имплантацией (искусственные клапаны сердца, катетеры, протезные суставы и ортопедические имплантаты) [129, 487]. При бактериемии *S. aureus* приводит к возникновению таких инфекций, как эндокардит, остеомиелит и др. [94, 385, 513]. Например, в США в 2014 году зарегистрировано 72444 случая инвазивных инфекций, вызванных MRSA [79]. 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 [312].

Инфекции, вызванные *S. aureus*, имеют также высокую социально-экономическую значимость и являются проблемой здравоохранения как в развитых, так и в развивающихся странах [401]. Особо актуальны инфекции, вызванные штаммами *S. aureus* с множественной устойчивостью к антимикробным химиопрепаратам, такими как метициллинрезистентные и ванкомицинрезистентные *S. aureus* (MRSA и VRSA соответственно) [8, 70, 112]. Количество инфекций, вызванных MRSA в США, составляет в среднем 80000 случаев в год, со смертностью примерно 11000 случаев [79, 295, 344]. Исследования показывают, что общие затраты на лечение MRSA-инфекций на порядок выше, чем на лечение инфекций, вызванных MSSA [105, 207].

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) [11, 82, 201]. Однако с середины 1990-х годов получили распространение инфекции, вызванные эпидемическими амбулаторными штаммами MRSA среди молодых пациентов без предшествующей госпитализации (CA-MRSA) [169, 532]. Позднее возникли инфекции, связанные с животноводством, вызванные LA-MRSA [164]. 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 [371]. 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 [307]. Однако с середины 1990-х годов появились штаммы со сниженной чувствительностью к ванкомицину. В 2002 г. были впервые выделены штаммы, резистентные к ванкомицину [357]. Это послужило стимулом для разработки и внедрения новых анти-MRSA препаратов, таких как оксазолидиноны, глицилциклиды, липопептиды, новые цефалоспорины [307]. Но с момента внедрения их в клиническую практику появились штаммы устойчивые к новым анти-MRSA препаратам [121, 313]. 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 с 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* чаще всего вызваны штаммами, колонизирующими слизистые оболочки или кожу [513]. 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 *sra* типирование, SCCmec типирование, *agr* типирование, ST типирование [533]. 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 [52, 66]. 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 [172, 187, 282, 470].

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 [56]. 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 [99]. 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* [99]. 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*) [99, 124, 396]. Agg типирование, предложенное в 2001 г., широко применяется для эпидемиологического расследования и мониторинга MRSA [366]. Коагулазотипирование также используется в эпидемиологии MRSA, при этом помимо серотипирования, используется амплификация гена *coa*, основанная на применении ПЦР с праймерами, нацеленными на переменную область коагулазной последовательности [366]. В настоящее время наиболее часто для генотипирования штаммов MRSA проводится комплексное генотипирование, включающее SCCmec, *spa* и MLST типирования с целью обеспечения точности результатов [366].

Применение полногеномного секвенирования генома бактериальных агентов ознаменовало прогресс в клинической микробиологии и эпидемиологии [150, 312]. 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 [312]. 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 [137]. 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. Секвенирование третьего поколения в частности SMRT, в отличие от секвенирования второго поколения, позволяет напрямую определять эпигенетику MRSA [95, 371].

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 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. Красноярска 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. Красноярска 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. Красноярска 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. Красноярска, Красноярского края.

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

Получены сведения о генетическом профиле вирулентности и механизмах антибиотикорезистентности штаммов MRSA, выделенных от госпитализированных пациентов и здоровых носителей г. Красноярска, 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. Установлена роль структуры генома данных штаммов в эволюции MRSA и их вирулентности.

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 и практическая значимость.

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 исследования заключается в том, что 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. Красноярска, 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*, 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.

Исследования в рамках диссертационной работы выполнены в период с 2007 по 2017 гг. на базе Российско-Японского центра микробиологии, метагеномики и инфекционных заболеваний, кафедры микробиологии им. доц. Б.М. Зельмановича ФГБОУ ВО КрасГМУ им. проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого Минздрава России, ЦНИЛ ФГБОУ ВО КрасГМУ им. проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого Минздрава России, располагающими всем необходимым оборудованием для выполнения работы.

Основные положения диссертации, выносимые на защиту

1. Установлено, что уровень носительства MRSA среди здоровых жителей г. Красноярска, 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. Красноярске, 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. Красноярска, 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. Красноярска, Красноярского края установлено распространение уникальных вариантов, названных ST239_{Kras} и ST8_{Kras}.

4. Установлено, что штаммы линии ST239, распространенные на территории г. Красноярска, Красноярского, 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. Красноярска, Красноярского края, характеризуются высоким уровнем вирулентности с уровнем частоты передачи генов резистентности от 10^{-4} до 10^{-8} .

5. Обнаружение на территории г. Красноярска, 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. Красноярска, 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 исследования. 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.).

Экспериментальные данные, полученные в ходе выполнения диссертационных исследований, 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.

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. Подбор специфических олигонуклеотидных праймеров для исследования штаммов MRSA, анализ результатов полногеномного секвенирования штаммов MRSA проведен совместно с научным сотрудником Международного медицинского образовательного исследовательского центра (IMERC) Ниигата, Япония, PhD Я. Ивао. В планировании исследований и анализе результатов принимала участие канд. биол. наук, заведующий кафедрой микробиологии им. доц. Б.М. Зельмановича, руководитель Российско-Японского центра микробиологии, метагеномики и инфекционных заболеваний КрасГМУ Перьянова О.В. В проведении бактериологического метода исследования и в определении чувствительности к антимикробным химиопрепаратам принимала участие научный сотрудник Российско-Японского центра микробиологии, метагеномики и инфекционных заболеваний КрасГМУ Поткина Н.К. В проведении секвенирования для МЛСТ типирования принимала участие

старший научный сотрудник Оседко О.Я. В сборе штаммов MRSA от пациентов и здоровых носителей принимали участие: канд. биол. наук врач-бактериолог КГБУЗ «Красноярская межрайонная клиническая больница скорой медицинской помощи им. Н.С.Карповича» Камшилова В.В.; врач-бактериолог КГАУЗ Краевого центра СПИД Ященко С.В. В подборе пациентов и в заборе материала для исследования принимали участие: канд. мед. наук, доцент врач-хирург КГБУЗ «Красноярская межрайонная клиническая больница № 7» Теплякова О.В.; канд. мед. наук врач-хирург КГБУЗ «Красноярская межрайонная клиническая больница № 7» Дробушевская А.И.; д-р мед. наук, доцент врач-хирург хирургического отделения КГБУЗ «Красноярская межрайонная клиническая больница скорой медицинской помощи им. Н.С.Карповича» Здзитовецкий Д.Э.; зав. инфекционным отделением КГБУЗ «Красноярская межрайонная клиническая больница скорой медицинской помощи им. Н.С.Карповича» Упирова А.А. ; клинический фармаколог КГБУЗ «Красноярская межрайонная клиническая больница скорой медицинской помощи им. Н.С.Карповича» А.И. Мотова; зав. отделением анестезиологии-реанимации, врач анестезиолог-реаниматолог КГБУЗ «Красноярский краевой клинический онкологический диспансер имени А.И. Крыжановского» Еремеева О.Г.; зав. отделением онкоабдоминальной хирургии, врач-хирург КГБУЗ «Красноярский краевой клинический онкологический диспансер имени А.И. Крыжановского» Селин С.М.; врач-фармаколог КГБУЗ «Красноярский краевой клинический онкологический диспансер имени А.И. Крыжановского» Боброва О.П.; врач-хирург краевого ожогового центра КГБУЗ «Краевая клиническая больница» Владимирова И.В. В подборе спортсменов, занимающихся контактными видами спорта, принимали участие руководитель КГАУ «РЦСП «Академия борьбы им. Д.Г. Миндиашвили» Миндиашвили Д.Г.; канд. пед. наук, доцент кафедры борьбы ИФКСиЗ им. И.Ярыгина КГПУ им. В.П.Астафьева Завьялова О.Б.; а также канд. мед. наук, доцент кафедры микробиологии КрасГМУ Решетнева И.Т. В подборе детей, находящихся в доме ребенка для

выявления носительства *S. aureus*, включая MRSA принимала участие главный специалист Министерства здравоохранения Красноярского края Бахарева Н.В. Автор провел статистическую обработку и анализ полученных данных, сформулировал выводы, практические рекомендации и перспективы дальнейшей разработки темы. Данная диссертация – это обобщение обработанных статистически данных, полученных автором лично и представленных системно и логически обоснованно.

Связь работы с научными программами.

Диссертационная работа поддержана краевыми, федеральными и международными грантами и госзаданиями: 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.

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, 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.

ГЛАВА 1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Эпидемиология метициллинрезистентных *S. aureus*

1.1.1 Общие сведения об MRSA

Staphylococcus aureus обычно колонизирует поверхность кожи и слизистые оболочки и примерно 30 % людей являются постоянными бактерионосителями *S. aureus* с его локализацией в передних отделах носа [133, 352]. Успех *S. aureus* как колонизирующего агента, так и патогена во многом обусловлен его способностью адаптироваться к различным средам благодаря приобретению новых генов вследствие горизонтального их переноса. Благодаря этому штаммы *S. aureus* могут использовать широкий и гибкий спектр детерминант генов вирулентности: различные факторы адгезии, колонизации, факторы уклонения от иммунного надзора, токсины (энтеротоксины, эксфолиатины, лейкоцидины и др.) [325].

S. aureus остается одной из основных причин инфекций, распространенных как в стационарах, так и во внебольничных условиях. *S. aureus* вызывает широкий спектр инфекций, включая инфекции кожи и мягких тканей (ИКМТ), такие как буллезное импетиго, абсцессы, фурункулез, стафилококковый синдром ошпаренной кожи; инвазивные инфекции, такие как сепсис, эндокардит, остеомиелит, пневмония; а также токсин-ассоциированные, например, синдром токсического шока и пищевые токсикоинфекции [191, 532].

При этом источником *S. aureus* может быть сам бактерионоситель, т.е. микроорганизмы могут вызывать эндогенную инфекцию, либо заражение может происходить экзогенным путем от бактерионосителей и больных стафилококковой инфекцией людей, а также от животных [513]. Особой группой риска в плане частоты колонизации *S. aureus*, MRSA являются иммунокомпрометированные лица, такие как онкологические больные, ВИЧ-инфицированные, больные с сахарным диабетом и др. [90].

В настоящее время *S. aureus* играет ведущую роль в качестве нозокомиального возбудителя инфекционных заболеваний в разных странах мира [371]. По данным национальной сети безопасности здравоохранения в США (данные примерно из 2000 больниц) *S. aureus* является лидирующим возбудителем среди госпитальных патогенов, выделенных при инфекционных осложнениях. В частности, *S. aureus* был наиболее распространенным возбудителем при вентилятор-ассоциированной пневмонии и при хирургических вмешательствах [454].

Хотя *S. aureus* является видом, естественно восприимчивым к антибиотикам, на протяжении многих лет он стал устойчивым практически ко всем антимикробным препаратам, которые вошли в клиническую практику. Исторически сложилось несколько классов лекарственно-устойчивого *S. aureus* [131, 494]. К ним относятся пенициллин G-устойчивый *S. aureus*, который появился в середине 1940-х годов благодаря приобретению плазмиды, несущей ген пенициллиназы (*penZ*, теперь *blaZ*) и продуцировал пенициллиназу (PCase, пенициллин-гидролизующий фермент) [404], а спустя два десятилетия 80% изолятов *S. aureus* стали устойчивы к пенициллину [143]. Метициллин-резистентный *S. aureus* (MRSA), появился в 1961 г., вскоре после введения (в 1959 г.) первого устойчивого к β -лактамазе пенициллина – метициллина. Штаммы *S. aureus*, резистентные к метициллину, были идентифицированы в Великобритании (Jevons, 1961) и продолжают оставаться одними из распространенных «суперплохих бактерий» во всем мире, вызывая высокую долю инфекций [245, 384]. Устойчивость штаммов MRSA к бета-лактамам связана с их продукцией дополнительного низкоаффинного пенициллин-связывающего белка (PBP), например подкласса B1, известного, как PBP2a или PBP2 ϕ [23, 208]. В случае действия бета-лактамных антибиотиков PBP2a или PBP2 ϕ компенсирует функцию заблокированных PBP, что дает штамму способность расти в присутствии антибиотика [471]. Дополнительный белок PBP кодируется приобретенным геном *tes*. Ген *tesA* или *tesC* входит в состав SCC*tes*, и

переносится вместе с генами, контролирующими его экспрессию - ген *mecR1*, кодирующий белок сигнальной трансдукции MecR1 и ген *mecI*, кодирующий репрессорный белок MecI [537]. Когда стало очевидно, что *mecA* широко распространен среди множественных видов стафилококка, было выдвинуто предположение, что его может переносить подвижный генетический элемент, который может легко передаваться среди стафилококков. После этого был идентифицирован генетический элемент, который кодировал устойчивость к метициллину и имел сайт-специфичную рекомбиназу, обозначенный как хромосомная кассета рекомбиназы (ссr), и обозначался как SCCmec [257, 280]. Ген *mecB* входит в состав плазмиды [115].

1.1.2 Эпидемиология MRSA. Распространение основных клонов и линий в мире

Доля MRSA значительно возросла в середине 1970-х годов в Европе, в следующем десятилетии в США, а затем и на глобальном уровне [143]. В настоящее время *S. aureus* играет ведущую роль в качестве нозокомиального возбудителя в разных странах. В частности, *S. aureus* был наиболее распространенным возбудителем при вентилятор-ассоциированной пневмонии и при послеоперационных хирургических инфекциях. В США переменная часть изолятов относилась к MRSA - от 43 до 58 % в 2009-2010 гг., от 52,6 % до 50,7 % в 2011-2014 гг., в зависимости от типа инфекций и/или отделения [455, 511].

MRSA является классическим примером мультирезистентных микроорганизмов, на долю которых приходится от 1 % до более 50 % всех инфекций, вызванных *S. aureus*, в зависимости от страны и клинической ситуации (Рисунок 1) [73, 239, 526].

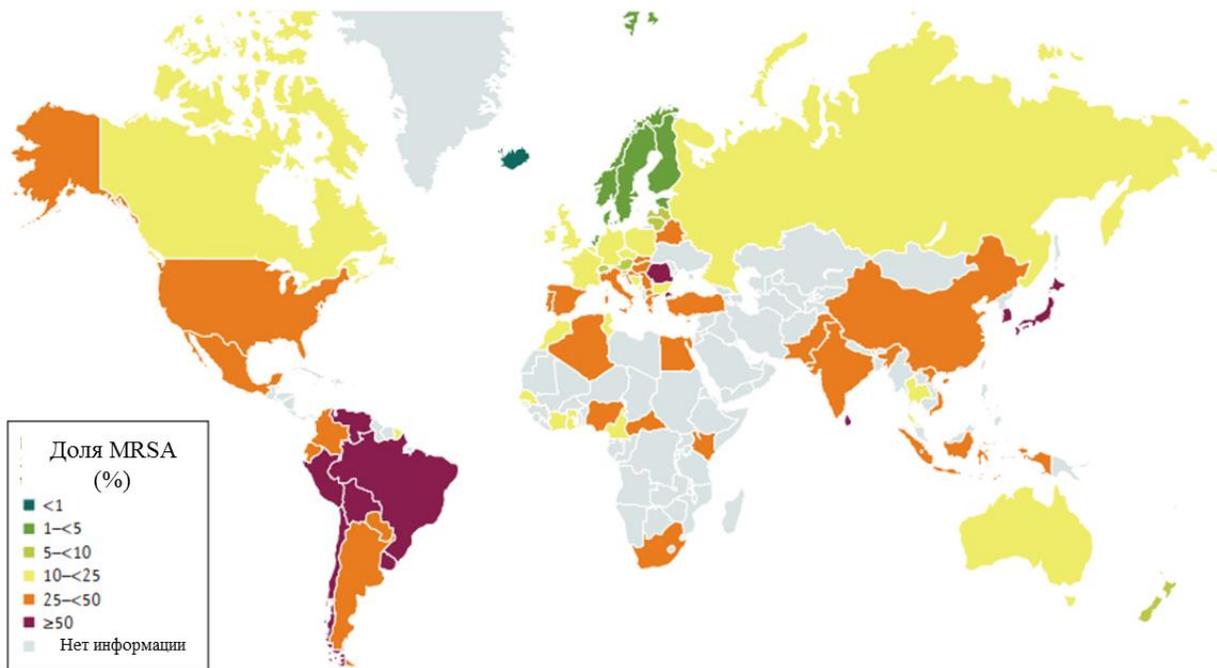


Рисунок 1 – Мировая распространенность MRSA. Показан процент изолятов *Staphylococcus aureus*, устойчивых к оксациллину (MRSA). Представлены данные Центра контроля за заболеваниями, экономики и политики. Данные для следующих стран адаптированы с вебсайта <https://resistancemap.cddep.org/AntibioticResistance.php>: Алжир, Боливия, Бразилия, Камерун, Центральноафриканская Республика, Чили, Колумбия, Египет, Гонконг, Индонезия, Кот-д'Ивуар, Япония, Кения, Мальта, Марокко, Нигерия, Парагвай, Перу, Сенегал, Сингапур, Южная Корея, Шри-Ланка, Тунис и Уругвай [312]

В Европе исследование распространенности *S. aureus*, координируемое Европейским центром по контролю и профилактике заболеваний (ECDC) и проведенное в стационарах 33 стран, показало, что *S. aureus* является вторым наиболее распространенным микроорганизмом после *E. coli*, и он остается первой причиной хирургических инфекций, в то время как доля MRSA сильно варьируется в зависимости от страны [73, 140]. Данные, собранные Европейской сетью наблюдения за антибиотикорезистентностью (EARS-Net), показали важные различия между странами в доли MRSA, выделенных от

пациентов с бактериемией. Так, в 2013 году в среднем по Европе доля MRSA составила 18 %, однако в таких странах как Исландия, скандинавские страны и Нидерланды, доля MRSA была ниже 2 %, в то время как в некоторых странах Восточной Европы и Южной Европы доля MRSA варьировала от 32 до 64 % [73]. Интересно отметить, что EARS-Net зафиксировала тенденцию к снижению доли MRSA во Франции, Великобритании, Германии и Ирландии, вероятно, из-за реализации стратегий контроля распространения и передачи MRSA в медицинских учреждениях [265, 410]. В Германии уровень штаммов MRSA среди выделенных клинических изолятов *S. aureus* снизился с 21,4 % в 2005 году до 11,8 % в 2014 году [73]. Процент и абсолютное число нозокомиальных инфекций MRSA в Германии значительно снизились за последний 6-летний период [364]. Всемирная картина распространения MRSA показана в глобальном отчете по антибиотикорезистентности, опубликованном Всемирной организацией здравоохранения в 2014 году [72]. Хотя данные по резистентности к антибиотикам были доступны только для Европы, Америки и Австралии, тем не менее о случаях выделения MRSA сообщалось на всех континентах. Большинство стран сообщили, что доля MRSA превышала 20 %, а иногда и доходила до 80 %. Это означает, что антибиотики второго ряда (или «резервные») необходимы для лечения или профилактики инфекций, вызванных MRSA в большинстве стран мира. Примечательно, что инфекции, вызванные MRSA, связаны с увеличением смертности и продолжительностью пребывания в больнице, что приводит к большим экономическим потерям по сравнению с инфекциями, вызванными MSSA [72]. Так, в 2015 году в США инвазивные инфекции, вызванные MRSA, включая бактериемию, выявили в 18,8 случаев на 100000 населения и были причиной смерти в 332 случаях [349]. Среди пациентов с бактериемией, вызванной MRSA смертность в 1,78-3 раза выше, чем при бактериемии, вызванной MSSA [133]. Ежегодно в Соединенных Штатах примерно 11000 случаев смерти связаны с инфекциями, вызванными MRSA [349]. Расходы, связанные с MRSA инфекциями, высоки: средняя продолжительность

пребывания и расходы на лечение пациентов с инфекциями, вызванными MRSA примерно в 2 раза выше, чем с инфекциями, вызванными MSSA [33, 79]. Так, по данным американских исследователей стоимость одного случая MRSA-инфекции в лечебно-профилактическом учреждении превышает 60000 долларов США [15].

Разработка и широкое использование методов молекулярного типирования позволили идентифицировать различные клоны MSSA и MRSA и их распространение по всему миру. Установлено, что подавляющее большинство изолятов MRSA (88 % штаммов), собранных в мире, принадлежали к 11 клональным комплексам (CC) [104]. Изоляты MRSA принадлежат к таким клональным комплексам: CC1, CC5, CC8, CC239, CC9, CC12, CC15, CC22, CC30, CC45, CC51/121, наиболее распространенными из которых являются CC5, CC8, CC239 и CC30 [143, 352, 495]. По сравнению с MSSA, линии MRSA менее многочисленны [394]. Эти различные стафилококковые линии со временем эволюционировали, накапливая изменения структуры генома, что влияло на экспрессию и функцию генов, и, возможно, самое важное, приобретали новые генетические элементы через горизонтальный перенос генов [343]. Недавние исследования показали, что клоны непрерывно эволюционируют: старые клоны ослабевают, а иногда и вновь появляются; обмен и распространение клонов и линий между различными материками и странами происходят быстрыми темпами из-за происходящей глобализации [143].

1.1.3 Эпидемиология HA-MRSA

Инфекции MRSA были впервые обнаружены в больницах и были названы MRSA инфекциями, связанными с медицинской помощью (Hospital-Acquired или Healthcare-Associated MRSA - HA-MRSA). Появившись в 1961 году, HA-MRSA распространились в различных стационарах всего мира. Снижение случаев MRSA-инфекций наблюдалось в 1970-х годах, но резкое

повторное увеличение доли штаммов MRSA произошло в начале 1980-х годов во всем мире, например в Великобритании, США, Австралии, некоторых европейских странах (Франция, Италия, Испания) [178]. После появления MRSA было установлено, что большинство инфекций были вызваны фаготипом 83А, который теперь классифицируется как CC8 ST250 и обозначается как «архаичный клон» [438]. Архаичный клон постепенно исчез в 1980-х годах и его заменили новые пандемические клоны HA-MRSA. Наиболее распространенными в стационарах являются клональные комплексы: CC5 SCCmecIV, распространенные в США и Европе; CC239 ST239 SCCmecIII, распространенные в Южной Америке, Азии и Австралии; CC22 SCCmecIV, доминирующие в Великобритании и распространенные по всему миру; CC30 SCCmecII, распространенные в Европе и CC45 SCCmecIV - в Центральной Европе (Рисунок 2) [325, 465]. К клональным комплексам относятся различные варианты ST. Клональный клон CC5 включает в себя клон ST5 или Нью-Йорк/Японский клон и педиатрический клон ST5. Клональный комплекс CC239 являются наиболее распространенным по всему миру, включающий бразильский клон ST239, венгерский клон ST239 и другие. Клоны ST240 и ST241 являются однолокусными вариантами ST239 (различаются мутациями в гене *pta* или *yqil* MLST профиля), данные ST варианты принадлежат к одному клональному комплексу CC239 [379]. CC22 широко распространен во всем мире, включая Европу, Австралию, Канаду и Индонезию. CC30 распространен в США и Великобритании, а также в Австралии, Канаде и Южной Африке. CC45 распространен в США и Европе [143].

В большинстве стационаров распространены только один или два доминирующих клон [471]. Напротив, существует множество клональных линий *S. aureus*, чувствительных к метициллину (MSSA), распространенных как во внебольничных условиях, так и в стационарах [324].

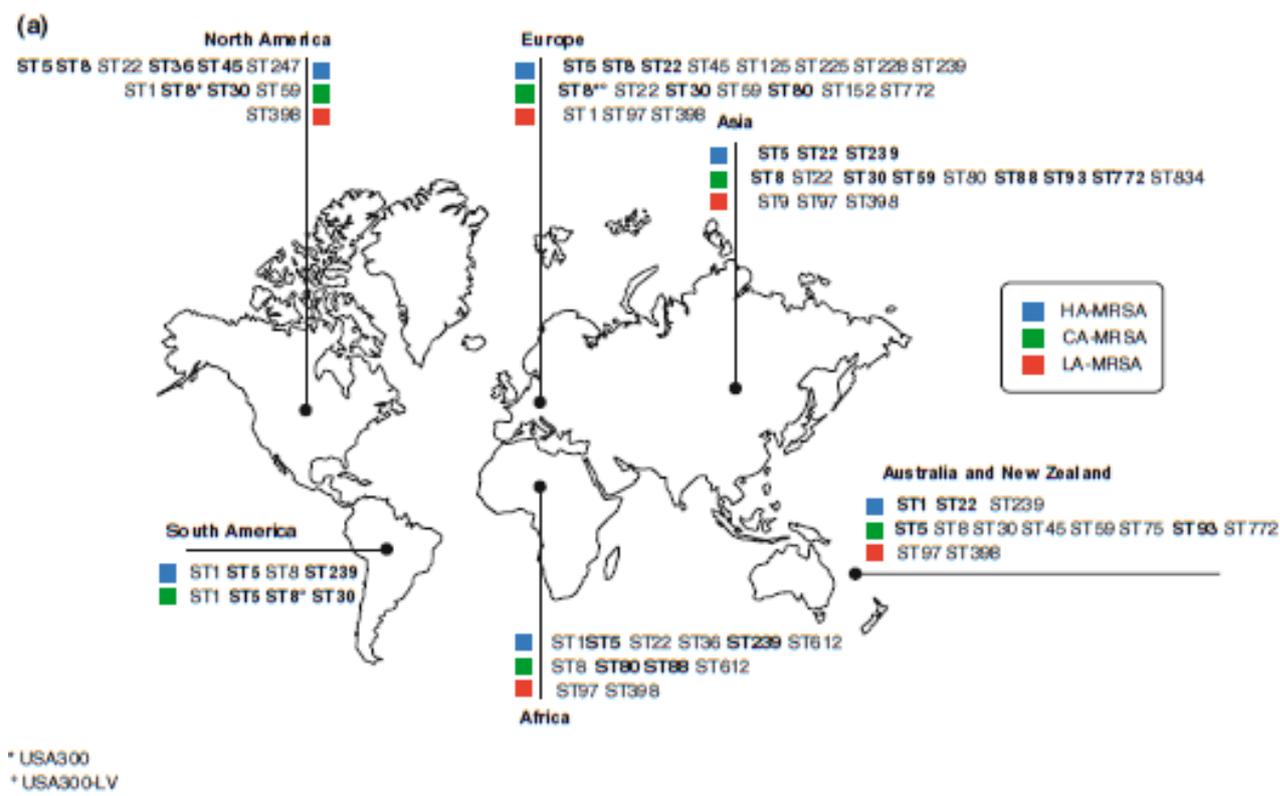


Рисунок 2 – Распространение различных клонов MRSA в мире [371]

В течение последних 60 лет клональный комплекс *S. aureus* CC30 оказал большое влияние на глобальное здоровье человека, вызвав появление трех пандемических волн и эпидемии синдрома токсического шока (TSS) [526]. CC30 является наиболее распространенной линией MSSA, колонизирующей людей, из которой возникло несколько клонов MRSA. В частности, одним из клонов, относящихся к CC30 является EMRSA-16 ST36, распространенный в британских больницах. Анализ генома показал, что этот клон возник в крупных городах, таких как Лондон и Глазго, прежде чем распространиться на региональном уровне, в обратном направлении распространения современного доминантного клона MRSA CC22 [352]. В нескольких отчетах говорится, что данный клон менее вирулентен, чем другие госпитальные MRSA [296, 352].

Одним из распространенных HA-MRSA во всем мире является клон CC239 ST239 SCCmecIII, который 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 [379]. Клон CC239-MRSA-III, возможно, один из давно циркулирующих в мире пандемических MRSA, ставший повсеместно распространенным в разных частях мира (Рисунок 2).

Есть множество сообщений о распространении CC239-MRSA-III во многих европейских странах, в том числе в Великобритании [195], Ирландии [450], Испании [163], Португалии [459], Италии [135], на Мальте [445], Хорватии [132], Германии [88], Австрии [304], Греческой Республике [361], Венгрии [158] и Греции [85]. Также CC239-MRSA-III распространен в Румынии [147, 376] и России [3, 45, 224, 289]. Клональный комплекс CC239-MRSA-III распространен на территории Средиземного моря и Ближнего Востока – в Греции [85], Турции [92], Египте [196], Марокко, Тунисе, Алжире [80], Иране [203], Саудовской Аравии [374], Кувейте [125]. Штаммы CC239-MRSA-III были выделены в Китае [145], Сингапуре [252], Малайзии [216], Монголии [400], Пакистане [263], Индии [389], Южной Корее [411], Лаосе [535], Тайланде [459]. Также есть публикации о выделении CC239-MRSA-III в странах Африки, таких как Гана, Кения, Нигер, Нигерия, Сенегал, страны Южной Африки [80, 498]. В Восточной Австралии и Новой Зеландии описаны случаи вспышек госпитальных инфекций, вызванных штаммами CC239-MRSA-III [249]. CC239-MRSA-III были выделены в США [442], Бразилии [502], Португалии [351], Эквадоре [543], Тринидад и Табаго, где в последнее время являются доминирующим клоном MRSA [375].

ST239 представляет собой гибридный клон, возникший в результате введения большого хромосомного фрагмента из ST30 (CC30) в геном CC8 [178, 459]. В составе генома штаммов ST239 выявили примерно 20 % от генома клона ST30 и 80 % от генома клона ST8, а также отдаленных родственников [459]. Хотя горизонтальный перенос и рекомбинация генетического материала широко встречается у бактерий, существенным отличием ST239 было то, что рекомбинация генетического материала

происходила как большие хромосомные замены, а не множественные локализованные рекомбинации [459].

Некоторые из ранних опубликованных сообщений об инфекциях, вызванных MRSA ST239, устойчивого к гентамицину, были из Австралии, Великобритании и США, которые начались в конце 1970-х и начале 1980-х годов [159, 189]. Внутригоспитальные эпидемии, вызванные ST239, описаны по всей Европе и Южной Америке в 1980-х и 1990-х годах [173, 174, 362, 473, 519], а также в Азии и на Ближнем Востоке в 1990-х и 2000-х годах [92, 290, 297, 327, 330, 391, 400, 448, 529]. Кроме того, многие изоляты ST239 MRSA выделяли от госпитализированных пациентов в Южной Америке, Восточной Европе и на Ближнем Востоке и были названы Бразильским, Португальским, Венгерским и Венским клонами, соответственно [92, 110, 228, 232]. В настоящее время ST239 является одним из основных возбудителей MRSA инфекций в азиатских больницах, за исключением Японии. Высокая численность населения в странах, где преобладает ST239, может привести к тому, что штаммы этой линии станут наиболее успешной линией MRSA в мире. Также установлено, что штаммы MRSA ST239 вызвали эпидемическую вспышку в Лондоне [296]. Инфекция в Лондоне, вызванная штаммом TW20 ST239, была, в первую очередь, связана с катетером, что указывает на то, что TW20 имел повышенную способность вызывать бактериемию. При изучении последовательности цельного генома штамма TW20 выявили наличие нескольких мобильных генетических элементов, среди многих других генов, включающих гены антибиотикорезистентности [246]. Примечательно, что при сравнении последовательности цельного генома нескольких глобальных изолятов ST239, установили, что штамм TW20 был азиатского происхождения, поскольку он был более похож на изоляты ST239 из Таиланда, чем на изоляты из Южной Америки или Европы [236].

В результате полногеномного секвенса большой коллекции штаммов CC239-MRSA-III из различных частей мира установили распространение

нескольких главных кладов, ассоциированных с территорией, на которой они распространены и названных как «Европейский», «Южно-Американский/Средне-Восточный», «Евразийский» (ранее «Турецкий»), «Азиатский» [236, 379].

Согласно данным многоцентровых исследований, проведенных в РФ, распространенность HA-MRSA в Российских больницах значительно варьировала от 0 до 80 % [20]. По результатам многоцентрового исследования, проведенного в 2002 г. в РФ, было установлено, что доля MRSA в различных отделениях разных стационаров различных городов России в среднем составила 33,5 % (варьировала от 0 % до 89,5 %), при этом наиболее часто MRSA выделяли от пациентов, госпитализированных в ожоговые отделения (77,5 %), отделения реанимации и интенсивной терапии (54,8 %), травматологии и ортопедии (42,1 %) [24]. В 2008 г. по результатам многоцентрового исследования, проведенного в 32 стационарах 19 городов РФ установлено, что доля MRSA составила 49,9 %, варьируя от 0 до 83 % в различных стационарах, при этом в г. Красноярске доля MRSA составила 59,6-70,9 % [25]. По результатам многоцентрового исследования МАРАФОН (25 стационаров в 18 городах), проведенного в 2011-2012 гг. в РФ, было установлено, что доля MRSA составила 66,9 % [52].

Вариант ST239 был также одним из наиболее распространенных HA-MRSA в России [7, 17, 224, 288]. В России ST239 оказался одним из наиболее успешных клонов HA-MRSA с вариантом *spa* t037. Данный вариант был идентифицирован в разных регионах РФ еще в начале 1990-х годов. В настоящее время он распространен на большой территории и представлен двумя различными вариантами [15, 27]. Так, по результатам генотипирования штаммов MRSA, изолированных от госпитализированных взрослых и детей в российских стационарах с различными нозологиями, установлено преобладание ST239 *spa* t037 и t030 SCCmec III (Рисунок 3) [44, 45]. При исследовании штаммов, распространенных в европейской части России, было установлено, что в условиях стационаров циркулируют

преимущественно ST239 *sra* t632, t030, t037 [3, 224, 504]. Изоляты, принадлежащие к *sra* типу t632, *tst*-негативные, были обнаружены только в центральной части РФ (г. Санкт-Петербург, г. Москва, г. Ярославль) [20]. Спорадические случаи, вызванные ST239 *sra* типа t632 были описаны в Турции [536], Китае [317] и на Ближнем Востоке. По результатам генотипирования госпитальных штаммов MRSA, выделенных во Владивостоке, установили их принадлежность к ST239 *sra* t3 и t351 SCCmec III [109].

Также одним из наиболее эволюционно конкурентных является клон ST8, *sra* тип t008, представитель клонального комплекса CC8, который распространен во всем мире [16, 44]. Широко распространены как внутрибольничные, так и внебольничные клоны данной генетической линии. Встречаются как метициллиночувствительные, так и метициллинорезистентные штаммы. К этой генетической линии относятся известный внебольничный клон USA300, который отличается от внутрибольничных продукцией PVL, и внутрибольничный, такой как UK EMRSA-2/6.

Клон ST8 широко распространен на территории России начиная с 1997 года и на протяжении всего периода [27, 28, 44]. Как уже упоминалось, штаммы с близкими MLVA профилями и родственными *sra* типами (по данным BioNumerics *sra* typing plugin), по-видимому, также являются представителями данного клона, в то время как в некоторых публикациях они рассматриваются как самостоятельные клоны. В России были обнаружены следующие близкородственные варианты этого клона: t024, t064, t3308 и t118, все они обладают IV типом SCCmec кассеты и принадлежат к ST8, по данным MLVA, они также отличаются не более чем на 1 VNTR локус (Рисунок 3) [44]. Так как оба этих результата основаны на анализе переменных повторяющихся повторов, которые быстро эволюционируют, можно предположить, что данные варианты клона ST8-t008-SCCmec IV .

Высокий уровень заболеваемости и смертности среди госпитализированных пациентов и огромные финансовые затраты, связанные с нозокомиальными инфекциями, вызванными MRSA, определяют данные микроорганизмы как глобальную проблему здравоохранения [111, 112, 247, 440, 453, 520].

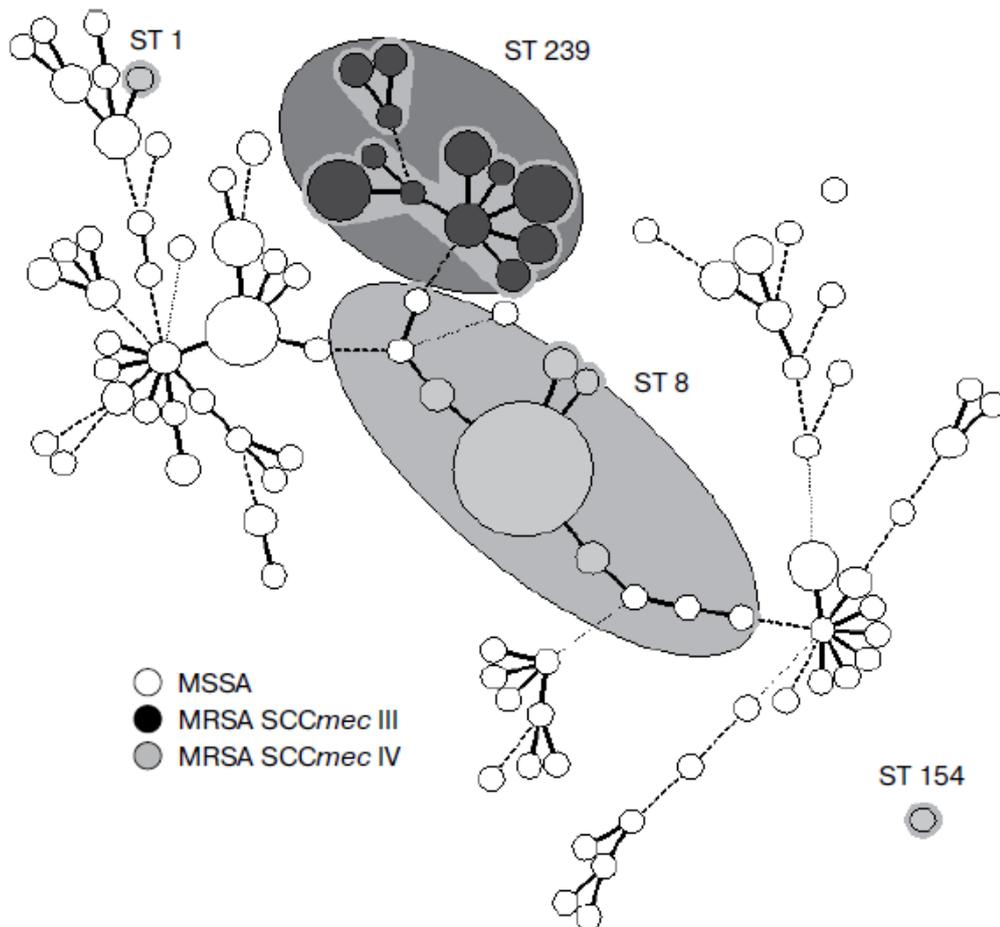


Рисунок 3 - Дендрограмма минимальных дистанций, построенная на основе композитного набора данных (6 VNTR локусов и тип SCCmec кассеты). На сером фоне – доминирующие клональные линии золотистого стафилококка в детских стационарах России [44]

HA-MRSA или MRSA, связанные с здравоохранением, можно разделить на две основные категории: «healthcare-associated community onset» и «hospital-onset» [340, 446]. Первые были определены как MRSA, связанные с наличием одного или нескольких факторов риска: наличие инвазивного

устройства; наличие инфекции/колонизации MRSA в предшествующий год; операция; госпитализация; нахождение в учреждениях, где предусматривается медицинский уход (дом престарелых и др.) в предшествующем году [260]. Последний вариант MRSA определяли как случаи выделения культуры MRSA из патологического материала пациента более чем через 48 часов после госпитализации [420].

Определение принадлежности штаммов к HA-MRSA основывается на важных концепциях следующим образом: местонахождение больного, где начинается развитие инфекции MRSA; текущее или предыдущее пребывание пациентов в медицинских учреждениях; наличие у пациента факторов риска колонизации HA-MRSA, включая наличие предшествующей инфекции, вызванной MRSA; генетические характеристики выделенных штаммов MRSA и восприимчивость к антибиотикам; диагноз у пациента [169, 295].

Также факторами риска инфицирования MRSA в медицинских организациях могут быть: госпитализация в стационар, пожилой возраст, сахарный диабет, колонизация MRSA, иммунодепрессия, высокая продолжительность предоперационной госпитализации, продолжительный прием антибиотиков перед госпитализацией, хирургическое вмешательство, чрезмерная травматизация тканей, неудовлетворительное качество обработки рук хирурга, продолжительность операции > 1 часа, хирургические дренажи, длительность нахождения в реанимационном отделении, тесный контакт с пациентом, имеющим MRSA и др. [8, 520].

1.1.4 Эпидемиология CA-MRSA

С появлением инфекций, вызванных штаммами MRSA, резистентность которых сформировалась во внебольничных условиях у пациентов, которые не имели факторов риска колонизации госпитальными штаммами, был введен термин community-associated methicillin-resistant *S. aureus* (CA-MRSA) [143, 154, 176, 213, 540]. CA-MRSA инфекции были впервые

зарегистрированы в отдаленных популяциях коренных жителей Австралии и США в конце 1990-х годов. Фатальные случаи инфекций, вызванных CA-MRSA, зафиксированы у детей в США, в штатах Миннесота и Северная Дакота и привлекли всеобщее внимание [169, 292, 495]. С тех пор опубликовано множество сообщений в разных странах мира об инфекциях, вызванных CA-MRSA [169, 311].

Возникновение CA-MRSA привело к тому, что в течение последних 15-20 лет он стал одним из важных патогенов человечества [142, 169, 402].

Типичные инфекции, вызванные CA-MRSA включают инфекции кожи и мягких тканей, фурункулы, импетиго, флегмону, абсцессы, некротизированную пневмонию, бактериемию [221, 419, 483]. Пять - десять процентов инфекций, вызванных CA-MRSA являются инвазивными и потенциально опасны для жизни человека [213, 294, 380]. CA-MRSA передается чаще всего путем контакта кожи с кожей инфицированного человека, контакта с загрязненными объектами или тесного контакта с бессимптомными носителями [223]. Группами повышенного риска заражения CA-MRSA являются дети от 0 до 2-х лет, дети в организованных коллективах, молодые люди, аборигены и люди с низким социально-экономическим статусом [532]. Коренное население в Канаде, Соединенных Штатах Америки и в тихоокеанских островных государствах также связано с высоким риском заражения CA-MRSA, что возможно определяется социальными и финансовыми особенностями [169]. Факторы риска заражения CA-MRSA включают: переполненные условия проживания с плохой жилищной инфраструктурой и отсутствием доступа к объектам для адекватной личной гигиены, наличие кожных заболеваний, вызванных MRSA, предшествующее лечение антимикробными препаратами [81].

К группам риска развития заболеваний, вызванных CA-MRSA, во внебольничных условиях относятся: спортсмены, занимающиеся контактными видами спорта; лица, употребляющие инъекционные наркотики; гомосексуалисты; военнослужащие; лица, пребывающие в

учреждениях системы исполнения наказаний; лица, пребывающие в закрытых коллективах (проживающие в домах престарелых, приютах); ВИЧ-инфицированные [8, 83, 136, 283, 348].

Факторы риска для CA-MRSA отличаются от тех, которые обычно связаны с оказанием медицинской помощи [116, 334, 466]. Кроме того, риск приобретения CA-MRSA может быть неравномерно распределен географически, и может быть связан с социальными условиями [185, 285].

Штаммы CA-MRSA отличаются от штаммов HA-MRSA на генетическом уровне. Международные клоны CA-MRSA принадлежат к ряду различных генетических линий и конкретные клоны преобладают на разных континентах (Рисунок 2) [139, 145, 359, 516]. Изоляты CA-MRSA, в отличие от HA-MRSA, имеют более короткие элементы SCCmec, а именно чаще всего SCCmecIV или V.

В течение нескольких лет после появления CA-MRSA во всем мире наблюдалось распространение ряда различных географически отличающихся генетических линий (Рисунок 2), включающих клон Юго-Западной части Тихого океана ST30 SCCmecIV, распространенный в Восточной Азии и Океании [160, 251, 500]; клон USA 400 ST1 SCCmecIV; клон USA300 ST8 SCCmecIV, распространенный в США [434]; Европейский вариант клона CA-MRSA ST80 SCCmecIV распространен в Европе, Северной Африке и на Ближнем Востоке [416, 466, 486].

Таким образом, CA-MRSA в основном принадлежат к клональным комплексам CC8 (ST8), CC30 (ST30), CC59, CC80 и CC93 [84].

К клонам CA-MRSA относится клональный комплекс 80 (CC80), который известен как европейский клон CA-MRSA, несмотря на его высокую распространенность как на Ближнем Востоке, так и в Северной Африке [359, 466]. Доминирующий клон CC80 MRSA имеет токсин лейкоцидин PVL, кодируемый генами lukS/FPV в составе профага FSa2, и содержит тип SCCmecIVc, устойчив к тетрациклину, фузидиевой кислоте и аминогликозидам (канамицин/амикацин) [234, 466].

Другой наиболее распространенной в мире линией CA-MRSA является ST8, к которой относится, например, клон USA300. К началу 2000-х годов единственным клоном, распространенным на территории США являлся клон CA-MRSA USA300 [219, 291, 482]. Установили, что USA300 принадлежал к ST8, чаще всего *sra* типа t008 и содержал SCCmecIV, а также гены, кодирующие лейкоцидин Пантон-Валентина (PVL) и гены устойчивости к эритромицину [219]. Этот эпидемиологически успешный клон имел *agr* 1, катаболический подвижный элемент аргинина (ACME) тип I, и набор генов вирулентности, включая *sek*, *seq* [182, 443]. Впоследствии этот клон был идентифицирован при расследовании вспышек ИКМТ в исправительных учреждениях в США, в штатах Миссисипи, Джорджии, Калифорнии и Техасе, а также среди спортсменов из штатов Колорадо, Индианы и округа Лос-Анджелес. Впоследствии один PFGE-тип, USA300-0114, был признан преобладающим штаммом в США и привел к развитию вспышек инфекций, вызванных MRSA. Например, к 2005 году было подсчитано, что 90 % всех внебольничных инфекций MRSA в г. Сан-Франциско были связаны именно с клоном USA300 [327]. Преобладание USA300 в качестве основной причины CA-MRSA при ИКМТ было продемонстрировано в общенациональном исследовании, проведенном в городских отделениях скорой медицинской помощи в США. В некоторых регионах страны было установлено, что штаммы USA300 вызывали 98 % ИКМТ среди пациентов, от которых были выделены MRSA [380, 490]. Распространение клона USA300 произошло на международном уровне на всех континентах мира за исключением Антарктики и описано во многих исследованиях. Однако в других странах мира клон USA300 еще не стал доминирующим [169].

Эпидемиология ST8 заметно отличается в различных регионах мира [468]. В Европе вариант ST8 является распространенным CA-MRSA, но большинство представителей клона не относятся USA300 [435]. ST8 очень редко встречается в Азии [154], спорадические случаи инфекций, вызванных

USA300 описаны в Японии [388], Южной Кореи [273] и Пакистане [338]. Клон CA-MRSA/J за последние годы получил некоторое распространение на территории Японии, однако этот клон, как полагают, эволюционировал из японской линии HA-MRSA, а не из классического варианта USA300 [261]. ST8 MRSA также не является основным клоном в Азиатско-Тихоокеанском регионе, включая Австралию и Новую Зеландию [516], хотя есть ранние сообщения о ST8 CA-MRSA из отдаленных населенных пунктов в Западной Австралии [160, 372]. С 2006 года USA300 также все чаще обнаруживается в южно-американских странах [430]. Несмотря на схожие результаты PFGE, изоляты USA300 из Южной Америки, как было установлено, обладают отличающимися молекулярно-генетическими свойствами по сравнению с USA300-0114, а именно наличием элемента SCCmecIVc и других мобильных генетических элементов, определяющих резистентность к меди и ртути (COMER), но не содержат ACME [416]. Варианты из Северной и Южной Америки теперь рассматриваются как две разные генетические линии и названы: USA300-NAE «Северо-Американский» и USA300-SAE «Южно-Американский» (или USA300-LV «Латино-Американский») [415]. Оба варианта разделились между собой от общего предшественника ~ 40 лет назад [415].

Установлено, что внебольничные штаммы циркулируют в условиях стационаров и вызывают госпитальные инфекции. Также зафиксированы случаи, когда госпитальные штаммы распространяются за пределы стационаров и вызывают инфекционные заболевания во внебольничных условиях. Так, клон USA300 после успешного распространения во внебольничных условиях, быстро распространился в условиях стационаров [327]. В 2004 году в США этот клон был причиной 28 % инфекций кровотока у пациентов, у которых был риск колонизации госпитальными штаммами и выявлен в 20 % случаев нозокомиальных инфекций [447]. Параллельно с распространением в системе здравоохранения США, клон USA300 все больше накапливал резистентность к различным антимикробным

химиопрепаратам, что отчасти объясняет его возрастающую устойчивость в условиях стационара [89, 479]. Резистентность в основном была обеспечена плазмидами устойчивости к клиндамицину (*ermA* и *ermC*), тетрациклину (*tetK* и *tetM*) и мупироцину (*mupA*) [185, 482]. Кроме того, сформировалась устойчивость к фторхинолонам, обусловленная хромосомными мутациями, уровень которой продолжает расти [380]. У нескольких изолятов USA300 также выявили сниженную восприимчивость к ванкомицину, а в некоторых случаях и к даптомицину [180, 417]. Перспектива увеличения антибиотикорезистентности ко многим антимикробным химиопрепаратам у штаммов USA300, обладающих высоким потенциалом вирулентности является большой угрозой.

Также ярким примером может служить Лионский клон. Данный клон относили к госпитальным, однако этот клон был причиной и внебольничных инфекций во Франции [168, 206]. Изоляты, относящиеся к Лионскому клону, характеризовались ST8, *agr1*, *spa t008* и др., SCCmecIV с комплексом гена *mec* класса B и *ccrAB* аллотип 2, связанный с дополнительным *ccr*-геном [168]. Тем не менее, штаммы, представители данного клона были более разнообразными, чем ранее сообщали [206]. Ген *sea* был обнаружен только у 88 % изолятов, *sed* у 49 %, *ser* у 49 % и *hly* у 12,7 % изолятов [168].

1.1.5 Эпидемиология LA-MRSA

Другой линией MRSA является LA-MRSA, которая связана с животноводством, среди людей впервые была выявлена в 2005 году, в Нидерландах [98]. Популяция свиней является основным резервуаром для LA-MRSA, однако представители данных MRSA также встречаются среди широкого круга других животных: крупный рогатый скот, лошади, цыплята, индейка, крысы, собаки, кошки [463]. Большинство штаммов LA-MRSA содержат ген *tetM*, а иногда и *tetK*, что определяет резистентность к тетрациклинам, являющейся наиболее используемой группой

антимикробных химиопрепаратов, используемой при выращивании свиней [230]. Другие гены антибиотикоустойчивости также часто присутствуют в геноме штаммов LA-MRSA. LA-MRSA способны вызывать большое разнообразие инфекционных заболеваний начиная от инфекций кожи и мягких тканей до более тяжелых инфекций, например: пневмонии, менингита и септицемии [164]. Большинство людей, колонизированных LA-MRSA, являлись фермерами, либо ветеринарами, либо членами домашних хозяйств. Таким образом, предполагается, что основными путями передачи LA-MRSA являются прямой контакт с животными или через воздух внутри амбаров или через тесный контакт с лицами, имеющими прямой контакт с животными [463]. К линии LA-MRSA относятся клональные линии прежде всего ST398, а также ST1, ST97, ST9 (Рисунок 2) [84].

1.2 Вирулентность *S. aureus*

Набор факторов вирулентности у штаммов *S. aureus* обширен, причем включает как структурные компоненты клетки, так и секретируемые продукты, играющие роль в патогенезе инфекционных заболеваний [217]. Потенциал вирулентности *S. aureus* значительно различается у разных штаммов вследствие наличия или отсутствия мигрирующих генетических элементов, содержащих гены, кодирующие токсинообразование и других детерминант вирулентности. Напротив, серия основных токсинов, кодируемых генами, таких как альфа-токсин, присутствует практически во всех штаммах *S. aureus*.

Особенность стафилококков заключается в том, что их фактор вирулентности может выполнять несколько функций в патогенезе, а также то, что множественные факторы вирулентности могут выполнять одну и ту же функцию. Регулирование экспрессии стафилококковых генов, кодирующих синтез факторов вирулентности играет центральную роль в патогенезе [235]. Чтобы уменьшить чрезмерные метаболические

потребности, экспрессия происходит скоординированным образом и только тогда, когда это необходимо. Штаммы *S. aureus* имеют многочисленные поверхностные белки, называемые «поверхностными компонентами микробной клетки, распознающими адгезивные матриксные молекулы», которые опосредуют тропность к клеткам тканей хозяина [105]. Поверхностные белки прикрепляются к молекулам таким как коллаген, фибронектин, фибриноген и различные поверхностные белки могут обеспечивать адгезию к одному и тому же компоненту клетки ткани хозяина [403]. Поверхностные белки, по-видимому, играют ключевую роль в иницировании стафилококковых эндоваскулярных инфекций, инфекций костей и суставов, а также инфекций протезов. Различные штаммы *S. aureus* могут иметь разные сочетания поверхностных белков и поэтому могут быть причиной возникновения определенных видов инфекций [487]. После адгезии *S. aureus* на тканях макроорганизма или протезах происходит его колонизация и выживание в условиях макроорганизма, что обеспечивается различными механизмами, например образованием биопленок, способствующих уклонению от иммунной защиты хозяина и действия антимикробных химиопрепаратов [94]. Способность образовывать и выживать в составе биопленок является одной из причин, по которым, например, инфекционные процессы на протезах трудно поддаются терапии и зачастую требуют удаления устройства. Экспрессия поверхностных белков обычно возникает при логарифмическом росте (репликации), тогда как секретлируемые белки, такие как токсины, образуются во время стационарной фазы [105]. Во время инфекции ранняя экспрессия поверхностных белков облегчает первоначальную колонизацию тканевых сайтов, тогда как более поздняя выработка токсинов облегчает инвазию и агрессию. Одним из регуляторных генов является *agr*, который представляет собой систему восприятия чувства кворума, играющую важную роль в регуляции стафилококковой вирулентности [462]. По-видимому, мутанты по *agr* гену имеют меньшую вирулентность и некоторые типы *agr* связаны с развитием

конкретных клинических заболеваний [123]. Другими важными регуляторами являются стафилококковые вспомогательные регуляторы, такие как *ArlR* и *ArlS*, *SaeRS*, *Rot* и *mgr* [105].

In vitro S. aureus может также проникать внутрь эпителиальных клеток, включая эндотелиальные клетки, и выживать там, что теоретически также позволяет ему ускользать от иммунного надзора хозяина, особенно при развитии эндокардита [218]. *S. aureus* также могут образовывать малые колониевые варианты, которые ускользают от иммунного надзора хозяина, не вызывая значительного повреждения клеток хозяина, а также защищены от действия антимикробных химиопрепаратов, что способствует развитию хронической рецидивирующей инфекции. Рецидивы инфекции, вызванной малыми колониевыми вариантами *S. aureus*, связаны с их способностью к реверсии к более вирулентному дикому фенотипу [227]. *S. aureus* обладает многими другими характеристиками, которые помогают избежать иммунной системы хозяина во время развития инфекционного процесса [105]. К основным защитным механизмам *S. aureus* относится производство антифагоцитарной капсулы (имеют большинство клинических изолятов). Капсула (как положительно, так и отрицательно заряженная) также играет роль в формировании абсцесса. Белок А связывает Fc-часть иммуноглобулина и, как результат, может препятствовать опсонизации, снижая фагоцитарную активность. *S. aureus* может также секретировать белок ингибирующий хемотаксис или внеклеточный адгезивный белок, которые нарушают процессы активации и хемотаксиса нейтрофилов к месту инфекции [113]. Кроме того, *S. aureus* продуцирует лейкоцидины, которые вызывают разрушение лейкоцитов путем образования пор в клеточной мембране [339]. Во время развития инфекционного процесса *S. aureus* продуцирует многочисленные ферменты, такие как протеазы, липазы и эластазы, которые позволяют ему инвазировать и разрушать ткани хозяина. *S. aureus* также способен вызывать септический шок вследствие продукции факторов, взаимодействующих и активирующих иммунную систему хозяина.

Пептидогликан, липотейхоевая кислота и α -токсин могут играть роль в этом процессе [355].

Штаммы *S. aureus* продуцируют суперантигены, действие которых приводит к развитию различных интоксикаций, таких как пищевая токсикоинфекция и синдром токсического шока [29, 407]. В отличие от структурных компонентов, отмеченных ранее, данные суперантигены могут вызывать синдром токсического шока, инициируя «цитокиновую бурю» [227]. Некоторые штаммы также продуцируют эпидермолизины или эксфолиативные токсины, которые способствуют развитию синдрома ошпаренной кожи или буллезного импетиго [30]. Стафилококковые энтеротоксины классифицируются как SAgs, которые обладают способностью инициировать массивную неспецифическую активацию Т-клеток, приводящую к выбросу цитокинов. Суперантигены примерно в 1000 раз активнее, чем обычные антигены [177]. Основной особенностью SAgs является способность напрямую связываться с молекулой основного комплекса гистосовместимости МНС класса II, минуя процесс антигенпрезентативных клеток. SAgs также связывают с V β -областью Т-клеточного рецептора, тем самым объединяя рецептор Т-клеток и молекулу МНС класса II, что приводит к неконтролируемому высвобождению различных провоспалительных цитокинов, включая TNF- α , IL-2, IL-1b, IL-8, IFN- γ [212, 414]. Среди большого количества секретируемых токсинов имеется группа стафилококковых суперантигенподобных (SSL) белков, кодируемых 11 генами *ssl* (ранее известными как стафилококковые экзотоксиноподобные белки) [192]. У штаммов *S. aureus* гены *ssl* расположены в варьируемой области генома, называемой RD13, содержащей геномные острова (vSa α , SaPI n 2 или SaPI m 2) [310]. Белки SSL имеют ограниченную общую гомологию последовательностей к стафилококковым энтеротоксинам (SE) и токсину синдрома токсического шока 1 (TSST-1) и, таким образом, представляют собой новое семейство экзотоксиноподобных белков. Гены *ssl* присутствуют во всех изученных до сих пор штаммах *S.*

aureus, что указывает на их роль в выживании бактерий [406]. Хотя белки SSL имеют гомологию последовательностей и аналогичные структуры каждый белок имеет конкретную, отчетливую функцию в патогенезе. Было показано, что белки SSL помогают *S. aureus* уйти от иммунного ответа хозяина и, таким образом, могут способствовать бактериальной персистенции. SSL5 препятствует взаимодействию PSGL-1 (P-селектин гликопротеин-лиганд-1) и P-селектина, что предотвращает миграцию нейтрофилов к месту инфицирования. SSL7 ингибирует IgA-зависимые клеточные эффекторные функции, опосредованные Fc α RI, такие как фагоцитоз, дегрануляцию и респираторный взрыв. SSL7 и SSL9 взаимодействуют с человеческими антиген-представляющими клетками (моноцитами и дендритными клетками) [117].

Фенолорастворимые модулины (PSM α) в последнее время стали важными детерминантами вирулентности, которые способствуют провоспалительным процессам и лизису нейтрофилов, а также других клеток макроорганизма [318]. Кроме того, некоторые PSM α облегчают структурирование и распространение биопленки. Один из вариантов пептидов PSM - PSM-мес, ген которого находится в составе элементов SCCмес, представляя первый ген токсина *S. aureus*, локализованный на мигрирующем генетическом элементе с детерминантами устойчивости к антибиотикам [425]. Согласно опубликованным последовательностям генома MRSA, ген *psm-мес* обнаруживается преимущественно внутри SCCмес-элементов II и III типов [122].

Аргинин катаболический мобильный элемент (ACME) – один из факторов вирулентности, присущий CA-MRSA, в частности, характерен для клона USA300, который может способствовать увеличению способности штаммов колонизировать кожу человека и поверхности слизистой оболочки [100]. У клона USA300, ACME интегрирован с *orfX* сайтом SCCмес, и окружен повторяющимися последовательностями, типичными для SCCмес-кассет. Мобилизация ACME опосредована рекомбиназой (*crAB*), кодируемой

элементом SCCmec [281]. Этот элемент может также с высокой частотой передаваться горизонтально. ACME содержит два кластера генов *arc*, кодирующих вторичную систему аргинин-деиминазы и *orr-3*, кодирующую ABC-транспортер, которые являются сопоставимыми детерминантами вирулентности других видов бактерий [369]. В совокупности данные исследователей свидетельствуют о том, что ACME может играть роль в передаче бактерий среди восприимчивых хозяев, способствуя росту, размножению бактерий и их выживанию.

Факторы, защищающие бактерии от действия системы иммунного ответа хозяина, учитывая их общую функциональную направленность, предлагают объединять в одну группу, охватив 38 таких факторов, описанных на сегодняшний день [19]. В эту группу включают и факторы, входящие в состав недавно охарактеризованного комплекса ИЕС (Immune evasion cluster). В ИЕС могут входить: стафилокиназа (ген *sak*), обладающая фибринолитической активностью, активирующая плазминоген и инактивирующая α -дефензины; ингибитор активации комплемента, блокирующий C3-конвертазу (ген *scn*); ингибитор хемотаксиса лейкоцитов (ген *chp*); активатор Т-клеточного звена иммунитета, обладающий свойствами суперантигена и обуславливающий мощную активацию Т-клеток, что приводит к развитию токсического шока (ген *sea*); энтеротоксин Р (ген *sep*), также обладающий свойствами суперантигена [237]. Описано 7 типов ИЕС комплекса (А – G), различающихся по составу входящих в них факторов вирулентности [19].

Особенности иммунной системы человека могут также влиять на восприимчивость к стафилококковой болезни [128].

Однако важно отметить, что не все штаммы *S. aureus* одинаковы с позиции вирулентности. Различные штаммы могут содержать различные наборы адгезинов и/или токсинов или могут отличаться по своей способности формировать биопленки и противостоять фагоцитозу. Распределение некоторых факторов вирулентности напрямую связано с

клональной принадлежностью штаммов, тогда как наличие других факторов вирулентности не связано с принадлежностью к определенному клону [371]. Определенные клоны MRSA обладают высоким потенциалом трансмиссии и способны широко распространяться в определенных странах и даже континентах. Множественная резистентность к антимикробным химиопрепаратам играет определенную роль в селективном преимуществе и доминировании таких клонов в стационарах. Тем не менее, исследователи также выявили, что данные клоны обладают повышенным уровнем вирулентности, что определяет их, например, более высокую способность к колонизации макроорганизма. Вирулентность HA-MRSA Бразильского клона определила то, что он стал основной причиной инвазивных стафилококковых инфекций в стационарах Бразилии в 1990-х годах. В 1995 году 38 % изолятов *S. aureus* в стационарах Бразилии относились к Бразильскому клону, а в 1998 году – 79 % изолятов. Такие штаммы имели повышенный уровень биопленкообразования по сравнению с другими штаммами. Они также имели более высокую адгезивную активность, в частности к эпителиальным клеткам. Наличие фибронектин-связывающих белков способствовало высокой инвазивной активности. Исследования *in vitro* демонстрируют, что данный клон может быть успешным, поскольку он обладает повышенной способностью к адгезии, ускользанию от иммунного надзора и инвазии [96].

Было предложено множество факторов вирулентности, характерных именно для CA-MRSA, например, такие как повышенная адгезивность, способность к ускользанию от иммунной системы хозяина и уникальный набор токсинов. Ранее сообщалось, что PVL является важным фактором вирулентности, характерным именно для CA-MRSA. Стафилококковые лейкоцидины, включая токин Пантон-Валентина (PVL), секретируются в виде двухкомпонентных токсинов, состоящих из S и F-белков [169, 176]. В зависимости от комбинации специфических белков S и F образуется токсин с различными лейкоцитолитическими, эритроцитолитическими и дермонекротическими свойствами [402]. PVL состоит из LukSPV и LukF-PV,

четырёх единиц каждой формы октамерных бета-баррелей, взаимодействующих с мембранами лейкоцитов *in vitro*, что приводит к лизису клеток [377]. Это может привести к тому, что клетки, такие как нейтрофилы, будут выделять воспалительные ферменты и цитокины (сублитические концентрации PVL также, по-видимому, вызывают высвобождение этих веществ) [273]. По-видимому, PVL индуцирует апоптоз нейтрофилов через митохондриальный путь при более низких концентрациях, тогда как при более высоких концентрациях PVL индуцирует некроз [281, 318]. В экспериментах *in vivo*, при инъекции внутривенно PVL вызывает дермато некроз у кроликов. Учитывая эти данные и корреляцией между PVL-продуцирующими штаммами CA-MRSA и развитием некротизирующей пневмонией и инфекциями кожи и мягких тканей, представляется правдоподобным, что PVL частично отвечает за повышенную вирулентность CA-MRSA, хотя другие лейкоцидины также могут играть определенную роль. Однако недавние исследования, в которых проводили сравнение вирулентности PVL-положительных и PVL-отрицательных штаммов CA-MRSA, демонстрируют противоречивые результаты [402]. Эти исследования показывают, что взаимосвязь продукции PVL с повышенным уровнем вирулентности *S. aureus* является сложной и противоречивой и требует дальнейшего изучения. Кроме того, обнаружили, что фенолорастворимые модулины, ранее непризнанный класс секретиремых пептидов *S. aureus*, продуцируются именно штаммами CA-MRSA на уровне более высоком по сравнению с уровнем продукции HA-MRSA, и способствуют развитию воспаления, уничтожению нейтрофилов; отвечают за вирулентность в моделях абсцесса и бактериемии [320, 402]. Другие токсины, такие как энтеротоксины, также могут играть важную роль в развитии инфекционных заболеваний, вызванных CA-MRSA.

1.3 Резистентность MRSA к антимикробным химиопрепаратам

Как уже упоминалось, *S. aureus* обладает уникальной высокой адаптивной способностью быстро формировать устойчивость практически к любым антимикробным химиопрепаратам [26, 46]. Антибиотикорезистентность часто приобретается благодаря наличию мигрирующих генетических элементов, передающихся даже от представителей других видов или родов, хотя хромосомные мутации также способствуют формированию антибиотикорезистентности [6, 97]. Мигрирующие генетические элементы формируют кластеры генов, которые обеспечивают антибиотикорезистентность (например, комплекс устойчивости к метициллину *mec* или комплекс резистентности к ванкомицину *vanA*). Тогда как мутации могут обеспечивать устойчивость к новым или синтетическим антибиотикам, которые не имеют естественных аналогов и для которых детерминанты резистентности недоступны в природе (например, для линезолида) [371, 404].

Эволюция различных генетических линий MRSA связана с приобретением детерминант устойчивости к антимикробным химиопрепаратам. Поэтому для некоторых клонов MRSA характерны определенные профили антибиотикорезистентности. Например, линии CA-MRSA сохраняют восприимчивость к большинству не бета-лактамных антибиотиков, однако для клона USA300 характерна антибиотикорезистентность еще и к эритромицину и ципрофлоксацину [169]. Европейский клон CA-MRSA ST80 устойчив к фузидиновой кислоте и тетрациклину [373]. Штаммы LA-MRSA обычно устойчивы к тетрациклину, наиболее часто используемому антибиотику в фермерской промышленности [405]. Линии HA-MRSA, как правило, устойчивы к широкому спектру антибиотиков, включая аминогликозиды, хотя самые последние появляющиеся клоны устойчивы к более узкому спектру антибиотиков. Для EMRSA-15 ST22 характерна антибиотикорезистентность к фторхинолонам и

макролидам, но сохраняет чувствительность к гентамицину [199, 270]. Лионский клон ST8 устойчив к фторхинолонам, чувствителен к гентамицину и может быть чувствителен к другим аминогликозидам и макролидам [168]. Механизмы и генетические детерминанты, определяющие резистентность к наиболее распространенным антимикробным химиопрепаратам, используемым для лечения стафилококковых инфекций, представлены в Таблице 1 [333, 404].

В настоящее время существует ряд новых, недавно разработанных антимикробных химиопрепаратов, которые проявляют хорошую активность в отношении MRSA, названные анти-MRSA препаратами. К таким анти-MRSA препаратам относятся липогликопептиды, такие как телаванцин, далбаванцин, даптомицин и новые антистафилококковые цефалоспорины, такие как цефтобипрол и цефтаролин [381].

Эти два последних антимикробных препарата, как и все бета-лактамы антибиотики являются субстратными аналогами PBP, что приводит к блочному, нарушенному синтезу клеточной стенки и гибели клеток. Но, в отличие от других бета-лактамов, цефтобипрол и цефтаролин обладают высокой аффинностью также для PBP2a, опосредующий устойчивость к метициллину у *S. aureus*, таким образом, эти препараты активны против MRSA [170, 370]. Цефтаролин применяется для терапии ИКМТ, внебольничной пневмонии. У штаммов MRSA существует несколько механизмов устойчивости к цефтаролину: мутации в аллострическом домене белка ПСБ2а (*mecA*); мутации в транспептидажном домене белка ПСБ2а; накопление вторичных мессенджеров цикло-диденозинмонофосфатов; гиперэкспрессия неспецифического эффлюксного насоса [21].

Ванкомицин и другой гликопептидный антибиотик тейкопланин были основой лечения MRSA в течение 30 лет [371]. Изоляты со сниженной восприимчивостью к ванкомицину впервые были описаны в Японии в 1997 году, а затем в нескольких других странах [60, 244]. Эти изоляты MRSA,

имели спектр минимальных ингибиторных концентраций ванкомицина (МПК) в диапазоне от пограничной восприимчивости до полной резистентности [232]. Между этими крайностями присутствовали изоляты с промежуточной восприимчивостью к ванкомицину (VISA) и теми, которые все еще чувствительны, но содержат меньшую популяцию с промежуточной восприимчивостью (гетерогенная VISA или hVISA) [455].

Таблица 1 - Механизмы и генетические детерминанты резистентности к антимикробным химиопрепаратам у штаммов MRSA

Антибиотик	Резистентность гена(ов)	Продукт(ы) генов	Механизм(ы) резистентности	Местоположение
β-лактамы	blaZ	β-лактамаза	Ферментный гидролиз β-лактамного ядра	Плазмида Транспозон
	mecA	PBP2a	Снижение аффинитета к PBP	Хромосома: SCCmec
Гликопептиды	GISA: неизвестно	Модифицированный пептидогликан	Остановка ванкомицина в клеточной стенке	Хромосома
	VRSA: vanA	D-Ala-D-Lac	Синтез дипептида со сниженным аффинитетом к ванкомицину	Плазмида Транспозон
Хинолы	parC	ParC (или GrlA) фрагмент топоизомеразы IV	Мутации в области QRDR, снижение аффинитета ДНК-ферментного комплекса к хинолам	Хромосома
	gyrA или gyrB	GyrA или GyrB фрагменты гиразы		
Аминогликозиды (напр., гентамицин)	Аминогликозид-модифицирующие ферменты (ac, aac, aph)	Ацетилтрансфераза, Фосфотрансфераза	Ацетилирование и/или фосфорилирование аминогликозид-модифицирующих ферментов	Плазмида, Транспозон
Триметоприм-сульфаметоксазол (TMP-SMZ)	Сульфаниламид: sulA	Дигидроптероатсинтаза	Сверхсинтез ферментами парааминобензойной кислоты	Хромосома
	TMP: dfrB	DHFR	Снижение аффинитета к DHFR	
Тетрациклины	Тетрациклин, доксициклин и миноциклин: tetM	Рибосомный защитный белок	Защита рибосом	Плазмида Транспозон
	Тетрациклин: tetK	Эффлюксный белок	Эффлюксный насос	Плазмида
Эритромицин	msrA	Эффлюксный белок	Эффлюксный насос	Плазмида
	erm (A, C)	Рибосомная метилаза (конститутивная или индуцибельная)	Перестройка 23S рНК	Плазмида Транспозоны
Клиндамицин	erm (A, C)	Рибосомная метилаза (конститутивная или индуцибельная)	Перестройка 23S рНК	Плазмида Транспозоны
Линезолид ^а	cfr	Рибосомная метилтрансфераза	Метилирование той 23S рНК, что нарушает связывание с рибосомой	Плазмида
Даптомицин ^б	mrgF	Лизилфосфатидилглицерол (ЛФГ) синтетаза	Повышение: синтез общей ЛФГ, наружного расположения ЛФГ и положительного заряда клеточной мембраны	Хромосомное

Определение принадлежности к VISA и hVISA усложняется проблемами с лабораторными методами, используемыми для проверки антибиотикочувствительности. Эталонным методом определения

чувствительности к ванкомицину является определение МПК методом серийных разведений в бульоне [71, 73]. Для выявления принадлежности к hVISA требуется трудоемкий тест, такой как анализ профиля популяции [357]. Институт клинических и лабораторных стандартов (CLSI) и Европейская комиссия по тестированию чувствительности к антимикробным химиопрепаратам (EUCAST) постановили, что штаммы MRSA относятся восприимчивыми к ванкомицину, если МПК составляет ≤ 1 мкг / мл [75, 77]. Если МПК ≥ 2 мкг / мл, то это указывает на то, что ванкомицин не эффективен против таких изолятов. Однако CLSI сохранила промежуточную категорию МПК 4-8 мкг / мл, характерную для VISA, четко дифференцируя их от резистентного к ванкомицину *S. aureus* (VRSA) с МПК ≥ 16 мкг / мл. Это связано с тем, что разные механизмы резистентности к ванкомицину характерны для VRSA и VISA. Данные различия признаны в номенклатуре также и у EUCAST, в документации которой данные изоляты обозначены как гликопептид-промежуточный *S. aureus* (GISA) и гликопептидорезистентный *S. aureus* (GRSA) с уровнем резистентности низкого уровня и высокого уровня соответственно [77]. Механизм резистентности VISA связан с утолщением клеточной стенки, которая препятствует прохождению ванкомицина к молекулярной мишени, а именно к процессу синтеза пептидогликана на внутренней стороне клеточной стенки. Механизм появления VISA из чувствительных родительских штаммов *in vitro* или *in vivo* связан с различными мутациями или изменением экспрессии генов, обеспечивающих синтез клеточной стенки [371]. В частности, полиморфизмы типа I и типа II локуса регулятора вспомогательного гена (*agr*) или изменения его функции были связаны с формированием VISA и hVISA [248]. В опубликованных отчетах уровень истинных гомогенных изолятов VISA среди штаммов MRSA остается низким [232]. Напротив, изоляты, относящиеся к hVISA более распространены и были обнаружены в большинстве стационаров различных стран, в которых проводили такие исследования. Таким образом, уровень распространенности hVISA может

быть недооценен [427]. В 2003 году показатель распространенности hVISA составил 2 % среди штаммов MRSA и 0,05 % среди штаммов MSSA, хотя были отмечены различия по уровню распространенности в разных стационарах разных стран мира [305]. В России, по данным исследования «МАРАФОН», доля штаммов MRSA с МПК к ванкомицину 2 мкг/мл составила 3,9 % [46]. Так, при МПК 0,5 мкг/мл клиническая неэффективность ванкомицина составляет 48 % и повышается до 90 % при увеличении МПК > 2,0 мкг/мл [38]. Предыдущее лечение ванкомицином и генетические особенности *S. aureus* являются предрасполагающими факторами формирования VISA или hVISA [357]. Штаммы, относящиеся к VISA и hVISA, сформировались среди представителей каждой из основных генетических линий MRSA, включая CA-MRSA USA300 [215]. Также обнаружили такие штаммы среди MSSA. Штаммы, относящиеся к VISA и hVISA, были обнаружены, например среди клональных линий CC5 и CC8 [371]. В мире на сегодняшний день изолировали 18 штаммов, относящихся к VRSA, резистентность которых была подтверждена с помощью молекулярно-генетических методов [357]. Первый штамм VRSA был выделен в Мичигане в 2002 году, подавляющее большинство других штаммов VRSA были изолированы в США, в частности в штате Мичиган [371]. Выделяли изоляты VRSA и в других странах: в Индии, Иране, Бразилии, Португалии, Японии [371].

1.4 Особенности структуры генома штаммов MRSA

Бактериальный геном штаммов MRSA состоит из основных и вспомогательных генов; основная часть генома содержит жизненно важные гены, необходимые для выживания клеток, например гены, кодирующие молекулы, участвующие в метаболизме, синтезе ДНК и РНК, репликации [343]. Пул вспомогательных генов представлен разнообразием генов, кодирующих факторы, необходимые для адаптации бактерий в разных

экологических нишах, например определяющие антибиотикорезистентность, продукцию факторов вирулентности и т.д. [245]. Вспомогательные гены обычно имеют отличающееся соотношение G+C, по сравнению с коровой частью генома, вследствие того, что они зачастую были получены от других видов бактерий [323].

Основной геном изолятов *S. aureus* относительно стабилен, но могут быть обнаружены однонуклеотидные полиморфизмы (SNP) и другие незначительные изменения в коровой части генома [325]. Кроме того, 15-20 % генома *S. aureus* состоит из мобильных генетических элементов, к которым относятся IS-элементы, транспозоны, фаги, плазмиды, острова патогенности, геномные острова и хромосомные кассеты [343]. Эти элементы интегрируются в нескольких местах в геноме, часто рекомбинируют и переносятся в геном и из него [354]. Из-за ограниченной рестрикции, которая контролирует горизонтальный перенос между представителями генетических линий, мобильные генетические элементы имеют тенденцию ассоциироваться с определенной клональной линией [428]. Мобильные генетические элементы кодируют факторы вирулентности, факторы ускользания от иммунитета и гены устойчивости к антимикробным химиопрепаратам [104]. В геномах *S. aureus* встречается очень широкий диапазон комбинаций мобильных генетических элементов.

1.4.1 Структура стафилококковой хромосомной кассеты SCCmec

Одним из важных мобильных генетических элементов является стафилококковая хромосомная кассета SCCmec, которая очень разнообразна по своей структурной организации и генетическому содержанию и классифицирована на типы и подтипы (Рисунок 4) [18, 259]. В настоящее время общепринятой практикой является определение клональной принадлежности MRSA путем определения типа SCCmec и типа ST. Вскоре после первоначального описания SCCmec были описаны несколько

структурно различных элементов SCC_{mec}. Эти элементы разделялись по нескольким характеристикам следующим образом: наличие гена *mecA* в *mec* генетическом комплексе, наличие гена(ов) *ccr* (*ccrAB* и/или *ccrC*) в генетическом комплексе *ccr*, наличие сайта интеграции - ISS, который служит в качестве мишени для *ccr*-зависимой рекомбинации, наличие фланкирующих прямых повторяющихся последовательностей (DR), содержащих ISS [367]. Принадлежность к типу SCC_{mec} определяется комбинацией варианта *ccr* и классом *mec* генетического комплекса. Это ключевые элементы кассеты, ответственные за интеграцию и удаление SCC_{mec} и фенотип устойчивости к бета-лактамам, соответственно [328].

Генетический комплекс *ccr* состоит из гена *ccr* и открытой рамки считывания – ORFs [151]. Существует три варианта гена *ccr* – *ccrA*, *ccrB* и *ccrC*, разделяющиеся в свою очередь на аллотипы. На основании аллельных вариаций в *ccr* генетическом комплексе была определена серия аллотипов [151]. Генетический комплекс *ccr*, обнаруженный у *S. aureus*, может относиться к типу 1 (несущий *ccrA1B1*), типу 2 (несущий *ccrA2B2*), типу 3 (несущий *ccrA3B3*), типу 4 (несущий *ccrA4B4*) и типу 5 (несущий *ccrC*), различия в котором могут быть обнаружены с помощью ПЦР [153].

Генетический комплекс *mec* состоит из гена *mecA*, регуляторных генов и ассоциации инсерционных последовательностей. Класс А генетического комплекса *mec* (класс А *mec*) включает в себя ген *mecA*, регуляторные гены *mecR1* и *mecI*, расположенные левее гена *mecA*, а также гипервариабельный участок (HVR) и IS431, расположенные правее гена *mecA* 280. Класс В генетического комплекса *mec* включает в себя ген *mecA*, укороченный ген *mecR1*, произошедший в результате включения IS1272, расположенного левее гена *mecA*, а также HVR и IS431, расположенных правее гена *mecA*.

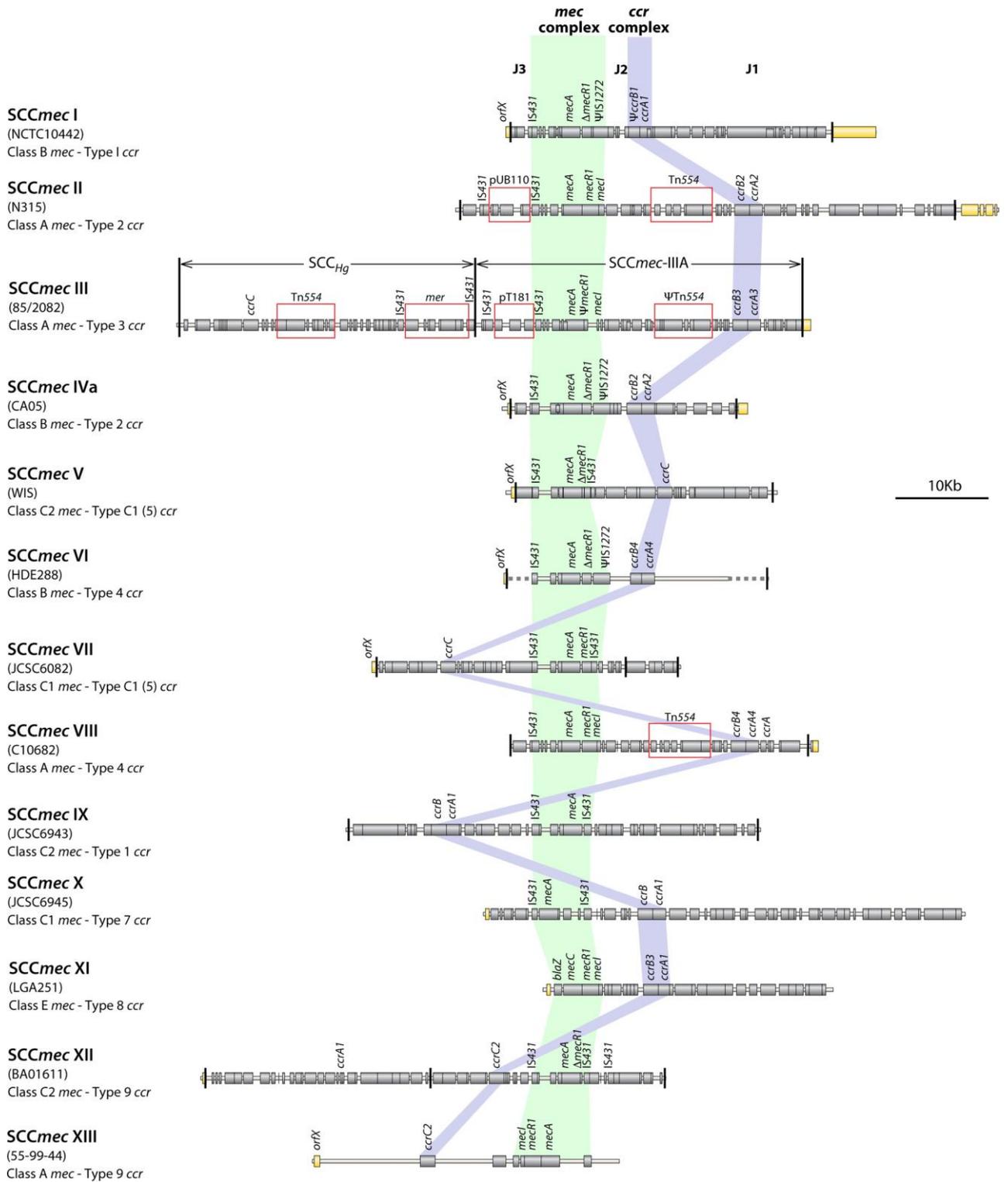


Рисунок 4 – Структура типов SCCmec у штаммов MRSA [307]

Класс С генетического комплекса *meс* включает в себя ген *meсA*, укороченный ген *meсR1*, произошедший в результате включения *IS1272*, расположенного левее гена *meсA*, а также HVR и *IS431*, расположенных

правее гена *tesA*. Класс С подразделяется на: С1 - включает расположенный левее гена *tesA* IS431 и имеющий ту же направленность, что и IS431 расположенный справа (рядом с HVR); в С2 расположенный левее гена *tesA* IS431, имеющего другую направленность. С1 и С2 считаются различными комплексами гена *tes*, так как они, вероятно, развивались независимо. Класс D состоит из *tesA* и Δ MecR1, но не имеет IS последовательности, расположенной левее гена *tesR1*. Было описано несколько вариантов в основных классах комплекса гена *tes*, включающих вставки IS431 или IS1182 левее гена *tesA* в комплексе гена *tes* класса А или вставку Tn4001 правее от гена *tesA* в комплексе класса В *tes*. Эти варианты обозначаются числом, следующим за классом (напр. класс В2, Рисунок 3) [258, 328].

J участки, отличные от *tes* и комплексов генов *ccr*. Элемент SCC*tes* включает в себя три варианта J участка, являющихся не обязательными компонентами кассеты. Эти участки могут нести гены, кодирующие резистентность к антимикробным препаратам. Участок J1 локализован между правым хромосомным переходом и комплексом *ccr*. Участок J2 расположен между *ccr* комплексом и *tes* комплексом. Участок J3 – между *tes* комплексом и переходом к хромосоме слева. Варианты J участков в сочетании с комплексами *tes-ccr* используется для субтипирования варианта SCC*tes* [279, 328].

На сегодняшний день существует 13 типов SCC*tes*, некоторые из которых подразделяются на субтипы [307]. Множество разных структур, включая IS последовательности и транспозоны, были выявлены в составе основных типов SCC*tes*, локализованные в участках, отличных от генетических комплексов *tes* и *ccr*, в J участках. Таким образом, каждый тип SCC*tes* был далее классифицирован на подтипы на основе полиморфизма или вариаций в J-областях в рамках одного и того же комплекса генов *ccr* и комплексной комбинации *tes*-генов. На сегодняшний день для описания подтипов элементов SCC*tes* используются выявление различий в участке J1, например, IVa, IVb и IVc; выражения различий в связи с наличием или

отсутствием мобильных генетических элементов, например, IA, PA и IVA; и различия в каждом участке J1, J2 и J3, например, II.1.1.1, II.1.1.2 и II.2.1.1 [280, 328].

Также были идентифицированы элементы SCC_{mec}, несущие два генетических комплекса *ccr*. Например, стафилококковая хромосомная кассета, имеющаяся у штамма *S. aureus* ZH47 включает в себя *ccrC* и SCC_{mec} класса B2 *mec* (подкласс комплекса гена *mec* класса B, в который был встроен транспозон Tn4001), 2 тип генетического комплекса *ccr* и участок J1, гомологичный с типом SCC_{mec} IVc [259]. Когда идентифицируются составные элементы SCC, несущие два гена *ccr*, следует сопоставить ассоциацию генов *ccr*, комплексов гена *mec* и J областей в композите, чтобы определить, какой существующий тип SCC_{mec} содержит данный штамм. После этого, следует определить ассоциацию элемента SCC_{mec} с другим геном *ccr*, чтобы установить является ли присутствие двух *ccr*-генов результатом двух отдельно интегрированных SCC-элементов и/или композит генерируется путем слияния двух элементов после удаления исходной области соединения, содержащей DR в ISS [258].

Интересно отметить, что у стафилококков также были идентифицированы элементы SCC, в составе которых нет гена *mecA*, но в их составе имеются другие характерные гены, например, кластер генов капсулообразования, антибиотикорезистентности к фузидиновой кислоте или оперон резистентности к ртути [321]. Эти элементы обладают следующими характеристиками с SCC_{mec}: имеют ген(ы) *ccr* (*ccrAB* и/или *ccrC*) в генетическом комплексе *ccr*, ISS в стафилококковой хромосоме и фланкирующие последовательности DR, содержащих ISS [120].

Кроме того, стафилококки могут также обладать SCC-подобными областями, которые имеют ISS, но отличаются от SCC тем, что они не содержат гены *ccr*. Они разнообразны по размеру: от самых коротких (0,1 т.п.н.) до самых длинных (34 т.п.н.). Их называют псевдо-SCC элементами или ψ SCC элементами [259].

В 2011 году García-Álvarez [214] и Shore et al. [451] обнаружили новый тип SCCmec типа XI у *S. aureus*. SCCmec XI имеет структурное сходство с другими известными элементами SCCmec и интегрируется в один и тот же хромосомный локус *orfX*. В отличие от ранее известных элементов SCCmec, несущих *mecA*, этот элемент содержит еще один гомолог *mec*, первоначально обозначенный *mec*_{ALGA251}, а затем как *mecC*. Ген *mecC* на 70 % идентичен с *mecA* на генетическом уровне [214]. Ген *mecC* был выявлен среди штаммов MRSA, циркулирующих на территории 13 европейских стран, и такие штаммы MRSA были изолированы от 14 различных биологических видов [408]. Штаммы MRSA, имеющие ген *mecC* были выделены также от людей с различными инфекционными заболеваниями, преимущественно с инфекциями кожи и мягких тканей, а также с инвазивными инфекциями, такими как сепсис [408].

Аргинин-катаболический подвижный элемент (ACME) был обнаружен путем полногеномного секвенирования штамма клона USA300, относящегося к наиболее распространенным CA-MRSA в Северной Америке [182]. ACME кодирует аргинин-дезаминазу, которая превращает L-аргинин. Кластер из шести генов, *arcRADBC* (*arc* локус) и *opp3* (система олигопептидной пермеазы), представляют собой ACME типа I, присутствующие в составе генома штамма USA300 [182]. Тип I ACME связан с конкретными подтипами SCCmec. Он присутствует в геноме клинических изолятов, относящихся к типу ST8, содержащему SCCmecIVa [198]. Вариант ACME, в котором отсутствует оперон *opp3* и имеются изменения в последовательности ДНК, также был обнаружен у штаммов ST8 MSSA, ST5 (USA100, SCCmecII) и ST59 (USA1000) [369]. Вариант ACME также был обнаружен в штаммах MRSA ST97, несущих SCCmecV [369]. Наличие ACME связано с типом SCCmec и интегрирован в том же сайте *attB* в гене *orfX* [198]. Поэтому вполне вероятно, что рекомбиназы, которые опосредуют удаление SCCmec, также мобилизуют ACME [183].

С открытием нового аллотипа *ccrC2*, был выявлен XII тип SCCmec у штамма *S. aureus* BA01611 [525]. Штамм был выделен из образца при коровьем мастите, собранного на северо-западе Китая. Тип SCCmec XII окружен элементом псевдо-SCC (? SCC), SCCBA01611, несущим усеченный *ccrA1*. Следовательно, SCCmec типа XII представляет собой композицию, состоящую из псевдо-SCC и неповрежденного SCCmec, обозначенного SCCmecBA01611. Однако этот составной SCC не содержит ген устойчивости к антимикробным химиопрепаратам, отличный от *tesA*. Элемент размером 25 т.п.н., демаркированный через два прямых повтора - DR2 и DR3, имеющий 31 открытую рамку считывания (ORF). Данный элемент содержит новый *ccrC*-аллотип *ccrC2*. Кроме того, в типе SCCmec XII были выявлены две субъединицы метилирования системы ограничения (RM) с ограничениями типа III, которые, по-видимому, чрезвычайно редки для *S. aureus*. Элемент псевдо-SCC в SCCmec типа XII содержит 30 ORF, локализованных после *orfX*. Элемент длиной приблизительно 24,3 т.п.н., обозначенный DR1 и DR2, несущий комплекс гена типа 1 *ccr* с усеченным вариантом *ccrA1* [525].

Недавно Vaig с соавторами обнаружили новый SCCmec XIII типа у штамма MRSA ST152, изолированного от 30-летнего датчанина с бактериемией [103]. Этот элемент имеет длину 32,3 т.п.н. и содержит новый ген *ccrC2*. Однако структура его геномного комплекса *tes* похожа на структуру комплекса *tes* класса A (*mecI-mecR1-mecA-IS431*) с дополнительным элементом IS431, расположенным ниже *mecI*. Кроме того, порядок генов в комплексе гена *tes* типа SCCmec XIII инвертирован в сравнении с геномным комплексом класса A *tes*. Более того, он содержит ген устойчивости к гентамицину в транспозоне Tn4001, обнаруженном в J2-области элемента [103].

Хотя происхождение MRSA до сих пор не полностью определено, предполагается, что чувствительный к метициллину *S. aureus* (MSSA) путем горизонтального переноса приобрел ген *tesA* от коагулазо-негативных

стафилококков [515, 522]. Последующие данные свидетельствуют о том, что основные клоны MRSA неоднократно возникали в результате успешного эпидемического распространения штаммов MSSA [201].

Наличие дистанционно связанных линий MRSA указывает на то, что генетические клоны вряд ли произошли от одного общего генетического варианта [201].

Установлено, что некоторые клональные комплексы *S. aureus*, например, CC30 и CC5 чаще ассоциируется с развитием инвазивных заболеваний [210]. Было предположено, что некоторые гены, входящие в состав SCCmec и вне SCCmec элемента определяют взаимосвязь между генетическим вариантом штамма *S. aureus* и способностью к развитию инвазивных заболеваний [218]. Хотя SCCmec имеет решающее значение при формировании резистентности к антимикробным химиопрепаратам штаммов *S. aureus*, нет прямых доказательств того, что наличие и тип SCCmec играет конкретную роль в вирулентности MRSA.

1.4.2 Структура островов патогенности и геномных островов

Стафилококковыми островами патогенности (SaPIs) являются мобильные генетические элементы размером 14-17 т.п.н. [14, 343]. На сегодняшний день не менее чем шестнадцать SaPI были секвенированы, при этом SaPI1 считается прототипом [126]. SaPI образуют когерентное семейство с консервативными генами ядерной части [393]. Гены коровой части включают в себя две открытые рамки считывания, кодирующие транскрипционные регуляторные белки и область, кодирующую интергразу, белок Rep и терминазу [393]. В дополнение к генам ядерной части почти все SaPI кодируют продукцию энтеротоксинов или токсина синдрома токсического шока (TSST) [341]. Элементы SaPI эволюционировали, чтобы использовать бактериофаг в качестве средства для эффективной межклеточной передачи. Остров SaPI1, несущий *tst-1*, обладает системой

упаковки для фаго-опосредованного межклеточного переноса [493]. Остров патогенности SaPI_{bov2} является исключением из этого правила, и вместо этого он содержит белок адгезии Вар, который играет роль в развитии хронических инфекций, например мастита у крупного рогатого скота [489]. Другой остров - SaPI_{bov1} несет небольшую часть бактериофага, которая обеспечивает перенос острова в один из нескольких сайтов связывания в геноме [146]. Подобно профагам, стафилококковые острова патогенности SaPIs интегрированы в определенных участках хромосомного прикрепления (*att*) и находятся под контролем своих главных репрессоров [426]. Однако, в отличие от классических репарационных систем фагов, репрессоры SaPI не являются инактивированными SOS. После инфицирования вспомогательным фагом или SOS-индукцией резидентного вспомогательного профага продуцируется антирецепторный белок, который противодействует репрессору SaPI (*Stl*) [488]. Различные SaPI вновь активируются с помощью различных фаговых антирепрессоров [392]. Антирепрессоры с фаговым кодированием идентифицированы только для очень немногих SaPI: dUTPase для SaPI₂ и SaPI_{bov1}, *Sri* для SaPI₁ и 80a, GP15 для SaPI_{bov2} [393]. SaRI имеет, по существу, ту же структуру что и SaPI, но он несет ген устойчивости к фузидиевой кислоте вместо гена вирулентности [395].

Другой класс островков *vSa* находится в геноме *S. aureus*, они несут много генов, связанных с вирулентностью, но не имеют генов для их межклеточного перемещения [245]. Островки *vSa* фланкированы измененным геном транспозазы, расположенным выше и ниже системой с частичной рестрикционной модификацией (RM) типа I. Учитывая состав геномных островов, а именно наличие остаточных генов транспозазы и процент содержания G+C, отличающийся от состава основного генома, говорит в том, что геномные острова когда-то были мобильными элементами. Острова *vSa α* , *vSa β* , *vSa γ* , *vSa δ* , *vSa ϵ* относятся к этому классу островов [217], например, *vSa α* содержит ряд генов *ssl* (стафилококковых суперантигенподобных) и кластер генов липопротеинов *lpl* [212, 309].

Геномный остров *vSaβ* кодирует синтез бактериоцинов, энтеротоксинов, гиалуронидазы и кластер генов сериновой протеазы. Геномный остров *vSaδ* (ранее обозначаемый *vSaγ*) имеет гены, кодирующие эксфолиативный токсин D (ETD) и ингибитор дифференцировки эпидермальных клеток (EDIN). Геномный остров *vSaε* имеет вспомогательные регуляторы гена T и U, участвующие в регуляции вирулентности, и кластеры генов кодирующих продукцию липопротеинов и фибронектинсвязывающих белков [102].

1.4.3 Структура плазмид

Плазмиды являются аутореплицирующимися молекулами ДНК. Стафилококки обычно переносят одну или несколько копий плазмид в клетке и в составе плазмид имеются разнообразные гены [343]. Стафилококковые плазмиды могут быть отнесены к одной из трех следующих групп: небольшие многокопийные плазмиды, которые несут единую детерминанту резистентности; более крупные - 15-30 т.п.н., низкокопийные (4-6 на клетку) плазмиды, которые обычно несут несколько детерминант резистентности; конъюгативные плазмиды мультирезистентности к антимикробным химиопрепаратам [418]. Большие плазмиды подвергаются тета-репликации, тогда как маленькие плазмиды, обычно, реплицируются механизмом катящегося кольца [287, 324]. Вследствие ограниченной способности *S. aureus* приобретать ДНК из окружающей среды (низкая естественная компетентность) по сравнению с бактериями, такими как *Escherichia coli* или *Bacillus subtilis*, большая часть межклеточного переноса стафилококковых плазмид происходит путем трансдукции или конъюгации [383]. При входе в бактериальную клетку стафилококковые плазмиды остаются в виде свободной циркулирующей ДНК или интегрируются в хромосому. Так, устойчивость к пенициллину обеспечивается β-лактамазой, которая кодируется геном *blaZ* и тесно связанными регуляторными генами *blaI* и *blaR*, локализованными в составе плазмиды [329]. Помимо β-лактамазы,

кодируемой плазмидными генами, гены *bla* могут быть расположены в транспозонах или внутри хромосомной ДНК [512].

В процессе эволюции штаммы *S. aureus* приобрели гены резистентности к ванкомицину от энтерококков. Это привело к появлению резистентного к ванкомицину *S. aureus* (VRSA), опосредуемого наличием гена *VanA* [404, 541]. Механизм резистентности ванкомицин-промежуточных штаммов *S. aureus* (VISA, МПК: 4-8 мг/мл) связан с мутациями в гене *vSRSR*, определяющего промежуточную устойчивость к ванкомицину через систему регуляции (двухкомпонентную систему регуляторов для синтеза клеточной стенки *S. aureus*) [305]. Мутации в генах *vraS* (H5N) и *vraS* (S329L) конститутивно активируют регуляторную систему и усиливают синтез клеточной стенки. Сопутствующее увеличение резистентности наблюдалось в отношении антимикробных химиопрепаратов - ингибиторов синтеза клеточной стенки, таких как β -лактамы, фосфомицин, бацитрацин и гликопептиды [245, 507]. Транспозон Tn1546 в составе конъюгативной плазмиды имеет кластер генов, кодирующих устойчивость к ванкомицину. Данный мигрирующий элемент, скорее всего, переносится в геном штаммов MRSA от энтерококков, устойчивых к ванкомицину (VRE) во время коинфекции [106]. Энтерококковая плазида может находиться в клетке, например у штаммов VRSA-3, 5 и 6, либо Tn1546 может быть включен в стафилококковую плазмиду, например у штаммов VRSA-1, 7, 8, 9 и 10 или в плазмиду pLW1043 [345]. Транспозон Tn1546 кодирует оперон *vanA*, состоящий из *vanA*, *vanH*, *vanX*, *vanS*, *vanR*, *vanY* и *vanZ* [365]. Интересно, что для второго выделенного VRSA-изолята, зарегистрированного в США (VRSA-2), *van* оперон находится в усеченном Tn1546 в составе необычно большой для *S. aureus* плазмиды размером 120 т.п.н. [506]. Гены *vanA* и *vanH* ответственны за синтез предшественника D-Ala-D-Lac, который имеет гораздо более низкое сродство к гликопептидным антибиотикам, по сравнению с исходным D-Ala-D-Ala. Ген *vanX* кодирует дипептидазу, которая играет роль в устранении мишеней D-Ala-D-Ala дикого типа путем

гидролиза [496]. Экспрессия генов устойчивости к ванкомицину происходит только в присутствии ванкомицина в результате процесса, опосредованного двухкомпонентной системой сигнальной трансдукции, кодируемой генами *vanS* и *vanR*. Гены *vanY* и *vanZ* кодируют дополнительный белок, который может играть роль в резистентности к тейкопланину [427]. В дополнение к генам, кодирующим устойчивость к антимикробным химиопрепаратам и молекулам, участвующим в метаболизме, стафилококковые плазмиды кодируют устойчивость к различным органическим и неорганическим веществам, таким как кадмий, ртуть, арсенат и т. д., которые являются высокотоксичными для живых клеток. Стафилококковые плазмиды также могут переносить гены токсинообразования. Например, гены, кодирующие продукцию эксфолиатинов, расположены на фагах *uETA*, *uETA2* и *uETA3*, геномном острове *mSAs* и на плазмиде *pETB* [211].

1.4.4 Структура IS-последовательностей, транспозонов (Tn)

Транспозоны и IS-последовательности широко распространены в составе генома среди штаммов *S. aureus*. Они могут присутствовать в виде одной копии или в нескольких экземплярах в геноме или в сочетании с другими мигрирующими элементами [343]. Хотя IS-последовательности могут существовать независимо друг от друга в составе генома *S. aureus*, они часто представляют собой пары, входящие в состав транспозона [293]. Вставка IS-последовательности в различные локусы может вызывать изменения в экспрессии генов в основной хромосоме. Кроме того, IS-последовательности инактивируют гены путем прямой инсерции или оказывает полярный эффект на транскрипцию соседних генов [264]. Активация генов в непосредственной близости IS-последовательностей обычно опосредуется промоторами, переносимыми IS-последовательностями или путем образования гибрида промотора с нативным промотором определенного гена [343]. Например, *IS257* в дополнение к составу

композиционного транспозона Tn4003 образуют гибридный промотор для оперона с резистентностью к триметоприму (*dfrA*). IS256 был впервые описан как часть транспозона Tn 4001, который содержит ген *aacA-aphD* и опосредует резистентность к аминогликозидам у нозокомиального штамма *S. aureus* [293, 343]. Он имеет длину 1324 п.н., единственный ген *tnpA* кодирует DDE-транспозазу, которая содержит два Asp и один остаток Glu в его активном сайте; концы IS256 образованы двумя несовершенными инвертированными повторами (IRL и IRR). Кроме того, вставки IS256 создаются двумя прямыми повторами с участками длиной 8 п.н., которые формируются путем дублирования последовательности-мишени во время транспозиции [386]. Элементы IS256 переносятся посредством механизма «копировать и вставлять», тем самым приводя к накоплению их копий в геноме, поскольку каждая транспозиция будет увеличивать число копий на единицу. Интеграция одного инсерционного элемента (IS) в ген или его промотор может приводить к инактивации или сверхэкспрессии данного гена. Таким образом, элементы IS256 являются факторами изменения активности таких процессов как образование биопленок или изменения активности сигма-фактора В у штаммов *S. aureus* и *Staphylococcus epidermidis*. Кроме того, было показано, что у *S. aureus* IS256 участвует в регуляции генов устойчивости к антимикробным химиопрепаратам и вирулентности; например, введение IS256 в промотор *rot* приводило к повышению вирулентности *S. aureus* представителя клона USA500 [293].

У штаммов *S. aureus* транспозоны (Tn) преимущественно кодируют гены устойчивости к антимикробным химиопрепаратам. Малые по размеру транспозоны обычно представлены в стафилококковом геноме в нескольких экземплярах, при этом либо входят в состав самой хромосомы, либо находятся в составе мигрирующих генетических элементов, таких как *SCCmec* или в составе плазмид [343]. Эта группа включает Tn554 и Tn552, которые кодируют устойчивость к антимикробным химиопрепаратам, например, спектиномицину [268]. Для сравнения, большие транспозоны

длиной 18 т.п.н. присутствуют в единственной копии и кодируют устойчивость к антимикробным химиопрепаратам, таким как тетрациклины, триметоприм, аминогликозиды, ванкомицину [308, 461].

1.4.5 Структура бактериофагов

Размер генома бактериофагов варьирует от 16-18 т.п.н. до 120-140 т.п.н. Геном бактериофага обычно объединяет шесть функциональных модулей, обеспечивающих следующее: лизогению, репликацию ДНК, упаковку, головку, хвост и лизис [175]. Примерно 50-70 открытых рамок считывания приходится на геном бактериофага. Модуль, обеспечивающий лизогению, состоит из протеина интегразы и регулятора, *CI* и *Сго*, соответственно. Переключение между лизогенным и литическим состояниями контролируется на молекулярном уровне: фаг останется в лизогенном состоянии, если преобладает *CI*, но будет преобразован в литический цикл, если преобладает *Сго*. Модуль, обеспечивающий репликацию ДНК, расположен ниже от модуля лизогении, может быть вовлечен в перенаправление метаболизма ДНК хозяина для репликации ДНК фага, так как в этом участке можно идентифицировать различные ДНК-связывающие фрагменты и предполагаемые нуклеазы. Было обнаружено, что три гена в этом участке участвуют в мобилизации островов патогенности *S. aureus* SaPIs. Выход и репликация SaPIs нуждаются в наличии вспомогательного фага. После индукции резидентного вспомогательного фага или суперинфекции с помощью вспомогательного фага геном SaPI вырезают, реплицируют и упаковывают в структурные белки фага-помощника с образованием инфекционных частиц SaPI, капсид которых обычно составляет 1/3 от размера его помощника [392]. Модули упаковки ДНК и морфогенеза локализованы между модулем репликации ДНК и хвостовым модулем. В последнее время подробно изучены функции нескольких генов в этой области. Белок *RinA* оказывает регуляторную

функцию - он связывается с оператором, расположенным выше гена *terS*, и активирует транскрипцию позднего оперона, покрывающего модули морфогенеза и лизиса [204].

Эволюция фаговых линий, по-видимому, обусловлена переносом генов взаимозаменяемых генетических элементов (модулей), которые состоят из функционально родственных генов. У фагов Siphoviridae обычно шесть функциональных модулей: лизогения, репликация ДНК, упаковка, голова, хвост и лизис [276]. Функциональный модуль, найденный в одном фаге, может быть заменен другим модулем, не связанным с последовательностью, который выполняет те же или связанные функции, при этом часто гены внутри таких модулей перемещаются вместе [527]. Таким образом, множественные варианты геномов фагов *S. aureus* имеют химерную и мозаичную структуру, являющуюся результатом горизонтального переноса и процессов рекомбинации [353]. В геноме штаммов *S. aureus* было описано несколько факторов вирулентности, закодированных в фагах. Положительная лизогенная фаговая конверсия различных факторов вирулентности была описана для генов, кодирующих продукцию лейкоцидина Пантон-Валентина (*lukSF*), эксфолиативного токсина А (*eta*), белка клеточной стенки SasX и кластера генов ускользания от иммунного надзора (IEC), состоящего из энтеротоксина SEA (*sea*), стафилокиназы (*sak*), ингибирующего хемотаксис белка (*chp*) и ингибитора стафилококкового комплемента (*scn*) [319]. Нарушение функции хромосомных факторов посредством интеграции фагов было названо отрицательной конверсией, примером которой является интеграция фагов Sa3int и Sabint в ген *hly*, кодирующий б-гемолизин или ген *geh*, кодирующий липазу. В большинстве случаев конверсия фагов может быть связана с развитием конкретных заболеваний, вследствие наличия генов, кодирующих токсинообразование [527].

1.5 Определение принадлежности MRSA

Используются фенотипические методы, а именно: выделенные штаммы *S. aureus* проверяют на устойчивость к метициллину методом скрининга - дискодиффузии [312]. Наиболее достоверный метод скрининга заключается в применении диска с цефокситином на агаре Мюллера-Хинтона. Другой вариант метода скрининга – культивирование штаммов *S. aureus* на агаре Мюллера-Хинтона с добавлением 6 мкг / мл оксациллина и 4% NaCl (в соответствии с рекомендациями CLSI) [69]. Первоначально оксациллин использовался в качестве маркерного антибиотика для определения принадлежности MRSA, однако в настоящее время CLSI рекомендует использовать цефокситин, так как он является лучшим в плане детекции принадлежности MRSA, чем оксациллин, [69]. Метод скрининга с цефокситином более четко определяет фенотипически и позволяет определить принадлежность к MRSA как в случае наличия генов как *mecA*, так и *mecC*. Для получения достоверных результатов и предотвращения ложных отрицательных результатов при проведении метода дискодиффузии необходимо строго придерживаться конкретных правил: выдерживать температуру культивирования 35 °С, время культивирования - 24 часа. Это связано с тем, что белок RBP2a, закодированный в гене *mecA* менее эффективен при сшивании пентапептидных цепей пептидогликана клеточной стенки во время синтеза клеточной стенки, что приводит к более медленному росту резистентных изолятов. Это явление приводит к гетеростабильной популяции, в которой клетки обладают разным уровнем резистентности, а некоторые фенотипически восприимчивы, хотя генотипически являются резистентными [312]. Вышеупомянутые рекомендации по тестированию на чувствительность к цефокситину позволяют обнаруживать в гетерогенной популяции более медленно растущие субпопуляции MRSA. Некоторые штаммы MRSA могут определяться фенотипически как чувствительные к цефокситину (и оксациллину) и для их выявления требуется воздействие

низких концентраций цефокситина [413]. В этом случае следует учитывать присутствие индуцибельного гена *mecA*. Помимо синтеза модифицированных PBP2a, устойчивость к метициллину также может определяться другими механизмами. Одним из примеров является стафилококковые штаммы *S. aureus* с пограничной устойчивостью к оксациллину (BORSA); они демонстрируют низкую, пограничную устойчивость и в отличие от MRSA, не имеют генов *mecA* или *mecC*. Штаммы BORSA нельзя классифицировать как метициллин-резистентные или метициллин-чувствительные; их устойчивость менее выражена, чем определяемая наличием PBP2a и является результатом других механизмов [250]. Первоначально к BORSA относили штаммы с МПК к оксациллину 2 мкг / мл, однако дальнейшие исследования показали, что МПК к оксациллину для некоторых штаммов BORSA может быть выше (4-16 мкг / мл) [457]. Пограничная устойчивость к оксациллину у штаммов *S. aureus* может определяться гиперпродукцией бета-лактамаз [250]. Также есть другие механизмы формирования фенотипа BORSA, включая синтез новых бета-лактамаз, кодируемых плазмидой или модификация генов PBP, возникающих в результате спонтанных аминокислотных замещений в транспептидазном домене [250]. Эти модификации обычно включают PBP3 и / или PBP4, в результате селективного давления бета-лактаманного антибиотика. В отличие от BORSA, гиперпродуцирующих бета-лактамазы, такие штаммы относят к модифицированным *S. aureus* (MODSA) [272].

Принадлежность выделенной культуры *S. aureus* к MRSA также может быть обнаружена с помощью теста латекс-агглютинации на основе взаимодействия антиген-антитело, который обнаруживает наличие PBP2a посредством использования анти-PBP2a-антител. Кроме того, несколько автоматизированных инструментов, выполняющих тесты по идентификации и определяющих чувствительность стафилококков к антимикробным химиопрепаратам, продемонстрировали высокую чувствительность и специфичность для тестируемых штаммов MRSA [518].

Одним из наиболее перспективных методов прямой идентификации MRSA является матрица лазерной десорбционно-ионизирующей временной пролетной масс-спектрометрии (MALDI-TOF MS). Идентификация основана на сравнении полученного белкового профиля по масс-спектрометрии бактериального или грибкового образца с базой данных профилей [399].

Современные методы, основанные на детекции ДНК для прямого обнаружения MRSA, в клинических образцах представляют собой мультиплексные ПЦР в режиме реального времени для обнаружения *S. aureus* и наличия гена *mecA* [312]. Результаты получают примерно через 1,5 часа. Также используются генетические методы, в частности ПЦР для определения генов *mecA* или *mecC*.

1.6 Генетические методы типирования MRSA, полногеномное секвенирование

Во время расследования вспышек, вызванных MRSA, с целью выяснения источников инфекции и путей распространения для определения степени родства, выделенные изоляты могут быть генотипированы. Часто результаты генотипирования недоступны до тех пор, пока не закончится «вспышка» [95, 465]. Определение того, какие генетические варианты явились причиной развития вспышки, может быть ценным инструментом при проведении противоэпидемических мероприятий. Типирование изолятов часто выполняется в удаленных референтных лабораториях, поэтому может быть существенная задержка в получении и интерпретации данных. Возможные генетические вариации между изолятами MRSA, выделенных во время вспышки, диктуют необходимость включения в исследование в качестве контроля актуальные изоляты, типичные для палаты или больницы конкретного региона. В противном случае результаты типирования не позволят определить, какая группа изолятов была частью вспышки. Штаммы MRSA наиболее часто встречаются и вызывают инфекционные заболевания в

медицинских учреждениях по сравнению с внебольничными условиями. Поэтому распространение MRSA в стационарах может рассматриваться как клинически более значимое и, скорее всего, связано с низким инфекционным контролем. В исследовании, проведенном в Великобритании, показано, что почти 2 % пациентов при госпитализации были колонизированы MRSA, в то время как в американском исследовании выявили уровень догоспитальной колонизации MRSA - 4 % [266]. Колонизированные пациенты не только подвержены более высокому риску инфицирования, но они являются резервуаром таких изолятов для окружающих. MRSA распространяется от пациента к пациенту посредством прямого контакта, через оборудование, инструменты, персонал, посетителей или окружающую среду [167].

Популярные методы типирования штаммов MRSA часто включают в себя *sra* типирование, MLST типирование, которые могут быть полезны для классификации небольших вариантов линий, но это иногда бывает ненадежно и стабильность этих маркеров не всегда достоверна. В большинстве стационаров распространены только одна или две доминирующие линии MRSA, поэтому эти методы не всегда являются полезными при расследовании вспышки [465]. Гель-электрофорез в пульсирующем поле (PFGE) может надежно обнаруживать принадлежность к определенной генетической линии, если реакцию выполняет опытный сотрудник. Метод PFGE основан на обнаружении размера 10-20 геномных фрагментов ДНК после обработки рестрикционным ферментом SmaI. Когда мигрирующие элементы перемещаются или выходят из состава генома, профиль бандов PFGE может измениться, поэтому этот метод может указывать на некоторые (но не все) генетические вариации между изолятами [481]. Другие способы генотипирования, такие как MLVA, также могут обнаруживать некоторые изменения в спектре мигрирующих элементов [465]. Микрочипы способны обнаруживать родословную и наличие или отсутствие конкретных мигрирующих элементов, в зависимости от экстенсивности ДНК-зондов на матрице. Они могут быть быстрыми и

недорогими, чтобы фиксировать вариации в основных циркулирующих клонах MRSA [354, 465]. Существует ряд методов генотипирования, которые основаны на ПЦР, такие как полиморфизм длины амплифицированного фрагмента (AFLP), случайная амплификация полиморфной ДНК (RAPD) и ПЦР повторяющихся элементов (Rep-PCR) [307]. Проводится анализ полиморфизма длин рестриционных фрагментов продуктов амплификации переменного региона коагуляционного гена (*coa*-ПЦР-ПДРФ) [1].

История технологий секвенирования может быть разбита на три этапа: секвенирование первого, второго и третьего поколений [238, 325]. Революция в секвенировании началась с изобретения метода «цепной мишени», в настоящий момент называемого секвенированием Сэнгера [238, 439]. Совершенствование метода, связанное с использованием улучшенных наборов для секвенирования, а также с переходом на капиллярный электрофорез привели к появлению современных машин Sanger, которые обеспечивают низкое пропускное, но высококачественное считывание ДНК, протяженностью до ~ 1 т.п.н. Секвенирование Сэнгера по-прежнему часто называют «золотым стандартом» и обычно используется для целенаправленной проверки результатов с более высокой пропускной способностью. В первом десятилетии XXI века было разработано несколько новых методов секвенирования ДНК [315]. В отличие от платформ первого поколения, новые технологии второго поколения значительно сократили количество считываний, но значительно увеличили пропускную способность (до миллиарда прочтений за один прогон) [95]. Обычные короткочитаемые платформы, основанные на флуоресценции, включают в себя секвенирование Illumina с помощью технологий синтеза, например HiSeq и MiSeq, пиросеквенирование Roche 454 и секвенирование Applied Biosystem лигирования и обнаружения олигонуклеотидов (SOLiD). Дополнительные платформы с коротким чтением включают в себя секвенаторы Ion Torrent, которые обнаруживают нуклеотиды по разнице в pH в результате выявления ионов водорода, испускаемых во время полимеризации, в отличие от

световых сигналов [95]. Хотя данные платформы с коротким чтением позволили ученым быстро выявлять мутации в группе генов, ответственных за развитие заболеваний и даже выявлять полную структуру генома как в исследовательских, так и в клинических целях [298], все они имеют общие недостатки. Короткие прочтения препятствуют прочтению сложных частей генома [316], выявлению геномных вариаций, выявлению распределений областей повторов и расположения пробелов и неоднозначных областей в сборках *de novo* [95, 356]. В стадии амплификации во время подготовки библиотеки и/или в реальной реакции секвенирования также получаются химерные чтения [229], вариации в размерах повторов и неполная информация о наличии GC-богатых / бедных участков. В совокупности эти недостатки препятствуют использованию метода в диагностических целях.

Секвенирование третьего поколения в целом характеризуется как одномолекулярное секвенирование и принципиально отличается от методов секвенирования второго поколения. Helicos обеспечил первое коммерческое применение одномолекулярного секвенирования на основе детекции флуоресценции и секвенирования методом синтеза. Несмотря на отсутствие недостатков, таких как неполное представление GC-богатых / бедных участков, ранний вариант одномолекулярного секвенирования все еще осуществлял короткие (часто 35 п.н.) длины прочтения [95]. Новые современные технологии, такие как одномолекулярное секвенирование в реальном времени (SMRT Pacific Biosciences, PacBio) секвенирование и секвенирование с использованием нанопор от Oxford Nanopore Technologies имеют преимущества по сравнению с ранним одномолекулярным секвенированием, например, возможность получения длинных прочтений (> 20 т.п.н.). Эти платформы позволяют секвенировать / собирать повторяющиеся участки, выявлять вариативные участки и выявлять эпигенетические модификации [262]. Секвенирование длится несколько часов, что определяет его важное значение для диагностики.

Для проведения SMRT секвенирования должна быть подготовлена библиотека из двухцепочечной ДНК (Рисунок 5 А). Обычно для этого требуется пять или более микрограмм ДНК [95]. Подготовка библиотеки предполагает использование простых лигационных шпилек кольцевой конструкции комплементарных молекуле ДНК, называемые SMRTbell (Рисунок 5 В) [491]. Затем к адаптеру отжигают праймер и полимеразу, после чего библиотека загружается в ячейку SMRT, содержащую 150000 наноразмерных камер наблюдения (волноводы с нулевым режимом - ZMW) для системы RSII и до миллиона на новой платформе Sequel. Затем связанные с полимеразой SMRTbells загружаются в ZMW (Рисунок 5 С). В идеале, сколько ZMW было загружено, столько и должно быть загружено SMRTbell, чтобы максимально увеличить пропускную способность и длину чтения. Для хорошего результата секвенирования это составляет от одной трети до половины ZMW. Следовательно, ячейка SMRT обычно производит ~55000 считываний для системы RSII и 365000 считываний для системы Sequel. Фактически реакция секвенирования происходит в каждом ZMW, малый диаметр которого позволяет выявить наименьший доступный объем обнаруживаемой флуоресценции [431]. Сквозь дно в каждую ZMW ячейку подаётся свет, при этом световая волна широко не распространяется и оставляет освещённым только объём дна ячейки порядка 20 пиктолитров. Полимераза внутри каждого ZMW достраивает флуоресцентно меченые нуклеотиды, излучающие флуоресцентный сигнал, который синхронизируется камерой в реальном времени (Рисунок 5 С). Выявляют флуоресценцию каждой флуоресцентной метки, сшитой с нуклеотидом, который в конкретный момент присоединяется ДНК-полимеразой.

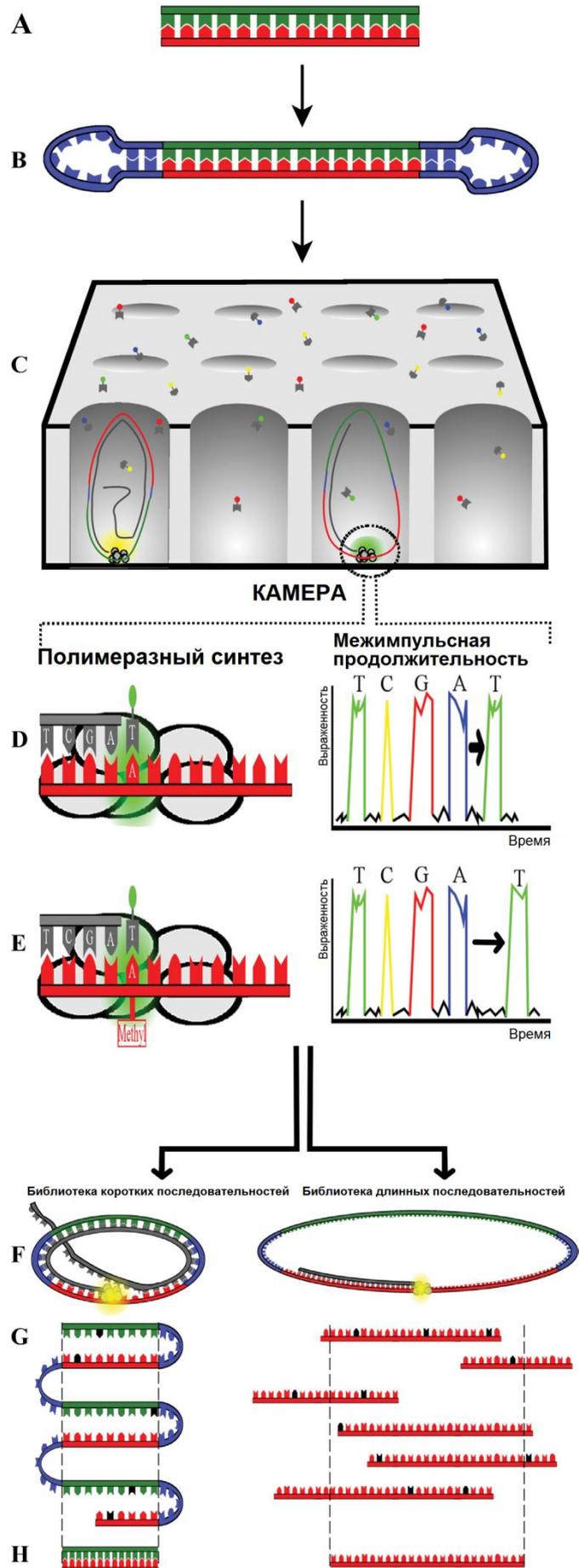


Рисунок 5 – Технология секвенирования третьего поколения [95]

Так как к четырем типам нуклеотидов пришиты разные флуоресцентные метки, это позволяет различать их между собой. Таким образом, получают зависимость интенсивности флуоресценции от времени. В результате выстраивается график, в котором по пикам разного спектра определяется геномная последовательность. Эти сигналы преобразуются в длинные последовательности, называемые непрерывными длинными считываниями (CLR) [431].

Все подпрограммы из одной и той же молекулы могут быть объединены в одну высокоточную консенсусную последовательность, называемую круговой консенсусной последовательностью (CCS) или считыванием вставки (ROI) (Рисунок 5 F-H, левая часть). Благодаря обнаружению скорости присоединения нуклеотидов в режиме реального времени темпы прохождения полимеразы через цепь ДНК регистрируются во время секвенирования [95]. Считывание - это не заданная длина чтения, а распределение длительностей чтения в зависимости от продолжительности работы каждой отдельной полимеразы. Поскольку нет необходимости в усилении во время подготовки библиотеки или во время процесса секвенирования, дефекты в результатах секвенирования, такие как определение GC-богатых / бедных участков, отсутствуют. В отличие от платформ второго поколения PacBio также отличаются по типам ошибок и имеют более высокий уровень (~ 13-15 %), хотя они распределены при чтении случайным образом [138, 141]. Возможно повысить точность метода путем повторного определения последовательности одной и той же молекулы (> 99 %), а также разбивая или комбинируя различные CLR, полученные из одного и того же локуса (Рисунок 5 G и H).

Для сопоставления полученных разных прочтений необходим биоинформационный анализ, требующий адаптации текущих инструментов и/или разработки новых методов, обеспечивающих выравнивание [138, 303, 326, 523] и сборку генома [277, 300, 501, 528]. Многие специализированные инструменты PacBio (в том числе необходимые для демультиплексирования,

анализа CCS-прочтений, анализа длинных ампликонов, сборки *de novo* и эпигенетического анализа) доступны в пакете анализа SMRT от PacBio и находятся в открытом доступе (www.pacb.com/support/softwaredownloads/). Можно использовать командную строку или графический интерфейс пользователя SMRT Portal и SMRT Link [95].

Заключение по обзору литературы

Таким образом, необходим мониторинг частоты встречаемости MRSA как в здоровой популяции людей, а теперь и животных, так и среди больных с различными нозологиями. Изучение молекулярно-генетических особенностей микроорганизмов, в частности MRSA, проводится во всем мире, начиная с момента появления таких штаммов. В настоящий момент для понимания механизмов вирулентности высокоадаптивных и пластичных микроорганизмов, таких как MRSA, необходимо изучать их молекулярно-генетические особенности и проводить данные исследования на постоянной основе. Также необходимо выявлять уровень и механизмы антибиотикорезистентности у штаммов MRSA. Разработка схем типирования MRSA и изучения механизмов резистентности к антимикробным препаратам прошла путь от фаготипирования до широкого разнообразия высокотехнологичных молекулярно-генетических методов. Однако в лабораторной диагностике инфекций вызванных MRSA, в РФ зачастую используется только бактериологический метод и метод скрининга. Вместе с тем вопрос о генотипировании штаммов MRSA в рутинной практике остается открытым, несмотря на то, что разработаны действующие нормативно-методические документы [8]. Молекулярно-генетические методы, применяемые для генотипирования, выявления спектра факторов вирулентности, механизмов антибиотикорезистентности достаточно трудоемки и зачастую не доступны с материальной точки зрения и требуют дальнейшего развития. В связи с этим разработка и внедрение доступных

молекулярно-генетических технологий амплификации нуклеиновых кислот позволят с новых позиций подойти к совершенствованию лабораторной типизации штаммов, выявления основных факторов вирулентности и антибиотикорезистентности, что расширит возможности практических лабораторий по выявлению эпидемиологии и профилактики, а также лечения инфекций, вызванных MRSA.

ОСНОВНАЯ ЧАСТЬ

ГЛАВА 2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1 Материалы

2.1.1 Штаммы микроорганизмов

В работе использованы типовые коллекционные штаммы микроорганизмов (Таблица 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 год (Таблица 3, 4).

Выделенные изоляты хранились на среде, содержащей 70 % триптиказо-соевого бульона (Becton Dickinson, США) и 30 % глицерина (Pharm grade Panreac, Испания) и разлитой в пробирки для криоконсервации при -80 °С в низкотемпературном холодильнике (Sanyo, Япония). Для проведения исследований штаммы микроорганизмов выращивали на среде триптиказо-соевый бульон BBL (Becton Dickinson, США) с добавлением агарозы (Pronadisa, Conda, Испания).

Работа со штаммами микроорганизмов выполнялась в соответствии с санитарно-эпидемиологическими правилами [67].

Таблица 2 – Коллекционные штаммы микроорганизмов, использованные в работе

№	Вид микроорганизма и номер штамма	Коллекция
1	2	3
1.	<i>S. aureus</i> ATCC 25923	American Type Culture Collection
2.	MRSA ATCC 27664	
3.	MRSA ATCC 31890	
4.	<i>E. coli</i> ATCC 25922	
5.	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	

1	2	3
6.	MRSA NPk1 - SCCmec type II.1.1.1	коллекция Т. Yamamoto
7.	MRSA NCTC10442 - SCCmec I -	International Working Group on SCCmec (IWG-SCC)
8.	MRSA N315 - SCCmec II	
9.	MRSA 85/2082SCCmec III -	
10.	MRSA JCSC1968 - SCCmec IVa	
11.	MRSA JCSC1978 - SCCmec IVb	
12.	MRSA JCSC4788 - SCCmec IVc	
13.	MRSA JCSC4469 - SCCmec IVd	
14.	MRSA WIS - SCCmec V(5C2)	
15.	MRSA PM1 - SCCmec V(5C2&5)	
16.	Штамм ANS46 MRSA, выделенный в Австралии в 1982 г. с генотипом ST239/SCCmecIII.1.1.1	коллекция Н. de Lancastre
17.	Штамм HU25 относится к Бразильскому клону, полученный в Бразилии в 1993 г., с генотипом ST239/SCCmecIII.1.1.2 (ША)	
18.	Штамм MRSA BK2464 относится к New York/Japan клону (не имеет TSST-1), полученный в 1996 г. в США, с генотипом ST5/SCCmecII	
19.	Штамм HAR24, относится к клону EMRSA-16 с генотипом ST36/SCCmecII	
20.	MRSA Mu50	коллекция К. Hiramatsu
21.	Штамм MRSA N315, относится к клону New York/Japan с генотипом ST5/SCCmecII, (имеет TSST-1, в составе SaPI _{m1} /n1)	
22.	Штамм MRSA NN33, относится к клону New York/Japan, получен в Гифу (Япония) в 2006 г. от младенца с низкой массой тела с некротизирующим фасциитом	
23.	Штамм MRSA T1, относится к клону New York/Japan, получен в г. Ниигата в 2003 г. от мужчины 59 лет с СТШ	коллекция Т. Yamamoto
24.	MRSA T2	
25.	MRSA COL	
26.	MRSA FRI-1151m	
27.	MRSA USA400	
28.	MRSA NN12	
29.	MRSA NN13	
30.	MRSA 0345	
31.	MRSA NN4	
32.	CA-MRSA PM1 (PVL+ ST59/SCCmecV)	

Таблица 3 – Протипированные штаммы MRSA, выделенные от здоровых бактерионосителей

№	Вид микроорганизма	Количество штаммов	Категория обследованных
1	2	3	4
1.	MRSA	7	Дети дома ребенка

1	2	3	4
2.	MRSA	1	Студенты медицинского университета
3.	MRSA	10	Медицинские работники различных отделений крупных красноярских стационаров
4.	MRSA	12	Обследованные на дисбактериоз
	ИТОГО	30	

Таблица 4 – Протипированные штаммы MRSA, выделенные от больных с разными нозологиями

№	Вид микроорганизма	Количество штаммов	Категория обследованных
1.	MRSA	10	Пациенты с фурункулами, карбункулами
2.	MRSA	22	Пациенты с абсцессами
3.	MRSA	2	ВИЧ-инфицированные пациенты с абсцессами
4.	MRSA	21	Пациенты с флегмонами
5.	MRSA	3	ВИЧ-инфицированные пациенты с флегмонами
6.	MRSA	15	Пациенты с гнойно-некротическими осложнениями СДС
7.	MRSA	12	Пациенты с термическими ожогами
8.	MRSA	8	Пациенты с острым посттравматическим остеомиелитом
9.	MRSA	2	Пациенты с хроническим посттравматическим остеомиелитом
10.	MRSA	21	Пациенты с внебольничной пневмонией
11.	MRSA	2	ВИЧ-инфицированные с внебольничной пневмонией
12.	MRSA	22	Пациенты с госпитальной пневмонией
13.	MRSA	3	Пациенты с синдромом системного воспалительного ответа
14.	MRSA	4	Онкобольные
15.	MRSA	4	Пациенты с сепсисом
16.	MRSA	1	Пациенты с тонзилитом
17.	MRSA	1	Пациенты с гнойным отитом
	ИТОГО	153	

2.1.2 Образцы клинического материала. Клинический материал, полученный при обследовании здоровых бактерионосителей и больных с разными нозологиями

Все обследуемые дали информированное добровольное согласие на обследование. В основу работы положен анализ проспективного и ретроспективного исследования. 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).

В 2013 г. в г. Красноярске было обследовано на наличие колонизации *S. aureus*, MRSA 167 детей из дома ребенка в возрасте до 0 до 4 лет (средний возраст – $2,0 \pm 1,1$ лет). В возрасте от 0 до 1 года было обследовано 52 ребенка (средний возраст – $0,7 \pm 3,2$ месяцев), доля мальчиков составила 51,9 % (27 мальчиков), доля девочек 48,1 % (25 девочек). В возрасте от 1 до 4 лет было обследовано 115 детей (средний возраст – $2,0 \pm 0,97$ лет), доля мальчиков составила 60,0 % (69 мальчиков), доля девочек 40,0 % (46 девочек). Критерии включения: возраст от 0 до 4 лет, проживание на территории г. Красноярска, Красноярского края, проживание в доме ребенка; критерии исключения: проживание в семье. Стерильными ватными тампонами забирали мазки из передних отделов носа.

С 2012 г. по 2017 г. на наличие колонизации *S. aureus*, MRSA обследовано 737 школьников 1-4 и 7-11 классов г. Красноярска и Красноярского края, в т.ч. 40 школьников начальных классов и 697 школьников 7-11 классов. Возраст школьников 7-11 классов 13-17 лет (средний возраст - $15,0 \pm 0,92$ лет), доля мальчиков составила 46,5 % (324 человек), доля девочек 53,5 % (373 девочки). Возраст школьников начальных классов 7-10 лет (средний возраст - $7,0 \pm 1,13$ лет), доля мальчиков составила

60,0 % (24 мальчика), доля девочек 40,0 % (16 девочек). Все обследованные были проанкетированы с целью выявления факторов риска инфицирования нозокомиальными MRSA. Критерии включения школьников 1-4 классов: возраст 6-10 лет, проживание на территории г. Красноярска, Красноярского края, обучение в СОШ; критерии исключения: госпитализация за последние 6 мес., острые и хронические заболевания на момент обследования. Критерии включения школьников 7-11 классов: возраст 13-17 лет, проживание на территории г. Красноярска, Красноярского края, обучение в СОШ; критерии исключения: госпитализация за последние 6 месяцев, острые и хронические заболевания на момент обследования. Стерильными ватными тампонами забирали мазки из передних отделов носа.

В 2011 г. в г. Красноярске было обследовано на наличие колонизации *S. aureus*, MRSA 108 спортсменов, занимающихся контактными видами спорта: вольной борьбой (26 человек), греко-римской борьбой (80 человек), армрестлингом (2 человека). Возраст обследованных 11-28 лет (средний возраст - $19,0 \pm 7,5$ лет), в т.ч. женщин – 30,6 % (33 женщины), мужчин – 69,4 % (75 мужчин). Все обследованные были проанкетированы с целью выявления факторов риска инфицирования нозокомиальными MRSA. Критерии включения: возраст ≥ 11 лет, проживание на территории г. Красноярска, Красноярского края, регулярные занятия контактными видами спорта: вольной борьбой, греко-римской борьбой, армрестлингом; критерии исключения: госпитализация за последние 6 месяцев, острые и хронические заболевания на момент обследования. Стерильными ватными тампонами забирали мазки из передних отделов носа. Для исследования обсемененности кожи в области живота у спортсменов использовали бакпечатки со средой маннит–солевой агар (Pronadisa, CONDA, Испания).

За период 2008-2017 гг. на наличие *S. aureus*, MRSA были обследованы 2503 студента лечебного, педиатрического, стоматологического, фармацевтического, медицинская кибернетика факультетов, 1-3 курсов медицинского университета. Возраст студентов 18-29 лет (средний возраст -

19,0 ± 3,18 лет). Доля мужчин составила 33,7 % (844 человек), доля женщин 66,3 % (1659), в т.ч. доля женщин среди студентов лечебного факультета составила 62,6 %, среди студентов педиатрического факультета - 74,6 %, среди студентов стоматологического факультета – 49,4 %, среди студентов специальности «фармация» – 84,7 %, среди студентов специальности «медицинская кибернетика» – 65,2 %. Все обследованные были проанкетированы с целью выявления факторов риска инфицирования нозокомиальными MRSA. Критерии включения: возраст \geq 18 лет, проживание на территории г. Красноярска, Красноярского края, обучение в университете; критерии исключения: госпитализация за последние 6 месяцев, острые и хронические заболевания на момент обследования, работа в ЛПУ. Стерильными ватными тампонами забирали мазки из передних отделов носа.

В 2008-2009 гг. и 2015-2017 гг. было обследовано 374 и 2076 медицинских работников различных отделений крупных красноярских стационаров, соответственно. В 2008-2009 гг. было обследовано 271 женщин (72,5 %), 103 мужчин (27,5 %), возрастная категория составила от 22 до 60 лет (средний возраст сотрудников – 42,0 ± 9,7 лет). В 2015-2017 гг. было обследовано 1646 женщин (77,3 %), 430 мужчин (22,7 %), возрастная категория: от 18 до 81 лет (средний возраст сотрудников – 40,0 ± 14,3 лет). Критерии включения: возраст \geq 18 лет, работа в стационаре больницы; критерии исключения: острые и хронические инфекционные заболевания на момент обследования, беременность. Стерильными ватными тампонами забирали мазки из передних отделов носа и зева.

За период 2012-2016 гг. в г. Красноярске обследовано 175 больных с первичными неосложненными инфекциями кожи и мягких тканей, такими как карбункул, фурункул, госпитализированных в КГБУЗ «КМКБСМП им. Н.С. Карповича». Возраст обследованных 18 – 70 лет (средний возраст 27,0 ± 12,6). Критерии включения: возраст \geq 18 лет, диагноз фурункул, карбункул. Критерии исключения: пребывание в стационаре более 48 часов, сахарный диабет, ВИЧ. Материал для исследования - гнойное отделяемое, забирали

при поступлении в стационар. Посев материала осуществляли на комплекс питательных сред по методу Gould.

За период 2010-2016 гг. в г. Красноярске обследовано 476 больных с первичными неосложненными инфекциями кожи и мягких тканей, такими как абсцесс, госпитализированных в КГБУЗ «КМКБСМП им. Н.С. Карповича» и КГБУЗ «Красноярская межрайонная клиническая больница № 7». Возраст обследованных 19 – 76 лет (средний возраст $29,0 \pm 14,2$). Критерии включения: возраст ≥ 18 лет, диагноз абсцесс. Критерии исключения: пребывание в стационаре более 48 часов, сахарный диабет, ВИЧ. Материал для исследования - гнойное отделяемое, биоптат, забирали при поступлении в стационар. Посев материала осуществляли на питательные среды методом секторных посевов. У 12 обследуемых параллельно с изучением аэробной и факультативно-анаэробной микрофлорой было проведено выделение анаэробных микроорганизмов. С этой целью осуществляли забор биоптата во время операции.

За период 2010-2016 гг. в г. Красноярске обследовано 975 больных с первичными неосложненными инфекциями кожи и мягких тканей, такими как флегмона, госпитализированных в КГБУЗ «КМКБСМП им. Н.С. Карповича» и КГБУЗ «Красноярская межрайонная клиническая больница № 7». Возраст обследованных 18 – 79 лет (средний возраст $32,0 \pm 15,1$). Критерии включения: возраст ≥ 18 лет, диагноз флегмона. Критерии исключения: пребывание в стационаре более 48 часов, сахарный диабет, ВИЧ. Материал для исследования - гнойное отделяемое, биоптат, забирали при поступлении в стационар. Посев материала осуществляли на питательные среды методом секторных посевов. У 19 обследуемых параллельно с изучением аэробной и факультативно-анаэробной микрофлорой было проведено выделение анаэробных микроорганизмов. С этой целью осуществляли забор биоптата во время операции.

За период 2010-2016 гг. в г. Красноярске проспективно обследовано 240 больных с вторичными осложненными инфекциями кожи и мягких

тканей, такими как гнойно-некротические формы синдрома диабетической стопы, госпитализированных в КГБУЗ «КМКБСМП им. Н.С. Карповича» и КГБУЗ «Красноярскую межрайонную клиническую больницу № 7». Возраст обследованных 32–89 лет (средний возраст $61,2 \pm 15,9$). Доля мужчин составила 55,8 %, доля женщин 44,2 %, Критерии включения: возраст ≥ 18 лет, сахарный диабет 2-го типа, гнойно-некротические формы синдрома диабетической стопы, госпитализация в стационар. Критерии исключения: сахарный диабет 1-го типа, ВИЧ-инфекция. Материал для исследования – биоптат, гнойное отделяемое. Посев материала осуществляли на питательные среды методом секторных посевов. У 16 обследуемых параллельно с изучением аэробной и факультативно-анаэробной микрофлорой было проведено выделение анаэробных микроорганизмов. С этой целью осуществляли забор биоптата во время операции.

Были обследованы 145 больных с термическими ожогами, поступивших в краевой ожоговый центр ККБ в 2013-2016 гг. У обследованных пациентов возраст от 14 до 64 лет (средний возраст $45,0 \pm 11,6$), в т.ч. 112 мужчин (70 %) и 33 женщины (30 %). Критерии включения: возраст ≥ 14 лет, термические ожоги IIIA, IIIB и IV степени, госпитализация в стационар. Критерии исключения: ВИЧ-инфекция. Забор материала от ожоговых больных производился в первые 48 часов поступления в стационар и далее по мере необходимости. Материалами для исследования служили раневое отделяемое, биоптат. Взятие биоптата на границе здоровая-пораженная ткань при соблюдении правил асептики осуществлял врач. Предварительно кожные покровы, окружающие раны, обрабатывали антисептическим раствором, далее с помощью стерильной салфетки удаляли некротические массы, гной, детрит. Биоптат на границе пораженная-здоровая ткань, массой 0,2-0,8 грамма брали с помощью стерильного скальпеля с соблюдением правил асептики. Биоптат помещали в стерильный флакон с крышкой или стерильную пробирку и доставляли в бактериологическую лабораторию. Для оценки значимости микроорганизмов посев материала

осуществляли на питательные среды методом секторных посевов. Выделенные культуры идентифицировали как с помощью обычных микробиологических методов, так и спомощью тест-системы фирмы Remel (США), фирмы Bio Meriux; идентификация по морфо-тинкториальным, культуральным и биохимическим свойствам.

За период 2009-2016 гг. в г. Красноярске изучено 699 клинических материалов от 388 больных с остеомиелитом, госпитализированных в КГБУЗ «КМКБСМП им. Н.С. Карповича» и КГБУЗ «Красноярскую межрайонную клиническую больницу № 7». Из них в 1-й группе - 347 больных с посттравматическим остеомиелитом (620 образцов) и во 2-й группе - 41 больной с хроническим остеомиелитом в стадии обострения (79 образцов). Возраст обследованных составил 23-66 лет (средний возраст $35,6 \pm 5,7$). Доля мужчин составила 64,9 %, доля женщин 35,1 %. Критерии включения для 1-й группы: возраст ≥ 18 лет, посттравматический остеомиелит, госпитализация в стационар; критерии исключения: сахарный диабет 1-го, 2-го типа, ВИЧ-инфекция, хронический остеомиелит, гематогенный остеомиелит. Критерии включения для 2-й группы: возраст ≥ 18 лет, хронический посттравматический остеомиелит, госпитализация в стационар; критерии исключения: сахарный диабет 1-го, 2-го типа, ВИЧ-инфекция, гематогенный остеомиелит. Материал для исследования – раневое отделяемое, интраоперационный материал, отделяемое свищей. Посев материала осуществляли на питательные среды методом секторных посевов - желточно–солевой агар, кровяной агар, хром-агар. Выделенные культуры идентифицировали как с помощью обычных микробиологических методов, так и спомощью тест-системы фирмы Remel (США), фирмы Bio Meriux; идентификацию проводили по морфо-тинкториальным, культуральным и биохимическим свойствам.

За период 2011-2016 гг. в г. Красноярске обследовано 916 больных с клиническим диагнозом внебольничная пневмония, госпитализированных в КГБУЗ «КМКБСМП им. Н.С. Карповича», возраст 18 – 93 лет (средний

возраст $55,0 \pm 18,6$). Материалами для исследования служили мокрота, бронхоальвеолярное содержимое, забранные от пациентов в разные сроки госпитализации. У 472 больных с тяжелым течением внебольничной пневмонии была забрана также кровь на стерильность в разные сроки госпитализации. Сбор материала от пациентов проводился в соответствии с общепринятыми правилами [37]. Критерии включения: возраст ≥ 18 лет, наличие продуктивного кашля, диагноз пневмония, отсутствие антибиотикотерапии или продолжительность приема < 24 часов. Критерии исключения: предшествующая госпитализация в течение 6 месяцев, развитие пневмонии > 48 часов с момента госпитализации.

За период 2012-2016 гг. в г. Красноярске обследовано 272 больных с пневмонией без уточнения возбудителя, развившейся позднее 48 часов госпитализации в КГБУЗ «КМКБСМП им. Н.С. Карповича», с острым нарушением мозгового кровообращения, закрытой или открытой черепно-мозговой травмой, с сочетанной травмой, сахарным диабетом, гангреной, сепсисом, перитонитом, панкреонекрозом. Возраст обследованных 18 – 95 лет (средний возраст $57,0 \pm 19,1$). Материалами для исследования служили бронхоальвеолярное содержимое, реже мокрота. Критерии включения: возраст ≥ 18 лет, развитие пневмонии > 48 часов с момента госпитализации, ИВЛ. Критерии исключения: внебольничная пневмония.

За период 2011-2016 гг. в г. Красноярске обследовано 148 больных с синдромом системного воспалительного ответа, госпитализированных в общую реанимацию (ОРИТ № 1) или нейрореанимацию (ОРИТ № 2) КГБУЗ «КМКБСМП им. Н.С. Карповича». Возраст обследованных 18 – 79 лет (средний возраст $37,0 \pm 14,8$), в исследование включены 101 мужчина и 47 женщин. Критерии включения: возраст ≥ 18 лет, синдром системного воспалительного ответа (при наличии двух или больше клинических признаков: температура тела > 38 °C или < 36 °C, частота сердечных сокращений > 90 / мин, частота дыхания > 20 / мин или гипервентиляция ($\text{PaCO}_2 \leq 32$ мм.рт.ст.), число лейкоцитов в крови $> 12 \times 10^9$ /л или $< 4 \times 10^9$ /

л, или незрелых форм $> 10 \%$), развившийся позднее 48 часов госпитализации. Критерии исключения: синдром системной воспалительной реакции на этапе поступления в стационар. Материалом для исследования служила кровь, всего было исследовано 334 проб крови. При этом от каждого больного забирали от 2 до 12 проб крови (в среднем от каждого пациента 2,3 пробы). У больных кровь забирали при соблюдении правил асептики из периферической вены в соответствии с рекомендациями. Сбор материала от пациентов проводился в соответствии с общепринятыми правилами [37].

За период 2012-2015 гг. обследовано 184 онкологических больных, в т.ч. 117 больных, находящихся в отделении анестезиологии-реанимации и 67 пациентов хирургического отделения №1 КГБУЗ Красноярского краевого клинического онкологического диспансера. Возраст обследованных от 21 до 90 лет (средний возраст $62,0 \pm 19,1$). Критерии включения: возраст ≥ 18 лет, хирургическое вмешательство по поводу опухолей желудочно-кишечного тракта (рак пищевода, желудка, ободочной и прямой кишки, поджелудочной железы) и рака легкого. Критерии исключения: гепатиты В, С, D, ВИЧ-инфекция, синдром системной воспалительной реакции на этапе поступления в стационар. Материалом для исследования являлись бронхоальвеолярное содержимое, получаемое при проведении санационной фибробронхоскопии и раневое отделяемое. Отбор материала производился объемно шприцем, либо стандартным тампоном промышленного производства с использованием транспортной среды (Хай-Медиа, Индия).

За период 2010-2014 гг. в г. Красноярске обследовано 36 наркозависимых ВИЧ-инфицированных пациентов с абсцессами различной локализации, госпитализированных в КГБУЗ «КМКБСМП им. Н.С. Карповича» и КГБУЗ «Красноярская межрайонная клиническая больница № 7». Возраст обследованных 25 - 43 лет (средний возраст $34,3 \pm 4,2$). Критерии включения: возраст ≥ 18 лет, диагноз абсцесс, ВИЧ-инфекция, внутривенное введение наркотиков. Критерии исключения: туберкулез, сахарный диабет.

Материал для исследования - гнойное отделяемое, биоптат, забирали. Посев материала осуществляли на питательные среды методом секторных посевов.

За период 2010-2014 гг. в г. Красноярске обследовано 28 наркозависимых ВИЧ-инфицированных пациентов с флегмоной госпитализированных в КГБУЗ «КМКБСМП им. Н.С. Карповича» и КГБУЗ «Красноярскую межрайонную клиническую больницу № 7». Возраст обследованных 27 - 34 лет (средний возраст $32,7 \pm 3,5$). Критерии включения: возраст ≥ 18 лет, диагноз флегмона, ВИЧ-инфекция, внутривенное введение наркотиков. Критерии исключения: туберкулез, сахарный диабет. Материал для исследования - гнойное отделяемое, биоптат. Посев материала осуществляли на питательные среды методом секторных посевов.

За период 2012-2014 гг. в г. Красноярске обследовано 30 ВИЧ-инфицированных больных с клиническим диагнозом «внебольничная пневмония», госпитализированных в КГБУЗ «КМКБСМП им. Н.С. Карповича», возраст 20 - 42 года (средний возраст $30,9 \pm 6,7$). Материалами для исследования служили бронхоальвеолярное содержимое, мокрота, забранные от пациентов не позднее 48 часов госпитализации. У 27 больных с тяжелым течением внебольничной пневмонии, в т.ч. с синдромом системного воспалительного ответа была забрана также кровь на стерильность в первые сутки госпитализации и далее по мере необходимости в разные сроки госпитализации; всего исследовано 88 проб крови. При этом от каждого больного забирали как минимум 2 пробы и до 6 проб крови (в среднем от каждого пациента 3,3 пробы). У больных кровь забирали при соблюдении правил асептики из периферической вены в соответствии с рекомендациями. Сбор материала от пациентов проводился в соответствии с общепринятыми правилами [37]. Критерии включения: возраст ≥ 18 лет, наличие продуктивного кашля, диагноз внебольничная пневмония, ВИЧ-инфекция. Критерии исключения: туберкулез, сахарный диабет.

2.2 Методы

2.1.1 Микробиологические методы исследования

2.2.1.1 Посев клинического материала, идентификация микроорганизмов

Мазки из передних отделов носа, забранные на носительство *S. aureus*, MRSA заседали на селективную среду маннит-солевой агар (Pronadisa, CONDA, Испания) с добавлением яичного желтка или ЖСА методом штрих с площадкой. Культивировали в течение 24-48 часов.

Для оценки значимости выделенных штаммов посевами биоптата, раневого отделяемого, интраоперационного материала, отделяемого свищей проводили методом секторных посевов (по Gould) на питательные среды – колумбийский агар с добавлением 5 % крови (Хай-Медиа, Индия), маннит-солевой агар (Pronadisa, CONDA, Испания), хром-агар (Хай-Медиа, Индия). Культивировали в течение 24-48 часов.

При исследовании мокроты, предварительно микроскопировали для оценки качества, брали 1 мл, добавляли 9 мл мясопептонного бульона и гомогенизировали с бусами в банке в течение 20 мин. Далее из полученной гомогенной эмульсии готовили последовательные десятикратные разведения. Посев осуществляли с меньшего разведения к большему. Заседали по 0,1 мл из исходного разведения 1:10 на колумбийский агар с добавлением 5 % крови (Хай-Медиа, Индия), желточно-солевой агар, среды Эндо и Сабуро (ФБУН ГНЦ ПМБ, Оболенск); из разведений мокроты 10^{-4} и 10^{-6} заседали на чашки с колумбийским агаром с добавлением 5 % крови (Хай-Медиа, Индия). Посевы инкубировали в течение в течение 24-48 часов при 37 °С.

Посев бронхоальвеолярного содержимого заседали калибровочной петлей методом секторных посевов (по Gould) на питательные среды - на колумбийский агар с добавлением 5 % крови (Хай-Медиа, Индия), желточно-

солевой агар, среды Эндо и Сабуро (ФБУН ГНЦ ПМБ, Оболенск). Инкубировали в течение 24-48 часов при 37 °С.

При исследовании крови для выращивания аэробов, микроаэрофилов и факультативных анаэробов использовали среду HiCombi, для анаэробных микроорганизмов – HiSafe, для грибов - двухфазную систему ХайКомби для грибов (ХайМедиа, Индия).

Посев исследуемого материала для выделения анаэробных микроорганизмов осуществляли незамедлительно на свежеприготовленную питательную среду для выделения анаэробов - агар Шадлера (Bio Merieux, Франция) по методу Gould. Чашки с посевами исследуемого материала на агар Шадлера помещали в индивидуальные газогенераторные пакеты Generbag французской фирмы bio Merieux для выделения анаэробов. Посевы инкубировали в термостате при 37 °С в течение 48-96 часов. Далее полученные колонии микроорганизмов отвивали на чашки Петри с агаром Шадлера и инкубировали культуры микроорганизмов как в аэробных, так и в анаэробных условиях. В случае если рост наблюдался только в анаэробных условиях, следовательно, культуру относили к облигатным анаэробам, если культура росла и в аэробных условиях – к факультативным анаэробам.

Выделенные культуры идентифицировали как с помощью обычных микробиологических методов, так и с помощью тест-систем фирмы Remel (США), фирмы Bio Merieux в соответствии с инструкцией производителя; идентификацию проводили по морфо-тинкториальным, культуральным и биохимическим свойствам.

2.2.1.2 Выявление чувствительности к антимикробным химиопрепаратам

Метод диско-диффузионный использовали для выявления чувствительности штаммов к антимикробным химиопрепаратам. Для этого готовили взвесь (миллиардную) из 24 часовой культуры, выращенной на

агаре, в забуференном физиологическом растворе. Для контроля концентрации микроорганизмов применяли стандарт мутности ОСО, а также денситометр. Взвесь микроорганизмов распределяли тампоном по поверхности чашек с подсушенным агаром Мюллера-Хинтона (Becton Dickinson and Co., Madison, Wis., США). Чашки, засеянные микроорганизмами, подсушивали 5-10 минут, далее на поверхность среды раскладывали диски, пропитанные антимикробными химиопрепаратами (OXOID, Великобритания; Bio-Rad, США). Диски размещали на одинаковом расстоянии друг от друга и на 2-2,5 см от края чашки. Спустя сутки измеряли диаметр зоны задержки роста микроорганизмов, включая диаметр самого диска с антимикробным химиопрепаратом, сопоставляли полученные диаметры с нормативными документами.

Чувствительность стафилококков к оксациллину (Sigma-Aldrich, США), цефокситину (OXOID, Великобритания) проводили методом скрининга в соответствии с международными рекомендациями CLSI, EUCAST [76, 77].

У энтеробактерий определяли наличие бета-лактамаз расширенного спектра (БЛРС) фенотипически двумя методами. Первый метод - «двойных дисков», при котором продукция определяется за счет синергизма цефалоспорины с клавулановой кислотой на среде Мюллера-Хинтона (Becton Dickinson and Co., Madison, Wis., США) с использованием дисков с антибиотиками OXOID (Великобритания). Для исследования использовали диски, пропитанные антимикробными химиопрепаратами группы цефалоспорины (цефтазидим, цефотаксим, цефепим) и диски, пропитанные клавулановой кислотой (амоксициллин-клавулановая кислота). Положительным считали результат, если происходило увеличение диаметра зоны задержки роста штамма вокруг хотя бы одного из дисков, пропитанных антибиотиком из группы цефалоспоринов в направлении диска, пропитанного клавулановой кислотой. Важным при постановке эксперимента является расположение дисков по отношению друг к другу,

например диски, пропитанные цефалоспорином в концентрации 30 мкг, должны быть на расстоянии 20 мм [188].

Также для выявления продукции бета-лактамаз расширенного спектра использовали второй метод - 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) проводили методом инактивации карбапенемов (CIM) [497].

Для определения МПК для различных антимикробных химиопрепаратов у штаммов MRSA использовали метод, при котором готовили серийные разведения антимикробных препаратов в агаре. Для постановки эксперимента готовили двукратные разведения антибиотиков (Sigma-Aldrich, США) в концентрациях от 0,008 до 256 мкг / мл в чашках Петри с плотной средой Мюллера-Хинтона (Becton Dickinson and Co., Madison, Wis., США). Использовали субстанции антимикробных препаратов: ампициллин, оксациллин, цефазолин, цефаклор, цефотиам, цефокситин, цефтазидим, цефотаксим, цефпиром, имипенем, меропенем, биापенем, дорипенем, канамицин, гентамицин, стрептомицин, арбекацин, фосфомицин, хлорамфеникол, тетрациклин, доксициклин, миноциклин, клиндамицин, эритромицин, кларитромицин, азитромицин, налидиксовая кислота, ципрофлоксацин, левофлоксацин, триметоприм-сульфометаксозол, мупироцин, фузидиевая кислота, ванкомицин, тейкопланин, линезолид, рифапицин, а также кадмий (Sigma-Aldrich, США). Для этого готовили взвесь ($1 \cdot 10^8$ м.к. / мл) из 24 часовой культуры, выращенной на агаре, в забуференном физиологическом растворе. Для контроля концентрации микроорганизмов применяли стандарт мутности ОСО, а также денситометр. Инкубировали при температуре 37 °С в течение 24 часов. Определяли МПК и сопоставляли с нормативными документами [77].

Также для определения МПК для различных антимикробных химиопрепаратов у штаммов MRSA использовали метод E-теста (Bio Merieux, Франция).

Для внутрилабораторного контроля были использованы контрольные штаммы коллекции ATCC (*S. aureus* ATCC 25923, *E. coli* ATCC 25922 и *P. aeruginosa* ATCC 27853) при определении чувствительности к антимикробным химиопрепаратам и метициллинорезистентности. Обработку результатов антибиотикочувствительности проводили с использованием компьютерной программы WHONET (ВОЗ).

2.2.2 Молекулярно-биологические и серологические методы

2.2.2.1 Выделение нуклеиновых кислот

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

Хромосомную ДНК из штаммов MRSA выделяли кипячением [39]. В 450 мкл деионизованной стерильной воды суспензировали полную микробиологическую петлю культуры. Полученную суспензию инкубировали 10 минут при 100 °С, после чего осаждали центрифугированием при 10000 g в течение 5 минут. Выделенную ДНК хранили в замороженном виде при минус 20 °С.

Хромосомную ДНК из штаммов MRSA также выделяли с помощью набора реагентов GenElute™ Bacterial Genomic DNA Kits (Sigma-Aldrich, США) в соответствии с инструкцией производителя.

Плазмидную ДНК из штаммов MRSA получали с использованием набора Plasmid Midi Kit (QIAGEN Sciences, Tokyo) в соответствии с методом Kado и Liu модифицированный с применением лизостафина [275].

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) для выделения геномной ДНК.

2.2.2.2 Праймеры

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». Подбор олигонуклеотидов для исследования, а также определение их специфичности делался путем изучения последовательностей нуклеотидов, которые уже размещены в базе данных GenBank Национального центра биотехнологической информации США (National Center for Biotechnology Information) (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Некоторые последовательности праймеров были впервые получены и депонированы в эту же базу данных.

Праймеры и их последовательности, которые были использованы в данном исследовании представлены в Таблицах 5-10.

2.2.2.3 Метод ПЦР для выявления фрагментов генов *nuc* и *tesA*

Для определения принадлежности к MRSA выявляли гены *nuc* и *tesA* с помощью ПЦР. Праймеры для выявления гена *nuc* (*nuc1*: GCGATTGATGGTGATACGGTT и *nuc2*: AGCCAAGCCTTGACGAACATAAAGC) необходимы для дифференциации MRSA и MSSA от коагулазонегативных стафилококков. Праймеры для выявления гена *tesA* (*tesA-QF2*: GGGATCATAGCGTCATTATTCC и *tesAQR2*: CGATGCSTATCTCATATGC), кодирующего синтез ПСБ2а. Режим амплификации включал цикл начальный 94 °C 3 мин. Далее 30 циклов: этапы состояли из денатурации ДНК 94 °C 90 сек.; отжиг при 55 °C в течение 60 сек.; синтез в течение 60 сек. при 72 °C и затем заключительный

цикл при 72 °C 10 мин. Выявление ПЦР-продуктов проводили с применением электрофореза в 1,5 % геле из агарозы с добавлением этидия бромида (100 мг/л) в TAE-буфере (Трис-ацетат 0,04 М, ЭДТА 0,002 М, pH 8,0). Использовали 100 п.н. DNA маркер (Sigma-Aldrich Japan, Tokyo) для определения молекулярной массы ПЦР-продуктов. Детекцию проводили в гель-документирующей системе Bio-Rad Molecular Imager Gel Doc XR+ для верификации результатов электрофореза при длине волны 365 нм (Bio-Rad Laboratories, Inc., США).

2.2.2.4 Генотипирование штаммов MRSA. Гель-электрофорез в пульсирующем поле (PFGE)

Для понимания особенностей популяционной биологии *S. aureus* и выявления происхождения и распространения клонов MRSA и связей между MRSA и MSSA необходимо охарактеризовать выделенные изоляты. Наиболее широко используемым методом молекулярного типирования для изучения локальной и глобальной эпидемиологии MRSA представляет собой гель-электрофорез в пульсирующем поле (PFGE) [107]. PFGE - это метод молекулярного типирования бактериального генома путем анализа хромосомных рестрикционных фрагментов [423, 480]. Этот метод оказался очень успешным для исследования нозокомиальных вспышек, а также был использован для идентификации клонов MRSA, которые обладают особой способностью вызывать крупные вспышки и распространяться на национальном и международном уровнях (клоны EMRSA) [161, 186, 432].

Для получения тотальной ДНК суточную культуру штаммов MRSA вносили в 3 мл стерильной среды LB (Difco, Detroit, MI) и подращивали в термошейкере при температуре 37 °C в течение 3 часов [220]. Далее проверяли оптическую плотность и вносили 0,8 - 1 мл культуральной массы в 1,5 мл микроцентрифужные пробирки с последующим центрифугированием 15000 об/мин в течение 5 мин при температуре 40 °C. Брали в работу

пробирки с определенным объемом осадка, в случае не достаточности объема добавляли еще культуральную массу MRSA. Убирали супернатант и вносили в пробирки для промывки по 1 мл стерильного TEN-буфера (0,1 М Tris Cl, 0,15 М NaCl, 0,1 М ЭДТА), затем центрифугировали 15000 об / мин в течение 5 минут при температуре 40 °С. Промытые клетки ресуспендировали в 0,2 мл стерильном ЕС-буфера (6 мМ Tris Cl, 1 М NaCl, 0,1 М ЭДТА, 0,5 % Brij 58, 0,2% дезоксихолата, 0,5% саркозила). К суспензии клеток добавляли два микролитра лизостафина в концентрации раствора 1 мг / мл, растворенного в 20 мМ ацетат натрия, и затем смесь перемешивали встряхиванием. Затем 300 мкл 2 % SeaPlaque агарозы (FMC Corp., Rockland, Maine), растворенные в буфере ЕС, добавляли к суспензии лизостафиновых клеток. Суспензию быстро встряхивали и быстро пипетировали и вносили в специальную форму доверху с «горочкой», не допуская образования пузырьков воздуха в агарозе. Далее давали возможность застыть при комнатной температуре на льду в течение 30 минут. После затвердевания, получившиеся агарозные блоки с образцами, помещали в пробирки объемом 2 мл, содержащие 1 мл ЕС-буфера, и клетки в пробирке лизировали в течение 1 часа при 37 °С. Далее добавляли в каждую пробирку по 100 мкл раствора протеиназы (10 мг на 1 мл DDW) и оставляли при температуре 50 °С на всю ночь. После стадии лизинга ЕС-буфер удаляли и заменяли 1 мл стерильного ТЕ-буфера (10 мМ Tris Cl, 5 мМ EDTA) аккуратно переворачивали и удаляли буфер. Затем вносили в каждую пробирку по 1 мл ТЕ-PMSF (растворяли 1,7 мг PMSF в 200 мкл изопропанола и вносили в 10 мл ТЕ-буфера) и инкубировали в течение 1 часа при 50 °С. Процедуру повторяли. Затем убирали ТЕ-PMSF и вносили 1 мл свежего ТЕ-буфера на льду в течение 30 минут. Процедуру повторяли. Для проведения электрофореза блок разрезали на мелкие кусочки (2 на 5 мм) и помещали в 62,5 мкл ферментного буфера (10xT буфер с DDW) на льду в течение 30 минут. Затем убирали ферментный буфер и вносили по 65,5 мкл ферментного буфера (10 x T буфер с BSA, DDW), добавляли 20 U SmaI рестрикционного фермента (New England BioLabs, Beverly, Mass) и оставляли

при 30 °С в термошейкере 140 об / мин на всю ночь. После вносили блоки обработанных образцов в лунки 1,2 % агарозного геля для PFGE (FMC Corp.) и проводили электрофорез CHEF-DR II или CHEF-DR III (Bio-Rad) в 0,53 TBE буфере (Bio-Rad) с ДНК-маркером (Lambda ladder; Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, США). Параметры электрофореза были следующими: начальный импульс 5 сек.; конечный импульс 40 сек.; напряжение 200 В или 6 В / см; в течение 22 часов при температуре 8 °С. Далее после окраски в бромистом этидии проводили анализ хромосомных рестрикционных фрагментов. Интерпретация полученных результатов проводилась визуально в соответствии со следующими рекомендациями: образцы, у которых оказались идентичные по размеру и числу полосы ДНК считались одинаковыми, эпидемиологически связанными изолятами; в случае если по трем или менее полосам были различия, обусловленные мутацией, вставкой, делецией и/или инверсией, то штаммы относили к представителям подтипам одного клона; если выявлялись различия четырьмя или более полосами, то такие изоляты считались относящимися к разным генетическим клонам. Был проведен иерархический кластерный анализ.

2.2.2.5 Молекулярное МЛСТ типирование штаммов MRSA

Молекулярное МЛСТ типирование штаммов MRSA проводили в соответствии с международными стандартами [200]. МЛСТ типирование основано на изучении семи генов домашнего хозяйства и определении аллельного профиля (номер аллеля каждого гена), с использованием вебсайта <http://www.mlst.net/>. Список праймеров для МЛСТ типирования представлен в Таблице 5.

Условия проведения ПЦР семи генов «домашнего хозяйства»: денатурация 5 мин 95 °С, далее 30 циклов: 95 °С 1 мин., 55 °С 1 мин., 72 °С 1 мин. И финальный этап 72 °С 5 мин. и далее 4 °С. Затем проводили горизонтальный электрофорез в 1,5 % агарозном геле. Часть образцов

очищали, секвенировали и анализировали самостоятельно на базе ЦНИЛ КрасГМУ. Ампликоны были очищены с использованием набора для очистки PCR Qiagen (Qiagen, Германия) и выщелочены DraI (Roche Biochemicals, Германия) в соответствии с инструкциями производителя. Последовательности обеих нитей ДНК определяли секвенированием по Сэнгеру с помощью секвенатора ДНК ABI PRISM 3500 (Applied Biosystems, США).

Таблица 5 - Праймеры для МЛСТ типирования

Ген	Праймер	Последовательность (3'-5')
Carbamate kinase (<i>arcC</i>)	<i>arcC</i> -Up <i>arcC</i> -Dn	TTGATTCACCAGCGCGTATTGTC AGGTATCTGCTTCAATCAGCG
Shikimate dehydrogenase (<i>aroE</i>)	<i>aroE</i> -Up <i>aroE</i> -Dn	ATCGGAAATCCTATTTACATTC GGTGTGTGATTAATAACGATATC
Glycerol kinase (<i>glpF</i>)	<i>glpF</i> -Up <i>glpF</i> -Dn	CTAGGAACTGCAATCTTAATCC TGGTAAAATCGCATGTCCAATTC
Guanylate kinase (<i>gmk</i>)	<i>gmk</i> -Up <i>gmk</i> -Dn	ATCGTTTTATCGGGACCATC TCATTAAC TACAACGTAATCGTA
Phosphate acetyltransferase (<i>pta</i>)	<i>pta</i> -Up <i>pta</i> -Dn	GTAAAATCGTATTACCTGAAGG GACCCTTTTGTTGAAAAGCTTAA
Triosephosphate isomerase (<i>tpi</i>)	<i>tpi</i> -Up <i>tpi</i> -Dn	TCGTTCATTCTGAACGTCGTGAA TTTGACCTTCTAACAATTGTAC
Acetyl coenzyme A acetyltransferase (<i>yqiL</i>)	<i>yqiL</i> -Up <i>yqiL</i> -Dn	CAGCATAACAGGACACCTATTGGC CGTTGAGGAATCGATACTGGAAC

Реакции секвенирования проводили с использованием набора реагентов ABI PRISM BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (Perkin Elmer Applied Biosystems Division, США) в соответствии с протоколом производителя с праймерами, используемыми при первоначальной амплификации ПЦР. Метод Сэнгера - гибридизация синтетического олигонуклеотида длиной 17—20 п.н. со специальным

участком в секвенируемом участке. Для этого в очищенный ПЦР-продукт предварительно вносят 4 флуоресцентных красителя. Луч лазера приводит к флуоресценции красителей в определённом месте в геле во время проведения капиллярного электрофореза в геле из полиакриламида, а специальный детектор выявляет миграцию конкретного нуклеотида в настоящий момент через гель. Часть образцов заказывали очистку и секвенирование в ЗАО «Евроген». Совмещение сиквенсов обеих цепей каждого гена проводили с помощью программного обеспечения In-silico Molecular Cloning 5.3.36. Полученные последовательности вносили на веб-сайт <http://saureus.mlst.net>. Данные были проанализированы с помощью программного обеспечения eBURST (<http://eburst.mlst.net>).

2.2.2.6 Spa типирование

Spa типирование проводили путем проведения ПЦР с использованием ранее рекомендованных праймеров spa-1113f TAAAGACGATCCTTCGGTGAGC, spa-1514r CAGCAGTAGTGCCGTTTGCTT [360]. Используемые условия ПЦР: денатурация 5 мин. 80 °С, далее 35 циклов: 45 сек. 94 °С, отжиг 45 сек. 60 °С, удлинение 90 сек. 72 °С, финальное удлинение 10 мин 72 °С. Ампликоны были очищены с использованием набора для очистки PCR Qiagen (Qiagen, Германия) и выщелочены DraI (Roche Biochemicals, Германия) в соответствии с инструкциями производителя. Далее определяли последовательности обеих нитей ДНК секвенированием по Сэнгеру с помощью секвенатора ДНК ABI PRISM 3500 (Applied Biosystems, США). Реакции секвенирования проводили с использованием набора реагентов ABI PRISM BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (Perkin Elmer Applied Biosystems Division, США) в соответствии с протоколом производителя, с праймерами, используемыми при первоначальной амплификации ПЦР. Затем анализировали результаты, используя базу

eGenomics (<http://tools.egenomics.com/>) или базу Ridom SpaServer (<http://spaserver.ridom.de/>).

2.2.2.7 Типирование *agr* регуляторного гена

Проводили методом ПЦР и определяли принадлежность к определенной аллельной группе [469]. Для определения класса *agr* изолятов использовались пары праймеров классов *agrI*, *agrII*, *agrIII* и *agrIV* (Таблица 6).

Таблица 6 - Праймеры для типирования по регуляторному гену *agr*

№	Наименование праймеров	Нуклеотидная последовательность
1.	<i>agrI</i> forward	CAC TTA TCA TCA AAG AGC C
2.	<i>agrI</i> reverse	CCA CTA ATT ATA GCT GG
3.	<i>agrII</i> forward	GTA GAG CCG TAT TGA TTC
4.	<i>agrII</i> reverse	GTA TTT CAT CTC TTT AAG G
5.	<i>agrIII</i> forward	CAA GCT ATT ACA TTA CTA CCA
6.	<i>agrIII</i> reverse	AAT GCT TCC ACT TAC TATC
7.	<i>agrIV</i> forward	GCT CAA TTC ATG CAA TTA
8.	<i>agrIV</i> reverse	ATG GTA CTG TAA ACA TTA

Температура отжига для всех пар праймеров составляла 50 °С. В случае необходимости, ампликоны были очищены с использованием набора для очистки PCR Qiagen (Qiagen, Германия) и выщелочены DraI (Roche Biochemicals, Германия), в соответствии с инструкциями производителя. Реакции секвенирования проводили с использованием набора реагентов ABI PRISM BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (Perkin Elmer Applied Biosystems Division, США) в соответствии с протоколом производителя, с праймерами, используемыми при первоначальной амплификации ПЦР. Сравнительный анализ и анализ полиморфизма последовательностей между различными генами *agr* выполнялись с помощью программного пакета DNASTAR (DNASTAR, США).

2.2.2.8 Коагулазотипирование (Coa)

Коагулазотипирование штаммов MRSA проводили с использованием стафилококковых антикоагулазных сывороток Coagulase Typing Antisera "SEIKEN" (Denka Seiken, Tokyo, Japan). Набор состоит из 8 типизирующих антикоагулазных сывороток (тип I - тип VIII).

2.2.2.9 Типирование стафилококковой хромосомной кассеты (SCCmec)

Для определения типа SCCmec использовали мультиплексную ПЦР с праймерами, предложенные D.C. Oliveira и H. Lencastre в соответствии с рекомендациями международной группы http://www.sccmec.org/Pages/SCC_HomeEN.html [398].

Мультиплексная ПЦР включала в себя определение восьми локусов (от А до Н), выбранных на основе ранее описанных последовательностей элементов mec (Таблица 7) [257, 258, 397].

Также включенным в протокол в качестве внутреннего положительного контроля был ген *tecA*.

Локус А специфичен для SCCmec типа I; локус В в составе оперона *kdr* и специфичен для SCCmec типа II; локус С в составе *tecI*, присутствующему в SCCmec типах II и III; локус D в составе области *dcs*, присутствующей в SCCmec типах I, II и IV; локус Е расположен в области между интегрированной плазмидой *pI258* и транспозоном *Tn554*, специфичным для SCCmec типа III; локус F, который также специфичен для SCCmec типа III, расположен в области между *Tn554* и *orf*).

Локусы G и H были включены для дифференциации структурных вариантов IA и IIIA соответственно. Локус G является левым соединением между IS431 и *pUB110*, а локус H является левым соединением между IS431 и *pT181*. Праймеры были синтезированы в ООО «Литех», Россия. Условия М-ПЦР: преденатурация 4 мин. 94 °С; 30 циклов 94 °С 30 сек., 53 °С 30 сек.,

и 72 °С 1 мин.; 4 мин. 72 °С; и хранение при 4 °С. ПЦР продукт выявляли в 2 % агарозном геле горизонтальным электрофорезом в ТАЕ буфере с визуализацией с применением бромистого этидия.

Таблица 7 - Праймеры для мультиплексной ПЦР для типирования SCCmec

Локус	Праймер	Последовательность (3'-5')	Локализация	Размер продукта (п.о.)	Тип SCCmec
A	CIF2 F2	TTCGAGTTGCTGATGAAGAAGG	18398-18419 ^a	495	I
	CIF2 R2	ATTTACCACAAGGACTACCAGC	18892-18871 ^a		
B	KDP F1	AATCATCTGCCATTGGTGATGC	10445-10467 ^b	284	II
	KDP R1	CGAATGAAGTGAAAGAAAGTGG	10728-10707 ^b		
C	MEC1 P2	ATCAAGACTTGCATTTCAGGC	42428-42447 ^b	209	II, III
	MEC1 P3	GCGGTTTCAATTCACCTTGTC	42636-42617 ^b		
D	DCS F2	CATCSTATGATAGCTTGGTC	38011-37992 ^a	342	I, II, IV
	DCS R1	CTAAATCATAGCCATGACCG	37670-37689 ^a		
E	RIF4 F3	GTGATTGTTTCGAGATATGTGG	45587-45607 ^c	243	III
	RIF4 R9	CGCTTTATCTGTATCTATCGC	45829-45809 ^c		
F	RIF5 F10	TTCTTAAGTACACGCTGAATCG	59573-59594 ^c	414	III
	RIF5 R13	GTCACAGTAATTCATCAATGC	59986-59965 ^c		
G	IS431 P4	CAGGTCTCTTCAGATCTACG	49963-49982 ^b	381	
	pUB110 R1	GAGCCATAAACCAATAGCC	50343-50323 ^b		
H	IS431 P4	CAGGTCTCTTCAGATCTACG	29654-29673 ^c	303	
	pT181 R1	GAAGAATGGGGAAAGCTTCAC	29976-29956 ^c		
<i>mecA</i>	MECA P4	TCCAGATTACAACCTTCACCAGG	1190-1211 ^d	162	
	MECA P7	CCACTTCATATCTTGTAACG	1351-1332 ^d		

Также использовали праймеры для М-ПЦР, рекомендованные К. Zhang (Таблица 8) [538]. Условия М-ПЦР: денатурация 94 °С 5 мин., далее 10 циклов - 94 °С 45 сек., 65 °С 45 сек., и 72 °С 1,5 мин. и еще 25 циклов по 94 °С 45 сек., 55 °С 45 сек., и 72 °С 1,5 мин., 72 °С 10 мин. и хранение при 4 °С.

Субтипирование SCCmec проводили в соответствии с рекомендациями (<http://www.staphylococcus.net/>). В качестве контрольных штаммов при проведении SCCmec типирования использованы международные штаммы, рекомендованные International Working Group on SCCmec (IWG-SCC) (Таблица 2) [241, 299].

Таблица 8 - Праймеры для мультиплексной ПЦР для типирования SCCmec

Праймер	Последовательность (3'-5')	Концентрация (μM)	Размер продукта (п.о.)	SCCmec
Type I-F Type I-R	GCTTTAAAGAGTGTCTGTTACAGG GTTCTCTCATAGTATGACGTCC	0.048	613	SCCmec I
Type II-F Type II-R	CGTTGAAGATGATGAAGCG CGAAATCAATGGTTAATGGACC	0.032	398	SCCmec II
Type III-F Type III-R	CCATATTGTGTACGATGCG CCTTAGTTGTCTGTAACAGATCG	0.04	280	SCCmec III
Type IVa-F Type IVa-R	GCCTTATTCGAAGAAACCG CTACTCTCTGAAAAGCGTCCG	0.104	776	SCCmec IVa
Type IVb-F Type IVb-R	TCTGGAATTAAGTTCAGCTGC AAACAATATTGCTCTCCCTC	0.092	493	SCCmec IVb
Type IVc-F Type IVc-R	ACAATATTTGTATTATCGGAGAGC TTGGTATGAGGTATTGCTGG	0.078	200	SCCmec IVc
Type IVd-F5 Type IVd-R6	CTCAAAATACGGACCCCAATACA TGCTCCAGTAATTGCTAAAG	0.28	881	SCCmec IVd
Type V-F Type V-R	GAACATTGTTACTTAAATGAGCG TGAAAGTTGTACCCCTGACACC	0.06	325	SCCmec V
MecA147-F MecA147-R	GTG AAG ATA TAC CAA GTG ATT ATG CGC TAT AGA TTG AAA GGA T	0.046	147	<i>mecA</i>
mecI-F mecI-R	CCCTTTTTATACAATCTCGTT ATATCATCTGCAGAATGGG	0.08	146	Class A <i>mec</i>
IS1272-F mecR1-R	TATTTTTGGGTTTCACTCGG CTCCACGTTAATTCCATTAATACC	0.08	1,305	Class B <i>mec</i>
ccrAB-β2 ccrAB-α2 ccrAB-α3 ccrAB-α4	ATTGCCTTGATAATAGCCITCT AACCTATATCATCAATCAGTACGT TAAAGGCATCAATGCACAAACACT AGCTCAAAAAGCAAGCAATAGAAT	0.08 0.08 0.08 0.08	700 1,000 1,600	Type 1 <i>ccr</i> Type 2 <i>ccr</i> Type 3 <i>ccr</i>
ccrC-F ccrC-R	ATGAATTCAAAGAGCATGGC GATTTAGAATTGTCTGTTGATTGC	0.08	336	Type 5 <i>ccr</i>

2.2.2.10 Определение генов вирулентности у штаммов MRSA

С помощью ПЦР исследовали 48 генов вирулентности: 3 лейкоцидина (*lukPVSF*, *lukM*, *lukE-lukD*); 5 гемолизинов (*hly*, *hla*, *hly-v*, *hly*, и *hld*); белковый цитолизин (*psmA*); 19 генов стафилококковых энтеротоксинов (*tst*, *seb*, *sea*, *sed*, *sec*, *seg*, *see*, *sei*, *seh*, *sej*, *sel*, *sek*, *sen*, *sem*, *sep*, *seo*, *ser*, *seq*, *seu*); эксфолиатины (*eta*, *etb* и *etd*); *edin*, *ssl*, *ACME-arcA*; 14 генов адгезии (*icaA*, *icaD*, *eno*, *fib*, *fnbA*, *fnbB*, *ebpS*, *clfA*, *clfB*, *sdrC*, *sdrD*, *sdrE*, *cna*, *bbp*) (Таблица 9) [477].

Таблица 9 - Праймеры для определения генов вирулентности у штаммов MRSA

Изучаемые гены	Праймеры	Последовательность (5'-3')	размер продукта (п.н.)	Контрольные штаммы
1	2	3	4	5
Стафилококковые энтеротоксины				
<i>tst</i>	TST-3	AAGCCCTTTGTTGCTTGCG	445	NN33, OC3
	TST-6	ATCGAACTTTGGCCATACTTT		
<i>sea</i>	SEA-3	CCT TTGGAAACGGTTAAAACG	127	Mu50, OC8
	SEA-4	TCTGAACCTTCCCATCAAAAAC		
<i>seb</i>	SEB-1	TCGCATCAAACGACAAAACG	477	COL
	SEB-4	GCAGGTA CTCTATAAGTGCCTGC		
<i>sec</i>	SEC-3	CTCAAGAACTAGACATAAAAGCTAGG	271	NN33
	SEC-4	TCAAATCGGATTAACATTATCC		
<i>sed</i>	SED-3	CTAGTTTGTAATATCTCCTTTAAACG	319	FRI-1151m
	SED-4	TTAATGCTATATCTTATAGGGTAAACATC		
<i>see</i>	SEE-3	CAGTACCTATAGATAAAGTTAAAACAAGC	178	ATCC 27664
	SEE-2	TAACTTACCGTGGACCCTTC		
<i>seg</i>	SEG-1	AATTATGTGAATGCTCAACCCGATC	642	NN33
	SEG-2	AAACTTATATGGAACAAAAGGTA CTAGTTC		
<i>seh</i>	SEH-1	CAATCACATCATATGCGAAAGCAG	376	USA400
	SEH-2	CATCTACCCAAACATTAGCACC		
<i>sei</i>	SEI-1	CTCAAGGTGATATTGGTGTAGG	576	NN33
	SEI-2	AAAAAACTTACAGGCAGTCCATCTC		
<i>sej</i>	ZDR	GAGCTCTCAATAAATTTGAGCACC	1731	FRI-1151m
	ZID	TCTAGAATAGTAGGTTCTGCTCTT		
<i>sek</i>	sek-F	GGTGTCTCTAATAGTGCCAG	284	USA300, OC3
	sek-R	TCGTTAGTAGCTGTGACTCC		
<i>sel</i>	sel-F	ATCAATGGCAAGCATCAAACAG	264	NN33
	sel-R	TGGAAGACCGTATCCTGTG		
<i>sem</i>	mpSEM-1	CTATTAATCTTTGGGTTAATGGAGAAC	300	NN33
	mpSEM-2	TTCAGTTTCGACAGTTTGTGTCAT		
<i>sen</i>	mpSEN-1	ATGAGATTGTTCTACATAGCTGCAAT	680	NN33
	mpSEN-2	AACTCTGCTCCCACTGAAC		
<i>seo</i>	mpSEO-1	AGTTTGTGTAAGAAGTCAAGTGTAGA	180	NN33
	mpSEO-2	ATCTTTAAATTCAGCAGATATTCCATCTAAC		

1	2	3	4	5
<i>sep</i>	sep-F	CTGAATTGCAGGGAAGCTGCT	187	NN33
	sep-R	CAAGTTTTCTGTGGCGGTTA		
<i>seq</i>	seq-F	TCTAGCATATGCTGATGTAGG	383	USA300, OC3
	seq-R	CAATCTCTTGAGCAGTTAC(C/T)TC		
<i>seu</i>	PSE2	TAAAATAAATGGCTCTAAAATTGATGG	790	NN12
	PSE4	CGTCTAATTGCCACGTTATATCAGT		
<i>set</i>	setl-a	GAATTCAGATTGGGAGAATAATACTATG	789	NN4
	setl-b	AGATCTCAACGTTTCATCGTTAAGCTGC		
Эксополиатины				
<i>eta</i>	ETA-3	CTAGTGCATTTGTTATTCAAGACG	119	NN13
	ETA-4	TGCATTGACACCATAGTACTTATTC		
<i>etb</i>	ETB-3	ACGGCTATATACATTC AATTCAATG	262	NN13
	ETB-4	AAAGTTATTCAATTAATGCACTGTCTC		
<i>etd</i>	Netd-1	CAAACATCATGTATCAAGGATGG	378	0345
	Netd-2	CCAGAATTTCCCGACTCAG		
Другие				
<i>edin</i>	EDIN-1	GAAGTATCTAATACTTCTTTAGCAGC	625	NN4
	EDIN-2	TCATTTGACAATTCTACACTTCCAAC		
<i>psma</i>	PSMa-F	TATCAAAAAGCTTAATCGAACAATTC		Mu50
	PSMa-R	CCCCTTCAAATAAGATGTTTCATATC		
<i>ACME-arcA</i>	arcAIPS.2 7	CTAACACTGAACCCCAATG	1946	USA300
	arcAIPS.2 8	GAGCCAGAAGTACGCGAG		
<i>opp3</i>	AIPS45	GCAAATCTGTAAATGGTCTGTTC	1183	USA300
	AIPS46	GAAGATTGGCAGCACAAAGTG		
Лейкоцидины				
<i>lukS-PV</i>	PVL-1	ATCATTAGGTA AAAATGTCTGGACATGATCCA	433	NN12
	NPVL-2	GCATCAASTGTATTGGATAGCAAAAAGC		
<i>lukE-lukD</i>	LUKDE-1	TGAAAAAGGTTCAAAGTTGATACGAG	269	NN33, OC3
	LUKDE-2	TGTATTTCGATAGCAAAAAGCAGTGCA		
<i>lukM</i>	LUKM-1	TGGATGTTACCTATGCAACCTAC	780	ATCC 31890
	LUKM-2	GTTCGTTTCCATATAATGAATCACTAC		
Гемолизины				
<i>hla</i>	HLA-1	CTGATTACTATCCAAGAAATTCGATTG	209	NN33, OC3
	HLA-2	CTTTCCAGCCTACTTTTTTATCAGT		
<i>hlb</i>	HLB-1	GTGCACTTACTGACAATAGTGC	309	COL, OC3
	HLB-2-	GTTGATGAGTAGCTACCTTCAGT		

1	2	3	4	5
<i>hld</i>	HLD-1	AAGAATTTTTATCTTAATTAAGGAAGGAGTG	111	NN33
	HLD-2	TTAGTGAATTTGTTCACTGTGTCGA		
<i>hlg</i>	mpHLG-1	GTCAAYAGAGTCCATAATGCATTTAA	535	NN33, OC3
	mpHLG-2	CACCAAATGTATAGCCTAAAGTG		
<i>hlg-v</i>	mpHLG2-1	GACATAGAGTCCATAATGCATTYGT	390	NN33, OC3
	mpHLG2-2	ATAGTCATTAGGATTAGGTTTCACAAAG		
Адгезины				
<i>cna</i>	<i>cnaF</i>	GTCAAGCAGTTATTAACACCAGAC	423	NN12, OC3
	<i>cnaF</i>	AATCAGTAATTGCACTTTGTCCACTG		
<i>bbp</i>	<i>bbpF</i>	AACTACATCTAGTACTCAACAACAG	575	NN12
	<i>bbpR</i>	ATGTGCTTGAATAACACCATCATCT		
<i>icaA</i>	ICAAF	CCTAACTAACGAAAGGTAG	1315	NN33, OC3
	ICAAAR	AAGATATAGCGATAAGTGC		
<i>icaD</i>	ICADF	AAACGTAAGAGAGGTGG	381	NN33, OC3
	ICADR	GGCAATATGATCAAGATAC		
<i>eno</i>	ENO-1	ACGTGCAGCAGCTGACT	302	NN33, OC3
	ENO-2	CAACAGCATYCTTCAGTACCTTC		
<i>fnbA</i>	<i>fnbAF</i>	CATAAATTGGGAGCAGCATCA	127	NN33, OC3
	<i>fnbAR</i>	ATCAGCAGCTGAATTCCCAT		
<i>fnbB</i>	FNBB-1	GTAACAGCTAATGGTCGAATTGATACT	524	NN33, OC3
	FNBB-2	CAAGTTCGATAGGAGTACTATGTTC		
<i>ebpS</i>	<i>ebpSF</i>	AGAATGCTTTTGCAATGGAT	652	NN33, OC3
	<i>ebpSR</i>	AATATCGCTAATGCACCGAT		
<i>clfA</i>	CLFA-1	ATTGGCGTGGCTTCAGTGCT	292	NN33, OC3
	CLFA-2	CGTTTCTTCCGTAGTTGCATTTG		
<i>clfB</i>	CLFB-1	ACATCAGTAATAGTAGGGGGCAAC	205	NN33, OC3
	CLFB-2	TTCGCACTGTTTGTGTTTGCAC		
<i>fib</i>	FIB-1	CTACAACACTACAATTGCCGTCAACAG	404	NN33, OC3
	FIB-2	GCTCTTGTAAGACCATTTTCTTCAC		
<i>sdrC</i>	SDRC-F1	GGCGACCAAAGAAATATAATC	287	NN33, OC3
	SDRC-R1	GTTGTAGTTAGTCCATCAGA		
<i>sdrD</i>	SDRD-F1	CCACTGGAAATAAAGTTGAAG	325	NN33, OC3
	SDRD-R1	CGTTTAGGTGCTGTACTTT		
<i>sdrE</i>	SDRE-F1	TGCTACAGCTCCAACAAG	326	NN33, OC3
	SDRE-R1	CAATGACCTCTCCTGATGG		

Режим амплификации ПЦР для определения большинства генов факторов вирулентности: цикл начальный 95 °С на протяжении 5 мин.; 30 циклов амплификации - денатурация 95 °С 30 сек.; отжиг 55 °С 2 мин.; синтез

2 мин. 72 °С и заключительный этап 5 мин. 72 °С. Выявление ПЦР-продуктов производили методом электрофореза в 1,5 % геле из агарозы с применением этидия бромида (100 мг / л) в ТАЕ-буфере (Трис-ацетат 0,04 М, ЭДТА 0,002 М, рН 8,0). Использовали 100 п.н. DNA маркер (Sigma-Aldrich Japan, Tokyo) для определения молекулярной массы ПЦР-продуктов, а также заведомо положительные контроли.

Детекцию проводили в гель-документирующей системе Bio-Rad Molecular Imager Gel Doc XR+ для верификации результатов электрофореза при длине волны 365 нм (Bio-Rad Laboratories, Inc., США).

2.2.2.11 Определение уровня продукции токсинов TSST-1 и SEA у штаммов MRSA

Уровень продукции токсина синдрома токсического шока TSST-1 определяли с помощью серологического метода. Штаммы MRSA инкубировали при 37 °С на протяжении 18 часов в питательной среде сердечно-мозговой бульон (Difco Laboratories, Sparks, MD, USA), далее доводили концентрацию бактерий до $2,0 \times 10^9$ КОЕ / мл. Применяли реакцию латекс-агглютинации, набор TST-RPLA (Denka Seiken), в соответствии с инструкцией производителя для определения уровня продукции штаммами MRSA токсина синдрома токсического шока в супернатанте.

Проводили измерение уровня продукции токсина SEA, для чего был использован серологический метод. Штаммы MRSA инкубировали при 37 °С на протяжении 18 часов в питательной среде сердечно-мозговой бульон (Difco Laboratories, Sparks, MD, USA), далее доводили концентрацию бактерий до $2,0 \times 10^9$ КОЕ / мл. Применяли реакцию латекс-агглютинации, набор SET-RPLA (Denka Seiken) в соответствии с инструкцией производителя для определения уровня продукции штаммами MRSA энтеротоксина SEA в супернатанте.

Реакцию делали в стерильных микропланшетах в соответствии с рекомендациями производителя. Для каждого теста использовались положительные и отрицательные контроли. После этой процедуры планшеты оставляли на поверхности без вибрации, без помех при комнатной температуре в течение 20-24 часов. Для выявления агглютинации была исследована каждая лунка в каждом ряду с использованием черного фона. Чувствительность этого теста при обнаружении TSST-1 и SEA составляла приблизительно 2 нг / мл.

2.2.2.12 Определение механизмов резистентности к антимикробным препаратам у штаммов MRSA

Механизмы резистентности к антимикробным препаратам определяли методом ПЦР, используя следующие праймеры (Таблица 10), а также в случае необходимости методом секвенирования [152, 156, 350, 358, 472, 476, 492].

Таблица 10 – Список праймеров для определения генов резистентности к антимикробным химиопрепаратам

Антимикробные препараты	Гены	Праймеры	Последовательность	Размер продукта (пн)
1	2	3	4	5
Метициллин, цефалоспорины	<i>mecA</i>	<i>mecA</i> -QF2	GGGATCATAGCGTCATTATTCC	163
		<i>mecA</i> QR2	CGATGCSTATCTCATATGC	
Ампициллин	<i>blaZ</i>	<i>blaZ</i> -F	ACT TCA ACA CCT GCT GCT TTC	170
		<i>blaZ</i> -R	TGA CCA CTT TTA TCA GCA ACC	
Тетрациклины (тетрациклин)	<i>tetK</i>	<i>tetK</i> -F2	GTAGCGACAATAGGTAATAGT	380
		<i>tetK</i> -R2	GTAGTGACAATAAACCTCCTA	
	<i>tetM</i>	<i>tetM</i> - F2	AGTGGAGCGATTACAGAA	158
		<i>tetM</i> - R2	CATATGTCCTGGCGTGTCTA	
Аминогликозиды (гентамицин, канамицин)	<i>aac(6')/a</i> <i>ph(2'')</i>	<i>aac</i> -aph-F	TTGGGAAGATGAAGTTTTTAGA	160
		<i>aac</i> -aph-R	CSTTTACTCCAATAATTTGGCT	

1	2	3	4	5
Аминогликозиды (гентамицин, канамицин)	<i>aph(3')-IIIa</i>	aph(3) 1-F	GGCTAAAATGAGAATATCACCGG	523
		aph(3) 1-R	CTTTAAAAAATCATACAGCTCGCG	
	<i>ant(4)-Ia</i>	ant(4) 1-F	CAAACCTGCTAAATCGGTAGAAGCC	294
		ant(4) 1-F	GGAAAGTTGACCAGACATTACGAACT	
Аминогликозиды (стрептомицин)	<i>aadE</i>	aadE-F	ACT GGC TTA ATC AAT TTG GG	597
		aadE-R	GCC TTT CCG CCA CCT CAC CG	
Аминогликозиды (неомицин)	<i>aadD</i>	aadDF	TAGCTGAATAAGAACGGTGCTCTC	312
		aadDR	CACTTCCACCTTCCACTCACC	
Аминогликозиды (спектиномицин)	<i>spc</i>	<i>spc_fw</i>	ACCAAATCAAGCGATTTAAA	561
		<i>spc_rv</i>	GTCACCTGTTTGCCACATTCG	
Макролиды, линкозамиды (эритромицин, клиндамицин)	<i>ErmA</i>	ermA-F	TCTAAAAAGCATGTAAGAA	645
		ermA-R	CTTCGATAGTTTATTAATATTAGT	
	<i>ErmB</i>	ermB-F	GAAAAGGTAACAACCAATA	639
		ermB-R	AGTAACGGTACTTAAATTGTTTAC	
Макролиды, линкозамиды	<i>ErmC</i>	ermC-F2	AGTACAGAGGTGTAATTTTCG	520
		ermC-R2	AATTCCTGCATGTTTTAAGG	
	<i>MrsA/ MrsB</i>	mrsA/B-F	GCAAATGGTGTAGGTAAGACAACCT	399
		mrsA/B-R	ATCATGTGATGTAACAAAAT	
Фторхинолоны	<i>gyrA</i>	tnpR-F	ATGATTTTTGGCTATGCTCG	382
		tnpR-R	TAAGACCAGAGTTAGTTCGTTTC	
	<i>griA</i>	tnpA-F	ACAACCTCTTTCTGTAGACCAC	604
		tnpA-R	GTCTTTTAGCCAAGCGAG	
Хлорамфеникол	<i>cat</i>	cat-pC221F	CCATACCGATTTCAATGATTCCTT	157
		cat-pC221R	GCATGATGAAGCTGTAAGGC	
Блеомицин	<i>ble</i>	BleS	CTGAGACTCGAGATGTTACAGTCTATCCCGGCATTG	399
		BleR	CTGAGACTGCAGTTAGCTTTTTATTTGTTGAAAAAAGC	
Акрифлавин/аммоний хлорид (бензалкония хлорид, бензетония хлорид, хлоргексидина биглюконат, этидиум бромид)	<i>qacA</i>	qacAF	GATCGCACGGTCTATAAGGATT	324
		qacAR	CGAGGCCAAATAAAGCAAATCC	
Ртуть	<i>mer</i>	merAF	TCAAACGTCAAGGCTGCAAG	333
		merAR	CGTAACCTTCACCAATCCATCG	
Кадмий	<i>cadA</i>	cadA-F1	GTTCGATTGTAATTGGCGG	
		cadA-R1	TTTCTGACCATTCCGC	
	<i>cadC</i>	cadC-F1	GAAGATAAGGTAACAGGGCT	
		cadC-R1	CAAGCTGTTTAAACATGCTC	

Условия ПЦР для определения генов резистентности: 35 циклов – денатурация на протяжении 1 мин. при 95 °С, отжиг праймеров на протяжении 1 мин. при 50 °С, элонгация на протяжении 1 мин. 30 сек. при 72 °С, и заключительный этап 5 мин. при 72 °С.

Для определения генов *Erm*, *MrsA/mrsB*, *blaZ* использовали мультиплексную ПЦР. ПЦР-смесь для одного образца содержала 50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl (pH 9.0), 0,1 % Triton X-100, 2,5 mM MgCl, 0,4 mM каждого специфического праймера, 200 mM dNTP, и 0,5 ед Taq DNA полимеразы (КАРА). Чтобы уменьшить образование неспецифических продуктов, был использован протокол «горячего старта». ПЦР: 3 мин. при 96 °С и затем 30 циклов 1 сек. при 95 °С для денатурации, 30 сек. при 55 °С [437].

2.2.2.13 Определение плазмидного профиля у штаммов MRSA

У выделенных штаммов MRSA определяли плазмидный профиль. Для этого культивировали в течение ночи штаммы MRSA на триптиказо-соевом бульоне, затем центрифугировали и отмывали в 0,1 М фосфатном буфере. Плазмидную ДНК MRSA получали с использованием набора Plasmid Midi Kit (QIAGEN Sciences, Токио) в соответствии с инструкцией производителя. Плазмидную ДНК анализировали горизонтальным электрофорезом в агарозе (0,6-1,0 %). Размеры плазмид определяли при использовании ДНК маркеров [533]. Круговое промежуточное соединение Tn554 было выявлено с помощью ПЦР (размер продукта ПЦР, 772 п.н.), как описано ранее [242].

2.2.2.14 Трансконъюгация штаммов MRSA

Штаммы-доноры были соединены со штаммом-реципиентом *S. aureus* RN2677 (является рестриktionно-отрицательным и устойчивым к рифампицину и новобиоцину) на мембранных фильтрах, которые помещали на чашки Петри со средой триптиказо-соевый агар (Difco, Sparks, MD, США) (клетками вверх), инкубировали при 37 °С в течение 18 часов (сшивание с

фильтрами), как описано ранее. Штамм RN2677 использовался в качестве реципиента, поскольку он не содержал плазмид и имел маркеры непередаваемой лекарственной устойчивости. В экспериментах культуры доноров и реципиентов смешивали в соотношении 1 : 2, центрифугировали и фиксировали на триптиказо-соевом агаре без фильтров (сшивание без фильтров). Альтернативно, культуры доноров и реципиентов смешивали в триптиказо-соевом бульоне (Difco) (сшивание на жидкой среде). После инкубации в течение 18 часов при 37 °С оба штамма проверяли как трансконъюганты фенотипически: маркер устойчивости донора - 10 мкг гентамицина на мл, маркер устойчивости реципиента - 5 мкг новобиоцина на мл для штамма RN2677 и 50 мкг стрептомицина на мл для штамма-донора. Гены устойчивости штаммов-доноров и трансконъюгатов исследовали с помощью ПЦР, как описано ранее [531, 533].

Испытание на чувствительность к антибактериальным препаратам штаммов проводили с использованием метода серийного разведения в агаре Мюллера-Хинтона (без добавления соли, Becton Dickinson and Co., Madison, Wis.) в соответствии со стандартными рекомендациями [68]. Брали одну петлю (5 мкл) тестируемых бактерий в концентрации суспензии 10^6 КОЕ/мл и засеивали на поверхность агара, инкубация проводилась в течение 20 часов при 37 °С.

2.2.2.15 Анализ экспрессии мРНК у штаммов MRSA

Уровни экспрессии мРНК генов цитолитических пептидов *PSM α* и *Hld* (*psma* и *hld*) и 16S рРНК были исследованы методом RT-PCR с набором SuperScript (Invitrogen, США) [441, 477]. Уровни экспрессии *psma* и *hld* были определены по уровню экспрессии 16S рРНК. Были также исследованы уровни экспрессии мРНК генов транскрипционной регуляции (*sarA*, *sarR*, *mgrA*, *saeR*, *saeS*, *sarX*, *rot* и *srrAB*). Штаммы N315 и Mu50 варианта ST5/SCCmecIIA-MRSA были использованы в качестве контрольных с

низким уровнем экспрессии *psma*; штамм USA300-0114 типа ST8/SCCmecIVa CA-MRSA и штамм RS08 CA-MRSA типа ST30/SCCmecIVc были использованы в качестве контрольных с высоким уровнем экспрессии *psma* [428].

2.2.2.16 Геномный анализ

Проведен полногеномный анализ штамма MRSA OC3, относящегося к варианту ST239. Использовали метод пиросеквенирования с помощью системы FLX, с программным обеспечением GS *De Novo* Assembler, вариант версии 2.0 (Roche Diagnostics, Branford, CT, USA). Номера доступа в GenBank для генома OC3 (144 контига) - BBKC01000001-BBKC01000144. Контиги OC3 были сопоставлены с полным геномом штамма MRSA TW20 вариант ST239, длиной 3043210 п.н. (номер доступа FN433596 в GenBank) с использованием программного обеспечения MUMmer (<http://mummer.sourceforge.net/>). Регистрационный номер участка ДНК, кодирующего синтез *tst*, при проведении секвенирования (63; 7398 п.н.) - AB678405. Для выявления открытой рамки считывания (*orf*) использовано программное обеспечение MolecularCloning (версия 4.2) (Silico Biology, Yokohama, Япония). Геномные последовательности были выравнены с помощью программного обеспечения ClustalW (версия 2.1).

Разрывы между контигами, связанные с наличием мобильных элементов, например плазмид, были заполнены с помощью ПЦР и секвенирования. Также контиги собирали, используя «удлиняющую» (long-range) ПЦР *in vitro* с помощью набора (Takara Bio, Otsu, Japan) согласно инструкции производителя. После обработки соответствующими рестриктазами и лигированием с соответствующими кассетами, амплификация выполнялась с помощью кассетных праймеров и целевых праймеров.

Геном штамма MRSA OC8 анализировали методом секвенирования long-read single-molecule real-time (SMRT) с применением P5/C3, с использованием технологии секвенирования системы PacBio RS II (Pacific Biosciences, Menlo Park, CA, США), с программным обеспечением SMRT Analysis v2.3.0/иерархический процесс сборки генома (HGAP) [150]. Прочтение генома провели с 259-кратным покрытием. Окончательное конструирование полной кольцевой последовательности генома проводили с помощью ПЦР и секвенирования. Номер доступа в GenBank для полной кольцевой последовательности генома OC8 - AP017377. В анализе инверсий парные сравнения между двумя последовательностями генома MRSA выполнялись с использованием WebACT (<http://www.webact.org/WebACT/home>).

Филогенетическое дерево было построено с помощью программного обеспечения TreeViewX (версия 0.5.0) (<http://taxonomy.zoology.gla.ac.uk/rod/treeview.html>). Анализ гомологий сделан с применением BLAST (<http://blast.ddbj.nig.ac.jp/top-e.html>) и FASTA (<http://fasta.ddbj.nig.ac.jp/top-j.html>)

2.2.2.17 Разработка мультиплексной ПЦР для детекции основных клональных линий MRSA

На основании результатов генотипирования штаммов MRSA, распространенных на территории г. Красноярска, Красноярского края, а также изучения их генетического профиля вирулентности и изучения структуры генома, производился подбор маркеров, позволяющих определить принадлежность выделенных штаммов к определенной клональной линии. Были разработаны и созданы праймеры и условия проведения мультиплексной ПЦР и ПЦР, апробированы на штаммах, выделенных как от госпитализированных пациентов, так и от носителей как на территории г. Красноярска, так и выделенных в других городах России.

2.2.3 Биоинформационные и статистические методы исследования

Полученные результаты были анализированы с использованием программного обеспечения: Microsoft «Excel» 2007 для создания базы данных, WHOnet 5.6 – для анализа результатов определения чувствительности к антимикробным химиопрепаратам, Statistica 10 (StatSoft, США), а также программного обеспечения для работы с нуклеотидными последовательностями. Критерии Шапиро–Уилка и Колмогорова–Смирнова использовали для проверки количественных признаков на нормальность распределения. Количественные признаки были представлены в виде среднего значения (Mean), максимального (max), минимального (min), стандартного отклонения (σ). Сравнение количественных признаков, если признак в каждой из независимых групп подчиняется закону нормального распределения и дисперсии в обеих группах равны, проводилось с помощью непарного двустороннего t-критерия Стьюдента; если признак в каждой из зависимых групп подчиняется закону нормального распределения проводилось с помощью парного t-критерия Стьюдента; с помощью критерия Манна-Уитни в случае, если данные не подчиняются закону нормального распределения. Качественные признаки были представлены в виде абсолютных чисел и долей (%). В сравнительном анализе использовался двусторонний критерий Фишера. Уровень значимости $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

ГЛАВА 3 Выявление частоты встречаемости *S. aureus*, включая MRSA среди здоровых жителей г. Красноярска, Красноярского края и больных с разными нозологиями, и роль MRSA в развитии заболеваний разного генеза

3.1 Выявление частоты колонизации *S. aureus*, включая MRSA среди различных групп здорового населения

3.1.1 Выявление частоты колонизации *S. aureus*, включая MRSA среди детей из дома ребенка, школьников

В 2013 г. в г. Красноярске было обследовано на наличие колонизации *S. aureus*, MRSA 167 детей из дома ребенка в возрасте от 0 до 4 лет. У всех обследованных детей из дома ребенка в 100 % случаев выявлены стафилококки разных видов. Колонизация *S. aureus* слизистых оболочек носа детей из дома ребенка в возрасте от 0 до 1 года выявлена в 17,3 % случаев (у 9 из 52 обследованных). При этом частота носительства *S. aureus* среди мальчиков составила 14,8 %, а среди девочек 20,0 %. Установлено носительство MRSA среди детей из дома ребенка в возрасте от 0 до 1 года – в 3,85 % случаев (у 2 из 52 обследованных), при этом штаммы MRSA были выделены только от девочек. Колонизация *S. aureus* слизистых оболочек носа детей из дома ребенка в возрасте от 1 до 4 лет выявлена в 23,5 % случаев (у 27 из 115 обследованных). При этом, частота носительства *S. aureus* среди мальчиков составила 27,5 % (у 19 из 69 обследованных), а среди девочек – 17,4 % (у 8 из 46 обследованных) ($p=0,264$). Установлено носительство MRSA среди детей из дома ребенка в возрасте от 1 до 4 лет – в 4,34 % случаев (у 5 из 115 обследованных), при этом штаммы MRSA были выделены только от мальчиков. По результатам нашего исследования не установлены статистически значимые различия в частоте носительства *S.*

aureus среди детей из дома ребенка в возрасте от 0 до 1 года и от 1 до 4 лет ($p=0,422$). Не установлено статистически значимых различий в частоте носительства MRSA среди детей из дома ребенка в возрасте от 0 до 1 года и от 1 года до 4 лет ($p=1,000$).

По результатам изучения чувствительности к антибиотикам, установили, что 100 % штаммов MRSA, изолированных от детей дома ребенка, относились к мультирезистентным и оказались устойчивыми в 100 % случаев к ципрофлоксацину, в 85,7 % к офлоксацину, гентамицину, хлорамфениколу соответственно, в 42,9% случаев к макролидам и в 14% к тетрациклинам. Штаммы MSSA, изолированные от детей дома ребенка в 9,1 % случаев относились к мультирезистентным и оказались устойчивыми в 15,2 % случаев к макролидам, в 12,1 % к тетрациклину и в 9,1 % к доксициклину и хлорамфениколу соответственно, в 3,0 % случаев резистентны к фторхинолонам и гентамицину соответственно (Рисунок 6, Таблица 11).

Из 36 выделенных *S. aureus* 7 (4,2 %) штаммов являлись PVL негативным MRSA (Таблица 12). Выделенные штаммы MRSA принадлежали к ST8, *spa1* (t008), SCCmec IV.3.1.1., *coa* III, *agr* 1, характеризовался наличием лейкоцидина *lukED*, гемолизинов, энтеротоксина *sea*, адгезинов (за исключением *сна*, *bbp*).

В 2012-2017 гг. в г. Красноярске и Красноярском крае обследовано 40 школьников начальных классов и 697 школьников 7-11 классов. У всех обследованных школьников в 100 % случаев выявлены стафилококки разных видов. Колонизация *S. aureus* слизистых оболочек носа школьников 1-4 классов выявлена в 42,5 % случаев (у 17 из 40 обследованных). При этом частота носительства *S. aureus* среди мальчиков начальных классов составила 50,0 % (у 12 из 24 обследованных), а среди девочек 31,3 % (у 5 из 16 обследованных) ($p=0,332$).

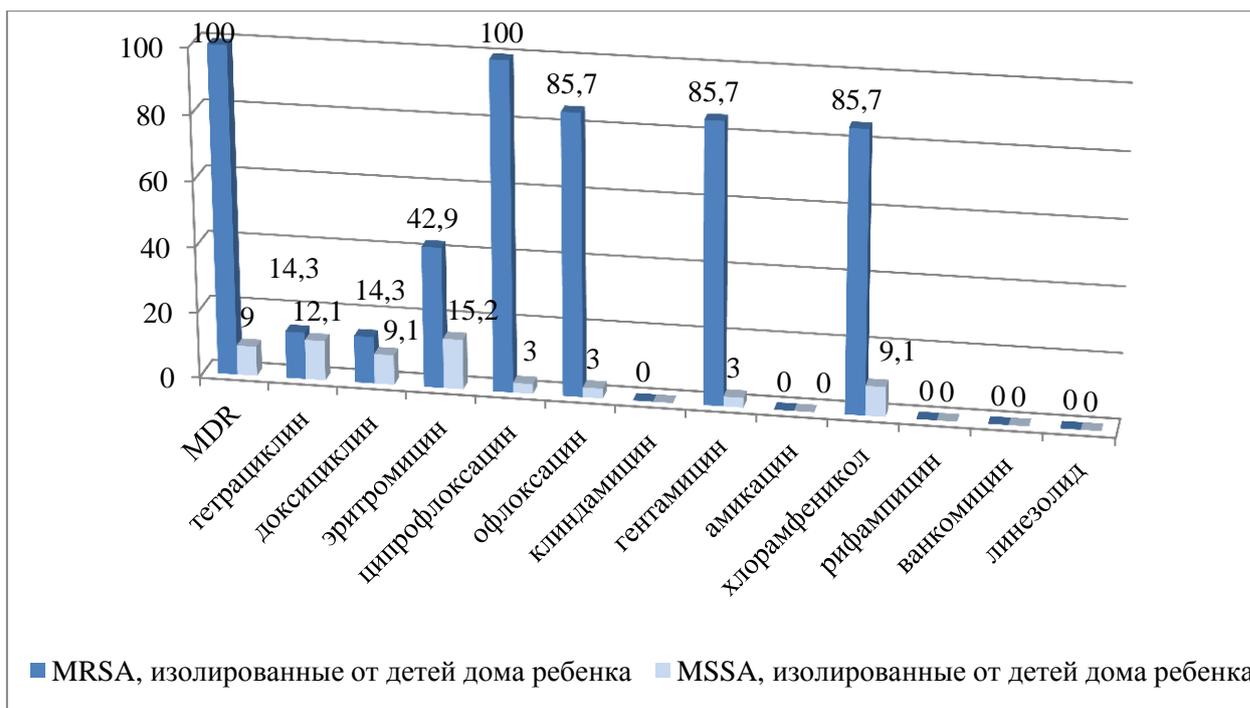


Рисунок 6 - Результаты определения резистентности (%) к антимикробным химиопрепаратам у штаммов MRSA, MSSA, изолированных от детей из дома ребенка

Таблица 11 - Характеристика антибиотикорезистентности штаммов MRSA, изолированных от детей из дома ребенка

Антимикробные препараты	Результаты (n=7)
1	2
Имипенем (МПК, мкг / мл)	0,25–0,75
Оксациллин (МПК, мкг / мл)	2–6,0
Рифампицин (МПК, мкг / мл)	0 % 0,004-0,008
Хлорамфеникол (МПК, мкг / мл)	85,7 % 8,0 - > 32
Сульфаметоксазол/Триметоприм	0 %
Гликопептиды	0 %
Ванкомицин (МПК, мкг / мл)	1,5–2,0
Оксазолидиноны	0 %
Линезолид (МПК, мкг / мл)	0,75 - 1,5
Даптомицин (МПК, мкг / мл)	0 % 0,064 - 0,125

Таблица 12 - Молекулярно-генетическая характеристика штаммов MRSA, изолированных от детей дома ребенка

Определяемые характеристики	Результаты (n=7)
1	2
CC	8
ST	8
<i>spa</i>	1 (t008)
SCCmec	IV.3.1.1 (IVc)
<i>agr</i>	1
<i>coa</i>	III
Токсины:	
Лейкоцидины	
<i>lukPVSF</i>	-
<i>lukE-lukD</i>	+
<i>lukM</i>	-
Гемолизины	
<i>hla, hlg, hlg-v</i>	+
<i>hlb (split)</i>	(+)
Пептидные цитолизины	
<i>psmA, hld</i>	+
Энтеротоксины	
<i>sea</i>	+
<i>tst</i>	-
<i>sec, sep, seb, sed, see, seh, set, sel</i>	-
SapI5 (<i>sek, seq</i>)	-
<i>sej, seu, egc*</i>	-
Эксфолиатины	
<i>eta, etb, etd</i>	-
Адгезины:	
<i>c12ag'</i>	+
<i>cna, bbp</i>	-
Другие	
ACME (<i>arcA</i>)	-
<i>ssl</i>	-
<i>edin</i>	-

Колонизация *S. aureus* слизистых оболочек носа школьников 7-11 классов выявлена в 33,0 % случаев (у 230 из 697 обследованных). При этом частота носительства *S. aureus* среди мальчиков 7-11 классов составила 27,5 % (у 89 из 324 обследованных), а среди девочек - 37,8 % (у 141 из 373 обследованных) ($p=0,005$). По результатам нашего исследования не

установлено статистически значимое различие в частоте носительства *S. aureus* среди школьников начальных классов и среди школьников 7-11 классов ($p=0,230$). Не установлено носительство MRSA среди школьников.

Изучили чувствительность к антимикробным препаратам у штаммов MSSA, изолированных от школьников, установили, что встречаемость MDR среди MSSA составила 1,0 %. Штаммы MSSA, изолированные от школьников, оказались устойчивыми в 66,7 % случаев к пенициллину, в 9,3 % случаев к тетрациклину, в 5,3 % случаев к доксициклину, в 2,6 % случаев к клиндамицину, в 6,4 % случаев к макролидам и хлорамфениколу, соответственно. Штаммы MSSA, изолированные от школьников сохраняют 100 % чувствительность к фторхинолонам, аминогликозидам, рифампицину, ванкомицину, линезолиду (Рисунок 7).

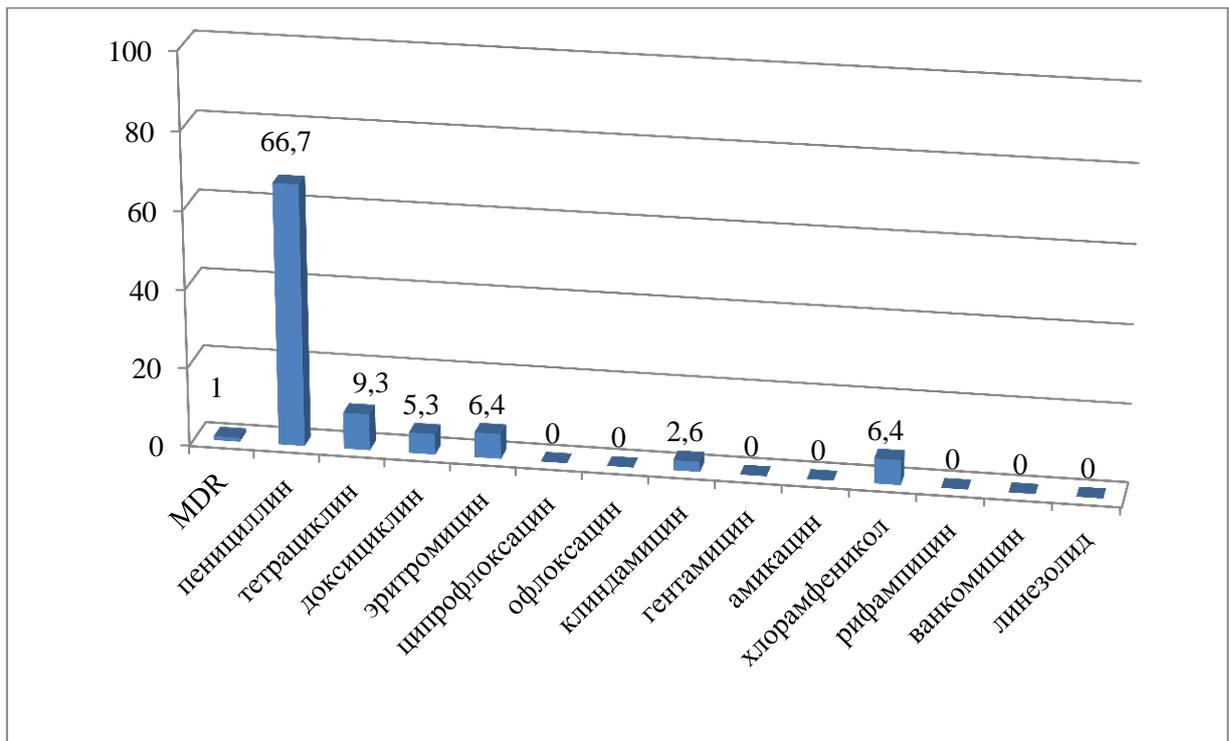


Рисунок 7 - Результаты определения резистентности (%) к антимикробным химиопрепаратам у штаммов MSSA, изолированных от школьников

3.1.2 Выявление частоты колонизации *S. aureus*, включая MRSA среди спортсменов, студентов

В 2011 г. в г. Красноярске было обследовано 108 спортсменов, занимающихся контактными видами спорта на наличие колонизации *S. aureus*, MRSA. Бактерионосительство *S. aureus* на слизистых оболочках и коже выявлено в 38,9 % случаев (у 42 обследованных).

При исследовании уровня бактерионосительства *S. aureus* среди спортсменов различных возрастных групп установили, что в возрастной группе спортсменов 11-15 лет носительство *S. aureus* на коже не выявлено, а на слизистой носа выявлено в 43,7 % случаев. В возрастной группе спортсменов 16-19 лет колонизация *S. aureus* на коже составила 5,4 %, а на слизистой носа – 30,9 %. В группе спортсменов 20-28 лет носительство *S. aureus* на коже не установлено, а на слизистой носа составила 40,0 %. Наибольшая встречаемость *S. aureus* среди спортсменов отмечается в возрастной группе 11-15 лет ($p=0,605$) (Таблица 13).

При исследовании носительства *S. aureus* среди спортсменов в зависимости от вида борьбы, наблюдалась аналогичная тенденция. Частота выявления носительства *S. aureus* на коже значительно ниже, чем на слизистой носа ($p<0,001$) (Таблица 13). Встречаемость носительства *S. aureus* в зависимости от продолжительности занятия спортом показало, что более часто кожа и слизистая носа обсеменены у лиц, занимающихся борьбой менее 2 лет – в 50,0% случаев, по сравнению с теми, кто занимается более 2 лет – в 35,9% случаев ($p=0,403$) (Таблица 13).

Установлены различия частоты колонизации *S. aureus* среди мужчин и женщин, занимающихся контактными видами спорта. Носительство *S. aureus* на слизистой оболочке носа и кожи у мужчин установлено в 48% случаев, а у женщин в 18,2% случаев. Носительство *S. aureus* у мужчин-спортсменов наблюдается в 2,6 раз чаще, чем у женщин-спортсменов ($p=0,002$) (Таблица 13).

Таблица 13 - Результаты исследования колонизации *S. aureus*, включая MRSA среди спортсменов, занимающихся контактными видами спорта

Признаки	Не колонизированы (n=67)		Колонизированы <i>S. aureus</i> (n=41)								MRSE (n=2)				Всего		
			MSSA (n=41)				MRSA (n=0)										
	кол-во	%	нос		кожа		нос		кожа		нос		кожа		кол-во	%	
						кол-во	%	кол-во	%	кол-во	%	кол-во	%	кол-во	%	кол-во	%
<i>Пол</i>																	
мужчины	40	52,0	36	48,0	2	2,7	0	0	0	0	1	1,3	0	0	75	100	
женщины	27	81,8	5	15,2	1	3,0	0	0	0	0	1	3,0	0	0	33	100	
<i>Возраст (лет)</i>																	
11-15	9	56,3	7	43,7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	16	100	
16-19	38	69,1	17	30,9	3	5,4	0	0	0	0	2	3,6	0	0	57	100	
20-28	20	60,0	14	40,0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	35	100	
<i>Вид спорта</i>																	
вольная борьба	19	79,2	5	20,8	2	7,7	0	0	0	0	0	0	0	0	26	100	
греко-римская борьба	48	63,2	28	36,8	3	3,7	0	0	0	0	2	1,85	0	0	81	100	
армрестлинг	0	0	2	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	100	
<i>Продолжительность занятия спортом</i>																	
менее 2 лет	8	50,0	8	50,0	1	6,2	0	0	0	0	0	0	0	0	16	100	
более 2 лет	59	64,1	33	35,9	2	2,2	0	0	0	0	2	2,2	0	0	92	100	

Бактерионосительство *S. aureus* у спортсменов на слизистой носа выше, чем на коже во всех возрастных категориях вне зависимости от вида спорта, пола, продолжительности занятия спортом ($p < 0,001$).

Все изолированные штаммы *S. aureus* были метициллинчувствительными.

За период 2008-2017 гг. на наличие *S. aureus*, включая MRSA были обследованы 2503 студента лечебного, педиатрического, стоматологического, фармацевтического, медицинская кибернетика факультетов, 1-3 курсов медицинского университета. У всех обследованных студентов в 100 % случаев выявлены стафилококки разных видов. Колонизация *S. aureus* слизистых оболочек носа студентов выявлена в 21,5 % случаев (у 537 обследованных). По результатам нашего исследования установлено статистически значимое различие в частоте носительства *S. aureus* среди спортсменов в 1,8 раз выше, чем среди студентов ($p < 0,001$).

Установлено носительство MRSA у одного студента 2 курса лечебного факультета, не имевшего факторов риска колонизации госпитальными штаммами. Таким образом, доля носительства MRSA среди студентов составила 0,04 %.

При изучении чувствительности к антимикробным препаратам у штаммов MSSA, изолированных от студентов, было установлено, что встречаемость MDR среди MSSA составила 13,9 %, при этом выявлена одновременная резистентность к 2-3 группам антимикробных химиопрепаратов. Штаммы MSSA, изолированные от студентов, оказались устойчивыми в 61,1 % случаев к пенициллину, в 5,6 % случаев к тетрациклину, в 11,1 % случаев к эритромицину, в 2,8 % случаев к клиндамицину, ципрофлоксацину и хлорамфениколу, соответственно. Штаммы MSSA, изолированные от студентов, сохраняют 100 % чувствительность к аминогликозидам, рифампицину, ванкомицину, линезолиду (Рисунок 8).

Из 537 выделенных *S. aureus* 1 (0,17 %) штамм являлся PVL негативным MRSA (Таблица 14). Выделенный штамм MRSA (OC217) принадлежал к ST8, spa1 (t008), SCCmec IV.3.1.1., coa III, agr 1, характеризовался наличием лейкоцидина lukED, гемолизинов, энтеротоксина *sea*, адгезинов (за исключением *sna*, *bbp*).

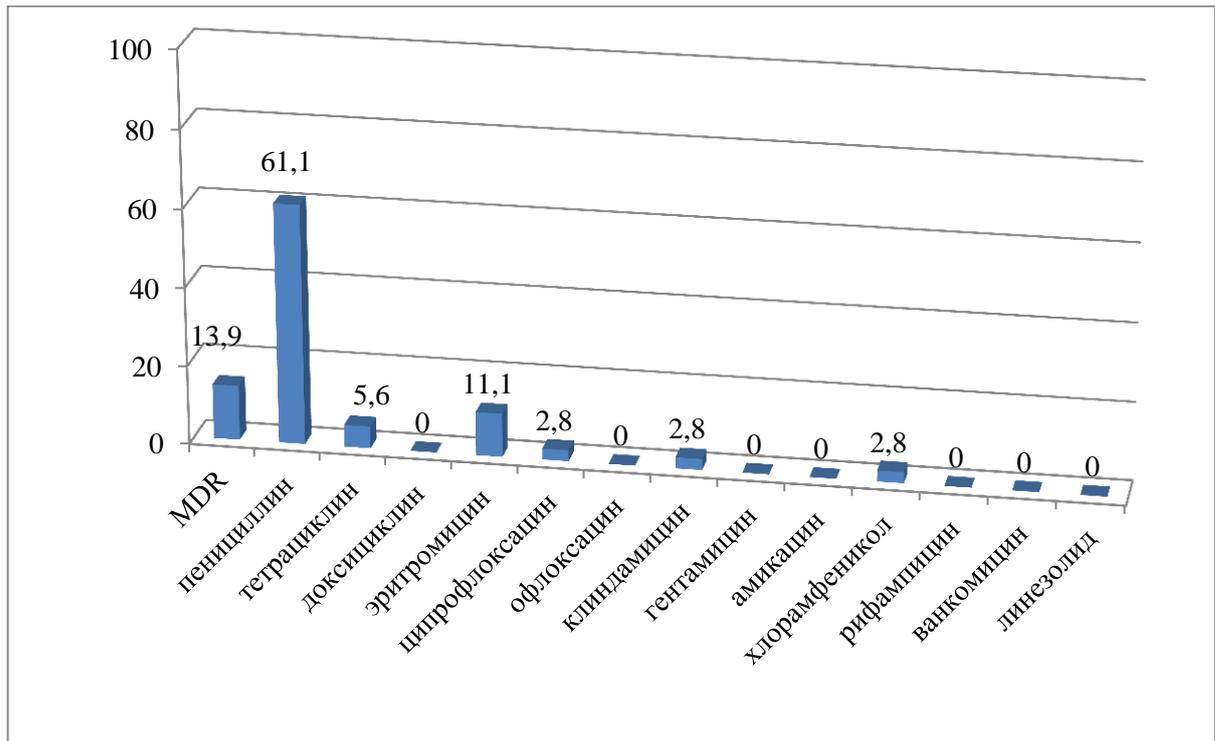


Рисунок 8 - Результаты определения резистентности (%) к антимикробным препаратам у штаммов MSSA, изолированных от студентов

Выявили уровень продукции энтеротоксина *sea* – 1,024 нг / мл. МПК для оксациллина составила 32 мкг / мл; имипенема – 0,125 мкг / мл. Выделенный штамм оказался резистентным к ципрофлоксацину, левофлоксацину, хлорамфениколу (Таблица 15). Также выделенный штамм MRSA (OC217) характеризовался чувствительностью к тяжелым металлам (кадмий).

Таблица 14 - Молекулярно-генетическая характеристика штамма MRSA (OC217), изолированного от студента

Определяемые характеристики	Результаты (n=1)
СС	8
ST	8
<i>sra</i>	1 (t008)
SCCmec	IV.3.1.1 (IVc)
<i>agr</i>	1
<i>coa</i>	III
Токсины:	
<i>Лейкоцидины</i>	
<i>lukPVSF</i>	-
<i>lukE-lukD</i>	+
<i>lukM</i>	-
<i>Гемолизины</i>	
<i>hla, hlg, hlg-v</i>	+
<i>hlb (split)</i>	(+)
<i>Пептидные цитолизины</i>	
<i>psma, hld</i>	+
<i>Энтеротоксины</i>	
<i>sea</i>	+
<i>tst</i>	-
<i>sec, sep, seb, sed, see, seh, set, sel</i>	-
SapI5 (<i>sek, seq</i>)	-
<i>sej, seu, egc*</i>	-
<i>Эксфолиатины</i>	
<i>eta, etb, etd</i>	-
Адгезины:	
<i>c12ag'</i>	+
<i>cna, bbp</i>	-
Другие	
ACME (<i>arcA</i>)	-
<i>ssl</i>	-
<i>edin</i>	-

Таблица 15 - Характеристика антибиотикорезистентности штамма MRSA (OC217), изолированного от студента

Антимикробные препараты	Результаты (n=1)
1	2
Имипенем (МПК, мкг/мл)	0,125
Оксациллин (МПК, мкг/мл)	32

1	2
Ампициллин (МПК, мкг/мл)	4
Аминогликозиды	0 %
Тетрациклины	0 %
Макролиды	0 %
Линкозамиды	0 %
Фторхинолоны	100 %
Рифампицин	0 %
Хлорамфеникол	100 %
Сульфаметоксазол/Триметоприм	0 %
Гликопептиды	0 %
Ванкомицин (МПК, мкг/мл)	0,5
Оксазолидиноны	0 %
Мупироцин	0 %

3.1.3 Выявление частоты колонизации *S. aureus*, включая MRSA среди медицинских работников

В 2008-2009 гг. и 2015-2017 гг. было обследовано 374 и 2076 медицинских работников различных отделений крупных красноярских стационаров, соответственно. В 2008 г. среди медицинских работников бактерионосительство *S. aureus* хотя-бы одного из исследованных биотопов (нос и/или зев) выявлена в 28,9 % случаев (108 обследованных); доля MRSA составила 0,53 % (2 обследованных) (Таблица 16).

В 2015-2017 гг. среди медицинских работников бактерионосительство *S. aureus* хотя бы одного из исследованных биотопов (нос и/или зев) выявлено в 12,5 % случаев (260 обследованных) ($p < 0,001$); доля MRSA составила 0,39 % (8 обследованных) ($p = 0,656$). Бактерионосительство *S. aureus* выявлено среди медицинских работников: ожогового центра в 50 % случаев, родильного дома - 26,9 %, приемного отделения - 26,2 %, отделения для больных с острыми отравлениями - 22,2 %. Бактерионосительство *S. aureus* выявлено среди медицинских работников урологического отделения, эндоскопического, диагностического, травматологического отделений, отделения переливания крови в 0-1,2 % случаев.

Таблица 16 - Выявление частоты колонизации *S. aureus*, включая MRSA среди медицинских работников различных отделений стационаров г. Красноярска в 2015-2017 гг.

Наименование отделения	Количество обследованных	Доля/количество колонизированных <i>S. aureus</i>	Доля/количество колонизированных MRSA
Приемные отделения	42	26,2 % (11/42)	0
Пульмонологические отделения	22	18,2 % (4/22)	0
Кардиологическое отделение	42	14,3 % (6/42)	2,4 % (1/42)
Отделения для больных с острыми отравлениями	36	22,2 % (8/36)	2,7 % (1/36)
Нефрологическое отделение	11	9,1 % (1/11)	0
Эндокринологические отделения	24	4,2 % (1/24)	0
Хирургические отделения	154	19,5 % (30/154)	0,65 % (1/154)
Хирургические отделения (гнойное)	79	12,7 % (10/79)	1,27 % (1/79)
Отделения сосудистой хирургии	114	12,3 % (14/114)	0
Урологические отделения	49	0	0
Гинекологическое отделение	37	8,1 % (3/37)	0
Отделения хирургической стоматологии	64	18,8 % (12/64)	0
Операционные блоки	272	6,6 % (18/272)	0
Нейрохирургические отделения	182	9,9 % (18/182)	0
Инфекционные отделения	198	11,6 % (23/198)	0
Неврологическое отделение для больных с острыми нарушениями мозгового кровообращения	44	9,1 % (4/44)	2,28 % (1/44)
Отделения реанимации	342	10,5 % (36/342)	0,29 % (1/342)
Травматологические отделения	84	1,2 % (1/84)	1,19 % (1/84)
Физиотерапевтические отделения	36	19,4 % (7/36)	0
Эндоскопическое отделение	10	0	0
Диагностические отделение (олд, офд)	56	0	0
Рентгенологические отделения	56	10,7% (6/56)	0
Переливания крови	5	0	0
Ожоговый центр	19	50 % (8/19)	0
Родильные дома	145	26,9 % (39/145)	0,69 % (1/145)

Бактерионосительство MRSA выявлено среди медицинских работников кардиологического отделения в 2,4 % случаев, отделения для больных с острыми отравлениями - 2,7 %, неврологического отделения для больных с острыми нарушениями мозгового кровообращения - 2,28 %, хирургического отделения №3 (гнойного) - 1,27 %, травматологического отделения - 1,19 % (Таблица 16).

Штаммы MSSA, изолированные от медицинских работников в 24,1 % случаев относились мультирезистентным и оказались устойчивыми в 87,0 % случаев к пенициллину, в 20,4 % случаев к эритромицину, в 5,6 % случаев к тетрациклину, в 2,8 % и 1,9 % случаев к хлорамфениколу и клиндамицину соответственно (Рисунок 9).

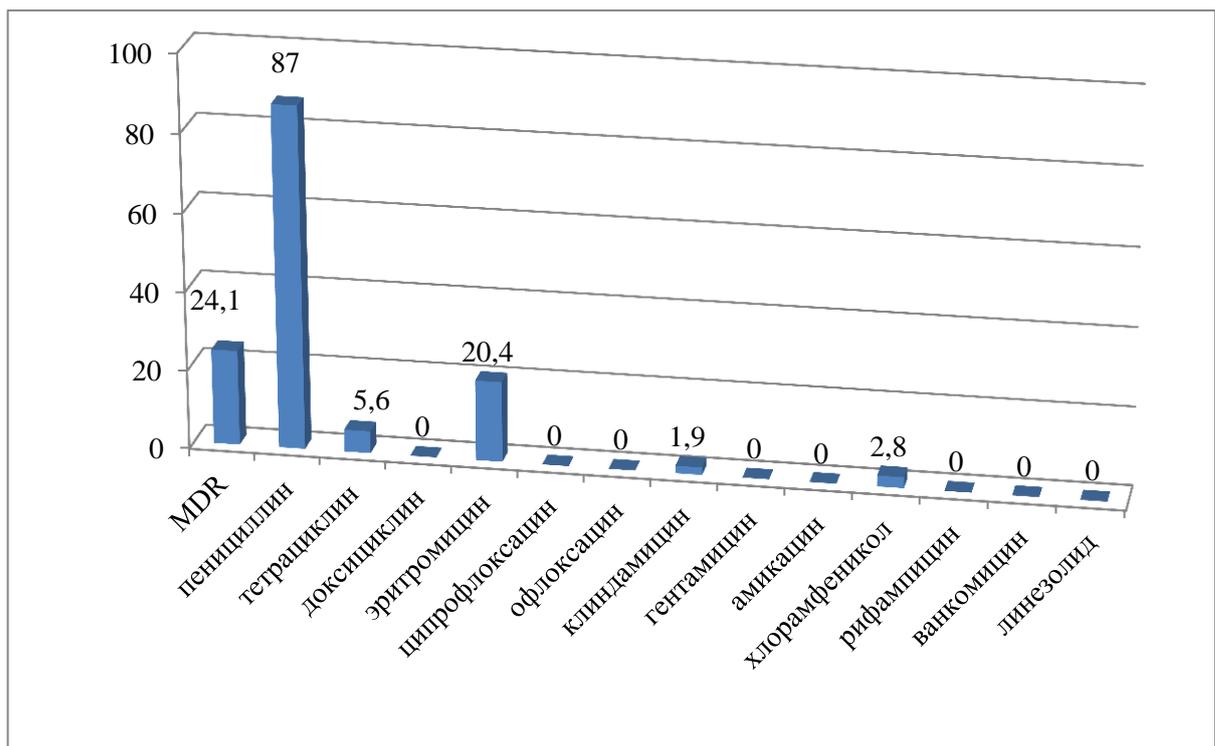


Рисунок 9 - Результаты определения резистентности (%) к антимикробным препаратам у штаммов MSSA, изолированных от медицинских работников

По результатам изучения чувствительности к антибиотикам, установили, что 80 % штаммов MRSA, изолированных от медицинских работников, относились к мультирезистентным. Штаммы MRSA, изолированные в 2008-2009 гг., характеризовались резистентностью в 100 % случаев к фторхинолонам, в 50 % случаев к аминогликозидам, тетрациклинам, макролидам, линкозамидам, рифампицину, хлорамфениколу, сульфаметоксазол/триметоприму. МПК для оксациллина составила 32 - > 128 мкг / мл, для имипенема - 0,25-32 мкг / мл. Штаммы MRSA, изолированные от медицинских работников в 2015-2017 гг., характеризовались меньшей резистентностью и оказались устойчивыми в 37,5 % случаев к тетрациклинам, в 25,0 % случаев к фторхинолонам, в 12,5 % случаев к макролидам и хлорамфениколу (Таблица 17).

Таблица 17 - Характеристика антибиотикорезистентности штаммов MRSA, изолированных от медицинских работников в 2008-2009 гг. и 2015-2017 гг.

Антимикробные препараты	Результаты антибиотикорезистентности	
	2008-2009 гг (n=2)	2015-2017 гг. (n=8)
Имипенем (МПК, мкг/мл)	0,25-32	0,125-1
Оксациллин (МПК, мкг/мл)	32->128	4
Ампициллин (МПК, мкг/мл)	4-64	
Аминогликозиды	50%	0%
Тетрациклины	50%	37,5%
Макролиды	50%	12,5%
Линкозамиды	50%	0%
Фторхинолоны	100%	25,0%
Рифампицин (МПК, мкг/мл)	50% 0,008->128	0% 0,008-0,012
Хлорамфеникол	50%	12,5%
Сульфаметоксазол/Триметоприм	50%	
Гликопептиды	0%	0%
Ванкомицин (МПК, мкг/мл)	0,5	2-4
Оксазолидиноны	0%	0%
Мупироцин	0%	0%

Один из 8 штаммов MRSA, изолированных от медицинских работников в 2015-2017 гг., был выделен от бывшей студентки медицинского университета, т.е. от студентки, обследованной на носительство *S. aureus*, MRSA 7 лет назад в 2009 г., от которой тогда был выделен штамм MRSA (штамм OC217). На сегодняшний день бывшая студентка является клиническим врачом в кардиологическом отделении крупного стационара г. Красноярск. Сопоставив результаты антибиотикочувствительности 2 штаммов, выделенных от одного человека с промежутком в 7 лет, установили различия в уровнях МПК для ванкомицина – произошло увеличение МПК в 2016 г. составила 3 мкг / мл, т.е. штамм отнесен к hVISA (МПК 2—4 мкг / мл) (Таблица 18) [248].

Таблица 18 - Характеристика антибиотикочувствительности штаммов MRSA OC217 и OC0335, изолированных в 2009 г. и 2016 г.

Антимикробные препараты	Результаты антибиотикорезистентности	
	OC217	OC0335
Имипенем (МПК, мкг / мл)	0,125	0,25
Оксациллин (МПК, мкг / мл)	32	4
Ампициллин (МПК, мкг / мл)	4	4
Аминогликозиды	0 %	0 %
Тетрациклины	0 %	0 %
Макролиды	0 %	0 %
Линкозамиды	0 %	0 %
Фторхинолоны	100 %	100 %
Рифампицин (МПК, мкг / мл)	0 % 0,0625	0 % 0,006
Хлорамфеникол (МПК, мкг / мл)	100 % 4	100 % >32
Сульфаметоксазол/Триметоприм	0 %	0 %
Гликопептиды	0 %	0 %
Ванкомицин (МПК, мкг / мл)	0,5	3,0
Оксазолидиноны	0 %	0 %
Линезолид (МПК, мкг / мл)	1	1,5
Мупироцин	0 %	0 %
Полипептиды		
Даптомицин (МПК, мкг / мл)	-	0,25

Также мы сопоставили результаты молекулярно-генетических особенностей 2 штаммов MRSA - OC217 и OC0335, изолированных от одного человека в 2009 г. и 2016 г. Установили, что оба штамма являются PVL негативным MRSA, принадлежат к одному и тому-же генетическому клону, характеризуются идентичностью набора факторов вирулентности - ST8, *sra1* (t008), SCCmec IV.3.1.1., *coa* III, *agr* 1, характеризовались наличием лейкоцидина *lukED*, гемолизинов, энтеротоксина *sea*, адгезинов (за исключением *sna*, *bbp*) (Таблица 19).

Таблица 19 - Молекулярно-генетическая характеристика штаммов MRSA - OC217 и OC0335, изолированных от одного человека в 2009 г. и 2016 г.

Определяемые характеристики	Результаты типирования штаммов MRSA	
	2009 г. OC217	2016 г. OC0335
1	2	3
CC	8	8
ST	8	8
<i>sra</i>	1 (t008)	1 (t008)
SCCmec	IV.3.1.1 (IVc)	IV.3.1.1 (IVc)
<i>agr</i>	1	1
<i>coa</i>	III	III
Токсины:		
<i>Лейкоцидины</i>		
<i>lukPVSF</i>	-	-
<i>lukE-lukD</i>	+	+
<i>lukM</i>	-	-
<i>Гемолизины</i>		
<i>hla, hlg, hlg-v</i>	+	+
<i>hlb</i> (split)	(+)	(+)
<i>Пептидные цитолизины</i>		
<i>psma, hld</i>	+	+
<i>Энтеротоксины</i>		
<i>sea</i>	+	+
<i>tst</i>	-	-
<i>sec, sep, seb, sed, see, seh, set, sel</i>	-	-
SapI5 (<i>sek, seq</i>)	-	-
<i>sej, seu, egc*</i>	-	-
<i>Эксфолиатины</i>		

1	2	3
<i>eta, etb, etd</i>	-	-
Адгезины:		
<i>c12ag'</i>	+	+
<i>cna, bbp</i>	-	-
Другие		
<i>ACME (arcA)</i>	-	-
<i>ssl</i>	-	-
<i>edin</i>	-	-

Таким образом, выявлено длительное (7 лет) носительство одного генетического варианта MRSA. При этом, в 2009 г. штамм MRSA был отнесен к внебольничным, т.к. был выделен на тот момент от студентки, не имевшей факторов риска инфицирования госпитальными штаммами и по характеристикам относился к штаммам внебольничного происхождения. При обследовании в 2016 г. данная сотрудница уже несколько лет являлась сотрудником кардиологического отделения.

При исследовании молекулярно-генетических особенностей штаммов MRSA, выделенных от медицинских работников в 2008-2009 гг. и в 2015-2017 гг. установили, что штаммы MRSA, выделенные в 2008-2009 гг. являлись PVL негативными, а среди штаммов MRSA, изолированных в 2015-2017 гг. выявили 2 (25,0 %) PVL позитивных (Таблица 20).

Таблица 20 - Молекулярно-генетическая характеристика штаммов MRSA, изолированных от медицинских работников в 2008-2009 гг. и 2015-2017 гг.

Определяемые характеристики	Результаты типирования штаммов MRSA				
	2008-2009 гг.		2015-2017 гг.		
	(n=1)	(n=1)	(n=2)	(n=4)	(n=2)
1	2	3	4	5	6
CC	239	8	239	8	30
ST	239	8	239	8	30
<i>spa</i>	3 (t037)	1 (t008)	3 (t037)	1 (t008)	19 (t019)
<i>SCCmec</i>	III.1.1.2 (IIIА)	IV.3.1.1 (IVc)	III.1.1.2 (IIIА)	IV.3.1.1 (IVc)	IV.3.1.1 (IVc)
<i>agr</i>	1	1	1	1	3

1	2	3	4	5	6
<i>coa</i>	IV	III	IV	III	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>	-	+	-	+	-
<i>tst</i>	+	-	+	-	1/2
<i>sel</i>	-	-	-	-	1/2
<i>sec, sep, seb, sed, see, seh, set</i>	-	-	-	-	-
SapI5 (<i>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>	-	-	-	-	-
Антибиотикорезистентность					
Имипенем (МПК, мкг / мл)	32	0,25	0,25-0,38	0,19-1	0,125-0,75
Оксациллин (МПК, мкг / мл)	> 128	32	4	4	4
Ампициллин (МПК, мкг / мл)	64	4	-	-	-
Аминогликозиды	100 %	0 %	0 %	0%	0 %
Тетрациклины	100 %	0 %	50 %	25%	0 %
Макролиды	100 %	0 %	0 %	0%	50 %
Линкозамиды	100 %	0 %	0 %	0%	0 %
Фторхинолоны	100 %	100 %	0 %	50%	0 %
Рифампицин (МПК, мкг / мл)	100 %	0 %	0 %	0%	0 %
Хлорамфеникол	0 %	100%	0 %	25%	0 %
Сульфаметоксазол/Триметоприм	100 %	0 %	-	-	-
Гликопептиды	0 %	0 %	0 %	0%	0 %
Ванкомицин (МПК, мкг / мл)	0,5	0,5	2	2	2
Оксазолидиноны	0 %	0 %	0 %	0%	0 %
Мупиноцин	0 %	0 %	0 %	0%	0 %

Выделенный 1 (50 %) штамм MRSA в 2008-2009 гг. принадлежал к ST8, *spr1* (t008), SCCmec IV.3.1.1., *coa* III, *agr* 1, характеризовался наличием

лейкоцидина lukED, гемолизинов, энтеротоксина SEA (*sea*), адгезинов (за исключением *sna*, *bbp*). Выявили уровень продукции энтеротоксина *sea* – 1,024 нг / мл. Выделенный второй штамм MRSA (50 %) в 2008-2009 гг. принадлежал к ST239, *sra3* (t037), III.1.1.2 (IIIА), *coa* IV, *agr* 1, характеризовался наличием лейкоцидина lukED, гемолизинов, токсина синдрома токсического шока TSST-1 (*tst*), энтеротоксинов SEK (*sek*), SEQ (*seq*), адгезинов (за исключением *bbp*). Выявили уровень продукции токсина синдрома токсического шока TSST-1 – 200 нг / мл, что ниже в 2 раза (400 нг / мл) уровня продукции токсина синдрома токсического шока TSST-1 штаммами MRSA, выделенными от больных с инвазивными MRSA-инфекциями.

Выделенные в 2015-2017 гг. 4 штамма MRSA (50,0 %) относились к ST8, *sra1* (t008), SCCmec IV.3.1.1., *coa* III, *agr* 1, характеризовался наличием лейкоцидина lukED, гемолизинов, энтеротоксина SEA (*sea*), адгезинов (за исключением *sna*, *bbp*). Выделенные в 2015-2017 г. 2 штамма MRSA (25,0%) относились к ST239, *sra3* (t037), III.1.1.2 (IIIА), *coa* IV, *agr* 1, характеризовался наличием лейкоцидина lukED, гемолизинов, токсина синдрома токсического шока TSST-1 (*tst*), энтеротоксинов SEK (*sek*), SEQ (*seq*), адгезинов (за исключением *bbp*).

Выделенные в 2017 г. 2 штамма MRSA (25,0 %) относились к PVL позитивным ST30, *sra* 19 (t019), SCCmec IV.3.1.1., *coa* IV, *agr* 1 (Таблица 20). Установлено, что данные 2 сотрудницы 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 не выявлено распространение подобных штаммов MRSA. PVL позитивные штаммы CA-MRSA ST30 были выделены в Австралии (*sra* t019 / SCCmec IVa), на Тайване (*sra* t019 / SCCmec IVc), в США (*sra* t019 / SCCmec IVa), в Нидерландах (*sra* t654 / SCCmec IVc), в Египте (*sra* t2519 / SCCmec V), в Японии (*sra* t019 / SCCmec IVa, SCCmec

IVc) [255, 256, 402]. PVL позитивные штаммы HA-MRSA ST30 были выделены в конце 90-х гг. в Японии [255]. В РФ PVL позитивные штаммы MRSA ST30 ранее были выделены: один штамм (ST30/spa19(t019)/SCCmecIV.3.1.1./coaIV/agr1) в 2005-2006 гг. в г. Владивостоке [109], а второй штамм (ST96/spa999/SCCmecIII/agr3) выделен в 2004-2010 гг [363]. По генетическим характеристикам выделенные в г. Красноярске PVL позитивные штаммы MRSA во многом совпадали со штаммом, выделенном в г. Владивостоке, однако 1 красноярский штамм MRSA имел еще и ген *tst*. По уровню резистентности к антимикробным препаратам, Владивостокский PVL позитивный штамм MRSA был устойчив только к β -лактамным антибиотикам, а один красноярский PVL позитивный штамм MRSA помимо резистентности к β -лактамным антибиотикам был устойчив к макролидам.

Таким образом, среди медицинских работников стационаров г. Красноярска носителей MRSA распространены как типичные госпитальные штаммы, относящиеся к варианту ST239, так и штаммы, относящиеся к варианту ST8, которые были выделены и во внебольничных условиях и в госпиталях.

3.2 Выявление роли MRSA в развитии заболеваний разного генеза

3.2.1 Выявление роли MRSA в развитии первичных неосложненных ИКМТ – фурункулов, карбункулов, неосложненный абсцесс, флегмона

За период 2012-2016 гг. в г. Красноярске обследовано 175 больных с фурункулом, карбункулом. При исследовании гнойного отделяемого в первые 48 часа поступления больных в стационар рост микроорганизмов в этиологически значимом количестве был получен в 85,1 % случаев (у 149 обследованных). Выделено 155 штаммов микроорганизмов. При этом микроорганизмы были выделены в монокультуре в 96,6 % случаев, доля

ассоциаций из двух микроорганизмов составила 3,4 %. В составе микрофлоры гнойного отделяемого преобладали грамположительные микроорганизмы, выделенные в 95,5% случаев (Рисунок 10). В 91,6 % случаев были выделены стафилококки, *S. aureus* были выделены в 78,1 % случаев (121 из 155 штаммов), доля MRSA составила 8,3 % (10 из 121 штамма).

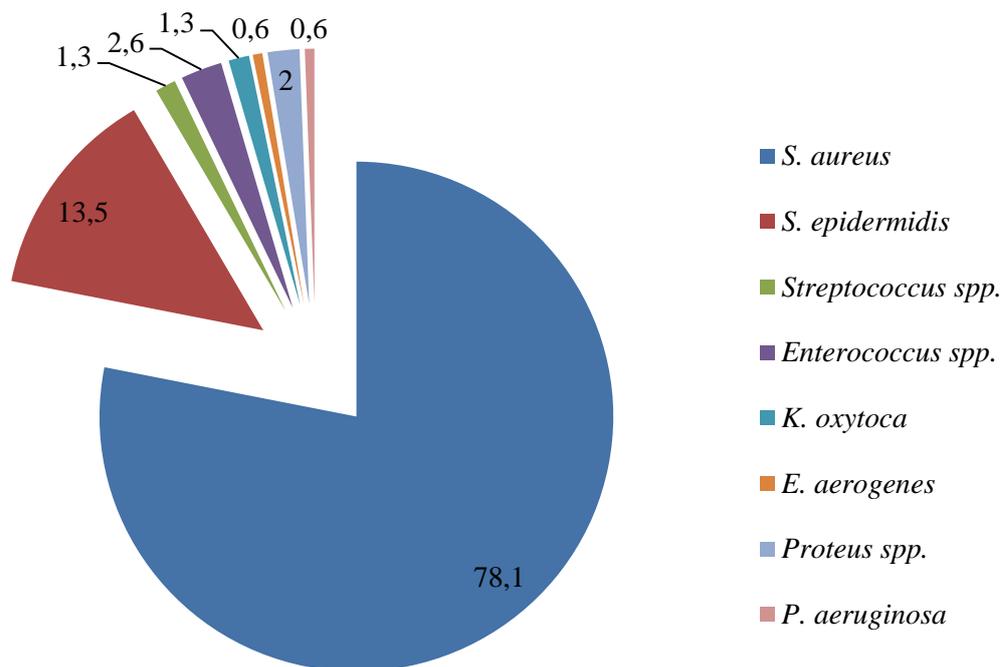


Рисунок 10 - Микрофлора гнойного отделяемого от пациентов с фурункулом, карбункулом

Грамотрицательная микрофлора выделена в 4,5 % случаев; на долю представителей семейства *Enterobacteriaceae* пришлось 3,9 %, в том числе выделены *Klebsiella oxytoca*, *Enterobacter aerogenes*, *Proteus spp.*, БЛРС продуценты не выделены. На долю неферментирующих грамотрицательных бактерий (НГОБ) приходилось 0,6 % случаев, были выделены *P. aeruginosa*, доля МБЛ продуцентов составила 0 %.

За период 2010-2016 гг. в г. Красноярске обследовано 476 больных с неосложненным абсцессом. При исследовании гнойного отделяемого,

биооптата в первые 48 часов поступления больных в стационар рост микроорганизмов в этиологически значимом количестве был получен в 74,4 % случаев (у 354 обследованных). Изолировано 407 штаммов. При этом микроорганизмы были выделены в монокультуре в 91 % случаев, доля ассоциаций из двух микроорганизмов составила 8,7 %, из трех микроорганизмов – 0,3 %. В составе микрофлоры гнойного отделяемого преобладали грамположительные микроорганизмы, выделенные в 71,7 % случаев (Рисунок 11).

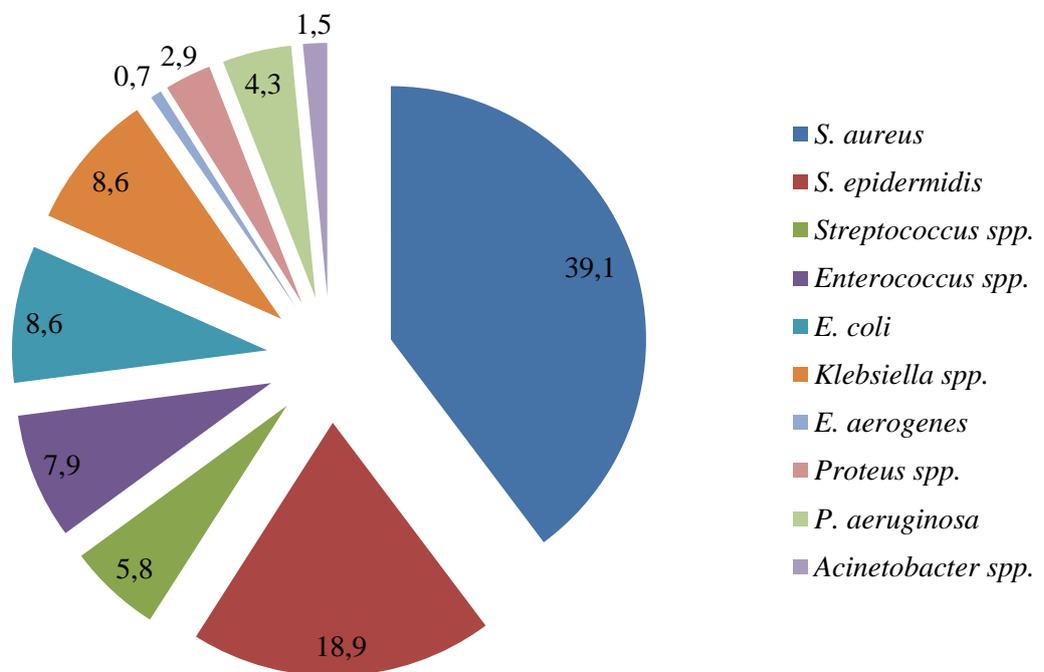


Рисунок 11 - Микрофлора гнойного отделяемого, биооптата от пациентов с неосложненным абсцессом

В 58 % случаев были выделены стафилококки, *S. aureus* были выделены в 39,1 % случаев (159 из 407 штаммов), доля MRSA составила 18,9 % (30 из 159 штаммов). Грамотрицательная микрофлора выделена в 28,3 % случаев; на долю представителей семейства *Enterobacteriaceae* приходилось 22,5 %, в т.ч. выделены *E. coli* (8,6 %), *Klebsiella spp.* (8,6 %),

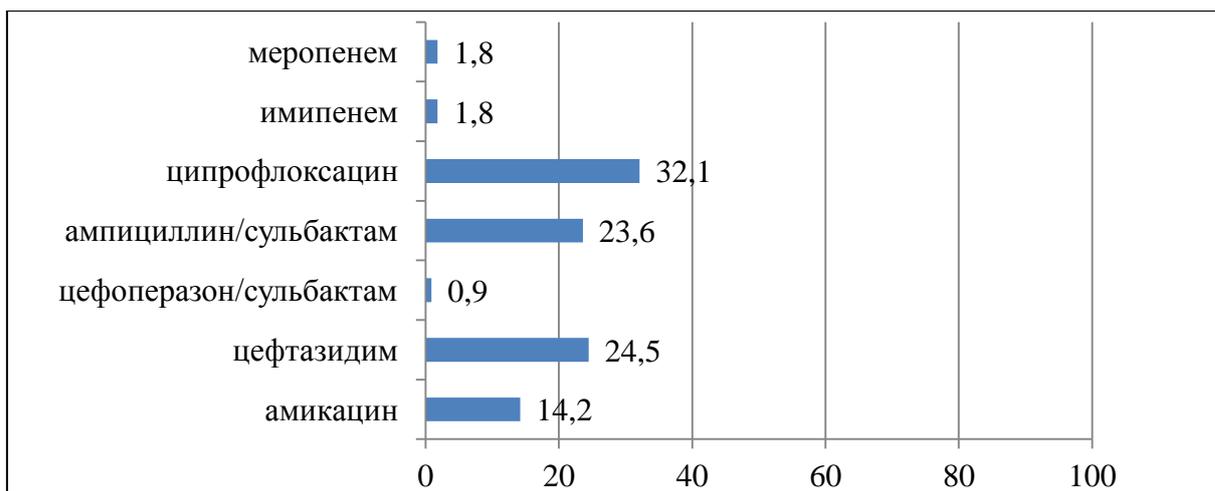
Enterobacter aerogenes (0,7 %), *Proteus* spp. (2,9 %), доля БЛРС продуцентов составила 21,7 %. На долю неферментирующих грамотрицательных бактерий (НГОб) приходилось 5,8 % случаев, выделены *P. aeruginosa* (4,3 %), *Acinetobacter* spp. (1,5 %), доля МБЛ продуцентов составила 0 %.

При изучении антибиотикорезистентности штаммов, представителей сем. *Enterobacteriaceae*, выделенных от больных с неосложненным абсцессом, установили их резистентность к цефтазидиму в 24,5 % случаев; к цефоперазону/сульбактаму и ампициллину/сульбактаму в 0,9 % и 23,6 % случаев соответственно; к ципрофлоксацину было устойчиво 32,1 % штаммов; чувствительность к амикацину сохраняли 85,8 %; к карбапенемам были чувствительны 98,2 % штаммов (Рисунок 12).

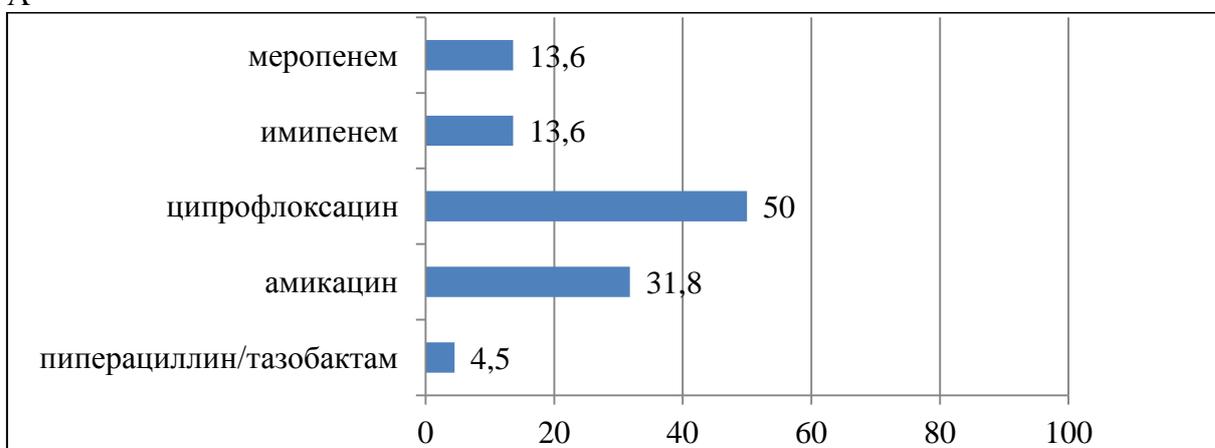
При изучении антибиотикорезистентности неферментирующих грамотрицательных бактерий, выделенных от больных с неосложненным абсцессом, установили их резистентность к амикацину в 31,8 % случаев, к ципрофлоксацину в 50 % случаев, к карбапенемам - 13,6 % случаев.

За период 2010-2016 гг. в г. Красноярске обследовано 975 больных с флегмоной. При исследовании гнойного отделяемого, биоптата в первые 48 часов поступления больных в стационар рост микроорганизмов в этиологически значимом количестве был получен в 60,6 % случаев (у 591 обследованного).

Изолировано 784 штамма. При этом микроорганизмы были выделены в монокультуре в 88,7 % случаев, доля ассоциаций составила 11,3 %, в т.ч. из двух микроорганизмов - 8,5 %, из трех микроорганизмов – 2,7 %, из четырех – 0,1 %. В составе микрофлоры гнойного отделяемого, биоптатов преобладали грамположительные микроорганизмы, выделенные в 68,2 % случаев (Рисунок 13).



А



Б

Рисунок 12 - Результаты определения антибиотикорезистентности (%)

Примечание: А - представители сем. *Enterobacteriaceae*, Б – неферментирующие грамотрицательные бактерии (*Acinetobacter* spp. - за исключением пиперациллин/тазобактама)

В 43,8 % случаев были выделены стафилококки, *S. aureus* были выделены в 27,2 % случаев (213 из 784 штаммов), доля MRSA составила 21,6 % (46 из 213 штаммов). *Streptococcus pyogenes* выделены в 10,1 % случаев. Доля *Enterococcus* spp. составила 14,3 %, при этом преобладали *Enterococcus faecalis* (8,9 %). Грамотрицательная микрофлора выделена в 31,1% случаев; на долю представителей семейства *Enterobacteriaceae* приходилось 17,2 %, в т.ч. выделены *E. coli* (6,1 %), *Klebsiella* spp. (5,2 %), *Enterobacter aerogenes* (1,3 %), *Proteus* spp. (3,3 %) и др. (*Citrobacter freundii*, *Serratia marcescens*, *Morganella morganii*), доля БЛРС продуцентов составила 23,7 %. На долю неферментирующих грамотрицательных бактерий

приходилось 13,9 % случаев, выделены *P. aeruginosa* (6,9 %), *Acinetobacter spp.* (7 %), доля МБЛ продуцентов составила 3,1%. В 0,7 % случаев были выделены *Candida spp.*

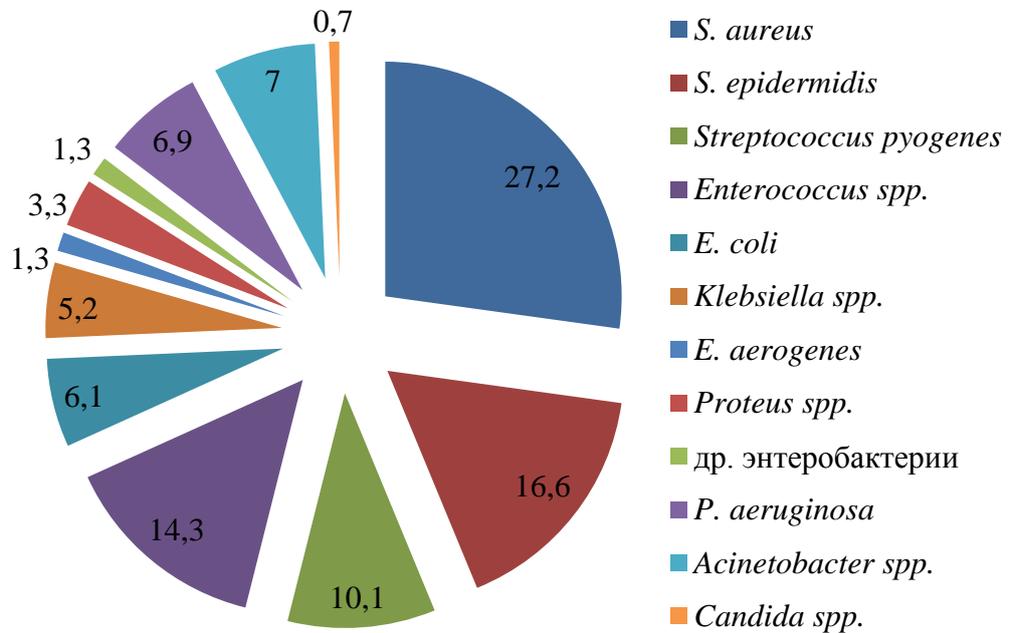
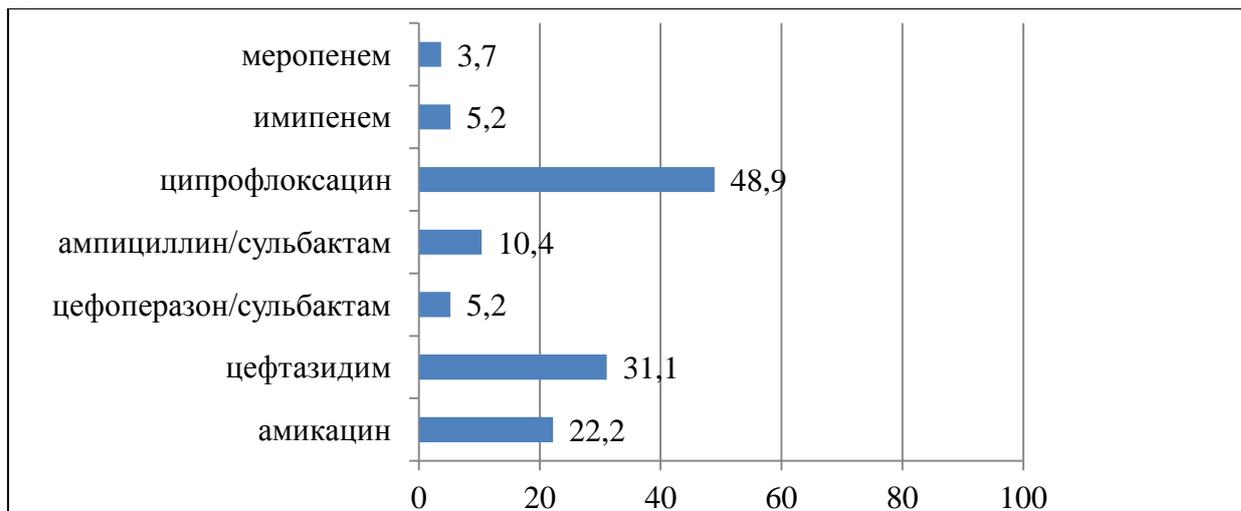


Рисунок 13 - Микрофлора гнойного отделяемого, биоптата от пациентов с флегмоной

При изучении антибиотикорезистентности штаммов, представителей сем. *Enterobacteriaceae*, выделенных от больных с флегмоной, установили их резистентность к цефтазидиму в 31,1 % случаев; к цефоперазону/сульбактаму и ампициллину/сульбактаму в 5,2 % и 10,4 % случаев соответственно; к ципрофлоксацину было устойчиво 48,9 % штаммов; к амикацину в 22,2 %; к карбапенемам в 4,5 % случаев (Рисунок 14).

При изучении антибиотикорезистентности неферментирующих грамотрицательных бактерий, выделенных от больных с флегмоной, установили их резистентность к амикацину в 69,2 % случаев, к ципрофлоксацину в 66,3 % случаев, к карбапенемам в 27,9 % случаев. 17,8 % выделенных штаммов энтерококков были устойчивыми к ампициллину.

А



Б

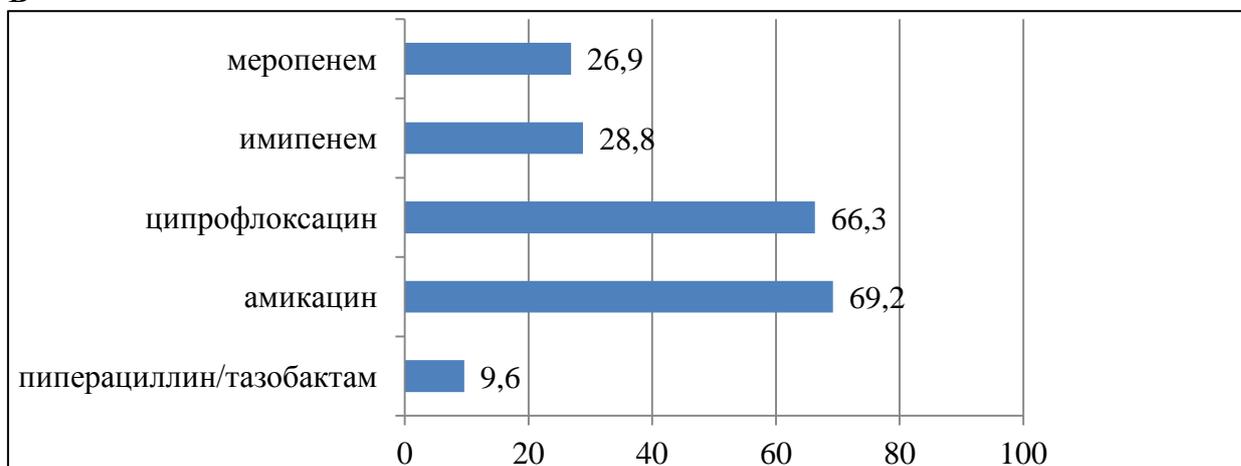


Рисунок 14 - Результаты определения антибиотикорезистентности (%)

Примечание: А - представители сем. *Enterobacteriaceae*, Б – неферментирующие грамотрицательные бактерии (*Acinetobacter* spp. - за исключением пиперациллин/тазобактама)

Проведено генотипирование 49 штаммов MRSA, выделенных от пациентов с фурункулом/карбункулом (10 штаммов), абсцессом (22 штамма), флегмоной (17 штаммов). Все выделенные штаммы MRSA были PVL-негативными. Большая часть штаммов MRSA (65,3 %) относились к генотипу ST8/spa1(t008)/agr1/SCCmecIV.3.1.1/CoaIII, характеризовались наличием лейкоцидина lukED, гемолизинов, энтеротоксина SEA (*sea*), адгезинов (за исключением *spa*, *bbp*). Оказались чувствительными практически ко всем изученным антимикробным препаратам, кроме β-лактамов, фторхинолонов и хлорамфеникола. Из 32 штаммов данного генотипа 10 штаммов были

выделены от пациентов с фурункулами/карбункулами; 15 от пациентов с абсцессами и 7 от пациентов с флегмонами (Таблица 21).

Таблица 21 - Молекулярно-генетическая характеристика штаммов MRSA, изолированных от больных с первичными неосложненными ИКМТ – фурункул/карбункул, неосложненный абсцесс, флегмона

Определяемые характеристики	Результаты типирования штаммов MRSA		
	n=9	n=8	n=32
1	2	3	4
CC	239	239	8
ST	239	239	8
<i>sra</i>	3 (t037)	3 (t037)	1 (t008)
SCCmec	III.1.1.2 (IIIА)	III.1.1.1	IV.3.1.1 (IVc)
<i>agr</i>	1	1	1
<i>coa</i>	IV	IV	III
Токсины:			
<i>Лейкоцидины</i>			
<i>lukPVSF</i>	-	-	-
<i>lukE-lukD</i>	+	+	+
<i>lukM</i>	-	-	-
<i>Гемолизины</i>			
<i>hla, hlg, hlg-v</i>	+	+	+
<i>hly (split)</i>	(+)	(+)	(+)
<i>Пептидные цитоллизины</i>			
<i>psmA, hld</i>	+	+	+
<i>Энтеротоксины</i>			
<i>sea</i>	-	+	+
<i>tst</i>	+	-	-
<i>sec, sep, seb, sed, see, seh, set, sel</i>	-	-	-
SapI5 (<i>sek, seq</i>)	+	+	-
<i>sej, seu, egc*</i>	-	-	-
<i>Эксфолиатины</i>			
<i>eta, etb, etd</i>	-	-	-
Адгезины:			
<i>c12ag'</i>	+	+	+
<i>cna</i>	+	+	-
<i>bbp</i>	-	-	-
Другие			
ACME (<i>arcA</i>)	-	-	-
<i>ssl</i>	+	+	+
<i>edin</i>	-	-	-
Антибиотикорезистентность			

1	2	3	4
Имипенем (МПК, мкг/мл)	32-64	16	0,25
Оксациллин (МПК, мкг/мл)	>128	128	4-32
Ампициллин (МПК, мкг/мл)	32-64	32	4
Аминогликозиды	100%	0%	0%
Тетрациклины	100%	100%	0%
Макролиды	100%	100%	0%
Линкозамиды	100%	100%	0%
Фторхинолоны	100%	0%	100%
Рифампицин (МПК, мкг/мл)	100% >128	0% 0,008	0% 0,008
Хлорамфеникол	100%	0%	100%
Сульфаметоксазол/Триметоприм	100%	100%	0%
Гликопептиды	0%	0%	0%
Ванкомицин (МПК, мкг/мл)	0,5	1-2	0,5
Оксазолидиноны	0%	0%	0%
Мупироцин	0%	0%	0%
Плазмиды (т.п.н.)	2,9	-	2,9

18,4 % штаммов MRSA относились к ST239/spa3(t037)/agr1/SCCmecIII.1.1.2(IIIА)/coaIV, характеризовались наличием лейкоцидина lukED, гемолизинов, токсина синдрома токсического шока TSST-1 (*tst*), энтеротоксинов SEK (*sek*), SEQ (*seq*), адгезинов (за исключением *bbp*). Характеризовались антибиотикорезистентностью к аминогликозидам, макролидам, линкозамидам, фторхинолонам, хлорамфениколу (гены резистентности локализованы в плазмиде 2,9 т.п.н.), рифампицину (МПК > 128 мкг / мл), сульфаметоксазол/триметоприму и чувствительностью ко всем остальным изученным препаратам. Из 9 изученных штаммов, относящихся к данному генотипу 7 были выделены от пациентов с флегмонами и 2 штамма выделены от пациентов с абсцессами.

16,3 % штаммов MRSA относились к ST239/spa3(t037)/agr1/SCCmecIII.1.1.1/coaIV характеризовались наличием лейкоцидина lukED, гемолизинов, энтеротоксина SEA (*sea*), энтеротоксинов SEK (*sek*), SEQ (*seq*), адгезинов (за исключением *bbp*). Характеризовались антибиотикорезистентностью к макролидам, линкозамидам, сульфаметоксазол/триметоприму и чувствительностью ко всем остальным изученным препаратам. Из 8 изученных штаммов, относящихся к данному

генотипу, 3 были выделены от пациентов с флегмонами и 5 штаммов выделены от пациентов с абсцессами.

3.2.2 Выявление роли метициллинрезистентных *Staphylococcus aureus* и их молекулярно-генетических особенностей в развитии гнойно-некротических форм синдрома диабетической стопы

В г. Красноярске за период 2010-2016 гг. обследовали 240 больных с гнойно-некротическими формами синдрома диабетической стопы в первые сутки госпитализации. В первые сутки рост микроорганизмов в этиологически значимом количестве был получен в 85 % случаев (у 204 обследованных) по результатам исследования биоптата, гнойного отделяемого больных. Выделено 288 штаммов. Микроорганизмы были выделены в монокультуре в 76,4 % случаев, доля ассоциаций составила 23,6 %, в т.ч. из двух микроорганизмов – 20,1 %, из трех микроорганизмов – 3,5 %. Установили, что в первые сутки в микрофлоре гнойного отделяемого, биоптатов преобладала грамотрицательная микрофлора, которая была выделена в 53,5 % случаев; при этом на долю представителей семейства *Enterobacteriaceae* приходилось 34,4 %, в т.ч. выделены *E. coli* (7,6 %), *Klebsiella* spp. (9,0 %), *Enterobacter* spp. (3,5 %), *Proteus* spp. (10,8 %) и др. (*Citrobacter freundii*, *Serratia marcescens*, *Providencia rettgeri* - 3,5 %). Неферментирующие грамотрицательные бактерии выделены в 19,1 % случаев: *P. aeruginosa* - 13,2 %, *Acinetobacter* spp. - 5,9 % случаев. В 46,5 % случаев выделены грамположительные микроорганизмы: в 30,2% случаев – стафилококки; *S. aureus* – 18,4 % (53 из 288 штаммов); доля *Enterococcus* spp. - 15,6 %, при этом доминировали *Enterococcus faecalis* (11,5 %) (Рисунок 15).

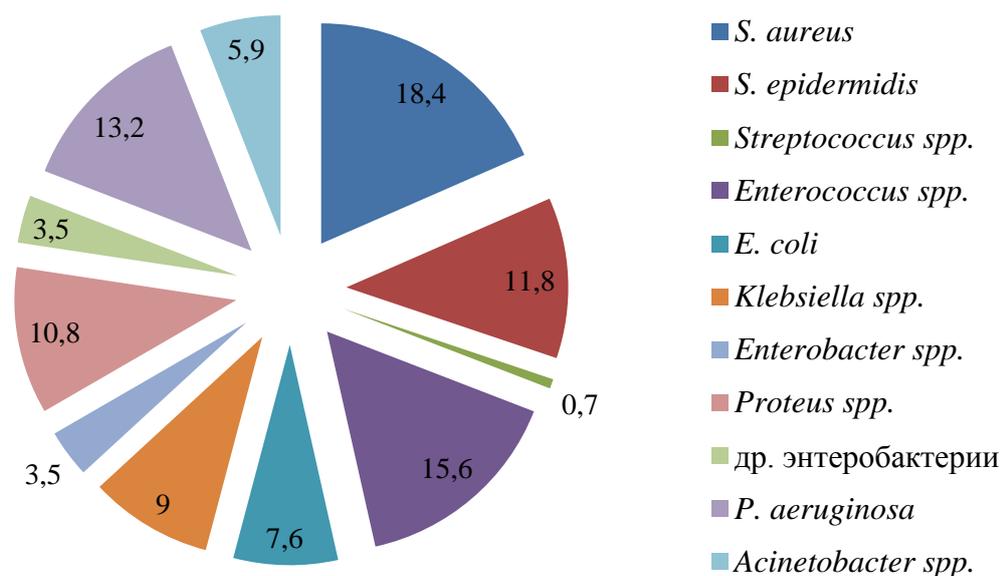


Рисунок 15 - Микрофлора гнойного отделяемого, биоптата от пациентов с гнойно-некротическими формами синдрома диабетической стопы в первые сутки госпитализации

Было обследовано на 5-50 сутки госпитализации 163 больных с гнойно-некротической формой синдрома диабетической стопы, госпитализированных в КГБУЗ «КМКБСМП им. Н.С. Карповича» и КГБУЗ «Красноярскую межрайонную клиническую больницу № 7». При посеве биоптатов, раневого отделяемого на 5-50 сутки госпитализации у больных с синдромом диабетической стопы рост микроорганизмов наблюдался в 95,1 % случаев. Выделено 246 штаммов. Доля монокультур в биоптате, раневом отделяемом на 5-50 сутки госпитализации – 51,6 %, доля ассоциаций микроорганизмов - 48,4 %. Микрофлора была представлена грамположительными микроорганизмами, выделенными в 50 % случаев, в т.ч. *Staphylococcus spp.* - 31,3 % случаев (58 из 246 штаммов), *Enterococcus spp.* - 16,2 % случаев (Рисунок 16).

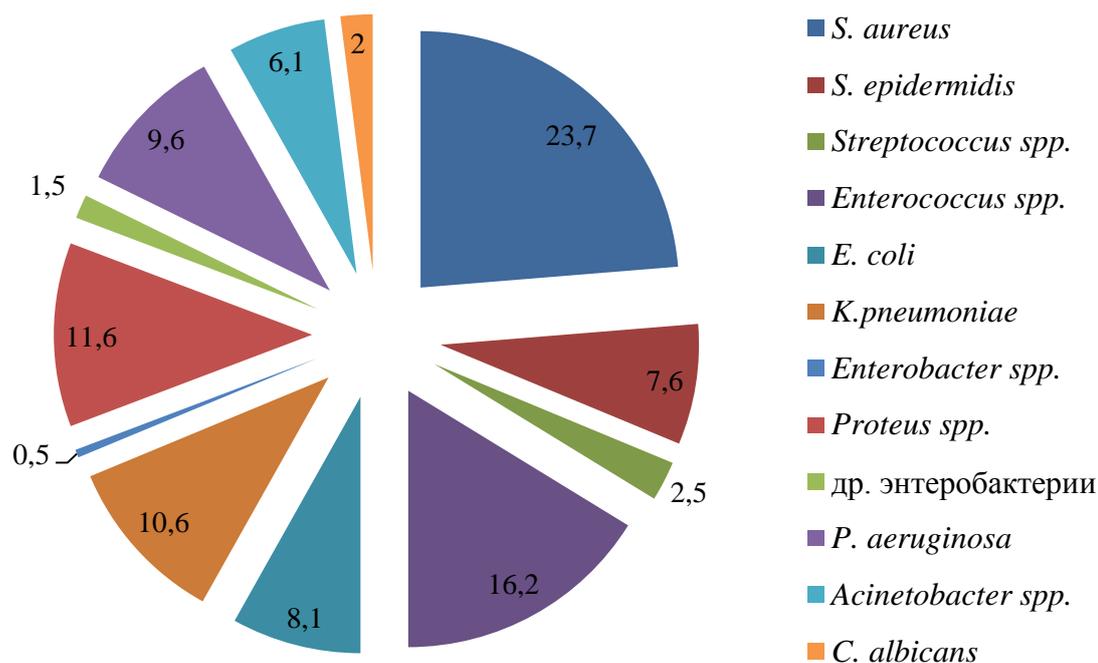
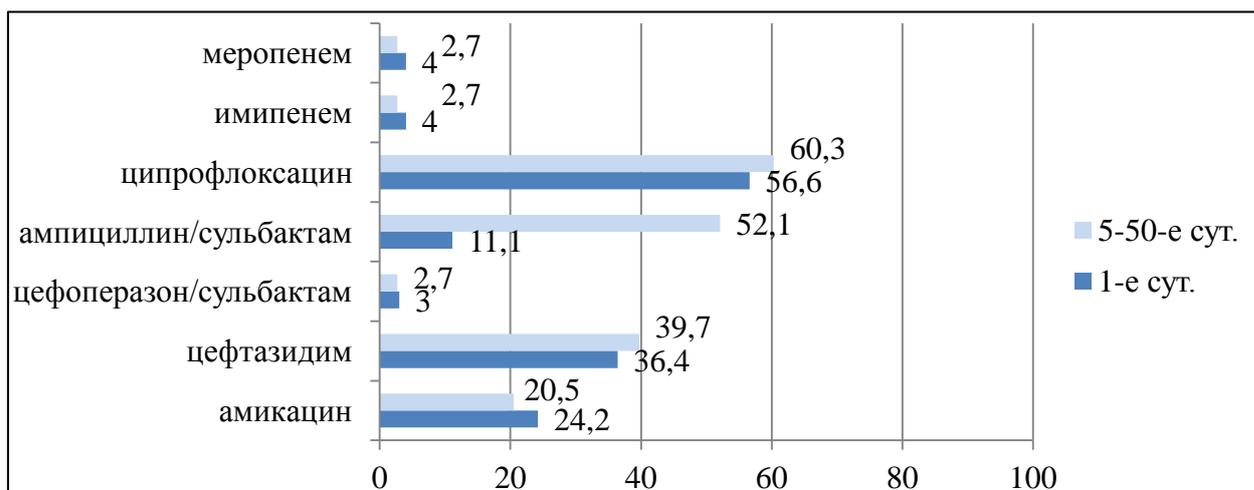


Рисунок 16 – Микробный пейзаж гнойного отделяемого, биоптата, полученных на 5-50 сутки госпитализации от пациентов с гнойно-некротическими формами синдрома диабетической стопы (%)

Грамотрицательные микроорганизмы выделены в 48 % случаев, в т.ч. на долю неферментирующих грамотрицательных бактерий - 15,7 % случаев, среди них доминировал вид *P. aeruginosa*. Среди представителей семейства *Enterobacteriaceae* (32,3 %) преобладали виды рода *Proteus*. В 2 % случаев выделили дрожжеподобные грибы р. *Candida*. Наиболее часто встречались ассоциации: MSSA и *P. aeruginosa*; MSSA и *A. baumannii*, *E. faecalis*; *P. aeruginosa* и *Proteus mirabilis*; *K. pneumoniae*; *E. faecalis* и *K. pneumoniae*.

Изучили антибиотикорезистентность штаммов сем. *Enterobacteriaceae*, изолированных от больных с синдромом диабетической стопы в первые 48 часов госпитализации: в 36,4 % случаев резистентны к цефтазидиму, в 3 % и 11,1% случаев резистентны к цефоперазону / сульбактаму и ампициллину / сульбактаму соответственно, в 56,6 % случаев резистентны к ципрофлоксацину; в 24,2 % случаев - к амикацину, в 4 % - к карбапенемам (Рисунок 17).

А



Б

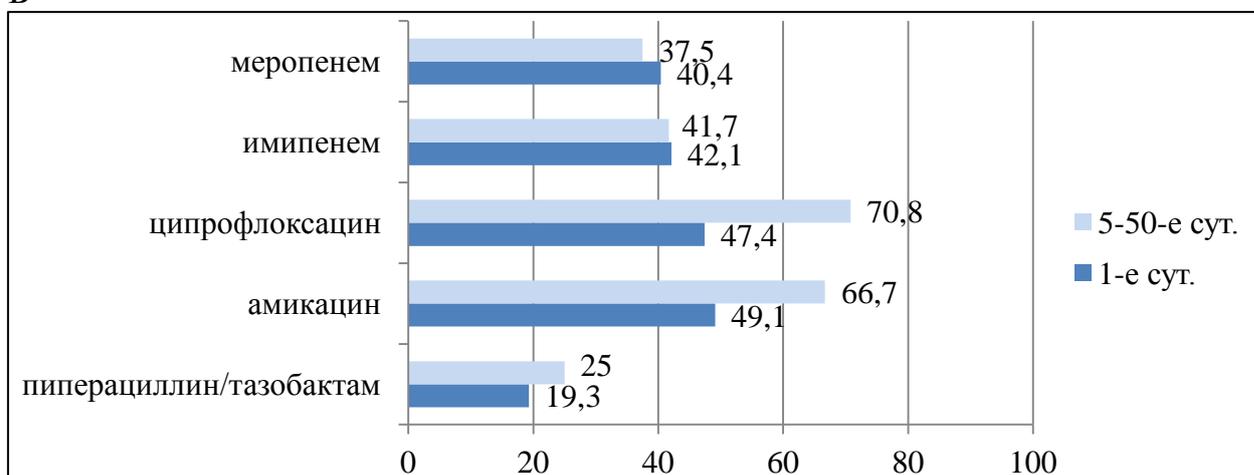


Рисунок 17 - Результаты определения антибиотикорезистентности (%)

Примечание: А - представители сем. *Enterobacteriaceae*, Б – неферментирующие грамотрицательные бактерии (*Acinetobacter* spp. - за исключением пиперациллин/тазобактама)

Изучили антибиотикорезистентность штаммов сем. *Enterobacteriaceae*, изолированных от больных с синдромом диабетической стопы на 5-50-е сутки госпитализации, установили, что уровень резистентности к амикацину, цефтазидиму, цефоперазону/сульбактаму, ципрофлоксацину и карбапенемам изменился не значительно. Выявили увеличение уровня резистентности к ампициллину/сульбактаму до 52,1 %. Среди энтеробактерий, выделенных в первые сутки госпитализации, доля БЛРС-продуцентов составила 36,4 % (36 из 99 штаммов); на 5-50 сутки госпитализации – 35,3 % (31 из 85 штаммов).

Изучили антибиотикорезистентность штаммов неферментирующих грамотрицательных бактерий, изолированных от больных с синдромом диабетической стопы в первые 48 часов госпитализации, выявили в 49,1 % случаев резистентность к амикацину, в 47,4 % случаев - к ципрофлоксацину, в 41,3 % случаев - к карбапенемам. Изучили антибиотикорезистентность штаммов неферментирующих грамотрицательных бактерий, изолированных от больных с синдромом диабетической стопы на 5-30-е сутки госпитализации и установили, что уровень резистентности неферментирующих грамотрицательных бактерий к карбопенемам изменился не значительно; но увеличилась доля резистентности к амикацину до 66,7 %, к ципрофлоксацину до 70,8 % (Рисунок 17).

Среди неферментирующих грамотрицательных бактерий, выделенных в первые сутки госпитализации, доля МБЛ-продуцентов составила 30,9 % (17 из 55 штаммов); на 5-50 сутки нахождения в стационаре – 31,7 % (13 из 41 штамма).

Выявили устойчивость к ампициллину у 26,7 % штаммов энтерококков, изолированных в первые сутки госпитализации; доля ампициллинрезистентных энтерококков на 5-50-е сутки госпитализации возросла до 28,4 %.

Доля MRSA в первые сутки госпитализации составила 37,7 % (20 из 53 штаммов); а на 5-50-е сутки нахождения пациентов в стационаре – 39,7 % (23 из 58 штаммов) ($p=0,142$, $p=0,836$). Доля метициллинрезистентных штаммов среди коагулазоотрицательных стафилококков составила 26,7 %.

Примерно у 80 % больных сахарным диабетом возникает синдром диабетической стопы и частота больших ампутаций составляет 70-90 %, летальность после которых достигает 60-70 % (при наличии критической ишемии нижних конечностей без коррекции артериального кровотока) [382]. Гнойно-некротические поражения нижних конечностей приводят к летальному исходу у примерно 60 % больных сахарным диабетом, причем у таких больных их развитие наблюдается в 40 раз чаще, по сравнению с

общей популяцией [4, 48, 194]. Частота ампутаций, связанных с диабетом в США составляет 66000 случаев в год; при этом причиной ампутации стопы является гангрена (50–70 %). Пребывание в стационаре таких пациентов с гнойно-некротическими поражениями на 50 % дольше [54]. В развитии гнойно-некротических поражений нижних конечностей у больных сахарным диабетом без риска ампутации выделяют *S. aureus* и β -гемолитические стрептококки, энтерококки, неспорообразующие анаэробы, энтеробактерии, неферментирующие грамотрицательные бактерии [36, 40]. Предикторами инфицирования язв у пациентов с диабетической стопой полирезистентными микроорганизмами, такими как MRSA, и полирезистентные энтерококки, грамотрицательные микроорганизмы, являются длительная антибиотикотерапия препаратами широкого спектра действия, предшествующая госпитализация, хирургическое лечение, что ухудшает прогноз заболевания [40, 390]. Одним из ведущих возбудителей гнойных осложнений у больных диабетом является MRSA, доля которых среди *S. aureus* составляет 40-50% (США) [429].

Изучили молекулярно-генетические особенности у 15 изолятов MRSA. Все изолированные штаммы MRSA были PVL-негативными. 40 % штаммов MRSA отнесились к генетическому варианту ST8/spa1(t008)/agr1/SCCmecIV.3.1.1/CoaIII и имели лейкоцидин lukED, гемолизины, энтеротоксин SEA (*sea*), адгезины (кроме *sna*, *bbp*) (Таблица 22). Выделенные штаммы MRSA варианта ST8/spa1(t008)/agr1/SCCmecIV.3.1.1/CoaIII характеризовались резистентностью к хлорамфениколу (плазмида 2,9 т.п.н.), фторхинолонам, в 50 % случаев устойчивы к аминогликозидам (плазмиды 25 и 27 т.п.н.), к макролидам (плазмиды 2,4 и 2,5 т.п.н.). К остальным изученным препаратам сохраняли чувствительность.

Таблица 22 - Молекулярно-генетические особенности изолятов MRSA, выделенных от больных с гнойно-некротическими формами синдрома диабетической стопы

Определяемые характеристики	Результаты типирования изолятов MRSA		
	n=7	n=2	n=6
1	2	3	4
CC	239	12	8
ST	239	12	8
<i>sra</i>	3 (t037)	(t156)	1 (t008)
SCCmec	III.1.1.2 (IIIa)	нт ¹	IV.3.1.1 (IVc)
<i>agr</i>	1	1	1
<i>coa</i>	IV	I, VII	III
Токсины:			
<i>Лейкоцидины</i>			
<i>lukPVSF</i>	-	-	-
<i>lukE-lukD</i>	+	+	+
<i>lukM</i>	-	-	-
<i>Гемолизины</i>			
<i>hla, hlg, hlg-v</i>	+	+	+
<i>hly (split)</i>	(+)	(+)	(+)
<i>Пептидные цитоллизины</i>			
<i>psmA, hld</i>	+	+	+
<i>Энтеротоксины</i>			
<i>sea</i>	-	-	+
<i>tst</i>	+	-	-
<i>sec, sep, seb, sed, see, seh, set, sel</i>	-	-	-
SapI5 (<i>sek, seq</i>)	+	+	-
<i>sej, seu, 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>			
АСМЕ (<i>arcA</i>)	-	-	-
<i>ssl</i>	+	+	+
<i>edin</i>	-	-	-
Антибиотикорезистентность			
Имипенем (МПК, мкг / мл)	32-64	0,5	0,25
Оксациллин (МПК, мкг / мл)	> 128	64	32
Ампициллин (МПК, мкг / мл)	32-64	8	4
Аминогликозиды	100 %	0 %	50 %
Тетрациклины	100 %	0 %	0 %

1	2	3	4
Макролиды	100 %	0 %	50 %
Линкозамиды	100 %	0 %	0 %
Фторхинолоны	100 %	0 %	100 %
Рифампицин (МПК, мкг / мл)	100 % > 128	0 % 0,008	0 % 0,008
Хлорамфеникол	100 %	100 %	100 %
Сульфаметоксазол/Триметоприм	100 %	0 %	0 %
Гликопептиды	0 %	0 %	0 %
Ванкомицин (МПК, мкг / мл)	0,5	0,5	0,5
Оксазолидиноны	0 %	0 %	0 %
Мупироцин	0 %	0 %	0 %
Плазмиды (т.п.н.)	2,9 (7/7)	4,5 (2/2)	2,9 (6/6)
			2,4 (1/6)
			2,5 (2/6)
			25 (2/6)
			27 (1/6)

Примечание: нт¹ – не типизируемый

46,7 % штаммов MRSA принадлежали к генетическому варианту ST239/spa3(t037)/agr1/SCCmecIII.1.1.2(IIIА)/coaIV и имели лейкоцидин lukED, гемолизины, токсин синдрома токсического шока TSST-1 (*tst*), энтеротоксины SEK (*sek*), SEQ (*seq*), адгезины (кроме *bbp*). Штаммы MRSA принадлежащие к генетическому варианту ST239/spa3(t037)/agr1/SCCmecIII.1.1.2(IIIА)/coaIV характеризовались резистентностью к макролидам, хлорамфениколу (плазида 2,9 т.п.н.), аминогликозидам, фторхинолонам, линкозамидам, сульфаметоксазол/триметоприму, рифампицину (МПК > 128 мкг / мл), и оказались чувствительными к остальным изученным антимикробным препаратам. Провели PFGE анализ выделенных штаммов и установили, что данные штаммы относились к одному генетическому клону, но при этом имели отличия между собой на один банд.

13,3 % штаммов MRSA (два штамма) были отнесены к генетическому варианту ST12/spanew(t156)/agr1/SCCmecUT/coaIorVII, имели лейкоцидин lukED, гемолизины, энтеротоксины SEC (*sec*), SEP (*sep*), адгезины, кроме *sna*, *bbp*. Штаммы MRSA отнесенные к генетическому варианту ST12/spanew(t156)/agr1/SCCmecUT/coaIorVII характеризовались

чувствительностью к макролидам, рифампицину, сульфаметоксазол/триметоприму, аминогликозидам, фторхинолонам, тетрациклинам, оксазолидинонам, гликопептидам, мупироцину, фузидиевой кислоте, фосфомицину; характеризовались устойчивостью к хлормафениколу (плазмида 4,5 т.п.н.). Один из штаммов MRSA, относящийся к генотипу ST12/spanew(t156)/agr1/SCCmecUT/coaIorVII был изолирован от мужчины К, 84 лет, который проживал в г. Красноярске. Мужчина К экстренно поступил в стационар КГБУЗ «Красноярской межрайонной клинической больницы № 7» 01.10.2010 г. с основным диагнозом *Сахарный диабет 2 типа, стадия декомпенсации. Диабетический гломерулосклероз. Гнойно-некротическое воспаление культи левой голени. Состояние после ампутации правой нижней конечности на уровне верхней трети бедра и левой нижней конечности на уровне верхней трети голени. Сопутствующий диагноз: ИБС: дилатация полости левого желудочка сердца, мелкоочаговый кардиосклероз, стенозирующий коронаросклероз около 50%. Операции от 06.10.2010 г. и 13.10.2010 г.: вторичная хирургическая обработка раны, некрэктомия.* Была назначена стандартная терапия, на фоне которой прогрессировало гнойно-гранулирующее воспаление в мягких тканях культи левой голени. Далее у пациента начался внутриальвеолярный отек легких; двусторонний гидроторакс; мелкоточечные кровоизлияния в слизистые и серозные оболочки, происходили дистрофические изменения паренхиматозных органов. Сохраняющаяся интоксикация в связи с продолжающимся воспалением в культе усугубляла сердечную недостаточность. В итоге к смерти больного 15.10.2010 г. привела развившаяся острая сердечная недостаточность. От данного пациента был выделен из биоптата, забранного во время операции от 06.10.2010 штамм MRSA OC50 г. и впоследствии из аутоптата при патологоанатомическом вскрытии.

У пациентов с гнойно-некротическими формами синдрома диабетической стопы микрофлора гангренозных поражений представлена как

грамотрицательными, так и грамположительными микроорганизмами. Не выявлено статистически значимых различий ($p=0,164$) в спектре микроорганизмов выделенных в первые сутки поступления в стационар и на 5-50 сутки. При гнойно-некротических осложнениях синдрома диабетической стопы доля *S. aureus* среди микрофлоры в первые сутки поступления в стационар составила 18,4 % (53 из 288 штаммов), на 5-50 сутки – 23,7 % (58 из 246 штаммов). По литературным данным за рубежом, по результатам исследований биоптатов пациентов с синдромом диабетической стопы доля *S. aureus* составляет 15-50 % [429], следовательно, полученные результаты соответствуют общемировым. Среди данной категории пациентов в первые сутки поступления в стационар и на 5-50 сутки не выявлено статистически значимых различий во встречаемости полирезистентных микроорганизмов (MRSA, БЛРС-продуцентов среди энтеробактерий, МБЛ-положительных микроорганизмов р. *Pseudomonas*, р. *Acinetobacter*). Среди энтеробактерий, выделенных в первые сутки госпитализации, доля БЛРС-продуцентов составила 36,4 % (36 из 99 штаммов); на 5-50 сутки госпитализации – 35,3 % (31 из 85 штаммов; $p=1,000$). в первые сутки госпитализации доля МБЛ-продуцентов составила 30,9 % (17 из 55 штаммов); на 5-50 сутки нахождения в стационаре – 31,7 % (13 из 41 штамма; $p=1,000$). Доля MRSA в первые сутки госпитализации составила 37,7 % (20 из 53 штаммов); а на 5-50-е сутки нахождения пациентов в стационаре – 39,7 % (23 из 58 штаммов; $p=0,321$).

Больные с синдромом диабетической стопы являются особой категорией, так как поражение тканей у них зачастую приобретает длительный характер и требуется неоднократные госпитализации. При этом, помимо консервативной терапии, зачастую требуется хирургическая обработка ран, предполагающая радикальное удаление всех некротизированных тканей в случае развития гнойного процесса, сопровождающегося некрозом тканей. При этом излишнее иссечение тканей, в т.ч. и здоровых с целью полного удаления некроза нередко может

приводить к дополнительной травматизации и может послужить причиной дальнейшего развития гнойно-инфекционного процесса. В случае недостаточного удаления некротизированных тканей и фибрина, а также сложности проведения некрэктомии при глубоких поражениях, развитие гангрены может приводить к необходимости ампутации конечности [31]. Больных с синдромом диабетической стопы вынуждены экстренно госпитализировать и нередко одни и те же больные находятся на лечении в разных стационарах города. В частности были выявлены больные, от которых выделяли штаммы полирезистентных микроорганизмов в т.ч. MRSA в разные сроки их лечения, в различных стационарах г. Красноярска.

Например, женщина Л, 59 лет, пенсионерка, была доставлена по экстренным показаниям в стационар КГБУЗ «КМКБСМП им. Н.С. Карповича» 11.08.2010 г. с диагнозом: *Основной: Рожистое воспаление правой голени и стопы, буллезно-геморрагическая форма. Сопутствующий.: Варикозное расширение вен нижних конечностей. ПТФС. Хроническая венозная недостаточность III ст. Сахарный диабет II типа, вторичная инсулинопотребная форма, субкомпенсация.* Из анамнеза известно: больная в течении недели отмечала ухудшение самочувствия - температура тела поднималась до 38⁰С, появились выраженная гиперемия кожных покровов, отек, буллы. С данными жалобами больная Л была госпитализирована и получала консервативную терапию, в т.ч. азитромицин, но при этом положительной динамики не наблюдалось. Из патологического материала 21.09.2010 г. в этиологически значимом количестве были выделены *P.aeruginosa* (устойчив к ципрофлоксацину, амикацину), MRSA. На фоне появления участков некроза на передней поверхности правой голени 22.09.2010 была выполнена некрэктомия. После проведенного оперативного вмешательства корректировалась антибиотикотерапия: в т.ч. назначали имипенем/циластатин; затем ципрофлоксацин и метронидазол; а затем рифампицин и ципрофлоксацин. Наблюдалась положительная динамика на фоне терапии: была выражена краевая эпителизация ран, очистились раны,

отделяемое стало серозным. 04.10.2010 пациентка была выписана (провела в стационаре 54 койко-дня). Ту же больную Л 21.10.2010 г. вновь экстренно госпитализировали уже в КГБУЗ «Красноярскую межрайонную клиническую больницу № 7» с диагнозом: *Сахарный диабет II типа тяжелое течение, стадия субкомпенсации, гнойно-некротические трофические язвы правой голени. Рожистое воспаление правой голени, буллезная форма. Варикозная болезнь вен нижних конечностей. ХВН II ст*». Были проведены хирургическая обработка ран и некрэктомия от 21.10.2010 г. и 27.10.2010 г. При посеве биоптата из раны 21.10.2010 г. в этиологически значимом количестве был выделен штамм MRSA. Была проведена противовоспалительная, антибиотикотерапия, обезболивающая, сахароснижающая терапия. Состояние больной улучшилось на фоне лечения, язвы на голени зарубцевались, в области голеностопного сустава поражения уменьшились в размерах, умеренно гранулировали. Больная Л 11.11.2010 г. была выписана на амбулаторное долечивание в удовлетворительном состоянии (провела в стационаре 20 койко-дней).

Изолированные от больной Л штаммы MRSA OC66 и OC159 отнесились к одному и тому же генетическому варианту ST239/spa3(t037)/SCCmecIII.1.1.2(IIIА)/coaIV/agr1 и имели лейкоцидин lukED, гемолизины, токсин синдрома токсического шока TSST-1 (*tst*), энтеротоксины SEK (*sek*), SEQ (*seq*), адгезины (за исключением *bbp*) (Таблица 22). Изолированные штаммы оказались устойчивы практически ко всем изученным группам антимикробных препаратов – аминогликозидам, бета-лактамам (МПК оксациллин - 128 мкг / мл, имипенем – 16 мкг / мл), линкозамидам, макролидам, рифампицину (МПК > 128 мкг / мл), фторхинолонам, сульфаметоксазол/триметоприму, хлорамфениколу, и характеризовались чувствительность к линезолиду, ванкомицину, тейкопланину, фосфомицину, мупироцину, фузидовой кислоте. По результатам PFGE анализа выявили полное совпадение профиля бандов у

штаммов MRSA, выделенных от одной больной, при ее госпитализации в разных стационарах.

3.2.3 Выявление роли MRSA в развитии вторичных осложненных ИКМТ – инфицированных ожоговых ран

В 2013-2016 гг. исследовали биоптаты, раневое отделяемое, полученные в первые 48 часов поступления в стационар и затем по мере необходимости от 145 пациентов с термическими ожогами IIIA, IIIB и IV степени, госпитализированных в отделение анестезиологии-реанимации №4 краевого ожогового центра ККБ. При посеве биоптатов, раневого отделяемого, полученных от ожоговых больных в первые сутки исследования рост микроорганизмов выявили в 25,5 % случаев, в этиологически значимом количестве. Выделено 74 штамма. В биоптате, раневом отделяемом доля ассоциаций микроорганизмов составила 30,4 % (Таблица 23). У ожоговых больных в первые сутки при исследовании биоптата, раневого отделяемого в составе микрофлоры преимущественно были грамположительные микроорганизмы, доля которых 69 % и представлены *Staphylococcus* spp, а также *Enterococcus* spp. и *Corynebacterium* spp. (Таблица 23).

S. aureus изолированы в 47,3 % случаев (35 из 74 штаммов). В 25,7 % случаев выделены неферментирующие грамотрицательные бактерии, среди них доминировали *P. aeruginosa*. На долю семейства *Enterobacteriaceae* приходилось 5,3 %, доминировали *Enterobacter* spp. Дрожжеподобные грибы р. *Candida* изолированы не были. В первые сутки госпитализации часто встречающимися ассоциантами были MSSA и *P. aeruginosa* (21,4 %); MSSA и метициллинчувствительные *Staphylococcus epidermidis* (28,6 %); MRSA и *Corynebacterium* spp. (21,4 %); *P. aeruginosa* и *Proteus vulgaris* (14,3 %).

Таблица 23 – Микробный пейзаж гнойных осложнений у ожоговых больных (2013-2016 гг.)

Микроорганизмы	Количество (%)					
	1-е сутки n=145	10-е сутки n=106	20-е сутки n=45	30-е сутки n=24	40-е сутки n=13	50-е сутки n=4
Моноинфекция	32 (69,6)	62 (63,3)	30 (71,4)	13 (56,5)	6 (54,5)	1 (25)
Микст-инфекция	14 (30,4)	36 (36,7)	12 (28,6)	10 (43,5)	5 (45,5)	3 (75)
Enterobacteriaceae	4 (5,3)	23 (14,1)	9 (16,1)	4 (10,3)	3 (13)	6 (50)
<i>E. coli</i>	0	6 (3,7)	0	0	0	0
<i>Enterobacter</i> spp.	2 (2,7)	2 (1,2)	1 (1,8)	1 (2,6)	0	1 (8,3)
<i>Proteus</i> spp.	1 (1,3)	7 (4,3)	3 (5,4)	0	2 (8,7)	3 (25)
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	1 (1,3)	8 (4,9)	5 (8,9)	3 (7,7)	1 (4,3)	2 (16,7)
НГОБ	19 (25,7)	61 (37,6)	21 (37,5)	14 (35,8)	12 (52,2)	3 (25)
<i>Pseudomonas</i> spp.	11 (14,9)	29 (17,9)	17 (30,4)	9 (23,1)	9 (39,2)	2 (16,7)
<i>Acinetobacter</i> spp.	8 (10,8)	32 (19,7)	4 (7,1)	5 (12,7)	3 (13,0)	1 (8,3)
Грамположительные	51 (69)	76 (47,1)	26(46,4)	20 (51,3)	8 (34,8)	2 (16,7)
<i>Enterococcus</i> spp.	2 (2,7)	9 (5,6)	1 (1,8)	0	3 (13,0)	1 (8,4)
<i>Streptococcus</i> spp.	1 (1,3)	1 (0,6)	0	1 (2,6)	0	0
<i>S. aureus</i> MSSA	28 (37,8)	28 (17,3)	6 (10,6)	3 (7,7)	0	0
<i>S. aureus</i> MRSA	7 (9,6)	27 (16,8)	17 (30,4)	12 (30,7)	4 (17,5)	1 (8,3)
<i>S. epidermidis</i> MSSE	5 (6,8)	6 (3,7)	1 (1,8)	1 (2,6)	1 (4,3)	0
<i>S. epidermidis</i> MRSE	0	4 (2,5)	0	2 (5,1)	0	0
<i>Corynebacterium</i> spp.	8 (10,8)	1 (0,6)	1 (1,8)	1 (2,6)	0	0
Грибы	0	2 (1,2)	0	1 (2,6)	0	1 (8,3)
<i>Candida</i> spp.	0	2 (1,2)	0	1 (2,6)	0	1 (8,3)
Всего	74 (100)	162 (100)	56 (100)	39 (100)	23 (100)	12 (100)

Примечание: n – количество обследованных

При посеве биоптатов, раневого отделяемого, полученного на 10-е-50-е сутки пребывания в стационаре ожоговых больных рост был получен в 92,7 % случаев. Выделено 292 штамма. Ассоциации микроорганизмов выделили в 62,9 % случаев (Таблица 23). Доминировали грамотрицательная флора, выделенная в 53,4 % случаев. НГОБ составили 38,0 %, при этом преобладали виды *P. aeruginosa* и *Acinetobacter baumannii*. Семейство *Enterobacteriaceae* встречалось в 15,4 % случаев и доминировали *Proteus* spp. и *Klebsiella pneumoniae*. В 45,2 % случаев изолировали грамположительные микроорганизмы и представлены *Staphylococcus* spp. (38,7 %), *Enterococcus*

spp. (4,8 %) (Таблица 23). *S. aureus* изолированы в 33,6 % случаев (98 из 292 штаммов). Выделены в 1,0 % случаев дрожжеподобные грибы р. *Candida*.

На 10-е - 50-е сутки часто выделяли ассоциации при гнойных осложнениях у ожоговых больных *A. baumannii*, *K. pneumoniae* и MRSA (25,8 %), *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae* и *A. baumannii* (15,2 %); *P. aeruginosa* и *A. baumannii* (15,2 %); *P. aeruginosa* и *K. pneumoniae* (15,2 %); MRSA и *P. aeruginosa* (15,2 %); *K. pneumoniae* и MRSA (6,1 %); *A. calcoaceticus*, *Candida albicans* и *K. pneumoniae* (1,0 %).

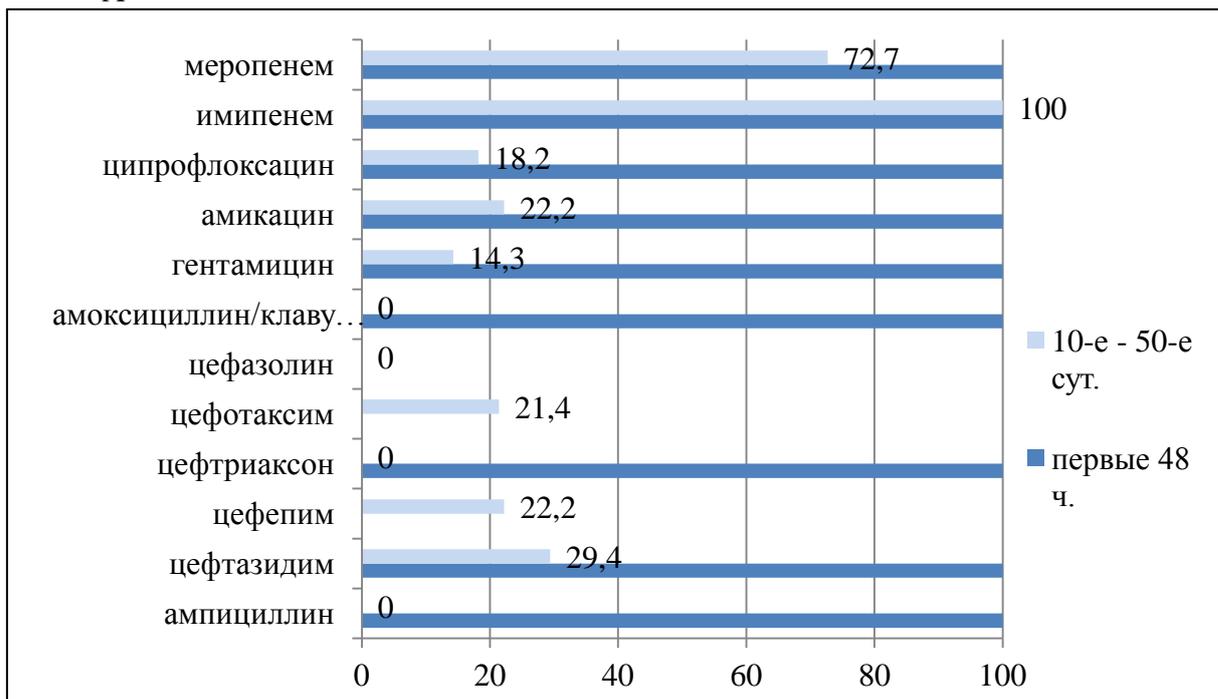
По результатам изучения чувствительности к антибиотикам микроорганизмов сем. *Enterobacteriaceae*, выделенных от ожоговых больных в первые 48 часов, выявили 100 % чувствительность к цефтриаксону, ампициллину, амоксициллин/клавулановой кислоте, цефтазидиму, амикацину, ципрофлоксацину, гентамицину, карбапенемам (Рисунок 18).

Чувствительность к антибиотикам сем. *Enterobacteriaceae* на 10-е-50-е сутки нахождения в стационаре больных с ожогами достоверно снизилась: 100 % штаммов устойчивы к апициллину, цефазолину, цефтриаксону, амоксициллин/клавулановой кислоте; 22,2 % изолятов чувствительны к амикацину; 18,2 % изолятов чувствительны к ципрофлоксацину; 72,7 % изолятов чувствительны к меропенему и 100 % изолятов чувствительны к имипенему (Рисунок 18).

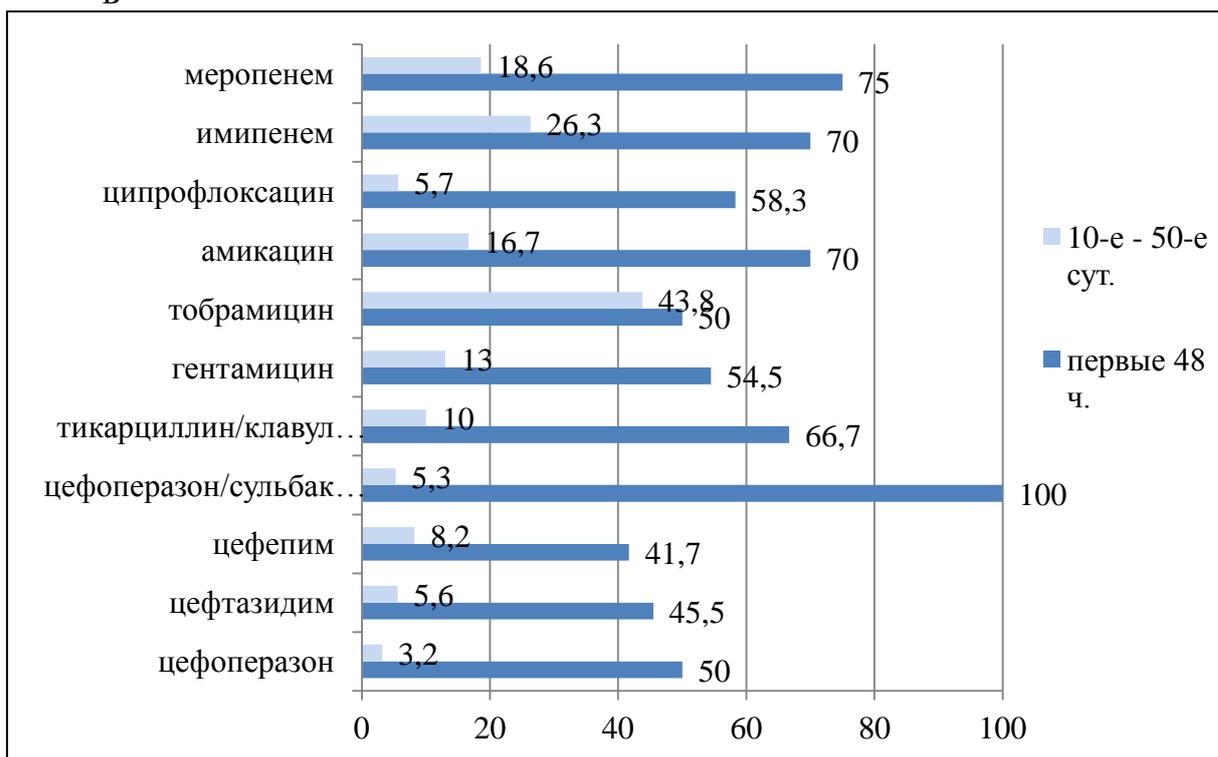
Уровень XDR - 33,3 %, MDR - 66,7 % среди штаммов *K. pneumoniae*; 25 % и 75 % соответственно - среди штаммов *Proteus spp.*

Продукция β-лактамаз расширенного спектра действия является основным механизмом устойчивости к антибиотикам у представителей сем. *Enterobacteriaceae*. Доля продуцентов БЛРС среди энтеробактерий составила 53 % (*K. pneumoniae* – 100 %, *Proteus spp.* – 50 %).

А



Б



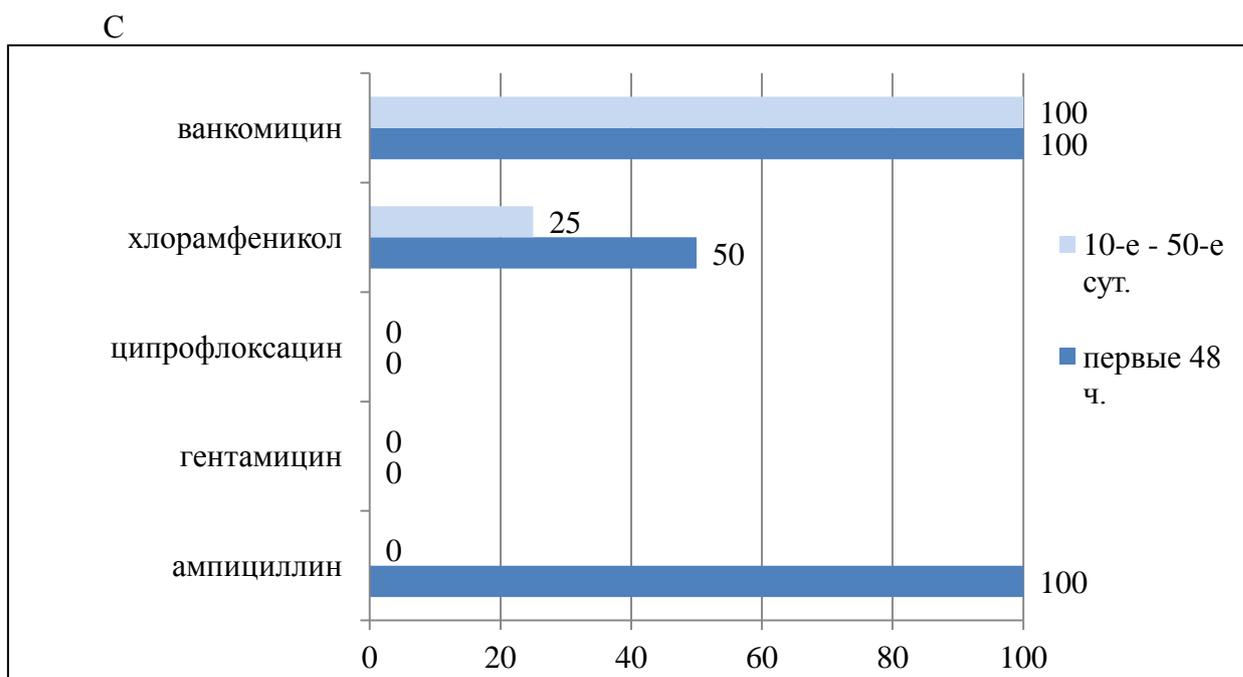


Рисунок 18 - Чувствительность к антибактериальным препаратам (%)

Примечание: А - представители сем. *Enterobacteriaceae*, Б – неферментирующие грамотрицательные бактерии (*Pseudomonas* spp., *Acinetobacter* spp.), С - штаммы *Enterococcus* spp.

Штаммы НГОБ, выделенные от больных с ожогами в первые сутки, установили чувствительность 100 % к цефоперазону/сульбактаму; чувствительность 66,7 % к тикарциллину/клавулановой кислоте; чувствительность 50 % к цефоперазону, тобрамицину; чувствительность 70 % к имипенему, амикацину; чувствительность 75 % меропенему (Рисунок 17). На 10-е - 50-е сутки чувствительность к антибиотикам штаммов НГОБ, достоверно снизилась – менее 10 % штаммов сохраняли чувствительность к цефалоспорином и ингибиторозащищенным пенициллинам; 16,7 % штаммов были чувствительны к амикацину; 5,7 % чувствительны к ципрофлоксацину; 18,6 % и 26,3 % штаммов чувствительны к меропенему и имипенему соответственно (Рисунок 18). Изоляты *P. aeruginosa* и *A. baumannii* оказались полирезистентными.

Доля XDR среди изолятов *A. baumannii* составила 20 %, PDR – 67 %; среди изолятов *P. aeruginosa* – 17 % и 66 % соответственно. Продукция МБЛ штаммами *P. aeruginosa* и *A. baumannii* обеспечивала резистентность к

карбапенемам, доля которых – 37 %. Доля продуцентов МБЛ среди штаммов *P. aeruginosa* – 19 %, среди штаммов рода *Acinetobacter* – 33 %.

Штаммы *Enterococcus* spp., изолированные от больных с ожогами в первые сутки проявляли 100 % резистентность к ципрофлоксацину, гентамицину; 50 % изолятов сохраняли чувствительность к хлорамфениколу и 100 % изолятов – к ванкомицину, ампициллину. Чувствительность к антибиотикам штаммов *Enterococcus* spp. на 10-е - 50-е сутки снизилась – 100 % штаммов устойчивы к гентамицину, ампициллину, ципрофлоксацину; 25 % изолятов чувствительны к хлорамфениколу; 100 % изолятов чувствительны к ванкомицину (Рисунок18).

Доля MRSA в первые 48 часов составила 20 % (7 из 35 штаммов), метициллинрезистентных *Staphylococcus epidermidis* (MRSE) не выявили. Доля MRSA на 10-е - 50-е сутки составила 62,2 % (61 из 98 штаммов) ($p < 0,001$), доля MRSE составила 40,0 %. Также, помимо фенотипической детекции, использовали ПЦР для подтверждения принадлежности к MRSA.

Пациенты с термическими ожогами IIIA, IIIB и IV степени являются одной из наиболее уязвимых групп в плане колонизации штаммами MRSA, в связи с утратой защитного барьера кожи и иммуносупрессии, что приводит к развитию гнойно-воспалительных осложнений. У таких пациентов инфекционные осложнения развиваются наиболее часто [9, 155]. В Национальном отчете по ожоговым больным США приводятся данные о трех главных осложнениях у пациентов с ожогами, таких как флегмона, пневмония и инфекции мочевыводящих путей [267]. Частыми осложнениями у ожоговых пациентов, не находящихся на искусственной вентиляции легких, являются нагноение области донорского забора, гнойное расплавление аутодерматрансплантатов, флегмона, флебиты, а так же постинъекционные абсцессы [267]. На долю инфекционных осложнений приходится 30-75 % всех смертельных исходов [9, 269, 347]. В случае, если инфекционные осложнения вызваны микроорганизмами с множественной лекарственной устойчивостью риск смертности повышается в 8,5-11 раз у

пациентов с ожогами [93]. Одними из лидирующих возбудителей инфекционных осложнений у ожоговых больных в США являются метициллинчувствительные *S. aureus* (MSSA) (19,6 % от всех обследованных), *Enterococcus faecalis* (12,5 %), MRSA (11,0 %) и *Pseudomonas aeruginosa* (10,7 %) [157]. Ведущими возбудителями инфекционных осложнений у ожоговых пациентов в России также являются *S. aureus* (35,7 %), при этом доля MRSA составляет до 82 % и *P. aeruginosa* (33,3 %) [10, 49, 50, 55].

Провели генотипирование штаммов MRSA для оценки генетического разнообразия микроорганизмов. Установили, что MRSA не имели PVL. Среди больных с ожогами выявили распространения одного клона MRSA - ST239/*spa3*(t037)/*agr1*/SCC*mecIII*.1.1.2(IIIА)/CoaIV. Тип кассеты SCC*mecIII*.1.1.2 (IIIА) такой же как у Бразильского клона (штамм HU25). Однако, выделенные от ожоговых пациентов изоляты MRSA имели ген *tst*, обеспечивающий синтез токсина синдрома токсического шока (Рисунок 19). Остальные признаки штаммов совпадали с линией ST239 MRSA: имели гены *lukED*, гены, отвечающие за синтез гемолизинов, гены, отвечающие за синтез суперантигенов (*sek* and *seq*) и гены, отвечающие за синтез адгезинов, в т.ч. ген *сна* коллаген-адгезин. Изоляты MRSA, выделенные от ожоговых пациентов имели множественную лекарственную резистентность – устойчивы к макролидам, аминогликозидам, линкозамидам, рифампицину, фторхинолонам, хлорамфениколу, сульфаметоксазолу; также выявили высокий уровень МПК к имипенему и оксациллину (Таблица 24). Высокий уровень МПК > 128 мкг / мл к рифампицину также отличал эти штаммы.

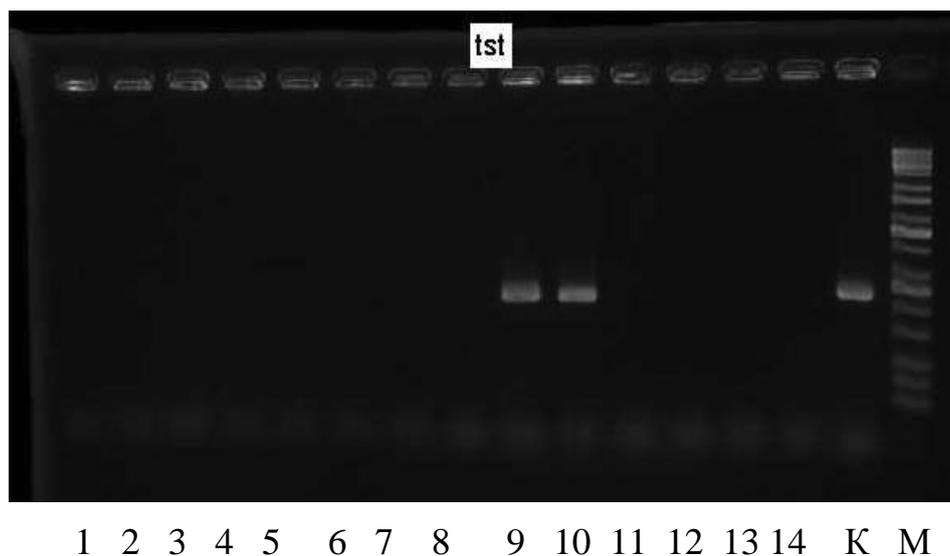


Рисунок 19 - Результаты исследования штаммов MRSA, изолированных от ожоговых пациентов методом ПЦР на определение гена *tst*, обеспечивающего синтез токсина синдрома токсического шока

Примечание: 9, 10 - номера штаммов MRSA, выделенных от ожоговых пациентов; 1-8, 11-14 – номера штаммов MRSA, выделенных от бактерионосителей MRSA; К – штамм ОСЗ – контроль заведомо положительный, М – маркер для определения размера ДНК (100 п.н., 150 п.н., 200 п.н., 300 п.н., 400 п.н., 500 п.н., 600 п.н., 800 п.н., 1000 п.н., 1200 п.н., 1600 п.н., 2000 п.н., 3000 п.н., 4000 п.н., 5000 п.н.) KAPA Universal DNA ladder (KAPA, США).

Таблица 24 – Молекулярно-генетические особенности изолятов MRSA, полученных от ожоговых пациентов в 2013-2015 гг

Генетические характеристики	Гены вирулентности	Штаммы MRSA, полученные от ожоговых пациентов (n=12)
1	2	3
CC		239
ST		239
spa		3 (t037)
SCCmec		III.1.1.2 (IIIА)
agr		1
coa		IV
	Токсины: Лейкоцидины <i>lukPVSF</i>	-

1	2	3
	<i>lukE-lukD</i>	+
	<i>lukM</i>	-
	Гемолизины	
	<i>hla, hlg, hlg-v</i>	+
	<i>hly (split)</i>	(+)
	Белковые цитолизины	
	<i>psma, hld</i>	+
	Энтеротоксины	
	<i>sea</i>	-
	<i>tst</i>	+
	<i>sec, sep, sel</i>	-
	<i>seb, sed, see, seh, set</i>	-
	<i>SapI5 (sek, seq)</i>	+
	<i>sej, seu</i>	-
	<i>egc</i>	-
	Эксфолиатины	
	<i>eta, etb, etd</i>	-
	Адгезины:	
	<i>c12ag</i>	+
	<i>cna</i>	+
	<i>bbp</i>	-
Антибиотикорезистентность		
Имипенем (МПК, мкг/мл)		64
Оксациллин (МПК, мкг/мл)		>128
Ампициллин (МПК, мкг/мл)		32-64
Ванкомицин (МПК, мкг/мл)		0,5
Аминогликозиды		12/12
Тетрациклины		12/12
Макролиды		12/12
Линкозамиды		12/12
Фторхинолоны		12/12
Рифампицин		12/12
Хлорамфеникол		12/12
Сульфаметоксазол		12/12

Примечание: n=12 - число изолятов MRSA, полученных от разных ожоговых пациентов

Принцип параллельного ущерба определяет уровень устойчивости к рифампицину, как предиктор формирования уменьшения чувствительности к гликопептидам и необходимость его мониторинга [20]. Штаммы MRSA были чувствительны к ванкомицину (МПК, 0,5 мкг / мл), линезолиду, тейкопланину, триметоприму, мупироцину, фузидиевой кислоте. Установили наличие крупной плазмиды у выделенных штаммов MRSA (размер 2,9 т.п.н).

При исследовании методом гель-электрофорез в пульсирующем поле выявили генетическую однородность изолятов MRSA, полученных от ожоговых пациентов.

Инфекционные осложнения у ожоговых пациентов возникают в 30-50 % случаев и являются проблемой здравоохранения [267, 269]. В основе лечения ожоговых пациентов лежит быстрое восстановление целостности кожных покровов, но инфекции приводят к гнойному расплавлению аутодерматрансплантов, и это утяжеляет течение заболевания и может приводить к прогрессированию явлений синдрома системного воспалительного ответа и нарастанию синдрома полиорганной недостаточности. Множественная антибиотикорезистентность и резистентность к антисептикам возбудителей инфекционных осложнений у ожоговых пациентов определяет их выживание в ране и приводит к формированию толстого фибринозного налета. При удалении фибринозного налета с обширной раневой поверхности происходит субъективное улучшение состояния больного, снижается температура, улучшается самочувствие, уменьшаются явления энцефалопатии. Применение физических методов дебридмента пораженной поверхности с применением современных антисептиков, приводит к уменьшению частоты локальных гнойных осложнений.

При исследовании биоптатов, раневого отделяемого ожоговых пациентов в первые 48 часов госпитализации микроорганизмы выявлены в 25,5 % случаев, преобладали грамположительные микроорганизмы, в т.ч. MSSA (37,8 %). Грамотрицательные микроорганизмы выделены в 31 % случаев (23 из 74 штаммов). На 10-е - 50-е сутки у ожоговых пациентов микроорганизмы выявлены в 93,2 % случаев; определили изменение структуры микрофлоры инфекционных осложнений с ростом доли полирезистентных микроорганизмов. Грамотрицательные микроорганизмы (53,4 %, 156 штаммов из 292) занимали ведущее место в возникновении инфекционных осложнений. Значимую роль играли НГОб родов

Pseudomonas и *Acinetobacter* – 38,0 % (111 из 292 штаммов) от общей микрофлоры, и это является серьезной проблемой, т.к. они имели высокую степень резистентности к антибиотикам; доля XDR – 18 %, доля PDR – 67 %. На 10-е - 50-е сутки также значимую роль играли стафилококки (38,7 %, 113 из 292 штаммов), доля MRSA составляла 20,9 % (61 из 292 штаммов) от общего числа штаммов, а доля MRSA среди изолированных штаммов *S. aureus* достоверно возросла с 20 % (7 из 35 штаммов) до 62,2 % ($p < 0,001$). Следовательно, преобладали ассоциации мульти- (MDR), экстремально резистентных возбудителей (XDR), а также панрезистентных микроорганизмов (PDR), и этот факт нужно учитывать при выборе препаратов для эмпирической терапии.

Изменение микрофлоры у ожоговых пациентов на 10-е - 50-е сутки в сторону роста доли антибиотикорезистентных микроорганизмов можно объяснить как длительностью антибиотикотерапии, что приводит к селекции резистентных штаммов, так и присоединением госпитальной флоры. Выявили полную генетическую однородность штаммов MRSA, полученных от разных ожоговых пациентов, в результате генопирования, изучения генетического профиля, в т.ч. вирулентности и резистентности, следовательно, полученные штаммы, возможно, имели госпитальное происхождение.

Установлено, что присутствие в ране MRSA в ассоциации с *P. aeruginosa* и/или *A. baumannii* в значимом количестве, может приводить практически к полному лизису пересаженных аутодерматрансплантатов.

3.2.4 Выявление роли MRSA в развитии посттравматического остеомиелита

При исследовании 620 образцов раневого отделяемого, отделяемого свищей, интраоперационного материала от 347 больных с острым посттравматическим остеомиелитом рост микроорганизмов в этиологически

значимом количестве был получен в 70,8 % случаев (в 439 материалах). Выделено 472 штамма. При этом микроорганизмы были выделены в монокультуре в 90,2 % случаев, доля ассоциаций составила 9,8 %. В составе микрофлоры преобладали грамположительные микроорганизмы и выделены в 77,8 % случаев (Таблица 25). В 64,2 % случаев были выделены стафилококки, на долю *S. aureus* приходилось 43,9 % (207 из 472 штаммов). Доля *Enterococcus* spp. составила 10,9 %, при этом преобладали *Enterococcus faecalis* (7,8 %). Стрептококки были выделены в 2,7 % случаев. Грамотрицательная микрофлора выделена в 22 % случаев; на долю представителей семейства *Enterobacteriaceae* приходилось 12,9 %. На долю неферментирующих грамотрицательных бактерий приходилось 9,1 % случаев, выделены *P. aeruginosa* (4,9 %), *Acinetobacter* spp. (4,2 %). Дрожжеподобные грибы р. *Candida* были выделены в 0,2 % случаев.

При исследовании 79 образцов раневого отделяемого, отделяемого свищей, интраоперационного материала от 41 больного с хроническим посттравматическим остеомиелитом в стадии обострения рост микроорганизмов в этиологически значимом количестве был получен в 73,4 % случаев (в 58 материалах). Выделен 71 штамм. При этом микроорганизмы были выделены в монокультуре в 77,6 % случаев, доля ассоциаций составила 22,4 %. В составе микрофлоры преобладали грамположительные микроорганизмы и выделены в 66,2 % случаев (Таблица 25). В 56,3 % случаев были выделены стафилококки, на долю *S. aureus* приходилось 52,1 % (37 из 71 штаммов). Доля *Enterococcus* spp. составила 9,9 %, при этом были выделены только *Enterococcus faecalis*. Грамотрицательная микрофлора выделена в 33,8 % случаев; на долю представителей семейства *Enterobacteriaceae* приходилось 21,1 %. На долю неферментирующих грамотрицательных бактерий приходилось 12,7 % случаев.

На фоне проводимой антибактериальной терапии при исследовании патологических материалов в динамике у пациентов с острым

посттравматическим остеомиелитом в 60,4 % случаев к 5-м суткам после операции не выявили рост микроорганизмов. В 23,8 % случаев микроорганизмы выделяли из патологических материалов на протяжении 10-15 суток. У 15,8 % пациентов выделение возбудителя из патологических материалов сохранялось на протяжении более 15 суток.

Для этиотропной терапии посттравматического остеомиелита, при выделении MRSA, использовали ванкомицин, реже - линезолид и рифампицин. Число препаратов, активных в отношении MSSA, было достаточно велико. С целью антимикробной терапии инфекции, вызванной *P. aeruginosa*, препаратами выбора были цефоперазон/сульбактам, имипенем/цилостатин, цефтазидим.

Таблица 25 - Микрофлора клинических материалов от больных с посттравматическим остеомиелитом

Микроорганизмы	Количество штаммов (%)	
	Острый посттравматический остеомиелит n=620	Хронический посттравматический остеомиелит n=79
Enterobacteriaceae	61 (12,9)	15 (21,1)
<i>E. coli</i>	15 (3,2)	3 (4,2)
<i>Enterobacter</i> spp.	4 (0,8)	0
<i>Proteus</i> spp.	15 (3,2)	9 (12,7)
<i>Klebsiella</i> spp.	20 (4,2)	3 (4,2)
<i>Citrobacter freundii</i>	5 (1,1)	0
<i>Morganella morgannii</i>	2 (0,4)	0
НГ ОБ	43 (9,1)	9 (12,7)
<i>P. aeruginosa</i>	23 (4,9)	5 (7,0)
<i>A. baumannii</i>	20 (4,2)	4 (5,7)
Грамположительные	367 (77,8)	47 (66,2)
<i>Enterococcus</i> spp.	51 (10,9)	7 (9,9)
<i>Streptococcus</i> spp.	13 (2,7)	0
<i>S. aureus</i>	207 (43,9)	37 (52,1)
КОС	96 (20,3)	3 (4,2)
Грибы	1 (0,2)	0
<i>Candida</i> spp.	1 (0,2)	0
Всего	472 (100)	71 (100)

Примечание: n – количество исследованных образцов

Изучили антибиотикорезистентность штаммов представителей сем. *Enterobacteriaceae*, выделенных от больных с острым посттравматическим остеомиелитом, резистентность их к цефтазидиму была установлена в 26,2 % случаев; к цефоперазону/сульбактаму в 3,3 % случаев и ампициллину/сульбактаму в 11,5 %, к ципрофлоксацину были устойчивы 39,3 % штаммов; к амикацину – 19,7 %. К карбапенемам установлена 100 % чувствительность (Таблица 26). Уровень резистентности штаммов представителей сем. *Enterobacteriaceae*, выделенных от больных с хроническим посттравматическим остеомиелитом, выше, в частности к цефтазидиму было устойчиво 30,8 % штаммов, к цефепиму – 23,1 %, к цефоперазону/сульбактаму – 15,4 %, к ампициллину/сульбактаму – 46,2 %, к ципрофлоксацину были устойчивы 76,9 % штаммов; к амикацину – 23,1 %. Чувствительность к карбапенемам сохранялась. Доля БЛРС-продуцентов среди энтеробактерий, выделенных от больных с острым посттравматическим остеомиелитом, составила 13,1 %; от больных с хроническим посттравматическим остеомиелитом – 53,3 %.

При изучении антибиотикорезистентности неферментирующих грамотрицательных бактерий, выделенных от больных с острым посттравматическим остеомиелитом, установили их резистентность к амикацину в 37,8 % случаев, к ципрофлоксацину в 48,6 % случаев, к карбапенемам в 8,1 % случаев. У больных с хроническим посттравматическим остеомиелитом установлена 100 % резистентность штаммов неферментирующих грамотрицательных бактерий к цефалоспорином, ципрофлоксацину, гентамицину, меропенему. 42,9 % штаммов чувствительны к амикацину. 28,6 % штаммов чувствительны к имипенему (Таблица 26). Доля МБЛ-продуцентов среди неферментирующих грамотрицательных бактерий, выделенных от больных с острым посттравматическим остеомиелитом, составила 24,3 %; с хроническим посттравматическим остеомиелитом – 85,7 %.

Доля MRSA, выделенных от больных с острым посттравматическим остеомиелитом, составила 33,8 % (70 из 207 штаммов); с хроническим посттравматическим остеомиелитом – 51,4 % (19 из 37 штаммов) ($p=0,062$).

Остеомиелит по частоте и тяжести, количеству осложнений и рецидивов остается наиболее распространенным и тяжелым заболеванием опорно-двигательного аппарата [53]. Частота развития остеомиелита длинных костей варьирует в широких пределах и достигает при открытых переломах 2–50 %, при огнестрельных – 9–12 %, после хирургического лечения закрытых переломов – 0,2–12,0 %, при эндопротезировании крупных суставов – 0,5–1,4 % [412]. Одним из ведущих возбудителей остеомиелита как острого, так и хронического остается *S. aureus* [42, 412, 444].

Таблица 26- Антибиотикорезистентность (%) основных представителей микрофлоры клинических материалов от больных с посттравматическим остеомиелитом

Антимикробные препараты	Острый посттравматический остеомиелит			Хронический посттравматический остеомиелит		
	MSSA n=137	НГ ОБ n=37	Энтеробактерии n=61	MSSA n=15	НГ ОБ n=7	Энтеробактерии n=13
Цефтазидим	НО	40,5	26,2	НО	100	30,8
Цефепим	НО	35,1	9,8	НО	100	23,1
Цефоперазон/сульбактам	НО	10,8	3,3	НО	57,1	15,4
Ампициллин/сульбактам	НО	НО	11,5	НО	НО	46,2
Ципрофлоксацин	23,4	48,6	39,3	33,3	100	76,9
Амикацин	0	37,8	19,7	13,3	57,1	23,1
Гентамицин	0	27,0	8,2	40	100	30,8
Меропенем	НО	8,1	0	НО	100	0
Имипенем/циластатин	НО	8,1	0	НО	71,4	0
Пенициллин	65,7	НО	НО	80	НО	НО
Эритромицин	20,4	НО	НО	33,3	НО	НО
Клиндамицин	14,6	НО	НО	33,3	НО	НО
Ванкомицин	0	НО	-	0	-	-

Примечание: НО - не определяли

Проведено генотипирование 10 штаммов MRSA, выделенных как от больных с острым посттравматическим остеомиелитом (n=8), так и от больных с хроническим посттравматическим остеомиелитом (n=2). Все выделенные штаммы MRSA были PVL-негативными (Таблица 27).

Таблица 27 - Молекулярно-генетическая характеристика штаммов MRSA, изолированных от больных с посттравматическим остеомиелитом

Определяемые характеристики	Результаты типирования штаммов MRSA	
	n=8	n=2
1	2	3
CC	239	8
ST	239	239
<i>spa</i>	3 (t037)	3 (t037)
SCCmec	III.1.1.2 (IIIА)	III.1.1.1
<i>agr</i>	1	1
<i>coa</i>	IV	IV
Токсины:		
Лейкоцидины		
<i>lukPVSF</i>	-	-
<i>lukE-lukD</i>	+	+
<i>lukM</i>	-	-
Гемолизины		
<i>hla, hlg, hlg-v</i>	+	+
<i>hlb (split)</i>	(+)	(+)
Пептидные цитолизины		
<i>psmA, hld</i>	+	+
Энтеротоксины		
<i>sea</i>	-	+
<i>tst</i>	+	-
<i>sec, sep, seb, sed, see, seh, set, sel</i>	-	-
SapI5 (<i>sek, seq</i>)	+	+
<i>sej, seu, egc*</i>	-	-
Эксфолиатины		
<i>eta, etb, etd</i>	-	-
Адгезины:		
<i>c12ag'</i>	+	+
<i>cna</i>	+	+
<i>bbp</i>	-	-
Другие		
ACME (<i>arcA</i>)	-	-
<i>ssl</i>	+	+
<i>edin</i>	-	-

1	2	3
Антибиотикорезистентность		
Имипенем (МПК, мкг / мл)	32	16
Оксациллин (МПК, мкг / мл)	>128	128
Ампициллин (МПК, мкг / мл)	32-64	32
Аминогликозиды	100 %	0 %
Тетрациклины	100 %	100 %
Макролиды	100 %	100 %
Линкозамиды	100 %	100 %
Фторхинолоны	100 %	0 %
Рифампицин (МПК, мкг / мл)	100 % >128	0 % 0,008
Хлорамфеникол	100 %	0 %
Сульфаметоксазол/Триметоприм	100 %	100 %
Гликопептиды	0 %	0 %
Ванкомицин (МПК, мкг / мл)	0,5-2	1-2
Оксазолидиноны	0 %	0 %
Мупироцин	0 %	0 %
Плазмиды (т.п.н.)	2,9	-

Из изученных штаммов 8 MRSA принадлежали к ST239/spa3(t037)/agr1/SCCmecIII.1.1.2(IIIА)/coaIV характеризовались наличием лейкоцидина lukED, гемолизинов, токсина синдрома токсического шока TSST-1 (*tst*), энтеротоксинов SEK (*sek*), SEQ (*seq*), адгезинов (за исключением *bbp*). Характеризовались антибиотикорезистентностью к аминогликозидам, макролидам, линкозамидам, фторхинолонам, хлорамфениколу (гены резистентности локализованы в плазмиде 2,9 т.п.н.), рифампицину (МПК>128 мкг / мл), сульфаметоксазол/триметоприму и чувствительностью ко всем остальным изученным препаратам. 2 штамма MRSA были выделены от больных с хроническим остеомиелитом и имели уровень МПК к ванкомицину 2 мкг / мл, данные штаммы отнесены к h-VISA. По результатам PFGE анализа данные штаммы относились к одному клону, но при этом отличались между собой на один банд, т.е. не были полностью идентичными. При этом все выделенные штаммы данного генотипа, относились к госпитальным, т.к. были выделены от пациентов позднее 48 часов пребывания в стационаре (пациенты при этом находились в разных стационарах г. Красноярска).

20 % штаммов MRSA относились к ST239/spa3(t037)/agr1/SCCmecIII.1.1.1/coaIV характеризовались наличием лейкоцидина lukED, гемолизинов, энтеротоксина SEA (*sea*), энтеротоксинов SEK (*sek*), SEQ (*seq*), адгезинов (за исключением *bbp*). Характеризовались антибиотикорезистентностью к макролидам, линкозамидам, сульфаметоксазол/триметоприму и чувствительностью ко всем остальным изученным препаратам. Штаммы MRSA данного генотипа были выделены от больных с острым остеомиелитом.

3.2.5 Выявление роли MRSA в развитии внебольничной пневмонии

Обследовано 916 больных с клиническим диагнозом внебольничная пневмония, госпитализированных в КГБУЗ «КМКБСМП им. Н.С. Карповича». При исследовании мокроты, БАЛ от пациентов с внебольничной пневмонией в первые 48 часов госпитализации, рост микроорганизмов был получен в 9,5 % случаев (у 87 обследованных). Изолировано 94 штамма (Таблица 28). При этом, в основном были выделены монокультуры (в 93,1 % случаев). В составе микрофлоры преобладали грамположительные микроорганизмы, выделенные в 51,1 % случаев и представленные *S. aureus* – 35,1 % (33 из 94 штаммов); доля MRSA 12,1 % (4 из 33 штаммов) и *S. pneumoniae* – 16,0% (Таблица 28). На долю неферментирующих грамотрицательных бактерий (НГОб) приходилось 19,2 % случаев, при этом среди них выделяли *P. aeruginosa* и *A. baumannii* в 9,6 % случаев соответственно. Среди представителей семейства *Enterobacteriaceae* (29,7 %) доминировали *K. pneumoniae* (17,1 %). Дрожжеподобные грибы р. *Candida* выделены не были. Наиболее частыми ассоциантами в первые сутки госпитализации являлись MSSA и *P. aeruginosa*; MSSA и *A. baumannii*; MRSA и *K. pneumoniae*.

Таблица 28 - Микрофлора ВХП, крови у больных внебольничной пневмонией, 2011-2016 гг.

Микроорганизмы	Количество (%)									
	1-е сутки		5-е сутки		10-е сутки		20-е сутки		30-е сутки	
	ВХП (n=916)	Кровь (n=472)	ВХП (n=170)	Кровь (n=235)	ВХП (n=106)	Кровь (n=113)	ВХП (n=41)	Кровь (n=62)	ВХП (n=8)	Кровь (n=31)
Наличие роста	87(9,5)	30(6,4)	70(41,2)	9(3,8)	58(54,7)	7(6,2)	26(63,4)	5(8,1)	7(87,5)	2(6,5)
Моноинфекция	81(93,1)	30(100)	48(68,6)	9(100)	46(79,3)	7(100)	22(84,6)	5(100)	5(71,4)	2(100)
Микст-инфекция	6(6,9)	0	22(31,4)	0	12(20,7)	0	4(15,4)	0	2(28,6)	0
Enterobacteriaceae	28(29,7)	6(20,1)	31(31,9)	1(11,1)	25(32,8)	2(28,6)	8(24,2)	0	2(22,2)	0
БЛРС+	6	0	18	-	23	1	6	0	2	0
БЛРС-	22	2	14	-	2	1	2	0	0	0
<i>E. coli</i>	9(9,6)	3(10,1)	5(5,2)	0	2(2,6)	0	1(3,0)	0	0	0
<i>Enterobacter</i> spp.	1(1,0)	0	3(3,1)	0	3(3,9)	0	2(6,0)	0	1(11,1)	0
<i>Proteus</i> spp.	1(1,0)	1(3,3)	2(2,0)	1(11,1)	0	0	0	0	0	0
<i>Serratia</i> spp.	1(1,0)	0	0	0	3(3,9)	0	0	0	0	0
<i>Klebsiella</i> spp.	16(17,1)	2(6,7)	21(21,6)	0	17(22,4)	2(28,6)	5(15,2)	0	1(11,1)	0
НГОБ	18(19,2)	2(6,6)	34(35,1)	1(11,1)	37(48,8)	2(28,7)	18(54,6)	1(20,0)	6(66,7)	0
МБЛ+	1	0	6	0	6	1	5	0	3	0
МБЛ-	17	2	25	1	32	1	12	1	3	0
<i>Pseudomonas</i> spp.	9(9,6)	1(3,3)	15(15,5)	0	13(17,2)	1(14,3)	9(27,3)	1(20,0)	3(33,3)	0
<i>Acinetobacter</i> spp.	9(9,6)	1(3,3)	19(19,6)	1(11,1)	24(31,6)	1(14,3)	9(27,3)	0	3(33,4)	0
Грам+	48(51,1)	21(70,0)	15(15,5)	6(66,7)	5(6,6)	3(42,8)	2(6)	3(60,0)	0	2(100)
<i>S. pneumoniae</i>	15(16,0)	5(16,7)	1(1,1)	1(11,1)	0	1(14,3)	0	0	0	0
<i>S. aureus</i>	33(35,1)	16(53,3)	14(14,4)	5(55,6)	5(6,6)	2(28,5)	2(6,0)	3(60,0)	0	2(100)
<i>S. aureus</i> MSSA	29(87,9)	12(75,0)	8(57,1)	5(100)	2(40,0)	1(50)	0	1(33,3)	0	0
<i>S. aureus</i> MRSA	4(12,1)	4(25,0)	6(42,9)	0	3(60,0)	1(50)	2(100)	2(66,7)	0	2(100)
Грибы	0	1(3,3)	17(17,5)	1(11,1)	9(11,8)	0	5(15,2)	1(20,0)	1(11,1)	0
<i>Candida</i> spp.	0	1(3,3)	17(17,5)	1(11,1)	9(11,8)	0	5(15,2)	1(20,0)	1(11,1)	0
Всего микроорганизмов	94(100)	30(100)	97(100)	9(100)	76(100)	7(100)	33(100)	5(100)	9(100)	2(100)

Примечание: n – количество обследованных; Грам+ - грамположительные

При исследовании БАЛ (184 обследованных) микроорганизмы выявлены в 29 случаях (15,8 %) в монокультуре. Доминировали грамотрицательные микроорганизмы – 68,9 %; на долю представителей сем. *Enterobacteriaceae* пришлось 31,0 %, в том числе доля *K. pneumoniae* составила 24,1 %, доля *E. coli* – 6,9 %. На долю НГОБ приходилось 37,9 % случаев, при этом среди них выделяли *P. aeruginosa* в 20,7 % случаев и *A. baumannii* в 17,2 % случаев. Грамположительные микроорганизмы выделены из БАЛ в 31,1 % случаев и представлены *S. aureus* – 17,2 % (5 из 29 штаммов); доля MRSA составила 40 % (2 из 5 штаммов) и *S. pneumoniae* – 13,8 %.

Недостатком исследований этиологии внебольничной пневмонии в нашей работе явилось отсутствие выявления прихотливых микроорганизмов, таких как *M. pneumoniae*, *C. pneumoniae*, *H. influenzae*.

У 472 обследованных с тяжелым течением внебольничной пневмонии в качестве исследуемого материала в первые сутки госпитализации была забрана кровь. Возраст 18 – 92 лет (средний возраст $43,0 \pm 20,6$), среди обследованных доля женщин составила 31,1 % (147 обследованных), доля мужчин - 68,9 % (325 обследованных). Рост микроорганизмов в крови выявлен в 6,4 % случаев, при этом в 100 % случаев выделена моноинфекция. Изолировано 30 штаммов. Возраст пациентов, от которых был получен рост при посеве крови, составил 24-79 лет (средний возраст $43,0 \pm 19,3$), из них 8 - женщины и 22 - мужчины. При исследовании крови от больных с внебольничной пневмонией в первые сутки в составе микрофлоры преобладали грамположительные микроорганизмы, выделенные в 70 % случаев и представленные преимущественно *S. aureus* - 53,3 % (16 из 30 штаммов), при этом доля MRSA составила 25% (4 из 16 штаммов) (Таблица 28). *S. pneumoniae* были выделены из крови от 5 обследованных 32-77 лет (средний возраст $41,0 \pm 16,8$), из них 2 - женщины и 3 - мужчины. У троих обследованных, у которых был выделен *S. pneumoniae*, образцы крови были посеяны повторно несколько раз, повторный рост микроорганизмов *S.*

pneumoniae был получен в 1 случае. Среди представителей семейства *Enterobacteriaceae* (20,1 %) доминировали *E. coli* (10,1 %). На долю неферментирующих грамотрицательных бактерий (НГОб) приходилось 6,6 % случаев, при этом были выделены по одному штамму *P. aeruginosa* и *A. baumannii*. Дрожжеподобные грибы р. *Candida* выделены от одного пациента.

На 5-е сутки мокрота, БАЛ были исследованы у 170 пациентов, рост микроорганизмов получен в 41,2 % случаев (70 обследованных). Выделено 97 штаммов микроорганизмов. Доминировали грамотрицательные микроорганизмы, выделенные в 67,0 % случаев. Среди представителей семейства *Enterobacteriaceae* (31,9 %) преобладали *Klebsiella spp* (21,6 %). На долю НГОб приходилось 35,1 % случаев, преобладали *A. baumannii* (19,6 %). Грамположительные микроорганизмы выделены в 15,5 % случаев и представлены в 14,4 % *S. aureus* (14 из 97 штаммов), при этом доля MRSA составила 42,9 % (6 из 14 штаммов) (Таблица 28). *S. pneumoniae* были выделены от 1 обследованного (1,1 %). Дрожжеподобные грибы р. *Candida* выделены от 17 пациентов (17,5 %).

На 5-е сутки кровь была исследована у 235 пациентов, рост микроорганизмов получен в 3,8 % случаев (9 обследованных). Выделено 9 штаммов. Доминировали грамположительные микроорганизмы, выделенные в 66,7 % случаев и представленные преимущественно *S. aureus* в 55,6 % случаев (5 из 9 штаммов), при этом доля MRSA составила 0 % (Таблица 28). *S. pneumoniae* были выделены из крови от 1 обследованного (11,1 %). Среди представителей семейства *Enterobacteriaceae* (11,1 %) был выделен *Proteus spp*. На долю неферментирующих грамотрицательных бактерий (НГОб) приходилось 11,1 % случаев, был выделен штамм *A. baumannii*. Дрожжеподобные грибы р. *Candida* выделены от одного пациента.

На 10-е сутки материал из нижних отделов дыхательных путей был исследован у 106 пациентов, рост микроорганизмов получен в 54,7 % случаев (58 обследованных). Выделено 76 штаммов микроорганизмов. Доминировали грамотрицательные микроорганизмы, выделенные в 81,6 % случаев и

представленные преимущественно *Klebsiella pneumoniae* (22,4 %). В 31,6 % случаев выделены *A. baumannii*. Изоляты *S. aureus* получены в 6,6 % случаев (5 из 76 штаммов), при этом доля MRSA составила 60 % (3 из 5 штаммов) (Таблица 28). *S. pneumoniae* выделены не были. Дрожжеподобные грибы р. *Candida* выделены в 11,8 % случаев.

На 10-е сутки кровь была исследована у 113 пациентов, рост микроорганизмов получен в 6,2 % случаев (7 обследованных). Выделены 7 штаммов. Доминировали грамотрицательные микроорганизмы, выделенные в 57,3 % случаев и представленные преимущественно *K. pneumoniae* (28,6 %). В 14,3 % соответственно выделены *P. aeruginosa* и *A. baumannii*. Изоляты *S. aureus* получены в 28,5 % случаев (2 из 7 штаммов), при этом доля MRSA составила 50 % (1 из 2 штаммов) (Таблица 28). *S. pneumoniae* были выделены из крови от 1 обследованного (14,3 %). Дрожжеподобные грибы р. *Candida* выделены не были.

На 20-е-30-е сутки материал из нижних отделов дыхательных путей был исследован у 49 пациентов, рост микроорганизмов получен в 67,3 % случаев (33 обследованных). Выделено 42 штамма. Доминировали грамотрицательные микроорганизмы, выделенные в 80,9 % случаев и представленные энтеробактериями в 23,8 % случаев; НГОб – 57,1 %. *S. aureus* выделены в 4,8 % случаев (2 из 42 штаммов), при этом доля MRSA составила 100 % (2 из 2 штаммов) (Таблица 28). Дрожжеподобные грибы р. *Candida* выделены в 14,3 % случаев.

На 20-е сутки кровь была исследована у 62 пациентов, рост микроорганизмов получен в 8,1 % случаев (5 обследованных). Выделено 5 штаммов. Доминировали грамположительные микроорганизмы, выделенные в 60 % случаев и представленные *S. aureus* (3 из 5 штаммов), при этом доля MRSA составила 66,7 % (2 из 3 штаммов) (Таблица 28). *S. pneumoniae* выделены не были. Среди грамотрицательных бактерий был выделен штамм *P. aeruginosa* (20 %). Дрожжеподобные грибы р. *Candida* выделены от одного пациента.

На 30-е сутки кровь была исследована у 31 пациента, рост микроорганизмов получен в 6,5 % случаев (2 обследованных). Были выделены только *S. aureus*, при этом доля MRSA составила 100 % (Таблица 28).

В первые сутки госпитализации была изучена чувствительность к антимикробным препаратам изолятов микроорганизмов сем. *Enterobacteriaceae*, выделенных от больных внебольничной пневмонией. Выявили 100 % чувствительность к ампициллину, цефтриаксону, цефтазидиму, амоксициллин/клавулановой кислоте, амикацину, гентамицину, ципрофлоксацину, карбапенемам (Рисунок 20).

Доля продуцентов БЛРС среди представителей сем. *Enterobacteriaceae* составила 21,4 %.

На 5-е - 30-е сутки пребывания в стационаре больных с внебольничной пневмонией чувствительность к антимикробным химиопрепаратам изолятов микроорганизмов сем. *Enterobacteriaceae* снизилась – 75,0 % и 61,8 % штаммов резистентны к цефтазидиму и ампициллин/сульбактаму соответственно; 58,8 % штаммов резистентны к ципрофлоксацину; 41,2 % штаммов резистентны к амикацину. Чувствительность к карбапенемам сохраняется в 95,6 % случаев (Рисунок 20). На 5-е - 30-е сутки пребывания доля продуцентов БЛРС среди представителей сем. *Enterobacteriaceae* составила 73,5 %. При исследовании чувствительности к антимикробным препаратам НГОБ, выделенных в первые сутки, установили 89,5 % чувствительность к карбапенемам; 94,7 % и 89,5 % штаммов чувствительны к ципрофлоксацину и амикацину соответственно. 96,3 % штаммов *Pseudomonas* spp. чувствительны к пиперациллин/тазобактаму (Рисунок 20).

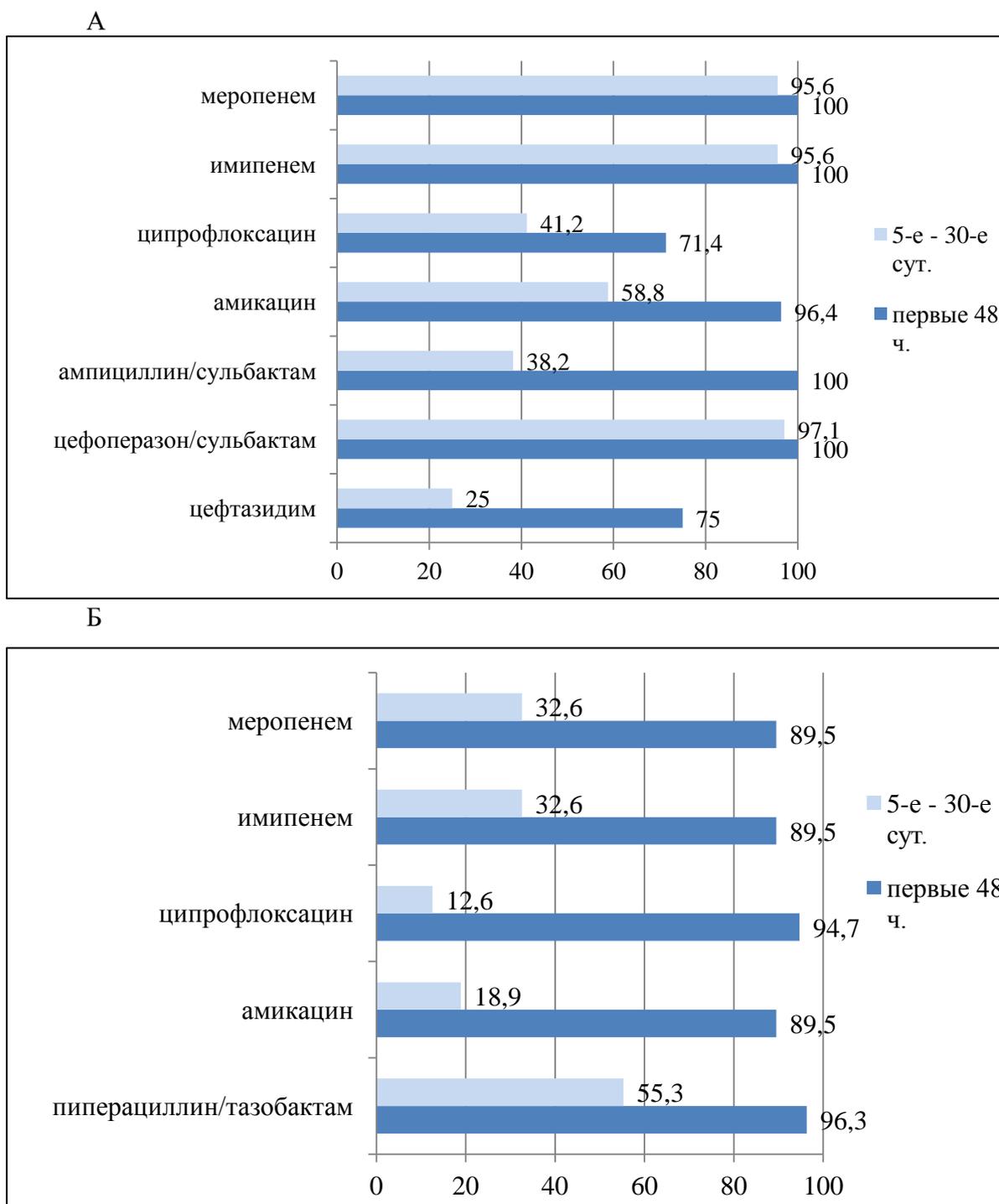


Рисунок 20 - Чувствительность к антибактериальным препаратам (%)

Примечание: А - представители сем. *Enterobacteriaceae*, Б – неферментирующие грамотрицательные бактерии (*Pseudomonas* spp., *Acinetobacter* spp.)

Доля продуцентов МБЛ среди штаммов НГОБ, изолированных в первые сутки составила 5,3 %. На 5-е - 30-е сутки пребывания в стационаре чувствительность к антимикробным препаратам штаммов НГОБ, снизилась:

81,1 % штаммов резистентны к амикацину; 87,4 % - к ципрофлоксацину; 67,4 % штаммов резистентны к карбапенемам (Рисунок 20). Доля продуцентов МБЛ среди штаммов НГОБ, изолированных на 5-е-30-е сутки составила 21,1%.

Доля MRSA среди выделенных *S. aureus* из воздухоносных путей, крови в первые сутки, составила 16,3 % (8 из 49 штаммов); на 5-е - 30-е сутки доля MRSA – 45,5 % (15 из 33 штаммов). Принадлежность к MRSA подтвердили с помощью ПЦР.

Внебольничная пневмония – широко распространенное заболевание у взрослых, занимающее ведущее место в структуре заболеваемости и смертности от инфекционных болезней в развитых странах [63]. Следует отметить, что наибольшую проблему для врачей представляют пациенты с тяжелой внебольничной пневмонией, т.к., несмотря на доступные методы диагностики и лечения, в том числе современные антимикробные препараты, летальность у данной категории больных остается высокой, а лечение является сложным и дорогостоящим [64]. Описано более ста микроорганизмов (бактерии, вирусы, грибы, простейшие), которые при определенных условиях могут являться возбудителями внебольничной пневмонии [63]. Однако большинство случаев заболевания ассоциируется с относительно небольшим кругом патогенов. К числу наиболее актуальных “типичных” бактериальных возбудителей тяжелой внебольничной пневмонии относятся *S. pneumoniae*, энтеробактерии - *K. pneumoniae* и др., *S.aureus*, *Haemophilus influenzae* [62, 510]. В этиологии тяжелой внебольничной пневмонии существенно возрастает актуальность *P. aeruginosa* в связи с недавним приемом системных антимикробных препаратов, длительной терапией системными кортикостероидами в фармакодинамических дозах, муковисцидозом, вторичным бронхоэктазом у некоторых категорий пациентов. Среди “атипичных” возбудителей при тяжелом течении внебольничной пневмонии наиболее часто выявляется *Legionella pneumophila*, меньшую актуальность представляют *Mycoplasma*

pneumoniae и *Chlamydophila pneumoniae* [63, 424]. По данным НИИ антимикробной химиотерапии ведущими возбудителями тяжелой внебольничной пневмонии являлись *S. pneumoniae* (41,2 %) и энтеробактерии (23,6 %) [41]. По данным Минздрава России, у 90 % больных, умерших от внебольничной пневмонии в стационаре, этиологический диагноз остается неустановленным [41]. Особенности популяции пациентов с внебольничной пневмонией в России: распространенность вредных привычек, частота и структура сопутствующих заболеваний, характер оказания медицинской помощи, в частности, высокая частота госпитализации лиц с нетяжелым течением внебольничной пневмонии, географическое расположение и климатические условия [41]. У иммунокомпетентных пациентов с внебольничной пневмонией возбудителями инфекции могут быть *Pseudomonas aeruginosa*, сем. *Enterobacteriaceae* ESBL+ и штаммы MRSA [424]. Внебольничные штаммы MRSA также стали патогенами внебольничной пневмонии относительно недавно [346]. Американское торакальное общество инфекционных заболеваний Америки (ATS/IDSA) в 2007 году заявили, что посев крови следует проводить выборочно у пациентов с внебольничной пневмонией [314]. В рекомендациях Британского торакального общества (BTS) также указано, что выделение гемокультур необходимо делать у пациентов с умеренным или тяжелым течением внебольничной пневмонии [322]. Напротив, недавние рекомендации Европейского респираторного общества и Европейского общества клинической микробиологии и инфекционных заболеваний (ERS/ESCMID) утверждают, что выделение гемокультур должны выполняться у всех пациентов, CAP (положительные результаты примерно у 5-14 %) [521]. В 2005 году ATS/IDSA внедрила концепцию медико-санитарной пневмонии (HCAP) в качестве типа пневмонии на уровне сообщества (CO) [63]. HCAP составляет от 17,3 % до 73,7 % от внебольничной пневмонии. По сравнению с CAP HCAP ассоциируется с более высоким уровнем возбудителей с

множественной резистентностью (MDR), которые требуют антимикробной терапии широкого спектра действия или модификации начальной терапии.

Исследовали молекулярно-генетические особенности штаммов MRSA, выделенных от больных с внебольничной пневмонией и установили, что все штаммы являлись PVL негативными (Таблица 29).

Таблица 29 - Молекулярно-генетическая характеристика штаммов MRSA, изолированных от больных с внебольничной пневмонией

Определяемые характеристики	Результаты типирования штаммов MRSA
	(n=17)
1	2
CC	8
ST	8
<i>spa</i>	1 (t008)
<i>SCCmec</i>	IV.3.1.1 (IVc)
<i>agr</i>	1
<i>coa</i>	III
Токсины:	
<i>Лейкоцидины</i>	
<i>lukPVSF</i>	-
<i>lukE-lukD</i>	+
<i>lukM</i>	-
<i>Гемолизины</i>	
<i>hla, hlg, hlg-v</i>	+
<i>hly (split)</i>	(+)
<i>Пептидные цитоллизины</i>	
<i>psma, hld</i>	+
<i>Энтеротоксины</i>	
<i>sea</i>	+
<i>tst</i>	-
<i>sec, sep, seb, sed, see, seh, set, sel</i>	-
<i>SapI5 (sek, seq), sej, seu, egc*</i>	-
<i>Эксфолиатины</i>	
<i>eta, etb, etd</i>	-
Адгезины:	
<i>c12ag'</i>	+
<i>cna, bbp</i>	-
Другие	
<i>ACME (arcA), edin</i>	-
<i>ssl</i>	+
Антибиотикорезистентность	
Имипенем (МПК, мкг/мл)	0,125-0,5
Оксациллин (МПК, мкг/мл)	32-64
Ампициллин (МПК, мкг/мл)	4

1	2
Аминогликозиды	23,5 %
Тетрациклины	0 %
Макролиды	0 %
Линкозамиды	0 %
Фторхинолоны	100 %
Рифампицин	0 %
Хлорамфеникол	100 %
Сульфаметоксазол/Триметоприм	0 %
Гликопептиды	0 %
Ванкомицин (МПК, мкг/мл)	0,5-1
Оксазолидиноны	0 %
Мупироцин	0 %

Выделенные штаммы MRSA принадлежали к ST8, spa1 (t008), SCCmec IV.3.1.1., coa III, agr 1, характеризовался наличием лейкоцидина lukED, гемолизинов, энтеротоксина SEA (*sea*), адгезинов (за исключением *cna*, *bbp*). У 4 штаммов MRSA выявили уровень продукции энтеротоксина *sea* – 1,024 нг / мл.

3.2.6 Выявление роли MRSA в развитии госпитальной пневмонии

За период 2012-2016 гг. в г. Красноярске обследовано 272 больных нозокомиальной пневмонией. При исследовании бронхоальвеолярного лаважа или мокроты от пациентов с госпитальной пневмонией рост микроорганизмов был получен в 86,0 % случаев (у 234 обследованных) (Таблица 30). Выделено 482 штамма. При этом, микроорганизмы были выделены преимущественно в составе ассоциаций (в 76,5 % случаев). На 3-5-е сутки пребывания в стационаре в составе микрофлоры воздухоносных путей преобладали грамотрицательные микроорганизмы, выделенные в 71,6 % случаев. Среди представителей семейства *Enterobacteriaceae* (38,1 %) доминировали *K. pneumoniae* (24,8 %), и в 6,2 % случаев выделены *E. coli*. На долю ферментирующих грамотрицательных бактерий приходилось 33,5 % случаев, при этом среди них доминировали *A. baumannii* (19,2 %). Чуть реже, в 14,3 % случаев, были выделены *P. aeruginosa*. Грамположительные микроорганизмы выделены в 12,2 % случаев и представлены *S. aureus* (59 из

482 штаммов) (Таблица 30). Дрожжеподобные грибы р. *Candida* выделены в 16,2 % случаев. Наиболее частыми ассоциантами на 3-5-е сутки являлись *K. pneumoniae* и *Acinetobacter* spp. (19,3 %), *K. pneumoniae* и *Candida albicans* (16,7 %), *K. pneumoniae* и *P. aeruginosa* (13,5 %); *A. baumannii* и *E. coli* (11,9 %), MSSA и *K. pneumoniae* (8,6 %); MRSA и *A. baumannii* (4,5 %).

Таблица 30 - Микрофлора ВХП больных с пневмонией, развившейся позднее 48 часов госпитализации, 2012-2016 гг.

Микроорганизмы	Количество (%)						
	3-5-е сутки (n=272)	10-е сутки (n=24)	15-е сутки (n=36)	20-е сутки (n=21)	30-е сутки (n=16)	40-е сутки (n=6)	50-е сутки (n=2)
Наличие роста	234(86,0)	20(83,3)	33(91,7)	17(81,0)	15(93,8)	6(100)	2(100)
Моноинфекция	55(23,5)	9(45)	20(60,6)	8(47,1)	6(40,0)	2(33,3)	1(50,0)
Микст-инфекция	179(76,5)	11(55)	13(39,4)	9(52,9)	9(60,0)	4(66,7)	1(50,0)
Enterobacteriaceae	184(38,1)	19(47,5)	22(35,5)	11(34,4)	11(40,8)	8(72,7)	2(66,6)
БЛРС+	132(71,7)	15(78,9)	19(86,4)	9(81,8)	4(80,0)	-	2(100)
БЛРС-	52(28,3)	4(21,1)	3(13,6)	2(18,2)	1(20,0)	-	0
<i>E. coli</i>	30(6,2)	1(2,5)	2(3,2)	2(6,3)	0	0	0
<i>Citrobacter</i> spp.	1(0,2)	0	2(3,2)	0	0	0	0
<i>Enterobacter</i> spp.	3(0,6)	2(5,0)	0	0	0	0	0
<i>Proteus</i> spp.	25(5,1)	2(5,0)	3(4,8)	1(3,1)	1(3,7)	3(27,3)	1(33,3)
<i>Serratia</i> spp.	6(1,2)	3(7,5)	1(1,6)	0	0	0	0
<i>Klebsiella</i> spp.	119(24,8)	11(27,5)	14(22,7)	8(25,0)	7(25,9)	4(36,3)	1(33,3)
<i>Morganella</i> spp.	0	0	0	0	3(11,2)	1(9,1)	0
НГОБ	161(33,5)	17(44,5)	36(58,1)	15(46,9)	13(48,1)	1(9,1)	1(33,3)
МБЛ+	36(22,4)	5(29,4)	8(30,8)	7(46,7)	-	-	-
МБЛ-	125(77,6)	12(70,6)	18(69,2)	8(53,3)	-	-	-
<i>Pseudomonas</i> spp.	69(14,3)	8(20,0)	26(41,9)	13(40,6)	7(25,9)	0	1(33,3)
<i>Acinetobacter</i> spp.	92(19,2)	9(22,5)	10(16,2)	2(6,3)	6(22,2)	1(9,1)	0
Грамположительные							
<i>S. aureus</i>	59(12,2)	3(7,5)	2(3,2)	1(3,1)	1(3,7)	1(9,1)	0
<i>S. aureus</i> MSSA	35(59,3)	0	1(50,0)	1(100)	0	0	-
<i>S. aureus</i> MRSA	24(40,7)	3(100)	1(50,0)	0	1(100)	1(100)	-
Грибы							
<i>Candida</i> spp.	78(16,2)	1(2,5)	2(3,2)	5(15,6)	2(7,4)	1(9,1)	0
Всего микроорганизмов	482(100)	40(100)	62(100)	32(100)	27(100)	11(100)	3(100)

Примечание: n – количество обследованных

На 10-е - 20-е сутки при посеве бронхоальвеолярного лаважа или мокроты рост был получен в 86,4 % случаев. Выделено 134 штамма. Доля ассоциаций микроорганизмов составила 47,1 % (Таблица 30). В составе

микрофлоры преобладали грамотрицательные микроорганизмы, выделенные в 89,6 % случаев. На долю НГОБ приходилось 50,7 %, при этом среди них доминировали *P. aeruginosa* (35,1 %). Среди представителей семейства *Enterobacteriaceae* (38,8 %) доминировали *K. pneumoniae* (24,6 %). Грамположительные микроорганизмы выделены в 4,5 % случаев и представлены *S. aureus* (6 из 134 штаммов). Дрожжеподобные грибы р. *Candida* выделены в 6,0% случаев. Наиболее частыми ассоциантами на 10-е - 20-е сутки пребывания в стационаре являлись *K. pneumoniae* и *A. baumannii* (20,3 %), *P. aeruginosa* и *K. pneumoniae* (17,6 %), *C. albicans* и *K. pneumoniae* (3,0 %).

На 30-е -50-е сутки при посеве бронхоальвеолярного лаважа или мокроты рост был получен в 95,8 % случаев. Выделено 41 штамм. Доля ассоциаций микроорганизмов составила 60,9% (Таблица 30). В составе микрофлоры преобладали грамотрицательные микроорганизмы, выделенные в 90,2 % случаев. Среди представителей семейства *Enterobacteriaceae* (53,7 %) доминировали *K. pneumoniae* (29,3 %). На долю НГОБ приходилось 36,6 %, при этом были выделены *P. aeruginosa* в 19,5 % случаев и *A. baumannii* в 17,1 % случаев. Грамположительные микроорганизмы выделены в 4,9 % случаев и представлены *S. aureus* (2 из 41 штаммов). Дрожжеподобные грибы р. *Candida* выделены в 7,3 % случаев. Наиболее частыми ассоциантами на 30-е - 50-е сутки пребывания в стационаре являлись *A. baumannii* и *P. aeruginosa* (19,9 %), *K. pneumoniae* и *P. aeruginosa* (17,4 %), *K. pneumoniae* и *Proteus spp.* (10,6 %).

При исследовании чувствительности к антимикробным препаратам изолятов микроорганизмов сем. *Enterobacteriaceae*, выделенных из бронхоальвеолярного лаважа или мокроты от пациентов с госпитальной пневмонией на 3-5-е сутки, установили резистентность к цефтазидиму в 70,9 % случаев, к ампициллину/сульбактаму в 68,7 % случаев, к ципрофлоксацину - 81,3 %, амикацину – 35,7 %. Выявлена чувствительность

цефоперазону/сульбактаму и карбапенемам в 97,8 % и 97,2 % случаев соответственно (Рисунок 21).

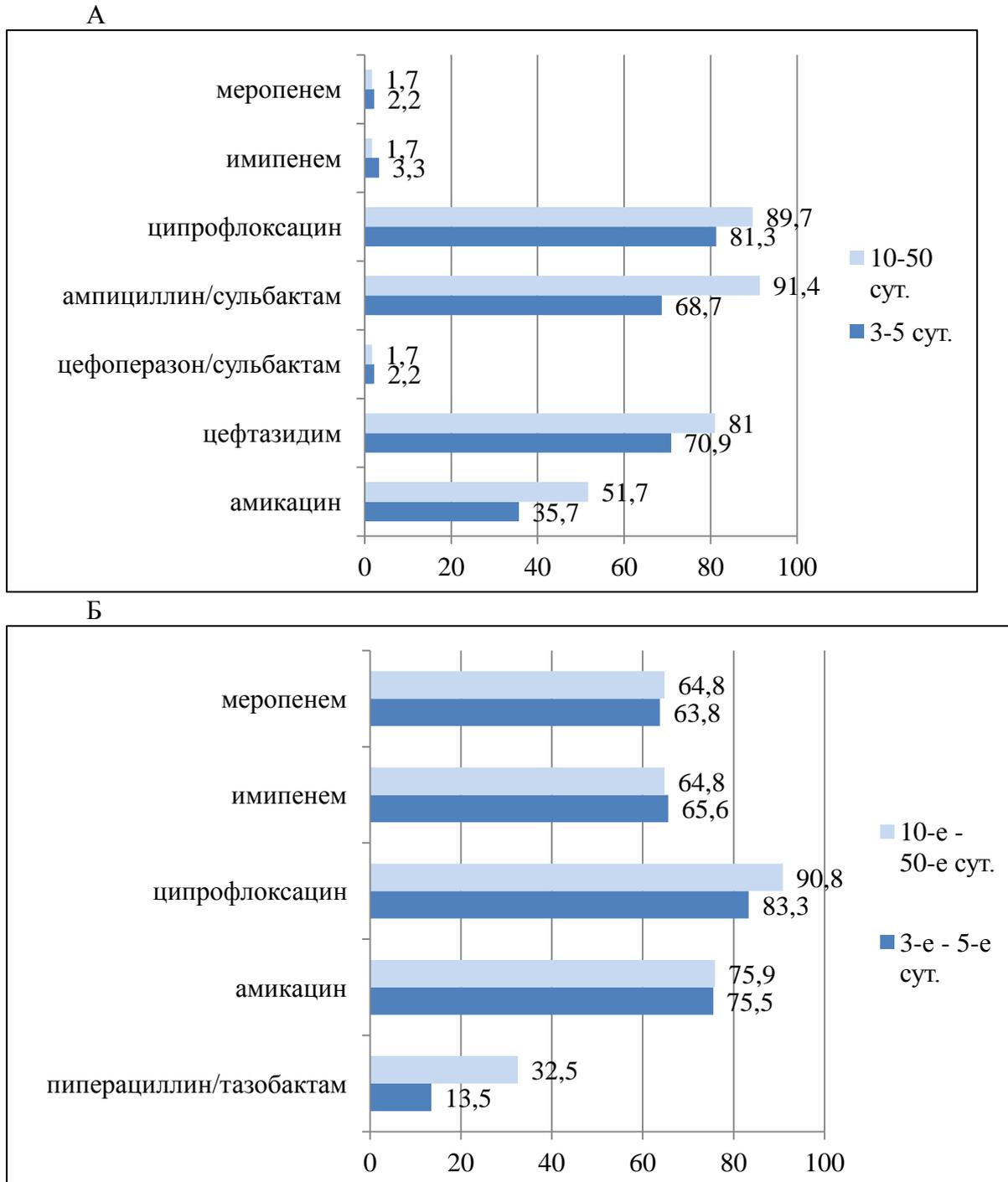


Рисунок 21 - Результаты определения резистентности к антибактериальным препаратам (%)

Примечание: А - представители сем. *Enterobacteriaceae*, Б – неферментирующие грамотрицательные бактерии (*Acinetobacter* spp. - за исключением пиперациллин/тазобактама)

На 10-е - 50-е сутки чувствительность к антимикробным препаратам изолятов микроорганизмов сем. *Enterobacteriaceae*, выделенных от пациентов с госпитальной пневмонией, снизилась – резистентность к цефтазидиму в 81,0 % случаев, к ампициллину/сульбактаму в 91,4 % случаев, к ципрофлоксацину – 89,7 %, амикацину – 51,7 %. Сохраняется чувствительность цефоперазону/сульбактаму и карбапенемам в 98,3 % случаев соответственно (Рисунок 21). Основным механизмом резистентности представителей сем. *Enterobacteriaceae* является продукция бета-лактамаз расширенного спектра действия. Среди энтеробактерий, изолированных на 3-5-е сутки доля продуцентов БЛРС составила 72,5 %; на 10-50-е сутки – 84,5 %.

При исследовании чувствительности к антимикробным препаратам НГОб, выделенных из бронхоальвеолярного лаважа или мокроты от пациентов с госпитальной пневмонией на 3-5-е сутки, установили резистентность изолятов *Acinetobacter* spp. и *Pseudomonas* spp. к амикацину в 75,5 % случаев, к ципрофлоксацину в 83,3 % случаев, к карбапенемам в 64,7 % случаев. Установлена чувствительность к пиперациллин/тазобактаму среди штаммов *Pseudomonas* spp. в 86,5% случаев (Рисунок 21). На 10-е - 50-е сутки установлено повышение резистентности к пиперациллин/тазобактаму среди штаммов *Pseudomonas* spp. – 67,5 %; сохраняется или статистически не значимо снижается уровень резистентности к амикацину, ципрофлоксацину, карбапенемам.

При оценке полученных данных антибиотикорезистентности выделенные изоляты *P. aeruginosa* и *A. baumannii* являлись полирезистентными. Резистентность к карбапенемам штаммов *P. aeruginosa* и *A. baumannii* обусловлена продукцией МБЛ, доля которых на 3-5-е сутки составила 22,1 %, на 10-е - 50-е сутки – 33,3 %.

Доля MRSA среди выделенных *S. aureus* на 3-5-е сутки составила 40,7 % (24 из 59 штаммов); на 10-е - 50-е сутки доля MRSA – 75,0 % (6 из 8 штаммов) ($p=0,126$). Принадлежность к MRSA подтвердили с помощью ПЦР.

Одним из наиболее серьезных осложнений у госпитализированных тяжелых пациентов, значительно повышающих риск летального исхода, увеличивающих длительность и стоимость стационарного лечения, является нозокомиальная пневмония. Нозокомиальная пневмония – заболевание, характеризующееся появлением на рентгенограмме свежих очагово-инфильтративных изменений в легких спустя 48 часов и более после госпитализации в сочетании с клиническими данными, подтверждающими ее инфекционную природу при исключении инфекций, которые находились в инкубационном периоде на момент поступления больного в стационар [34, 61]. Нозокомиальная пневмония является одним из наиболее часто встречающихся в стационаре инфекционных заболеваний и самым частым — у больных отделений реанимации и интенсивной терапии. Клинические и экономические последствия нозокомиальной пневмонии очень значимы, особенно для больных, находящихся на искусственной вентиляции лёгких.

Нозокомиальная (госпитальная, внутрибольничная) пневмония - пневмония, развивающаяся через 48 и более часов после госпитализации, при отсутствии инкубационного периода на момент поступления больного в стационар. Нозокомиальная пневмония, связанная с искусственной вентиляцией легких (НПивл), - пневмония, развившаяся не ранее чем через 48 часов от момента интубации и начала проведения искусственной вентиляции легких, при отсутствии признаков лёгочной инфекции на момент интубации [12]. Однако во многих случаях у хирургических больных манифестация возможна и в более ранние сроки.

Нозокомиальная пневмония занимает третье место (15-18 %) в структуре всех нозокомиальных инфекций в стационаре после инфекций кожи и мягких тканей и мочевых путей, однако показатели летальности при нозокомиальной пневмонии (летальность 20-50 % и более) в 10 и более раз превосходят таковые при двух других указанных нозоологиях [34]. По результатам проспективного исследования, проведенного в 2010 в г. Смоленске микрофлора при нозокомиальной пневмонии у

травматологических больных представлена в 20,2 % случаев *S.aureus* (доля MRSA составила 72 % от числа выделенных штаммов *S.aureus*), в 33,6 % случаев представителями сем. *Enterobacteriaceae*, в 27,8 % случаев НГОБ (*A. baumannii*, *P. aeruginosa*) [34]. Пневмония, связанная с уходом за больным (healthcare-associated pneumonia — HAP), поражает больных, находящихся на лечении в социальных домах, или же регулярно посещающих гемодиализные центры, или в домашних условиях при получении такого лечения, как длительная кислородотерапия, неинвазивная вентиляция легких и др [64]. По структуре возбудителей и патобиологическим характеристикам HAP может быть отнесена к разновидности больничной (нозокомиальной) пневмонии. Выделение HAP в самостоятельную группу обусловлено некоторыми особенностями возбудителей данной пневмонии, а также клинической картиной и методов профилактики и лечения. В структуре возбудителей HAP доминирует грамотрицательная флора и установлен высокий уровень резистентности к АБТ [2]. Наиболее частыми возбудителями являются резистентные к метициллину штаммы стафилококка (MRSA) *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacteriaceae* и др. [64].

Для оценки генетического разнообразия изолятов, было проведено генотипирование штаммов MRSA. Все выделенные штаммы MRSA были PVL-негативными. Выявлено наличие двух клонов MRSA, распространенных среди больных (Таблица 31). 75 % штаммов MRSA были отнесены к генотипу ST239/*spa3*(t037)/*agr1*/SCC*mecIII*.1.1.2(IIIА)/CoaIV, имели гены *lukED*, гены, кодирующие гемолизины, *tst*, гены, кодирующие суперантигены (*sek* and *seq*) и гены, кодирующие адгезины, в т.ч. коллаген-адгезин (*cna*). 25 % штаммов относились к ST8/*spa1*(t008)/*agr1*/SCC*mecIV*.3.1.1/CoaIII, характеризовались наличием лейкоцидина *lukED*, гемолизинов, энтеротоксина SEA (*sea*), адгезинов (за исключением *cna*, *bbp*).

Штаммы MRSA ST239 характеризовались множественной лекарственной устойчивостью, были резистентны к аминогликозидам, макролидам, линкозамидам, фторхинолонам, рифампицину,

хлорамфениколу, сульфаметоксазолу; имели высокий уровень МПК к оксациллину и имипенему (Таблица 31). Высокий уровень резистентности к рифампицину (МПК > 128 мкг / мл) у штаммов MRSA ST239 также является отличительным признаком. У всех штаммов MRSA ST239 выявили наличие крупной плазмиды размером 2,9 т.п.н. Штаммы MRSA ST8 характеризовались устойчивостью к фторхинолонам, хлорамфениколу, выявили наличие плазмиды размером 2,9 т.п.н. (Таблица 31). Все выделенные штаммы MRSA сохраняли чувствительность к ванкомицину (МПК, 0,5 мкг / мл), тейкопланину, линезолиду, мупироцину, триметоприму, фузидиевой кислоте.

Таблица 31 - Молекулярно-генетическая характеристика штаммов MRSA, изолированных от больных с пневмонией, развившейся позднее 48 часов госпитализации

Определяемые характеристики	Результаты типирования штаммов MRSA	
	n=15	n=5
1	2	3
CC	239	8
ST	239	8
<i>spa</i>	3 (t037)	1 (t008)
SCCmec	III.1.1.2 (IIIa)	IV.3.1.1 (IVc)
<i>agr</i>	1	1
<i>coa</i>	IV	III
Токсины:		
<i>Лейкоцидины</i>		
<i>lukPVSF</i>	-	-
<i>lukE-lukD</i>	+	+
<i>lukM</i>	-	-
<i>Гемолизины</i>		
<i>hla, hlg, hlg-v</i>	+	+
<i>hly (split)</i>	(+)	(+)
<i>Пептидные цитоллизины</i>		
<i>psma, hld</i>	+	+
<i>Энтеротоксины</i>		
<i>sea</i>	-	+
<i>tst</i>	+	-
<i>sec, sep, seb, sed, see, seh, set, sel</i>	-	-

1	2	3
SapI5 (<i>sek, seq</i>)	+	-
<i>sej, seu, egc*</i>	-	-
Эксфолиатины		
<i>eta, etb, etd</i>	-	-
Адгезины:		
<i>c12ag'</i>	+	+
<i>cna</i>	+	-
<i>bbp</i>	-	-
Другие		
<i>ACME (arcA)</i>	-	-
<i>ssl</i>	+	+
<i>edin</i>	-	-
Антибиотикорезистентность		
Имипенем (МПК, мкг/мл)	32-64	0,25
Оксациллин (МПК, мкг/мл)	>128	32
Ампициллин (МПК, мкг/мл)	32-64	4
Аминогликозиды	100 %	0 %
Тетрациклины	100 %	0 %
Макролиды	100 %	0 %
Линкозамиды	100 %	0 %
Фторхинолоны	100 %	100 %
Рифампицин (МПК, мкг/мл)	100 % >128	0 % 0,008
Хлорамфеникол	100 %	100 %
Сульфаметоксазол/Триметоприм	100 %	0 %
Гликопептиды	0 %	0 %
Ванкомицин (МПК, мкг/мл)	0,5	0,5
Оксазолидиноны	0 %	0 %
Мупироцин	0 %	0 %
Плазмиды (т.п.н.)	2,9	2,9

3.2.7 Выявление роли MRSA в развитии синдрома системного воспалительного ответа

За период 2011-2016 гг. в г. Красноярске обследовано 148 больных с синдромом системного воспалительного ответа. При исследовании крови рост микроорганизмов был получен в 16,2 % случаев (у 24 обследованных). Выделено 24 штамма, микроорганизмы были выделены в монокультуре. В составе микрофлоры крови преобладали грамположительные микроорганизмы, выделенные в 79,2 % случаев. В 75 % случаев были выделены *S. aureus* (18 из 24 штаммов), доля MRSA составила 16,7 % (3 из 18

штаммов). В 4,2% случаев выделены *Streptococcus pyogenes*. Среди представителей семейства *Enterobacteriaceae* (8,3 %) выделены *Proteus mirabilis*, доля БЛРС продуцентов составила 100 %. На долю неферментирующих грамотрицательных бактерий приходилось 8,3 % случаев, выделены *A. baumannii*, доля МБЛ продуцентов составила 50 %. Дрожжеподобные грибы *C. albicans* выделены в 4,2 % случаев.

При последующих посевах рост микроорганизмов в крови обследованных (162 материала) выявили в 1,9 % случаев (3 штамма). Выделено *S. aureus* выделены в 33,3 % случаев (1 из 3 штаммов), MRSA не были выделены. В 66,7 % случаев были выделены *C. albicans* (2 из 3 штаммов).

Сепсис — это патологический процесс, в основе которого лежит реакция организма в виде генерализованного (системного) воспаления на инфекцию различной природы (бактериальную, вирусную, грибковую). Сепсис — одна из форм такой реакции, при которой как минимум два симптома Синдрома Системной Воспалительной Реакции (ССВР) развиваются в ответ на локальный инфекционный процесс. Локальное воспаление, сепсис, тяжелый сепсис и септический шок — это различные формы выраженности воспалительной реакции организма на инфекционный процесс. Тяжелый сепсис и септический шок являются наиболее тяжелыми формами такой реакции и сопровождаются нарушениями функций систем и органов [47, 74, 101].

Проведено генотипирование трех штаммов MRSA. Все выделенные штаммы MRSA были PVL-негативными. Штаммы MRSA были отнесены к генотипу ST239/*spa3*(t037)/*agr1*/SCC*mecIII*.1.1.2(IIIА)/CoaIV, имели гены *lukED*, гены, кодирующие гемолизины, *tst*, гены, кодирующие суперантигены (*sek* and *seq*) и гены, кодирующие адгезины, в т.ч. коллаген-адгезин (*cna*) (Таблица 32).

Таблица 32 - Молекулярно-генетическая характеристика штаммов MRSA, изолированных от больных с синдромом системного воспалительного ответа

Определяемые характеристики	Результаты типирования штаммов MRSA
	n=3
1	2
CC	239
ST	239
<i>sra</i>	3 (t037)
SCCmec	III.1.1.2 (IIIА)
<i>agr</i>	1
<i>coa</i>	IV
Токсины:	
<i>Лейкоцидины</i>	
<i>lukPVSF</i>	-
<i>lukE-lukD</i>	+
<i>lukM</i>	-
<i>Гемолизины</i>	
<i>hla, hlg, hlg-v</i>	+
<i>hly (split)</i>	(+)
<i>Пептидные цитоллизины</i>	
<i>psma, hld</i>	+
<i>Энтеротоксины</i>	
<i>sea</i>	-
<i>tst</i>	+
<i>sec, sep, seb, sed, see, seh, set, sel</i>	-
SapI5 (<i>sek, seq</i>)	+
<i>sej, seu, egc*</i>	-
<i>Эксфолиатины</i>	
<i>eta, etb, etd</i>	-
Адгезины:	
<i>c12ag'</i>	+
<i>cna</i>	+
<i>bbp</i>	-
Другие	
ACME (<i>arcA</i>)	-
<i>ssl</i>	+
<i>edin</i>	-
Антибиотикорезистентность	
Имипенем (МПК, мкг/мл)	64
Оксациллин (МПК, мкг/мл)	>128
Ампициллин (МПК, мкг/мл)	32-64
Аминогликозиды	100 %

1	2
Тетрациклины	100 %
Макролиды	100 %
Линкозамиды	100 %
Фторхинолоны	100 %
Рифампицин (МПК, мкг/мл)	100 % >128
Хлорамфеникол	100 %
Сульфаметоксазол/Триметоприм	100 %
Гликопептиды	0 %
Ванкомицин (МПК, мкг/мл)	0,5
Оксазолидиноны	0 %
Мупироцин	0 %
Плазмиды (т.п.н.)	2,9

3.2.8 Выявление роли MRSA в развитии гнойно-воспалительных заболеваний у онкологических больных

При посеве промывных вод бронхов, полученных от больных с опухолями желудочно-кишечного тракта или раком легкого, рост микроорганизмов был получен в 82,1 %, а при посеве раневого отделяемого - в 97,0 % случаев. При исследовании бронхоальвеолярного лаважа доля ассоциаций микроорганизмов составила 51,0 %. А при исследовании раневого отделяемого доля ассоциаций микроорганизмов составила 90,8 %.

При исследовании отделяемого нижних дыхательных путей в составе микрофлоры у онкологических больных преобладали НГОБ, которые составляли 44,5 %. Они преимущественно были представлены *P. aeruginosa* (38,1 %) и *A. baumannii* (42,3 %). На долю энтеробактерий у онкологических больных, приходилось 24 %. Среди представителей семейства *Enterobacteriaceae* доминировали *K. pneumoniae* и *E. coli* удельный вес которых составил 37,8 и 27,8 % соответственно. Грамположительные микроорганизмы были выявлены в 24 % случаев, эту группу составили представители рода *Staphylococcus* spp. на долю которых приходилось 82,9 % и *Enterococcus* spp., удельный вес которых среди грамположительных микроорганизмов составил 17,1 %. Доля *S. aureus* – 19,9 %, доля MRSA (2

штамма) среди штаммов *S. aureus* – 6,9 %. Дрожжеподобные грибы р. *Candida* выявлены в 7,5 % случаев.

Серьезной клинической проблемой является чрезвычайно высокая антибиотикорезистентность возбудителей гнойно-воспалительных заболеваний у онкологических больных. При исследовании антибиотикорезистентности выделенных возбудителей из нижних дыхательных путей установлено, что *A. baumannii* характеризовались экстремальной и панрезистентностью в 90 % случаев, а *P. aeruginosa* – в 80 % (Рисунок 22).

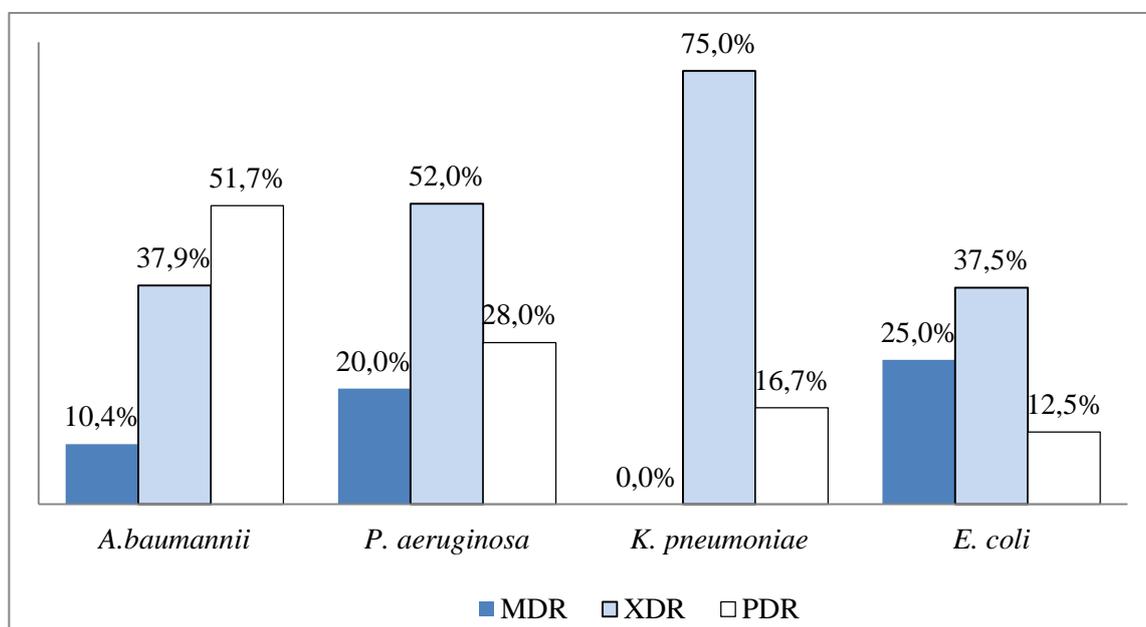


Рисунок 22 - Антибиотикорезистентность актуальных возбудителей, выделенных из бронхоальвеолярного лаважа от онкологических больных

Исходя из анализа антибиотикограммы НГОБ, можем констатировать отсутствие эффективного препарата для назначения эмпирической терапии (Рисунок 23). Среди активных возбудителей гнойно-воспалительных заболеваний представителей сем. *Enterobacteriaceae*, штаммы *K. pneumoniae* характеризовалась наличием экстремальной резистентностью и панрезистентностью в 92 % случаев. 25 % изолятов *E. coli* характеризовались мультирезистентностью и в 50 % случаев характеризовалась экстремальной и

панрезистентностью. Основным механизмом резистентности среди представителей сем. *Enterobacteriaceae* являлась продукция бета-лактамаз расширенного спектра действия. Так среди всех энтеробактерий доля продуцентов БЛРС составила 62 %. Изученные изоляты *K. pneumoniae* продуцировали бета-лактамазы расширенного спектра в 57 % случаев, среди изолятов *E. coli* – 38 %. Представители обоих видов чувствительны к имипенему в 100 % случаев, и поэтому имипенем может являться препаратом выбора для рациональной терапии в том случае, если инфекция вызвана данными микроорганизмами. Среди изученных изолятов *K. pneumoniae* выявлены устойчивые к меропенему – в 18,2 % случаев и среди *E. coli* – в 12,5 % (Рисунок 24).

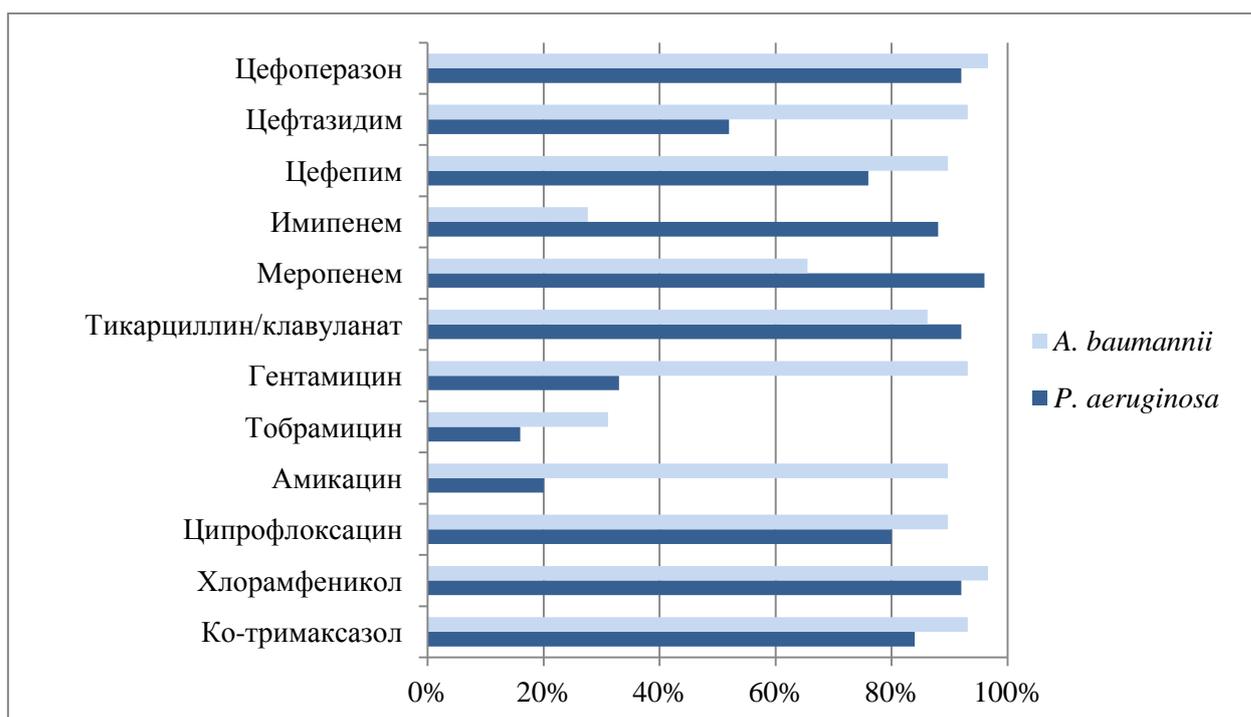


Рисунок 23 - Антибиотикорезистентность штаммов *P. aeruginosa*, *A. baumannii*, выделенных из бронхоальвеолярного лаважа от онкологических больных (%)

При исследовании раневого отделяемого в составе микрофлоры у онкологических больных так же преобладали НГОб – 48 %. Данная группа

была представлена *P. aeruginosa* (46,2 %) и *A. baumannii* (50,0 % случаев). Среди энтеробактерий (34,9 %) доминировали *K. pneumoniae* и *E. coli*, выделенные в 28,6 % и 42,8 % случаев соответственно. Среди грамположительных микроорганизмов, удельный вес которых составил 17,1 %, в т.ч. 46,2 % приходилось на долю представителей рода *Staphylococcus* spp. и 53,8 % - на долю *E. faecalis*. Доля *S. aureus* – 7,9 %, доля MRSA (2 штамма) среди штаммов *S. aureus* – 16,7 %.

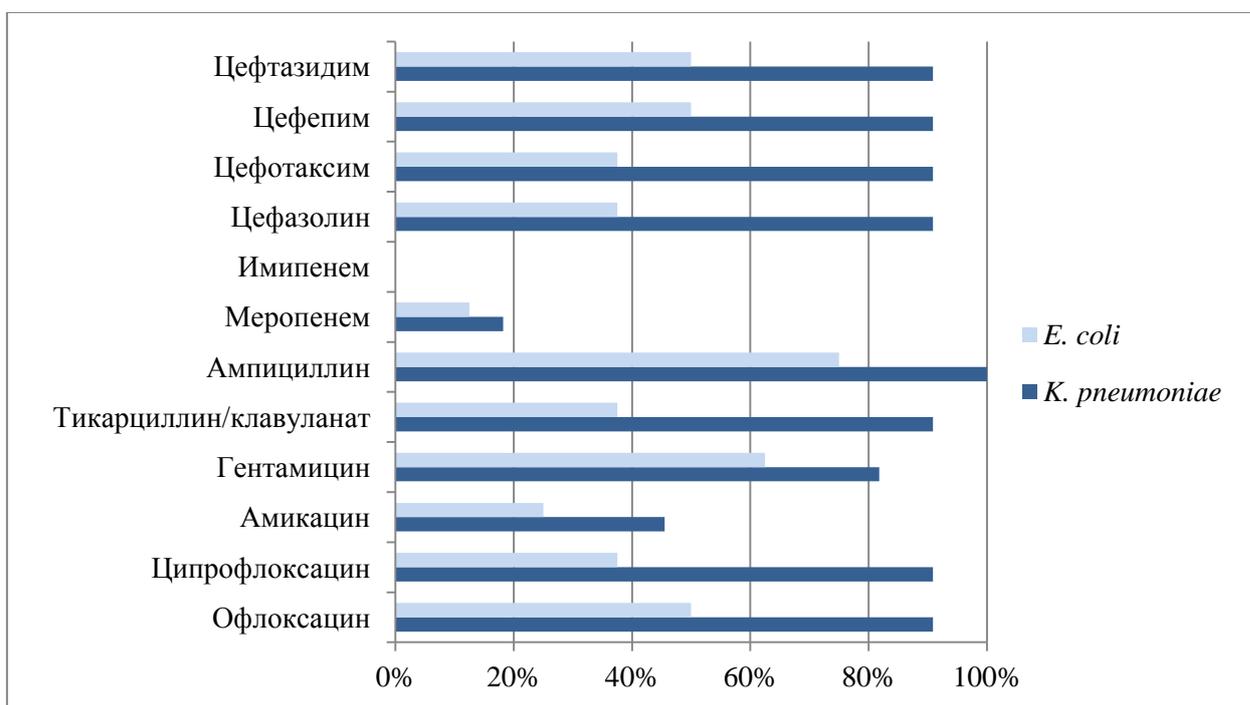


Рисунок 24 - Антибиотикорезистентность штаммов *K. pneumoniae*, *E. coli*, выделенных из бронхоальвеолярного лаважа от онкологических больных (%)

При оценке полученных данных антибиотикорезистентности выделенных изолятов *A. baumannii* выявлена экстремальная резистентность и панрезистентность в равных долях (50 %), а изоляты *P. aeruginosa* в 83,4 % случаев характеризовались экстремальной резистентностью (Рисунок 25).

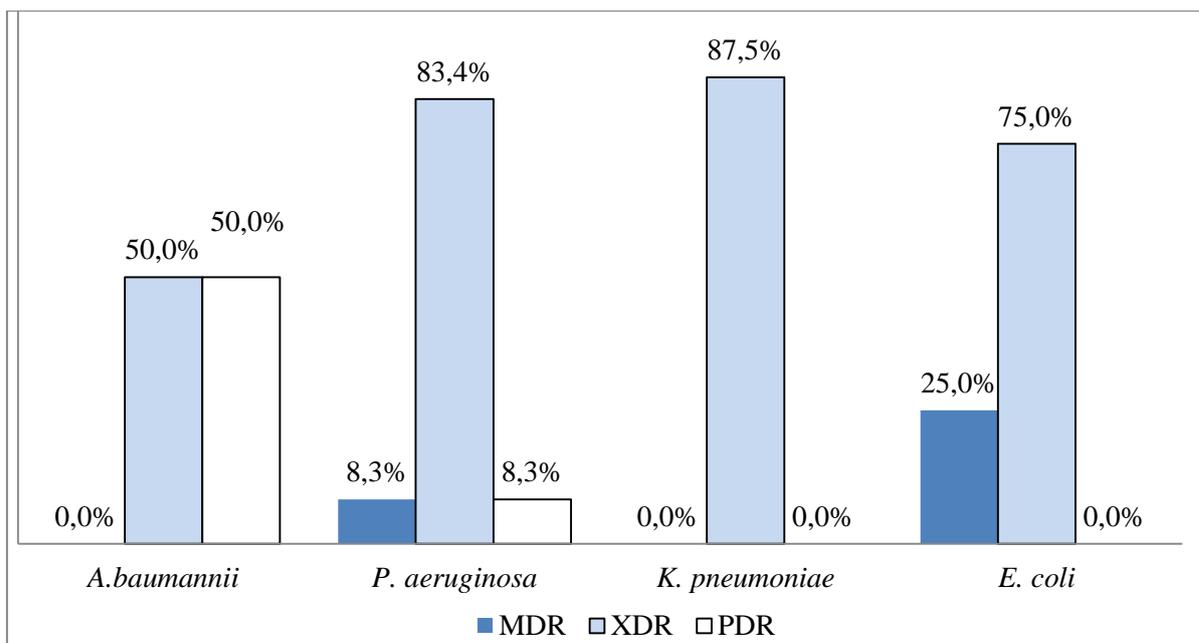


Рисунок 25 - Антибиотикорезистентность актуальных возбудителей, выделенных из раневого отделяемого онкологических больных

Препаратом выбора для эмпирической терапии может являться тобрамицин, в том случае, если инфекция вызвана данными микроорганизмами (Рисунок 26). Вторая основная группа возбудителей гнойно-воспалительных осложнений, выделенная у онкологических больных, характеризовалась ярко выраженной экстремальной резистентностью у штаммов *K. pneumoniae* и *E. coli* на уровне 87,5 и 75 % случаев соответственно. В раневом отделяемом продуценты БЛРС среди изученных энтеробактерий составили 66,7 %, в том числе среди изолятов *K. pneumoniae* 88,9 %, среди изолятов *E. coli* – 60 %.

При этом изоляты *K. pneumoniae* чувствительны к имипенему и меропенему в 100 % случаев, а среди *E. coli* устойчивость к данным препаратам выявлена в 20 % случаев (Рисунок 27).

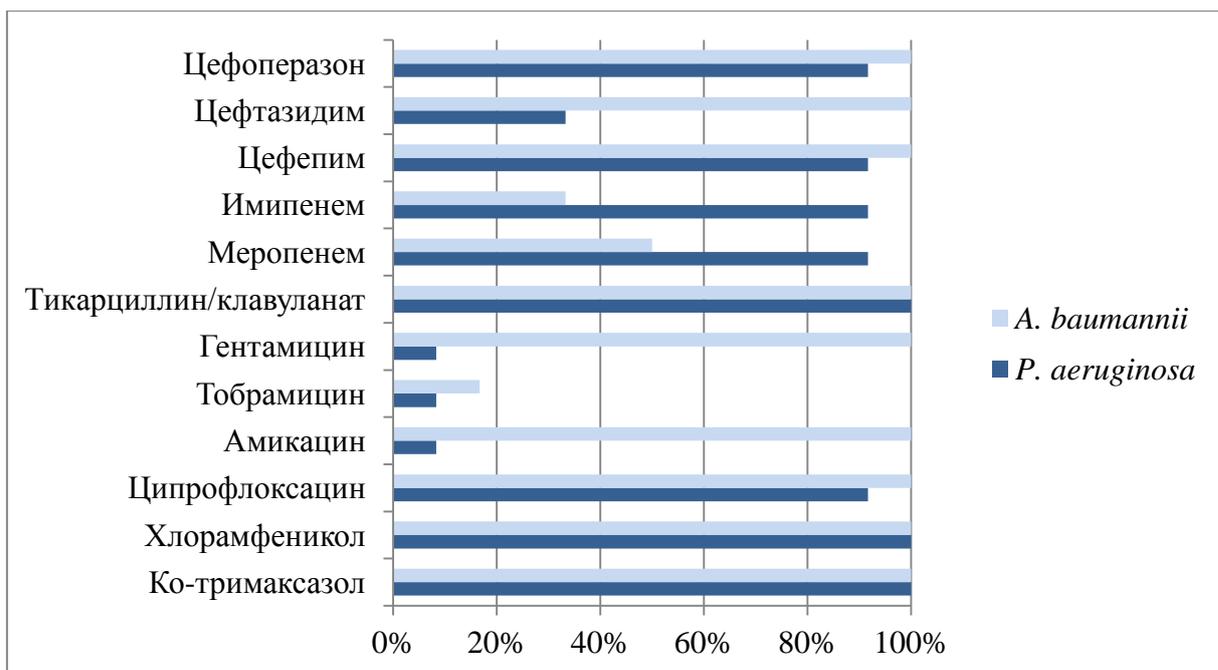


Рисунок 26 - Антибиотикорезистентность штаммов *P. aeruginosa*, *A. baumannii*, выделенных из раневого отделяемого онкологических больных (%)

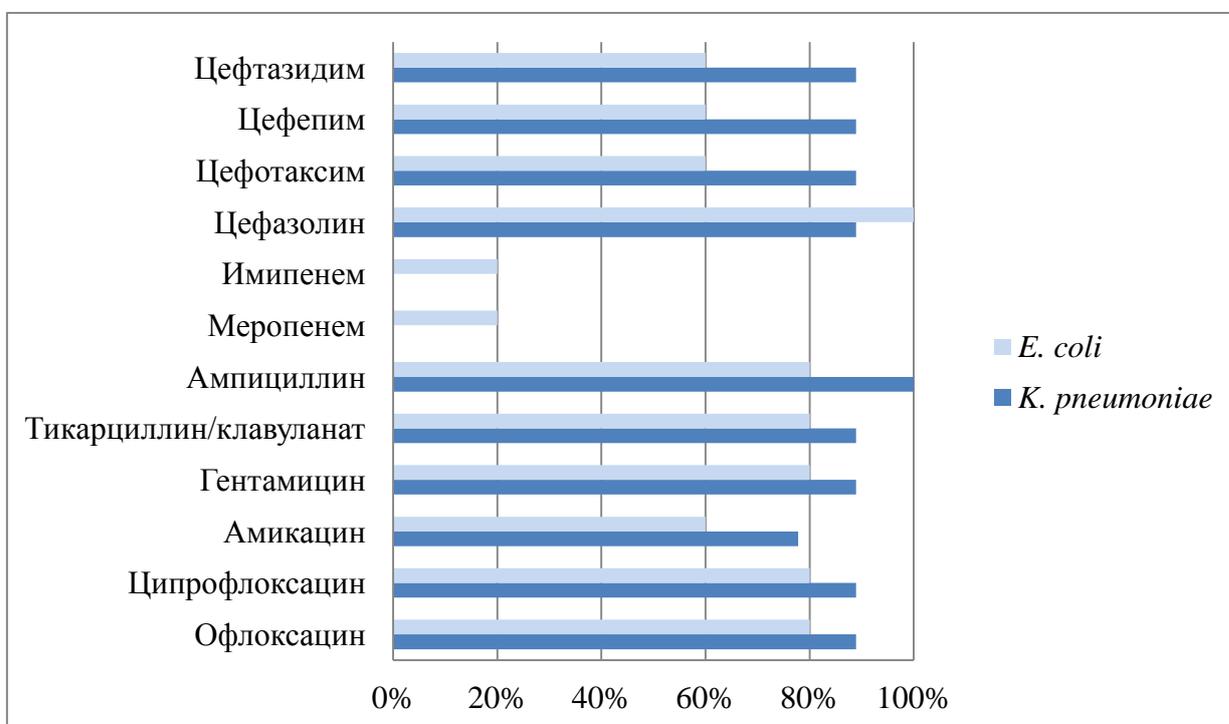


Рисунок 27 - Антибиотикорезистентность штаммов *K. pneumoniae*, *E. coli*, выделенных из раневого отделяемого онкологических больных (%)

Устойчивые к имипенему и/или меропенему штаммы *P. aeruginosa* и *A. baumannii* являлись подозрительными на продукцию МБЛ. Продукция МБЛ класса В данными штаммами изучалась в подтверждающем тесте – "метод двойных дисков" (double-disk approximation test) с ингибитором металло-β-лактамаз – ЭДТА. Наличие генов наиболее распространенных МБЛ у штаммов *P. aeruginosa*, *A. baumannii* (VIM, IMP-типов), а у *A. baumannii* также генов OXA-23, OXA-40, OXA-58 на базе НИИ антимикробной химиотерапии (г. Смоленск) методом ПЦР в режиме реального времени с использованием коммерческих наборов «АмплиСенс® MDR MBL-FL» (ФБУН Центральный НИИ эпидемиологии Роспотребнадзора, Россия) и системы Rotor-Gene 6000 (Corbett Research, Австралия).

Было изучено 10 штаммов *P. aeruginosa* (по 5 штаммов из раневого отделяемого и бронхоальвеолярного лаважа) и 9 штаммов *A. baumannii*, выделенных из бронхоальвеолярного лаважа пациентов отделения анестезиологии-реанимации. Уставлено, что ни один из изученных штаммов не образует МБЛ, но четыре штамма *A. baumannii* (44,4 %) являются продуцентами других карбапенемаз молекулярного класса D OXA-23. Все изученные штаммы *P. aeruginosa* МБЛ-отрицательные, но карбапенемрезистентные. Возможно, это связано не с выработкой β-лактамаз, а с другими механизмами резистентности, например, снижением проницаемости клеточной стенки, повышенным эффлюксом и др.

Доля метициллинрезистентных стафилококков у онкологических больных составила 48,9 %, при этом доля MRSA составила 8,9 % от всех выделенных стафилококков.

У онкологических больных инфекционные осложнения остаются наиболее частыми и тяжелыми среди всех осложнений, возникающих в процессе лечения, и являются частой причиной смерти примерно 30 % (39,3–42,8 %) [22, 87]. Инфекционные осложнения ухудшают качество жизни, увеличивают вероятность повторной госпитализации, резко утяжеляют течение послеоперационного периода, приводят к более продолжительному

пребыванию в стационаре, являются причиной необходимости повторных операций и повышают стоимость лечения [5, 101]. У онкологических больных риск развития инфекционных осложнений значительно повышен, особенно вызванных MRSA [436]. При этом инфекции в большинстве случаев имеют нозокомиальную природу, протекают крайне тяжело и плохо поддаются терапии в связи с высокой резистентностью возбудителей [59].

Серьезной проблемой является чрезвычайно высокая антибиотикорезистентность микроорганизмов. Был проведен анализ фенотипических профилей MDR, XDR и PDR среди актуальных возбудителей гнойно-воспалительных осложнений у онкологических больных. Под мультирезистентными (multi-drug-resistant, MDR) понимают штаммы микроорганизмов, резистентные к 3 и более классам антимикробных препаратов (хотя бы к одному препарату из класса) [190]. Штаммы, сохранившие чувствительность к 1–2 классам антибиотиков и устойчивые к остальным группам антибактериальных препаратов, считаются штаммами с чрезвычайной резистентностью (extremely or extensively-drug-resistant, XDR). При наличии устойчивости ко всем группам антибиотиков микроорганизмы называются панрезистентными (pan-drug-resistant, PDR).

Высокий процент выделения MDR и XDR вариантов возбудителей обусловлен наличием множества факторов риска у пациентов онкохирургического профиля (предшествующая антибактериальная терапия, нахождение в стационаре, наличие ХОБЛ, возраст старше 60 лет, иммунодефицит, высокий нутритивный риск развития инфекционных осложнений, доказанная локальная резистентность госпитальных микроорганизмов к антибиотикам).

Данные результатов микробиологического исследования отделяемого дыхательных путей в 2010-2015 гг. свидетельствуют о превалировании микробных ассоциаций мульти- (MDR), экстремально резистентных возбудителей (XDR), что необходимо учитывать при планировании и проведении эмпирической терапии при данном осложнении. Наиболее

частыми ассоциантами в отделяемом дыхательных путей являются *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae* и *A. baumannii* (20,9 %); *P. aeruginosa* и *A. baumannii* (14,6 %); *P. aeruginosa* и *K. pneumoniae* (14 %); *Enterobacter* spp. и *P. aeruginosa* (13 %); *A. baumannii*, *Serratia marcescens* и *B. cepacia* (9,5 %); *K. pneumoniae* и *E. coli* (8 %); *A. calcoaceticus*, *E. coli* и *K. pneumoniae* (7 %); *Proteus* spp., *P. aeruginosa* и *Corynebacterium* spp. (7 %). Самыми частыми локализациями злокачественных новообразований, сопровождающиеся развитием нозокомиальной пневмонии, стали: злокачественные новообразования пищевода, желудка и легких, что объясняется объемами комбинированных операций, техническими трудностями операций, способствующих развитию нозокомиальной пневмонии; соматическим статусом пациентов. По срокам развития преобладала пневмония позднего характера, что также необходимо учитывать при обсуждении программы терапии. Пневмония развивалась на $7,91 \pm 1,46$ сутки после госпитализации и на $4,17 \pm 0,52$ сутки с момента проведения оперативного лечения. Частота нозокомиальных пневмоний среди оперируемых больных составляла 16 %. Атрибутивная летальность составляла 5,8 %, что объясняется преобладанием нозокомиальных пневмоний, не ассоциированных с ИВЛ и особенностями кодировки при проведении патологоанатомической экспертизы.

При изучении антибиотикорезистентности изолятов, выделенных от онкологических больных, установлено, что все изоляты *A. baumannii* относятся к XDR варианту; среди *P. aeruginosa* доля XDR-вариантов составила 25 %, а MDR – 60 %. Изученные изоляты *K. pneumoniae* и *E. coli* относятся к MDR.

Данные результатов микробиологического мониторинга свидетельствуют о превалировании микробных ассоциаций MDR и XDR возбудителей, что необходимо учитывать при планировании и проведении эмпирической терапии при данном осложнении. Анализ резистентности антимикробных препаратов в отношении лидирующих возбудителей в 2012-

2015 гг. показал преобладание MDR/XDR штаммов, что значимо должно изменять программу стартовой антибактериальной терапии.

Эмпирическая антибактериальная терапия гнойных осложнений должна носить комбинированный де-эскалационный характер, учитывая этиологическую характеристику. В схемах комбинированной терапии должны быть включены карбапенемы, ингибиторы бета-лактамаз, аминогликозиды 3 поколения. Анти-MRSA препараты при эмпирическом назначении должны применяться только по особым показаниям (длительность предшествующей антимикробной терапии более 15 дней, предшествующая терапия ципрофлоксацином). При наличии высоких баллов по APACHE 2 в стартовую программу терапии необходимо дополнительно включать полимиксин В, колистиметат натрия, при высокой вероятности наличия *Acinetobacter* spp. - тигециклин.

Изучили молекулярно-генетические особенности 4 штаммов MRSA, полученных от пациентов онкологическими заболеваниями в 2013-2015 гг. (Таблица 33). Изолированные штаммы MRSA PVL не имели. Установили распространение двух клонов MRSA у онкологических больных. 75 % штаммов MRSA были отнесены к варианту ST239/spa3(t037)/SCCmecIIIА, в ДНК определили наличие гена *lukED*, генов, кодирующих адгезины, гемолизины и гена *tst*, кодирующий токсин синдрома токсического шока TSST-1, и генов *sek seq*, кодирующие синтез энтеротоксинов. Установлена уникальная комбинация генов *tst*, *sek*, *sep*, *cna*, не характерная для линии для ST239. Токсин синдрома токсического шока (TSST-1) - это суперантиген, способствует неспецифической активации Т-лимфоцитов, это значительно утяжеляет течение заболевания. Штаммы MRSA линии ST239 широко распространены во всем мире, но не имели гена *tst*. 25 % штаммов MRSA относились к линии ST8/spa1(t008)/SCCmecIVc, имели ген *lukED*, гены, кодирующие адгезины, гемолизины и ген *sea*, энтеротоксина (Таблица 33).

Выявили, что штаммы варианта ST239/spa3(t037)/SCCmecIIIА имели множественной антибиотикоустойчивость, резистентны в 100% случаев к

аминогликозидам, линкозамидам, макролидам, фторхинолонам, рифампицину, сульфаметоксазолу, тетрациклину и резистентны к хлорамфениколу в 66,7 % случаев; чувствительны к ванкомицину, линезолиду в 100 % случаев. Штаммы клона MRSA ST8/spa1(t008)/SCCmecIVc резистентны в 100 % случаев к аминогликозидам, макролидам, тетрациклинам, хлорамфениколу, линкозамидам; чувствительны в 100 % случаев к фторхинолонам, рифампицину, сульфаметаксазолу, ванкомицину, линезолиду.

Таблица 33 – Молекулярно-генетические характеристики MRSA, выделенных от больных с онкологическими заболеваниями

Генетические характеристики	Гены вирулентности	Изоляты MRSA, полученные от онкобольных	
		(n=1)	(n=3)
CC		8	239
ST		8	239
spa		1 (t008)	3 (t037)
SCCmec		IV.3.1.1 (IVc)	III.1.1.2 (IIIА)
	Токсины:		
	Лейкоцидины	-	-
	luk _{PV} SF	+	+
	lukE-lukD	-	-
	lukM		
	Гемолизины	+	+
	hla, hlg, hlg-v	(+)	(+)
	hlb (split)		
	Белковые цитоллизины	+	+
	psm α , hld		
	Энтеротоксины	+	-
	sea	-	+
	tst	-	-
	sec, sep	-	-
	seb, sed, see, seh, set	-	+
	SapI5 (sek, seq)	-	-
	sej, seu	-	-
	egc		
	Эксфолиатины	-	-
	eta, etb, etd		
	Адгезины:	+	+
	c12ag	-	+
	cna	-	-

Примечание: n=1 и n=3 - число штаммов, изолированных от разных онкобольных

3.2.9 Выявление роли MRSA в развитии гнойно-воспалительных заболеваний у ВИЧ-инфицированных

За период 2010-2016 гг. в г. Красноярске обследовано 36 наркозависимых ВИЧ-инфицированных пациентов с абсцессами различной локализации. При исследовании гнойного отделяемого, биоптата больных рост микроорганизмов в этиологически значимом количестве был получен в 72,2 % случаев (у 26 обследованных). Выделено 30 штаммов микроорганизмов. При этом микроорганизмы были выделены в монокультуре в 92,3 % случаев, ассоциации из 3 микроорганизмов - в 7,7 %. В составе микрофлоры гнойного отделяемого, биоптатов преобладали грамположительные микроорганизмы, выделенные в 76,7 % случаев (Рисунок 28). В 66,7 % случаев были выделены стафилококки, *S. aureus* были выделены в 40 % случаев (12 из 30 штаммов), доля MRSA составила 16,7 % (2 штамма из 12). *S. epidermidis* выделены в 26,7 % случаев, доля MRSE – 37,5 %. *S. pyogenes* выделены в 3,3 % случаев. Энтерококки – в 6,7 % случаев. Грамотрицательная микрофлора выделена в 23,3% случаев; на долю представителей семейства *Enterobacteriaceae* приходилось 10 %, выделены *E. coli*, доля БЛРС продуцентов составила 100 %. На долю неферментирующих грамотрицательных бактерий приходилось 13,3 % случаев, в т.ч. *P. aeruginosa* (10 %), *A. baumannii* (3,3 %), доля МБЛ продуцентов - 25 %.

За период 2010-2016 гг. в г. Красноярске обследовано 28 наркозависимых ВИЧ-инфицированных пациентов с флегмоной. При исследовании гнойного отделяемого, биоптата больных рост микроорганизмов в этиологически значимом количестве был получен в 71,4 % случаев (у 20 обследованных). При этом микроорганизмы были выделены в монокультуре в 100 % случаев. Выделено 20 штаммов микроорганизмов.

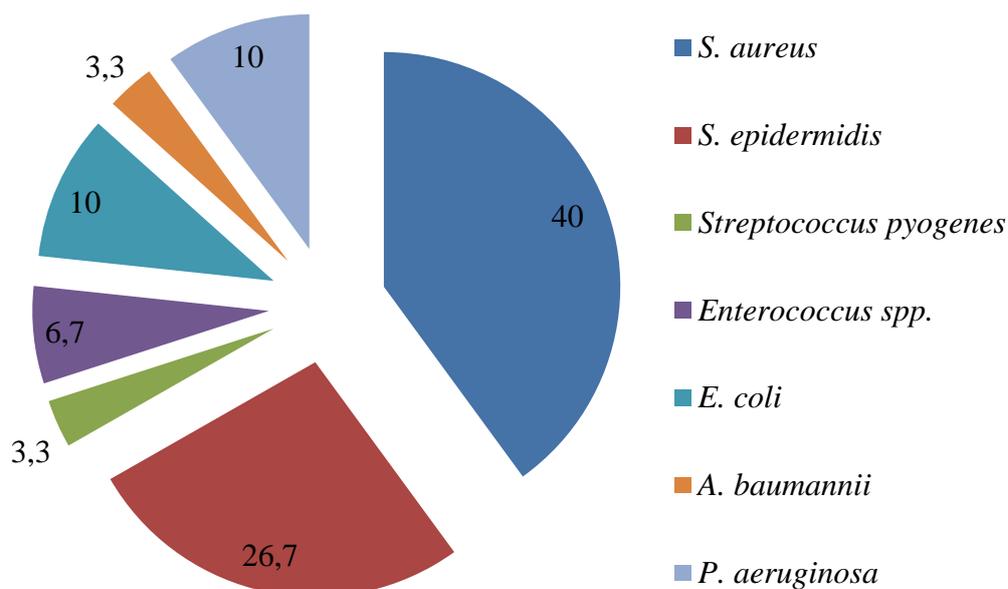


Рисунок 28 - Микрофлора гнойного отделяемого, биоптата от наркозависимых ВИЧ-инфицированных пациентов с абсцессом (%)

В составе микрофлоры гнойного отделяемого, биоптатов преобладали грамположительные микроорганизмы, выделенные в 75 % случаев (Рисунок 29).

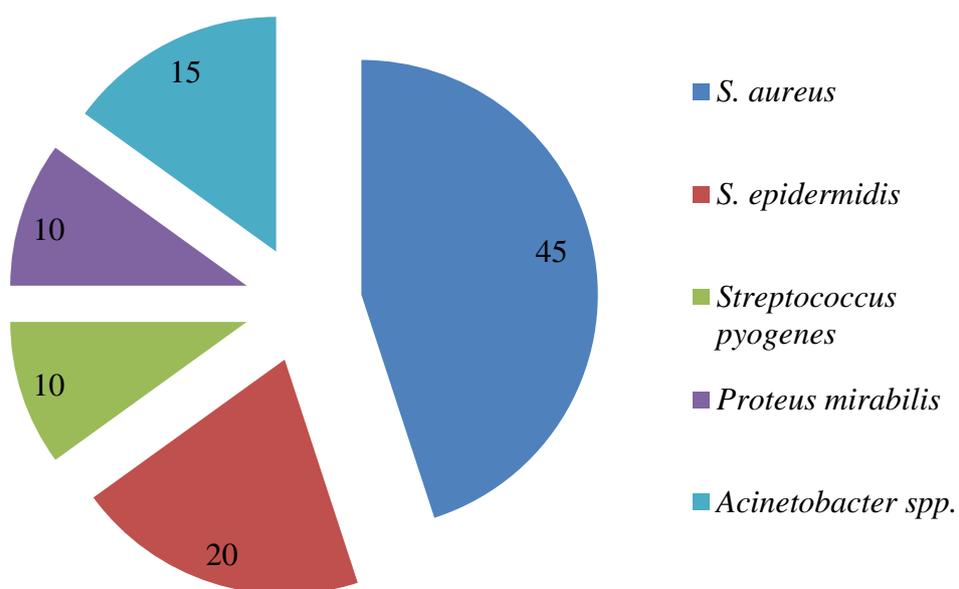


Рисунок 29 - Микрофлора гнойного отделяемого, биоптата от наркозависимых ВИЧ-инфицированных пациентов с флегмоной (%)

В 65 % случаев были выделены стафилококки, *S. aureus* были выделены в 45 % случаев (9 из 20 штаммов), доля MRSA составила 33,3 % (3 штамма из 9). Доля MRSE – 50 %. *S. pyogenes* выделены в 10 % случаев. Грамотрицательная микрофлора выделена в 25 % случаев; на долю представителей семейства *Enterobacteriaceae* приходилось 10 %, выделены *P. mirabilis*, доля БЛРС продуцентов составила 100 %. На долю неферментирующих грамотрицательных бактерий приходилось 15 % случаев, выделены *A. baumannii*, доля МБЛ продуцентов составила 66,7 %.

Протипировали 5 штаммов MRSA, выделенных от ВИЧ-инфицированных с абсцессом, с флегмоной (Таблица 34). Из выделенных штаммов MRSA 46,7 % принадлежали к ST239/spa3(t037)/agr1/SCCmecIII.1.1.2(IIIА)/coaIV характеризовались наличием лейкоцидина lukED, гемолизинов, токсина синдрома токсического шока TSST-1 (*tst*), энтеротоксинов SEK (*sek*), SEQ (*seq*), адгезинов (за исключением *bbp*). Характеризовались антибиотикорезистентностью к аминогликозидам, макролидам, линкозамидам, фторхинолонам, хлорамфениколу (гены резистентности локализованы в плазмиде 2,9 т.п.н.), рифампицину (МПК>128 мкг/мл), сульфаметоксазол/триметоприму и чувствительностью ко всем остальным изученным препаратам (Таблица 34).

Таблица 34 - Молекулярно-генетическая характеристика штаммов MRSA, изолированных от наркозависимых ВИЧ-инфицированных пациентов с абсцессом, с флегмоной

Определяемые характеристики	Результаты типирования штаммов MRSA
	n=5
1	2
CC	239
ST	239
<i>spa</i>	3 (t037)
SCCmec	III.1.1.2 (IIIА)
<i>agr</i>	1

1	2
<i>coa</i>	IV
Токсины:	
<i>Лейкоцидины</i>	
<i>lukPVSF</i>	-
<i>lukE-lukD</i>	+
<i>lukM</i>	-
<i>Гемолизины</i>	
<i>hla, hlg, hlg-v</i>	+
<i>hlb (split)</i>	(+)
<i>Пептидные цитолизины</i>	
<i>psma, hld</i>	+
<i>Энтеротоксины</i>	
<i>sea</i>	-
<i>tst</i>	+
<i>sec, sep, seb, sed, see, seh, set, sel</i>	-
SapI5 (<i>sek, seq</i>)	+
<i>sej, seu, 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>ACME (arcA)</i>	-
<i>ssl</i>	+
<i>edin</i>	-
<i>Антибиотикорезистентность</i>	
Имипенем (МПК, мкг/мл)	32
Оксациллин (МПК, мкг/мл)	>128
Ампициллин (МПК, мкг/мл)	32-64
Аминогликозиды	100 %
Тетрациклины	100 %
Макролиды	100 %
Линкозамиды	100 %
Фторхинолоны	100 %
Рифампицин (МПК, мкг/мл)	100 % >128
Хлорамфеникол	100 %
Сульфаметоксазол/Триметоприм	100 %
Гликопептиды	0 %
Ванкомицин (МПК, мкг/мл)	0,5-1
Оксазолидиноны	0 %
Мупироцин	0 %
Плазмиды (т.п.н.)	2,9(7/9)

Обследовано 30 ВИЧ-инфицированных с клиническим диагнозом внебольничная пневмония, госпитализированных в КГБУЗ «КМКБСМП им. Н.С. Карповича», возраст 20 - 42 года (средний возраст $30,9 \pm 6,7$).

За период 2012-2014 гг. в г. Красноярске обследовано 30 ВИЧ-инфицированных больных с клиническим диагнозом внебольничная пневмония. При исследовании БАЛ, мокроты от ВИЧ-инфицированных пациентов с внебольничной пневмонией рост микроорганизмов был получен в 73,3 % случаев (у 22 обследованных). Выделено 23 штамма (Рисунок 30). При этом, в основном были выделены монокультуры (в 95,5 % случаев). Ассоциацию микроорганизмов выявили в 4,5 % случаев, представленную *E. faecium* и MSSE. В составе микрофлоры преобладали грамотрицательные микроорганизмы, выделенные в 43,5 % случаев и представленные представителями семейства *Enterobacteriaceae* (30,4 %) доминировали *K. pneumoniae* (17,4 %). На долю неферментирующих грамотрицательных бактерий приходилось 13,1 % случаев, при этом среди них выделили *A. baumannii*.

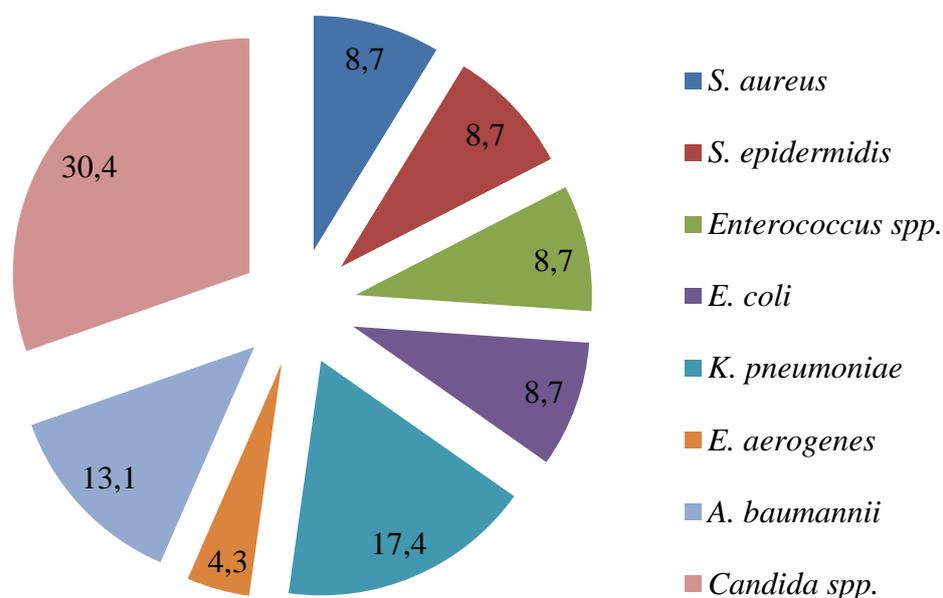


Рисунок 30 - Микрофлора воздухоносных путей ВИЧ-инфицированных пациентов с клиническим диагнозом внебольничная пневмония (%)

Грамположительные микроорганизмы выделили в 26,1 % случаев и представлены *S. aureus* – 8,7 % (2 из 23 штаммов); доля MRSA 50 % (1 штамм) и *S. epidermidis* – 8,7 % (доля MRSE 50 % - 1 штамм) (Рисунок 30). Дрожжеподобные грибы р. *Candida* выделены в 30,4 % случаев.

При исследовании крови от 27 ВИЧ-инфицированных пациентов с внебольничной пневмонией в первые сутки госпитализации рост микроорганизмов был получен в 14,8 % случаев (у 4 обследованных). При этом были выделены монокультуры в 100% случаев. В составе микрофлоры преобладали грамположительные микроорганизмы (75 %) и представлены *S. aureus* (3 из 4 штаммов); доля MRSA 33,3 % (1 штамм). Грамотрицательные микроорганизмы выделены в 25 % случаев и представлены *E. coli*. При повторных исследованиях крови микроорганизмы были выделены у 2 пациентов на протяжении 30-40 суток госпитализации и были представлены MRSA и *C. albicans*.

При изучении антибиотикорезистентности штаммов, представителей сем. *Enterobacteriaceae*, выделенных от ВИЧ-инфицированных пациентов с клиническим диагнозом внебольничная пневмония установили их резистентность к цефтазидиму и ампициллину/сульбактаму в 100 % случаев; к цефоперазону/сульбактаму и амикацину в 14,3 % случаев соответственно; к ципрофлоксацину было устойчиво 57,1 % штаммов; 100% штаммов сохраняли чувствительность к карбапенемам (Рисунок 31).

При изучении антибиотикорезистентности *A. baumannii*, изолированных от ВИЧ-инфицированных пациентов с клиническим диагнозом внебольничная пневмония установили 100 % их резистентность к изученным антибактериальным препаратам.

Для оценки генетического разнообразия изолятов было проведено генотипирование 2 штаммов MRSA. Выделенные штаммы MRSA были PVL-негативными. Штаммы MRSA были отнесены к генотипу ST239/*spa3(t037)/agr1/SCCmecIII.1.1.2(III A)/CoaIV*, имели гены *lukED*, гены,

кодирующие гемолизины, *tst*, гены, кодирующие суперантигены (*sek* and *seq*) и гены, кодирующие адгезины, в т.ч. коллаген-адгезин (*cna*).

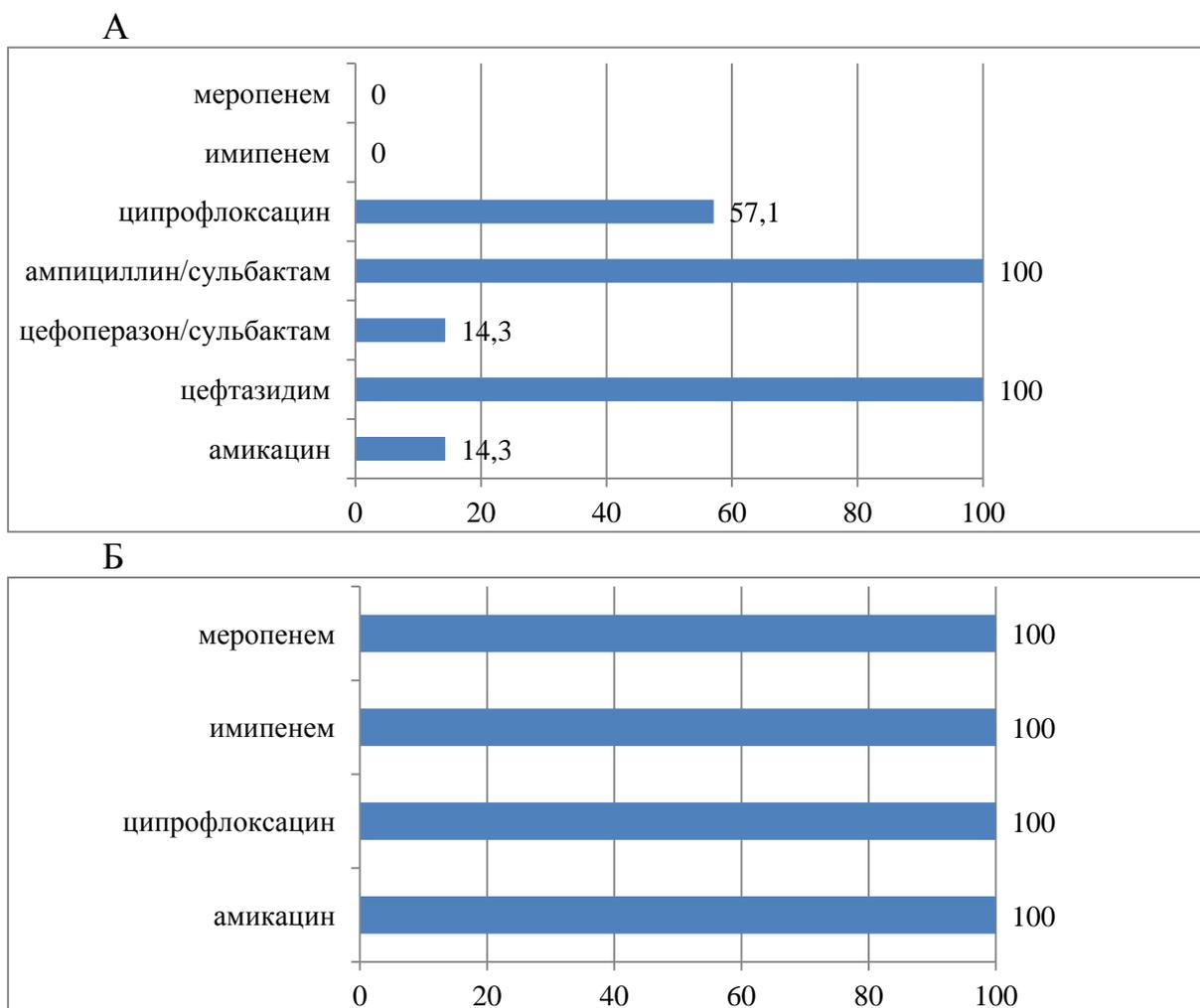


Рисунок 31 - Результаты определения резистентности к антибактериальным препаратам (%)

Примечание: А - представители сем. *Enterobacteriaceae*, Б – *A. baumannii*

Данные штаммы относятся к госпитальному клону. У ВИЧ-инфицированных пациентов, госпитализированных с внебольничной пневмонией, наличие госпитальных штаммов MRSA можно объяснить тем, что для данной категории пациентов периодически требуется госпитализация в стационар, в связи с тем, что со временем у них происходит снижение уровня CD4 Т-лимфоцитов и увеличение уровня РНК ВИЧ в крови, что способствует развитию различных заболеваний. Такая неоднократная

госпитализация приводит к повышению риска колонизации госпитальной флорой.

Штаммы MRSA характеризовались множественной лекарственной устойчивостью – резистентны к аминогликозидам, макролидам, линкозамидам, фторхинолонам, рифампицину, хлорамфениколу, сульфаметоксазолу; имели высокий уровень МПК к оксациллину и имипенему (Таблица 35). Один штамм, выделенный от ВИЧ-инфицированного из крови относился к h-VISA, т.к. уровень МПК к ванкомицину составил 2 мкг / мл.

Таблица 35 - Молекулярно-генетическая характеристика штаммов MRSA, изолированных от ВИЧ-инфицированных пациентов с клиническим диагнозом внебольничная пневмония

Определяемые характеристики		Результаты типирования штаммов MRSA
		n=2
1		2
CC		239
ST		239
<i>spa</i>		3 (t037)
SCCmec		III.1.1.2 (IIIА)
<i>agr</i>		1
<i>coa</i>		IV
Лейкоцидины:	<i>lukPVSF, lukM</i>	-
	<i>lukE-lukD</i>	+
Гемолизины:	<i>hla, hlg, hlg-v</i>	+
	<i>hly (split)</i>	(+)
Пептидные цитоллизины:	<i>psma, hld</i>	+
Энтеротоксины:	<i>tst</i>	+
	<i>sea, sec, sep, seb, sed, see, seh, set, sel, sej, seu, egc*</i>	-
	SapI5 (<i>sek, seq</i>)	+
Эксфолиатины:	<i>eta, etb, etd</i>	-
Адгезины:	<i>c12ag', cna</i>	+
	<i>bbp</i>	-
Другие:	АСМЕ (<i>arcA</i>), <i>edin</i>	-
	<i>ssl</i>	+
Антибиотикорезистентность		
Имипенем (МПК, мкг/мл)		>32

1	2
Оксациллин (МПК, мкг/мл)	>256
Аминогликозиды	100 %
Тетрациклины	100 %
Макролиды	100 %
Линкозамиды	100 %
Фторхинолоны	100 %
Рифампицин (МПК, мкг/мл)	100 % >32
Хлорамфеникол (МПК, мкг/мл)	100 % >32
Сульфаметоксазол/Триметоприм	100 %
Гликопептиды	0 %
Ванкомицин (МПК, мкг/мл)	0,5-2
Оксазолидиноны	0 %
Лнезолид, (МПК, мкг/мл)	1,0
Даптомицин, (МПК, мкг/мл)	0,125-0,19
Мупироцин	0 %
Плазмиды (т.п.н.)	2,9

Заключение по главе

Достаточно высокий уровень носительства *S. aureus* выявлен у школьников начальных классов (42,5 %). Полученные данные согласуются с общемировыми, так как, по литературным данным, назальное носительство *S. aureus* у детей достигает от 45 % до 70 % [513]. Однако у школьников средних классов и старших классов выявлена тенденция снижения доли носительства *S. aureus* до 33,0 % ($p=0,230$).

Также установлено, что среди спортсменов, занимающихся контактными видами спорта (вольная борьба и др.) доля носительства *S. aureus* составила 38,0 %, что статистически значимо ($p<0,001$) превышает долю носительства *S. aureus* среди студентов (21,5 %). Это связано с тесными контактами спортсменов кожа-к-коже во время борьбы на ковре, что способствует передачи штаммов микроорганизмов, в т.ч. *S. aureus* [520]. Спортсмены, занимающиеся контактными видами спорта, являются группой риска колонизации CA-MRSA [402].

Носительство *S. aureus* среди детей дома ребенка составила от 17,3 % до 23,5 %, у возрастных категорий 0-1 год и 1-4 года соответственно

($p=0,422$). По литературным данным в период новорожденности доля носительства *S. aureus* достигает 60 %, затем происходит снижение доли носительства до 25-30 % [513]. По полученным данным, происходит, наоборот, увеличение доли носительства с возрастом, хотя и в пределах общемировых показателей. Возможно, это связано с тем, что дети дома ребенка находятся в закрытых коллективах. Уровень носительства MRSA среди детей дома ребенка составил от 3,85 до 4,34%, у возрастных категорий 0-1 год и 1-4 года соответственно ($p=1,000$). Возможно, достаточно высокий уровень носительства MRSA связан с тем, что дети дома ребенка находятся в закрытых коллективах.

При выявлении носительства *S. aureus* среди медицинских сотрудников крупных стационаров г. Красноярска, установлено, что 15 % являлись носителями, в РФ доля носителей *S. aureus* среди медицинских сотрудников составила 23,7 % [8]. В РФ доля носителей MRSA среди медицинских работников составила 4,6 % [13]. Доля медицинских работников-носителей MRSA г. Красноярска составила 0,41%. Так, при исследовании медицинских работников стационаров в г. Смоленске, носительство *S. aureus* составило 19 %, носительство MRSA – 0,5%; в Ростове-на-Дону носительство *S. aureus* - 6,43%, носительство MRSA – 2,76%. Полученные данные свидетельствуют об относительном эпидемическом благополучии в плане распространения носительства *S. aureus*, MRSA среди медицинских сотрудников г. Красноярска, что, возможно, связано с выявлением носителей и их санацией.

По результатам исследования носительства MRSA среди спортсменов, занимающихся контактными видами спорта в РФ, доля носительства составила 6,8-10 % [35, 65]. Частота выделения MRSA у студентов медицинских ВУЗов в РФ была 1,25 % [65]. Не установлено носительства MRSA среди школьников, среди спортсменов, занимающихся контактными видами спорта, а среди студентов уровень носительства составил всего 0,04 %.

С точки зрения колонизации внебольничными штаммами MRSA уязвимыми группами являются дети, особенно находящиеся в тесном контакте друг с другом, в т.ч. в детских садах, школах; спортсмены, занимающиеся контактными видами спорта; одной из главных по значимости групп риска являются лица, у которых выявлена ВИЧ-инфекция [51, 368]. Опубликованные отчеты эпидемиологического надзора свидетельствуют, что носительство CA-MRSA чаще встречаются у детей в возрасте до 2 лет. Так, на Тайване в предыдущих исследованиях сообщалось о том, что колонизация MRSA носа была распространена среди детей, и наблюдалось увеличение носителей среди детей в детских садах и школьников с 1,9 % в 2001 году до 11,6 % в 2009 году [331]. Тем не менее, по результатам исследований в зарубежных странах, уровень носительства MRSA на слизистой носа среди детей составил 6,8 %, среди работников здравоохранения - 5,0-7,7 % и был выше, чем у взрослого населения - 3,8 % [144, 524]. Дети, посещающие центры по уходу за детьми, особенно дети дома ребенка имеют повышенный риск для развития различных инфекций, поскольку они являются иммунологически наивными и уязвимыми к инфекции, также усугубляет проблему их тесный контакт и склонность к загрязнению окружающей среды секретами дыхательных путей, мочой и фекалиями, через которые могут распространяться инфекции [368]. Полученные нами 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 исследовании клональной принадлежности штаммов MRSA, выделенных от здоровых носителей, не имевших риска колонизации госпитальными штаммами, установлена их принадлежность к внебольничному варианту ST8/SCCmecIVc, характеризующемуся резистентностью к 2-3 группам антимикробных препаратов, помимо β -лактамов (Таблица 36).

Таблица 36 – Результаты выявления носительства *S. aureus*, включая MRSA среди различных групп населения

Категории обследованных	Не колонизированы		Колонизированы				Всего		Краткая молекулярно-генетическая характеристика штаммов MRSA	Антибиотикорезистентность штаммов MRSA
			<i>S. aureus</i>		MRSA					
	Количество	%	Количество	%	Количество	%	Количество	%		
Дети дома ребенка (возраст 0-1 г.)	43	82,7	9	17,3	2	3,85	52	100	ST8/spa1(t008)/SCCmecIV.3.1.1/coaIII/agr1 (2/2)	ФХ 2/2 (100%), АМ ½ (50%), ХА 2/2(100%)
Дети дома ребенка (возраст 1-4 г.)	88	76,5	27	23,5	5	4,34	115	100	ST8/spa1(t008)/SCCmecIV.3.1.1/coaIII/agr1 (5/5)	ФХ 5/5 (100%), АМ 5/5 (100%), МА 3/5 (60%), ТЕТ 2/5 (40%) ХА 4/5(80%)
Школьники 1-4 классов	23	57,5	17	42,5	0	0	40	100	-	-
Школьники 7-11 классов	467	67,0	230	33,0	0	0	697	100	-	-
Студенты медицинского университета	1966	78,5	537	21,5	1	0,04	2503	100	ST8/spa1(t008)/SCCmecIV.3.1.1/coaIII/agr1	ФХ 1/1 (100%), ХА 1/1 (100%)
Спортсмены, занимающиеся контактными видами спорта	67	62,0	41	38,0	0	0	108	100	-	-
Медицинские работники различных отделений крупных красноярских стационаров	2082	85,0	368	15,0	10	0,41	2450	100	ST8/spa1(t008)/SCCmecIV.3.1.1/coaIII/agr1 (5/10)	ТЕТ 1/5, ФХ 2/5, ХА 2/5
									ST239/spa3(t037)/III.1.1.2(IIA)/coaIV/agr1/tst+ (3/10)	АМ 1/3, ТЕТ 2/3, МА 1/3, ЛИ 1/3, ФХ 1/3, РИФ 1/3
									ST30/spa19(t019)/SCCmecIV.3.1.1./coaIV/agr 1 PVL+ (2/10)	МА 1/2

При исследовании клональной принадлежности штаммов MRSA, выделенных от медицинских работников, установлена их принадлежность к варианту ST8/SCCmecIVc, характеризующемуся резистентностью к 5 группам антимикробных препаратов, помимо β -лактамов, что свидетельствует о распространении этого варианта в условиях стационаров и госпитальных ST239/SCCmecIII характеризующемуся резистентностью к 6 группам антимикробных препаратов, помимо β -лактамов (Таблица 36).

По результатам исследований в РФ, максимальная распространенность MRSA установлена у пациентов с инфекциями кожи и мягких тканей (фурункулез, гидраденит, панариций) $-31,08 \pm 1,72$ на 1000 [32].

При изучении роли *S. aureus*, MRSA в развитии инфекций кожи и мягких тканей установили, что наиболее часто штаммы *S. aureus* выделены из патологических материалов от пациентов с фурункулом/карбункулом. Так, доля *S. aureus* среди выделенных микроорганизмов составила 78,1 % и у 69,1 % от числа обследованных. Доля MRSA от выделенных штаммов *S. aureus* составила 8,3 %, а от числа обследованных больных – 5,7 % (Таблица 37). У больных, госпитализированных с абсцессами, доля *S. aureus* среди выделенных микроорганизмов составила 39,1 %, а от числа обследованных – 33,4 %. Доля MRSA от выделенных штаммов *S. aureus* составила 18,9 %, а от числа обследованных больных – 6,3 %. При сравнении с результатами микробиологического исследования патологических материалов, полученных от ВИЧ-инфицированных с абсцессами, установили отсутствие статистически значимых различий в доли *S. aureus* (доля в микрофлоре – 40 %, доля от обследованных – 33,3 %) ($p=0,919$) и MRSA (доля в микрофлоре - 16,7 %, доля от обследованных – 5,6 %) ($p=1,000$).

У больных, госпитализированных с флегмонами, доля *S. aureus* среди выделенных микроорганизмов составила 27,2 %, а от числа обследованных – 21,8 %. Доля MRSA от выделенных штаммов *S. aureus* составила 21,6 %, а от числа обследованных больных – 4,7 % (Таблица 37).

Таблица 37 – Результаты выявления доли *S. aureus*, включая MRSA в микрофлоре гнойно-воспалительных заболеваний у госпитализированных пациентов

Категории пациентов с гнойно-воспалительными заболеваниями	Нет роста		Наличие роста		Число штаммов	Доля в микрофлоре				Доля от обследованных				Всего обследовано		Молекулярно-генетическая характеристика штаммов MRSA	Антибиотико-резистентность штаммов MRSA
	n	%	n	%		<i>S. aureus</i>		MRSA		<i>S. aureus</i>		MRSA					
						n	%	n	%	n	%	n	%	n	%		
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18
Пациенты с фурункулами, карбункулами	26	14,9	149	85,1	155	121	78,1	10	8,3	121	69,1	10	5,7	175	100	ST8/spa1(t008)/SCCmecIV.3.1.1 (10/10)	ФХ 10/10, ХА 10/10
Пациенты с абсцессами	122	25,6	354	74,4	407	159	39,1	30	18,9	159	33,4	30	6,3	476	100	ST8/spa1(t008)/SCCmecIV.3.1.1 (15/22)	ФХ 15/15, ХА 15/15
																ST239/spa3(t037)/SCCmecIII.1.1.2 /tst+ (2/22)	АМ 2/2, ТЕТ 2/2, МА 2/2, ЛИ 2/2, ФХ 2/2, РИФ 2/2, ХА 2/2, СТ 2/2
																ST239/spa3(t037)/SCCmecIII.1.1.1 (5/22)	ТЕТ 5/5, МА 5/5, ЛИ 5/5, СТ 5/5
ВИЧ-инфицированные пациенты с абсцессами	10	27,8	26	72,2	30	12	40,0	2	16,7	123	33,3	2	5,6	36	100	ST239/spa3(t037)/SCCmecIII.1.1.2 /tst+ (2/2)	АМ 2/2, ТЕТ 2/2, МА 2/2, ЛИ 2/2, ФХ 2/2, РИФ 2/2, ХА 2/2, СТ 2/2
Пациенты с флегмонами	384	39,4	591	60,6	784	213	27,2	46	21,6	213	21,8	46	4,7	975	100	ST8/spa1(t008)/SCCmecIV.3.1.1 (7/17)	ФХ 7/7, ХА 7/7

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18
Пациенты с флегмонами (продолжение)																ST239/spa3(t037)/SCCmecIII.1.1.2 /tst+ (7/17)	АМ 7/7, ТЕТ 7/7, МА 7/7, ЛИ 7/7, ФХ 7/7, РИФ 7/7, ХА 7/7, СТ 7/7
																ST239/spa3(t037)/SCCmecIII.1.1.1 (3/17)	ТЕТ 3/3, МА 3/3, ЛИ 3/3, СТ 3/3
ВИЧ-инфицированные пациенты с флегмонами	8	28,6	20	71,4	20	9	45,0	3	33,3	9	32,1	3	10,7	28	100	ST239/spa3(t037)/SCCmecIII.1.1.2 /tst+ (3/3)	АМ 3/3, ТЕТ 3/3, МА 3/3, ЛИ 3/3, ФХ 3/3, РИФ 3/3, ХА 3/3, СТ 3/3
Пациенты с гнойно-некротическими осложнениями СДС (в первые 48 часов пребывания в стационаре)	36	15,0	204	85,0	288	53	18,4	20	37,7	53	22,1	20	8,3	240	100	ST8/spa1(t008)/SCCmecIV.3.1.1 (6/15)	АМ 3/6, МА 3/6, ФХ 6/6, ХА 6/6
																ST239/spa3(t037)/SCCmecIII.1.1.2 /tst+ (7/15)	АМ 7/7, ТЕТ 7/7, МА 7/7, ЛИ 7/7, ФХ 7/7, РИФ 7/7, ХА 7/7, СТ 7/7
																ST12/spanew(t15 6) (2/15)	ХА 2/2
Пациенты с гнойно-некротическими осложнениями СДС (5-50 сутки госпитализации)	8	4,9	155	95,1	246	58	23,7	23	39,7	58	35,6	23	14,1	163	100		
Пациенты с термическими ожогами (в первые 48 часов пребывания в стационаре)	108	74,5	37	25,5	74	35	47,3	7	20,0	35	24,1	7	4,8	145	100	ST239/spa3(t037)/SCCmecIII.1.1.2 /tst+ (12/12)	АМ12/12, ТЕТ 12/12, МА 12/12, ЛИ 12/12, ФХ 12/12, РИФ 12/12, ХА 12/12, СТ 12/12
Пациенты с термическими ожогами (10-50 сутки госпитализации)			178	92,7	292	98	33,6	61	62,2	98	51,0	61	31,8	192	100		

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18
Острый посттравматический остеомиелит	181	29,2	439	70,8	472	207	43,9	70	33,8	207	33,4	70	11,3	620	100	ST239/spa3(t037) /SCCmecIII.1.1.2 /tst+ (6/8)	АМ6/6, ТЕТ 6/6, МА 6/6, ЛИ 6/6, ФХ 6/6, РИФ 6/6, ХА 6/6, СТ 6/6
																ST239/spa3(t037/ SCCmecIII.1.1.1 (2/8)	ТЕТ 2/2, МА 2/2, ЛИ 2/2, СТ 2/2
Хронический посттравматический остеомиелит	21	26,6	58	73,4	71	37	52,1	19	51,4	37	46,8	19	24,1	79	100	ST239/spa3(t037) /SCCmecIII.1.1.2 /tst+ (2/2)	АМ2/2, ТЕТ 2/2, МА 2/2, ЛИ 2/2, ФХ 2/2, РИФ 2/2, ХА 2/2, СТ 2/2
Пациенты внебольничной пневмонией (мокрота, БАЛ)	с 829	90,5	87	9,5	94	33	35,1	4	12,1	33	3,6	4	0,4	916	100	ST8/spa1(t008)/S CCmecIV.3.1.1 (17/17)	АМ 4/17, ФХ 17/17, ХА 17/17
ВИЧ- инфицированные внебольничной пневмонией (БАЛ, мокрота)	с 8	26,7	22	73,3	23	2	8,7	1	50,0	2	6,7	1	3,33	30	100	ST239/spa3(t037) /SCCmecIII.1.1.2 /tst+ (1/1)	АМ 1/1, ТЕТ 1/1, МА 1/1, ЛИ 1/1, ФХ 1/1, РИФ 1/1, ХА 1/1, СТ 1/1
ВИЧ- инфицированные внебольничной пневмонией (кровь)	с 23	85,2	4	14,8	4	3	75,0	1	33,3	3	11,1	1	3,7	27	100-	ST239/spa3(t037) /SCCmecIII.1.1.2 /tst+ (1/1)	АМ 1/1, ТЕТ 1/1, МА 1/1, ЛИ 1/1, ФХ 1/1, РИФ 1/1, ХА 1/1, СТ 1/1
Пациенты госпитальной пневмонией (БАЛ, мокрота)	с 38	14,0	234	86,0	482	59	12,2	24	40,7	59	21,7	24	8,8	272	100	ST239/spa3(t037) /SCCmecIII.1.1.2 /tst+ (15/20)	АМ 15/15, ТЕТ 15/15, МА 15/15, ЛИ 15/15, ФХ 15/15, РИФ 15/15, ХА 15/15, СТ 15/15
																ST8/spa1(t008)/S CCmecIV.3.1.1 (5/20)	ФХ 5/5, ХА 5/5

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18
Пациенты с синдромом системного воспалительного ответа	124	83,8	24	16,2	24	18	75,0	3	16,7	18	12,2	3	2,03	148	100	ST239/spa3(t037)/SCCmecIII.1.1.2/tst+ (3/3)	АМ 3/3, ТЕТ 3/3, МА 3/3, ЛИ 3/3, ФХ 3/3, РИФ 3/3, ХА 3/3, СТ 3/3
Онкобольные (ОРИТ, БАЛ)	21	17,9	96	82,1	146	29	19,9	2	6,9	29	24,8	2	1,71	117	100	ST239/spa3(t037)/SCCmecIII.1.1.2/tst+ (2/2)	АМ 2/2, ТЕТ 2/2, МА 2/2, ЛИ 2/2, ФХ 2/2, РИФ 2/2, ХА 2/2, СТ 2/2
Онкобольные (ХО, раневое отделяемое)	2	3,0	65	97,0	152	12	7,9	2	16,7	12	17,9	2	3,0	67	100	ST239/spa3(t037)/SCCmecIII.1.1.2/tst+ (1/2)	АМ 1/1, ТЕТ 1/1, МА 1/1, ЛИ 1/1, ФХ 1/1, РИФ 1/1, СТ 1/1
																ST8/spa1(t008)/SCCmecIV.3.1.1 (1/2)	АМ 1/1, ТЕТ 1/1, МА 1/1, ЛИ 1/1, ХА 1/1

Примечание: n – количество обследованных

При сравнении с результатами микробиологического исследования патологических материалов, полученных от ВИЧ-инфицированных с флегмонами, не установили статистически значимые различия ($p=0,078$) в доли *S. aureus* (доля в микрофлоре – 45 %, доля от обследованных – 32,1 %) и MRSA (доля в микрофлоре – 33,3 %, доля от обследованных – 10,7 %) ($p=0,781$).

Установлено, что у пациентов с гнойно-некротическими осложнениями синдрома диабетической стопы при поступлении в стационары г. Красноярск и при дальнейшем пребывании в стационаре значение *S. aureus* (18,4 % и 23,7 % в первые часы госпитализации и на 5-50 суток соответственно), MRSA (37,7 % и 39,7 % в первые часы госпитализации и на 5-50 суток соответственно) достоверно не меняется ($p=0,142$, $p=0,836$). Возможно это связано с наличием долго не заживающих язв и необходимостью частой госпитализации (Таблица 37). Среди пациентов с синдромом диабетической стопы, госпитализированных в стационары Франции и Швейцарии, выделили MRSA генетического варианта ST8/spa(t008) и ST5/ST105/spa(t002), устойчивые к гентамицину [421]. Среди пациентов с диабетической стопой в Мексике выявлено распространение клона MRSA USA300 (ST8/spa(t008)/PVL+) [194]. Проведено генотипирование штаммов MRSA, изолированных от госпитализированных пациентов в РФ [224, 289], однако нет информации о генетических вариантах MRSA от пациентов с синдромом диабетической стопы. В данной работе установлено, что среди пациентов с синдромом диабетической стопы в г. Красноярске и Красноярском крае распространены генетические варианты MRSA, соответствующие генетическим вариантам, выделенным ранее от пациентов с другими заболеваниями [289]. У пациентов с синдромом диабетической стопы доминирующим клоном MRSA являлся госпитальный ST239/spa3(t037)/agr1/SCCmecIII.1.1.2(III A)/coaIV/tst⁺, выделен от госпитализированных пациентов позднее 48 часов нахождения в стационаре (ранее пациенты находились в разных медицинских учреждениях г.

Красноярска); характеризующийся высоким уровнем вирулентности и антибиотикорезистентности. Выделен вариант MRSA ST8/spa1(t008)/agr1/SCCmecIV.3.1.1/CoaIII от пациентов ранее 48 часов пребывания в стационаре и относился к внебольничным.

Установлено, что у пациентов с ожогами IIIA, IIIB и IV в г. Красноярске в первые часы госпитализации доля *S. aureus* в микрофлоре составила 47,3 % и 24,1 % от числа обследованных; доля MRSA в микрофлоре составила 20 % и 4,8% от числа обследованных. На 10-50 сутки госпитализации доля *S. aureus* в микрофлоре составила 33,6 % ($p=0,028$) и 51 % ($p<0,001$) от числа обследованных; доля MRSA в микрофлоре достоверно увеличилась 62,2 % ($p<0,001$) и 31,8 % ($p<0,001$) от числа обследованных (Таблица 37). В России доминирующими клонами MRSA являются ST239/spa3(t037)/SCCmecIIIA, ST239/spa351(t030)/SCCmecIII и ST8/spa1(t008)/SCCmecIV [45, 224]. Распространенным вариантом линии ST239 в г. Красноярске является уникальный вариант ST239_{Крас}, который характеризуется наличием гена *tst*, обеспечивающего синтез токсин синдрома токсического шока [289]. Штаммы MRSA, полученные от ожоговых пациентов, по характеристикам совпадали с циркулирующим в г. Красноярске уникальным вариантом ST239_{Крас}. Штаммы MRSA, полученные от ожоговых пациентов, характеризовались наличием множества факторов вирулентности, резистентности, что значительно отягощает течение инфекционных осложнений [58].

Установлено, что доля *S. aureus* в микрофлоре больных с острым посттравматическим остеомиелитом составила 43,9 % и 33,4 % от числа обследованных; доля MRSA в микрофлоре составила 33,8 % и 11,3 % от числа обследованных. Доля *S. aureus* в микрофлоре больных с хроническим посттравматическим остеомиелитом составила 52,1 % ($p=0,203$) и 46,8 % ($p=0,024$) от числа обследованных; доля MRSA в микрофлоре составила 51,4 % ($p=0,062$) и 24,1 % ($p=0,003$) от числа обследованных (Таблица 37).

Установлено, что в развитии внебольничной пневмонии у больных г. Красноярска доля *S.aureus* в микрофлоре составила 35,1 %, от числа обследованных - 3,6 %; доля MRSA составила 12,1 %, от числа обследованных - 0,4 %. При посеве крови больных с тяжелым течением внебольничной пневмонии доля *S.aureus* в микрофлоре составила 53,3 %, от числа обследованных - 3,4 %; доля MRSA составила 25 %, от числа обследованных - 0,8 %. Полученные данные о доли *S.aureus*, возможно, связаны с возрастом пациентов (средний возраст $55,0 \pm 18,6$). При исследовании ВИЧ-инфицированных, госпитализированных с внебольничной пневмонией, установили, что доля *S.aureus* в микрофлоре составила 8,7 % ($p=0,012$), от числа обследованных - 6,7 % ($p=0,306$); доля MRSA составила 50 % ($p=0,338$), от числа обследованных - 3,33 % ($p=0,149$). При посеве крови ВИЧ-инфицированных с тяжелым течением внебольничной пневмонии доля *S.aureus* в микрофлоре составила 75 %, от числа обследованных - 11,1 %; доля MRSA составила 33,3 %, от числа обследованных - 3,7 % (Таблица 37).

Установлено, что у пациентов с госпитальной пневмонией, госпитализированных в ОРИТ крупных стационаров г. Красноярска доля *S. aureus* в микрофлоре составила 12,2 %, от числа обследованных - 21,7 %; доля MRSA составила 40,7 %, от числа обследованных - 8,8 % (Таблица 37).

Установлено, что у больных с сепсисом, госпитализированных в крупные стационары г. Красноярска доля *S. aureus* в микрофлоре составила 75 %, от числа обследованных - 12,2 %; доля MRSA составила 16,7 %, от числа обследованных - 2,03 % (Таблица 37).

Установлено, что у онкобольных с госпитальной пневмонией, находящихся в ОРИТ в г. Красноярске доля *S. aureus* в микрофлоре составила 19,9 %, от числа обследованных - 24,8 %; доля MRSA составила 6,9 %, от числа обследованных - 1,71 %. Установлено, что у онкобольных с послеоперационными осложнениями, госпитализированных в отделение онкоабдоминальной хирургии имени Н.А. Рыкованова в г. Красноярске доля

S.aureus в микрофлоре составила 7,9 % (12 из 152, 29 из 146 $p=0,004$), от числа обследованных – 17,9 % ($p=0,357$); доля MRSA составила 16,7 % ($p=0,567$), от числа обследованных – 3 % ($p=0,623$) (Таблица 37). Распространенным вариантом линии ST239 в г. Красноярске является уникальный вариант ST239_{Крас}, который характеризуется наличием гена *tst* [289]. В г. Красноярске выявлено распространение уникального клона MRSA ST8_{Крас}, у которого *sra* тип (*sra*1[t008]) соответствовал *sra* типу ST8 варианта, выявленного ранее в других регионах России, но отличался от штаммов, выделенных в г. Владивостоке (ST8*sra*826[t:unknown]) [57]. У вариантов ST8_{Крас}, выделенных в Красноярском крае и ST8, выделенных в г. Владивостоке выявлены SCCmecIV.3.1.1(IVc) и имеются ген *sea* [505]. Установлено соответствие генетических вариантов MRSA, выделенных от онкологических пациентов с инфекционными осложнениями, генетическим вариантам наиболее распространенным в Красноярском крае.

Таким образом, установлено распространение двух доминантных линий MRSA на территории г. Красноярска, Красноярского края, таких как ST239 и ST8 и двух минорных линий MRSA, таких как ST30 и ST12. При этом, штаммы, относящиеся к линии ST239, являются госпитальными, а штаммы линии ST8 являются внебольничными, но распространены и в условиях стационара.

Глава 4 Молекулярно-генетическая характеристика, продукция факторов вирулентности и механизмы резистентности штаммов MRSA, выделенных в г. Красноярске, Красноярском крае

4.1 Молекулярно-генетическая характеристика штаммов MRSA, выделенных в г. Красноярске, Красноярском крае

Было выделено 155 штаммов MRSA от здоровых бактерионосителей и от госпитализированных пациентов с различными гнойно-воспалительными заболеваниями; характеристика этих штаммов описана в предыдущей главе. Помимо 155 штаммов MRSA, в 2007-2013 гг. были собраны 28 штаммов от других обследованных (Таблица 3, 4). Из 28 штаммов MRSA, не описанных в предыдущей главе, 16 штаммов принадлежали к линии ST8/spa1(t008)/agr1/SCCmecIV.3.1.1/CoaIII, имели гены *lukED*, гены, кодирующие адгезины (кроме *bbp*, *cna*), гемолизины, пептидные цитолизины (*psma*, *hld*), ген *ssl* и имели ген *sea*, кодирующий синтез энтеротоксина SEA. Штаммы ST8 характеризовались устойчивостью помимо β -лактамных антимикробных препаратов к аминогликозидам (6,3 %), хлорамфениколу (100 %) и фторхинолонам (75 %). Штаммы MRSA линии ST8 были выделены от детей, находящихся амбулаторно и обследованных на дисбактериоз толстого кишечника (11 штаммов); от детей с внебольничной пневмонией в первые 48 часов госпитализации, закончившейся фатально (2 штамма); от взрослых пациентов с внебольничной пневмонией в первые 48 часа госпитализации, закончившейся фатально (2 штамма); от взрослого пациента с сепсисом позднее 48 часов пребывания в стационаре и закончившимся фатально (1 штамм).

Из 28 штаммов MRSA, не описанных в предыдущей главе, 8 штаммов принадлежали к линии ST239/spa3(t037)/agr1/SCCmecIII.1.1.2(IIIА)/CoaIV, имели гены *lukED*, гены, кодирующие гемолизины, *tst*, гены, кодирующие суперантигены (*sek* and *seq*), пептидные цитолизины (*psma*, *hld*), ген *ssl* и

гены, кодирующие адгезины, в т.ч. коллаген-адгезин (*sna*). Характеризовались множественной лекарственной устойчивостью – резистентны помимо β-лактамных антимикробных препаратов к аминогликозидам, макролидам, линкозамидам, тетрациклинам, фторхинолонам, рифампицину, хлорамфениколу, сульфаметоксазолу; имели высокий уровень МПК к оксациллину и имипенему. Штаммы MRSA линии ST239 *tst+* были выделены от взрослых пациентов с госпитальной пневмонией (4 штамма), закончившейся фатально; от пациента с сепсисом (1 штамм); от взрослых пациентов с раневыми инфекциями (3 штамма).

Из 28 штаммов MRSA, не описанных в предыдущей главе, 4 штамма принадлежали к линии ST239/*spa3(t037)/agr1/SCCmecIII.1.1.1/coaIV* характеризовались наличием лейкоцидина *lukED*, гемолизинов, энтеротоксина SEA (*sea*), энтеротоксинов SEK (*sek*), SEQ (*seq*), пептидных цитолизинов (*psma*, *hld*), наличием гена *ssl*, адгезинов (за исключением *bbp*). Штаммы, помимо β-лактамных антимикробных препаратов, были резистентны к аминогликозидам, тетрациклинам, макролидам, линкозамидам, сульфаметоксазол/триметоприму и чувствительностью ко всем остальным изученным препаратам.

По результатам исследования 183 штаммов, имеющих в коллекции, выделенных от здоровых бактерионосителей и госпитализированных пациентов с различными нозологиями, установили, что 98,9 % выделенных штаммов MRSA были PVL-негативными, 1,1 % штаммов MRSA были PVL-позитивными. Молекулярные данные по изученным 183 изолятам MRSA суммированы в Таблице 38 и на Рисунке 32. Штаммы MRSA были разделены на четыре группы: от А до D (Таблица 38). Из выделенных штаммов MRSA 41 % относились к группе А1 ($n = 75$) и принадлежали к ST239/*spa3(t037)/agr1/SCCmecIII.1.1.2(IIIА)/coaIV*.

7,7 % штаммов MRSA относились к группе А2 ($n = 14$) варианту ST239/*spa3(t037)/agr1/SCCmecIII.1.1.1/coaIV*. Все были *tst +*; при этом

уровень производства TSST-1 были аналогичны уровням штаммов MRSA клона ST5/SCCmecII_{NY/J}.

Таблица 38 - Молекулярно-генетическая характеристика штаммов MRSA, изолированных от здоровых бактерионосителей и больных с разными нозологиями

Определяемые характеристики	Результаты типирования штаммов MRSA, n=183				
	Группа А		Группа В n=90	Группа С n=2	Группа D n=2
	A ₁ , n=75	A ₂ , n=14			
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)	нт ¹	IV.3.1.1 (IVc)
<i>agr</i>	1	1	1	1	3
<i>coa</i>	IV	IV	III	I, VII	IV
Токсины:					
Лейкоцидины					
<i>lukPVSF</i>	-	-	-	-	+
<i>lukE-lukD</i>	+	+	+	+	-
<i>lukM</i>	-	-	-	-	-
Гемолизины					
<i>hla, hlg, hlg-v</i>	+	+	+	+	+
<i>hly (split)</i>	(+)	(+)	(+)	(+)	-
Пептидные цитоллизины					
<i>psma, hld</i>	+	+	+	+	+
Энтеротоксины					
<i>sea</i>	-	-	+ (77/90)	-	-
<i>tst</i>	+	+	-	-	1/2
<i>sel</i>	-	-	-	-	1/2
<i>sec, sep, seb, sed, see, seh, set</i>	-	-	-	-	-
SapI5 (<i>sek, seq</i>)	+	+	-	+	-
<i>sej, seu</i>	-	-	-	-	-
<i>egc*</i>	-	-	-	-	+
Эксфолиатины					
<i>eta, etb, etd</i>	-	-	-	-	-
Адгезины:					
<i>c12ag'</i>	+	+	+	+	+
<i>cna</i>	+	+	-	+	+
<i>bbp</i>	-	-	-	-	+
Другие					

1	2	3	4	5	6
<i>ACME (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 %
Мупироцин	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)		

Примечание: п – количество штаммов, нт¹ – не типиреуемый

Штаммы в группе А1 относились к MDR, характеризовались резистентностью к аминогликозидам, макролидам, тетрациклинам, линкозамидам, фторхинолонам, хлорамфениколу, рифампицину (МПК>128 мкг/мл), сульфаметоксазол/триметоприму и чувствительностью ко всем остальным изученным препаратам. Штаммы в группе А1 имели плазмиду *SpI* (pSpI). В анализе PFGE (Рисунок 32) группа А1 включала несколько расходящихся подкластеров с основным кластером (тип 239 α , 44,4 %). Группа А1 MRSA была обозначена как ST239_{Kras}.

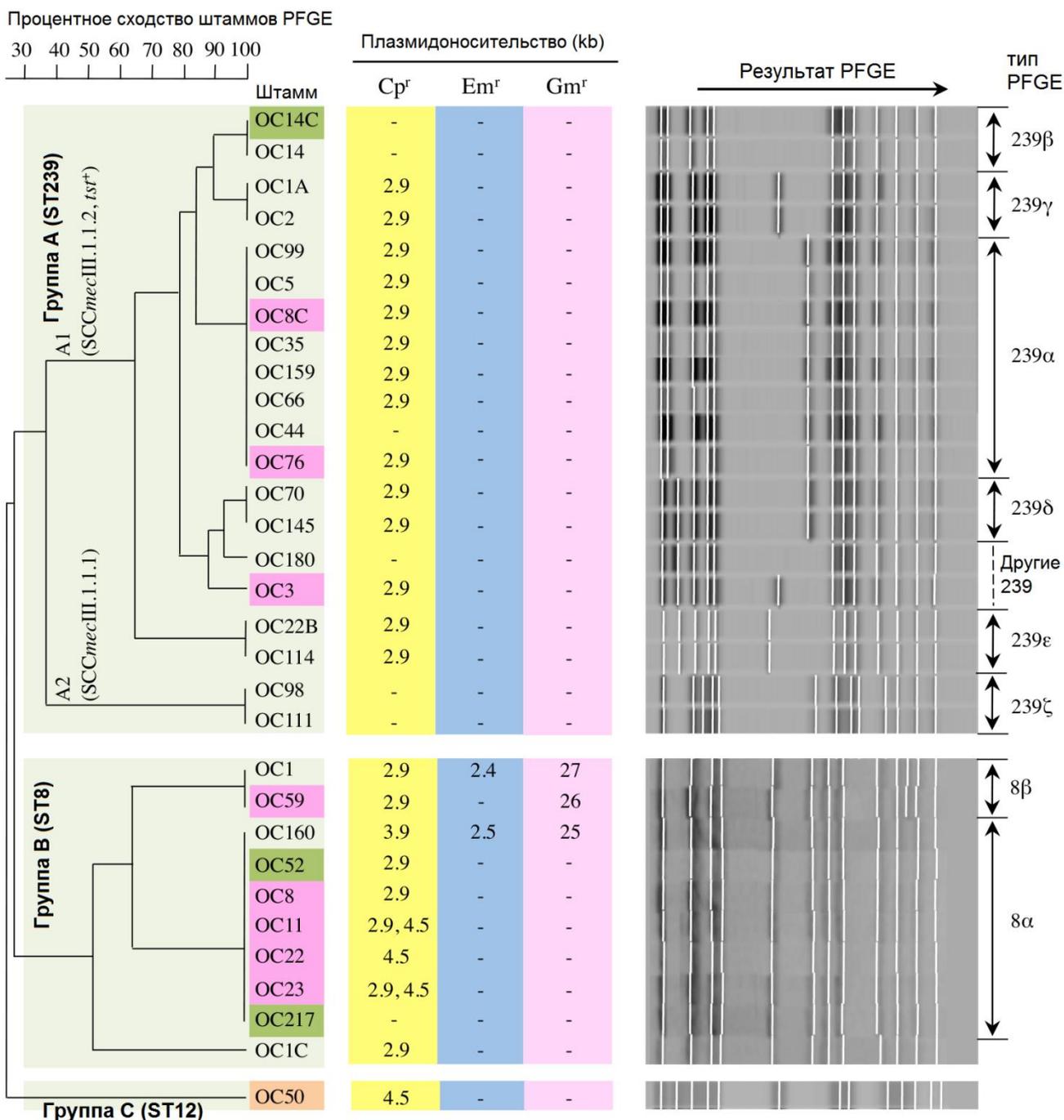


Рисунок 32 - Данные гель-электрофореза в пульсирующем поле (PFGE) и плазмидного профиля штаммов MRSA, изолированных в г. Красноярске

Примечание: выделение цветом названия штамма указывает происхождение штамма, например, красным выделены штаммы, изолированные от пациентов с фатальной пневмонией, коричневым цветом штаммы, выделенные от пациентов с сепсисом, зеленым штаммы, выделенные от носителей. Из случаев смертельной пневмонии штаммы OC3, OC8C, OC11, OC76 были изолированы от пациентов с госпитальной пневмонией, тогда как OC8, OC22, OC23 и OC59 были изолированы от пациентов с внебольничной пневмонией. Из случаев носительства штаммы OC14C и OC52 были изолированы от медицинских работников, а штамм OC217 - от студента

Штаммы ST239_{Kras} были выделены в основном от госпитализированных пациентов – с ИКМТ, в т.ч. от пациентов с синдромом диабетической стопы, от ожоговых пациентов; также от пациентов с остеомиелитом, как с острым, так и с хроническим; с госпитальной пневмонией, в т.ч. с фатальным исходом (например, штаммы OC3, OC8C и OC76); с сепсисом; онкологических больных; ВИЧ-инфицированных, госпитализированных с разными нозологиями. Также штаммы группы A1 были выделены от носителей – медицинского персонала стационаров г. Красноярска (например, штамм OC14C). Штаммы в группе A2 были *sea* + (Таблица 38). Результаты PFGE анализа штаммов группе A2 отличались от штаммов группы A1 (Рисунок 32). Штаммы из группы A2 являются достаточно распространенным вариантом HA-MRSA ST239 в России, и отличаются несколько более узким спектром множественной лекарственной устойчивости по сравнению со штаммами A1 (Таблица 38), характеризовались антибиотикорезистентностью к макролидам, линкозамидам, сульфаметоксазол/триметоприму и чувствительностью ко всем остальным изученным препаратам. Группа A (A1 и A2) демонстрировала высокий уровень МПК к имипенему и оксациллину (Таблица 38), что согласуется с характеристиками HA-MRSA [475]. Все штаммы были восприимчивы к триметоприму, фузидиновой кислоте, ванкомицину, тейкопланину, линезолиду и мупироцину.

Из изученных штаммов MRSA 49,1 % относились к группе B (n = 90) принадлежали к линии ST8/spa1(t008)/agr1/SCCmecIV.3.1.1/CoaIII (Таблица 38). Большинство штаммов (85,6 %, 75/90) были *sea*+ и продуцировали данный энтеротоксин на высоких уровнях (Таблица 38). У штаммов были очень похожие результаты PFGE, выделили два подтипа с не более чем трехбандовой разницей, что указывала на их принадлежность к одному и тому же клону (обозначенный как ST8_{Kras}): 8 α (основной тип: n = 7) и 8 β (n = 2) и (Рисунок 32). Штаммы ST8_{Kras} (группа B) имели низкий уровень МПК для имипенема и оксациллина (Таблица 38), что согласуется с

характеристиками CA-MRSA [475]. Характеризовались антибиотикорезистентностью 91,1 % штаммов к фторхинолонам; 95,6 % штаммов к хлорамфениколу (у 73,3 % штаммов гены резистентности локализованы в *Srg* плазмиде 2,9 т.п.н.); в 16,7 % случаев резистентны к аминогликозидам (гены резистентности локализованы в плазмидах 25 и 27 т.п.н.); в 7,8 % к макролидам (гены резистентности локализованы в плазмидах 2,4 и 2,5 т.п.н.); 4,4 % штаммов устойчивы к тетрациклинам; 1,1% штаммов устойчивы к линкозамидам. Все штаммы были восприимчивы к триметоприму, фузидиновой кислоте, ванкомицину, тейкопланину, линезолиду и мупироцину. Штаммы были выделены от носителей – детей дома ребенка, детей обследованных на дисбактериоз (12 штаммов), студента, заключенных, медицинских работников; также были выделены от пациентов с ИКМТ, с внебольничной пневмонией, в т.ч. 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, либо от пациентов, не имевших риска колонизации госпитальными штаммами; так и от пациентов, находящихся в стационарах более 48 часов, т.е. имевших риск колонизации госпитальной флорой.

Штаммы группы C (n = 2) 1,1 % относились к ST12/*sraNew* (t156)/нетипируемый SCCmec, выявили низкие уровни резистентности к имипенему и оксациллину и имели плазмиду *Srg*. Что касается резистентности к лекарственным средствам - были устойчивыми к хлорамфениколу, гены резистентности локализовались в плазмиде (4,5 т.п.н.). (Таблица 38). Штаммы характеризовались чувствительностью к аминогликозидам, макролидам, тетрациклинам, фторхинолонам, рифампицину, сульфаметоксазол/триметоприму, гликопептидам, оксазолидинонам, мупироцину, фосфомицину, фузидиевой кислоте.

Данные штаммы MRSA были выделены от пациентов с синдромом диабетической стопы после 48 часов пребывания в стационаре.

Два штамма MRSA, выделенные от медицинских работников в 2016 г. (1,1 %) относились к PVL-позитивным ST30/spa19(t019)/SCCmecIV.3.1.1./coaIV/agr1. Один красноярский PVL-позитивный штамм MRSA, помимо резистентности к β -лактамам антибиотикам, был устойчив к макролидам. Установлено, что данные 2 сотрудницы 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 не выявлено распространение подобных штаммов MRSA.

4.2 Уровень продукции токсина синдрома токсического шока и энтеротоксина SEA. Уровень экспрессии мРНК генов цитолитических пептидов и регуляторных генов у штаммов MRSA

Определили уровень продукции токсина синдрома токсического шока у 18 штаммов MRSA, относящихся к варианту ST239_{Kras}. Установлено, что уровень продукции TSST-1 составил 50-800 нг / мл, в среднем 313 нг / мл. Результаты определения уровня продукции TSST-1 у *tst* положительного штамма OC3 в реакции латекс-агглютинации с набором TST-RPLA представлены в рисунке 32. Уровень продукции TSST-1 штаммом OC3 оказался высоким и по уровню продукции совпадал со штаммами MRSA T1 и T2 клон New York/Japan ST5 (японский вариант), изолированными от пациентов с синдромом токсического шока, и штаммом MRSA NN33 клон New York/Japan ST5 (японский вариант), выделенном от госпитализированного пациента с некротизирующим фасциитом. Уровень продукции токсина синдрома токсического шока штаммом OC3 оказался ниже по сравнению со штаммом MRSA Mu50 клон New York/Japan ST5

(Рисунок 33). Также сравнивали результаты продукции токсина штаммом ОСЗ с уровнем продукции TSST-1 штаммом MRSA 10H, относящегося также к варианту ST239, не имеющего *tst*, выделенного от 34-летнего пациента с хирургической раневой инфекцией в г. Владивостоке в 2006 г., у которого, как и предполагалось, были негативными результаты в реакции латекс-агглютинации. Сравнивали результаты с отрицательным контролем - штамм MRSA BK2464 клон New York/Japan (американский вариант), у которого также были негативными результаты в реакции латекс-агглютинации.

Определили уровень продукции энтеротоксина SEA в реакции латекс-агглютинации с набором SET-RPLA у 8 штаммов MRSA, относящихся к варианту ST8_{Kras}. Установлено, что уровень продукции энтеротоксина SEA составил 1024-2048 нг / мл.

Токсины, такие как TSST-1 и энтеротоксины, являются суперантигенами (SAg), которые вызывают массовое высвобождение провоспалительных цитокинов, что приводит к выраженному воспалительному ответу, что в свою очередь приводит к эндотоксиноподобному шоку, который включает в себя повышение проницаемости сосудов, гемодинамический шок, мультиорганную недостаточность и способствуют фатальному исходу [212]. В настоящее время имеется более 21 известных SAg, включая TSST-1, энтеротоксины (SEA-E и SEI), энтеротоксин-подобный токсин (SeIG, H и JU) [227, 443] и по меньшей мере более 15 экзотоксинов (SET1-SET15) [209]. Энтероксин SEA также относится к суперантигенам и его продукция наряду с другими факторами вирулентности способствует агрессии штаммов ST8_{Kras} в развитии инфекционного процесса.

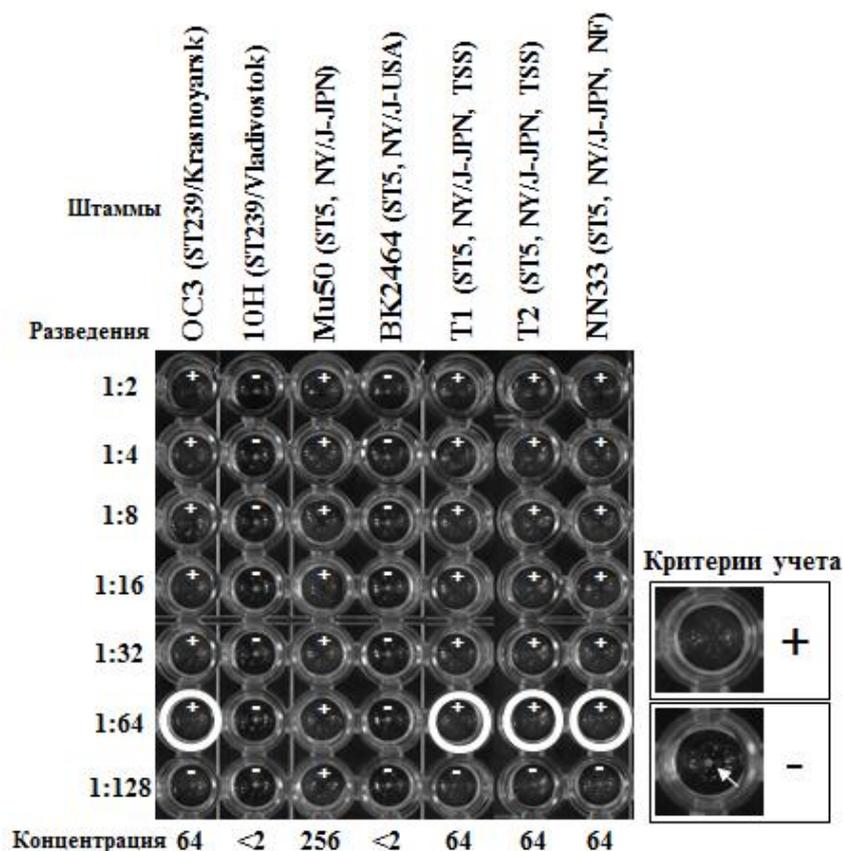


Рисунок 33 - Результаты реакции латекс-агглютинации по определению уровня продукции TSST-1 в супернатанте штаммов HA-MRSA

Примечание: Отрицательный контроль - штаммы 10H и BK2464, не имеющие *tst*-гена. Положительный контроль - штаммы Mu 50 (ST 5, NY/J, JPN); T1 (ST 5, NY/J, JPN, TSS); T2 (ST 5, NY/J, JPN, TSS); NN33 (ST 5, NY/J, NF)

Изучили уровень экспрессии генов *psma* и *hld*. Штаммы ST239_{Kras}, включая штамм OC3, экспрессировали гены *psma* и *hld* на высоких уровнях, аналогично CA-MRSA USA300 и российскому CA-MRSA (штамм RS08 и штаммы ST8_{Kras}). Однако выявили, что уровень экспрессии генов *psma* и *hld* у штаммов ST239_{Kras} значительно выше, по сравнению со штаммами HA-MRSA, варианта ST5/SCCmecII клона NY/J и другими представителями линии ST239/SCCmecIII, включая контрольные штаммы HU25 и ANS46 ($p < 0,001$) (Рисунок 34 А).

Уровни экспрессии регуляторных генов транскрипции представлены на Рисунке 34 В. Штаммы ST239_{Kras}, включая штамм OC3, продемонстрировали

более высокие уровни экспрессии генов *sarR*, *mgrA*, *saeR*, *saeS*, *sarX*, *rot* и *srrAB* ($p < 0,001$) по сравнению с другими штаммами линии ST239, включая контрольные штаммы HU25 и ASN46. Уровни экспрессии гена *sarA* существенной не различались между штаммами линии ST239.

На Рисунке 34 в А, в правой части представлены результаты уровня экспрессии цитолитических пептидов (*psmA* и *hld*) для контрольных штаммов MRSA, как для штаммов CA-MRSA, которые показывали высокие уровни экспрессии генов, так и для штаммов HA-MRSA, которые показывали низкие уровни экспрессии генов. В левой части Рисунка 34 представлены результаты уровня экспрессии цитолитических пептидов (*psmA* и *hld*) штамма RS08 CA-MRSA, который показал высокие уровни экспрессии, как и ожидалось; у штаммов CA-MRSA ST8_{Kras} (ST8/SCCmecIVc), включая штамм OC8, также были выявлены высокие уровни экспрессии генов. Штаммы ST239 HA-MRSA, показали низкие уровни экспрессии генов, как ожидалось. Однако штаммы ST239_{Kras} (ST239/SCCmecIII/spa3/tst+), включая штамм OC3, неожиданно показали высокие уровни экспрессии генов, аналогичные штаммам CA-MRSA.

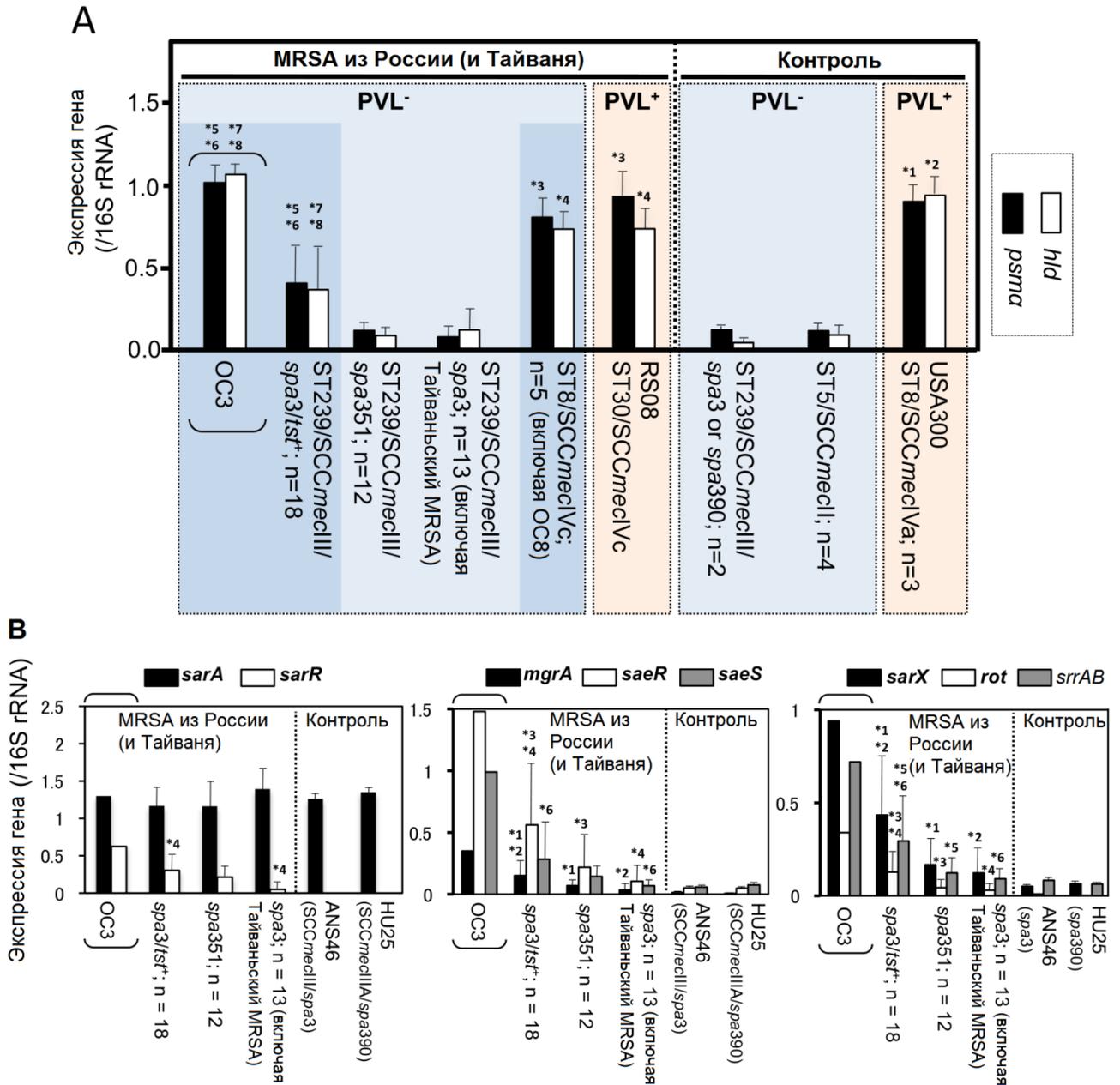


Рисунок 34 - Уровни экспрессии мРНК генов цитолитических пептидов (*psmA* и *hld*) у штаммов ST239_{Kras} и ST8_{Kras} (A) и регуляторных генов в ST239_{Kras} штаммы (B), по сравнению с контрольными штаммами SA- и HA-MRSA и другими штаммами MRSA ST239

Примечание: достоверность отличий в уровне продукции гена *psmA*: *1, $p < 0,001$ по сравнению с контрольным ST239/SCCmecIII и ST5/SCCmecII; *3, $p < 0,001$ по сравнению с контрольным ST239/SCCmecIII и ST5/SCCmecII; *5, $p < 0,001$ по сравнению с контрольным ST239/SCCmecIII и ST5/SCCmecII; *6, $p < 0,001$ по сравнению с российским ST239/SCCmecIII/*spr3* и *spr351*. Достоверность отличий в уровне продукции гена *hld*: *2, $p < 0,05$ по сравнению с контрольным ST239/SCCmecIII и ST5/SCCmecII; *4, $p < 0,001$ по сравнению с контрольным ST239/SCCmecIII и ST5/SCCmecII; *7, $p < 0,001$ по сравнению с контрольным ST239/SCCmecIII и ST5/SCCmecII; *8, $p < 0,001$ по сравнению с русскими штаммами ST239/SCCmecIII/*spr3* и *spr351*

4.3 Механизмы резистентности к антимикробным препаратам, плазмидный профиль у штаммов MRSA, изолированных в г. Красноярске

По результатам исследования антибиотикорезистентности установили, что представители варианта ST239 A₁, выделенные в г. Красноярске, отличались множественной лекарственной устойчивостью (практически ко всем изученным антимикробным химиопрепаратам - аминогликозидам, тетрациклинам, макролидам, линкозамидам, фторхинолонам, хлорамфениколу, триметоприм/сульфаметоксазолу), в том числе резистентны к рифампицину (уровень МПК более 128 мкг/мл). Представители клона MRSA ST8 оказались резистентны к 1-4 не бета-лактамным антимикробным химиопрепаратам, в том числе аминогликозидам, макролидам, линкозамидам, фторхинолонам, хлорамфениколу.

Механизмы резистентности к антимикробным химиопрепаратам у штаммов MRSA, изолированных в г. Красноярске, связаны как с наличием генетических структур, таких как *SCCmec*, плазмид, транспозонов, а также с мутациями в генах.

Резистентность к фторхинолонам обусловлена мутациями в хромосомных генах (97,3 % штаммов ST239_{Крас} и 91,1 % штаммов ST8_{Крас}): *GyrA* - замена аминокислоты Ser 84 Leu Серин лейцин - мутации в кодоне 84; *GrlA* - замена аминокислоты Ser 80 Phe Серин Фенилаланин - мутации в кодоне 80. Данный механизм связан с модификациями мишени действия бактериальных ферментов ДНК-гиразы и топоизомеразы IV, опосредующих конформационные изменения в молекуле бактериальной ДНК, необходимые для ее нормальной репликации. Аминокислотные замены, в свою очередь, приводят к снижению сродства хинолонов к ферментам. МПК для фторхинолонов у штаммов 4-128 мкг/мл

Резистентность к рифампицину (97,3 % штаммов ST239_{Крас}) обусловлена мутациями в хромосомных генах: *groV* - замена аминокислот

His481Asn гистидин - аспарагин, мутации в кодоне 481; Ile527Met изолейцин – метионин, мутации в кодоне 527. Мишенью действия рифамицинов является фермент ДНК-зависимая РНК-полимераза (ген *rpoB*). Устойчивость к рифампицину связана с мутациями в сравнительно небольшом фрагменте β -субъединицы этого фермента. МПК для рифампицина у штаммов более 128 мкг/мл. По результатам исследований Гончарова А.Е, среди представителей широко распространенных в России эпидемических *sra* типов t008, t030, t037 частота выявления штаммов с гипермутабельным фенотипом в частности к рифампицину выше, чем у не эпидемических штаммов, и составляет 52,3 % против 19,2 % (различия являются статистически значимыми, $p = 0,011$) [17].

Из изученных 97,3 % штаммов ST239_{Kras} и 16,7 % штаммов ST8_{Kras} резистентны к гентамицину и канамицину, механизм резистентности связан с наличием гена *aacA-aphD* в транспозоне Tn4001, кодирующего синтез аминогликозидмодифицирующих ферментов - AAC - ацетилтрансферазы – ферменты, присоединяющие молекулу уксусной кислоты, APH - фосфотрансферазы – ферменты, присоединяющие молекулу фосфорной кислоты. Резистентность к неомицину была обусловлена наличием гена *aadD*, локализованного в плазмиде pSK41 вместе с геном *ble*, обуславливающего резистентность к блеомицину. Механизм резистентности связан синтезом аминогликозидмодифицирующих ферментов аденилилтрансферазы, или нуклеотидилтрансферазы, осуществляющих инактивацию молекулы аминогликозида путем присоединения нуклеотида аденина. МПК для аминогликозидов у штаммов 32-128 мкг/мл.

Из изученных 98,7 % штаммов ST239_{Kras} имели ген *tetM* в транспозоне Tn5801, обеспечивающий резистентность к тетрациклину, вследствие защиты рибосом. 4,4 % штаммов ST8_{Kras} имели ген *tetK* в плазмиде Известно семейство защитных белков, которые позволяют бактерии синтезировать белок, несмотря на связывание с рибосомой молекулы тетрациклина. и детерминируют устойчивость ко всем тетрациклинам. МПК для тетрациклинов у штаммов 32-128 мкг/мл.

97,3 % штаммов ST239_{Kras} резистентны к макролидам, линкозамидам, гены *ermA* локализованы в транспозоне Tn554. 7,8 % штаммов ST8_{Kras} имели плазмиды pEmr/Clr (2,4 или 2,5 т.п.н.), кодирующие резистентность к эритромицину, клиндамицину (ген *ermC*). Резистентность к макролидам (эритромицин) и линкозамидам (клиндамицин) была связана с наличием генов *ermA*, *ermC*, кодирующих фермент метилазу; что обеспечивает модификацию мишени действия в результате метилирования 23S-субъединицы рРНК. Основной мишенью действия макролидов и линкозамидов является 50S субъединица бактериальной рибосомы. Несмотря на различия в структуре, все эти антибиотики имеют общий участок связывания с рибосомой. Таким образом, стафилококки устойчивы ко всем макролидам и линкозамидам, т.к. синтез метилазы конститутивный. У 1 штамма ST8 был выявлен индуцибельный синтез метилазы, что обеспечивало сохранение чувствительности к 16-членным макролидам и линкозамидам (спирамицин, джозамицин). МПК для макролидов у штаммов более 128 мкг/мл.

Данные плазмидного профиля штаммов MRSA, изолированных в г. Красноярске, приведены в Таблице 38, Рисунке 35. Многие штаммы MRSA имели только небольшую плазмиду pCr^r, и та же плаزمида pCr^r (2,9 т.п.н.) присутствовала у 71 (94,7 %) из 75 штаммов ST239_{Kras} (группа A1) и в 66 (73,3 %) из 90 штаммов ST8_{Kras} (группа B) (Рисунок 35). Данная плазмида pCr^r (2,9 т.п.н.) была на 99,9 % гомологичной плазмиде pCr^r (2,9 т.п.н.), выделенной из штаммов MRSA ST239 (spa351 [t030] /SCCmecIII.1.1.4), циркулирующих в г. Владивостоке. Часть штаммов ST8_{Kras} имели плазмиду pCr^r размером 3,9 т.п.н. (Рисунок 32). Кроме того, часть штаммов ST8_{Kras} имели плазмиду pCr^r размером 4,5 т.п.н.; часть из этих штаммов несли две разных плазмиды pCr^r (2.9 и 4.5 т.п.н.) (Рисунок 34).

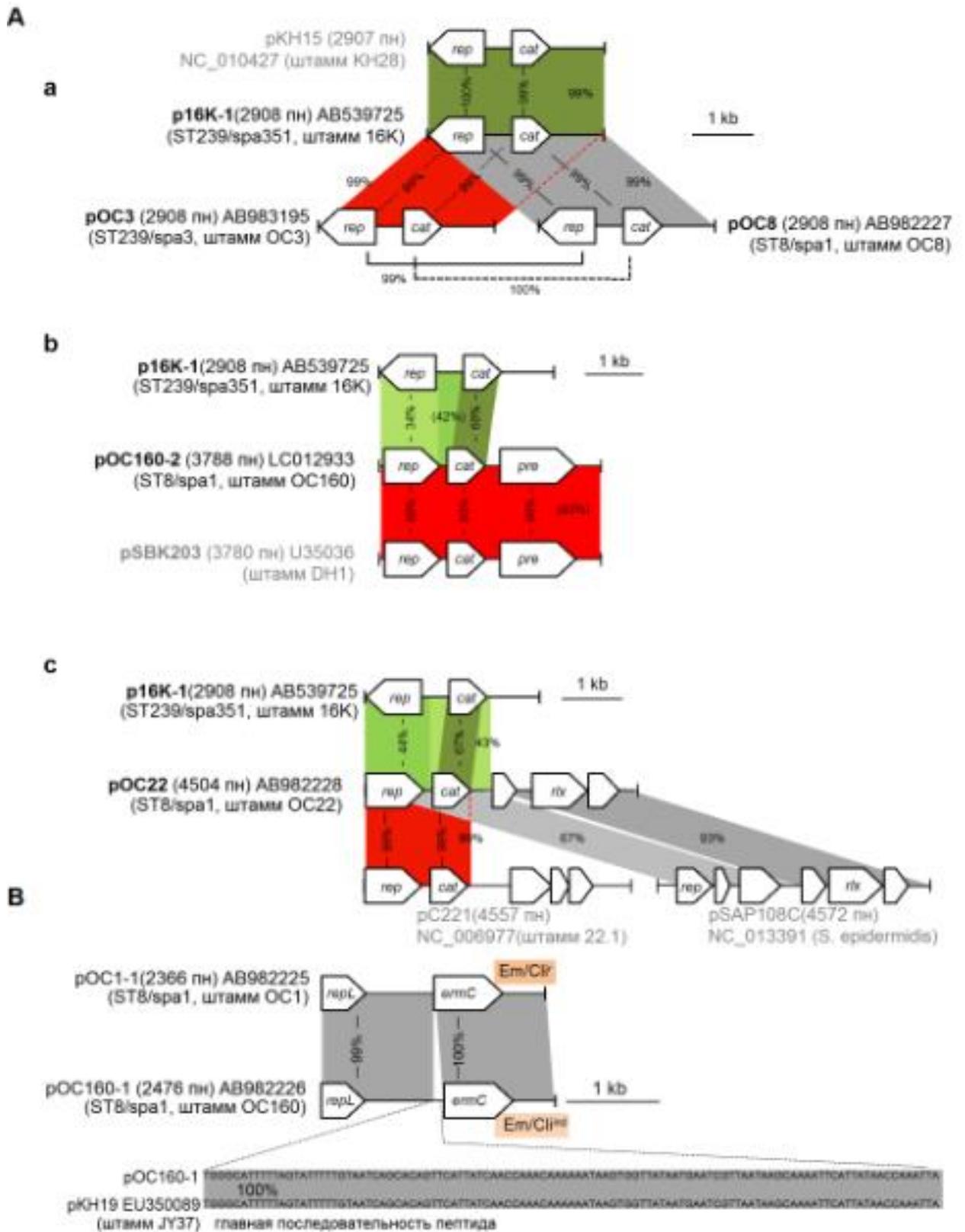


Рисунок 35 - Структурный анализ плазмид, определяющих устойчивость к хлорамфениколу (А-а-с) и резистентность к эритромицину/клиндамицину (В)

Плазмида pCp^r, определяет резистентность к хлорамфениколу и несет ген *cat*, кодирующий синтез хлорамфениколацетилтрансферазы, фермента, обеспечивающего ферментативную инактивацию (ацетилирование) хлорамфеникола. МПК для хлорамфеникола у штаммов 32-64 мкг/мл.

Данные о нуклеотидной последовательности плазмид изученных ранее штаммов были получены в GenBank. На Рисунке 35 в каждом сравнении гомологичные области заштрихованы. Гены, входящие в состав плазмиды: *cat*, устойчивость к хлорамфениколу; *rep*, белок инициатора репликации; *pre*, PRE-белок; *rlx*, RLX-белок; *repL*, белок инициатора репликации *L. Em/Clii*, конститутивная устойчивость к эритромицину и клиндамицину; *Em/Cliind*, индуцибельная резистентность к эритромицину и клиндамицину (из-за наличия пептидной последовательности в промоторной области выше от гена *ermC*).

Часть штаммов ST8_{Kras} (12,2 %) имели большие плазмиды (25 и 27 т.п.н.), кодирующие гены резистентности к антибиотикам ампициллину и пенициллину (ген *blaZ* – синтез фермента пенициллиназы) и антисептикам (альтернативно определяемая как пенициллиназная плазмида, pPCase), в дополнение к плазмиде pCp^r (Таблица 38). У штаммов ST239 ген *blaZ* локализован в транспозоне Tn552.

У штаммов ST239_{Kras} была выявлена резистентность к антисептикам акрифлавины, бензалконию хлориду, бензотониум хлориду, хлоргексидину, (ген *qacA*) и кадмию (ген *cadD*).

При исследовании чувствительности к ванкомицину использовали метод серийных разведений и в ряде случаев E-тест (bio Meriux, Франция). По уровню МПК к ванкомицину выявили 19 штамма MRSA (10,4 %), принадлежащие к группе heterogeneous Vancomycin intermediate *S.aureus* (hVISA) с уровнем МПК 2-3 мкг/мл. При этом, 7 штаммов были выделены от медицинских работников нескольких крупных стационаров г. Красноярска (ST8_{Kras}, ST239_{Kras}), в т.ч. 1 штамм hVISA был выделен от сотрудника родильного дома (ST8_{Kras}); 5 штаммов hVISA были выделены от детей дома

ребенка (ST8_{Kras}), обследованных на бактерионосительство; 7 штаммов hVISA были выделены от госпитализированных пациентов с различными гнойно-воспалительными заболеваниями, в т.ч. от ВИЧ-инфицированных (ST239_{Kras}). Также нами были выделен 1 штамм MRSA, принадлежащий к группе Vancomycin-intermediate *S.aureus* (VISA) с уровнем МПК 4 мкг/мл. Штамм был изолирован в 2016 г. от медицинского сотрудника неврологического отделения КГБУЗ «КМКБСМП им. Н.С. Карповича» (ST239_{Kras}).

4.4 Перенос плазмид лекарственной устойчивости у штаммов MRSA, изолированных в г. Красноярске

Плазмиды переносили от штаммов-доноров в штамм-реципиент *S. aureus* RN2677 в бактериальной смешанной культуре с частотой от 10^{-5} до 10^{-7} (Рисунок 36, часть D). Транспозон Tn554, несущий гены *ermA*, *spc* у штаммов ST239_{Kras} также переносили на штамм-реципиент RN2677 (Рисунок 36, часть D), встраивание которого происходило посредством кругового промежуточного соединения. Плазмиды pCp^r, размером 2,9 т.п.н. демонстрировали высокий уровень частоты передачи (Tra +) pPCase (Рисунок 36, часть D).

На рисунке 36 в части А штамм, обозначенный как RN, RN2677 являлся реципиентом. Ковалентно замкнутую кольцевую (CCC) плазмидную ДНК, выделенную из MRSA и трансконъюгантов (RN2677, несущих плазмиды), подвергали электрофорезу в 1 % агарозе (Рисунок 36). Размеры плазмид определяли сравнением с эталонными плазмидами с известными молекулярными размерами. Плазмиды: Cpг - плазида устойчивости к хлорамфениколу (выделена желтым на Рисунке 36); Emг - плазида резистентности к эритромицину (выделена синим на Рисунке 36); Gmг - плазида устойчивости к гентамицину (выделена красным на Рисунке 36).

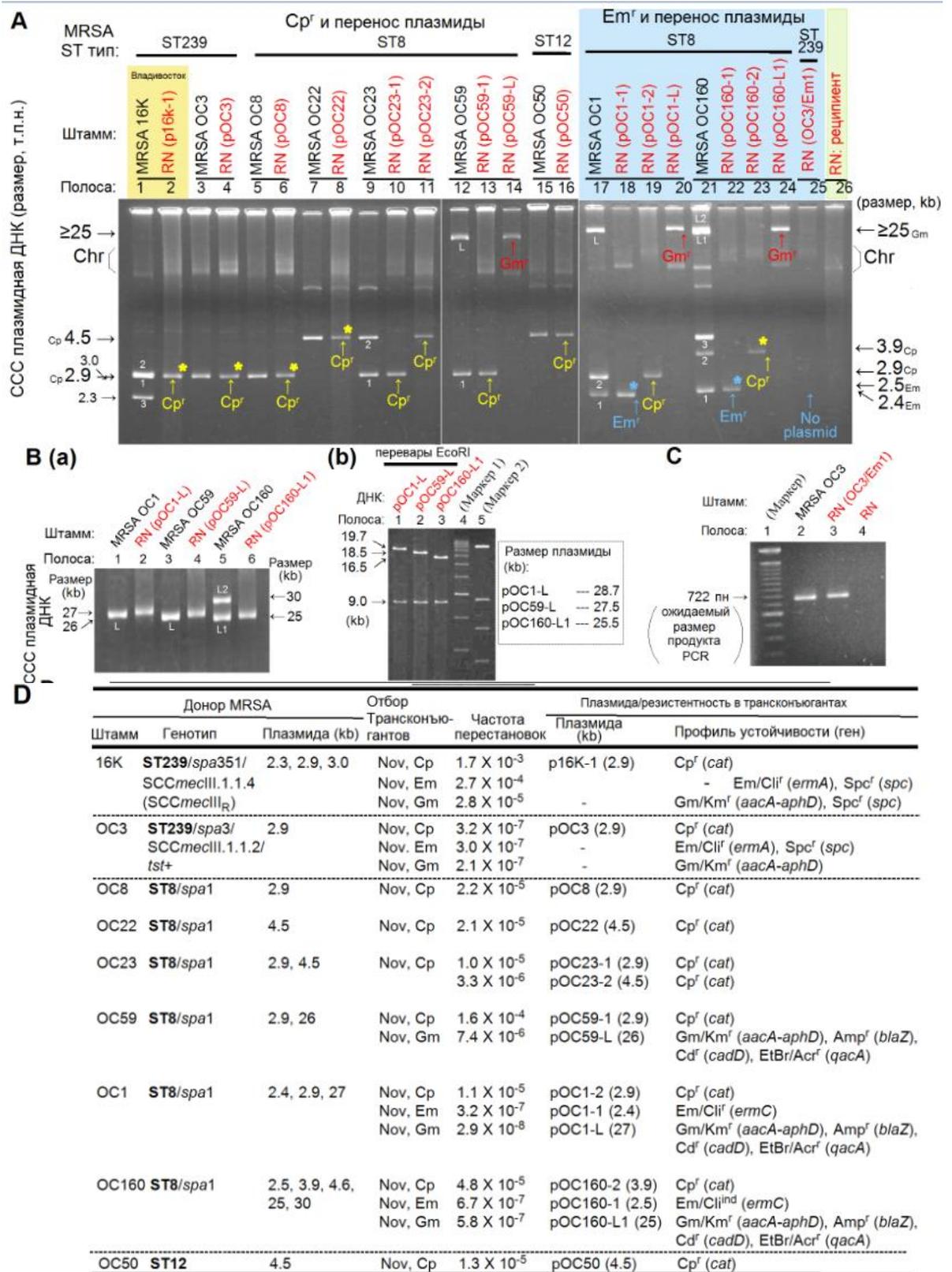


Рисунок 36 - Анализ плазмидного профиля (от А до С) и перенос плазмиды в смешанной бактериальной культуре (D) MRSA из г. Красноярск, по сравнению со штаммом ST239 MRSA 16K из г. Владивостока. В; RN, RN2677 (реципиент)

На Рисунке 36 имеются следующие обозначения: Nov - новобиоцин; Cr - хлорамфеникол; Em - эритромицин; Gm - гентамицин; Cl_i - клиндамицин; Spc - спектиномицин; Amp - ампициллин; Cd - кадмий; EtBr - бромид этидия; Acr - акрифлавин.

У плазмид, обозначенных * на Рисунке 36, определяли полную нуклеотидную последовательность. На Рисунке 36 в части В-а представлены результаты электрофореза плазмидной ДНК ССС в 0,6 % агарозе.

На Рисунке 36 в части В-б плазмидную ДНК ССС разрезали рестрикционным ферментом EcoRI и подвергали электрофорезу в 0,5 % агарозе. Были использованы маркеры: маркер 1, размером 2,5 т.п.н.; маркер 2 - λ-HindIII. На Рисунке 36 в части С представлены результаты ПЦР, позволившие обнаружить наличие кольцевого промежуточного соединения транспозона Tn554: штамм OC3 ST239_{Kras} (№ 2) и трансконъюгат Emg RN2677 (№ 3) дали положительные результаты, тогда как штамм RN2677 (№ 4) не имел такой структуры. На Рисунке 36 в части D представлены результаты бактериальной трансконъюгации (метод с фильтрами, метод без фильтра) между MRSA штаммами-донорами и штаммом-реципиентом RN2677. Указана частота передачи плазмид антибиотикорезистентности – донор-трансконъюгант.

Распределение плазмид у штаммов, изолированных в г. Красноярске является уникальным. Многие штаммы MRSA имели плазмиду pCr^r и зачастую несли два вида плазмид pCr^r, в отличие от штаммов, распространенных в других странах и не имевших pCr^r [182, 246, 253, 261, 474], или штаммов из г. Владивостока, имевших несколько разных плазмид [533]. В России антимикробные химиопрепараты до 2016 г. можно было приобрести в аптечной сети без рецепта врача в разных формах выпуска препаратов: таблетированная, инъекционные растворы, мази для наружного применения, глазные капли и др. Бесконтрольное и необоснованное широкое применение антимикробных химиопрепаратов способствует селекционному давлению и закреплению в популяции штаммов

MRSA, имеющих различные механизмы антибиотикорезистентности, например мобильные генетические элементы, такие как плазида pCr^r . Небольшие плазмиды pCr^r , размером 2,9 т.п.н. могут легко передаваться горизонтально, а также при репликации штаммов [119, 286, 456]. Однако и крупные Tra^+ плазмиды аналогично могут горизонтально переноситься, например в процессе конъюгации [114, 337]. Такие структуры как $pEMr$ и $Tn554$ имеют циклическое строение и могут также переноситься горизонтально, подобно pCr^r [533].

Заключение по главе

При изучении чувствительности штаммов MRSA к антимикробным химиопрепаратам не выявили корреляции между материалом, из которого был изолирован штамм, диагнозом. Однако установили зависимость между уровнем антибиотикорезистентности и генетическим вариантом, к которому относился выделенный штамм. Выявили высокий уровень резистентности к фторхинолонам среди штаммов, относящихся к разным генетическим вариантам MRSA, циркулирующим на территории г. Красноярск, Красноярского края. Штаммы MRSA ST239_{Крас} характеризовались множественной резистентностью к антимикробным химиопрепаратам. Механизмы антибиотикорезистентности связаны как с приобретением мобильных генетических элементов, так и с мутациями в хромосомных генах. Штаммы MRSA ST8_{Крас} характеризовались резистентностью к 2-3-4 группам антимикробных препаратов, механизмы антибиотикорезистентности связаны как с приобретением мобильных генетических элементов, так и с мутациями в хромосомных генах. Мутаторный фенотип у бактерий, в частности стафилококков, связан с различными нарушениями в системе репарации ошибок репликации (mismatch repair system, MMR) за счет точковых мутаций или протяженных делеций в генах *mutS* или *mutL* [17]. Известно, что штаммы бактерий, имеющие дефекты в MMR системе, помимо

повышенной частоты спонтанных мутаций, характеризуются также большой способностью к рекомбинациям и горизонтальному переносу генов [17]. Таким образом, широкое распространение штаммов с повышенной частотой мутаций и горизонтальным переносом генов среди эпидемических MRSA отражает, по-видимому, высокую степень геномной пластичности эпидемических генотипов [17].

У штаммов ST239_{Kras} была резко выражена продукция PSM α и Hld на уровне соответствующем штаммам CA-MRSA [508], что способствует цитолитическому эффекту в отношении клеток человека и способствует развитию абсцессов и бактериемий, что согласуется с литературными данными [271]. В литературе описаны случаи носительства, а также инфекций, включая некротизирующую пневмонию, вызванных штаммами HA-MRSA ST5/SCCmecII(NY/J) и ST764/SCCmecII, которые продуцировали PSM α /Hld на высоком уровне [477]. У штаммов ST239_{Kras} также был выявлен высокий уровень транскрипции некоторых регуляторных генов, за исключением гена *sarA* [149, 271, 335]. Они включали транскрипционно-позитивные гены-регуляторы, такие как *mgrA* [231], *saeR/S* [231] и *sarX* [162]; и транскрипционно-отрицательные гены регуляторы, такие как *sarR* [149, 335], *rot* [117] и *srrAB* [422]. Приобретение генов *sek* и *seq* с синонимичными заменами (*sek2*, *seq2*) может частично объяснить высокую вирулентность штаммов USA300 [485]. У штаммов ST239_{Kras}, в т.ч. штамма OC3 выявили те же уникальные последовательности SEK и SEQ, что и у штамма TW20, но которые отличались от тех, что были у штаммов клона USA300. Гены, кодирующие синтез факторов ускользания от иммунного надзора обычно группируются в локусе IEC в профаге ϕ Sa3 [499, 527], но часто обнаруживаются и в профаге ϕ Sa7 [499] или ν Sa β [253]. Штаммы ST239_{Kras} имели два гена, *sak* и *scn*, в составе локуса IEC, в то время как штаммы USA300 имели три гена *sak*, *chp* и *scn* (номер доступа в GenBank CP000255). Штаммы TW20 и ST8_{Kras} (OC8) имели набор из трех генов, *sak*, *scn*, и *sea*. Ген *sna*, кодирует синтез коллаген-адгезина [95,96] и связан с развитием

пневмоний [171] и буллезного импетиго [449]. У штаммов ST239_{Kras} выявили наличие *Sna*, что увеличивает их вирулентность в том числе за счет уклонения от иммунного надзора [278]. Таким образом, у штаммов ST239_{Kras} имеется совокупность множественных факторов, включающих как профессиональные факторы для уклонения от иммунного надзора, так и факторы, способствующие развитию конкретных поражений и симптомов.

Штаммы ST8_{Kras} характеризовались высоким уровнем продукции энтеротоксина SEА, являющегося суперантигеном, что способствует агрессии в развитии инфекционного процесса. Также у штаммов ST8_{Kras} были выявлены высокие уровни экспрессии генов (*psma* и *hld*), кодирующих синтез цитолитических пептидов.

Минорными генетическими вариантами MRSA, выделенными на территории Красноярского края, являются ST12 и ST30. 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 клон SWP, WA MRSA, USA1100 [169]. 1 штамм MRSA ST30 PVL+ был выделен в г. Владивостоке. Вирулентность штаммов MRSA, относящихся к ST30, выделенных в г. Красноярске, Красноярском крае связана с продукцией PVL, энтеротоксинов, адгезинов, в т.ч. с наличием генов *sna* и *bbp*. Резистентность к антимикробным химиопрепаратам ограничена группой бета-лактамов, однако один штамм был устойчив к макролидам.

Глава 5 Структура геномов штаммов представителей основных клонов MRSA, распространенных в г. Красноярске, Красноярском крае

5.1 Структура генома штамма представителя варианта ST239_{Kras}

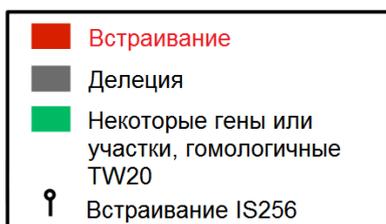
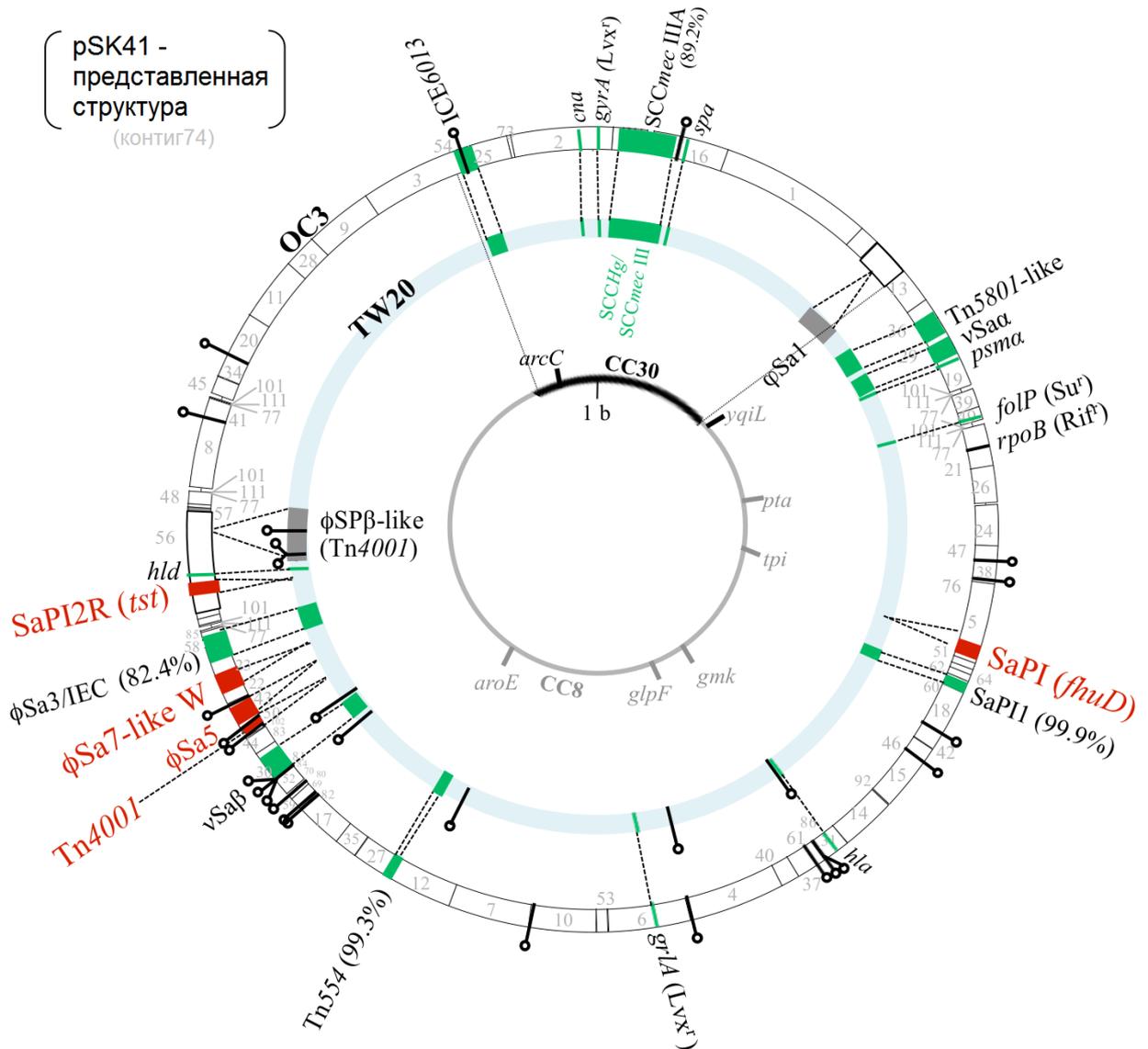
5.1.1 Результаты полногеномного анализа штамма OC3 ST239_{Kras}, выделенного в г. Красноярске

Изучен геном наиболее распространенного в г. Красноярске клона ST239, штамма OC3, выделенного в г. Красноярске. Штамм OC3 был выделен от пациента Б, 46-летнего ВИЧ-инфицированного мужчины, который поступил 03.07.09 в Краевую клиническую больницу, нейрохирургическое отделение с диагнозом *Опухоль мягкой мозговой оболочки с локализацией в правом мостомозжечковом углу*. 10.07.09 операция: трепанация задней черепной ямки справа, удаление опухоли. Осложнения: *Состояние после удаления менингиомы ММУ справа. Острое послеоперационное нарушение кровообращения в стволе мозга по смешанному типу с ишемией и кровоизлиянием в ствол мозга. Гидропневмоторакс справа*. 06.08.09 операция дренирование правой плевральной полости по Бюлау. Эмпиема плевры справа, бактериологическое исследование плевральной жидкости от 15.08.09: *P. aeruginosa*, MRSA. Дата смерти 22.08.09. Проведено 50 койко-дней. *Септикопиемия: септическая двусторонняя нижнедолевая мелкоочаговая гнойная пневмония; острый гнойный пиелонефрит левой почки, септический гепатит; гиперплазия костного мозга плоских и длинных трубчатых костей с миелоидной трансформацией; лейкоцитоз селезенки. Тяжелые дистрофические изменения паренхиматозных органов, очаговый некронефроз. Острые эрозии желудка. Альвеолярный отек легких. Отек и набухание вещества головного мозга*. При бактериологическом исследовании аутопсийного материала выделены микроорганизмы *P. mirabilis*, MRSA.

Размер генома штамма ОСЗ, выделенного в г. Красноярске составил 2,93 млн.п.н. Всего было прочтено 2,91 млн.п.н. генома штамма ОСЗ, что составило приблизительно 99,3 % определенных последовательностей генома от всей структуры генома штамма. Был проведен сравнительный анализ генома штамма ОСЗ на примере генома штамма TW20, который также относится к линии ST239. Штамм ОСЗ имел уникальную структуру генома (Рисунок 37). Геном ОСЗ состоял из двух частей, которые имели сходства с геномами вариантов ST30 и ST8, подобно геному штамма TW20 [246, 459]. В части генома, схожей с вариантом ST30 в геноме штамма ОСЗ, выявили ген *сна*, кодирующий коллаген-адгезин (Cna), кластер генов ускользания от иммунного надзора IEC6013 (с вставкой Tn552) и ген *sра*, кодирующий белок А (тип 3-t037), подобно штамму TW20. Однако, штамм ОСЗ не имел бактериофага φSa1 и структура хромосомной кассеты SCCmec отличалась: у штамма ОСЗ - SCCmecIII.1.1.2, у штамма TW20 - SCCmecIII.1.1.1.

В части генома, схожей с геномом варианта ST8, у штамма ОСЗ выявили пять уникальных вставок: остров патогенности *S. aureus*, имеющий ген *tst* и названный SaPI2R, вследствие его уникальной структуры; уникальный фаг, обозначенный как φSa7-подобный W; фаг φSa5; транспозон, Tn4001; SaPI, несущий ген *fhuD*, который кодирует белок транспортер феррихром ABC, обозначенный как SaPI *fhuD*. Отличительными особенностями генома штамма ОСЗ также было наличие двух делеций: отсутствие фага φSPβ-подобного, несущего ген *sasX* и Tn4001; отсутствие гена *dfrG*, кодирующего резистентность к триметоприму в транспозоне Tn5801.

Отличительным признаком генома штамма ОСЗ также было большое количество копий инсерционных последовательностей IS256 (более 22 копий в геноме), а у штамма TW20 имеется только восемь экземпляров инсерционных последовательностей. Возможно, такое большое количество копий IS256 необходимо для регуляции транскрипции и/или регуляции образования факторов вирулентности, в том числе токсинообразования.



GenBank идентификационный ном.
 Геном OC3 (контиги): BVKC01000001-BVKC01000144
 Генетическая структура (с завершённой последовательностью) OC3:
 SCCmecIII.1.1.2/OC3 (AB983237), SaPI2R (AB983196),
 SaPI (*fhuD*)/OC3 (AB983199), SaPI1/OC3 (AB983198),
 φSa7-like (W) (AB983197), φSa5/OC3 (AB983235),
 φSa3/OC3 (AB983236), pOC3 (AB983195)

Рисунок 37 - Структура генома штамма MRSA OC3 ST239_{Kras} по сравнению с геномом штамма MRSA TW20 ST239

Контиги генома штамма OC3 ST239_{Kras} (прочтение 2,91 млн.п.н.) были соединены на основе генома штамма TW20, размером 3043210 п.н. (номер

доступа в GenBank FN433596); на рисунке две структуры генома были нарисованы как два круга на общей карте генома, снаружи карта генома штамма ОСЗ и внутри карта генома штамма TW20. Информация о геноме включала в себя структуру стафилококковой хромосомной кассеты SCCmec, другие структуры устойчивости к лекарственным средствам (такие как транспозоны Tn, плазмиды, а также мутации генов), гены вирулентности, фаги, островки патогенности *S. aureus* (SaPI), геномные острова (vSa), инсерционные вставки (ISs). SCCmec: SCCmecIIA SCCmecIII.1.1.2 (штамм ОСЗ); SCCmecIII SCCmecIII.1.1.1, соединенный с SCCHg (TW20). Мутационная устойчивость к антимикробным химиопрепаратам: *Lvxr* - устойчивость к левофлоксацину; *Rifr* - устойчивость к рифампицину; *Sur* - устойчивость к сульфаметоксазолу. Гены вирулентности: *tst* - ген токсина синдрома токсического шока; *hld* - δ -гемолизин; *cna* - ген коллагенового адгезина; *sra* - ген белка А; *psma* - ген фенолорастворимый модулин (PSM); *hla* - α -гемолизин (α -токсин); IEC - кластер ускользания от иммунного надзора. Участки геномов CC30 и CC8 взяты у Holden et al. [246], а генетический элемент IEC6013 из [458]. Автономная плазида pOC3 (2,908 т.п.н.; контиг 75) штамма ОСЗ на рисунке не показана. Положение структуры pSK41 (с двумя копиями IS431 с обоих концов) в настоящее время остается неопределенным.

В геноме штамма ОСЗ выявлено девять генов устойчивости к лекарственным средствам: *mecA* в структуре SCCmecIII.1.1.2, *ermA* и *spc* в составе Tn554, *blaZ* в составе Tn552/ICE6013, *aacA-aphD* в составе Tn4001, *tetM* в составе Tn5801, *cat* в составе pOC3, а также гены *ble* и *aadD* в структуре pSK41. Выявили четыре мутации, определяющие устойчивость к антимикробным химиопрепаратам: *gyrA* (S84L) и *grlA* (S80F) для левофлоксацина [509], *rpoB* (H481N, I527M) для рифампицина [514] и ген *folP*, кодирующий фермент дигидроптеоратсинтетаза (DHPS). Замены в гене *folP*: F17L, V30I, T31N, M37I, I58V, T59S, V60L, L64M, I101M, V117I, V126I способствовали формированию устойчивости к сульфаметоксазолу с

увеличением МПК до более 512 мкг/мл. Выявленные замены (11 из 13 замен) практически соответствовали штамму V2157I [233]. В структуре SCCmecIII.1.1.2 определили наличие двух генов устойчивости к тяжелым металлам: *mer* и *cadA*.

Таким образом, у штамма OC3 в составе генома выявили три острова патогенности SaPIs: *tst+* SaPI2R (протяженность 14819 п.н.), SaPI имеющий ген *fhuD* (протяженность 15756 п.н.) и SaPI переносящий гены *sek* и *seq*; профаги: фаг 7-like [W] (42359 п.н.); профаг 5 (44424 п.н.), профаг 3; 5 транспозонов (Tns): 2 копии транспозона Tn554; Tn5801-like, транспозон Tn4001 (6483 п.н.), транспозон Tn552; 1 интегрированную плазмиду - генетическая структура pSK41; 1 автономную плазмиду pCpg (2908 п.н.).

5.1.2 Структура SCCmecIII.1.1.2 штамма MRSA OC3 ST239_{Kras}

Структура SCCmecIII.1.1.2 штамма MRSA OC3 ST239_{Kras} размером 61780 п.н. с последовательностями прямых повторов длиной 15 п.н. (*attL*, *attR*). Данная структура кассеты была идентична структуре контрольного штамма HU25 Бразильского клона с вариантом SCCmecIIIA, однако, заметно отличалась от структуры SCCmec штамма TW20, который имел кассету с двумя SCC SCCHg-SCCmecIII.1.1.1 (протяженность 35310 п.н.) (Рисунок 38, 39). По результатам сравнения гомологичные области заштрихованы. На рисунке 38 в части А при сравнении с SCCHg/SCCmecIII.1.1.1 штамма TW20, в структуре SCCmecIII.1.1.2 штаммов OC3 и HU25 не было среднего участка IS431^②-IS431. Структура SCCHg-SCCmecIII.1.1.1 штамма TW20 имеет четыре копии IS431 (①to④) в прямом положении в пограничной области двух SCC, что предполагает рекомбинацию между двумя копиями IS431 (② и④), необходимую для преобразования SCCmecIII.1.1.2. Область J3 структуры SCCmecIII.1.1.2 содержит основную часть SCCHg. У штамма 16K в структуре SCCmecIII.1.1.4 нет SCCHg. J3-области SCCmecIII.1.1.2 штамма

ОСЗ и SCCmecIII. 1.1.1 штамма TW20 были отличающимися друг от друга, размером 33011 п.н. и 6266 п.н. соответственно.

Чтобы подтвердить, что все штаммы ST239_{Kras} имеют один и тот же тип рекомбинации IS431, была проведена ПЦР с набором выбранных праймеров Hgreg (F)/attM (R) (для обнаружения attM) и Hgreg (F)/rec2/4 (R) (для идентификации рекомбинации между IS431 копий ② и ④) (Рисунок 38 В). На Рисунке 38 в части В набор праймеров Hgreg (F)/attM (R) позволил обнаружить attM, а набор праймеров Hgreg (F)/ rec2 / 4 (R) позволил выявить рекомбинацию между копиями IS431 ② и ④.

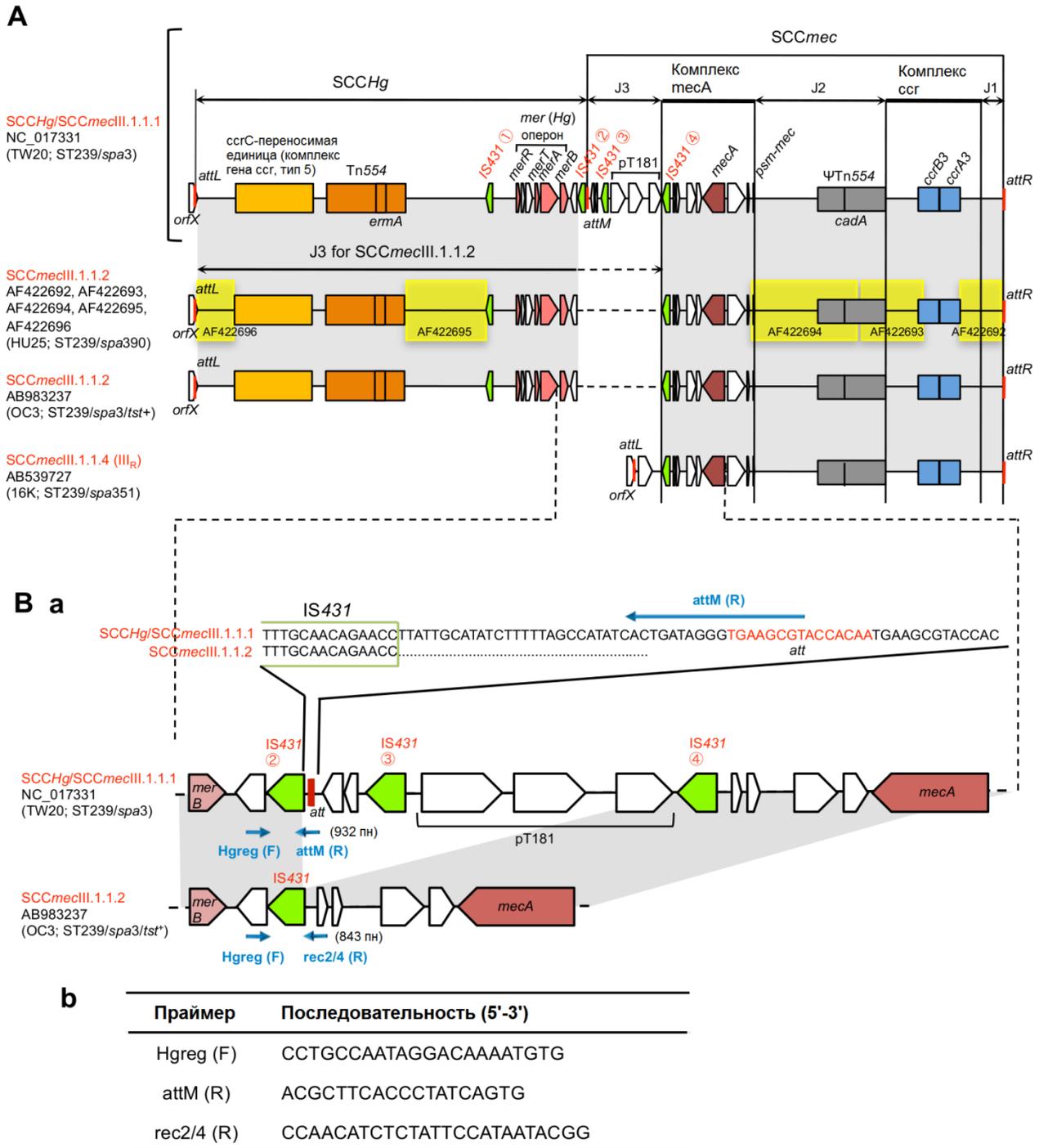


Рисунок 38 - Структура SCCmecIII.1.1.2 штамма OC3 ST239_{Kras} по сравнению с тремя структурами: SCCHg/SCCmecIII.1.1.1 штамма TW20, SCCmecIII.1.1.2 штамма HU25 и SCCmecIII.1.1.4 штамма 16K

Примечание: происхождение штаммов ST239: OC3, Красноярск; TW20, Лондон; HU25, Бразилия; 16K, Владивосток

Результаты ПЦР ясно показали, что все штаммы ST239_{Крас} имели структуру SCCmecIII.1.1.2 (IIIА) как у Бразильского клона. Штаммы, циркулирующие на территории России в таких городах как г. Красноярск и г. Владивосток, имели отличие в структурах SCCmecIII.1.1.4 и SCCmecIII.1.1.1 по SCCHg как показано на Рисунке 38 А, Таблице 40.

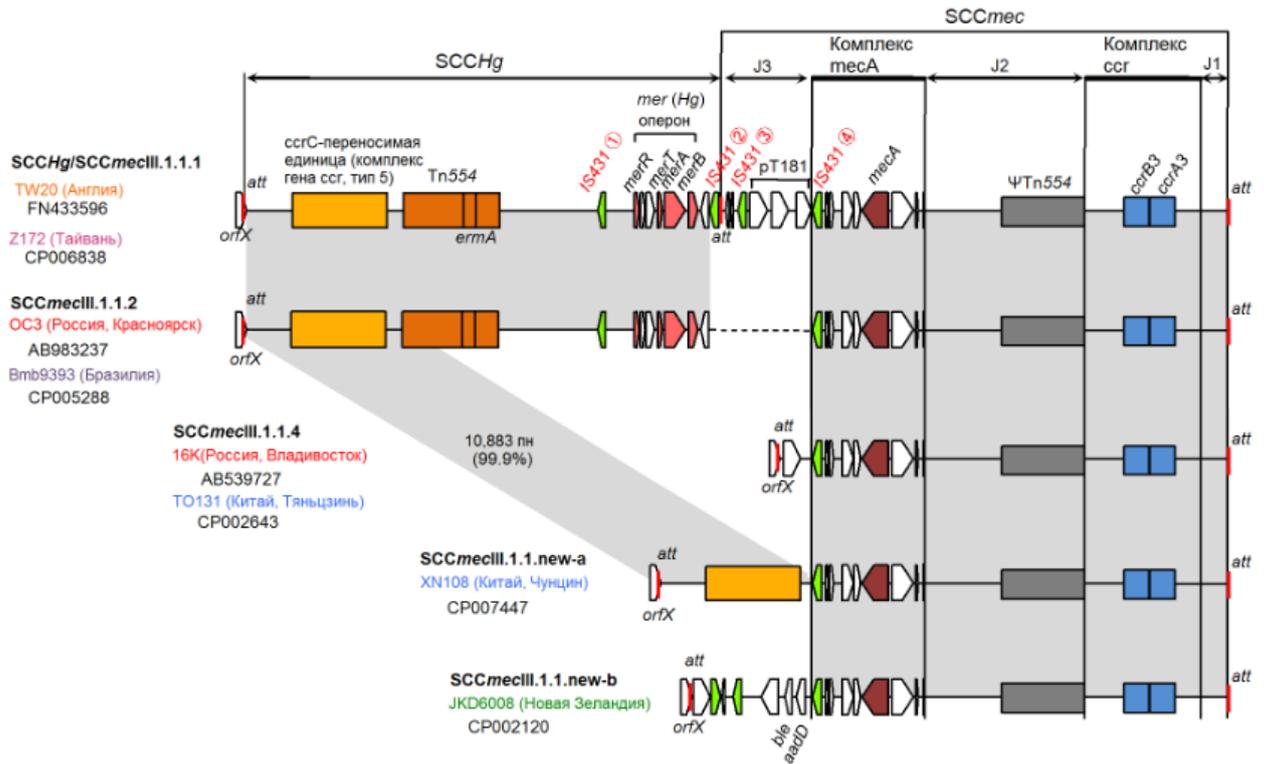


Рисунок 39 - Сравнение структуры SCCmecIII штамма MRSA OC3 ST239

Примечание: Восемь анализируемых геномов и структур SCCmecIII штаммов линии ST239, показаны на рисунке и описаны в таблице 40. Гомологические области затенены. SCCmecIII.1.1.new-a и SCCmecIII.1.1.new-b, SCCmecIII.1.1 с новыми регионами J3

Таблица 40 - Сравнение генетических структур штаммов MRSA ST239: вирулентности, лекарственной устойчивости и ЭВОЛЮЦИИ

Генетические структуры/тип		Характеристики штаммов MRSA: страна, где выделен (город), штамм, номер в Genbank, размер генома							
Группа/тип	структура	Англия TW20 3,043,210 bp FN433596	Тайвань Z172 2,987,966 bp CP006838	Китай (Чунцин) XN108 3,052,055 bp CP007447	Китай (Тяньцзинь) T0131 2,913,900 bp CP002643	РФ (Владивосток) 16К ~2.8 Мб BABZ01000001-107	РФ (Красноярск) OC3 ~2.93 Мб BVKC01000001-144	Бразилия Bmb9393 2,980,548 bp CP005288	Новая Зеландия JKD6008 2,924,344 bp CP002120
<i>sra</i> тип		3 (t037)	3 (t037)	3 (t037)	351 (t030)	351 (t030)	3 (t037)	390(t138)	3 (t037)
SCC	SCCmec ^a	III.1.1.1	III.1.1.1	III.1.1.new-b	III.1.1.4	III.1.1.4	III.1.1.2 (fused SCCHg/SCCmec)	III.1.1.2 (fused SCCHg/SCCmec)	III.1.1.new-a
	SCCHg	+	+	-	-	-	-	-	-
Бактериофаги	φSa1	+	-	+	-	-	+	+	-
	φSa3 (IEC)	+ (тип D: <i>scn, sak, sea</i>)	+ (тип D: <i>scn, sak, sea</i>)	+ (тип D: <i>scn, sak, sea</i>)	+ (тип D: <i>scn, sak, sea</i>)	+ (тип D: <i>scn, sak, sea</i>)	+ (тип E: <i>scn, sak</i>)	+ (тип B: <i>scn, sak, chp</i>)	+ (тип D: <i>scn, sak, sea</i>)
	φSa5	-	-	+	-	-	+	-	+
	φSa7	-	+	-	-	-	-	+	-
	φSa7-like (W) ^b	-	-	-	-	-	+	-	-
	φSPβ-like	+ (<i>sasX</i>)	+ (<i>sasX</i>)	+ (<i>sasX</i>)	-	-	-	-	-
Острова патогенности	SaPI1	+ (<i>sek, seq</i>)	+ (<i>sek, seq</i>)	+ (<i>sek, seq</i>)	+ (<i>sek, seq</i>)	+ (<i>sek, seq</i>)	+ (<i>sek, seq</i>)	+	+ (<i>sek, seq</i>)
	SaPI2	-	-	-	+	-	+ (<i>tst</i>) ^c	-	-
	SaPI (<i>fhuD</i>)	-	-	-	+	-	+	-	-
Уровень экспрессии <i>rsta</i>		HO ^d	HO ^d	HO ^d	HO ^d	-	+	HO ^d	HO ^d
Адгезин	<i>сна</i> ^e	+ (B1 [187aa])	+ (B1 [187aa])	+ (B1 [82aa])	+ (B1 [187aa])	+ (B1 [187aa])	+ (B1 [187aa])	+ (B1 [187aa])	+ (B1 [187aa])
Транспозоны	Tn5801-like	+	+	+	+	+	+	+	+
	Tn4001	+	+	+	-	+	+	+	+
	Tn554	+	+	+	+	+	+	+	+
	Tn552	+	+	-	+	+	+	+	+
Геномный остров	<i>vSAα</i>	+	+	+	+	+	+	+	+
	<i>vSAβ</i>	+	+	+	+	+	+	+	+
Плазмиды	pSK41	-	-	-	-	-	+(4 kb)	-	+(4 kb)
интегрированные в хромосому	pSK1-like	-	-	-	-	-	-	-	+(28 kb)
IS элементы	IS256	8	8	4	21	ND ^d	22	15	17
Механизм лекарственной устойчивости	Левлофлоксацин	<i>gyrA</i> Ser84Leu <i>gyrA</i> Ser80phe	Ser84Leu, Ser80phe	Ser84Leu [truncated] Ser80phe, Glu84 Lys His481Asn	Ser84Leu Ser80phe	Glu88Lys Ser80phe	Ser84Leu Ser80phe	Ser84Leu Ser80phe	Ser84Leu Ser80phe
	Рифампицин	<i>rpoB</i>	His481Asn	His481Asn	Leu466Ser, His481Asn	Leu466Ser, His481Asn	His481Asn, Ile527Met	His481Asn	-
Автономные плазмиды	Пенициллиназы	+(29.6 kb)	-	-	-	-	-	-	-
	Резистентности к хлорамфениколу	-	-	-	-	+(2.9 т.п.н.)	+(2.9 т.п.н.)	+(2.9 т.п.н.)	-

Примечание: ^a - III.1.1.new-a и III.1.1.new-b, III.1.1 варианты структуры SCCmecIII с новыми участками J3 (Рисунок 37); ^b - в этом исследовании обнаружен фаг; ^c - SaPI2R, первый *tst* + SaPI2 в линии штаммов ST239, распространенных в мире; ^d - HO - не описано; ^e - B1, количество повторов B; ^f - *blaZ* + трансмиссивная плазмида

5.1.3 Структура профага ϕ Sa7-like W в составе генома штамма OC3 ST239_{Kras}

В составе генома штамма OC3 имеется профаг ϕ Sa7-like W, размером 42359 п.н., который вставлен в ген *huNaDC-1*. Как показано на Рисунке 40 нуклеотидная последовательность гена интегразы у штамма OC3 имела высокую гомологию (практически 100 %) с геном интегразы профага 7 (ϕ Sa7) у штаммов NM2 Newman, штамма ST8 (номера доступа в GenBank, AP009351.1 и CP007499.1 соответственно), штамма ST30 (номер доступа в GenBank, LN626917.1), штамма ST133 (номер доступа в GenBank, CP001996.1) и штаммов ST239 (номера доступа в GenBank, CP005288.1, CP006838.1, CP009681.1). Данный факт указывает на то, что фаг ϕ Sa7-подобный (W) является членом семейства бактериофагов ϕ Sa7. Профаг ϕ Sa7-подобный (W) имел последовательность *att* на левом конце, длиной 9 п.н., как и у фага ϕ Sa7. Однако правая часть фага ϕ Sa7-подобного (W) была отличающаяся, а именно на правой стороне не было последовательности *att*, которая была у фага ϕ Sa7 (Рисунок 40). Кроме того, сайт вставки (в ген *huNaDC-1*) фага ϕ Sa7-подобного (W) был отличающимся от сайта вставки фага ϕ Sa7. У фага ϕ Sa7 сайт вставки - межцистронная область между генами *isdB* и *rpmF* (Рисунок 40, в нижней правой части).

По результатам анализа последовательностей установили, что фаг ϕ Sa7-подобный (W) имел общую гомологию с профагом ϕ Sa7 контрольного штамма NM2 всего лишь на 66 %.

Таким образом, установили уникальность структуры фага ϕ Sa7-подобного (W) штамма OC3 ST239_{Kras}.

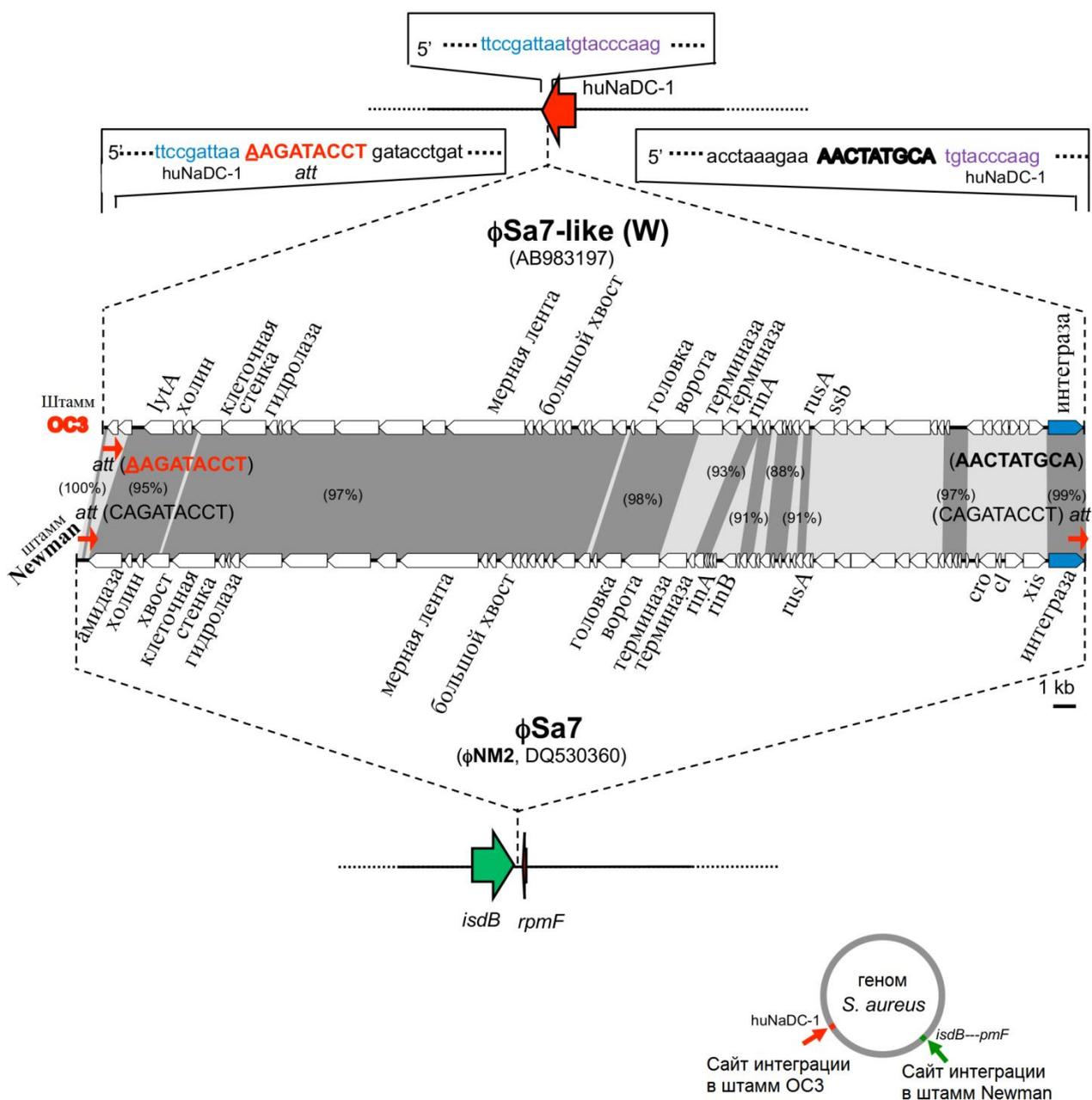


Рисунок 40 - Структура фага φSa7- like W штамма OC3 ST239_{Крас}

Примечание: Для выявления фаговой структуры профаг φSa7-подобный (W) сравнивали с профагом φSa7 штамма Newman. По результатам сравнения гомологичные участки выделены цветом. Фигура в нижней правой части рисунка указывает сайт интеграции фага в геномах обоих штаммов *S. aureus*. Целевая последовательность гена *huNaDC-1* φSa7-подобного (W), показана в верхней части рисунка (выделена синим и фиолетовым цветами), которая также присутствовала в гене *huNaDC-1* у других штаммов *S. aureus*

5.1.4 Структура острова патогенности SaPI2R, имеющего ген *tst* у штамма OC3 ST239_{Kras}

Остров патогенности SaPI2R, входящий в состав генома штамма OC3 ST239_{Kras}, имел размер 14819 п.н. и был фланкирован повторяющимися *att* последовательностями (*attL* и *attR*), протяженностью 20 п.н., и был вставлен в ген *groEL* (Рисунок 41 А). Остров патогенности SaPI2R показал высокую гомологию (91 %) с участком, не имеющим гена *tst* острова патогенности SaPI2 штамма *S. aureus* ATCC25923. Левая боковая часть *tst* + области острова SaPI2R протяженностью 6810 п.н. показала высокую гомологию (99 %) при сравнении с *tst* + островом SaPI2 штамма RN3984 (Рисунок 41 В). Хотя структура SaPI2R была схожа со структурой *tst*- SaPI2 штамма ATCC25923, структура SaPI2R заметно отличалась от других *tst* + островов SaPI (Рисунок 41 С). При сравнении последовательностей генов *tst* (Рисунок 41 D-a) было обнаружено семь кластеров: кластер *tst*, выявленный в России (штамм OC3), Великобритании, США, Южной Кореи и Аргентины; кластер *tst* в США (штамм RN3984); кластер *tst* в США (штамм pRN6101); кластер *tst* в США (штамм pRN6100), в Японии (ST5/SCCmecII HA-MRSA, NY/J-клон и ST8/SCCmecIV CA-MRSA, ST8 CA-MRSA/J клон), в Кении (штамм выделен от верблюда); три варианта *tst*-кластера из Ирландии, Швейцарии и Франции (штаммы выделены от быка и овцы). При анализе выявленной аминокислотной последовательности выявили схожие результаты (Рисунок 41 D-b). Российские штаммы (OC3) и британские штаммы, продуцирующие TSST-1, имели одну и ту же аминокислотную последовательность с одинаковой аминокислотной заменой в области сигнального пептида (S-11L; S→L в положении -11) по сравнению с очищенным белком TSST-1 штамма MN8 и белком TSST-1 штамма pRN6100, выделенного в США (впервые выявленный *tst*+ штамм) (Рисунок 41 E).

У штаммов MRSA, изолированных из клинических образцов в аминокислотной последовательности токсина TSST-1, закодированного в гене *tst*, не обнаружили аминокислотных замен или такие замены были очень редкими, в отличие от аминокислотной последовательности токсина TSST-1, продуцируемого изолятами животного происхождения (Рисунок 41 Е).

На Рисунке 41 в части А показаны последовательности *att* SaPI2R штамма OC3 ST239_{Kras}. На Рисунке 41 в части В структура SaPI2R сравнивали структуру *tst*-SaPI штамма ATCC25923 со структурой *tst* + SaPI2 штамма RN3984. Гомологичные области между структурами SaPI выделены цветом. Обозначены гены: *tst* - токсин синдрома токсического шока; *eta* - эксфолиатин А штамма *S. hyicus*; *ter* - ген терминазы; *rep* - ген инициатора репликации; *int* - ген интегразы. На Рисунке 41 в части С были проанализированы нуклеотидные последовательности *tst* + SaPI и *tst*- SaPI штамма ATCC25923 для определения филогенетического разнообразия. На Рисунке 41 в части D-а проанализировали филогенетическое разнообразие нуклеотидных последовательностей генов *tst*; номера доступа в GenBank указаны. На Рисунке 41 в части D-б представлены аминокислотные последовательности продуктов гена *tst* и проанализировано их филогенетическое разнообразие. Страну происхождения каждого изолята обозначали цветом: красный - Россия; желтый - Великобритания; синий - США; темно-красный - Корея; голубой - Аргентина; фиолетовый – Япония. Зеленым цветом выделены изоляты животного происхождения. На Рисунке 41 в частях С и D каждое ответвление в филогенетическом дереве определяется одной заменой вследствие одного нуклеотидного полиморфизма. На Рисунке 41 в частях В и Е представлены репрезентативные последовательности гена *tst* в сравнении с эталонными последовательностями штамма pRN6100. Стрелки указывают положение нуклеотидных изменений в генах *tst* и аминокислотных замен. В части Е Рисунка 41 зеленым цветом выделены стандартные аминокислоты в аминокислотных последовательностях очищенных TSST-1 (например, для

штамма MN8, номер доступа в GenBank EFH95768). Красными буквами обозначены отличающиеся аминокислоты в аминокислотных последовательностях очищенных TSST-1 (например, для штамма pRN6100).

5.1.5 Структура SaPI1, имеющего гены *sek*, *seq* штамма OC3

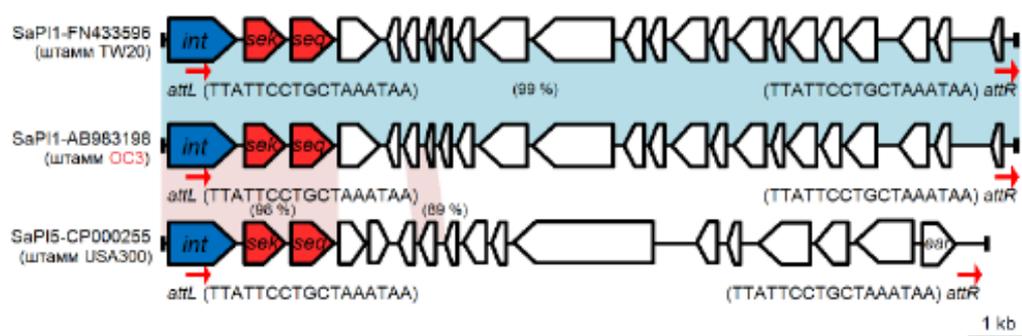
ST239_{Kras}

Остров патогенности SaPI1 штамма OC3 протяженностью 14577 п.н. имеет фланкирующие *att* последовательности, протяженностью 17 п.н., имеет гены *sek* и *seq*, кодирующие синтез суперантигенов (SE) и вставлен в некодируемую область генома. Остров SaPI1 штамма OC3 отличался высокой степенью гомологии (99,9 %) с островом SaPI1 штамма TW20 (Рисунок 42 А). Последовательности аминокислот SEK и SEQ были схожими у штаммов OC3 и TW20 с наличием одиноковой уникальной заменой аминокислот F119L (Рисунок 42 В-а) и двумя уникальными заменами аминокислот D194N и T201A, которые соответствовали двум из семи замен в острове SaPI5 клона USA300 (Рисунок 42 В-б), соответственно.

5.1.6 Структура SaPI, несущего ген *fhuD* штамма OC3 ST239_{Kras}

Остров патогенности SaPI (*fhuD*) размером 15756 п.н. вставлен в некодируемую область, расположенную ниже от гена *SsrA*, определяющего синтез связывающего белка. Выявлено 69 % гомологии острова SaPI (*fhuD*) штамма OC3 ST239_{Kras} и *fhuD* + острова SaPI_{m4} штамма Mu50 клона NY/J. Левая часть острова протяженностью 10,2 т.п.н. была гомологична на 95% с *fhuD*- острова SaPI_{j50} японского клона ST8/SCCmecIV1 CA-MRSA, что указывает на то, что SaPI (*fhuD*) имел новую мозаичную структуру (Рисунок 43).

А структура SaPI



В а SEK

Аминоислота	Сигнальный пептид		Сформировавшийся белок (SEK)				
	1(-23)	23(-1)	24 (1)			242 (219)	
Аминоислотное изменение:	↑↑ (-18) (-19)	↑↑↑↑ (-10) 18 (-8) 16 (-4) 20		↑ (40) 63	↑ (75) 98	↑ (92) 115	↑ (119) 142
COL (<i>sek</i>)	S L	I G S		E	T S	F	
USA300 (<i>sek2</i>)	V I	T S S		V	N P	F	
OC3 (<i>sek</i>)	S L	I G N		E	T S	L	
TW20 (<i>sek</i>)	S L	I G N		E	T S	L	

Красный: несходящиеся аминокислотные остатки

В б SEQ

Аминоислота	Сигнальный пептид		Сформировавшийся белок (SEQ)			
	1(-26)	26(-1)	27 (1)			242 (219)
Аминоислотное изменение:	↑ (-20)	↑↑ (-12) 38 (-15) 41 (-18) 44		↑ (110) 136	↑ (172) 198	↑↑ (194) 220 (201) 227
COL (<i>seq</i>)	I	A E K		K	P	D T
USA300 (<i>seq2</i>)	V	T Q T		E	T	N A
OC3 (<i>seq</i>)	I	A E K		K	P	N A
TW20 (<i>seq</i>)	I	A E K		K	P	N A

Красный: несходящиеся аминокислотные остатки

Рисунок 42 - Анализ структуры SaPI1, несущего гены *sek*, *seq* штамма OC3 ST239_{Kras}

Примечание: В части А рисунка в структуре SaPI1 краснойярского штамма MRSA OC3 выявили наивысшую гомологию с островом патогенности SaPI1 контрольного штамма TW20. SaPI1 штамма OC3 также сравнивали с SaPI5 клона USA300. Гомологичные области между структурами SaPI выделены цветом. В части В представлены аминокислотные последовательности продуктов генов *sek* и *seq* штаммов OC3, TW20 и USA300, которые сравнивали с таковыми контрольного штамма MRSA COL. Стрелки указывают положение аминокислотных изменений. Различия аминокислот в аминокислотных последовательностях штаммов в сравнении со штаммом COL обозначены красными буквами

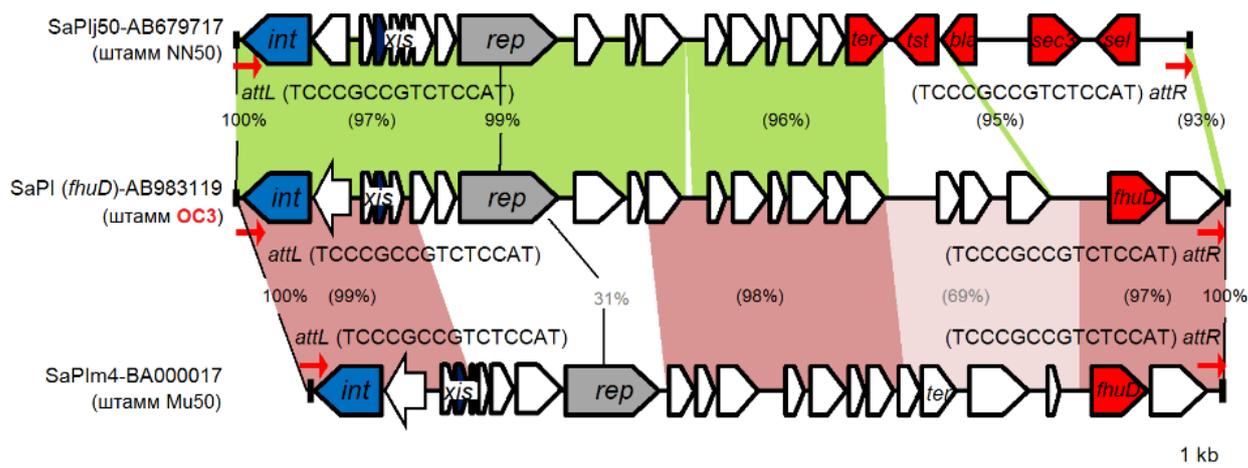


Рисунок 43 - Структура SaPI, несущего ген *fhuD* штамма OC3 ST239_{Kras}

На Рисунке 43 гомологичные области сравниваемых островов патогенности выделены цветом. Гены, входящие в состав острова патогенности SaPI (*fhuD*): ген *int* - кодирует синтез интегразы; ген *xis* - кодирует эксцизионную гидролазу; ген *rep* - кодирует инициатор репликации; ген *ter* - кодирует терминазу; ген *fhuD* - кодирует белок транспортер феррихром ABC.

В структуре острова SaPI, несущего ген *fhuD* штамма OC3 ST239_{Kras}, выявили ограниченную гомологию с любым из островов патогенности SaPI, выявленных ранее у *S. aureus*. Таким образом, штамм OC3 ST239_{Kras} имел новую мозаичную структуру острова SaPI (*fhuD*).

5.1.7 Структура ϕ Sa3 штамма OC3 ST239_{Kras}, несущего гены ускользания от иммунного надзора

Профаг ϕ Sa3 штамма OC3 протяженностью 43681 п.н. имеет участки *att* длиной 13 п.н. на обоих концах и вставлен в ген *hly*. У профага ϕ Sa3 штамма OC3 выявили 76 % гомологию с профагом штамма CN1, имеющим один и тот же тип *att* и тот же сайт интеграции (Рисунок 44). В состав

профага ϕ Sa3 входит кластер генов, кодирующих факторы ускользания от иммунного надзора (IEC) в левой части профага, в том числе ген *sak*, кодирующий стафилокиназу (SAK) и ген *scn*, кодирующий стафилококковый ингибитор комплемента (SCIN), но утрачен ген *chp*, кодирующий белок ингибитор хемотаксиса (CHIPS), который присутствовал в штамме CN1 (Рисунок 44). В области IEC у штамма TW20 и штамма OC8 ST8_{Kras} была выявлена гомологичность на 99,3 %, а в дополнение к генам *sak* и *scn* включен *sea* (Рисунок 44).

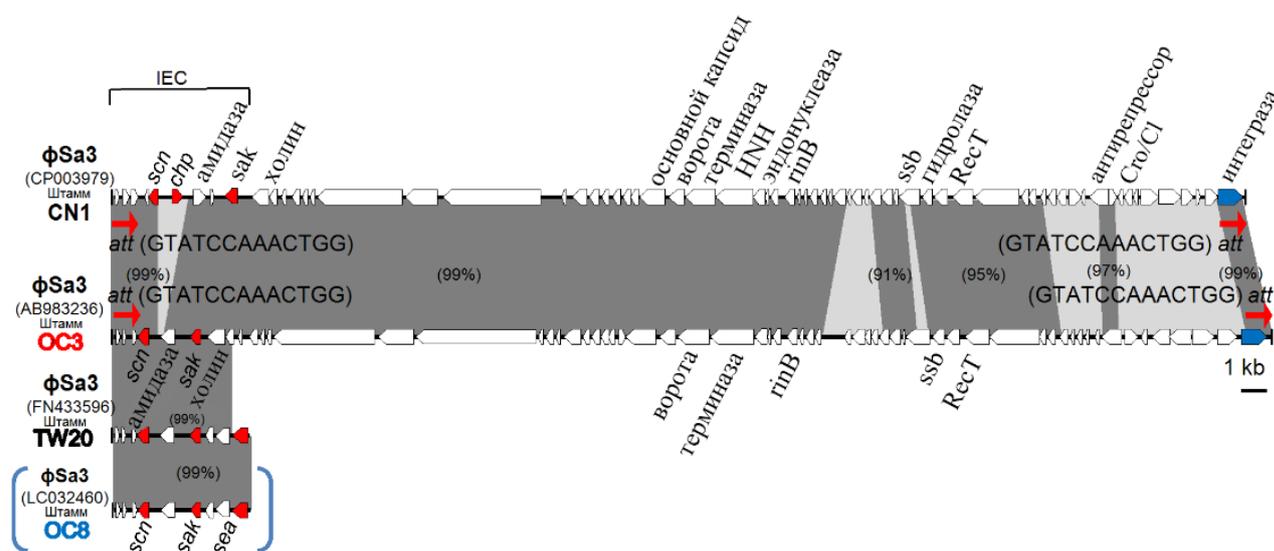


Рисунок 44 - Структура ϕ Sa3 штамма ST239_{Kras} OC3

Бактериофаг ϕ Sa3 штамма OC3 показал наивысшую гомологию с бактериофагом ϕ Sa3 штамма CN1. Левую часть бактериофага штамма ST8_{Kras} OC8, включающую кластер генов ускользания от иммунного надзора (IEC), также сравнили с таковой областью бактериофага ϕ Sa3 штамма TW20. Гомологичные области сравниваемых фагов выделены цветом. Гены, входящие в состав кластера IEC: ген *scn* - кодирует стафилококковый ингибитор комплемента (SCIN); ген *chp* - кодирует белок *S. aureus* (CHIPS), ингибирующий хемотаксис; ген *sak* - кодирует стафилокиназу (SAK); ген *sea* - кодирует синтез стафилококкового энтеротоксина А (ETA). Участок IEC,

несущий гены *scn* и *sak* штамма OC3 (область от *attL* до *sak*), размером 3 411 п.н. на 99 % гомологичен соответствующему участку штамма TW20. Область ПЕС, несущая *scn*, *sak* и *sea* штамма OC8 (область от *attL* до *sea*), размером 6022 п.н. на 99,3 % гомологична соответствующему участку штамма TW20.

5.1.8 Структура бактериофага ϕ Sa5 штамма OC3 ST239_{Kras}

Профаг ϕ Sa5 штамма OC3 размером 44424 п.н., имел повторяющиеся последовательности *att* протяженностью 10 п.н. на обоих концах, вставлен в гипотетический ген, кодирующий белок AGY89988.1, расположенный ниже гена, кодирующего синтез белка семейства ThiJ/PfpI. Профаг ϕ Sa5 штамма OC3 был схож с фагом ϕ Sa5 штамма XN108 с уровнем гомологии 63 % (Рисунок 45). Гомологичные области сравниваемых фагов выделены цветом. Таким образом, профаг ϕ Sa5 штамма OC3 имел новую мозаичную структуру.

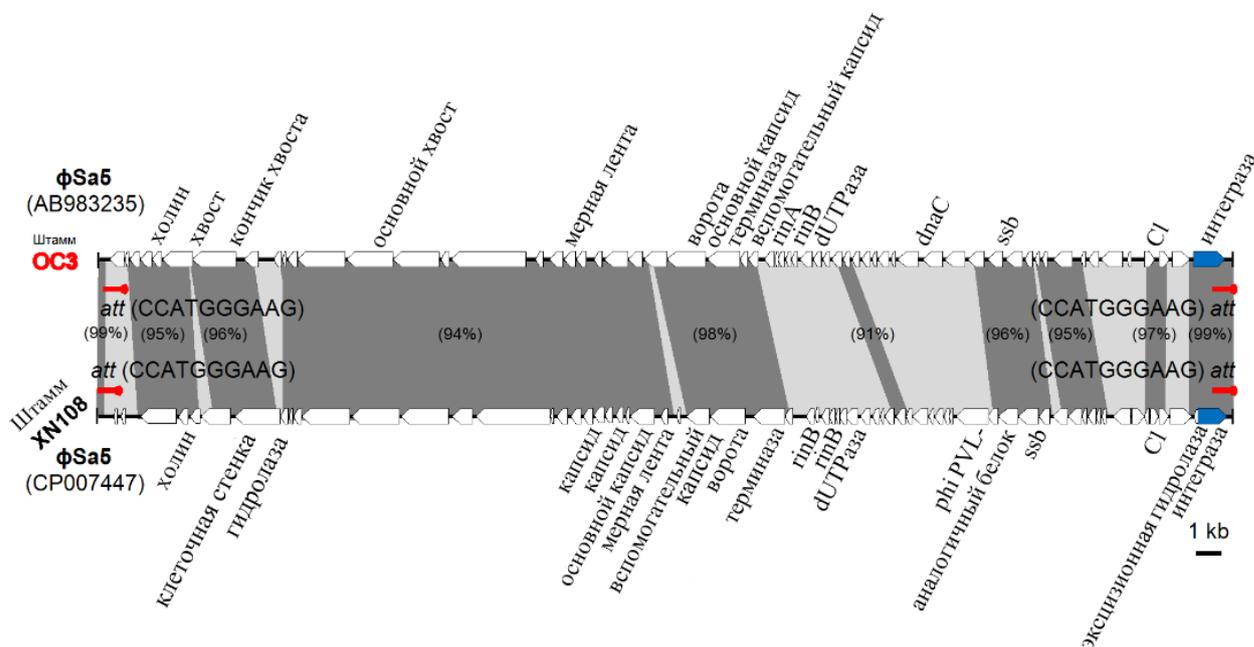


Рисунок 45 - Структура бактериофага ϕ Sa5 штамма OC3 ST239_{Kras}

5.1.9 Другие генетические структуры

Транспозон Tn4001, входящий в состав генома штамма OC3, фланкирован двумя IS256 размером 6483 п.н. и вставлен в некодируемую

область, расположенную ниже гена белка семейства ThiJ/PfpI (Рисунок 36). У штамма TW20 транспозон Tn4001 присутствовал в составе профага φSPβ-подобного.

Генетическая структура pSK41, связанная резистентностью, фланкирована двумя IS431, размером 4039 п.н.; в составе два гена устойчивости к лекарственным средствам *ble* и *aadD* (Рисунок 38). Местоположение генетической структуры pSK41 в геноме в настоящее время остается неизвестным.

5.2 Структура генома штамма MRSA OC8 варианта ST8_{Kras}

5.2.1 Результаты полногеномного анализа штамма MRSA OC8

ST8_{Kras}

Изучен геном штамма OC8 представителя одного из наиболее распространенных в г. Красноярске клона ST8, выделенного в г. Красноярске. Штамм OC8 был выделен из мокроты, забранной при поступлении от мальчика возрастом 1 год, поступившего 10.08.2009 г. в отделение реанимации ГДБ №1 с диагнозом *Внебольничная пневмония*. Фоновое: *эпизод остановки дыхания, сердечной деятельности*. 10.08.2009 г. были проведены реанимационные мероприятия. Дата смерти - 25.09.2009 г. Проведено койко-дней - 44. *Двусторонняя мелкоочаговая серозно-гнойная пневмония. Отек-набухание вещества головного мозга. Выраженные дистрофические и некробиотические изменения паренхиматозных органов*. При посеве аутоптата легкого выделены *E. coli*, *K. planticola*, MRSA. Размер генома штамма MRSA OC8 составил 2897106 п.н., имел уровень гомологии 99,9 % с основным участком генома штамма FPR3757 клона USA300 (номер доступа в GenBank CP000255), но и имел отличающиеся участки генома, включающие фаги, мобильные генетические элементы (Рисунок 46).

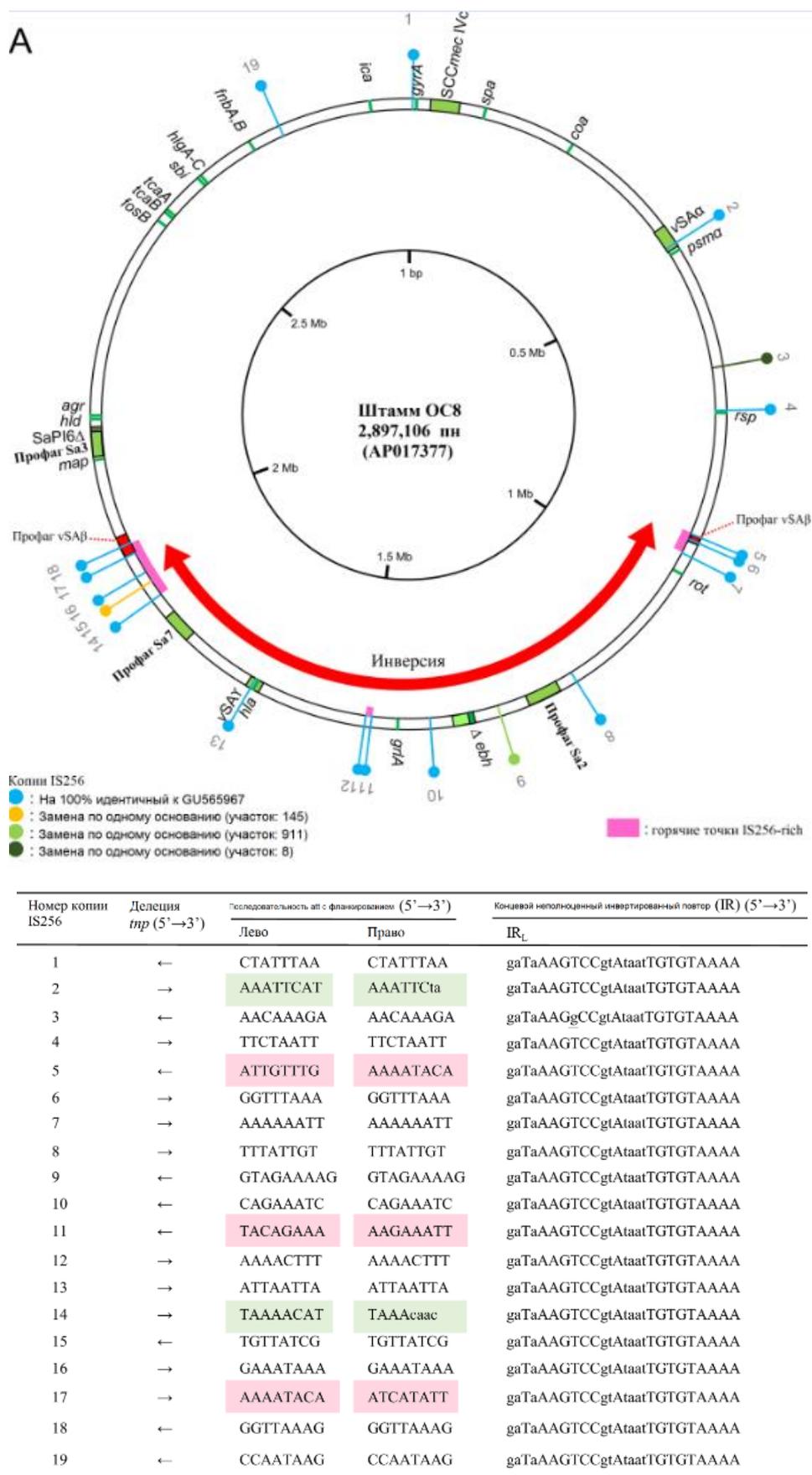


Рисунок 46 - Структура генома штамма OC8 (A) и положение копий IS256 в геноме (B)

На Рисунке 46 в части А представлена информация о геноме штамма OC8 MRSA, включающая следующее: фаги, SaPI, мобильные генетические элементы, в том числе IS256, гены вирулентности, резистентности и инверсию. Гены, представленные на карте генома: *spa* - белок А; *coa* - коагулаза; *psma* - фенолорастворимый модулин; *rsp* - регулятор транскрипции семейства AraC; *rot* - репрессор токсинообразования; *ebh* - внеклеточный матрикс-связывающий белок (гигантский белок); *gri* - ДНК-топоизомераза IV (устойчивость к хинолонам); *hla* - α -гемолизин (Hla); *map* - MAP протеин; *hld* - δ -гемолизин (Hld); *agr* - ген регулятор; *fos* - белок резистентности к фосфомицину; *tca* - мембранный белок резистентности к тейкопланину; *sbi* - IgG-связывающий белок; *hlg* - γ -гемолизин (Hlg); *fnb* - фибронектинсвязывающий белок; *ica* - межклеточный адгезивный белок А (образование биопленки); *gyr* - ДНК-гираза (устойчивость к хинолонам); *scn* - стафилококковый ингибитор комплемента (SCIN), *sak* - стафилокиназа (SAK); *sea* - суперантиген SEA локализован на фаге Sa3; ген *hlb* β -гемолизин (Hlb) разделяет фаг Sa3. В геноме OC8 выявили 19 копий IS256, пронумерованы от ① до ⑲, как показано на рисунке. Обогащенные IS256 участки - горячие точки отмечены розовым цветом. Большая геномная инверсия (MbIN) между IS256⑤ и IS256⑰ у штамма OC3 по сравнению со штаммом FPR3757USA300 (номер доступа в GenBank CP000255) отмечена красной стрелкой. Из-за MbIN геномный остров vSA β , который нес три IS256 (⑥, ⑰ и ⑱), был разделен на две части, расположенные на расстоянии друг от друга. В части В направление инсерционных элементов IS256 показано стрелками. Последовательности сайта *att* имеются с обеих сторон IS256 как прямые повторы (DR); последовательности *att* 19 элементов IS256 были отличающимися друг от друга. Относительно необычные гетерогенные последовательности *att* с левой и правой сторон, выделены красным цветом, а зеленым цветом выделены несовершенные DRs *att*. Терминальные перевернутые повторы IS256 протяженностью 26 п.н. были идентичны для 19

элементов IS256, за исключением IS256^③, который имел одно базовое изменение

Кроме того, штамм OC8 имел плазмиду резистентности к хлорамфениколу, протяженностью 2908 п.н. (pOC8) [289]. Основываясь на структуре полной кольцевой последовательности генома штамма MRSA OC8, была построена круговая карта генома OC8, как показано на Рисунке 46. В структуре генома штамма OC8 представлены фаги, SaPI, геномные острова, инсерционные последовательности (особенно IS256) [240, 332], несущие гены резистентности или мутационные изменения, некоторые гены вирулентности, некоторые регуляторные гены, гены и генетические структуры, используемые при генотипировании (*spr*, *agr*, *coa*, *SCCmec*). Штамм OC8 не имел транспозонов резистентности к антимикробным химиопрепаратам, например у штамма OC8 не было Tn4001 и Tn554 в отличие от штаммов ST239 HA-MRSA, распространенных в России (штаммы OC3 и 16K) [289, 533].

В состав генома штамма OC8 входил фаг φSa2. Размер фага φSa2 штамма OC8 составил 45781 п.н., выявили 86,5 % гомологию с PVL+ фагом φSa2 штамма FPR3757 клона USA300, однако штамм OC8 не имел гена, кодирующего синтез PVL, в отличие от штамма FPR3757. Вторым фагом φSa7 размером 44446 п.н. Данный фаг φSa7 штамма OC8 не имел генов вирулентности. У штамма FPR3757 USA300 нет в геноме φSa7. Третий фаг φSa3 размером 42984 п.н. встроен в ген *hly* (Рисунок 46, А). Как показано на Рисунке 47, фаг φSa3 штамма OC8 в левой части имел кластер генов ускользания от иммунного надзора (IEC), включающий гены *scn* (стафилококковый ингибитор комплемента, SCIN), *sak* (стафилокиназа, SAK), а также ген *sea*, кодирующий синтез суперантигена энтеротоксина SEA. Средняя часть фага φSa3 аналогична фагу штамма TW20 ST239/SCCmecIII HA-MRSA, который был изолирован от пациента с бактериемией, госпитализированного в отделение реанимации и интенсивной

терапии в Лондоне [195, 246]. Уровень гомологии между фSa3 штамма OC8 и фSa3 штамма TW20 составил 89,8 %, сходство нуклеотидных последовательностей генов *scp*, *sak* и *sea* было высоким - 99,4 %, 99,8 % и 100 % соответственно. Кластер IEC фага фSa3 у штамма FPR3757 клона USA300 имел гены *sak*, *chp* (белок *S. aureus*, ингибирующий хемотаксис, CHIPS) и ген *scp*, но не имел ген *sea*. Фаг фSa3 штамма OC8 и фаг фSa3 штамма FPR3757 USA300 в данной части имели гомологию на 81,8 %.

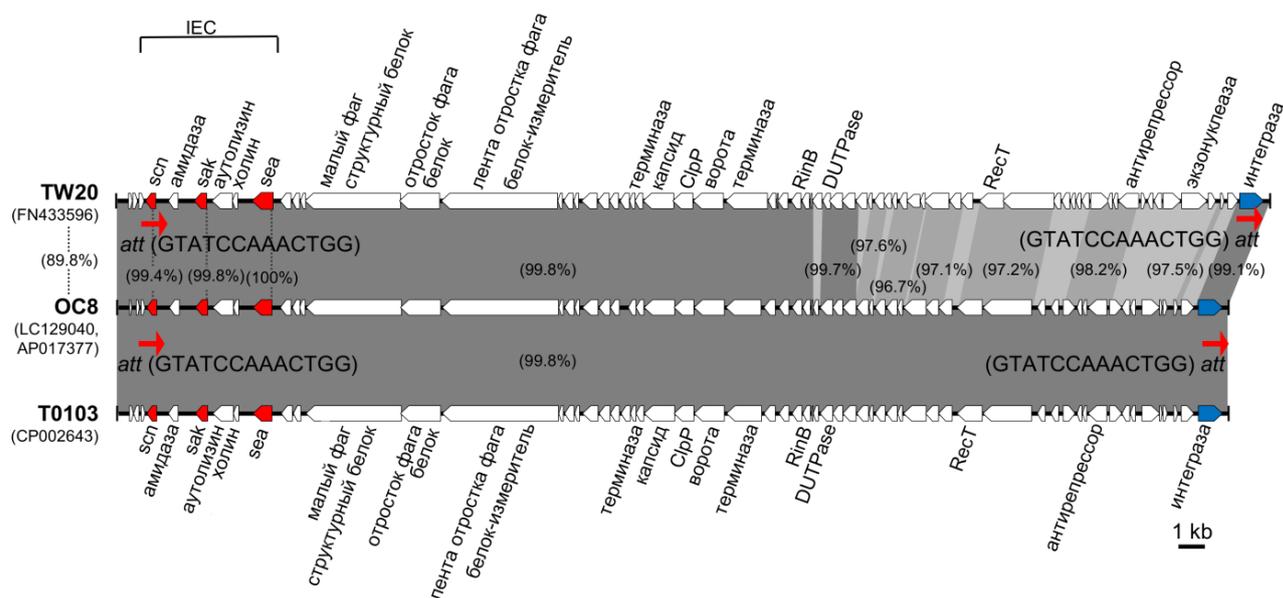


Рисунок 47 - Структура фага фSa3 у штамма OC8

Примечание: гены в составе IEC: *scp* - ген стафилококкового ингибитора комплемента (SCIN); *sak* - ген стафилокиназы (SAK); *sea* - ген стафилококкового энтеротоксина А (ETA)

Также у фага фSa3 штамма OC8 выявили высокий уровень гомологии с фагом фSa3 штамма T0103. Левая часть кластера генов ускользания от иммунного надзора (IEC) фага фSa3 штамма OC8 также демонстрировала высокую гомологию с фSa3 штамма TW20. Гомологичные области сравниваемых фагов выделены цветом. Штамм OC8 не имел ген *chp*,

кодирующий белок *S. aureus*, ингибирующий хемотаксис (CHIPS), в отличие от штамма FPR3757 USA300 (номер доступа в GenBank CP000255).

Из островов патогенности SaPI, в состав генома штамма OC8 входил остров SaPI6Δ, лишенный гена SAg и не было острова SaPI5, несущего гены *sek* и *seq*, который присутствовал у штаммов представителей клона USA300 [485]. Геном штамма OC8 утратил SAg-гены, кодирующие синтез суперантигенов.

В составе генома штамма OC8 выявили 19 копий инсерционных элементов IS256, которые были распределены вдоль всего генома OC8. Их распределение не было случайным, были выявлены три области, обогащенные IS256, отражающие области предпочтительных сайтов рекомбинации IS256 (Рисунок 46 А). Эти области генома, обогащенные IS256, могут служить рекомбинационными горячими точками. Наличие данных областей является отличительным признаком генома штамма OC8 от генома штамма FPR3757 US300, у которого не было выявлено копий IS256 [118].

Выявлена большая геномная инверсия у штамма OC8 в отличие от генома штамма FPR3757 клона US300; это событие было вызвано двумя экземплярами IS256 (⑤ и ⑰), локализованных в горячих точках рекомбинации, как показано на Рисунке 46 А и визуализировано на Рисунке 48. Большая геномная инверсия размером 1042885 п.н. охватила 36,0 % от всего генома штамма OC8, данная примерно одна миллионная инверсия была названа как MbIN.

В дополнение к IS256, в геноме OC8 были выявлены некоторые другие инсерционные элементы: IS431_{mec} и ΔIS1272 в SCC_{mecIVc}; две копии IS1181 (из них один экземпляр имел Δ*tnp*); и три копии семейства IS200, у которых выявили гомологию на 90,2 % в сравнении с ISSep3-подобными. Инсерционный элемент IS256 представлен в большем количестве копий в геноме OC8.

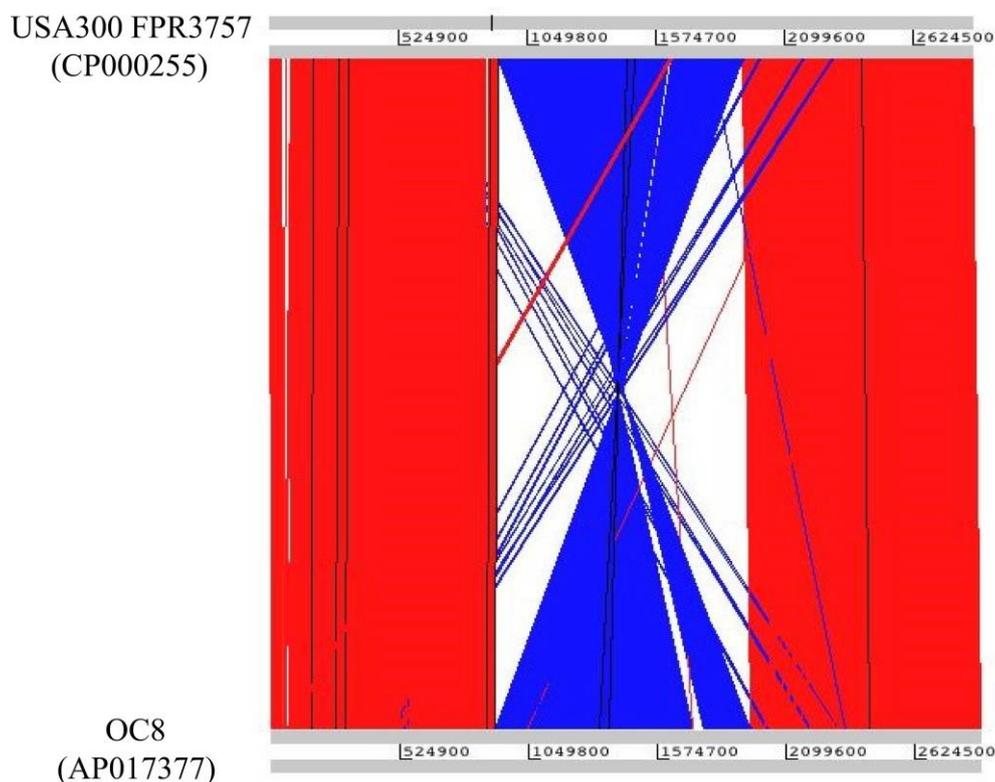


Рисунок 48 - Сравнение последовательностей геномов штаммов OC8 и FPR3757 USA300 с визуализацией большой геномной инверсии

Примечание: Сравнение геномной последовательности проводили с использованием WebACT для визуализации геномных инверсий. Последовательность генома штамма FPR3757 USA300 была получена из GenBank номер доступа CP000255. Перевернутая часть генома штамма OC8 относительно генома штамма FPR3757 USA300 выделена синим цветом

В структуре генома OC8 нет комплекса *ccrC*, который был обнаружен в структуре генома штамма 5C2&5 ST59/SCCmecV CA-MRSA, выделенного в Тайване [241], а также представленного в геноме штаммов линии ST239/SCCmecIII HA-MRSA, циркулирующих на территории России [533].

В составе генома штамма OC8 выявили геномный остров *vSA α* протяженностью 33301 п.н. с вставкой IS256.

Второй геномный остров был *vSA β* , который имел размер 35235 п.н. и имел 99,8 % гомологию с геномным островом *vSA β* штамма FPR3757 USA300. Геномный остров *vSA β* штамма OC8 содержал три инсерционных элемента IS256 (IS256^⑥, IS256^⑰ и IS256^⑱). Кроме того, геномный остров

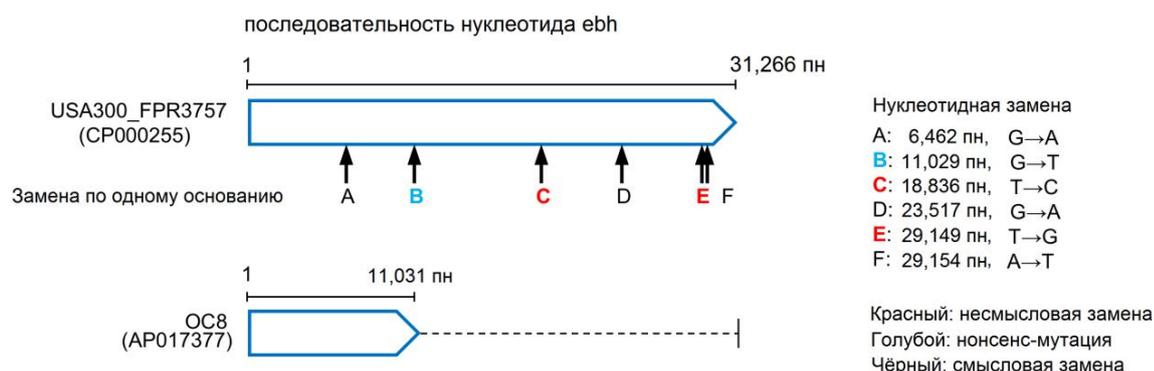
vSA β штамма OC8 был разделен на две части большой геномной инверсией MbIN, локализованной между IS256^⑤ и IS256^⑰ (Рисунок 46 А).

Третий геномный остров vSA γ , размером 21319 п.н. с вставкой IS256.

Гены, кодирующие синтез токсинов в геноме OC8 включали: *psma*, *hla* (в vSA γ), *sea* (в фSa3), *hld* и *hlg*. Ген *hlb* был разделен из-за вставки фSa3. Гены, кодирующие факторы ускользания от иммунного надзора, включенные в карту генома: *cna*, *ebh*, *map*, *scn* и *sak* (в фSa3), *sbi* и *fnbA,B*. Из них ген *ebh*, кодирующий гигантский белок Ebh [148, 306] имел нонсенс-мутацию (G→T в положении 11029 п.н.), в результате которой штамм продуцировал усеченный белок из-за стоп-кодона (TAA). Таким образом, усеченный белок Δ ebh, состоял из 3676 аминокислот, что соответствует 35,3 % от всего продукта гена *ebh*, так как изначально белок Ebh должен состоять из 10421 аминокислот [148], как, например, у штамма FPR3757 USA300 (Рисунок 49). Белок Δ ebh обозначен темно-зеленым цветом на Рисунке 46 А. Нуклеотидную последовательность гена *ebh* и выявленную аминокислотную последовательность Ebh и Δ ebh сравнивали между штаммами FPR3757 USA300 (в верхней части) и OC8 (в нижней части) (Рисунок 49, части А и В). На Рисунке 49 в части А у штамма OC8 в гене *ebh* было выявлено три бессмысловые замены (выделено черным цветом), две миссенс-мутации (выделено красным цветом) и одна нонсенс-мутация (выделено синим цветом). Для подтверждения наличия нонсенс-мутаций разработали два набора праймеров: *ebh1F* и *ebh1R* (5'-GTGTTCAAACGGTTCAATCA и 5'-AATAATCGTTTCAGCAGCAG, продукт 170 п.н.) и *ebh2F* и *ebh2R* (5'-ACTTAGATGGTACGCGTTTA и 5'-AАСТАТТCAСТТGСТСТGСТ, продукт 369 п.н.), основанных на определении последовательности гена *ebh* штамма OC8. В результате проведенной ПЦР с указанными праймерами и ДНК штамма OC8 с последующим секвенированием ПЦР-продукта полностью подтвердили наличие нонсенс-мутации (G→T в положении 11029 п.н.). На рисунке 49 в части В видно, что вследствие нонсенс-мутации *orf* гена *ebh* у

штамма OC8 продукт был сокращен и соответствовал только 35,3 % продукта гена *ebh* штамма FPR3757 USA300. Усеченный вариант белка Ebh штамма OC8 EbhΔ на 100 % гомологичен соответствующей части белка Ebh штамма FPR3757 USA300, но имел несколько отличающихся модулей FIVAR GA трансмембранного домена Ebh [148, 306].

A



B

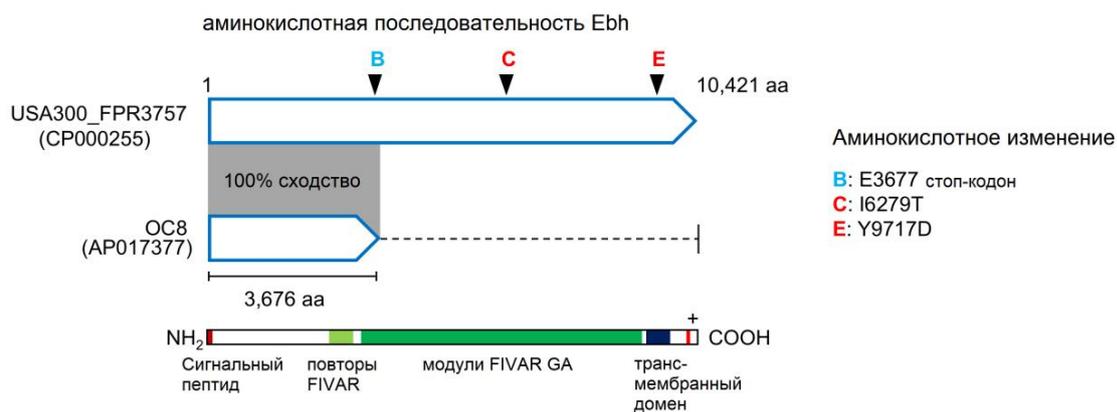


Рисунок 49 - Сравнение структуры гена *ebh* и его продукта между штаммами OC8 и FPR3757 USA300

Инсерционные элементы IS256 влияют на экспрессию и регуляцию генов, элемент IS256④ был вставлен в участок генома на 521 п.н. выше гена *rsp* (ген регулятор транскрипции семейства AgaC). Не было выявлено вставок IS256 в кластер генов *ica*, связанных с биопленкообразованием (оперон *ica*), в гене *rot* (ген репрессор токсинообразования) или в их промоторных областях. По литературным данным, наличие вставок IS256 в этих генах или их промоторных областях способствует регуляции образования факторов

вирулентности [118]. Положение гена *rot* в геноме штамма OC8 отличалось от положения гена в геноме штамма FPR3757 USA300 из-за наличия протяженной инверсии MbIN у штамма OC8 (Рисунок 46 А).

В результате секвенирования генома штамма OC8 установили, что резистентность к левофлоксацину обусловлена мутациями в гене *gyrA* (Ser84Leu) и гене *grlA* (Ser80Phe). Также в геноме штамма OC8 имеется ген *fosB*, кодирующий синтез фермента, дезактивирующего фосфомицин [484]; однако у штамма OC8 МПК фосфомицина составляла 1,0 мкг / мл. Не выявили наличие вставок IS256 в генах *tcaA,B* (гены, связанные с резистентностью к гликопептидам), инактивация которых приводила к появлению фенотипа устойчивости к гликопептиду [127, 342].

5.2.2 Положение нескольких копий IS256 в геноме штамма OC8

Инсерционный элемент IS256 имел инвертированные повторы IR протяженностью 26 п.н. и фланкирован прямыми повторами (DR) *att* длиной 8 или 9 п.н. [240, 332]. Проанализировали последовательности всех 19 копий IS256, входящих в состав генома штамма OC8; данные суммированы на Рисунке 46 А, В. Все копии IS256 имеют либо одинаковые или сходные последовательности; 16 из 19 копий IS256 были одинаковыми, а три копии IS256 отличались, имели по одному нуклеотидному замещению (Рисунок 46 В). В инвертированных повторах IR -последовательностей протяженностью 26 п.н. у варианта IS256^③ выявили одно базовое изменение (Рисунок 46 В). Фланкирующие последовательности сайта *att* у 19 копий IS256 в геноме штамма OC8 были протяженностью 8 или 9 п.н. и показаны на Рисунке 46 В. Данные фланкирующие последовательности *att* были отличающиеся друг от друга и, как правило, обогащенными АТ. Расположение сайтов *att* в левой и правой частях (*attL* и *attR*) у 14 из 19 копий IS256 (73,7 %) было одинаковым и непосредственно ориентированным как прямые повторы. Такие *att*-последовательности также присутствовали в соответствующей позиции в

геноме штамма FPR3757 USA300. Однако у двух копий IS256 (② и ⑭) (10,5 %) *attL* и *attR* были несовершенными повторами, и хотя последовательность *attL* была такой же как в геноме штамма FPR3757 USA300, но позиция *attR* у штамма OC8 была отличающейся от штамма FPR3757 USA300. У остальных трех копий IS256 (⑤, ⑪ и ⑰) (15,8 %) *attL* и *attR* были гетерогенными; однако *attL* и *attR* присутствовали в качестве сайтов в соответствующем положении у штамма FPR3757 USA300. Последние три копии IS256⑤, ⑪ и ⑰ в геноме штамма OC8 находились в горячих точках, богатых IS256 элементами (Рисунок 46 А). Девять из 19 копий IS256 (47,4 %) были вставлены с противоположной ориентацией, как показано, например, для IS256⑤ по сравнению с IS256⑰ (Рисунок 46 В).

В геноме штамма OC8 нет Tn4001, в состав которого включены две терминальные копии IS256 [337]. Наследование штаммами *S. aureus* инсерционных элементов IS256 возможно за счет включения внехромосомных замкнутых молекул с IS256 [240, 332]. Такая внехромосомная кольцевая ДНК с IS256 присутствовала в геноме штамма OC8 (Рисунок 50 А, В). Место соединения IS256 в кольцевой ДНК у штамма OC8 содержало терминальные концы IS256, включая несовершенные IR_L и IR_R, и дополнительные нуклеотидные протяженности длиной 6 п.н. Однако последовательность длиной 6 п.н. определялась как смесь различных протяженностей, что указывало на наличие гетерогенных круговых молекул IS256 в геноме OC8, каждый из которых имел последовательности длиной 6 п.н. (Рисунок 50 С).

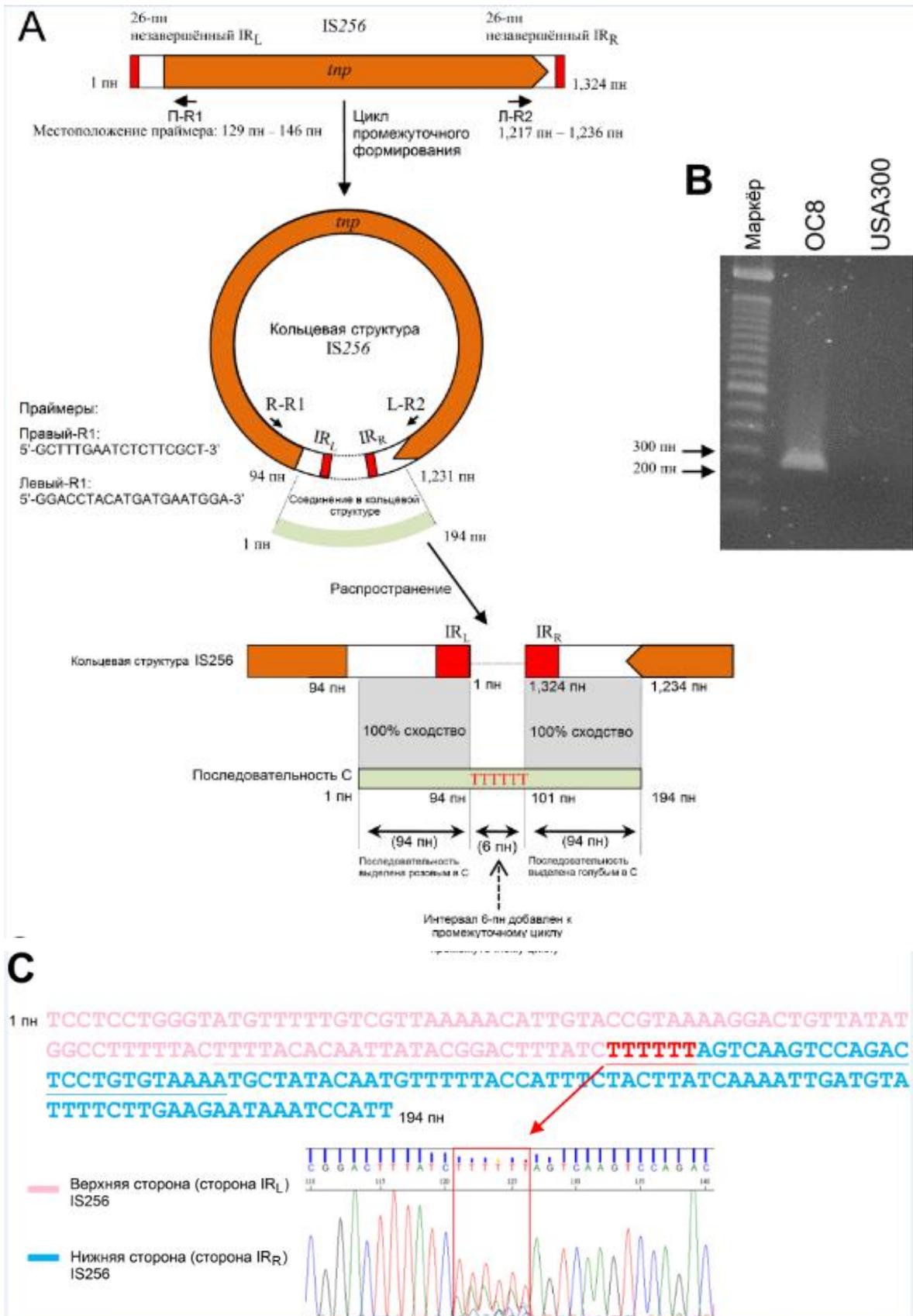


Рисунок 50 - Структура IS256 и его внехромосомной кольцевой ДНК у штамма OC8

На Рисунке 50 в части А представлена структура IS256 штамма OC8 по результатам секвенирования генома (номер доступа в GenBank AP017377). Структура была очень похожа на ранее описанные структуры IS256. ПЦР-праймеры для обнаружения кольцевой ДНК IS256 были сконструированы на основе последовательности генома OC8. На Рисунке 50 в части В представлены результаты ПЦР с выбранными праймерами (R-R1 и L-R2, показанный в части А), которые позволили обнаружить кольцевую ДНК IS256 у штамма OC8 (размер ПЦР-продукта около 200 п.н.), в то время как у штамма USA300-0114 не было обнаружено положительного результата, что свидетельствовало об отсутствии у этого штамма IS256. На Рисунке 50 в части С и В представлена нуклеотидная последовательность ПЦР-продукта, длиной 194 п.н., имеющая боковые области IR_L и IR_R у IS256 (OC8) и содержащая 6 п.н. протяженности, отмеченную красным. Несовершенные повторы, длиной 26 п.н. и последовательности протяженностью 6 п.н. были подчеркнуты на Рисунке в части С. Однако данные протяженности 6 п.н. были «смешанными», причем последовательности TTTTTT являлись основными (чуть меньше было последовательностей AAAAAA). Так как протяженности, длиной 6 п.н. происходят из фланкирующих последовательностей *att* [48], а у штамма OC8 в геноме 19 экземпляров IS256 с четкими последовательностями *att*, «смешанные» протяженности, длиной 6 п.н. отражают присутствие гетерогенной циклической ДНК (участок тандемных повторов) в геноме OC8. Это наблюдение согласуется с AT-насыщенными последовательностями последовательностей 19 экземпляров IS256 генома.

5.2.3 Геномные инверсии и делеции, связанные с IS256

Возможная модель большой геномной инверсии штамма OC8, связанная с двумя копиями IS256 ((5) и (17)), показана на Рисунке 51. Данный процесс включает два основных этапа: делеция между DR

последовательностями IS256 и инверсия между двумя IR последовательностями IS256.

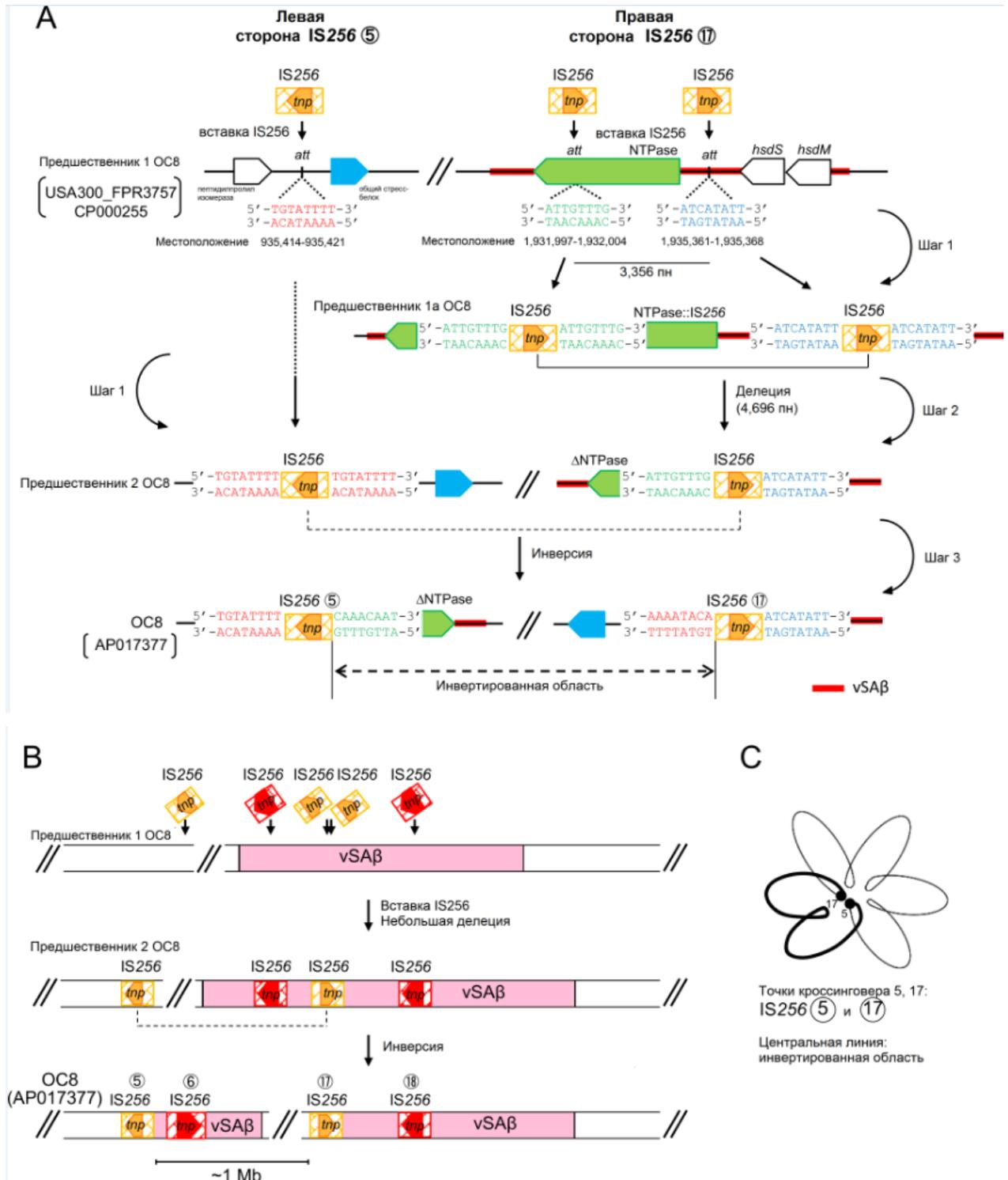


Рисунок 51 - Возможные механизмы большой геномной инверсии в геноме штамма OC8

В левой части Рисунка 51 А единичный элемент IS256 локализован в участке *att* (5'-TGТАТТТТ) предшественника 1 штамма ОС8, что было ранее описано у штамма FPR3757 клона USA300. Инсерционный элемент IS256 фланкирован DR последовательностями *att* (предшественник 2 штамма ОС8).

В правой части Рисунка 51 у предшественника 1 штамма ОС8 два инсерционных элемента IS256, возможно, встроились между двумя сайтами *att* (5'-АТТГТТТГ и 5'-АТСАТАТТ), которые также были представлены у штамма FPR3757 клона USA300, и каждый фланкирован *att* DR последовательностями, как показано у предшественника 1а ОС8.

На модели на Рисунке 51 в части А показано возможное происхождение одно миллионной геномной инверсии (MbIN) у штамма ОС8 и одновременной делеции. Первоначальный вариант штамма (Предшественник ОС8 1) не имел IS256, но имел последовательности сайтов *att*, аналогичные штамму FPR3757 USA300 (номер доступа в GenBank CP000255); размер ДНК-предшественника ОС8 1, фланкированный двумя сайтами *att* оценивался примерно в 3356 п.н. (в правой стороне Рисунка 51). Первый шаг (шаг 1) включает три вставки IS256 на разных сайтах *att*. Как показано в правой стороне Рисунка 51 после прямых повторов IS256 (у предшественника ОС8 1а) происходит гомогенная рекомбинация (этап 2), удаление небольшой области и оставление только одной копии IS256 (Предшественник ОС8 2). На 3 этапе происходит последовательная гомологичная рекомбинация между инвертированными повторами IS256 (на предшественнике ОС8 2), причем область, длиной 1 млн.п.н. перевернута и образуется вариант ОС8. Гены НТФазы *hsdS* и *hsdM* (в верхней правой части) были расположены на геномном острове *vSAβ* (отмечено красной линией). На Рисунке 51 в части В представлено событие раскола геномного острова *vsAβ*, которое произошло одновременно с инвертированием MbIN. Структуры предшественника ОС8 1, предшественника 2 ОС8 и штамма ОС8 такие же, как описанные на Рисунке 51 в части А. На Рисунке 51 в части С проиллюстрирована гипотетическая складчатая структура хромосомы с

областями цикличности, основанная на литературных данных [460], необходимая для усиления образования хиазм и последующего события инверсии MbIN на двух геномных местоположениях, которые локализованы далеко друг от друга.

Это могло быть выполнено как гомологичная рекомбинация между двумя инсерционными элементами IS256. В результате элементы IS256 фланкированы гетерогенными *att* последовательностями (5'-ATTGTTTG и 5'-ATCATATT) с делецией протяженностью 4696 п.н. (3356 п.н. ДНК предшественника 1 OC8, 1324 п.н. элемент IS256, 16 п.н. левая и правая *att* последовательности), как показано у предшественника 2 OC8 (Рисунок 51).

Гомологичная рекомбинация, возможно, произошла между двумя элементами IS256, в результате у штамма OC8 имеется две копии элемента IS256 в положении ⑤ и ⑰, что привело к инверсии участка генома протяженностью 1042885 п.н. (Рисунок 51). На Рисунке 51 в части С представлена модель кроссинговера между двумя элементами IS256 в положении ⑤ и ⑰ у штамма OC8, которые локализованы на дистанции примерно 1 млн.п.н. [460]. Элементы IS256⑪ с гетерогенными *attL* и *attR* локализованы как горячие рекомбинационные точки (Рисунок 46 А, В), возможно в результате гомологичной рекомбинации между двумя элементами IS256 у предшественника штамма OC8 и делеции участка протяженностью 1403 п.н. (63 п.н. участок ДНК предшественника 1 OC8, 1324 п.н. IS256, 16 п.н. левая и правая *att* последовательности) (Рисунок 52).

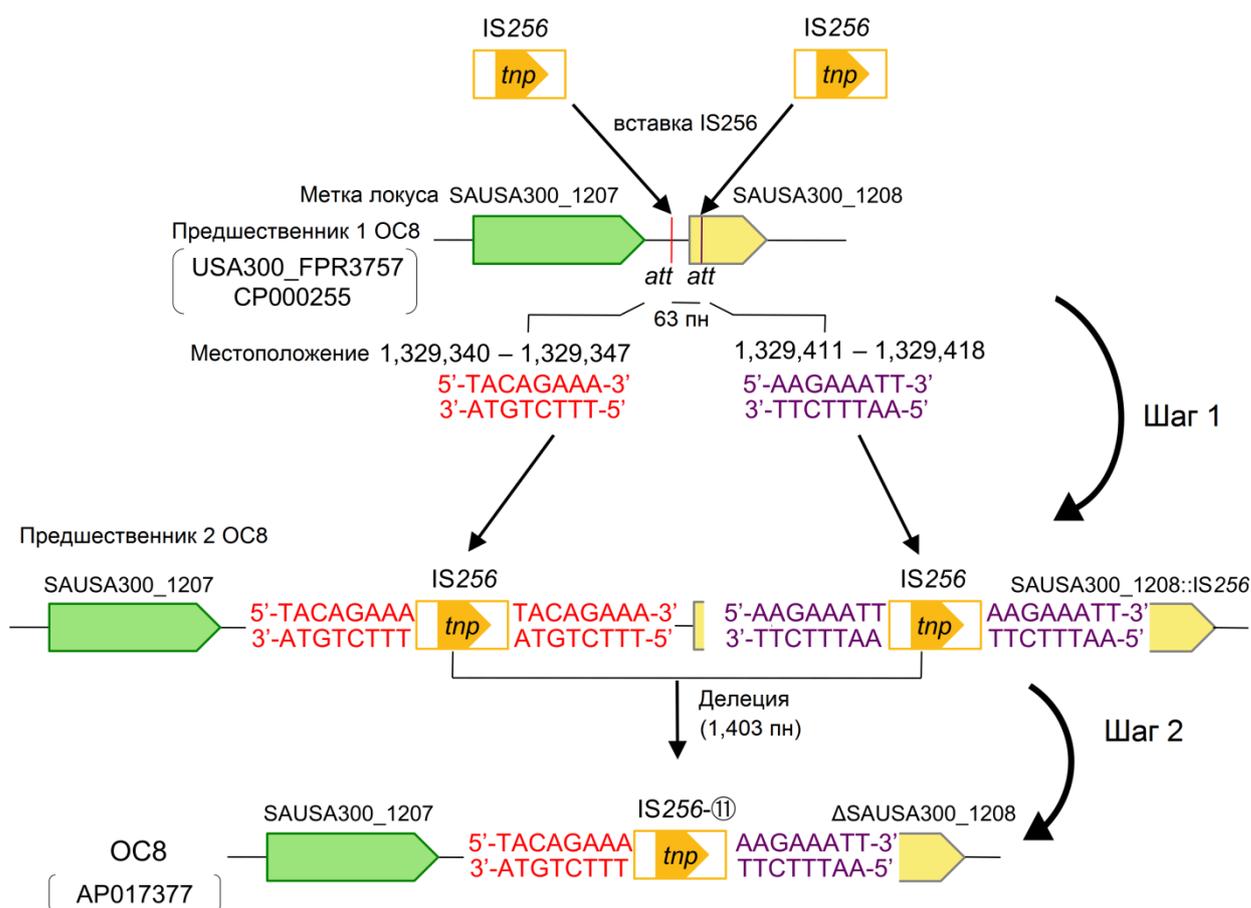


Рисунок 52 - Возможный механизм делеции в IS256[Ⓜ] у штамма OC8

Примечание: Предшественники штамма OC8 имели делеции. Первоначальный предшественник 1 штамма OC8 не имел IS256, но имел последовательности сайтов *att*, аналогичные штамму FPR3757 USA300; размер участка ДНК-предшественника OC8 1 - 63 п.н., фланкированный двумя сайтами *att*. Первый шаг включает в себя две вставки IS256 на разных сайтах *att* (предшественник 2 штамма OC8). На этапе 2 происходит гомологичная рекомбинация между прямыми повторами IS256 (у предшественника 2 штамма OC8) с делецией небольшой области и оставлением только одной копии IS256 (генерирование OC8 с IS256[Ⓜ])

5.2.4 Детекция и определение положения MbIN у штамма OC8

В геноме штамма OC8 имелись характерные области соединения MbIN. Для того чтобы обнаружить области левого и правого соединения с помощью ПЦР, были сконструированы праймеры на основе изучения полной последовательности генома штамма OC8 (Рисунок 53, А-С и В-Д соответственно).

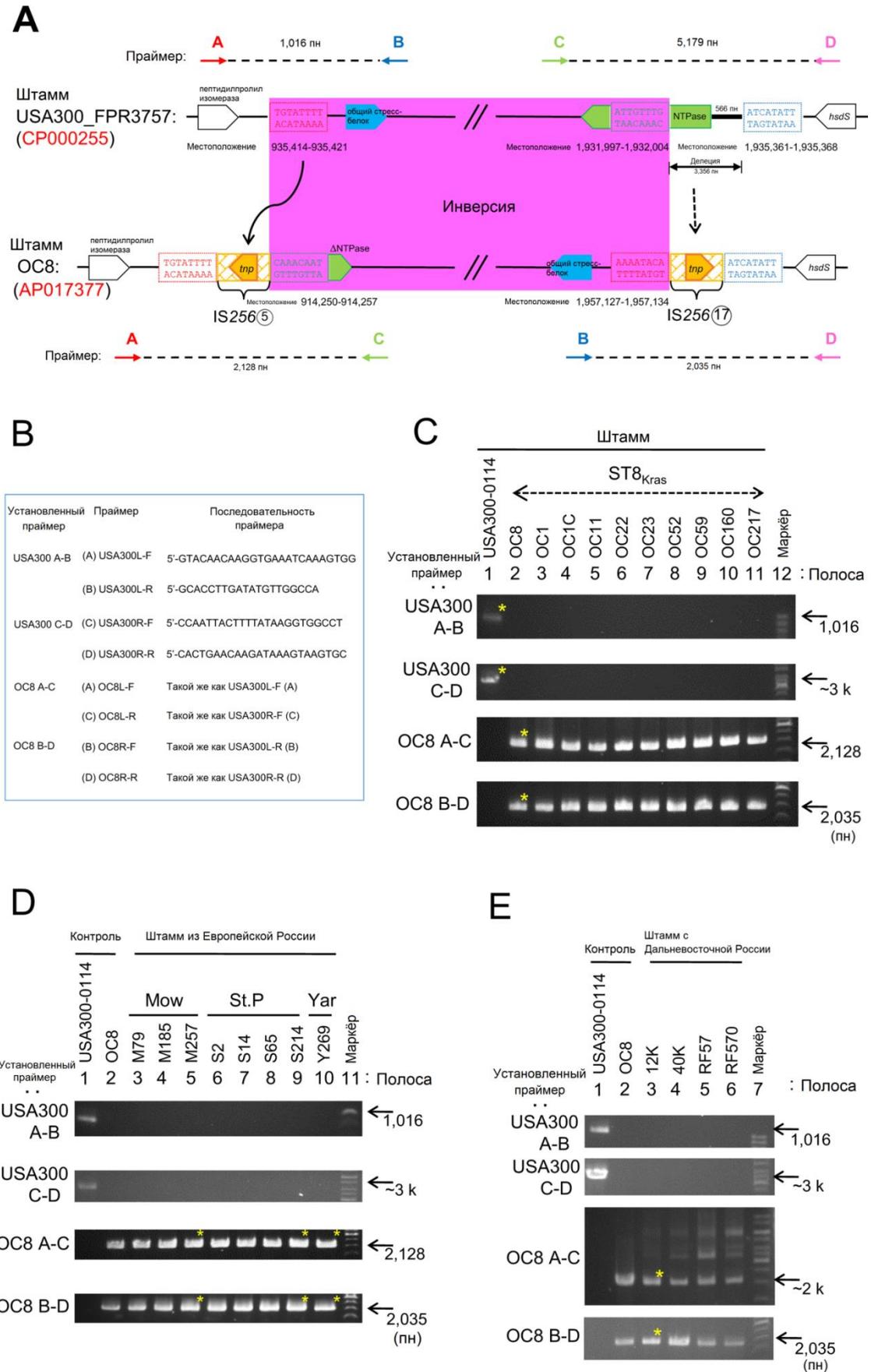


Рисунок 53 – Результаты ПЦР, необходимой для подтверждения наличия большой геномной инверсии (MbIN) у штамма OC8

На Рисунке 53 в частях А и В представлены праймеры для ПЦР, направленные на выявление участков соединения протяженной инверсии MbIN у штамма OC8 (А-С и В-Д) и те, которые нацелены на соответствующую область у штамма FPR3757 USA300 (А-В и С-Д). Праймеры были сконструированы на основе изучения полной нуклеотидной последовательности геномов штамма OC8 и штамма FPR3757USA300, соответственно. Показаны структуры участков перехода MbIN в геноме штамма OC8 и соответствующие области в геноме штамма FPR3757 USA300. На Рисунке в частях С-Е показаны результаты ПЦР, при этом отмечены звездочкой те ПЦР-продукты, которые были секвенированы; выявленные последовательности соответствовали последовательностям геномов штаммов OC8 и FPR3757 USA300. Штамм OC8 ST8_{Kras} MRSA (ST8/SCCmecIVc) изолирован в г. Красноярске. Географическое происхождение других штаммов MRSA, изолированных в Европейской части России: Mow – г. Москва; St.P – г. Санкт-Петербург; Yar – г. Ярославль. Штаммы MRSA, изолированные из Дальневосточной части России, были изолированы в г. Владивостоке.

Чтобы обнаружить соответствующую некодируемую область у штамма FPR3757 клона USA300, разработали праймеры (Рисунок 53, А-В и С-Д соответственно) для ПЦР на основе полной последовательности генома штамма FPR3757 USA300 (Рисунок 53 А и В). В результате ПЦР с наборами праймеров (А-В) и (С-Д) получили положительные результаты у штамма USA300-0114, как и ожидалось (Рисунок 53 С). Последовательности ПЦР-продуктов были сопоставимы со штаммом FPR3757 USA300. В результате ПЦР с наборами праймеров (А-В и С-Д) получили отрицательные результаты у штамма OC8, как и ожидалось (Рисунок 53 С). В результате ПЦР с наборами праймеров (А-С) и (В-Д) получили положительные результаты для предсказанных последовательностей у штамма OC8 и отрицательные результаты у штамма USA300-0114 (Рисунок 53 С). Затем исследовали штаммы ST8/SCCmecIVc из Европейского, Сибирского и Дальневосточного

регионов России (Рисунок 53, С-Е). В результате ПЦР с наборами праймеров (А-С) и (В-Д) получили положительные результаты для предсказанных последовательностей у всех исследованных штаммов, изолированных на территории России. В результате ПЦР с наборами праймеров (А-В) и (С-Д) получили отрицательные результаты у всех исследованных штаммов, изолированных на территории России. Эти результаты убедительно доказали, что все штаммы ST8/SCCmecIVc из Европейского, Сибирского и Дальневосточного регионов России имеют большую геномную инверсию MbIN, что указывает на их общее происхождение в процессе эволюции.

5.2.5 Выявление протяженной инверсии MbIN, особенностей элементов IS256 среди штаммов одной из распространенных в России линий ST239 HA-MRSA

Штаммы одной из распространенных в России линий ST239 HA-MRSA были также исследованы на предмет наличия протяженной инверсии MbIN, элементов IS256 и кольцевой ДНК с помощью ПЦР. По результатам ПЦР не выявили наличие протяженной инверсии MbIN у штамма OC3 HA-MRSA из г. Красноярска (линия ST239/spa3(t037)/SCCmecIIA) и у штамма 16K HA-MRSA из г. Владивостока (линия ST239/spa351(t030)/SCCmecIII). Результаты ПЦР с праймерами (А-С) и (В-Д) для данных штаммов были отрицательными, но были положительными результаты ПЦР с праймерами (А-В) и (С-Д), за исключением штамма OC3, у которого был отрицательный результат и в ПЦР с праймерами (С-Д), скорее всего, из-за мутаций. Таким образом, российская линия ST239 HA-MRSA не имела протяженной инверсии MbIN как у штамма OC8. Круговое соединение кольцевой ДНК IS256 у штаммов OC3 и 16K содержало полные концы IS256, включая несовершенные повторы IR_L и IR_R, и дополнительный гетерогенный участок, длиной 6 п.н. аналогичное таковому участку штамма OC8 (хотя и с особыми смешанными последовательностями) (Рисунок 54).

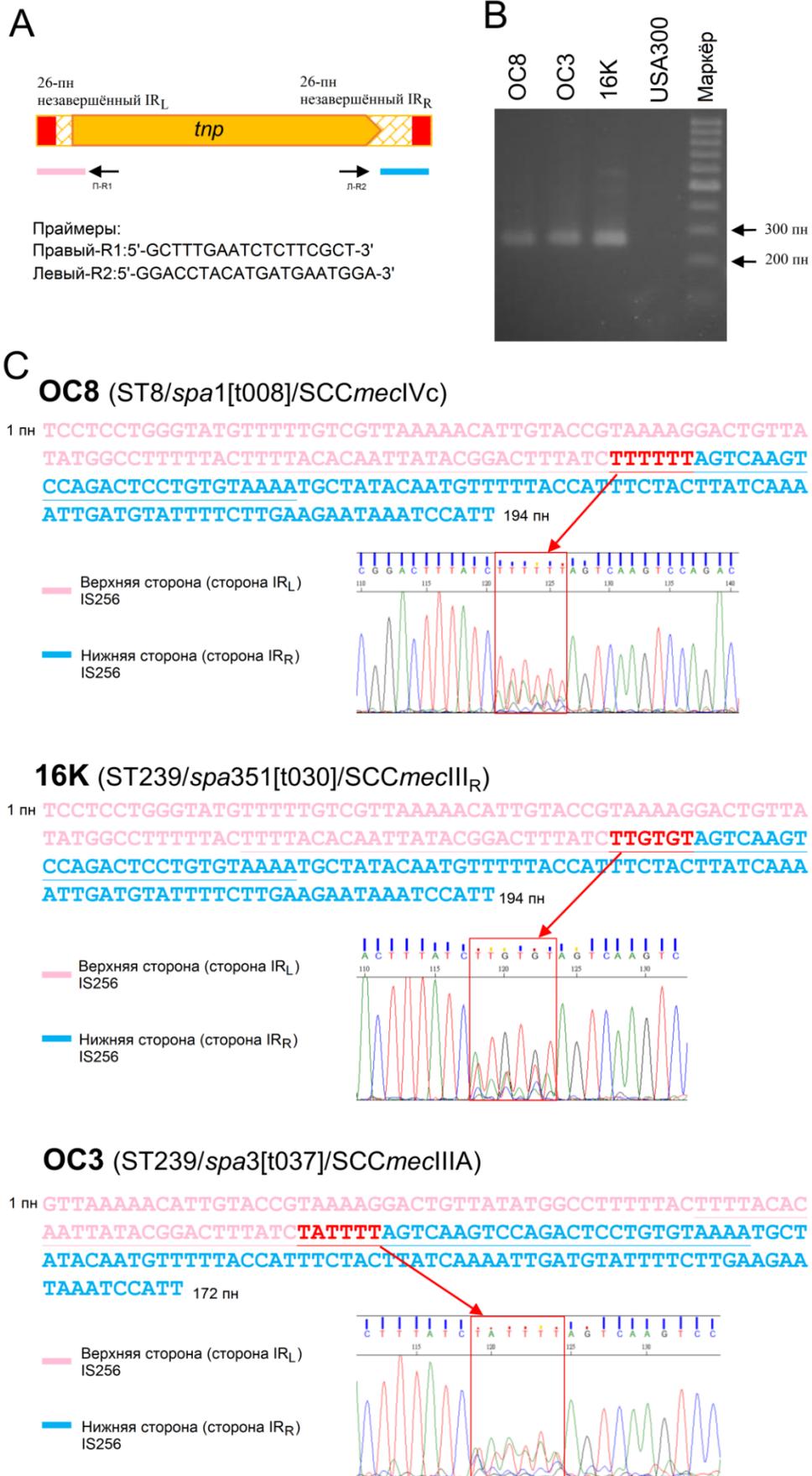


Рисунок 54 - Структура внехромосомной кольцевой ДНК IS256 у штаммов линии ST239/SCC*mecIII* HA-MRSA, распространенных в России

На Рисунке 54 в части А структура IS256 штамма OC8 представлена на основании изучения последовательности генома (номер доступа в GenBank AP017377). На Рисунке 54 в части А и В штаммы OC3 и 16К исследовали с помощью ПЦР с использованием набора праймеров ПЦР (R-R1 и L-R2) на наличие кольцевых молекул IS256. Полученные результаты были схожи с результатами для штамма OC8. На Рисунке 54 в части С представлена последовательность ПЦР-продуктов, которая соответствует боковым областям IR_L и IR_R IS256 штамма OC8 и содержит участки, протяженностью 6 п.н., отмеченные красным цветом; 26 п.н. несовершенные повторы IR и 6 п.н. протяженности подчеркнуты на Рисунке 54. Данные протяженности, длиной 6 п.н. были «смешанными»: TTGTGT у штамма 16К и TATTTT у штамма OC3, вероятно отражающие расходящиеся последовательности *att* в каждом геноме.

Заключение по главе

Определили последовательность генома штамма OC3 (ST239_{Kras} ST239/spa3(t037)/SCCmecIIIА) HA-MRSA, имеющего уникальную структуру. В составе генома выявили три острова патогенности SaPIs: уникальный, впервые выявленный SaPI2R, имеющий в составе ген *tst*; остров патогенности SaPI, имеющий ген *fhuD* с мозаичной структурой и SaPI, переносящий гены *sek* и *seq*; профаги: фаг φSa7-подобный (W); профаг φSa5, профаг φSa3; 5 транспозонов (Tns) (2 копии транспозона Tn554, Tn5801-like, транспозон Tn4001 (6483 п.н.), транспозон Tn552); 1 интегрированную плазмиду - генетическая структура pSK41; 1 автономную плазмиду pCpr (2908 п.н.) и множество копий IS256 (более 22 копий в геноме). Большое количество копий IS256 в геноме у штаммов ST239_{Kras}, возможно, связано с их участием в регуляции транскрипции, как было описано ранее для штаммов *S. epidermidis* [301] или гена *rot* [117]. Копии IS256 также

содействуют работе Tn4001 [134]. Выявлены 15 генов резистентности к различным антимикробным препаратам.

Определили полную кольцевую последовательность уникального генома штамма OC8 (ST8_{Kras} ST8/spa1(t008)/SCCmecIVc) CA-MRSA. Это позволило получить новые сведения. Штамм OC8 имел самую большую геномную инверсию MbIN, впервые выявленную среди штаммов MRSA, при этом это привело к расколу геномного острова vSA β , однако его влияние неизвестно. Наличие большой геномной инверсии MbIN является характерным для штаммов ST8-IVc, распространенных на территории России. Геномная инверсия MbIN была подтверждена методом ПЦР.

Штаммы линий ST8 CA-MRSA и ST239 HA-MRSA в России имели множество копий IS256. Возможно, что IS256 обладают потенциалом трансмиссии и дают штаммам эпидемиологические преимущества. Элементы IS256 имели гибкие механизмы на стадии интеграции и стадии экстрахромосомной ДНК и выступали в качестве мощного триггера эволюции MRSA. Обнаружили дополнительные факторы вирулентности штамма OC8, такие как усеченный гигантский поверхностный белок Ebh Δ и IS256, связанный с регуляцией генов.

Инверсии происходят при гомологичной рекомбинации, в которой две генетические структуры с гомологичными последовательностями, длиной 300 п.н. или более присутствуют в противоположных ориентациях (как IR) [226]. 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, как описывалось у штаммов *Pseudomonas aeruginosa* [302]. Ранее были сообщения о больших геномных инверсиях в генах рибосомальной РНК у штаммов *Escherichia coli* [243], в профаге у штаммов энтерогеморрагической *E. coli* O157: H7 [254], в IS6100 у штаммов *P. aeruginosa* [302], у штаммов *Salmonella Typhimurium* [433], а также у штаммов *S. aureus* (MRSA USA800) [452]. Штаммы *S. aureus*, как

правило, имеют обычные последовательности генов генома; однако у штаммов USA800 (линия ST5/SCCmecIV) геномная инверсия по сравнению с USA300 составляла приблизительно 500 т.п.н., и могла произойти между IRs IS1181 и последовательностью, длиной 73 п.н. [452]. Инверсия у штамма OC8 в настоящем исследовании была вызвана IRs IS256 и была протяженностью 1042885 п.н., что примерно в два раза больше, чем геномная инверсия US800, представляющая на тот момент наибольшую геномную инверсию среди штаммов *S. aureus* или MRSA. Геномная инверсия MbIN является эпидемиологическим маркером, который можно определять методом ПЦР, при выявлении ST8-IVc в 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, потому что, даже если имелось, хотя было несколько наборов IRs IS256 в геноме OC8, MbIN могла произойти только между горячими рекомбинационными точками, обогащенными IS256. Делеции происходили, когда две длинные гомологичные последовательности прямо ориентированы (как DR) [226]. Обнаружили следы двух делеций у штамма OC8 размером 63 п.н. и 3356 п.н. по сравнению с геномом штамма FPR3757 US300. Эти относительно небольшие делеции также наблюдались в горячих рекомбинационных точках, в которых IS256 DR были смежными друг с другом. Следовательно, предшественник штамма OC8 (до делеций) мог иметь на две копии IS256 в хромосоме больше (возможно, всего 21 экземпляр на геном). Возможно, OC8-мутанты с большим количеством делеций также могли исчезнуть в процессе эволюции.

Хотя инсерционный элемент IS256 хорошо исследован [118, 240, 332, 337, 433, 542], до сих пор не сообщалось о распространении IS256 между клетками и внутри генома при внутриклеточном распределении IS256. Что касается клеточно-клеточного распространения IS256, возможно, что одна

копия IS256 была введена в предшественник штамма OC8. Установили наличие внехромосомной кольцевой ДНК IS256 у штамма OC8, как сообщалось ранее [240, 332]. Можно предположить, что кольцевая форма IS256 переносится из клетки в клетку, аналогично транспозону Tn554, имеющему гены резистентности к эритромицину (в ST239/SCCmecIII HA-MRSA), который образовывал кольцевую ДНК [533] и успешно переносился при конъюгации (в смешанных культурах бактерий), в качестве «трансмиссионного транспозона» [289, 533]. Небольшие плазмиды, такие как плазмиды резистентности к хлорамфениколу размером 2,9 т.п.н., переносятся у штаммов *S. aureus* путем конъюгации (в смешанных культурах бактерий) с заметно более высокой частотой, чем трансмиссивные большие плазмиды пенициллиназы (PCase) [289, 533]. Этот способ межбактериальной передачи также способствует распространению IS256 среди штаммов *S. aureus*. Кольцевая форма IS256 в настоящее время исследуется для проверки ее возможности переноса из клетки в клетку (как «трансмиссивная инсерционная вставка»). При внутриклеточном распространении IS256 выявили несколько особенностей. Ранее сообщалось о том, что вставки IS256 происходят не случайным образом [542], мы обнаружили в геноме штамма OC8 три горячих точки рекомбинаций, обогащенных IS256, в дополнение к одиночному расположению IS256 элементов. Молекулярные механизмы, лежащие в основе этой сборки вставок IS256 элементов в виде горячих рекомбинационных точек еще не выяснены. Однако, горячие рекомбинационные точки могут демонстрировать предпочтительные последовательности сайтов вставки IS256. Они могут локализоваться в «мусорных» областях генома или области горячих рекомбинационных точек могут обеспечить уникальную топологическую маркировку для повышения вероятности атаки ферментом транспозаза. Фланкирующие последовательности IS256 размером 8 или 9 п.н., обнаруженные в геноме штамма OC8, были отличающимися. Возможно выбор сайта *att* не является строго определенным (частота появления той же самой последовательности

att < 5,3 % или < 4,8 %). Внехромосомная кольцевая ДНК IS256 также существовала в различных формах, каждая из которых имела гетерогенные протяженности, длиной 6 п.н. Следовательно, транспозаза IS256, являющаяся ДНК-связывающим белком, имела предпочтительные, а не фиксированные уникальные последовательности. Во внутригеномных последовательностях IS256 присутствовали три различных фланкирующие последовательности: гомогенные *attL* и *attR* как DR (73,7 %), которые создаются при вставках; гетерогенные *attL* и *attR* в горячих точках (10,5 %), которые создаются при инверсиях или делециях; частично гомологичные *attL* и *attR*, как несовершенные фланкирующие повторы DR (15,8 %), которые производятся при вставках и последующей мутации *attR*. Поэтому в настоящем исследовании гетерогенные *attL* и *attR* указывают на наличие инверсий или делеций.

Что касается роли IS256 в эволюции, то в дополнение к вышеуказанным хромосомным перестройкам подчеркиваем успешное распространение IS256 среди штаммов MRSA в России. Штаммы линии ST8/SCCmecIVc CA-MRSA (штамм OC8), линии ST239/spa3(t037)/SCCmecIIIА HA-MRSA (штамм OC3), и ST239/spa351(t030)/SCCmecIIIВ HA-MRSA (штамм 16K), распространенные в России, имеют несколько элементов IS256, что указывает на то, что мультикопийность IS256 обеспечивает избирательное преимущество микроорганизмам и способствует эволюции MRSA. В сравнительных геномных анализах штаммов OC3 и 16K использовали технологию пиросекционирования без заполнения всех промежутков между контигами (за исключением интересующих генетических структур); следовательно, точный анализ смежных последовательностей IS256 или большой инверсии не выполнялся. При изучении структуры генома штамма OC8 использовали системную технологию PacBio RS II [150], а также завершили создание полной кольцевой последовательности генома. При этом, удалось провести точный анализ распределения элементов IS256 и большой геномной

инверсии. Небольшой плазмидный анализ не был доступен для системы PacBio RS II, поскольку небольшие фрагменты ДНК, составляющие менее примерно 20 т.п.н., были удалены, и для построения библиотеки использовались только большие фрагменты ДНК. Поэтому для небольших плазмид мы изолировали плазмидную ДНК в отдельных экспериментах для полного анализа плазмидной последовательности с использованием ранее описанных методов. Что касается влияния IS256 на экспрессию генов, считается, что IS256 изменяет вирулентность *S. aureus* и лекарственную устойчивость [118]. Например, показано, что введение IS256 в промотор гена *rot* влияет на уровень вирулентности [118]. В настоящем исследовании введение IS256 в области промотора *rot* или *ica* [240, 542] не проводили. Геномные острова *vSA α* , *vSA β* и *vSA γ* имели инсерцию IS256. Геномный остров *vSA β* разделен на две части большой инверсией MbIN с небольшой делецией. Возможно, существует связь наличия IS256, MbIN и делеций с проявлением вирулентности штаммов.

Таким образом, в России выявили два основных клона MRSA, у которых обнаружены уникальные особенности структур геномов. Такие особенности важны как с позиции повышенного уровня вирулентности штаммов MRSA, так и эволюционных изменений. В России штаммы варианта ST8-IVc были распространены как во внебольничных условиях, так и в стационарах как минимум с 2007 года с наличием большой инверсии MbIN (эпидемиологический маркер), с множеством копий IS256, с наличием устойчивости к антимикробным препаратам, с наличием множественных факторов вирулентности, что дает штаммам избирательное преимущество. Эволюционное происхождение российского варианта ST8-IVc еще предстоит выяснить. Вариант ST239_{Kras} имел острова патогенности и бактериофаги с новой мозаичной структурой, в т.ч. имел ген *tst*, а также множество генов резистентности и большое количество копий IS256, что определяло его высокий уровень вирулентности, антибиотикорезистентности.

Глава 6 Сопоставление генетических вариантов MRSA и их эволюции, распространенных в г. Красноярске, Красноярском крае с MRSA, распространенными в других регионах России и за рубежом

6.1 Сравнение штаммов MRSA ST239_{Kras} и штаммов ST239 из других регионов России

Распространение штаммов HA-MRSA с генотипом ST239/*sra*351(t030)/SCCmecIII.1.1.4 было обнаружено в Европейской части России (г. Москва, г. Санкт-Петербург), Зауралье (г. Курган) и на Дальнем Востоке (г. Владивосток), но не было выявлено в Сибири (г. Красноярск) (Таблица 41). Генетический вариант с новым *sra*, *sra*New (t632) был распространен в Европейской части России (г. Санкт-Петербург). Генетический вариант ST239_{Kras} был распространен только в Сибири (г. Красноярск). При анализе результатов PFGE были обнаружены три основных, отличающихся между собой кластера: большой кластер *sra*351/SCCmecIII.1.1.4, распространенный на Дальнем Востоке; большой кластер *sra*351-New (t632)/SCCmecIII.1.1.4, в основном распространенный в Зауралье (а также на Дальнем Востоке); и большой кластер *sra*3/SCCmecIII.1.1.1-III.1.1.2, распространенный в Сибири и на Дальнем Востоке (Рисунок 55). Выявленный вариант ST239/*sra*351(t030)-*sra*New(t632)/SCCmecIII.1.1.4 оказался несколько отличающимся от вариантов, циркулирующих в Европейском, Уральском регионах и на Дальнем Востоке. Вариант ST239_{Kras} отличался от данных типов с новым вариантом *sra* и включал субкластеры *sra*3, сравнимыми с контрольными штаммами ASN46 и HU25.

Анализ результатов гель-электрофореза в пульсирующем поле (PFGE) штаммов ST239 MRSA из Европейской части РФ (г. Москва, г. Санкт-Петербург), из Зауралья (г. Курган) и Дальнего Востока (г. Владивосток) по сравнению с ST239_{Kras} позволил выявить некоторые сходства и отличия

В левой части Рисунка 55 цветом выделен большой кластер *sra3/SCCmecIII.1.1.1-III.1.1.2*, распространенный на территории Сибири и Дальнего Востока. В средней части Рисунка 55 представлены наименования штаммов, выделенных из разных регионов РФ, они выделены цветом: красным цветом - штаммы, выделенные в Сибири (г. Красноярск); зеленым цветом - штаммы, выделенные на Дальнем Востоке (г. Владивосток); коричневым цветом - штаммы, выделенные в Европейской части РФ (г. Москва, г. Санкт-Петербург); фиолетовым цветом - штаммы, выделенные в Зауралье (г. Курган). Контрольные штаммы HU25 и ANS46 цветом не выделены.

Доля MRSA среди изолятов *S. aureus* в России составила 0-89,5 % (в среднем 33,5 %) в 2000 году [467], 18 % - в 2004 году [504], 54,4 % - в 2006-2008 годах [43], 32,1 % - в 2007 году и 16,6 % - в 2012 году [130]. Основными генетическими вариантами MRSA, относящиеся к глобальной линии ST239 распространенными на территории России являются ST239/*sra3(t037)/SCCmecIII*, а также ST239/*sra351(t030)/SCCmecIII* и ST8/*sra1(t008)/SCCmecIV* [44].

В г. Красноярске наиболее распространенным вариантом HA-MRSA был ST239_{Kras}. Это новый региональный вариант линии ST239 (Таблица 41, Рисунок 55), который отличается от Европейских вариантов, циркулирующих на территории г. Москвы и г. Санкт-Петербурга, а также от вариантов, распространенных в Зауралье в г. Курган и на Дальнем Востоке в г. Владивостоке, где распространен новый тип ST239/*sra351(t030)/SCCmecIII.1.1.4* [533].

Штаммы MRSA ST239_{Kras} являются высоковирулентными HA-MRSA и были причиной фатальных случаев госпитальной пневмонии. Особенности течения заболевания, особенности больных с фатальной госпитальной пневмонией, например, возрастная категория пациентов соответствовали опубликованным ранее данным, посвященным вирулентности HA-MRSA [387].

Выявленные в результате проведенного PFGE анализа и других методов изучения молекулярно-генетические особенности штаммов MRSA позволили сделать вывод, что штаммы ST239_{Kras} сохранялись и распространялись на территории г. Красноярска, Красноярского края среди госпитализированных пациентов и бактерионосителей, например медицинских работников, по крайней мере, с 2007 года по настоящее время.

6.2 Молекулярные характеристики ST8 MRSA в России

Молекулярные характеристики штаммов ST8 MRSA, изолированные в Европейской части России (г. Москва, г. Санкт-Петербург, г. Ярославль), в Сибири (г. Красноярск) и на Дальнем Востоке (г. Владивосток) приведены в Таблице 41 и на Рисунке 56. У всех изолированных и изученных штаммов MRSA, относящихся к ST8 выявили одни и те же варианты *agr1*, SCCmecIVc и CoaIII. Выявили зависимость различных типов *spa* у Российских штаммов ST8 MRSA от географической локализации. Например, вариант *spa1* (t008), вероятно, был распространенным типом на территории Сибири и в Европейской части России, но не был выявлен на Дальнем Востоке. Основываясь на данном результате, наряду с полученными ранее результатами, демонстрирующими, что *spa1*(t008) является одним из наиболее распространенных типов среди MRSA линии ST8 [224], сделали заключение, что *spa1*(t008) может быть предшествующим вариантом *spa* в линии ST8, циркулирующей на территории России (Рисунок 56 В).

Практически все изученные штаммы линии ST8, циркулирующей на территории России, имели ген *sea*, кодирующий продукцию энтеротоксина SEA, относящегося к суперантигенам. Все штаммы ST8 демонстрировали повышенную экспрессию *psma*, аналогичную CA-MRSA (USA300 и RS08). Значения МПК для оксациллина и имипенема у представителей данной

Таблица 41 – Информация о штаммах линии ST8 MRSA, выделенных в разных городах России и за рубежом

Происхождение		Штамм	Время происхождения	Генотип:	Ген для токсина ^a , суперантигена, адгезина ^a	Резистентность ^{a,b}		Пациент:				Источник		
Страна				ST, <i>sra</i> ^a , <i>agr</i> ,		β-лактамы	не β-лактамы	Заболевание	Итог:	Возраст:	Пол:			
Область				SCCmec ^c , <i>Coa</i>		МПК (мкг/мл)								
Город ^a						ОХА ^a	IPM ^a							
Россия														
Сибирь	K ^a	OC1	2010	8, 1 (t008), 1, IVc ^a , III	<i>sea, psma(1)^a</i>	32	0.13	G, K, E, Cl, L, Ch, Su	Абсцесс кожи	R	50Y	F	40	
		OC1C	2011	8, 1 (t008), 1, IVc ^a , III	<i>sea, psma(1)^a</i>	32	0.25	L, Ch	Колит	R	3Y	M	40	
		OC8	2007	8, 1 (t008), 1, IVc ^a , III	<i>sea, psma(1)^a</i>	32	0.25	L, Ch	Пневмония (внебольничная)	D	1Y	M	40	
		OC11	2007	8, 1 (t008), 1, IVc ^a , III	<i>sea, psma(1)^a</i>	32	0.25	L, Ch	Пневмония, сепсис	D	39Y	M	40	
		OC22	2008	8, 1 (t008), 1, IVc ^a , III	<i>sea, psma(1)^a</i>	32	0.5	L, Ch	Пневмония (внебольничная)	D	41Y	M	40	
		OC23	2008	8, 1 (t008), 1, IVc ^a , III	<i>sea, psma(1)^a</i>	64	0.13	L, Ch	Пневмония (внебольничная)	D	40Y	M	40	
		OC52	2008	8, 1 (t008), 1, IVc ^a , III	<i>sea, psma(1)^a</i>	32	0.25	L, Ch	- ^c	- ^c	34Y	F	40	
		OC59	2008	8, 1 (t008), 1, IVc ^a , III	<i>sea, psma(1)^a</i>	32	0.13	G, K, L, Ch	Пневмония	D	4M	F	40	
		OC160	2011	8, 1 (t008), 1, IVc ^a , III	<i>sea, psma(1)^a</i>	32	0.5	G, K, E, Cl ^{ind} , L, Ch	Заражение раны, целлюлит	R	53Y	M	40	
		OC217	2010	8, 1 (t008), 1, IVc ^a , III	<i>sea, psma(1)^a</i>	32	0.13	L	- ^d	- ^d	19Y	F	40	
Европа		OC3	2007	239, 3 (t037), 1, IIIA ^a , IV	<i>tst, sek, sea, psma(1)^a, cna</i>	≥256	64	G, K, E, Cl, L, T, Ch, R, Su, St	Пневмония (больничная), сепсис	D	46Y	M	40	
		M ^a	M79	2011	8, 1 (t008), 1, IVc ^a , III	<i>sea, psma(1)^a</i>	32	0.25	G, K, L	Заражение раны	R	20-60Y ^e	- ^o	В этой статье
		M185	2008	8, 1580 (t2648), 1, IVc ^a , III	<i>sea, psma(1)^a</i>	32	0.25	G, K, E, Cl, L, Ch	Сепсис	D	20-60Y ^e	- ^o	В этой статье	
		M257	2012	8, New (t1259), 1, IVc ^a , III	<i>sea, psma(1)^a</i>	64	0.25	E, Cl, L, Ch	- ^c	- ^c	20-60Y ^e	- ^o	В этой статье	
		S ^a	S2	2011	8, 1 (t008), 1, IVc ^a , III	<i>sea, psma(1)^a</i>	64	0.25	G, K, L, Ch	Ожоговая рана	R	20-60Y ^e	- ^o	В этой статье
		S14	2011	8, 363 (t024), 1, IVc ^a , III	<i>sea, psma(1)^a</i>	64	1	G, K, E, Cl, L, Ch	Ожог, сепсис	R	20-60Y ^e	- ^o	В этой статье	
		S65	2011	8, 1 (t008), 1, IVc ^a , III	<i>sea, psma(1)^a</i>	64	0.25	L, Ch	Рана, остеомиелит	R	20-60Y ^e	- ^o	В этой статье	
		S214	2012	8, 363 (t024), 1, IVc ^a , III	<i>sea, psma(1)^a</i>	64	4	G, K, L, Ch	Остеомиелит, пневмония (больнич.)	D	20-60Y ^e	- ^o	В этой статье	
		Y ^a	Y269	2011	8, 1 (t008), 1, IVc ^a , III	<i>sea, psma(1)^a</i>	≥256	16	G, K, E, Cl, L, Ch	Заражение раны	R	20-60Y ^e	M	В этой статье
		Дальний Восток	V ^a	12K	2008	8, 826 (tUK) ^a , 1, IVc ^a , III	<i>sea, psma(1)^a</i>	32	0.06	G, K, Ch	Уретрит	R	21Y	M
40K	2008			8, 826 (tUK) ^a , 1, IVc ^a , III	<i>sea, psma(1)^a</i>	32	0.06	G, K, E, Cl, Ch	Заражение раны	R	19Y	M	41, эта статья	
RF57 ^f	2006			8, 826 (tUK) ^a , 1, IVc ^a , III	<i>sea, psma(1)^a</i>	64	1	G, K, E, Cl, Ch, R	Заражение раны	R	20-60Y ^e	- ^o	41, эта статья	
RF570	2010			8, 826 (tUK) ^a , 1, IVc ^a , III	<i>sea, psma(1)^a</i>	64	1	G, K, E, Cl, Ch, R	Заражение дых. путей (больнич.)	R	20-60Y ^e	- ^o	В этой статье	
16K	2008			239, 351 (t030), 1, III _R ^a , IV	<i>sea, sek, seq, cna</i>	≥256	64	G, K, E, Cl, L, T, Ch, R, Su, St	Уретрит	R	20Y	M	41, эта статья	
США		USA300-0114	- ^g	8, 1 (t008), 1, IVa ^a , III	PVL ^{+a} , ACME ^{+a} , <i>sek, seq, psma(1)^a</i>	32	0.13	K, E, Cl ^f , T	- ^g	- ^g	- ^g	- ^g	11, 42, 43	

^aГород: K, Красноярск; M, Москва; S, Санкт-Петербург; Y, Ярославль; V, Владивосток. SCCmec: IVc, IV.3.1.2; IVa, IV.1.1.1; IIIA, III.1.1.2; III_R, III.1.1.4. Тип *sra*: tUK (неизвестно), неизвестный номер *sra* Ridom. Ген: *psma* (+), повышенная экспрессия *psma* (которая была значительно больше уровня экспрессии HR-MSRA, P<0,05). Другие обычные гены-адгезины включают *lukE-lukD*, *hla*, *hlg*, *hlg-v*, *hld*, профаг *hIb*, и *c12ag* (*icaA*, *icaD*, *eno*, *fnbA*, *fnbB*, *ebpS*, *clfA*, *clfB*, *fib*, *sdrC*, *sdrD*, *sdrE*). PVL, стафилококковый лейкоцидин; ACME, катаболический подвижный аргинин-элемент. Антимикробный агент: ОХА, оксацилин; IPM, имипенем; G, гентамицин; K, канамицин; E, эритромицин; Cl, клиндамицин; L, левофлоксацин; Cl, ципрофлоксацин; T, тетрациклин; Ch, хлорамфеникол; R, рифампицин; Su, сульфаметоксазол; St, стрептомицин; Резистентность: ind, индуцибельная резистентность; i, промежуточный. Итог: R, выздоровление; D, смерть. Возраст: Y, год; M, месяц. Пол: F, женщина; M, мужчина.

^bЛевофлоксацин-резистентный штамм был также резистентен к ципрофлоксацину.

^cЗдоровый носитель (работник больницы)

^dЗдоровый носитель (студент)

^eВся личная информация (о пациентах) недоступна

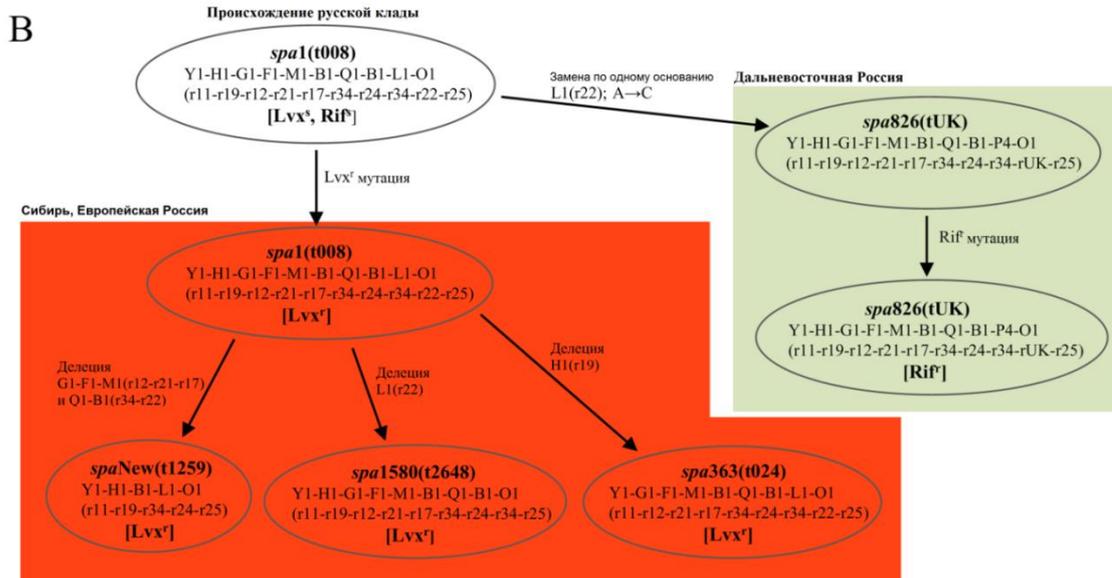
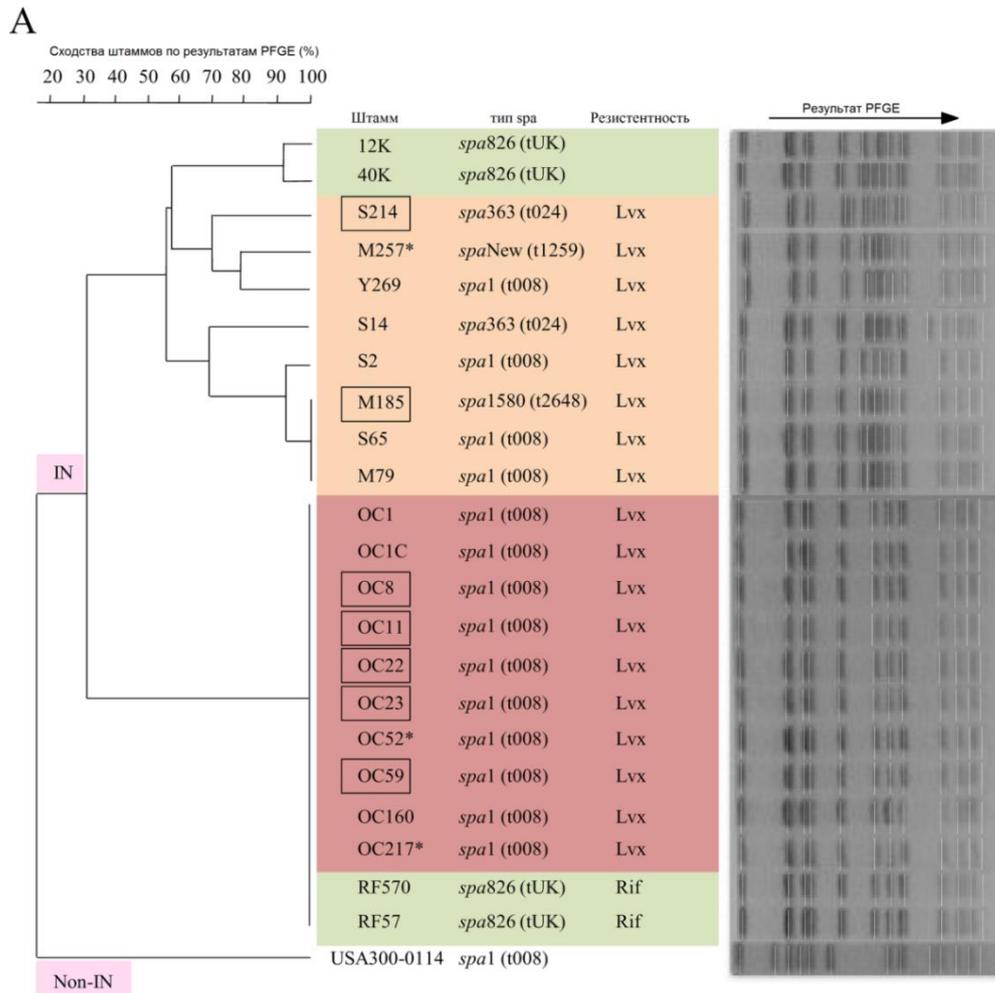


Рисунок 56 - Анализ результатов гель-электрофореза в пульсирующем поле (PFGE) (A) и анализ филогенетического разнообразия *spa*-типов (B) штаммов ST8/SCCmecIVc MRSA, выделенных в России

Примечание: Lvx^s, чувствительные к левофлоксацину; Rif^r, чувствительные к рифампицину; Lvx^r, устойчивые к левофлоксацину; Rif^r, устойчивые к рифампицину

линии были ниже, чем у HA-MRSA (по сравнению со штаммами OC3 и 16K), что согласуется с характеристиками CA-MRSA, однако МПК для имипенема был высоким (16 мкг / мл) у штамма, выделенного в г. Ярославле. Следовательно, изолированные на территории г. Красноярска, Красноярского края штаммы ST8 MRSA по критериям соответствовали CA-MRSA. Однако данные штаммы ST8 MRSA были также изолированы от бактерионосителей, имевших факторы риска колонизации госпитальными штаммами - медицинских работников, а также от пациентов, госпитализированных в стационары (штаммы изолированы позднее 48 часов пребывания в стационарах), что свидетельствует об их распространении в условиях больниц. Все изолированные штаммы ST8, циркулирующие на территории Сибири и в Европейской части России были устойчивы к левофлоксацину (МПК 4-8 мкг / мл), тогда как штаммы ST8, циркулирующие на Дальнем Востоке России, были чувствительными к данному антимикробному химиопрепарату. Механизм резистентности к левофлоксацину у штаммов ST8_{Kras} был схож с механизмом резистентности штаммов ST239_{Kras} HA-MRSA и был обусловлен схожими мутациями в гене. Из числа изученных штаммов ST8 MRSA один штамм, изолированный в Сибири (штамм OC160) проявил индуцибельную устойчивость к клиндамицину; в других случаях резистентность к клиндамицину была конститутивной. Резистентность к рифампицину (МПК 4 мкг / мл) была выявлена только у штаммов, изолированных на Дальнем Востоке России. Общей особенностью штаммов, изолированных из различных регионов России была резистентность к хлорамфениколу (МПК 64 мкг / мл).

При анализе полученных результатов PFGE выявили, что штаммы ST8, циркулирующие в Сибири, сформировали единый кластер (Рисунок 56 А). Таким образом, на территории г. Красноярска, Красноярского края распространен один тип ST8, названный ST8_{Kras}. Штаммы ST8 из Европейской части России отличались от штаммов ST8_{Kras} и составляли

гетерогенные кластеры. Штаммы ST8, изолированные в г. Владивостоке, были более гетерогенными и включали в себя как тип, схожий с ST8_{Kras}, так и дивергентный тип, который циркулирует на территории Европейской части России.

На Рисунке 56 в части А штаммы были разделены на две основные группы: IN, те, у которых была большая геномная инверсия, и Non-IN, те, у которых нет большой геномной инверсии. Географическое распределение изолятов MRSA выделено разными цветами: желтый - Европейская часть России (г. Москва, г. Санкт-Петербург, г. Ярославль); красный - Сибирь (г. Красноярск); зеленый - Дальний Восток (г. Владивосток). На Рисунке 56 в части В показаны номера *spa*-аллелей и номера *spa* Ridom (в скобках). Вариант *spa* 1 (t008) представляет собой русский вариант линии ST8/SCCmecIVc MRSA; другие типы *spa* отличались от типа *spa* общих предшественников.

Штаммы линии ST8 циркулируют на территории г. Красноярска, Красноярского края и относятся к уникальному клону MRSA ST8_{Kras} со схожими PFGE профилями. По *spa*-типу (*spa*1-t008) штаммы MRSA ST8_{Kras} соответствовали ранее выявленным в России линии ST8 MRSA [44], но отличались (*spa*826; t неизвестный) от штаммов линии ST8, изолированных в г. Владивостоке [533]. Штаммы ST8_{Kras} относились к CA-MRSA и были причиной фатальных случаев внебольничной пневмонии, а также распространены в стационарах и связаны с фатальными случаями госпитальной пневмонии. При этом выявлены случаи смертельных исходов внебольничной пневмонии у младенца и у ребенка младшего возраста, что согласуется с описанными ранее инфекциями, вызванными CA-MRSA [387].

Также были выявлены бактерионосители ST8_{Kras}, что свидетельствует о том, что клон стал широко распространенным. Внебольничные CA-MRSA PVL+, например ST8 USA300 [182-184] широко распространены в США [182, 183, 295, 387, 435, 500].

Гипервирулентность CA-MRSA USA300 связана с наличием мультивирулентных факторов, таких как продукция PVL, а также с наличием фактора ACME, α -гемолизина (Hla), повышенным уровнем продукции PSM и энтеротоксинов SEK (*sek2*) и SEQ (*seq2*) [183, 485]. У штаммов ST239_{Kras} HA-MRSA уникальный набор мультивирулентных факторов включал TSST-1, повышенную экспрессию PSM α /Hld, Hla, SEK/SEQ, SCIN/SAK и Spa. Из этих факторов TSST-1 ассоциировался с синдромом токсического шока (TSS) [464] и неонатальной TSS-подобной экзантемной болезнью, возникающей вследствие продукции большого количества цитокинов [91]. TSST-1 также связан с развитием эндокардита, вследствие наличия в том числе факторов уклонения от иммунного надзора [503]. Например, в Японии распространенными основными клонами HA-MRSA и CA-MRSA являются *tst+* и ассоциированы с развитием инвазивных инфекций, включая пневмонию и бактериемию [261]. Однако инвазивные инфекции, вызванные MRSA развивались независимо от наличия или отсутствия PVL [261, 288, 539]. В России в основном были выявлены PVL-негативные штаммы MRSA [44, 504, 130] и выявлено четыре штамма PVL-положительных MRSA [108, 363]. В г. Красноярске практически все штаммы MRSA были PVL-негативными, только 2 штамма были PVL-положительными и изолированы от медицинских работников. Выявлены PVL-положительные метициллин-чувствительные штаммы *S. aureus*, доля которых от изученных MSSA составила около 10 %. Такие штаммы вызывали инфекции кожи и мягких тканей, такие как фурункулы.

Штаммы ST8_{Kras} обладали набором мультивирулентных факторов, который включал энтеротоксин SEA, продуцируемый на высоком уровне; PSM α /Hld, продуцируемые на высоком уровне; факторы ускользания от иммунного надзора. Из перечисленных факторов энтеротоксин SEA связан с развитием тяжелых инфекций, таких как сепсис и синдром токсического шока [205] и способствует выживанию бактерий *in vivo* [530].

Выявленные в результате проведенного PFGE анализа и других методов изучения молекулярно-генетические особенности штаммов MRSA позволили сделать вывод, что штаммы ST8_{Kras} сохранялись и распространялись на территории г. Красноярска, Красноярского края, как во внебольничных условиях, так и в условиях стационаров среди госпитализированных пациентов, по крайней мере, с 2007 года по настоящее время.

Заключение по главе

Эволюция MRSA является важным моментом настоящего исследования в связи с необходимостью понимания особенностей вирулентности и антибиотикорезистентности микроорганизмов в настоящее время, так и необходимостью их прогноза в будущем.

Линия ST239/SCCmecIII является глобальной линией HA-MRSA, распространенной практически во всем мире [44, 145, 201, 236, 297, 379], которая состоит из MRSA-кладов [379]. Исторически, Бразильский клон имел тип SCCmecIIIA [236, 397], Венгерский клон имел тип SCCmecIII. Структура SCCmecIIIA теперь представляет собой один большой сплавленный SCC - SCCmecIII.1.1.2, полученный из двух SCC-связанных SCCmecIII путем IS431-рекомбинации [397]. Штаммы ST239_{Kras} имели тот же тип IS431-рекомбинации, что и у бразильского клона. В России нет информации о выявлении вариантов MRSA с типом SCCHg-SCCmecIII [533]. Впервые среди представителей глобальной линии ST239 у штаммов ST239_{Kras} установили наличие гена *tst* в составе острова патогенности SaPI [392]. Тот же самый ген *tst* был выделен у штаммов, относящихся к другому генетическому варианту и циркулирующих в Великобритании еще до выделения ST239_{Kras}, что говорит о возможном происхождении гена *tst* из Европы. Также штаммы ST239_{Kras} имели уникальный фаг φSa7-подобный (W). Фаги являются возможным инструментом горизонтального

переноса генов у штаммов *S. aureus* и классифицируются по типам интегразы [236, 246, 527]. У фага ϕ Sa7-подобный (W) выявлена интеграза типа 7 (Sa7int); однако ϕ Sa7-подобный (W) не имел концевых последовательностей *att*, аналогичных Tn554, но имел уникальный сайт вставки, отличный от ϕ Sa7 [274, 533]. Кроме того, ST239_{Kras} демонстрировали характеристики, присущие CA-MRSA, то есть высокий уровень экспрессии гена цитолитического пептида (как описано выше).

Вариант ST239 MRSA, Бразильский клон распространился в Португалии [86], Центральной Европе (Германия, Польша и Чешская Республика), в Северной Европе (Финляндия) [85, 88] и Восточной Европе/Западной Азии (Грузия) [110]. Город Красноярск имеет исторически близкую связь с Европейским регионом России (г. Санкт-Петербург, г. Москва). Представители азиатского клада ST239 MRSA (Юго-Восточная Азия), включая лондонский штамм TW20, который, скорее всего, передался из Юго-Восточной Азии [195, 236], имели характерный фаг ϕ SP β -подобный (таблица 41) [236, 246, 319], тогда как штаммы ST239_{Kras} не имели ϕ SP β -подобных. Основываясь на этих выводах и полученных результатах, предложен новый российский клон (штамм ОС3) в линии MRSA ST239/SCCmecIII. Возможно, что штаммы ST239_{Kras} возникли на основе Бразильского клона с возможным маршрутом передачи Бразилия - Европа (Запад – Центральная часть - Северо/Восток) - Россия (Европейская часть - Сибирь) (Рисунок 57). Для более точного понимания эволюции ST239 MRSA необходим проводить дальнейший анализ генома штаммов.

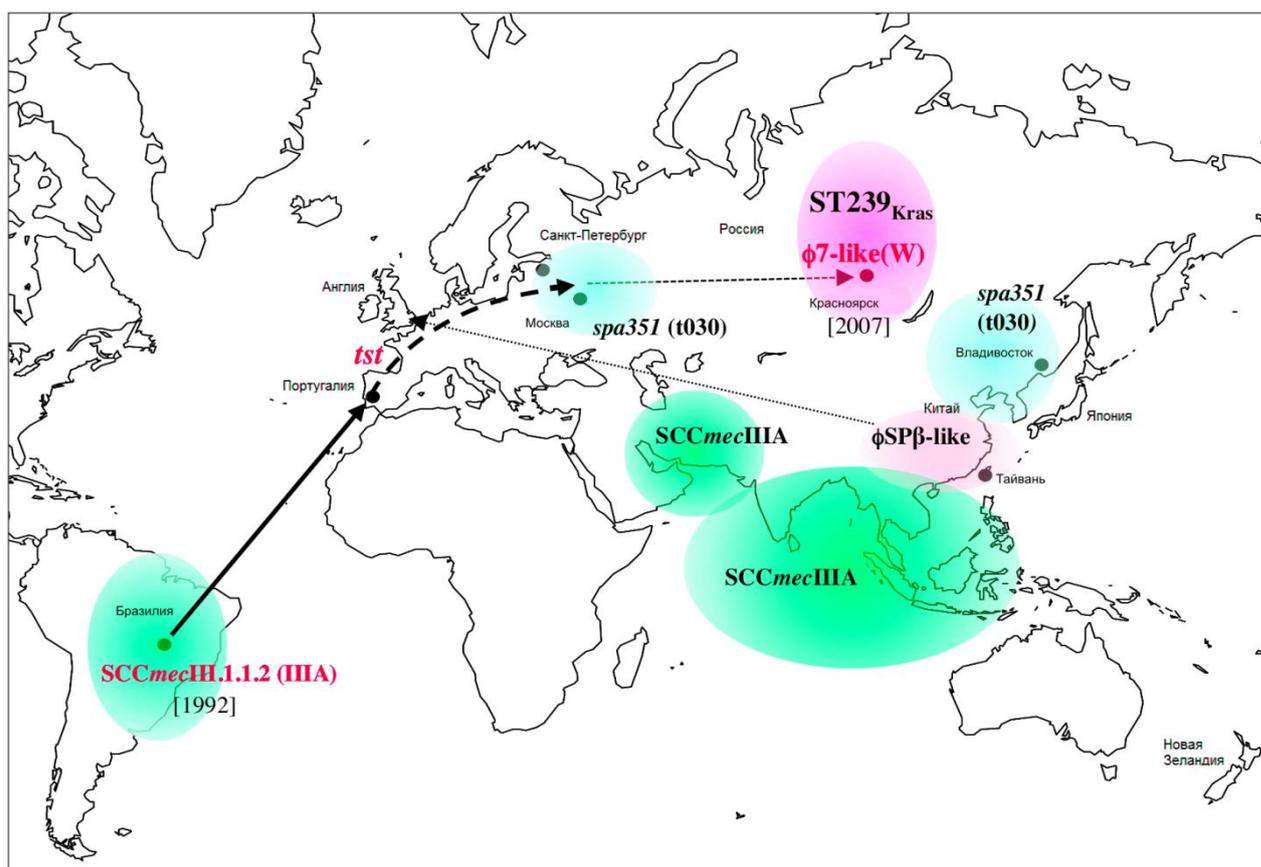


Рисунок 57 - Модель возможной эволюции штаммов ST239_{Kras}, выделенных в Сибири (г. Красноярск)

Примечание: ST239_{Kras} характеризуется наличием SCCmecIII.1.1.2, гена *tst* и бактериофага ϕ Sa7-подобный (W). На Рисунке представлен возможный маршрут передачи штаммов между Бразилией – Европой - Россией при формировании ST239_{Kras}

Некоторые континентальные клады MRSA распространились и межконтинентально, что характерно для линии ST239/SCCmecIII HA-MRSA [379]. В России распространены гетерогенные сублинии ST239/SCCmecIII [224], такие как ST239/*spa*351(t030)/SCCmecIII_R в г. Владивостоке [533] и ST239/*spa*3(t037)/SCCmecIII_A (ST239_{Kras}) в г. Красноярске [289]. Штаммы ST239_{Kras}, представляют собой сибирскую линию ST239 HA-MRSA с возможным эволюционным маршрутом Бразилия – Европа - Сибирь [289].

Один из наиболее эволюционно успешных и распространенных глобально является международный эпидемический клон ST8, *spa* тип t008, который распространен во многих странах мира. При этом,

распространены как внутрибольничные, так и внебольничные варианты данной клональной линии, встречаются и метициллинорезистентные, и метициллиночувствительные штаммы. К этой генетической линии относится известный внебольничный клон USA300, который отличается от внутрибольничных продукцией PVL, и внутрибольничный, такой как UK EMRSA-2/6. Широкое распространение штаммов линии ST8/SCCmecIV CA-MRSA, возможно, приведет к похожим последствиям как распространение, например, клона USA300 (ST8/spa1[t008]/SCCmecIVa с PVL+ ϕ Sa2 и ACME, связанным с SCCmecIVa) [72, 86, 184, 195, 201, 397, 495]. Клон USA300 вызвал крупную эпидемию CA-MRSA и HA-MRSA инфекций в США [72, 86, 184, 495] и продемонстрировал межконтинентальную передачу [219]. Представители данного клона особенно точно охарактеризованы [72, 184, 397, 495]. Также были описаны многие другие географические варианты линии ST8/SCCmecIV CA-MRSA. Ранее сообщалось о распространенном в Японии CA-MRSA варианте ST8/spa606(t1767)/SCCmecIV1 (ST8 CA-MRSA/J), который имеет уникальный японский подтип SCCmecIV (SCCmecIV1) и новый SaPIj50 с геном *tst* [261]; а также ST8 CA-MRSA с *spa779* (tUK: 11-19-12-21-17-34-24-24-34-24-24-34-22-25)/SCCmecIVx (неизвестный подтип) на Тайване; однако распространенность ST8 MRSA на Тайване была низкой (2,4 %) [474]. В Азии типы SCCmec среди штаммов линии ST8 являются отличающимися и уникальными. К линии ST8, *spa* тип t008 относится Лионский клон, который выявили прежде всего в госпитальных условиях, однако этот клон был причиной и внебольничных инфекций во Франции [168, 206].

В настоящем исследовании выявили российский вариант линии ST8/SCCmecIV CA-MRSA. Российские штаммы ST8-IVc имели уникальный генетический маркер - MbIN, такие штаммы широко распространены в Европейской, Сибирской и Дальневосточной регионах России с географической микроэволюцией, включающей типы *spa*. Такие

штаммы были связаны с развитием не только ИКМТ, но и с инвазивными инфекциями, такими как пневмония, сепсис, развившихся как во внебольничных условиях, так и в условиях стационаров [505, 533]. Глобальное эволюционное происхождение Российских штаммов ST8-IVc еще предстоит выяснить. Российские штаммы ST8-IVc, распространенные в Европейской и Сибирской частях России, демонстрировали резистентность к фторхинолонам, обеспечивающую избирательное преимущество, аналогично случаю с клоном USA300 [219, 482]. Также селективное преимущество российскому варианту ST8-IVc обеспечивает резистентность к хлорамфениколу [505]. Случаи резистентности к рифампицину были, возможно, связаны с широким его применением в клинической практике.

Штаммы MRSA варианта ST12 были выделены от двух пациентов с гнойно-некротическими осложнениями синдрома диабетической стопы, госпитализированных в правобережный стационар г. Красноярска в разное время. Клональный комплекс CC12 *S. aureus* достаточно редко распространен в мире. Так, штамм ST12 *sra* t156 был выделен от свиней в Германии в 1973 [179, 202], от цыплят [193]. Один изолят CC12 MSSA был изолирован от морской свинки в Швеции, у него был представлен оперон бета-лактамазы (*blaZ* / R / I), гены энтеротоксинов и гены IEC отсутствовали [378]. В 2009 г. были выделены 3 штамма ST12 *sra* t160 t1381 MSSA от госпитализированных пациентов в Испании [96], также были описаны единичные случаи выделения от людей, при этом у выделенных штаммов определили гены энтеротоксинов и гены IEC [336, 372].

ГЛАВА 7 Разработка варианта ПЦР для детекции линий ST239 и ST8, распространенных в России

7.1 Разработка М-ПЦР для определения штаммов MRSA линии ST239, распространенных в России

Нозокомиальные инфекции, вызванные MRSA, в мире ассоциированы с несколькими пандемическими клонами. Линия ST239 распространена во многих странах мира, например в странах Европы (Португалия, Германия, Чехия), в Южной Америке (Аргентина, Уругвай, Чили) в странах Азии и др. [158, 222]. Венгерский клон был выявлен в Венгрии в 1993 г., был доминирующим в 1994-1998 гг., но практически исчез в 2003-2004 гг. и в настоящее время вытеснен Южно-Германским клоном ST228/SCCmecI и Нью-Йоркским/Японским клоном ST5/SCCmecII [158]. В России выявлен вариант линии ST239, который отличается от штаммов, распространенных в других странах мира. Для больных с инфекциями, вызванными госпитальными штаммами MRSA, быстрое определение данной инфекции и адекватный выбор препаратов для антибактериальной терапии являются важными.

Генотипирование, в том числе ST-типирование являются золотым стандартом при определении клональной принадлежности штаммов MRSA. Однако недостатком генотипирования является сложность его выполнения и невозможность проведения в рутинной практике во многих лабораториях. М-ПЦР является доступной реакцией и ее можно проводить с использованием имеющегося в лабораториях ПЦР-оборудования, и этот метод менее трудоемкий, по сравнению с генотипированием.

Предложено использовать вариант М-ПЦР для быстрой детекции штаммов ST239 линии MRSA, распространенных в России. Для этого изучили молекулярно-генетические особенности разных клонов MRSA и установили, что комбинация четырех генов (*sea*, *sek*, *seq*, *cna*) или трех

генов (*sea*, *seq*, *cna*) были специфическими для штаммов ST239 линии MRSA, распространенных в России.

Штаммы MRSA, продуцирующие энтеротоксин SEA, кодируемый геном *sea* могут быть причиной синдрома токсического шока [165], пищевых токсикоинфекций, антибиотикассоциированной диареи (в комбинации с LukE-lukD -генами) [225] и других заболеваний. Кроме того, они могут вызывать инвазивные инфекции [205]. Два других энтеротоксина SEK и SEQ (гены *sek* и *seq*) закодированы в стафилококковых островах патогенности SaPI3 [534] и SaPI5, характерных для клона USA300 ST8 MRSA [182], а также в геноме бактериофага φSa3mw [MW2] клона USA400 ST1 MRSA [102]. Результатом действия данных энтеротоксинов является иммуносупрессия, которая способствует колонизации инфекции и последующей передачи, что играет роль в эволюции MRSA [181]. У Бразильского клона ST239/SCCmecIII/IIIА, родственного Венгерскому клону ST239/SCCmecIII, изначально отсутствовали гены энтеротоксинов *sea*, *sek* и *seq*. Возможно это связано с географическими отличиями в распространении Венгерского клона (который распространен в Южной Америке и Европе, в частности, в Португалии, Германии и Чехии) и Бразильского клона (который распространен на Тайване, в Китае, Индии, России и Европе, в частности, в Польше и Норвегии) [222]. В Японии Венгерский клон не выявлен и в основном распространен Нью-Йоркский/Японский клон [478]. Коллаген-адгезин, кодируемый геном *cna*, характерен для *S. aureus* или MRSA и способствует адгезии и повреждению коллагена, что может играть роль в развитии пневмонии [171], а также остеомиелита [197] и артрита [409].

Для детекции штаммов ST239 линии MRSA, распространенных в России, предложено использование М-ПЦР, основанной на выявлении трех генов вирулентности (*sea*, *seq* и *cna*) и двух дополнительных генов *mecA* - для идентификации MRSA и *nuc* - для дифференциации *S. aureus* от коагулазонегативных стафилококков. Таким образом, если в М-ПЦР

выявляли 4 или 5 указанных гена, то результаты оценивали как положительные и исследуемый штамм относили к ST239 линии MRSA, распространенных в России; если выявляли 3 и менее генов, то результаты оценивали как отрицательные.

Праймеры, используемые для постановки М-ПЦР указаны в Таблице 42.

Таблица 42 - Праймеры, используемые для проведения М-ПЦР

Изучаемые гены	Праймеры	Последовательность	размер продукта ПЦР (п.н.)
М-ПЦР			
<i>сна</i>	сна-QF1	5'-GGGAATAAATCAACGAATGTTACG	461
	сна-QR1	5'-ACTTCTTCCTTACCATGCTCTTG	
<i>sea</i>	sea-F1	5'-CTTGTAATGGTAGCGAGAA	373
	sea-R1	5'-CGGTCAATCGATTATTATCATG	
<i>nuc</i>	nuc1	5'-GCGATTGATGGTGATACGGTT	279
	nuc2	5'-AGCCAAGCCTTGACGAACTAAAGC	
<i>seq</i>	seq-F2	5'-CGCTTCAAGGAGTTAGTTCT	210
	seq-R2	5'-CTAAATTTTGATTCGCCAAC	
<i>mecA</i>	mecA-QF2	5'-GGGATCATAGCGTCATTATTCC	141
	mecAQR2	5'-CGATGCCTATCTCATATGC	

Праймеры для выявления генов, кодирующих синтез энтеротоксинов *sea* и *seq*, были разработаны на основе изучения последовательности генома MW2 (номер доступа в GeneBank NC003923) и клона USA300 (номер доступа в GeneBank NC007793). Праймеры для выявления гена *сна* были созданы на основании изучения последовательности генома штамма NN1 клона ST30 CA-MRSA (номер доступа в GeneBank AB266874).

Условия проведения разработанной М-ПЦР: начальный цикл 94 °С 3 мин, далее 30 циклов: денатурация 94 °С 90 с, отжиг праймеров 55 °С 60 с,

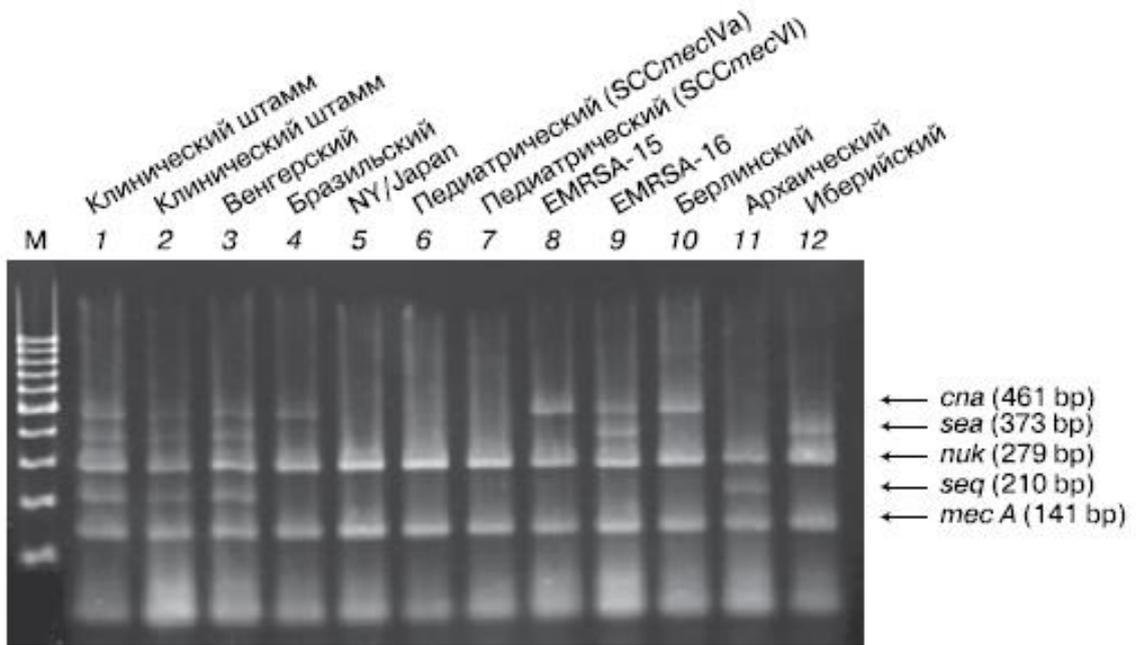
синтез 72 °С 60 с, завершающий цикл 72 °С 10 мин. Далее для выявления ПЦР-продукта проводили электрофорез в 2 % агарозном геле с бромистым этидием. Использовали маркер 100 п.н. DNA ladder (Sigma-Aldrich, Токио).

В качестве контрольных использовали штаммы MRSA: Нью-Йорк/японский клон ST5/SCCmecII, педиатрический клон ST5/SCCmecIV, EMRSA-15 ST22/SCCmecIV, EMRSA-16 ST36/SCCmecII, берлинский клон ST45/SCCmecIVa, венгерский клон ST239/SCCmecIII, бразильский клон ST239/SCCmecIIIa, иберийский клон ST247/SCCmecIA, архаический клон ST250/SCCmecI; а также штамм MSSA ATCC 29213, MRSE KE1, *S. epidermidis* ATCC 14990 (Таблица 43).

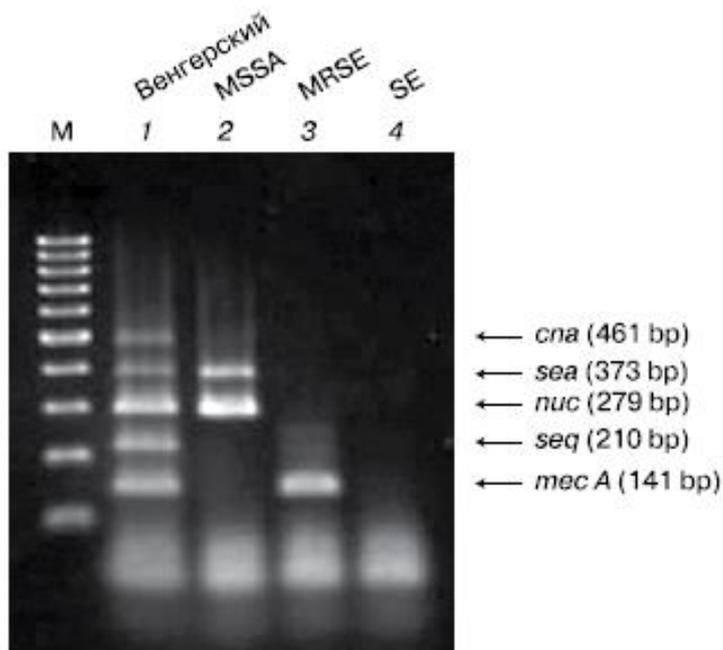
Результаты М-ПЦР, предназначенной для определения указанных пяти генов, характерных для венгерского клона, приведены на рисунке (Рисунок 58 А, линия 3); размеры продуктов ПЦР составили: 461 п.н. для *spa*, 373 п.н. для *sea*, 279 п.н. для *nuc*, 210 п.н. для *seq*, и 141 п.н. для *mecA*. У других восьми пандемических клонов MRSA выявили четыре и меньше полос (Рисунок 58 А, линии 4 - 12). Штамм MSSA ATCC 29213 дал только две полосы (*sea* и *nuc*), штамм MRSE KE1 только одну полосу (*mecA*) и у штамма SE ATCC 14990 не обнаружено не одной из полос, как и ожидалось (Рисунок 58 В, линии 2 - 4).

У двух штаммов, изолированных в России, выявлено наличие 5 полос; такие результаты были расценены как положительная М-ПЦР (Рисунок 58 А, строки 1 и 2).

Разработанный М-ПЦР позволяет быстро и точно проводить определение принадлежности MRSA к ST239, распространенных в России.



А



Б

Рисунок 58 – Результаты М-ПЦР для детекции штаммов линии ST239, распространенных в России

7.2 Разработка ПЦР для определения штаммов MRSA линии ST8, распространенных в России

В геноме штамма OC8, относящегося к генетической линии ST8, выявили наличие большой геномной инверсии MbIN. Так как было установлено, что наличие большой инверсии MbIN характерно для штаммов, распространенных не только в г. Красноярске, Красноярском крае, но и в других городах РФ, в т.ч. в Европейского, Сибирского и Дальневосточного регионов России, были созданы праймеры. Праймеры для ПЦР были разработаны на основе изучения полной последовательности генома штамма OC8 (Таблица 44) (A-C и B-D соответственно). Чтобы обнаружить соответствующий некодируемый участок штамма FPR3757 USA300, разработали праймеры (A-B и C-D соответственно) для ПЦР на основе изучения полной последовательности генома штамма FPR3757 USA300 (Рисунок 57 А и В). ПЦР с наборами праймеров (A-B) и (C-D) дали положительные результаты у штамма USA300-0114, так как у него отсутствует большая инверсия MbIN (Рисунок 57 С), также как и у штамма FPR3757 USA300. ПЦР с наборами праймеров (A-B и C-D) дали отрицательные результаты для штамма OC8, так как у него имеется большая геномная инверсия MbIN (Рисунок 53 С). Вместо этого ПЦР с наборами праймеров (A-C) и (B-D) дали положительные полосы для предсказанных последовательностей у штамма OC8 и дали отрицательные результаты у штамма USA300-0114 (Рисунок 53 С).

Условия ПЦР для набора праймеров A-B (контроль отсутствия MbIN): цикл начальный 95 °С на протяжении 5 мин.; 30 циклов амплификации - денатурация 95 °С 30 сек.; отжиг 65 °С 1 мин.; синтез 1 мин. 30 сек. 72 °С и заключительный этап 5 мин 72 °С. Размер ПЦР продукта 1016 п.н.

Таблица 44 – Праймеры для выявления большой инверсии MbIN

Установленный праймер	Праймер	Последовательность праймера
USA300 A-B	(A) USA300L-F	5'-GTACAACAAGGTGAAATCAAAGTGG
	(B) USA300L-R	5'-GCACCTTGATATGTTGGCCA
USA300 C-D	(C) USA300R-F	5'-CCAATTACTTTTATAAGGTGGCCT
	(D) USA300R-R	5'-CACTGAACAAGATAAAGTAAGTGC
OC8 A-C	(A) OC8L-F	Такой же как USA300L-F (A)
	(C) OC8L-R	Такой же как USA300R-F (C)
OC8 B-D	(B) OC8R-F	Такой же как USA300L-R (B)
	(D) OC8R-R	Такой же как USA300R-R (D)

Программа ПЦР для набора праймеров C-D (контроль отсутствия MbIN): цикл начальный 95 °С на протяжении 5 мин.; 30 циклов амплификации - денатурация 95 °С 30 сек.; отжиг 60 °С 1 мин.; синтез 6 мин. 72 °С и заключительный этап 5 мин 72 °С. Размер ПЦР продукта 3 т.п.н.

Программа ПЦР для набора праймеров A-C (обнаружение MbIN): цикл начальный 95 °С на протяжении 5 мин.; 30 циклов амплификации - денатурация 95 °С 30 сек.; отжиг 60 °С 1 мин.; синтез 2 мин. 30 сек. 72 °С и заключительный этап 5 мин 72 °С. Размер ПЦР продукта 2128 п.н.

Программа ПЦР для набора праймеров B- D (обнаружение MbIN): цикл начальный 95 °С на протяжении 5 мин.; 30 циклов амплификации - денатурация 95 °С 30 сек.; отжиг 62 °С 1 мин.; синтез 2 мин. 30 сек. 72 °С и заключительный этап 5 мин 72 °С. Размер ПЦР продукта 2128 п.н.

Выявление ПЦР-продуктов производили методом электрофореза в 1,5 % геле из агарозы с применением этидия бромиды. Для определения

молекулярной массы ПЦР-продукта помимо заведомо положительных контролей применяли 10000 bp KAPA Universal DNA ladder (KAPA, США).

Заключение по главе

На основании проведенных исследований, а именно анализа геномов ранее изученных штаммов MRSA, представленных в GeneBank, выявили уникальность структур генома у штаммов MRSA, представителей генетических линий ST8 и ST239. Выявили наличие большой геномной инверсии MbIN, характерной именно для штаммов генетической линии ST8 MRSA, циркулирующих на территории г. Красноярска, Красноярского края, РФ. Благодаря сконструированным праймерам и разработанным условиям ПЦР данные методы позволяют дифференцировать штаммы MRSA от других генетических линий.

Разработанные варианты М-ПЦР и ПЦР позволяют доступно для клинической практики проводить выявление и дифференциацию штаммов MRSA, относящихся генетическим линиям ST239 и ST8, циркулирующих как на территории г. Красноярска, Красноярского края, так и на территории РФ.

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 распространенные штаммы 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 [182], 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*, что характерно для CA-MRSA [118, 169, 184, 284, 485, 505]. 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 (EbhΔ) [148, 306]. 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 изменение 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 будет способствовать большему пониманию 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. Красноярск, Красноярского края, был предложен метод М-ПЦР и ПЦР для детекции штаммов MRSA, относящихся к генетическим вариантам ST239_{Крас} и ST8_{Крас}, который может быть применен 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. 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_{Kras} 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_{Kras} 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 Cp_r), 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_{Kras} резистентны к фторхинолонам (91,1 %, мутации в генах *GyrA*, *GrlA*), хлорамфениколу (69,5%, *cat* в плазмиде Cp_r), аминогликозидам (16,7 % , *aadD* в плазмиде pSK41), макролидам и линкозамидам (7,8 %, *ermC* в плаزمиде pEmr/C_{lir}), 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 мупироцину. Плазмиды pCp^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.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Необходимо проводить исследования о распространении MRSA во внебольничных условиях, а также в условиях стационаров для оценки эпидемиологической ситуации.
2. Необходимо проводить типирование изолятов MRSA и определять профили вирулентности, антибиотикорезистентности как для оценки эпидемиологической ситуации, так и прогноза эволюции микроорганизмов.
3. Необходимо проводить дифференциальную диагностику HA-MRSA и CA-MRSA для проведения эффективной этиотропной терапии и профилактики.
4. Необходимо внедрять меры неспецифической профилактики распространения изолятов HA-MRSA и CA-MRSA.
5. Необходимо выявлять МПК к ванкомицину в рутинной практике, в частности, с помощью метода E-теста с целью определения возможности использования ванкомицина для лечения инфекций, вызванных MRSA.

ПЕРСПЕКТИВНЫЕ НАПРАВЛЕНИЯ ДАЛЬНЕЙШЕЙ РАЗРАБОТКИ ТЕМЫ

1. Необходимо продолжить изучение распространения штаммов MRSA на территории г. Красноярска, Красноярского края и определять их генетический вариант, профиль вирулентности, антибиотикорезистентности и механизмы резистентности.
2. Необходимо выявить влияние наличия большой геномной инверсии на вирулентность штаммов, относящихся к одной из наиболее глобально распространенных линий ST8.
3. Необходимо провести апробацию предложенных методов выявления наиболее распространенных клонов MRSA в Красноярском крае.
4. Необходимо внедрить в лабораторную диагностику, разработанные быстрой детекции генетических вариантов, наиболее распространенных на территории Красноярского края.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

MRSA	— метициллинрезистентные <i>S. aureus</i>
VRSA	— ванкомицинрезистентные <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 A
SCCmec	— стафилококковая хромосомная кассета
<i>agr</i>	— ген, кодирующий регуляторную систему
PFGE	— гель-электрофорез в пульсирующем поле
MLST	— генотипирование по генам «домашнего хозяйства»
<i>coa</i>	— ген, кодирующий коагулазу
SMRT	— метод секвенирования long-read single-molecule real-time
M-ПЦР	— мультиплексная полимеразная цепная реакция
IWG-SCC	— International Working Group on SCCmec
СОШ	— средне-образовательная школа
ОРИТ	— отделение реанимации и интенсивной терапии
CLSI	— Институт клинических и лабораторных стандартов
EUCAST	— Европейская комиссия по тестированию на противомикробную восприимчивость
ORF	— открытая рамка считывания
БЛРС	— бета-лактамазы расширенного спектра
МБЛ	— металло-β-лактамазы
МПК	— минимальная подавляющая концентрация
м.к.	— микробных клеток
ВОЗ	— Всемирная организация здравоохранения
ДНК	— дезоксирибонуклеиновая кислота
LB	— среда Lisogenic Broth
<i>mecA</i>	— ген, кодирующий ПСБ2а
<i>nuc</i>	— ген, кодирующий нуклеазу
MSSA	— метициллинчувствительные <i>S. aureus</i>
ЭДТА	— этилендиаминтетрауксусная кислота
<i>lukPVSF, lukM, lukE-lukD</i>	— гены, кодирующие лейкоцидины
<i>hly, hla, hlg-v, hlg, u hld</i>	— гены, кодирующие гемолизины
<i>psma</i>	— ген, кодирующий фенолорастворимые модулины
	— белковый цитолизин
<i>eta, etb и etd</i>	— гены, кодирующие эксфолиатины
<i>tst</i>	— ген, кодирующий токсин синдрома токсического шока
	— гены, кодирующие стафилококковые энтеротоксины
<i>seb, sea, sed, sec, seg, see, sei, seh, sej, sel, sek, sen, sem, sep, seo, ser, seq, seu, set</i>	
<i>icaA, icaD, eno, fib, fnbA, fnbB, ebpS, clfA, clfB, sdrC, sdrD, sdrE, cna, bbp</i>	— гены, кодирующие адгезины

<i>ACME-arcA</i>	—	ген, кодирует вторичную систему аргинин-деиминазы аргинин катаболического мобильного элемента
<i>opp3</i>	—	ген, кодирует ABC-транспортер
<i>ssl</i>	—	ген, кодирующий стафилококковые суперантигенподобные белки
<i>edin</i>	—	ген ингибитора дифференцировки эпидермальных клеток
TSST-1	—	токсин синдрома токсического шока
KOE	—	колониеобразующая единица
SEA	—	энтеротоксин
<i>blaZ</i>	—	ген, кодирующий резистентность к ампициллину
<i>tetK</i>	—	ген, кодирующий резистентность к тетрациклину
<i>tetM</i>	—	ген, кодирующий резистентность к тетрациклину
<i>aac(6')/aph(2'')</i>	—	ген, кодирующий резистентность к гентамицину, канамицину
<i>aph(3')-IIIa</i>	—	ген, кодирующий резистентность к гентамицину, канамицину
<i>ant(4)-Ia</i>	—	ген, кодирующий резистентность к гентамицину, канамицину
<i>aadE</i>	—	ген, кодирующий резистентность стрептомицину
<i>aadD</i>	—	ген, кодирующий резистентность неомицину
<i>spc</i>	—	ген, кодирующий резистентность спектиномицину
<i>ErmA</i>	—	ген, кодирующий резистентность макролидам, линкозамидам (эритромицину, клиндамицину)
<i>ErmB</i>	—	ген, кодирующий резистентность макролидам, линкозамидам (эритромицину, клиндамицину)
<i>ErmC</i>	—	ген, кодирующий резистентность макролидам, линкозамидам (эритромицину, клиндамицину)
<i>MrsA/ mrsB</i>	—	ген, кодирующий резистентность макролидам, линкозамидам (эритромицину, клиндамицину)
<i>gyrA</i>	—	ген, кодирующий резистентность фторхинолонам
<i>grlA</i>	—	ген, кодирующий резистентность фторхинолонам
<i>cat</i>	—	ген, кодирующий резистентность хлорамфениколу
<i>ble</i>	—	ген, кодирующий резистентность блеомицин
<i>qacA</i>	—	ген, кодирующий резистентность акрифлавин/аммонию хлориду (бензалконию хлориду, бензетонию хлориду, хлоргексидину биглюконату, этидиум бромиду)
<i>mer</i>	—	ген, кодирующий резистентность к ртути
<i>cadA</i>	—	ген, кодирующий резистентность к кадмию
<i>cadC</i>	—	ген, кодирующий резистентность к кадмию
мРНК	—	матричная рибонуклеиновая кислота
рРНК	—	рибосомальная рибонуклеиновая кислота
<i>sarA, sarR, mgrA, saeR, saeS, sarX, rot u srrAB</i>	—	гены транскрипционной регуляции
ИКМТ	—	инфекции кожи и мягких тканей
EMRSA	—	эпидемический клон MRSA
USA300	—	клон MRSA
PVL	—	лейкоцедин Пантон-Валентина
MLVA	—	Multiple-Locus Variable number tandem repeat Analysis
SE	—	стафилококковые энтеротоксины

IEC	— кластер генов ускользания от иммунного надзора (Immune evasion cluster)
<i>sak</i>	— ген, кодирующий стафилокиназу
<i>scn</i>	— ген, кодирующий ингибитор активации комплемента, блокирующий C3-конвертазу
<i>chp</i>	— ген, кодирующий ингибитор хемотаксиса лейкоцитов
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
GISA	— гликопептид-промежуточный <i>S. aureus</i>
GRSA	— гликопептид-резистентные изоляты <i>S. aureus</i>
SNP	— однонуклеотидные полиморфизмы
ORFs	— открытая рамка считывания
млн.п.н.	— миллион пар нуклеотидов
т.п.н.	— тысяч пар нуклеотидов
п.н.	— пара нуклеотидов
SaPIs	— стафилококковые острова патогенности
vSa	— геномные острова
VRE	— энтерококки, устойчивые к ванкомицину
Tn	— транспозоны
IS	— инсерционные элементы
<i>mecC</i>	— ген, кодирующий дополнительный пенициллинсвязывающий белок
BORSA	— штаммы <i>S. aureus</i> с пограничной устойчивостью к оксациллину
PBP2a	— дополнительный пенициллинсвязывающий белок 2a
MALDI-TOF MS	— матрица лазерная десорбционно-ионизирующая время-пролетная масс-спектрометрия
<i>egc</i>	— кластер генов <i>seg</i> , <i>sei</i> , <i>sem</i> , <i>sen</i> , <i>seo</i> , обеспечивающих синтез энтеротоксинов,
<i>cl2ag</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)
XDR	— микроорганизмы, резистентные ко всем классам антибактериальных препаратов, кроме 1 или 2 классов (экстремальная или чрезвычайно высокая резистентность)
PDR	— микроорганизмы, резистентные ко всем классам антибактериальных препаратов (панрезистентные)
СДС	— синдром диабетической стопы
БАЛ	— бронхоальвеолярный лаваж
ХО	— хирургическое отделение
АМ	— аминогликозиды
ТЕТ	— тетрациклины
МА	— макролиды
ЛИ	— линкозамиды
ФХ	— фторхинолоны

РИФ	—	рифампицин
ХА	—	хлорамфеникол
СТ	—	сульфаметаксазол/триметоприм
SAgS	—	суперантигены
PSM α	—	фенолорастворимые модулины
АСМЕ	—	аргинин катаболический мобильный элемент
SmaI	—	рестрикционный фермент
НГОБ	—	неферментирующие грамотрицательные бактерии
MRSE	—	метициллинрезистентные <i>S. epidermidis</i>
КОС	—	коагулазоотрицательные стафилококки
ВХП	—	воздухоносные пути
НАР	—	пневмония, связанная с уходом за больным (healthcare-associated pneumonia)
ССВР	—	Синдром системной воспалительной реакции
ХОБЛ	—	хроническая обструктивная болезнь легких
pCp ^r	—	плазида резистентности к хлорамфениколу
φSa	—	Бактериофаг стафилококковый
<i>ebh</i>	—	ген, кодирующий гигантский белок Ebh
МbIN	—	одно миллионная геномная инверсия

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Абаев, И.В. Генотипирование изолятов *Staphylococcus aureus*, выделенных при вспышке эксфолиативного дерматита новорожденных / И. В. Абаев, Ю. П. Скрябин, Э. И. Печерских, И. П. Мицевич, Е. В. Мицевич, О. В. Коробова, В. А. Гриценко, Э. А. Светоч // Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. - 2014. - Т. 16, № 1. - С. 70-77.
2. Авдеев, С.Н. Нозокомиальная пневмония у взрослых: Национальные рекомендации / С. Н. Авдеев, В. Б. Белобородов, Б. З. Белоцерковский, Г. М. Галстян, Б. Р. Гельфанд, А. В. Дехнич, Н. Н. Климко, Р. С. Козлов, А. Л. Левит, О. Д. Мишнёв, Ю. С. Полушин, Д. Н. Проценко, Г. К. Решедько, В. А. Руднов, С. В. Сидоренко, А. И. Синопальников, А. Г. Чучалин, А. И. Щёголев, С. В. Яковлев, А. И. Ярошецкий // Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. - 2009. - Т. 11 № 2. - С. 100-142.
3. Афанасьев, М.В. Молекулярная характеристика метициллин-резистентных штаммов *Staphylococcus aureus*, изолированных в клиниках г. Москвы / М. В. Афанасьев, С. В. Каракашев, И. Н. Ильина, А. М. Салем Али-Салами, С. В. Сидоренко, В. М. Говорун // Молекулярная генетика, микробиология и вирусология. - 2010. - Т. 2, - С. 24-30.
4. Бахарев, И.В. Синдром диабетической стопы: диагностика, лечение, профилактика. Качество жизни / И. В. Бахарев, Ю. А. Редькин // Медицина. - 2003. - № 1. - С. 35-38.
5. Белоусова, Т.А. Инфекционные осложнения в колоректальной хирургии / Т. А. Белоусова // Вопросы онкологии. - 2012. - Т. 58 № 6. - С. 736-743.
6. Богомолова, Н.С. Динамика устойчивости к антибиотикам и частота выделения стафилококков и энтерококков у больных отделений реконструктивной хирургии / Н. С. Богомолова, Л. В. Большаков, С. М. Кузнецова, Т. Д. Орешкина // Антибиотики и химиотерапия. - 2011. - Т. 56, № 5-6. - С. 37-45.

7. Брусина, Е.Б. Эпидемиологический мониторинг циркуляции эпидемически значимых штаммов MRSA на территории Кемеровской области / Е. Б. Брусина, Л. С. Глазовская, Т. В. Ефимова, А. Е. Гончаров // Эпидемиология и вакцинопрофилактика. - 2012 -№ 5. - С. 20-24.

8. Брусина, Е.Б. Эпидемиология и эпидемиологический мониторинг инфекций, вызванных метициллинрезистентными штаммами золотистого стафилококка: федеральные клинические рекомендации / Е. Б. Брусина, О. А. Дмитренко, Л. С. Глазовская, Т. В. Ефимова - Москва: 2014. - 50 с.

9. Вазина, И.Р. Летальность и причины смерти обожженных / И. Р. Вазина, С. Н. Бугров // Российский медицинский журнал. - 2009 -№ 3. - С. 14-16.

10. Воробьева, О.Н. Этиология гнойно-септических процессов у ожоговых больных / О. Н. Воробьева, Л. И. Денисенко, Н. М. Жилина // Бюллетень СО РАМН. - 2010. - Т. 30, № 6. - С. 57-63.

11. Гасретова, Т.Д. Формирование и распространение MRSA-штаммов у больных с гнойно-воспалительными заболеваниями / Т. Д. Гасретова, О. Н. Синькова, Г. Г. Харсеева, А. Ю. Миронов // Клиническая лабораторная диагностика. - 2013. - № 4. - С. 33-36.

12. Гельфанд, Б.Р. Нозокомиальная пневмония у взрослых: Российские национальные рекомендации / Б. Р. Гельфанд - Москва: ООО "Издательство Медицинское информационное агентство", 2016. - 176 с.

13. Глазовская, Л.С. Оценка эффективности деколонизации назального носительства *Staphylococcus aureus* у медицинского персонала / Л. С. Глазовская, А. С. Печеник, О. А. Дмитренко, О. В. Перец, Е. Е. Филиппова, А. А. Мельников, Е. Б. Брусина // Эпидемиология и Вакцинопрофилактика. - 2016. - № 3. - С. 35-40.

14. Гончаров, А.Е. ПЦР-идентификация фрагментов генов островов патогенности в метициллинрезистентных штаммах *Staphylococcus aureus* / А. Е. Гончаров, Л. П. Зуева, А. Н. Суворов, Л. С. Глазовская, Е. Б. Брусина, И. С. Азизов, А. В. Лавриненко, Т. Н. Суборова, Д. В. Разумова, В. Ю. Хорошилов,

Б. И. Асланов, А. А. Долгий // Эпидемиология и инфекционные болезни. - 2013. - № 1. - С. 19-23.

15. Гончаров, А.Е. Ведущие эпидемиологически значимые клоны золотистого стафилококка, циркулирующие в географически удаленных регионах Евразии / А. Е. Гончаров, Л. П. Зуева, А. Н. Суворов, Л. С. Глазовская, Е. Б. Брусина, И. С. Азизов, А. В. Лавриненко, Т. Н. Суборова, О. Н. Софронова, О. А. Ушкарева, В. К. Ядрихинская // Медицинский альманах. - 2014. - № 4. - С. 27-30.

16. Гончаров, А.Е. Spa-сиквенстипирование штаммов золотистого стафилококка, циркулирующих в географически удаленных регионах Евразии / А. Е. Гончаров, Л. П. Зуева, А. Н. Суворов, Л. С. Глазовская, Е. Б. Брусина, И. С. Азизов, А. В. Лавриненко, Т. Н. Суборова, В. В. Колоджиева, А. С. Мохов, Д. В. Азаров // Вестник Северо-Западного государственного медицинского университета им. И.И. Мечникова. - 2014 -Т. 6, № 2. - С. 19-22.

17. Гончаров, А.Е. Штаммы с повышенной частотой мутаций в популяциях *S. aureus* различных spa\сиквенстипов: потенциальное эпидемиологическое значение / А. Е. Гончаров // Медицина в Кузбассе. - 2015. - Т. 14, № 4. - С. 26-29.

18. Гостев, В.В. SCCmec кассеты, эволюция и генетические линии метициллинорезистентных золотистых стафилококков / В. В. Гостев, С. В. Сидоренко // Антибиотики и химиотерапия. - 2012. - Т. 57, № 9-10. - С. 38-46.

19. Гостев, В.В. Распространение генов комплекса Immune evasion cluster и других факторов вирулентности у *Staphylococcus aureus* / В. В. Гостев, А. Е. Гончаров, М. А. Грачева, С. В. Сидоренко // Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. - 2013. - Т. 15, № 4. - С. 270-278.

20. Гостев, В.В. Антибиотикорезистентность метициллинрезистентных *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. - № 1-2. - С. 3-9.

21. Гостев, В.В. Молекулярные механизмы снижения чувствительности к цефтаролину метициллинорезистентных *Staphylococcus aureus* / В. В. Гостев, О. С. Калиногорская, О. А. Дмитренко, И. А. Цветкова, С. В. Сидоренко // Антибиотики и химиотерапия. - 2016. - Т. 61, № 9-10. - С. 17-21.

22. Давыдов, М.И. Инфекции в онкологии / М. И. Давыдов, Н. В. Дмитриева - Москва: Практическая медицина, 2009. - 472 с.

23. Демиховская, Е.В. MRSA - знаменитый и неизвестный метициллин-резистентный *S. aureus*: механизмы резистентности, лабораторная диагностика, клиника и эпидемиология / Е. В. Демиховская // Болезни и антибиотики. - 2012. - № 2. - С. 40-47.

24. Дехнич, А.В. Эпидемиология антибиотикорезистентности нозокомиальных штаммов *Staphylococcus aureus* в России: результаты многоцентрового исследования / А. В. Дехнич, И. А. Эйдельштейн, А. Д. Нарезкина, Г. Е. Афиногенов, Л. И. Ахметова, Л. Г. Боронина, Е. Н. Гугуцидзе, Л. В. Гудкова, Д. Э. Здзидовецкий, В. Н. Ильина, О. И. Кречикова, Н. Е. Марусина // Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. - 2002. - Т. 4, № 4. - С. 325-336.

25. Дехнич, А.В. Эпидемиология резистентности штаммов *S. aureus*, выделенных от пациентов в ОРИТ российских стационаров: результаты многоцентрового исследования / А. В. Дехнич, А. А. Никулина, Е. Л. Рябкова, О. И. Кречикова, М. В. Сухорукова, Р. С. Козлов // Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. - 2008. - Т. 10, №4. - С. 333-345.

26. Дехнич, А.В. Терапия нозокомиальных стафилококковых инфекций в России: время менять стереотипы / А. В. Дехнич // Врач. - 2010 - № 10. - С. 18-22.

27. Дмитренко, О.А. Исследование полиморфизма тес гена у метициллин-устойчивых штаммов *Staphylococcus aureus*, выделенных в стационарах в разных регионах России / О. А. Дмитренко, И. А. Шагинян, А. Л. Гинсбург // Молекулярная генетика, микробиология и вирусология. - 2005. - № 3. - С. 11-7.

28. Дмитренко, О.А. Молекулярно-генетическое типирование метициллин-резистентных штаммов *Staphylococcus aureus*, изолированных в стационарах различных регионов России и Беларуси / О. А. Дмитренко, И. А. Шагинян, В. И. Прохоров, С. М. Матвеев, А. Л. Гинсбург // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. - 2005. - № 4. - С. 46-52.

29. Дмитренко, О.А. Определение генов пирогенных токсинов суперантигенов у клинических изолятов метициллинрезистентных *Staphylococcus aureus* / В. Я. Прохоров, Ф. С. Луер, Т. Н. Суборова, И. И. Волков, В. И. Карабак, А. Л. Гинсбург // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. - 2006 -№ 2. - С. 36-42.

30. Дмитренко, О.А. Токсины золотистого стафилококка и их токсины: роль в патогенезе и профилактике стафилококковой инфекции / О. А. Дмитренко // Молекулярная медицина. - 2016. - Т. 14, № 4. - С. 10-19.

31. Доброквашин, С.В. Лечение больных с гнойно-некротическими осложнениями синдрома диабетической стопы / С. В. Доброквашин, Р. Р. Якупов, А. З. Валеев // Акушерство. Гинекология. Эндокринология. - 2011. - Т. 54, №6. - С. 97-99.

32. Ефимова, Т.В. Эпидемиологические особенности инфекций, вызванных метициллинрезистентными *Staphylococcus aureus* в Кемеровской области / Т. В. Ефимова, Л. С. Глазовская, Е. Б. Брусина, А. Е. Гончаров // Медицинский альманах. - 2011. - № 5. - С. 204-206.

33. Ефимова, Т.В. Эпидемический процесс инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи, вызванных метициллинрезистентными стафилококками: реальность и перспективы / Т. В. Ефимова, Л. С.

Глазовская, Е. Б. Брусина, О. А. Дмитренко // Медицинский альманах. - 2014 - № 4. - С. 22-27.

34. Жданюк, А.С. Нозокомиальная пневмония у травматологических больных: результаты проспективного наблюдательного исследования / А. С. Жданюк, О. У. Стецюк, О. В. Сивая, И. В. Гудков, О. И. Кречикова // Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. - 2010. - Т. 12, № 2. - Р. 106-116.

35. Заборова, В.А. Особенности стафилококковой микрофлоры кожи у спортсменов разных специализаций / В. А. Заборова, В. Г. Арзуманян, Т. А. Артемьева, Л. М. Бутовченко, К. Г. Гуревич, М. В. Ивкина // Курский научно-практический вестник "Человек и его здоровье". - 2015. - № 1. - С. 78-82.

36. Зеленина, Т.А. Особенности возбудителей гнойно-некротического процесса у больных с синдромом диабетической стопы / Т. А. Зеленина, Е. Е. Горлинская, Н. В. Ворохобина, А. Б. Земляной // Вестник Национального медико-хирургического Центра им. Н.И. Пирогова. - 2012. - Т. 7, № 2. - С. 82-84.

37. Зубков, М.Н. Сбор, транспортировка биологического материала и трактовка результатов микробиологических исследований / М. Н. Зубков // Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. - 2004. - Т. 6, № 2. - С. 143-154.

38. Зырянов, С.К. Современные проблемы инфекций, вызванных MRSA и пути их решения / С. К. Зырянов, И. Н. Сычев, Ю. Ш. Гущина // Антибиотики и химиотерапия. - 2017. - Т. 62, №7-8. - С. 69-79.

39. Маниатис, Т. Методы генетической инженерии. Молекулярное клонирование / Т. Маниатис, Э. Фрич, Д. Сэмбрук - Москва: Мир, 1984. - 480 с.

40. Привольнев, В.В. Структура возбудителей и их антибиотикорезистентность при инфекциях нижних конечностей у больных сахарным диабетом / В. В. Привольнев, Г. К. Решедько, В. А. Савкин, О. И.

Кречикова // Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. - 2009. - Т. 11, № 1. - С. 86-89.

41. Рачина, С.А. Структура бактериальных возбудителей внебольничной пневмонии в многопрофильных стационарах Смоленска / С. А. Рачина, Р. С. Козлов, Е. П. Шаль, И. В. Устюжанин, О. И. Кречиков, Н. В. Иванчик, И. В. Гудков, О. Ю. Асафьева, И. А. Гучев, С. А. Гуляева, Ю. В. Бурдинская, С. Б. Яцышина, Т. С. Астахова, Я. Б. Бейкин, Л. Г. Беседина // Пульмонология. - 2011. - № 1. - С. 5-18.

42. Розова, Л.В. Антибиотикорезистентность возбудителей хронического посттравматического остеомиелита / Л. В. Розова, Н. В. Годовых // Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. - 2016. - Т. 18, № 1. - С. 63-67.

43. Романов, А.В. Типирование MRSA: какие методы являются оптимальными для решения различных задач? / А. В. Романов, А. В. Дехнич // Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. - 2011. - Т. 13, № 2. - С. 168-176.

44. Романов, А.В. Молекулярная эпидемиология штаммов *Staphylococcus aureus* в детских стационарах России / А. В. Романов, А. В. Дехнич, М. В. Эйдельштейн // Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. - 2012. - Т. 14 №3. - С. 201-209.

45. Романов, А.В. Молекулярная эпидемиология внутрибольничных золотистых стафилококков в стационарах различных регионов России / А. В. Романов, А. В. Чернова, М. В. Эйдельштейн // Молекулярная медицина. - 2013. - Т. 4, - С. 55-66.

46. Романов, А.В. Антибиотикорезистентность нозокомиальных штаммов *Staphylococcus aureus* в стационарах России: результаты многоцентрового эпидемиологического исследования «МАРАФОН» в 2013-2014 / А. В. Романов, А. В. Дехнич, М. В. Сухорукова, Е. Ю. Склеенова, Н. В. Иванчик, М. В. Эйдельштейн, Р. С. Козлов // Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. - 2017. - Т. 19, № 1. - С. 57-62.

47. Руднов, В.А. Клинические рекомендации по диагностике и лечению тяжелого сепсиса и септического шока в лечебно-профилактических организациях Санкт-Петербурга / В. А. Руднов // Вестник анестезиологии и реаниматологии. - 2016. - Vol. 13, № 5. - P. 88-94.

48. Рундо, А.И. Современные аспекты этиологии и патогенеза синдрома диабетической стопы / А. И. Рундо // Новости хирургии. - 2015. - Т. 23, № 1. - С. 97-104.

49. Сабирова, Е.В. Антибиотикорезистентность нозокомиальных штаммов *Staphylococcus spp.*, выделенных в ожоговом центре в 2002-2008 гг / Е. В. Сабирова, Н. А. Гординская, Н. В. Абрамова, Е. С. Некаева // Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. - 2010. - Т. 12, № 1. - С. 77-81.

50. Самарцев, В.А. Особенности инфицирования ожоговых ран / В. А. Самарцев, Ю. А. Еньчева, М. В. Кузнецова, Т. И. Карпунина // Новости хирургии. - 2014. - Т. 22, № 2. - С. 199-206.

51. Страчунский, Л.С. Внебольничные MRSA - новая проблема антибиотикорезистентности / Л. С. Страчунский, Ю. А. Белькова, А. В. Дехнич // Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. - 2005. - Т. 7, № 1. - С. 32-46.

52. Сухорукова, М.В. Антибиотикорезистентность нозокомиальных штаммов *S. aureus* в стационарах выделенных от России: результаты многоцентрового эпидемиологического исследования МАРАФОН в 2011-2012 гг. / М. В. Сухорукова, Е. Ю. Склеенова, Н. В. Иванчик, А. В. Тимохова, М. В. Эйдельштейн, А. В. Дехнич, Р. С. Козлов // Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. - 2014. - Т. 16, №4. - С. 280-288.

53. Терехова, Р.П. Возбудители остеомиелита длинных костей и их резистентность / Р. П. Терехова, В. А. Митиш, Ю. С. Пасхалова, Г. Е. Складан, С. А. Прудникова, Л. А. Блатун // Раны и раневые инфекции. Журнал имени проф. Б.М. Костючёнка. - 2016. - Т. 3, № 2. - С. 24-30.

54. Токмакова, А.Ю. Современная концепция диагностики и лечения хронических ран у больных с синдромом диабетической стопы / А. Ю. Токмакова // Сахарный диабет. - 2009. - № 1. - С. 14-17.

55. Туркутюков, В.Б. Этиология гнойно-септических осложнений при ожоговой травме и мониторинг чувствительности микроорганизмов к антибиотикам / В. Б. Туркутюков, Т. Д. Ибрагимова, Е. В. Шмагунова // Тихоокеанский медицинский журнал. - 2012. - № 4. - С. 70-72.

56. Тюрин, Ю.А. SCCmec-типирование метициллинорезистентных штаммов *Staphylococcus aureus*, выделенных от госпитализированных и амбулаторных пациентов в Казани / Ю. А. Тюрин, Л. Т. Баязитова, О. Ф. Тюпкина, Р. С. Фассахов // Клиническая Микробиология и Антимикробная Химиотерапия. - 2013. - Том 15, № 1. - Р. 66-71.

57. 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.

58. 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.

59. 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.

60. Черненькая, Т.В. Чувствительность к антибактериальным препаратам метициллинрезистентных стафилококков, выделенных от пациентов стационара скорой медицинской помощи / Т. В. Черненькая, Н. В. Евдокимова // Медицинский алфавит. - 2017. - Т. 1, № 7. - С. 32-35.

61. Чучалин, А.Г. Нозокомиальная пневмония у взрослых: практические рекомендации по диагностике, лечению и профилактике / А. Г. Чучалин, А. И. Синапольников, Л. С. Страчунский, Р. С. Козлов, В. А. Руднов, С. В. Яковлев, О. У. Стецюк, Г. К. Решедько // Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. - 2005. - № 7. - С. 4-31.

62. Чучалин, А.Г. Внебольничная пневмония у взрослых: практические рекомендации по диагностике, лечению и профилактике / А. Г. Чучалин, А. И. Синапольников, Р. С. Козлов, И. Е. Тюрин, С. А. Рачина // Инфекционные болезни: новости, мнения, обучение. - 2013. - № 2. - С. 91-123.

63. Чучалин, А.Г. Клинические рекомендации по диагностике, лечению и профилактике тяжелой внебольничной пневмонии у взрослых: федеральные клинические рекомендации / А. Г. Чучалин, А. И. Синапольников, Р. С. Козлов, С. Н. Авдеев, И. Е. Тюрин, В. А. Руднов, С. А. Рачина, О. В. Фесенко - Москва: 2014. - 82 с.

64. Чучалин, А.Г. Пневмония: актуальная проблема медицины XXI века / А. Г. Чучалин // Терапевтический архив. - 2016. - № 3. - С. 4-12.

65. Широкова, И.Ю. Распространенность и характеристика носительства *Staphylococcus aureus* у студентов медицинских вузов (двухцентровое исследование) / И. Ю. Широкова, Г. А. Шишкин, Р. Ф. Чанышева, Л. С. Глазовская, Т. В. Ефимова // Медицина в Кузбассе. - 2013. - Т. 12, № 2. - С. 79-83.

66. Шляпников, С.А. Резистентные штаммы *Staphylococcus aureus* — растущая проблема в лечении инфекций мягких тканей / С. А. Шляпников, С. В. Сидоренко // Инфекции в хирургии. - 2010. - Т. 8, № 3. - С. 40-46.

67. □□ СП 1.3.2322-08 «Безопасность работы с микроорганизмами III - IV групп патогенности» / - Минюст РФ: М., 2008. -

68. Clinical and Laboratory Standards Institute [электронный ресурс] // Performance standard for antimicrobial susceptibility testing: 22nd informational supplement M100-S22, Wayne PA, USA: Clinical and Laboratory Standards Institute - 2012. - URL: <https://www.ecnmag.com/news/2012/01/clsi-publishes-2012-antimicrobial-susceptibility-testing-standards> (дата обращения: 10.10.2013).

69. Clinical and Laboratory Standards Institute [Электронный ресурс] // Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Third Informational Supplement. M100-S23 - 2013. - URL: <https://clsi.org/standards/products/microbiology/documents/m100/> (дата обращения: 01.03.2014).

70. Centers for Disease Control and Prevention [электронный ресурс] // Antibiotic Resistance Threats in the United States - 2013. - URL: www.cdc.gov/drugresistance/threat-report-2013 (дата обращения: 05.04.2016).

71. Clinical and Laboratory Standards Institute [электронный ресурс] // Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. Twenty-Fourth informational supplement. CLSI document M100-S24 - 2014. - URL: <file:///C:/Users/user/Downloads/CLSIM100-24-2014.pdf> (дата обращения: 17.03.2015).

72. World Health Organization [электронный ресурс] // Antimicrobial resistance: global report on surveillance 2014 - 2014. - URL: http://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/112642/9789241564748_eng.pdf;jsessionid=F6012F2C99D9325846D86494316E68E4?sequence=1 (дата обращения: 17.09.2017).

73. European Centre for Disease Prevention and Control [электронный ресурс] // Antimicrobial resistance surveillance in Europe 2014 - 2015. - URL: <https://ecdc.europa.eu/en/publications-data/antimicrobial-resistance-surveillance-europe-2014> (дата обращения: 17.12.2015).

74. □□ Клинические рекомендации по диагностике и лечению тяжелого сепсиса и септического шока в лечебно-профилактических

организациях Санкт-Петербурга: Клинические рекомендации / - Санкт-Петербург: Санкт-Петербургское общество специалистов по сепсису, 2016. - 94 с.

75. Clinical and Laboratory Standards Institute [электронный ресурс] // Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing, 28th Edition - 2018. - URL: <https://clsi.org/standards/products/microbiology/documents/m100/> (дата обращения: 23.05.2018).

76. Межрегиональная ассоциация по клинической микробиологии и антимикробной химиотерапии [электронный ресурс] // Определение чувствительности микроорганизмов к антимикробным препаратам: клинические рекомендации версия-2018-03 - 2018. - URL: <http://www.antibiotic.ru/minzdrav/files/docs/clrec-dsma2018.pdf> (дата обращения: 12.04.2018).

77. European Committee on Antimicrobial Susceptibility [электронный ресурс] // Testing Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 8.0 - 2018. - URL: http://www.eucast.org/clinical_breakpoints/ (дата обращения: 21.02.2018).

78. Centers for Disease Control and Prevention [электронный ресурс] // Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) - 2018. - <https://www.cdc.gov/mrsa/> (дата обращения: 17.05.2018).

79. Centers for Disease Control and Prevention [электронный ресурс] // Active bacterial core surveillance report, emerging infections program network, methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* - 2014. - URL: <https://www.cdc.gov/mmwr/pdf/wk/mm6348.pdf> (дата обращения: 21.04.2017).

80. Abdulgader, S.M. Molecular epidemiology of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Africa: a systematic review / S. M. Abdulgader, A. O. Shittu, M. P. Nicol, M. Kaba // *Frontiers in Microbiology*. - 2015. - № 6. - P. 1-21.

81. Agostino, J.W. The increasing importance of community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections / J. W. Agostino, J. K.

Ferguson, K. Eastwood, M. D. Kirk // Medical Journal of Australia. - 2017. - Vol. 207, № 9. - P. 388-393.

82. Aguayo-Reyes, A. Molecular basis of methicillin-resistance in *Staphylococcus aureus* / A. Aguayo-Reyes, M. Quezada-Aguiluz, S. Mella, G. Riedel, A. Opazo-Capurro, H. Bello-Toledo, M. Dominguez, G. Gonzalez-Rocha // Revista Chilena De Infectologia. - 2018. - Vol. 35, № 1. - P. 7-14.

83. Aiello, A.E. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* among US prisoners and military personnel: review and recommendations for future studies / A. E. Aiello, F. D Lowy, L. N. Wright, E. L. Larson // Lancet Infectious Diseases. - 2006. - Vol. 6, № 6. - P. 335-341.

84. Aires-De-Sousa, M. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* among animals: current overview / M. Aires-De-Sousa // Clinical Microbiology and Infection. - 2017. - Vol. 23, № 6. - P. 373-380.

85. Aires de Sousa, M. Two international methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clones endemic in a university hospital in Patras, Greece / M. Aires de Sousa, C. Bartzavali, I. Spiliopoulou, I. S. Sanches, M. I. Crisostomo, H. de Lencastre // Journal of Clinical Microbiology. - 2003. - № 41. - P. 2027-2032.

86. Aires de Sousa, M. Comparison of genetic backgrounds of methicillin-resistant and-susceptible *Staphylococcus aureus* isolates from Portuguese hospitals and the community / M. Aires de Sousa, T. Conceição, C. Simas, H. de Lencastre // Journal of Clinical Microbiology. - 2005. - № 43. - P. 5150-5157.

87. Akiyoshi, T. Effect of body mass index on short-term outcomes of patients undergoing laparoscopic resection for colorectal cancer: a single institution experience in Japan / T. Akiyoshi, M. Ueno, Y. Fukunaga, S. Nagayama, Y. Fujimoto, T. Konishi, H. Kuroyanagi, T. Yamaguchi // Surgical Laparoscopy Endoscopy & Percutaneous Techniques. - 2011. - № 21, № 6. - P. 409-414.

88. Albrecht, N. Clonal replacement of epidemic methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains in a German university hospital over a period of

eleven years / N. Albrecht, L. Jatzwauk, P. Slickers, R. Ehricht, S. Monecke // PLoS One. - 2011. - № 6. - P. 1-13.

89. Albrecht, V.S. *Staphylococcus aureus* Colonization and Strain Type at Various Body Sites among Patients with a Closed Abscess and Uninfected Controls at US Emergency Departments / V. S. Albrecht, B. M. Limbago, G. J. Moran, A. Krishnadasan, R. J. Gorwitz, L. K. McDougal, D. A. Talan // Journal of Clinical Microbiology. - 2015. - Vol. 53, № 11. - P. 3478-3484.

90. Alexander, A. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* nasal colonization in human immunodeficiency virus-infected patients / A. Alexander, S. Vishwanath, A. Sellvaraj, M. Varma, K. Saravu, K. Chawla // Annals of Tropical Medicine and Public Health. - 2017. - Vol. 10, № 6. - P. 1809-1813.

91. Alouf, J.E. Staphylococcal and streptococcal superantigens: molecular, biological and clinical aspects / J. E. Alouf, H. Müller-Alouf // International Journal of Medical Microbiology. - 2003. - № 292. - P. 429-440.

92. Alp, E. MRSA genotypes in Turkey: Persistence over 10 years of a single clone of ST239 / E. Alp, C. H. W. Klaassen, M. Doganay, U. Altoparlak, K. Aydin, A. Engin, C. Kuzucu, C. Ozakin, M. A. Ozinel, O. Turhan, A. Voss // Journal of Infection. - 2009. - Vol. 58, № 6. - P. 433-438.

93. Alp, E. Risk factors for nosocomial infection and mortality in burn patients: 10 years of experience at a university hospital / E. Alp, A. Coruh, G. K. Gunay, Y. Yontar, M. Doganay // Journal of Burn Care & Research. - 2012. - № 33. - P. 379-385.

94. Archer, N.K. *Staphylococcus aureus* biofilms properties, regulation and roles in human disease / N. K. Archer, M. J. Mazaitis, J. W. Costerton, J. G. Leid, M. E. Powers, M. E. Shirtliff // Virulence. - 2011. - Vol. 2, № 5. - P. 445-459.

95. Ardui, S. Single molecule real-time (SMRT) sequencing comes of age: applications and utilities for medical diagnostics / S. Ardui, A. Ameer, J. R. Vermeesch, M. S. Hestand // Nucleic Acids Research. - 2018. - Vol. 46, № 5. - P. 2159-2168.

96. Argudin, M.A. Clonal complexes and diversity of exotoxin gene profiles in methicillin-resistant and methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* isolates from patients in a Spanish hospital / M. A. Argudin, M. C. Mendoza, F. J. Mendez, M. C. Martin, B. Guerra, M. R. Rodicio // Journal of Clinical Microbiology. - 2009. - Vol. 47, № 7. - P. 2097-2105.

97. Argudin, M.A. Molecular basis of antimicrobial drug resistance in *Staphylococcus aureus* isolates recovered from young healthy carriers in Spain / M. A. Argudin, M. C. Mendoza, M. C. Martin, M. R. Rodicio // Microbial Pathogenesis. - 2014. - Vol. 74, - P. 8-14.

98. Armand-Lefevre, L. Clonal comparison of *Staphylococcus aureus* isolates from healthy pig farmers, human controls, and pigs / L. Armand-Lefevre, R. Ruimy, A. Andrement // Emerging Infectious Diseases. - 2005. - Vol. 11, № 5. - P. 711-714.

99. Asadollahi, P. Distribution of the most prevalent spa types among clinical isolates of methicillin-resistant and -susceptible *Staphylococcus aureus* around the world: a review / P. Asadollahi, N. N. Farahani, M. Mirzaii, S. S. Khoramrooz, A. van Belkum, K. Asadollahi, M. Dadashi, D. Darban-Sarokhalil // Frontiers in Microbiology. - 2018. - Vol. 9, № 163. - P. 1-16.

100. Aung, M.S. Molecular characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* from outpatients in northern Japan: increasing tendency of ST5/ST764 MRSA-IIa with arginine catabolic mobile element / M. S. Aung, M. Kawaguchiya, N. Urushibara, A. Sumi, M. Ito, K. Kudo, S. Morimoto, S. Hosoya, N. Kobayashi // Microbial Drug Resistance. - 2017. - Vol. 23, № 5. - P. 616-625.

101. Avritscher, E.B. Serious postoperative infections following resection of common solid tumors: outcomes, costs, and impact of hospital surgical volume / E. B. Avritscher, C. D. Cooksley, K. V. Rolston, J. M. Swint, G. L. Delclos, L. Franzini, S. G. Swisher, G. L. Walsh, P. F. Mansfield, L. S. Elting // Support Care Cancer. - 2014. - № 22. - P. 527–535.

102. Baba, T. Genome and virulence determinants of high virulence community-acquired MRSA / T. Baba, F. Takeuchi, M. Kuroda, H. Yuzawa, K.

Aoki, A. Oguchi, Y. Nagai, N. Iwama, K. Asano, T. Naimi, H. Kuroda, L. Cui, K. Yamamoto, K. Hiramatsu // *Lancet*. - 2002. - Vol. 359, № 9320. - P. 1819-1827.

103. Baig, S. Novel SCCmec type XIII (9A) identified in an ST152 methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* / S. Baig, T. B. Johannesen, S. Overballe-Petersen, J. Larsen, A. R. Larsen, M. Stegger // *Infection, Genetics and Evolution*. - 2018. - Vol. 61, - P. 74–76.

104. Bal, A.M. Genomic insights into the emergence and spread of international clones of healthcare-, community- and livestock-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: Blurring of the traditional definitions / A. M. Bal, G. W. Coombs, M. T. G. Holden, J. A. Lindsay, G. R. Nimmo, P. Tattevin, R. L. Skov // *Journal of Global Antimicrobial Resistance*. - 2016. - Vol. 6, - P. 95-101.

105. Balasubramanian, D. *Staphylococcus aureus* pathogenesis in diverse host environments / D. Balasubramanian, L. Harper, B. Shopsin, V. J. Torres // *Pathogens and Disease*. - 2017. - Vol. 75, № 1. - P. 1-13.

106. Ballard, S.A. Molecular characterization of *vanB* elements in naturally occurring gut anaerobes / S. A. Ballard, K. K. Pertile, M. Lim, P. D. R. Johnson, M. L. Grayson // *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. - 2005. - Vol. 49, № 5. - P. 1688-1694.

107. Bannerman, T.L. Pulsed-field gel-electrophoresis as a replacement for bacteriophage-typing of *Staphylococcus aureus* / T. L. Bannerman, G. A. Hancock, F. C. Tenover, J. M. Miller // *Journal of Clinical Microbiology*. - 1995. - Vol. 33, № 3. - P. 551-555.

108. Baranovich, T. The first isolation of Panton-Valentine leukocidin (PVL) positive community-acquired methicillin-resistant

Staphylococcus aureus (CA-MRSA) in Russia / T. Baranovich, V. Potapov, T. Yamamoto // *Eurosurveillance*. - 2007. - Vol. 12, № 3. - P. 78-84.

109. Baranovich, T. Molecular characterization and susceptibility of methicillin-resistant and methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* isolates from hospitals and the community in Vladivostok, Russia / T. Baranovich, H.

Zaraket, I. Shabana, V. Nevzorova, V. Turcutyucov, H. Suzuki // *Clinical Microbiology and Infection*. - 2010. - Vol. 16, № 6. - P. 575-582.

110. Bartels, M.D. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in hospitals in Tbilisi, the Republic of Georgia, are variants of the Brazilian clone / M. D. Bartels, A. Nanuashvili, K. Boye, S. M. Rohde, N. Jashiashvili, N. A. Faria, M. Kereselidze, S. Kharebava, H. Westh // *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*. - 2008. - Vol. 27, № 8. - P. 757-760.

111. Bassetti, M. Characteristics of *Staphylococcus aureus* bacteraemia and predictors of early and late mortality / M. Bassetti, M. Peghin, E. M. Treccarichi, A. Carnelutti, E. Righi, P. Del Giacomo, F. Ansaldi, C. Trucchi, C. Alicino, R. Cauda, A. Sartor, T. Spanu, C. Scarparo, M. Tumbarello // *PLoS One*. - 2017. - Vol. 12, № 2. - P. 1-11.

112. Bassetti, M. Predictors of mortality with *Staphylococcus aureus* bacteremia in elderly adults / M. Bassetti, E. Righi, P. Del Giacomo, A. Sartor, F. Ansaldi, C. Trucchi, C. Alicino, E. M. Treccarichi, T. Spanu, C. Paganino, M. Tumbarello, A. Carnelutti // *Journal of the American Geriatrics Society*. - 2018. - Vol. 66 № 7. - P. 1284-1289.

113. Beasley, F.C. Characterization of staphyloferrin A biosynthetic and transport mutants in *Staphylococcus aureus* / F. C. Beasley, E. D. Vines, J. C. Grigg, Q. Zheng, S. Y. Liu, G. A. Lajoie, M. E. P. Murphy, D. E. Heinrichs // *Molecular Microbiology*. - 2009. - Vol. 72, № 4. - P. 947-963.

114. Becker, E.C. Origin and fate of the 3' ends of single-stranded DNA generated by conjugal transfer of plasmid R1162 / E. C. Becker, R. Meyer // *Journal of Bacteriology*. - 2012. - № 194. - P. 5368–5376.

115. Becker, K. Plasmid-encoded transferable *mecB*-mediated methicillin resistance in *Staphylococcus aureus* / K. Becker, S. van Alen, E. A. Idelevich, N. Schleimer, J. Seggewiß, A. Mellmann, U. Kaspar, G. Peters // *Emerging Infectious Diseases journal*. - 2018 - Vol. 24, № 2. - P. 242-248.

116. Befus, M.B. HIV and colonization with *Staphylococcus aureus* in two maximum-security prisons in New York State / M. B. Befus, B. A. Miko, C. T. A.

Herzig, N. Keleekai, D. V. Mukherjee, E. Larson, F. D. Lowy // *Journal of Infection*. - 2016. - Vol. 73, № 6. - P. 568-577.

117. Benson, M.A. *Rot* and *saeRS* cooperate to activate expression of the Staphylococcal superantigen-like exoproteins / M. A. Benson, S. Lilo, T. Nygaard, J. M. Voyich, V. J. Torres // *Journal of Bacteriology*. - 2012. - Vol. 194, № 16. - P. 4355-4365.

118. Benson, M.A. Evolution of hypervirulence by a MRSA clone through acquisition of a transposable element / M. A. Benson, E. A. Ohneck, C. Ryan, F. Alonzo, H. Smith, A. Narechania // *Molecular Microbiology*. - 2014. - № 93. - P. 664–681.

119. Berg, T. Complete nucleotide sequence of pSK41: evolution of staphylococcal conjugative multiresistance plasmids / T. Berg, N. Firth, S. Apisiridej, A. Hettiaratchi, A. Leelaporn, R. Skurray // *Journal of Bacteriology*. - 1998. - № 180. - P. 4350–4359.

120. Berglund, C. Genetic diversity of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* carrying type IV SCCmec in Orebro County and the western region of Sweden / C. Berglund, T. Ito, X. X. Ma, M. Ikeda, S. Watanabe, B. Soderquist, K. Hiramatsu // *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. - 2009. - Vol. 63, № 1. - P. 32-41.

121. Berti, A.D. Heterogeneity of genetic pathways toward daptomycin nonsusceptibility in *Staphylococcus aureus* determined by adjunctive antibiotics / A. D. Berti, S. L. Baines, B. P. Howden, G. Sakoulas, V. Nizet, R. A. Proctor, W. E. Rose // *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. - 2015 -Vol. 59, № 5. - P. 2799-2806.

122. Bloes, D.A. Phenol-soluble modulin peptides contribute to Influenza A virus-associated *Staphylococcus aureus* pneumonia / D. A. Bloes, E. Haasbach, C. Hartmayer, T. Hertlein, K. Klingel, D. Kretschmer, O. Planz, A. Peschel // *Infection and Immunity*. - 2017. - Vol. 85, № 12. - P. 1-9.

123. Boles, B.R. Agr-mediated dispersal of *Staphylococcus aureus* biofilms / B. R. Boles, A. R. Horswill // *Plos Pathogens*. - 2008. - Vol. 4, № 4. - P. 1-13.

124. Bosch, T. Multiple-locus variable number tandem repeat analysis is superior to spa typing and sufficient to characterize MRSA for surveillance purposes / T. Bosch, G. N. Pluister, M. Van Luit, F. Landman, M. van Santen-Verheувel, C. Schot, S. Witteveen, K. van der Zwaluw, M. E. Heck, L. M. Schouls // *Future Microbiology*. - 2015. - № 10. - P. 1155-1162.

125. Boswihi, S.S. Shifts in the clonal distribution of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Kuwait hospitals: 1992-2010 / S. S. Boswihi, E. E. Udo, N. Al-Sweih // *PLoS One*. - 2016. - № 11. - P. 1-12.

126. Bowring, J. Pirating conserved phage mechanisms promotes promiscuous staphylococcal pathogenicity island transfer / J. Bowring, M. M. Neamah, J. Donderis, I. Mir-Sanchis, C. Alite, J. R. Ciges-Tomas, E. Maiques, I. Medmedov, A. Marina, J. R. Penades // *eLife*. - 2017. - Vol. 8, № 6. - P. 1-23.

127. Brandenberger, M. Inactivation of a novel threecistronic operon *tcaR-tcaA-tcaB* increases teicoplanin resistance in *Staphylococcus aureus* / M. Brandenberger, M. Tschierske, P. Giachino, A. Wada, B. Berger-Baëchi // *Biochimica et Biophysica Acta*. - 2000. - № 1523. - P. 135-139.

128. Broker, B.M. Immune control of *Staphylococcus aureus* - Regulation and counter-regulation of the adaptive immune response / B. M. Broker, S. Holtfreter, I. Bekeredjian-Ding // *International Journal of Medical Microbiology*. - 2014. - Vol. 304, № 2. - P. 204-214.

129. Brooks, J.L. Staphylococcal biofilms: quest for the magic bullet / J. L. Brooks, K. K. Jefferson // *Advances in Applied Microbiology*. - 2012. - Vol. 81, - P. 63-87.

130. Brusina, E.B. Epidemiological aspects of MRSA circulation in the industrial region of Russia / E. B. Brusina, L. S. Glazovskaya, T. V. Efimova // *Antimicrobial Resistance Infection Control*. - 2013. - № 2. - P. 57-61.

131. Bryskier, A. Antimicrobial Agents: Antibacterials and Antifungals / A. Bryskier - USA: ASM Press, 2005. - 1426 p.

132. Budimir, A. A variant of the Southern German clone of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* is predominant in Croatia / A. Budimir, R. H.

Deurenberg, Z. Bosnjak, E. E. Stobberingh, H. Cetkovic, S. Kalenic // *Clinical Microbiology and Infection*. - 2010. - Vol. 16, № 8. - P. 1077-1083.

133. Butterly, A. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* colonization, Its relationship to nosocomial infection, and efficacy of control methods / A. Butterly, U. Schmidt, J. Wiener-Kronish // *Anesthesiology*. - 2010. - Vol. 113, № 6. - P. 1453-1459.

134. Byrne, M.E. Nucleotide sequence analysis of IS256 from the *Staphylococcus aureus* gentamicin-tobramycin-kanamycin-resistance transposon Tn4001 / M. E. Byrne, D. A. Rouch, R. A. Skurray // *Gene*. - 1989. - № 81. - P. 361-367.

135. Campanile, F. Hospital-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (HA-MRSA) in Italy / F. Campanile, D. Bongiorno, S. Borbone, S. Stefani // *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*. - 2009. - № 8. - P. 22.

136. Campbell, K.M. Risk factors for community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections in an outbreak of disease among military trainees in San Diego, California, in 2002 / K. M. Campbell, A. F. Vaughn, K. L. Russell, B. Smith, D. L. Jimenez, C. P. Barrozo, J. R. Minarcik, N. F. Crum, M. A. K. Ryan // *Journal of Clinical Microbiology*. - 2004. - Vol. 42, № 9. - P. 4050-4053.

137. Cao, M.D. Streaming algorithms for identification of pathogens and antibiotic resistance potential from real-time MinION(TM) sequencing / M. D. Cao, D. Ganesamoorthy, A. G. Elliott, H. Zhang, M. A. Cooper, L. J. Coin // *GigaScience*. - 2016. - Vol. 5 № 1. - 1-32.

138. Carneiro, M.O. Pacific biosciences sequencing technology for genotyping and variation discovery in human data / M. O. Carneiro, C. Russ, M. G. Ross, S. B. Gabriel, C. Nusbaum, M. A. Depristo // *BMC Genomics*. - 2012. - Vol. 13, № 375. - P. 1-7.

139. Carrel, M. USA300 Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*, United States, 2000-2013 / M. Carrel, E. N. Perencevich, M. Z. David // *Emerging Infectious Diseases*. - 2015. - Vol. 21, № 11. - P. 1973-1980.

140. Cassini, A. Burden of six healthcare-associated Infections on European population health: estimating incidence-based disability-adjusted life years through a population prevalence-based modelling study / A. Cassini, D. Plachouras, T. Eckmanns, M. Abu Sin, H. P. Blank, T. Ducomble, S. Haller, T. Harder, A. Klingeberg, M. Sixtensson, E. Velasco, B. Weiss, P. Kramarz, D. L. Monnet, M. E. Kretzschmar, C. Suetens // *Plos Medicine*. - 2016. - Vol. 13, № 10. - P. 1-16.

141. Chaisson, M.J. Genetic variation and the de novo assembly of human genomes / M. J. Chaisson, R. K. Wilson, E. E. Eichler // *Nature Reviews Genetics*. - 2015. - № 16. - P. 627-640.

142. Chambers, H.F. The changing epidemiology of *Staphylococcus aureus*? / H. F. Chambers // *Emerging Infectious Diseases*. - 2001. - Vol. 7, № 2. - P. 178-182.

143. Chambers, H.F. Waves of resistance: *Staphylococcus aureus* in the antibiotic era / H. F. Chambers, F. R. Deleo // *Nature Reviews Microbiology*. - 2009. - Vol. 7, № 9. - P. 629-641.

144. Chen, C.J. Factors associated with nasal colonization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* among healthy children in Taiwan / C. J. Chen, K. H. Hsu, T. Y. Lin, K. P. Hwang, P. Y. Chen, Y. C. Huang // *Journal of Clinical Microbiology*. - 2011. - № 49. - P. 131-137.

145. Chen, C.J. New epidemiology of *Staphylococcus aureus* infection in Asia / C. J. Chen, Y. C. Huang // *Clinical Microbiology and Infection*. - 2014. - Vol. 20, № 7. - P. 605-623.

146. Chen, J. Phage-mediated intergeneric transfer of toxin genes / J. Chen, R. P. Novick // *Science*. - 2009. - Vol. 323, № 5910. - P. 139-141.

147. Chen, L. Identification of a novel transposon (Tn6072) and a truncated staphylococcal cassette chromosome mec element in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* ST239 / L. Chen, J. R. Mediavilla, D. S. Smyth, K. D. Chavda, R. Ionescu, R. B. Roberts, D. A. Robinson, B. N. Kreiswirth // *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. - 2010 - Vol. 54, № 8. - P. 3347-3354.

148. Cheng, A.G. The giant protein Ehb is a determinant of *Staphylococcus aureus* cell size and complement resistance / A. G. Cheng, D. Missiakas, O. Schneewind // *Journal of Bacteriology*. - 2014. - № 196. - P. 971-981.

149. Cheung, A.L. The SarA protein family of *Staphylococcus aureus* / A. L. Cheung, K. A. Nishina, M. P. Trottonda, S. Tamber // *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*. - 2008. - № 40. - P. 355–361.

150. Chin, C.S. Nonhybrid, finished microbial genome assemblies from long-read SMRT sequencing data / C. S. Chin, D. H. Alexander, P. Marks, A. A. Klammer, J. Drake, C. Heiner, A. Clum, A. Copeland, J. Huddleston, E. E. Eichler, S. W. Turner, J. Korlach // *Nature Methods*. - 2013. - Vol. 10, № 6. - P. 563-569.

151. Chlebowicz, M.A. Considerations for the distinction of ccrC-containing Staphylococcal cassette chromosome mec elements / M. A. Chlebowicz, J. M. van Dijk, G. Buist // *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. - 2011. - Vol. 55, № 4. - P. 1823-1824.

152. Choi, S.M. Multiplex PCR for the detection of genes encoding aminoglycoside modifying enzymes and methicillin resistance among *Staphylococcus species* / S. M. Choi, S. H. Kim, H. J. Kim, D. G. Lee, J. H. Choi, J. H. Yoo, J. H. Kang, W. S. Shin, M. W. Kang // *Journal of Korean Medical Science*. - 2003. - Vol. 18, № 5. - P. 631-636.

153. Chongtrakool, P. Staphylococcal cassette chromosome mec (SCCmec) typing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains isolated in 11 Asian countries: a proposal for a new nomenclature for SCCmec elements / P. Chongtrakool, T. Ito, X. X. Ma, Y. Kondo, S. Trakulsomboon, C. Tiensasitorn, T. Chavalit, J. H. Song, K. Hiramatsu // *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. - 2006. - Vol. 50, № 3. - P. 1001-1012.

154. Chuang, Y.Y. Molecular epidemiology of community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Asia / Y. Y. Chuang, Y. C. Huang // *Lancet Infectious Diseases*. - 2013. - Vol. 13, № 8. - P. 698-708.

155. Church, D. Burn wound infections / D. Church, S. Elsayed, O. Reid, B. Winston, R. Lindsay // *Clinical Microbiology Reviews*. - 2006. - № 19. - P. 403-434.

156. Clark, N.C. Detection of a streptomycin/spectinomycin adenyltransferase gene (*aadA*) in *Enterococcus faecalis* / N. C. Clark, O. Olsvik, J. M. Swenson, C. A. Spiegel, F. C. Tenover // *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. - 1999. - Vol. 43, № 1. - P. 157-160.

157. Collier, J. Stochasticity among antibiotic-resistance profiles of common burn-related pathogens over a six-year period Zachary / J. Collier, L. J. Gottlieb, J. C. Alverdy // *Surgical infections*. - 2017. - Vol. 18, № 3. - P. 327-335.

158. Conceicao, T. Replacement of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clones in Hungary over time: a 10-year surveillance study / T. Conceicao, M. Aires-De-Sousa, M. Fuzi, A. Toth, J. Paszti, E. Ungvari, W. B. van Leeuwen, A. van Belkum, H. Grundmann, H. de Lencastre // *Clinical Microbiology and Infection*. - 2007. - Vol. 13, № 10. - P. 971-979.

159. Cookson, B.D. Epidemic methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* / B. D. Cookson, I. Phillips // *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. - 1988. - Vol. 21, - P. 57-65.

160. Coombs, G.W. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clones, Western Australia / G. W. Coombs, J. C. Pearson, F. G. O'Brien, R. J. Murray, W. B. Grubb, K. J. Christiansen // *Emerging Infectious Diseases*. - 2006. - Vol. 12, № 2. - P. 241-247.

161. Cox, R.A. A major outbreak of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* caused by a new phage-type (EMRSA-16) / R. A. Cox, C. Conquest, C. Mallaghan, R. R. Marples // *Journal of Hospital Infection*. - 1995. - Vol. 29, № 2. - P. 87-106.

162. Cue, D. Activation of *sarX* by *Rbf* is required for biofilm formation and *icaADBC* expression in *Staphylococcus aureus* / D. Cue, M. G. Lei, C. Y. Lee // *Journal of Bacteriology*. - 2013. - № 195. - P. 1515-1524.

163. Cuevas, O. Molecular epidemiology of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Spain: a multicentre prevalence study (2002) / O. Cuevas, E. Cercenado, E. Bouza, C. Castellares, P. Trincado, R. Cabrera, V. A. // *Clinical Microbiology and Infection*. - 2007. - № 13. - P. 250-256.

164. Cuny, C. Livestock-associated MRSA: The impact on humans / C. Cuny, L. H. Wieler, W. Witte // *Antibiotics-Basel*. - 2015. - Vol. 4, № 4. - P. 521-543.

165. Czachor, J.S. Bacteremic nonmenstrual staphylococcal toxic shock syndrome associated with enterotoxins A and C / J. S. Czachor, T. E. Herchline // *Clinical Infectious Diseases*. - 2001. - Vol. 32, № 3. - P 53-56.

166. Dantes, R. National burden of invasive methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections, United States / R. Dantes, Y. Mu, R. Belflower, D. Aragon, G. Dumyati, L. H. Harrison, F. C. Lessa, R. Lynfield, J. Nadle, S. Petit, S. M. Ray, W. Schaffner, J. Townes, S. Fridkin // *JAMA Internal Medicine*. - 2013. - Vol. 173, № 21. - P. 1970-1978.

167. Datta, R. Risk of infection and death due to methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in long-term carriers / R. Datta, S. S. Huang // *Clinical Infectious Diseases*. - 2008. - Vol. 47, № 2. - P. 176-181.

168. Dauwalder, O. Epidemiology of invasive methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clones collected in France in 2006 and 2007 / O. Dauwalder, G. Lina, G. Durand, M. Bes, H. Meugnier, V. Jarlier, B. Coignard, F. Vandenesch, J. Etienne, F. Laurent // *Journal of Clinical Microbiology*. - 2008. - Vol. 46, № 10. - P. 3454-3458.

169. David, M.Z. Community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: Epidemiology and clinical consequences of an emerging epidemic / M. Z. David, R. S. Daum // *Clinical Microbiology Reviews* - 2010. - Vol. 23, № 3. - P. 616-687.

170. Davies, T.A. Binding of ceftobiprole and comparators to the penicillin-binding proteins of *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, and *Streptococcus pneumoniae* / T. A. Davies, M. G. Page, W. Shang, T.

Andrew, M. Kania, K. Bush // *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. - 2007. - Vol. 51, № 7. - P. 2621-2624.

171. De Bentzmann, S. *Staphylococcus aureus* isolates associated with necrotizing pneumonia bind to basement membrane type I and IV collagens and laminin / S. De Bentzmann, Tristan A, Etienne J, V. F. Brousse N, Lina G. // *Journal of Infectious Diseases*. - 2004. - Vol. 190, № 8. - P. 1506-1515.

172. De Lencastre, H. Genetic control of population structure in heterogeneous strains of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* / H. De Lencastre, A. M. S. Figueiredo, A. Tomasz // *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*. - 1993. - Vol. 12, - P. 13-18.

173. De Sousa, M.A. Three-year assessment of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clones in Latin America from 1996 to 1998 / M. A. De Sousa, M. Miragaia, I. S. Sanches, S. Avila, I. Adamson, S. T. Casagrande, M. C. C. Brandileone, R. Palacio, L. Dell'Acqua, M. Hortal, T. Camou, A. Rossi, M. E. Velazquez-Meza, G. Echaniz-Aviles, F. Solorzano-Santos, I. Heitmann, H. De Lencastre // *Journal of Clinical Microbiology*. - 2001. - Vol. 39, № 6. - P. 2197-2205.

174. De Sousa, M.A. Two international methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clones endemic in a University Hospital in Patras, Greece / M. A. De Sousa, C. Bartzavali, I. Spiliopoulou, I. S. Sanches, M. I. Crisostomo, H. De Lencastre // *Journal of Clinical Microbiology*. - 2003. - Vol. 41, № 5. - P. 2027-2032.

175. Deghorain, M. Characterization of novel phages isolated in coagulase-negative Staphylococci reveals evolutionary relationships with *Staphylococcus aureus* phages / M. Deghorain, L. M. Bobay, P. R. Smeesters, S. Bousbata, M. Vermeersch, D. Perez-Morga, P. A. Dreze, E. P. C. Rocha, M. Touchon, L. Van Melderen // *Journal of Bacteriology*. - 2012. - Vol. 194, № 21. - P. 5829-5839.

176. DeLeo, F.R. Community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* / F. R. DeLeo, M. Otto, B. N. Kreiswirth, H. F. Chambers // *Lancet*. - 2010. - Vol. 376, № 9743. - P. 767-767.

177. Demir, D. Do *Staphylococcus aureus* superantigens play a role in the pathogenesis of otitis media with effusion in children? / D. Demir, O. Karabay, M. Guven, G. Kayabasoglu, M. S. Yilmaz // International Journal of Pediatric Otorhinolaryngology. - 2016. - Vol. 84, - P. 71-74.

178. Deurenberg, R.H. The evolution of *Staphylococcus aureus* / R. H. Deurenberg, E. E. Stobberingh // Infection Genetics and Evolution. - 2008. - Vol. 8, № 6. - P. 747-763.

179. Devriese, L.A. Characteristics of *Staphylococcus aureus* strains isolated from different animal species / L. A. Devriese, P. Oeding // Research in Veterinary Science. - 1976. - Vol. 21, № 3. - P. 284-291.

180. Diekema, D.J. Continued emergence of USA300 methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in the United States: Results from a nationwide surveillance study / D. J. Diekema, S. S. Richter, K. P. Heilmann, C. L. Dohrn, F. Riahi, S. Tendolkar, J. S. McDanel, G. V. Doern // Infection Control and Hospital Epidemiology. - 2014. - Vol. 35, № 3. - P. 285-292.

181. Diep, B.A. Roles of 34 virulence genes in the evolution of hospital- and community-associated strains of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* / B. A. Diep, H. A. Carleton, R. F. Chang, G. F. Sensabaugh, F. Perdreau-Remington // Journal of Infectious Diseases. - 2006. - Vol. 193, № 11. - P. 1495-1503.

182. Diep, B.A. Complete genome sequence of USA300, an epidemic clone of community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* / B. A. Diep, S. R. Gill, R. F. Chang, T. H. Phan, J. H. Chen, M. G. Davidson, F. Lin, J. Lin, H. A. Carleton, E. F. Mongodin, G. F. Sensabaugh, F. Perdreau-Remington // Lancet. - 2006. - Vol. 367, № 9512. - P. 731-739.

183. Diep, B.A. The arginine catabolic mobile element and staphylococcal chromosomal cassette mec linkage: Convergence of virulence and resistance in the USA300 clone of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* / B. A. Diep, G. G. Stone, L. Basuino, C. J. Graber, A. Miller, S. A. des Etages, A. Jones, A. M. Palazzolo-Ballance, F. Perdreau-Remington, G. F. Sensabaugh, F. R. DeLeo, H. F.

Chambers // *Journal of Infectious Diseases*. - 2008. - Vol. 197, № 11. - P. 1523-1535.

184. Diep, B.A. The role of virulence determinants in community-associated MRSA pathogenesis / B. A. Diep, M. Otto // *Trends of Microbiology*. - 2008. - № 16. - P. 361-369.

185. Diep, B.A. Emergence of multidrug-resistant, community-associated, methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clone USA300 in men who have sex with men / B. A. Diep, H. F. Chambers, C. J. Graber, J. D. Szumowski, G. Miller, L. L. Han, J. H. Chen, F. Lin, J. Lin, T. H. Phan, H. A. Carleton, L. K. McDougal, F. C. Tenover, D. E. Cohen, K. H. Mayer, G. F. Sensabaugh, F. Perdreau-Remington // *Annals of Internal Medicine*. - 2008. - Vol. 148, № 4. - P. 249-257.

186. Dominguez, M.A. Spread and maintenance of a dominant methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) clone during an outbreak of MRSA disease in a Spanish hospital / M. A. Dominguez, H. Delencastre, J. Linares, A. Tomasz // *Journal of Clinical Microbiology*. - 1994. - Vol. 32, № 9. - P. 2081-2087.

187. Dornbusch, K. Extrachromosomal control of methicillin resistance and toxin production in *Staphylococcus aureus* / K. Dornbusch, H. O. Hallander, F. Löfqvist // *Journal of Bacteriology*. - 1969. - Vol. 98, № 2. - P. 351-358.

188. Drieux, L. Phenotypic detection of extended-spectrum beta-lactamase production in *Enterobacteriaceae*: review and bench guide / L. Drieux, F. Brossier, W. Sougakoff, V. Jarlier // *Clinical Microbiology and Infection*. - 2008. - Vol. 14, - P. 90-103.

189. Dubin, D.T. Physical mapping of the mec region of an Australian methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* lineage and a closely related American strain / D. T. Dubin, S. G. Chikramane, B. Inglis, P. R. Matthews, P. R. Stewart // *Journal of General Microbiology*. - 1992. - Vol. 138, - P. 169-180.

190. Duin, D. Multidrug resistant bacteria in the community: Trends and lessons learned / D. Duin, D. Paterson // *Infectious Disease Clinics of North America*. - 2016. - № 2. - P. 377-390.

191. Durupt, F. Prevalence of *Staphylococcus aureus* toxins and nasal carriage in furuncles and impetigo / F. Durupt, L. Mayor, M. Bes, M. E. Reverdy, F. Vandenesch, L. Thomas, J. Etienne // *British Journal of Dermatology*. - 2007. - Vol. 157, № 6. - P. 1161-1167.

192. Dutta, D. Cloning, expression, crystallization and preliminary X-ray diffraction studies of staphylococcal superantigen-like protein 1 (SSL1) / D. Dutta, A. Dutta, A. Bhattacharjee, A. Basak, A. K. Das // *Acta Crystallographica Section F-Structural Biology Communications*. - 2014. - Vol. 70, - P. 600-603.

193. Ebner, R. Microarray-based characterization of *Staphylococcus aureus* isolates obtained from chicken carcasses / R. Ebner, S. Johler, H. M. Sihto, R. Stephan, C. Zweifel // *Journal of Food Protection*. - 2013. - Vol. 76, № 8. - P. 1471-1474.

194. Echaniz-Aviles, G. Diabetic foot infection caused by community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (USA300) / G. Echaniz-Aviles, M. E. Velazquez-Meza, R. Vazquez-Larios Mdel, A. Soto-Nogueron, A. M. Hernandez-Duenas // *Journal of Diabetes*. - 2015. - Vol. 7, № 6. - P. 891-892.

195. Edgeworth, J.D. An outbreak in an intensive care unit of a strain of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* sequence type 239 associated with an increased rate of vascular access device-related bacteremia / J. D. Edgeworth, G. Yadegarfar, S. Pathak, R. Batra, J. D. Cockfield, D. Wyncoll // *Clinical Infectious Diseases*. - 2007. - № 44. - P. 493-501.

196. El-baz, R. Virulence characteristics and molecular relatedness of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* harboring different staphylococcal cassette chromosome mec / R. El-baz, D. E. Rizk, R. Barwa, R. Hassan // *Microbial Pathogenesis*. - 2017. - № 113. - P. 385-395.

197. Elasri, M.O. *Staphylococcus aureus* collagen adhesin contributes to the pathogenesis of osteomyelitis / M. O. Elasri, J. R. Thomas, R. A. Skinner, J. S. Blevins, K. E. Beenken, C. L. Nelson, M. S. Smeltzer // *Bone*. - 2002. - Vol. 30, № 1. - P. 275-280.

198. Ellington, M.J. Distribution of the ACME-arcA gene among methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* from England and Wales / M. J. Ellington, L. Yearwood, M. Ganner, C. East, A. M. Kearns // Journal of Antimicrobial Chemotherapy. - 2008. - Vol. 61, № 1. - P. 73-77.

199. Ellington, M.J. Decline of EMRSA-16 amongst methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* causing bacteraemias in the UK between 2001 and 2007 / M. J. Ellington, R. Hope, D. M. Livermore, A. M. Kearns, K. Henderson, B. D. Cookson, A. Pearson, A. P. Johnson // Journal of Antimicrobial Chemotherapy. - 2010 -Vol. 65, № 3. - P. 446-448.

200. Enright, M.C. Multilocus sequence typing for characterization of methicillin-resistant and methicillin-susceptible clones of *Staphylococcus aureus* / M. C. Enright, N. P. J. Day, C. E. Davies, S. J. Peacock, B. G. Spratt // Journal of Clinical Microbiology. - 2000. - Vol. 38, № 3. - P. 1008-1015.

201. Enright, M.C. The evolutionary history of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) / M. C. Enright, D. A. Robinson, G. Randle, E. J. Feil, H. Grundmann, B. G. Spratt // Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. - 2002. - Vol. 99, № 11. - P. 7687-7692.

202. Espinosa-Gongora, C. Phenotypes and genotypes of old and contemporary porcine strains indicate a temporal change in the *S. aureus* population structure in pigs / C. Espinosa-Gongora, A. Moodley, U. Lipinska, E. M. Broens, K. Hermans, P. Butaye, L. A. Devriese, F. Haesebrouck, L. Guardabassi // Plos One. - 2014. - Vol. 9, № 7. - P. 1-5.

203. Fatholahzadeh, B. Molecular characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clones from a teaching hospital in Tehran / B. E. Fatholahzadeh, M., M. Aligholi, G. Gilbert, M. Taherikalani, N. Jonaidi, M. A. Eslampour, M. M. Feizabadi // Japanese Journal of Infectious Diseases. - 2009. - № 62. - P. 309-311.

204. Ferrer, M.D. *RinA* controls phage-mediated packaging and transfer of virulence genes in Gram-positive bacteria / M. D. Ferrer, N. Quiles-Puchalt, M. D. Harwich, M. A. Tormo-Mas, S. Campoy, J. Barbe, I. Lasa, R. P. Novick, G. E.

Christie, J. R. Penades // *Nucleic Acids Research*. - 2011. - Vol. 39, № 14. - P. 5866-5878.

205. Ferry, T. Comparative prevalence of superantigen genes in *Staphylococcus aureus* isolates causing sepsis with and without septic shock / T. Ferry, D. Thomas, A. L. Genestier, M. Bes, G. Lina, F. Vandenesch, J. Etienne // *Clinical Infectious Diseases*. - 2005. - Vol. 41, № 6. - P. 771-777.

206. Ferry, T. Toxin gene content of the Lyon methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clone compared with that of other pandemic clones / T. Ferry, M. Bes, O. Dauwalder, H. Meugnier, G. Lina, F. Forey, F. Vandenesch, J. Etienne // *Journal of Clinical Microbiology*. - 2006. - Vol. 44, № 7. - P. 2642-2644.

207. Filice, G.A. Excess costs and utilization associated with methicillin resistance for patients with *Staphylococcus aureus* infection / G. A. Filice, J. A. Nyman, C. Lexau, C. H. Lees, L. A. Bockstedt, K. Como-Sabetti, L. J. Leshner, R. Lynfield // *Infection Control & Hospital Epidemiology*. - 2010. - Vol. 31, № 4. - P. 365-373.

208. Fishovitz, J. Penicillin-binding protein 2a of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* / J. Fishovitz, J. A. Hermoso, M. Chang, S. Mobashery // *The International Union of Biochemistry and Molecular Biology*. - 2014. - Vol. 66, № 8. - P. 572-577.

209. Fitzgerald, J.R. Genome diversification in *Staphylococcus aureus*: Molecular evolution of a highly variable chromosomal region encoding the staphylococcal exotoxin-like family of proteins / J. R. Fitzgerald, S. D. Reid, E. Ruotsalainen, T. J. Tripp, M. Y. Liu, R. Cole, P. Kuusela, P. M. Schlievert, A. Jarvinen, J. M. Musser // *Infection and Immunity*. - 2003. - Vol. 71, № 5. - P. 2827-2838.

210. Fowler, V.G. Potential associations between hematogenous complications and bacterial genotype in *Staphylococcus aureus* infection / V. G. Fowler, C. L. Nelson, L. M. McIntyre, B. N. Kreiswirth, A. Monk, G. L. Archer, J. Federspiel, S. Naidich, B. Remortel, T. Rude, P. Brown, L. B. Reller, G. R. Corey, S. R. Gill // *Journal of Infectious Diseases*. - 2007. - Vol. 196, № 5. - P. 738-747.

211. Franke, G.C. Epidemiology, variable genetic organization and regulation of the EDIN-B toxin in *Staphylococcus aureus* from bacteraemic patients / G. C. Franke, A. Bockenholt, M. Sugai, H. Rohde, M. Aepfelbacher // Microbiology Society Journals. - 2010. - Vol. 156, - P. 860-872.

212. Fraser, J.D. The bacterial superantigen and superantigen-like proteins / J. D. Fraser, T. Proft // Immunological Reviews. - 2008. - Vol. 225, - P. 226-243.

213. Fridkin, S.K. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* disease in three communities / S. K. Fridkin, J. C. Hageman, M. Morrison, L. T. Sanza, K. Como-Sabetti, J. A. Jernigan, K. Harriman, L. H. Harrison, R. Lynfield, M. M. Farley // New England Journal of Medicine. - 2005. - Vol. 352, № 14. - P. 1436-1444.

214. Garcia-Alvarez, L. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* with a novel mecA homologue in human and bovine populations in the UK and Denmark: a descriptive study / L. Garcia-Alvarez, M. T. G. Holden, H. Lindsay, C. R. Webb, D. F. J. Brown, M. D. Curran, E. Walpole, K. Brooks, D. J. Pickard, C. Teale, J. Parkhill, S. D. Bentley, G. F. Edwards, E. K. Girvan, A. M. Kearns, B. Pichon, R. L. R. Hill, A. R. Larsen, R. L. Skov, S. J. Peacock, D. J. Maskell, M. A. Holmes // Lancet Infectious Diseases. - 2011. - Vol. 11, № 8. - P. 595-603.

215. Gardete, S. Genetic pathway in acquisition and loss of vancomycin resistance in a methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) strain of clonal type USA300 / S. Gardete, C. Kim, B. M. Hartmann, M. Mwangi, C. M. Roux, P. M. Dunman, H. F. Chambers, A. Tomasz // PLoS Pathogens. - 2012. - Vol. 8, № 2. - P. 1-15.

216. Ghaznavi-Rad, E. Predominance and emergence of clones of hospital-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Malaysia / E. Ghaznavi-Rad, M. Nor Shamsudin, Z. Sekawi, L. Y. Khoon, M. N. Aziz, R. A. Hamat, N. Othman, P. P. Chong, A. van Belkum, H. Ghasemzadeh-Moghaddam, V. Neela // Journal of Clinical Microbiology. - 2010. - № 48. - P. 867-872.

217. Gill, S.R. Insights on evolution of virulence and resistance from the complete genome analysis of an early methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*

strain and a biofilm-producing methicillin-resistant *Staphylococcus epidermidis* strain / S. R. Gill, D. E. Fouts, G. L. Archer, E. F. Mongodin, R. T. DeBoy, J. Ravel, I. T. Paulsen, J. F. Kolonay, L. Brinkac, M. Beanan, R. J. Dodson, S. C. Daugherty, R. Madupu, S. V. Angiuoli, A. S. Durkin, D. H. Haft, J. Vamathevan, H. Khouri, T. Utterback, C. Lee, G. Dimitrov, L. X. Jiang, H. Y. Qin, J. Weidman, K. Tran, K. Kang, I. R. Hance, K. E. Nelson, C. M. Fraser // *Journal of Bacteriology*. - 2005. - Vol. 187, № 7. - P. 2426-2438.

218. Gill, S.R. Potential associations between severity of infection and the presence of virulence-associated genes in clinical strains of *Staphylococcus aureus* / S. R. Gill, L. M. McIntyre, C. L. Nelson, B. Remortel, T. Rude, L. B. Reller, V. G. Fowler // *Plos One*. - 2011. - Vol. 6, № 4. - P. 1-7.

219. Glaser, P. Demography and intercontinental spread of the USA300 community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* lineage / P. Glaser, P. Martins-Simoes, A. Villain, M. Barbier, A. Tristan, C. Bouchier, L. Ma, M. Bes, F. Laurent, D. Guillemot, T. Wirth, F. Vandenesch // *MBio*. - 2016. - Vol. 7, № 1. - P. 1-11.

220. Goering, R.V. Rapid method for epidemiologic evaluation of gram-positive cocci by field inversion gel-electrophoresis / R. V. Goering, M. A. Winters // *Journal of Clinical Microbiology*. - 1992. - Vol. 30, № 3. - P. 577-580.

221. Gonzalez, B.E. Pulmonary manifestations in children with invasive community-acquired *Staphylococcus aureus* infection / B. E. Gonzalez, K. G. Hulten, M. K. Dishop, L. B. Lamberth, W. A. Hammerman, E. O. Mason, S. L. Kaplan // *Clinical Infectious Diseases*. - 2005. - Vol. 41, № 5. - P. 583-590.

222. Gordon, R.J. Pathogenesis of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection / R. J. Gordon, F. D. Lowy // *Clinical Infectious Diseases*. - 2008. - Vol. 46, - P. 350-359.

223. Gosbell, I.B. Epidemiology, clinical features and management of infections due to community methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (cMRSA) / I. B. Gosbell // *Internal Medicine Journal*. - 2005. - Vol. 35, - P. 120-135.

224. 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, O. Khokhlova, T. Yamamoto, Y. Lobzin, I. Ryabchenko, S. Sidorenko // Infection Genetics and Evolution. - 2017. - Vol. 53, - P. 189-194.

225. Gravet, A. Predominant *Staphylococcus aureus* isolated from antibiotic-associated diarrhea is clinically relevant and produces enterotoxin A and the bicomponent toxin LukE-LukD / A. Gravet, M. Rondeau, C. Harf-Monteil, F. Grunenberger, H. Monteil, J. M. Scheftel, G. Prevost // Journal of Clinical Microbiology. - 1999. - Vol. 37, № 12. - P. 4012-4019.

226. Grindley, N.D. Mechanisms of site-specific recombination / N. D. Grindley, K. L. Whiteson, P. A. Rice // Annual Review of Biochemistry. - 2006. - № 75. - P. 567–605.

227. Grumann, D. Characterization of infecting strains and superantigen-neutralizing antibodies in *Staphylococcus aureus* bacteremia / D. Grumann, E. Ruotsalainen, J. Kolata, P. Kuusela, A. Jarvinen, V. P. Kontinen, B. M. Broker, S. Holtfreter // Clinical and Vaccine Immunology. - 2011. - Vol. 18, № 3. - P. 487-493.

228. Grundmann, H. Geographic distribution of *Staphylococcus aureus* causing invasive infections in Europe: A molecular-epidemiological analysis / H. Grundmann, D. M. Aanensen, C. C. van den Wijngaard, B. G. Spratt, D. Harmsen, A. W. Friedrich // Plos Medicine. - 2010. - Vol. 7, № 1. - P. 1-15.

229. Guan, P. Structural variation detection using next-generation sequencing data: a comparative technical review / P. Guan, W. K. Sung // Methods. - 2016. - Vol. 102, - P. 36-49.

230. Guardabassi, L. Public health impact and antimicrobial selection of methicillin-resistant staphylococci in animals / L. Guardabassi, J. Larsen, J. S. Weese, P. Butaye, A. Battisti, J. Kluytmans, D. H. Lloyd, R. L. Skov // Journal of Global Antimicrobial Resistance. - 2013. - Vol. 1, № 2. - P. 55-62.

231. Gupta, R.K. MgrA activates expression of capsule genes, but not the alpha-toxin gene in experimental *Staphylococcus aureus* endocarditis / R. K. Gupta, J. Alba, Y. Q. Xiong, A. S. Bayer, C. Y. Lee // *The Journal of Infectious Diseases*. - 2013. - № 208. - P. 1841–1848.

232. Hafer, C. Contribution of selected gene mutations to resistance in clinical isolates of vancomycin-intermediate *Staphylococcus aureus* / C. Hafer, Y. Lin, J. Kornblum, F. D. Lowy, A. C. Uhlemann // *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. - 2012. - Vol. 56, № 11. - P. 5845-5851.

233. Hampele, I.C. Structure and function of the dihydropteroate synthase from *Staphylococcus aureus* / I. C. Hampele, A. D'Arcy, G. E. Dale, D. Kostrewa, J. Nielsen, C. Oefner, M. G. Page, H. J. Schönfeld, D. Stüber, R. L. Then // *Journal of Molecular Biology*. - 1997. - 268:. - P. 21–30.

234. Harastani, H.H. Community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clonal complex 80 Type IV (CC80-MRSA-IV) isolated from the Middle East: A heterogeneous expanding clonal lineage / H. H. Harastani, S. T. Tokajian // *Plos One*. - 2014. - Vol. 9, № 7. - P. 1-11.

235. Harper, L. *Staphylococcus aureus* responds to the central metabolite pyruvate to regulate virulence / L. Harper, D. Balasubramanian, E. A. Ohneck, W. E. Sause, J. Chapman, B. Mejia-Sosa, T. Lhakhang, A. Heguy, A. Tsirigos, B. Ueberheide, J. M. Boyd, D. S. Lun, V. J. Torres // *MBio*. - 2018. - Vol. 9, № 1. - P. 1-17.

236. Harris, S.R. Evolution of MRSA during hospital transmission and intercontinental spread / S. R. Harris, E. J. Feil, M. T. G. Holden, M. A. Quail, E. K. Nickerson, N. Chantratita, S. Gardete, A. Tavares, N. Day, J. A. Lindsay, J. D. Edgeworth, H. de Lencastre, J. Parkhill, S. J. Peacock, S. D. Bentley // *Science*. - 2010. - Vol. 327, № 5964. - P. 469-474.

237. Hau, S.J. Comparative prevalence of immune evasion complex genes associated with beta-hemolysin converting bacteriophages in MRSA ST5 isolates from swine, swine facilities, humans with swine contact, and humans with no

swine contact / S. J. Hau, J. S. Sun, P. R. Davies, T. S. Frana, T. L. Nicholson // PLoS One. - 2015. - Vol. 10, № 11. - P. 1-13.

238. Heather, J.M. The sequence of sequencers: The history of sequencing DNA / J. M. Heather, B. Chain // Genomics. - 2016. - Vol. 107, - P. 1-8.

239. Heckel, M. Nasal carriage of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) at a palliative care unit: A prospective single service analysis / M. Heckel, W. Geissdorfer, F. A. Herbst, S. Stiel, C. Ostgathe, C. Bogdan // Plos One. - 2017. - Vol. 12, № 12. - P. 1-14.

240. Hennig, S. Characterization of the transposase encoded by IS256, the prototype of a major family of bacterial insertion sequence elements / S. Hennig, W. Ziebuhr // Journal of Bacteriology. - 2010. - № 192. - P. 4153–4163.

241. Higuchi, W. Structure and specific detection of staphylococcal cassette chromosome mec type VII / W. Higuchi, T. Takano, L. J. Teng, T. Yamamoto // Biochemical and Biophysical Research Communications. - 2008. - Vol. 377, № 3. - P. 752-756.

242. Higuchi, W. Emergence of the community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* USA300 clone in a Japanese child, demonstrating multiple divergent strains in Japan / W. Higuchi, S. Mimura, Y. Kurosawa, T. Takano, Y. Iwao, S. Yabe, O. Razvina, A. Nishiyama, Y. Ikeda-Dantsuji, F. Sakai, H. Hanaki, T. Yamamoto // Journal of Infection and Chemotherapy. - 2010. - Vol. 16, № 4. - P. 292-297.

243. Hill, C.W. Inversions between ribosomal RNA genes of *Escherichia coli* / C. W. Hill, B. W. Harnish // Proceedings of the National Academy of Sciences. - 1981. - № 78. - P. 7069-7072.

244. Hiramatsu, K. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clinical strain with reduced vancomycin susceptibility / K. Hiramatsu, H. Hanaki, T. Ino, K. Yabuta, T. Oguri, F. C. Tenover // Journal of Antimicrobial Chemotherapy. - 1997. - Vol. 40, № 1. - P. 135-136.

245. Hiramatsu, K. Genomic basis for methicillin resistance in *Staphylococcus aureus* / K. Hiramatsu, T. Ito, S. Tsubakishita, T. Sasaki, F.

Takeuchi, Y. Morimoto, Y. Katayama, M. Matsuo, K. Kuwahara-Arai, T. Hishinuma, T. Baba // *Infection & Chemotherapy*. - 2013. - Vol. 45, № 2. - P. 117-36.

246. Holden, M.T.G. Genome sequence of a recently emerged, highly transmissible, multi-antibiotic- and antiseptic-resistant variant of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, sequence type 239 (TW) / M. T. G. Holden, J. A. Lindsay, C. Corton, M. A. Quail, J. D. Cockfield, S. Pathak, R. Batra, J. Parkhill, S. D. Bentley, J. D. Edgeworth // *Journal of Bacteriology*. - 2010. - Vol. 192, № 3. - P. 888-892.

247. Holmes, N.E. Morbidity from in-hospital complications is greater than treatment failure in patients with *Staphylococcus aureus* bacteraemia / N. E. Holmes, J. O. Robinson, S. J. van Hal, W. J. Munckhof, E. Athan, T. M. Korman, A. C. Cheng, J. D. Turnidge, P. D. R. Johnson, B. P. Howden // *BMC Infectious Diseases* - 2018. - Vol. 18, № 1. - P. 1-9.

248. Howden, B.P. Reduced vancomycin susceptibility in *Staphylococcus aureus*, including vancomycin-intermediate and heterogeneous vancomycin-intermediate strains: resistance mechanisms, laboratory detection, and clinical implications / B. P. Howden, J. K. Davies, P. D. R. Johnson, T. P. Stinear, M. L. Grayson // *Clinical Microbiology Reviews*. - 2010. - Vol. 23, № 1. - P. 99-139.

249. Howden, B.P. Complete genome sequence of *Staphylococcus aureus* strain JKD6008, a ST239 clone of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* with intermediate level vancomycin resistance / B. P. Howden, T. Seemann, P. F. Harrison, C. R. McEvoy, J. A. Stanton, C. J. Rand, C. W. Mason, S. O. Jensen, N. Firth, J. K. Davies, P. D. Johnson, T. P. Stinear // *Journal of Bacteriology*. - 2010 - Vol. 192, № 21. - P. 5848-5849.

250. Hryniewicz, M.M. Borderline oxacillin-resistant *Staphylococcus aureus* (BORSA) – a more common problem than expected / M. M. Hryniewicz, K. Garbacz // *Journal of Medical Microbiology*. - 2017. - Vol. 6, - P. 1367–1373.

251. Hsu, L.Y. Establishment of ST30 as the predominant clonal type among community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates in

Singapore / L. Y. Hsu, Y. L. Koh, N. L. Chlebicka, T. Y. Tan, P. Krishnan, R. T. P. Lin, N. Tee, T. Barkham, T. H. Koh // *Journal of Clinical Microbiology*. - 2006. - Vol. 44, № 3. - P. 1090-1093.

252. Hsu, L.Y. Evolving EMRSA-15 epidemic in Singapore hospitals / L. Y. Hsu, N. Loomba-Chlebicka, Y. L. Koh, T. Y. Tan, P. Krishnan, R. T. P. Lin, N. W. Tee, D. A. Fisher, T. H. Koh // *Journal of Medical Microbiology*. - 2007. - № 56. - P. 376-379.

253. Hung, W.C. Comparative genomics of community-acquired ST59 methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Taiwan: novel mobile resistance structures with IS1216V / W. C. Hung, T. Takano, W. Higuchi, Y. Iwao, O. Khokhlova, L. J. Teng, T. Yamamoto // *PLoS One*. - 2012. - № 7. - P. 1-23.

254. Iguchi, A. Spontaneous recombination between homologous prophage regions causes large-scale inversions within the *Escherichia coli* O157:H7 chromosome / A. Iguchi, S. Iyoda, J. Terajima, H. Watanabe, O. R. // *Gene*. - 2006. - № 372. - P. 199-207.

255. Isobe, H. Evolution and virulence of Pantone-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, № 2. - P. 97-109.

256. Isobe, H. Recurrence of pelvic abscess from Pantone-Valentine leukocidin-positive community-acquired ST30 methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* / H. Isobe, D. Miyasaka, T. Ito, T. Takano, A. Nishiyama, Y. Iwao, O. Khokhlova, T. Okubo, N. Endo, T. Yamamoto // *Pediatrics International*. - 2013. - № 1. - P. 120-123.

257. Ito, T. Cloning and nucleotide sequence determination of the entire *mec* DNA of pre-methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* N315 / T. Ito, Y. Katayama, K. Hiramatsu // *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. - 1999. - Vol. 43, № 6. - P. 1449-1458.

258. Ito, T. Structural comparison of three types of staphylococcal cassette chromosome *mec* integrated in the chromosome in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (vol 45, pg 1323, 2001) / T. Ito, Y. Katayama, K. Asada, N. Mori, K. Tsutsumimoto, C. Tiensasitorn, K. Hiramatsu // Antimicrobial Agents and Chemotherapy. - 2001. - Vol. 45, № 12. - P. 3677-3677.

259. Ito, T. Classification of staphylococcal cassette chromosome *mec* (SCC*mec*): Guidelines for reporting novel SCC*mec* elements / T. Ito, K. Hiramatsu, D. C. Oliveira, H. de Lencastre, K. Y. Zhang, H. Westh, F. O'Brien, P. M. Giffard, D. Coleman, F. C. Tenover, S. Boyle-Vavra, R. L. Skov, M. C. Enright, B. Kreiswirth, K. S. Ko, H. Grundmann, F. Laurent, J. E. Sollid, A. M. Kearns, R. Goering, J. F. John, R. Daum, B. Soderquist // Antimicrobial Agents and Chemotherapy. - 2009. - Vol. 53, № 12. - P. 4961-4967.

260. Iwamoto, M. Trends in invasive methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections / M. Iwamoto, Y. Mu, R. Lynfield, S. N. Bulens, J. Nadle, D. Aragon, S. Petit, S. M. Ray, L. H. Harrison, G. Dumyati, J. M. Townes, W. Schaffner, R. J. Gorwitz, F. C. Lessa // Pediatrics. - 2013. - Vol. 132, № 4. - P. 817-824.

261. 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. Khokhlova, P. L. Ho, T. Yamamoto // Journal of Infection and Chemotherapy. - 2012 -Vol. 18, № 2. - P. 228-240.

262. Jain, M. The Oxford Nanopore MinION: delivery of nanopore sequencing to the genomics community / M. Jain, H. E. Olsen, B. Paten, M. Akeson // Genome Biology. - 2016. - Vol. 17, № 239. - P. 1-11.

263. Jamil, B. Hospital-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) from Pakistan: molecular characterisation by microarray technology / B. Jamil, D. Gawlik, M. A. Syed, A. A. Shah, S. A. Abbasi, E. Müller, A. Reißig, R.

Ehrlich, S. Monecke // European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases. - 2018 -Vol. 37, № 4. - P. 691-700.

264. Jansen, A. Role of insertion elements and transposons in the development of decreased susceptibility to vancomycin in *Staphylococcus aureus* / A. Jansen, M. Tuřck, C. Szekat, M. Nagel, I. Clever, G. Bierbaum // International Journal of Medical Microbiology. - 2007. - № 297. - P. 205-215.

265. Jarlier, V. Curbing methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in 38 French hospitals through a 15-year institutional control program / V. Jarlier, D. Trystram, C. Brun-Buisson, S. Fournier, A. Carbonne, L. Marty, A. Andreumont, G. Arlet, A. Buu-Hoi, J. Carlet, D. Decre, S. Gottot, L. Gutmann, M. L. Joly-Guillou, P. Legrand, M. H. Nicolas-Chanoine, C. J. Soussy, M. Wolf, J. C. Lucet, M. Aggoune, G. Brucker, B. Regnier // Archives of Internal Medicine. - 2010. - Vol. 170, № 6. - P. 552-559.

266. Jarvis, W.R. National prevalence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in inpatients at United States health care facilities, 2010 / W. R. Jarvis, A. A. Jarvis, R. Y. Chinn // American Journal of Infection Control. - 2012 -Vol. 40, № 3. - P. 194-200.

267. Jason, P. Regional and national review of factors associated with burn wound cellulitis / P. Jason, J. P. Heard, K. M. McDonald, Y. Xing, K. M. Kluesner, J. Liao, L. A. Wibbenmeyer // Journal of Burn Care & Research - 2015. - Vol. 36, № 1. - P. 23-32.

268. Jensen, S.O. Genetics of antimicrobial resistance in *Staphylococcus aureus* / S. O. Jensen, B. R. Lyon // Future Microbiology. - 2009. - Vol. 4, № 5. - P. 565-582.

269. Jeschke, M.G. Morbidity and survival probability in burn patients in modern burn care / M. G. Jeschke, R. Pinto, R. Kraft, A. B. Nathens, C. C. Finnerty, R. L. Gamelli, N. S. Gibran, M. B. Klein, B. D. Arnoldo, R. G. Tompkins, D. N. Herndon // Critical Care Medicine. - 2015. - № 43. - P. 808-815.

270. Johnson, A.P. Surveillance and epidemiology of MRSA bacteraemia in the UK / A. P. Johnson, A. Pearson, G. Duckworth // *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. - 2005 -Vol. 56, 3. - P. 455-462.

271. Joo, H.S. Antimicrobial activity of community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* is caused by phenol-soluble modulins derivatives / H. S. Joo, G. Y. Cheung, M. Otto // *Journal of Biological Chemistry*. - 2011. - № 286. - P. 8933–8940.

272. Jorgensen, J.H. Mechanisms of methicillin resistance in *Staphylococcus aureus* and methods for laboratory detection / J. H. Jorgensen // *Infection Control & Hospital Epidemiology*. - 1991. - Vol. 12, - P. 14-19.

273. Jung, J. Emergence of Panton-Valentine leucocidin-positive ST8-methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (USA300 clone) in Korea causing healthcare-associated and hospital-acquired bacteraemia / J. Jung, E. H. Song, S. Y. Park, S. R. Lee, S. J. Park, H. Sung, M. N. Kim, S. H. Kim, S. O. Lee, S. H. Choi, J. H. Woo, Y. S. Kim, Y. P. Chong // *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*. - 2016. - Vol. 35, № 8. - P. 1323-1329.

274. Kadlec, K. Identification of the novel *dfrK*-carrying transposon Tn559 in a porcine methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* ST398 strain / K. Kadlec, S. Schwarz // *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. - 2010. - № 54. - P. 3475-3477.

275. Kado, C.I. Rapid procedure for detection and isolation of large and small plasmids / C. I. Kado, S. T. Liu // *Journal of Bacteriology*. - 1981. - Vol. 145, № 3. - P. 1365-1373.

276. Kahankova, J. Multilocus PCR typing strategy for differentiation of *Staphylococcus aureus* siphoviruses reflecting their modular genome structure / J. Kahankova, R. Pantucek, C. Goerke, V. Ruzickova, P. Holochova, J. Doskar // *Environmental Microbiology*. - 2010. - Vol. 12, № 9. - P. 2527-2538.

277. Kamath, G.M. HINGE: long-read assembly achieves optimal repeat resolution / G. M. Kamath, I. Shomorony, F. Xia, T. A. Courtade, D. N. Tse // *Genome Research*. - 2017. - № 27. - P. 747-756.

278. Kang, M. Collagen-binding microbial surface components recognizing adhesive matrix molecule (MSCRAMM) of Gram-positive bacteria inhibit complement activation via the classical pathway / M. Kang, Y. P. Ko, X. Liang, C. L. Ross, Q. Liu, B. E. Murray, M. Höök // *Journal of Biological Chemistry*. - 2013. - № 288. - P. 20520-20531.

279. Katayama, Y. A new class of genetic element, staphylococcus cassette chromosome mec, encodes methicillin resistance in *Staphylococcus aureus* / Y. Katayama, T. Ito, K. Hiramatsu // *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. - 2000. - Vol. 44, № 6. - P. 1549-1555.

280. Katayama, Y. Genetic organization of the chromosome region surrounding mecA in clinical staphylococcal strains: Role of IS431-mediated mecI deletion in expression of resistance in mecA-carrying, low-level methicillin-resistant *Staphylococcus haemolyticus* / Y. Katayama, T. Ito, K. Hiramatsu // *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. - 2001. - Vol. 45, № 7. - P. 1955-1963.

281. Kawaguchiya, M. Genetic diversity of emerging Pantone-Valentine leukocidine/arginine catabolic mobile element (ACME)-positive ST8 SCCmec-IVa methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) strains and ACME-positive CC5 (ST5/ST764) MRSA strains in northern Japan / M. Kawaguchiya, N. Urushibara, S. Ghosh, O. Kuwahara, S. Morimoto, M. Ito, K. Kudo, N. Kobayashi // *Journal of Medical Microbiology*. - 2013. - Vol. 62, - P. 1852-1863.

282. Kayser, F.H. Genetic and molecular characterization of resistance determinants in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* / F. H. Kayser, J. Wust, P. Santan // *Medical Microbiology*. - 1976. - Vol. 9, - P. 137-148.

283. Kazakova, S.V. A clone of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* among professional football players / S. V. Kazakova, J. C. Hageman, M. Matava, A. Srinivasan, L. Phelan, B. Garfinkel, T. Boo, S. McAllister, J. Anderson, B. Jensen, D. Dodson, D. Lonsway, L. K. McDougal, M. Arduino, V. J. Fraser, G. Killgore, F. C. Tenover, S. Cody, D. B. Jernigan // *New England Journal of Medicine*. - 2005. - Vol. 352, № 5. - P. 468-475.

284. Kennedy, A.D. Epidemic community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: Recent clonal expansion and diversification / A. D. Kennedy, M. Otto, K. R. Braughton, A. R. Whitney, L. Chen, B. Mathema, J. R. Mediavilla, K. A. Byrne, L. D. Parkins, F. C. Tenover, B. N. Kreiswirth, J. M. Musser, F. R. DeLeo // Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. - 2008. - Vol. 105, № 4. - P. 1327-1332.

285. Khan, A. Current and future treatment options for community-associated MRSA infection / A. Khan, B. Wilson, I. M. Gould // Expert Opinion on Pharmacotherapy. - 2018. - Vol. 19, № 5. - P. 457-470.

286. Khan, S.A. Rolling-circle replication of bacterial plasmids / S. A. Khan // Microbiology and Molecular Biology Reviews. - 1997. - № 61. - P. 442–455.

287. Khan, S.A. Plasmid rolling-circle replication: highlights of two decades of research / S. A. Khan // Plasmid. - 2005. - Vol. 53, № 2. - P. 126-136.

288. Khokhlova, O. 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 / O. 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, № 3. - P. 335-339.

289. Khokhlova, O.E. Healthcare- and community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) and fatal pneumonia with pediatric deaths in Krasnoyarsk, Siberian Russia: unique MRSA's multiple virulence factors, genome, and stepwise evolution / O. E. Khokhlova, W. C. Hung, T. W. Wan, Y. Iwao, T. Takano, W. Higuchi, S. V. Yachenko, O. V. Teplyakova, 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. - Vol. 10, № 6. - P. 1-30.

290. Kim, E.S. Molecular characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates in Korea / E. S. Kim, H. J. Lee, G. T. Chung, Y. S. Lee, D. H. Shin, S. I. Jung, K. H. Song, W. B. Park, N. J. Kim, K. U. Park, E. C.

Kim, M. D. Oh, H. B. Kim // Journal of Clinical Microbiology. - 2011. - Vol. 49, № 5. - P. 1979-1982.

291. King, M.D. Emergence of community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* USA 300 clone as the predominant cause of skin and soft-tissue infections / M. D. King, B. J. Humphrey, Y. F. Wang, E. V. Kourbatova, S. M. Ray, H. M. Blumberg // Annals of Internal Medicine. - 2006. - Vol. 144, № 5. - P. 309-317.

292. Klein, E. Community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in outpatients, United States, 1999-2006 / E. Klein, D. Smith, R. Laxminarayan // Emerging Infectious Diseases. - 2009. - Vol. 15, № 12. - P. 1925-1930.

293. Kleinert, F. Influence of IS256 on genome variability and formation of small-colony variants in *Staphylococcus aureus* / F. Kleinert, R. Kallies, M. Hort, A. Zweynert, C. Szekat, M. Nagel, G. Bierbaum // Antimicrobial Agents and Chemotherapy. - 2017. - Vol. 61, № 8. - P. 1-16.

294. Klevens, R.M. Changes in the epidemiology of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in intensive care units in US hospitals, 1992-2003 / R. M. Klevens, J. R. Edwards, F. C. Tenover, L. C. McDonald, T. Horan, R. Gaynes // Clinical Infectious Diseases. - 2006. - Vol. 42, № 3. - P. 389-391.

295. Klevens, R.M. Invasive methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections in the United States / R. M. Klevens, M. A. Morrison, J. Nadle, S. Petit, K. Gershman, S. Ray, L. H. Harrison, R. Lynfield, G. Dumyati, J. M. Townes, A. S. Craig, E. R. Zell, G. E. Fosheim, L. K. McDougal, R. B. Carey, S. K. Fridkin // Jama-Journal of the American Medical Association. - 2007. - Vol. 298, № 15. - P. 1763-1771.

296. Knight, G.M. Shift in dominant hospital-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (HA-MRSA) clones over time / G. M. Knight, E. L. Budd, L. Whitney, A. Thornley, H. Al-Ghusein, T. Planche, J. A. Lindsay // Journal of Antimicrobial Chemotherapy. - 2012. - Vol. 67, № 10. - P. 2514-2522.

297. Ko, K.S. Distribution of major genotypes among methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clones in Asian countries / K. S. Ko, J. Y. Lee, J. Y. Suh, W. S. Oh, K. R. Peck, N. Y. Lee, J. H. Song // Journal of Clinical Microbiology. - 2005. - Vol. 43, № 1. - P. 421-426.

298. Koboldt, D.C. The next-generation sequencing revolution and its impact on genomics / D. C. Koboldt, K. M. Steinberg, D. E. Larson, R. K. Wilson, E. R. Mardis // Cell. - 2013. - Vol. 155, - P. 27-38.

299. Kondo, Y. Combination of multiplex PCRs for staphylococcal cassette chromosome mec type assignment: Rapid identification system for mec, ccr, and major differences in junkyard regions / Y. Kondo, T. Ito, X. X. Ma, S. Watanabe, B. N. Kreiswirth, J. Etienne, K. Hiramatsu // Antimicrobial Agents and Chemotherapy. - 2007. - Vol. 51, № 1. - P. 264-274.

300. Koren, S. Canu: scalable and accurate long-read assembly via adaptive k-mer weighting and repeat separation / S. Koren, B. P. Walenz, K. Berlin, J. R. Miller, N. H. Bergman, A. M. Phillippy // Genome Research. - 2017. - № 27. - P. 722-736.

301. Kozitskaya, S. The bacterial insertion sequence element IS256 occurs preferentially in nosocomial *Staphylococcus epidermidis* isolates: association with biofilm formation and resistance to aminoglycosides / S. Kozitskaya, S. H. Cho, K. Dietrich, R. Marre, K. Naber, W. Ziebuhr // Infection and Immunity. - 2004. - № 72. - P. 1210-1215.

302. Kresse, A.U. Impact of large chromosomal inversions on the adaptation and evolution of *Pseudomonas aeruginosa* chronically colonizing cystic fibrosis lungs / A. U. Kresse, S. D. Dinesh, K. Larbig, U. Römling // Molecular Microbiology. - 2003. - № 47. - P. 145-158.

303. Krizanovic, K. Evaluation of tools for long read RNA-seq splice-aware alignment / K. Krizanovic, A. Echchiki, J. Roux, M. Sikic // Bioinformatics. - 2017. - Vol. 34, № 5. - P. 748-754.

304. Krziwanek, K. MRSA in Austria-an overview / K. Krziwanek, C. Luger, B. Sammer, S. Stumvoll, M. Stammler, U. Sagel, W. Witte, H. Mittermayer // *Clinical Microbiology and Infection*. - 2008. - № 14. - P. 250-259.

305. Kuroda, M. Two-component system VraSR positively modulates the regulation of cell-wall biosynthesis pathway in *Staphylococcus aureus* / M. Kuroda, H. Kuroda, T. Oshima, F. Takeuchi, H. Mori, K. Hiramatsu // *Molecular Microbiology*. - 2003. - Vol. 49, № 3. - P. 807-821.

306. Kuroda, M. *Staphylococcus aureus* giant protein Ebh is involved in tolerance to transient hyperosmotic pressure / M. Kuroda, Y. Tanaka, R. Aoki, D. Shu, K. Tsumoto, T. Ohta // *Biochemical and Biophysical Research Communications*. - 2008. - № 374. - P. 237–241.

307. Lakhundi, S. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: molecular characterization, evolution, and epidemiology / S. Lakhundi, K. Zhang // *Clinical Microbiology Reviews* - 2018. - Vol. 31, № 4. - P. 1-103.

308. Lange, C.C. Molecular analysis of the plasmid-borne *aacA/aphD* resistance gene region of coagulase-negative staphylococci from chickens / C. C. Lange, C. Werckenthin, S. Schwarz // *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. - 2003. - Vol. 51, № 6. - P. 1397-1401.

309. Langley, R. The staphylococcal superantigen-like protein 7 binds IgA and complement C5 and inhibits IgA-Fc alpha RI binding and serum killing of bacteria / R. Langley, B. Wines, N. Willoughby, I. Basu, T. Proft, J. D. Fraser // *Journal of Immunology*. - 2005. - Vol. 174, № 5. - P. 2926-2933.

310. Langley, R.J. Staphylococcal enterotoxin-like X (SEIX) is a unique superantigen with functional features of two major families of staphylococcal virulence factors / R. J. Langley, Y. T. Ting, F. Clow, P. G. Young, F. J. Radcliff, J. M. Choi, R. P. Sequeira, S. Holtfreter, H. Baker, J. D. Fraser // *PloS Pathogens*. - 2017. - Vol. 13, № 9. - P. 1-29.

311. Larsen, A.R. Emergence and characterization of community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections in Denmark, 1999 to 2006 /

A. R. Larsen, M. Stegger, S. Bocher, M. Sorum, D. L. Monnet, R. L. Skov // Journal of Clinical Microbiology. - 2009. - Vol. 47, № 1. - P. 73-78.

312. Lee, A.S. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* / A. S. Lee, H. de Lencastre, J. Garau, J. Kluytmans, S. Malhotra-Kumar, A. Peschel, S. Harbarth // Nature reviews disease primers. - 2018 -Vol. 31, № 4. - P. 1-23.

313. Lee, H. Ceftaroline resistance by clone-specific polymorphism in penicillin-binding protein 2a of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* / H. Lee, E. J. Yoon, D. Kim, J. W. Kim, K. J. Lee, H. S. Kim, Y. R. Kim, J. H. Shin, J. H. Shin, K. S. Shin, Y. A. Kim, Y. Uh, S. H. Jeong // Antimicrobial Agents and Chemotherapy. - 2018 -Vol. 62, № 9. - P. 1-23.

314. Lee, J.H. Predictive factors of true bacteremia and the clinical utility of blood cultures as a prognostic tool in patients with community-onset pneumonia / J. H. Lee, Y. H. Kim // Medicine. - 2016. - Vol. 95, № 41. - P. 1-7.

315. Levy, S.E. Advancements in next-generation sequencing / S. E. Levy, R. M. Myers // Annual Review of Genomics and Human Genetics. - 2016. - Vol. 17, - P. 95-111.

316. Li, H. A statistical framework for SNP calling, mutation discovery, association mapping and population genetical parameter estimation from sequencing data / H. Li // Bioinformatics. - 2011. - Vol. 27, - P. 2987-2993.

317. Li, L.P. Characterization of methicillin-resistant and -susceptible staphylococcal isolates from bovine milk in Northwestern China / L. P. Li, L. X. Zhou, L. H. Wang, H. P. Xue, X. Zhao // Plos One. - 2015. - Vol. 10, № 3. - P. 1-8.

318. Li, M. Comparative analysis of virulence and toxin expression of global community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains / M. Li, G. Y. C. Cheung, J. H. Hu, D. C. Wang, H. S. Joo, F. R. DeLeo, M. Otto // Journal of Infectious Diseases. - 2010. - Vol. 202, № 12. - P. 1866-1876.

319. Li, M. MRSA epidemic linked to a quickly spreading colonization and virulence determinant / M. Li, X. Du, A. E. Villaruz, B. A. Diep, D. C. Wang, Y. Song, Y. R. Tian, J. H. Hu, F. Y. Yu, Y. Lu, M. Otto // Nature Medicine. - 2012. - Vol. 18, № 5. - P. 816-820.

320. Li, S. Phenol-soluble modulins: novel virulence-associated peptides of staphylococci / S. Li, H. Huang, X. Rao, W. Chen, Z. Wang, X. Hu // *Future Microbiology*. - 2014. - Vol. 9, № 2. - P. 203-216.

321. Li, S.S. Novel types of staphylococcal cassette chromosome mec elements identified in clonal complex 398 methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains / S. S. Li, R. L. Skov, X. Han, A. R. Larsen, J. Larsen, M. Sorum, M. Wulf, A. Voss, K. Hiramatsu, T. Ito // *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. - 2011. - Vol. 55, № 6. - P. 3046-3050.

322. Lim, W.S. British Thoracic Society adult community acquired pneumonia audit 2009/1 / W. S. Lim, M. Woodhead // *Thorax*. - 2011. - Vol. 66, № 6. - P. 548-549.

323. Lindsay, J.A. *Staphylococcus aureus*: superbug, super genome? / J. A. Lindsay, M. T. G. Holden // *Trends in Microbiology*. - 2004. - Vol. 12, № 8. - P. 378-385.

324. Lindsay, J.A. Genomic variation and evolution of *Staphylococcus aureus* / J. A. Lindsay // *International Journal of Medical Microbiology*. - 2010. - Vol. 300, № 2-3. - P. 98-103.

325. Lindsay, J.A. Evolution of *Staphylococcus aureus* and MRSA during outbreaks / J. A. Lindsay // *Infection Genetics and Evolution*. - 2014. - Vol. 21, - P. 548-553.

326. Liu, B. rHAT: fast alignment of noisy long reads with regional hashing / B. Liu, D. Guan, M. Teng, Y. Wang // *Bioinformatics*. - 2016. - № 32. - P. 1625-1631.

327. Liu, C. A population-based study of the incidence and molecular epidemiology of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* disease in San Francisco, 2004-2005 / C. Liu, C. J. Graber, M. Karr, B. A. Diep, L. Basuino, B. S. Schwartz, M. C. Enright, S. J. O'Hanlon, J. C. Thomas, F. Perdreau-Remington, S. Gordon, H. Gunthorpe, R. Jacobs, P. Jensen, G. Leoung, J. S. Rumack, H. F. Chambers // *Clinical Infectious Diseases*. - 2008. - Vol. 46, № 11. - P. 1637-1646.

328. Liu, J.Y. Staphylococcal chromosomal cassettes mec (SCCmec): A mobile genetic element in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* / J. Y. Liu, D. Q. Chen, B. M. Peters, L. Li, B. Li, Z. B. Xu, M. E. Shirliff // *Microbial Pathogenesis*. - 2016. - Vol. 101, - P. 56-67.

329. Liu, P.L. Effect of bla regulators on the susceptible phenotype and phenotypic conversion for oxacillin-susceptible mecA-positive staphylococcal isolates / P. L. Liu, H. P. Xue, Z. W. Wu, J. F. Ma, X. Zhao // *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. - 2016. - Vol. 71, № 8. - P. 2105-2112.

330. Liu, Y.D. Molecular evidence for spread of two major methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clones with a unique geographic distribution in chinese hospitals / Y. D. Liu, H. Wang, N. Du, E. H. Shen, H. B. Chen, J. Q. Niu, H. F. Ye, M. J. Chen // *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. - 2009. - Vol. 53, № 2. - P. 512-518.

331. Lo, W.T. Changes in the nasal colonization with methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in children: 2004-2009 / W. T. Lo, C. C. Wang, W. J. Lin, S. R. Wang, C. S. Teng, C. F. Huang, S. J. Chen // *PLoS One*. - 2010. - № 5. - P. 1-9.

332. Loessner, I. Transposase-dependent formation of circular IS256 derivatives in *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus aureus* / I. Loessner, K. Dietrich, D. Dittrich, J. Hacker, W. Ziebuhr // *Journal of Bacteriology*. - 2002. - № 184. - P. 4709–4714.

333. Lowy, F.D. Antimicrobial resistance: the example of *Staphylococcus aureus* / F. D. Lowy // *Journal of Clinical Investigation*. - 2003 -Vol. 111, № 9. - P. 1265-1273.

334. Lowy, F.D. *Staphylococcus aureus* colonization and infection in New York state prisons / F. D. Lowy, A. E. Aiello, M. Bhat, V. D. Johnson-Lawrence, M. H. Lee, E. Burrell, L. N. Wright, G. Vasquez, E. L. Larson // *Journal of Infectious Diseases*. - 2007. - Vol. 196, № 6. - P. 911-918.

335. Lucas, A.L. Phenotypic characterization of *sarR* mutant in *Staphylococcus aureus* / A. L. Lucas, A. C. Manna // Microbial Pathogenesis. - 2013. - № 57. - P. 52-61.

336. Luedicke, C. Molecular fingerprinting of *Staphylococcus aureus* from bone and joint infections / C. Luedicke, P. Slickers, R. Ehricht, S. Monecke // European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases. - 2010. - Vol. 29, № 4. - P. 457-463.

337. Lyon, B.R. Antimicrobial resistance of *Staphylococcus aureus*: genetic basis / B. R. Lyon, R. Skurray // Microbiological Reviews. - 1987. - № 51. - P. 88–134.

338. Madzgalla, S. Molecular characterization of *Staphylococcus aureus* isolates causing skin and soft tissue infections in patients from Malakand, Pakistan / S. Madzgalla, M. A. Syed, M. A. Khan, S. S. Rehman, E. Muller, A. Reissig, R. Ehricht, S. Monecke // European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases. - 2016. - Vol. 35, № 9. - P. 1541-1547.

339. Maeda, M. Analysis of staphylococcal toxins and clinical outcomes of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* bacteremia / M. Maeda, H. Shoji, T. Shirakura, T. Takuma, K. Ugajin, K. Fukuchi, Y. Niki, K. Ishino // Biological & Pharmaceutical Bulletin. - 2016. - Vol. 39, № 7. - P. 1195-1200.

340. Magill, S.S. Multistate point- prevalence survey of health care-associated infections / S. S. Magill, J. R. Edwards, W. Bamberg, Z. G. Beldavs, G. Dumyati, M. A. Kainer, R. Lynfield, M. Maloney, L. McAllister-Hollod, J. Nadle, S. M. Ray, D. L. Thompson, L. E. Wilson, S. K. Fridkin // New England Journal of Medicine. - 2014. - Vol. 370, № 13. - P. 1198-1208.

341. Maiques, E. Another look at the mechanism involving trimeric dUTPases in *Staphylococcus aureus* pathogenicity island induction involves novel players in the party / E. Maiques, N. Quiles-Puchalt, J. Donderis, J. R. Ciges-Tomas, C. Alite, J. Z. Bowring, S. Humphrey, J. R. Penades, A. Marina // Nucleic Acids Research. - 2016. - Vol. 44, № 11. - P. 5457-5469.

342. Maki, H. *tcaA* inactivation increases glycopeptide resistance in *Staphylococcus aureus* / H. Maki, N. McCallum, M. Bischoff, A. Wada, B. Berger-Bařchi // *Antimicrob Agents Chemother* - 2004. - № 48. - P. 1953-1959.

343. Malachowa, N. Mobile genetic elements of *Staphylococcus aureus* / N. Malachowa, F. R. DeLeo // *Cellular and Molecular Life Sciences*. - 2010. - Vol. 67, № 18. - P. 3057-3071.

344. Malani, P.N. National burden of invasive methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection / P. N. Malani // *Journal of the American Medical Association*. - 2014 -Vol. 9, № 311(14). - P. 1438-1439.

345. Mandal, S.M. Dissemination of antibiotic resistance in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and vancomycin-resistant *S. aureus* strains isolated from hospital effluents / S. M. Mandal, A. K. Ghosh, B. R. Pati // *American Journal of Infection Control*. - 2015. - Vol. 43, № 12. - P. 87-88.

346. Mandell, L.A. Community-acquired pneumonia: An overview / L. A. Mandell // *Postgraduate Medicine*. - 2015. - Vol. 127, № 6. - P. 607-615.

347. Mann, E.A. Comparison of mortality associated with sepsis in the burn, trauma, and general intensive care unit patient: A systematic review of the literature / E. A. Mann, M. M. Baun, J. C. Meininger, C. E. Wade // *Shock*. - 2012. - № 37. - P. 4-16.

348. Maree, C.L. Risk factors for infection and colonization with community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in the Los Angeles county jail: a case-control study / C. L. Maree, S. J. Eells, J. Tan, E. A. Bancroft, M. Malek, N. T. Harawa, M. J. Lewis, E. Santana, L. G. Miller // *Clinical Infectious Diseases*. - 2010. - Vol. 51, № 11. - P. 1248-1257.

349. Martin, E.M. Elimination of routine contact precautions for endemic methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and vancomycin-resistant *Enterococcus*: a retrospective quasi-experimental study / E. M. Martin, D. Russell, Z. Rubin, R. Humphries, T. R. Grogan, D. Elashoff, D. Z. Uslan // *Infection Control and Hospital Epidemiology*. - 2016. - Vol. 37, № 11. - P. 1323-1330.

350. Martineau, F. Correlation between the resistance genotype determined by multiplex PCR assays and the antibiotic susceptibility patterns of *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* / F. Martineau, F. J. Picard, N. Lansac, C. Menard, P. H. Roy, M. Ouellette, M. G. Bergeron // *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. - 2000. - Vol. 44, № 2. - P. 231-238.

351. Mayor, L. Molecular characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates collected in Asuncion, Paraguay / L. Mayor, J. Ortellado, C. Menacho, G. Lird, C. Courtier, C. Gardon, H. Meugnier, M. Bes, F. Vandenesch, J. Etienne // *Journal of Clinical Microbiology*. - 2007. - № 45. - P. 2298-2300.

352. McAdam, P.R. Molecular tracing of the emergence, adaptation, and transmission of hospital-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* / P. R. McAdam, K. E. Templeton, G. F. Edwards, M. T. G. Holden, E. J. Feil, D. M. Aanensen, H. J. A. Bargawi, B. G. Spratt, S. D. Bentley, J. Parkhill, M. C. Enright, A. Holmes, E. K. Girvan, P. A. Godfrey, M. Feldgarden, A. M. Kearns, A. Rambaut, D. A. Robinson, J. R. Fitzgerald // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. - 2012. - Vol. 109, № 23. - P. 9107-9112.

353. McCarthy, A.J. *Staphylococcus aureus* CC398 clade associated with human-to-human transmission / A. J. McCarthy, W. van Wamel, S. Vandendriessche, J. Larsen, O. Denis, C. Garcia-Graells, A. C. Uhlemann, F. D. Lowy, R. Skov, J. A. Lindsay // *Applied and Environmental Microbiology*. - 2012. - Vol. 78, № 24. - P. 8845-8848.

354. McCarthy, A.J. The distribution of plasmids that carry virulence and resistance genes in *Staphylococcus aureus* is lineage associated / A. J. McCarthy, J. A. Lindsay // *Bmc Microbiology*. - 2012. - Vol. 12, № 104. - P. 1-8.

355. McCarthy, A.J. *Staphylococcus aureus* innate immune evasion is lineage-specific: A bioinformatics study / A. J. McCarthy, J. A. Lindsay // *Infection Genetics and Evolution*. - 2013. - Vol. 19, - P. 7-14.

356. McFarland, K.N. SMRT sequencing of long tandem nucleotide repeats in SCA10 reveals unique insight of repeat expansion structure / K. N. McFarland, J. Liu, I. Landrian, R. Godiska, S. Shanker, F. Yu, W. G. Farmerie, T. Ashizawa // PLoS One. - 2015. - № 10. - P. 1-23

357. McGuinness, W.A. Vancomycin resistance in *Staphylococcus aureus* / W. A. McGuinness, N. Malachowa, F. R. DeLeo // Yale journal of biology and medicine. - 2017. - Vol. 90, - P. 269-281.

358. McManus, B.A. Comparative genotypes, staphylococcal cassette chromosome mec (sccmec) genes and antimicrobial resistance amongst *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus haemolyticus* isolates from infections in humans and companion animals / B. A. McManus, D. C. Coleman, E. C. Deasy, G. I. Brennan, B. O. Connell, S. Monecke, R. Ehricht, B. Leggett, N. Leonard, A. C. Shore // Plos One. - 2015. - 10, № 9. - P. 1-18.

359. Mediavilla, J.R. Global epidemiology of community-associated methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (CA-MRSA) / J. R. Mediavilla, L. Chen, B. Mathema, B. N. Kreiswirth // Current Opinion in Microbiology. - 2012. - Vol. 15, № 5. - P. 588-595.

360. Mellmann, A. Automated DNA sequence-based early warning system for the detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* outbreaks / A. Mellmann, A. W. Friedrich, N. Rosenkötter, J. Rothganger, H. Karch, R. Reintjes, D. Harmsen // PloS Medicine. - 2006. - Vol. 3, № 3. - P. 348-355.

361. Melter, O. Update on the major clonal types of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in the Czech Republic / O. Melter, M. Aires de Sousa, P. Urbášková, V. Jakubů, H. Žemličková, H. de Lencastre // Journal of Clinical Microbiology. - 2003. - № 41. - P. 4998-5005.

362. Melter, O. Update on the major clonal types of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in the Czech Republic / O. Melter, M. A. de Sousa, P. Urbaskova, V. Jakubu, H. Zemlickova, H. de Lencastre // Journal of Clinical Microbiology. - 2003. - Vol. 41, № 11. - P. 4998-5005.

363. Mendes, R.E. Characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains recovered from a phase IV clinical trial for linezolid versus vancomycin for treatment of nosocomial pneumonia / R. E. Mendes, L. M. Deshpande, D. S. Smyth, B. Shopsin, D. J. Farrell, R. N. Jones // Journal of Clinical Microbiology. - 2012. - № 50. - P. 3694-3702.

364. Meyer, E. The reduction of nosocomial mrsa infection in Germany an analysis of data from the hospital infection surveillance system (KISS) between 2007 and 2012 / E. Meyer, C. Schroder, P. Gastmeier, C. Geffers // Deutsches Arzteblatt International. - 2014. - Vol. 111, № 19. - P. 331-336.

365. Meziane-Cherif, D. Molecular basis of vancomycin dependence in vanA-type *Staphylococcus aureus* VRSA-9 / D. Meziane-Cherif, F. A. Saul, C. Moubareck, P. Weber, A. Haouz, P. Courvalin, B. Perichon // Journal of Bacteriology. - 2010. - Vol. 192, № 20. - P. 5465-5471.

366. Miao, J. Current methodologies on genotyping for nosocomial pathogen methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) / J. Miao, L. Chen, J. Wang, W. Wang, D. Chen, L. Li, B. Li, Y. Deng, Z. Xu // Microbial Pathogenesis. - 2017. - № 107. - P. 17-28.

367. Milheirico, C. Update to the multiplex PCR strategy for assignment of mec element types in *Staphylococcus aureus* / C. Milheirico, D. C. Oliveira, H. de Lencastre // Antimicrobial Agents and Chemotherapy. - 2007. - Vol. 51, № 12. - P. 4537-4537.

368. Miller, M.B. Prevalence and risk factor analysis for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* nasal colonization in children attending child care centers / M. B. Miller, D. J. Weber, J. S. Goodrich, E. B. Popowitch, M. D. Poe, V. Nyugen, T. R. Shope, D. T. Foster, J. R. Miller, J. Kotch // Journal of Clinical Microbiology. - 2011. - Vol. 49, № 3. - P. 1041-1047.

369. Miragaia, M. Genetic diversity of arginine catabolic mobile element in *Staphylococcus epidermidis* / M. Miragaia, H. de Lencastre, F. Perdreau-Remington, H. F. Chambers, J. Higashi, P. M. Sullam, J. Lin, K. I. Wong, K. A.

King, M. Otto, G. F. Sensabaugh, B. A. Diep // Plos One. - 2009. - Vol. 4, № 11. - P. 1-9.

370. Moisan, H. Binding of ceftaroline to penicillin-binding proteins of *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus pneumoniae* / H. Moisan, M. Pruneau, F. Maloui // Journal of Antimicrobial Chemotherapy. - 2010 -Vol. 65, № 4. - P. 713-716.

371. Monaco, M. Worldwide epidemiology and antibiotic resistance of *Staphylococcus aureus* / M. Monaco, F. P. de Araujo, M. Cruciani, E. M. Coccia, P. A. // Current Topics in Microbiology and Immunology. - 2017. - Vol. 409, - P. 21-56.

372. Monecke, S. Molecular epidemiology of *Staphylococcus aureus* in asymptomatic carriers / S. Monecke, C. Ludicke, P. Slickers, R. Ehricht // European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases. - 2009. - Vol. 28, № 9. - P. 1159-1165.

373. Monecke, S. A field guide to pandemic, epidemic and sporadic clones of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* / S. Monecke, G. Coombs, A. C. Shore, D. C. Coleman, P. Akpaka, M. Borg, H. Chow, M. Ip, L. Jatzwauk, D. Jonas, K. Kadlec, A. Kearns, F. Laurent, F. G. O'Brien, J. Pearson, A. Ruppelt, S. Schwarz, E. Scicluna, P. Slickers, H. L. Tan, S. Weber, R. Ehricht // PLoS One. - 2011. - № 6. - P. 1-21.

374. Monecke, S. Molecular epidemiology and characterisation of MRSA isolates from Trinidad and Tobago / S. Monecke, H. Nitschke, P. Slickers, R. Ehricht, W. Swanston, M. Manjunath, R. Roberts, P. E. Akpaka // European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases. - 2012. - № 31. - P. 1497-1500.

375. Monecke, S. Population structure of *Staphylococcus aureus* from Trinidad & Tobago / S. Monecke, B. Stieber, R. Roberts, P. E. Akpaka, P. Slickers, R. Ehricht // PLoS One. - 2014. - № 9. - P. 1-11.

376. Monecke, S. Molecular typing of MRSA and of clinical *Staphylococcus aureus* isolates from Iași, Romania / S. Monecke, E. Müller, O. S. Dorneanu, T. Vremeră, R. Ehricht // PLoS One. - 2014. - Vol. 9, № 5. - P. 1-9.

377. Monecke, S. Characterization of PVL-positive MRSA from Norway / S. Monecke, H. V. Aamot, B. Stieber, A. Ruppelt, R. Ehricht // APMIS. - 2014 - Vol. 122, № 7. - P. 580-584.

378. Monecke, S. Diversity of *Staphylococcus aureus* Isolates in European Wildlife / S. Monecke, D. Gavier-Widen, H. Hotzel, M. Peters, S. Guenther, A. Lazaris, I. Loncaric, E. Muller, A. Reissig, A. Ruppelt-Lorz, A. C. Shore, B. Walter, D. C. Coleman, R. Ehricht // PloS One. - 2016. - Vol. 11, № 12. - P. 1-27.

379. Monecke, S. Molecular typing of ST239-MRSA-III from diverse geographic locations and the evolution of the SCCmec III element during its intercontinental spread / S. Monecke, P. Slickers, D. Gawlik, E. Müller, A. Reissig, A. Ruppelt-Lorz, P. E. Akpaka, D. Bandt, M. Bes, S. S. Boswihi, D. C. Coleman, G. W. Coombs, O. S. Dorneanu, V. V. Gostev, M. Ip, B. Jamil, L. Jatzwauk, M. Narvaez, R. Roberts, A. Senok, A. Shore, S. Sidorenko, L. Skakni, A. M. Somily, M. A. Syed, A. Thürmer, E. Udo, T. Vremeră, J. Zurita, R. Ehricht // Frontiers in Microbiology. - 2018. - - P. 1-61.

380. Moran, G.J. Methicillin-resistant *S. aureus* infections among patients in the emergency department / G. J. Moran, A. Krishnadasan, R. J. Gorwitz, G. E. Fosheim, L. K. McDougal, R. B. Carey, D. A. Talan // New England Journal of Medicine. - 2006. - Vol. 355, № 7. - P. 666-674.

381. Morata, L. New antibiotics against gram-positives: present and future indications / L. Morata, J. Mensa, A. Soriano // Current Opinion in Pharmacology. - 2015. - Vol. 24, - P. 45-51.

382. Morbach, S. Diabetic foot syndrome / S. Morbach, E. Müller, H. Reike, A. Risse, G. Rümenapf, M. Spraul // Experimental and Clinical Endocrinology & Diabetes. - 2014. - Vol. 122, № 7. - P. 416-424.

383. Morikawa, K. A new staphylococcal sigma factor in the conserved gene cassette: functional significance and implication for the evolutionary processes / K.

Morikawa, Y. Inose, H. Okamura, A. Maruyama, H. Hayashi, K. Takeyasu, T. Ohta // *Genes to Cells*. - 2003. - Vol. 8, № 8. - P. 699-712.

384. Munier, A.L. Comparative dynamics of the emergence of fluoroquinolone resistance in staphylococci from the nasal microbiota of patients treated with fluoroquinolones according to their environment / A. L. Munier, V. de Lastours, F. Barbier, F. Chau, B. Fantin, R. Ruimy // *International Journal of Antimicrobial Agents*. - 2015. - Vol. 46, № 6. - P. 653-659.

385. Murray, R. *Staphylococcus aureus* infective endocarditis: diagnosis and management guidelines / R. Murray // *Internal Medicine Journal*. - 2005. - Vol. 35, - P. 25-44.

386. Nagel, M. Influence of ciprofloxacin and vancomycin on mutation rate and transposition of IS256 in *Staphylococcus aureus* / M. Nagel, T. Reuter, A. Jansen, C. Szekat, G. Bierbaum // *International Journal of Medical Microbiology*. - 2011. - Vol. 301, № 3. - P. 229-236.

387. Naimi, T.S. Comparison of community- and health care-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection / T. S. Naimi, K. H. LeDell, K. Como-Sabetti, S. M. Borchardt, D. J. Boxrud, J. Etienne, e. al // *JAMA*. - 2003. - № 290. - P. 2976-2984.

388. Nakamura, I. Clinical aspects of infection with methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* USA300 strain, generally regarded as community-acquired, in Japan / I. Nakamura, T. Yamaguchi, Y. Miura, H. Shimizu, S. Fukushima, Y. Mizuno, T. Matsumoto // *Japanese Journal of Infectious Diseases*. - 2013. - Vol. 66, № 5. - P. 416-420.

389. Neetu, T.J. Genotyping of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* from tertiary care hospitals in Coimbatore, South India / T. J. Neetu, S. Murugan // *Journal of Global Infectious Diseases*. - 2016. - № 8. - P. 68-74.

390. Nelson, A. CODIFI (Concordance in Diabetic Foot Ulcer Infection): a crosssectional study of wound swab versus tissue sampling in infected diabetic foot ulcers in England / A. Nelson, A. Wright-Hughes, M. R. Backhouse, B. A. Lipsky,

J. Nixon, M. S. Bhogal, C. Reynolds, S. Brown // *British Medical Journal*. - 2018. - Vol. 8, № 1. - P. 1-12.

391. Nimmo, G.R. Changing epidemiology of methicillin-resistant *S. aureus* in Queensland, Australia, 2000-2006: use of passive surveillance of susceptibility phenotypes / G. R. Nimmo, J. Fong, D. L. Paterson, M. L. McLaws // *Journal of Hospital Infection*. - 2008. - Vol. 70, № 4. - P. 305-313.

392. Novick, R.P. The phage-related chromosomal islands of Gram-positive bacteria / R. P. Novick, G. E. Christie, J. R. Penades // *Nature Reviews Microbiology*. - 2010. - Vol. 8, № 8. - P. 541-551.

393. Novick, R.P. Staphylococcal pathogenicity islands - movers and shakers in the genomic firmament / R. P. Novick, G. Ram // *Current Opinion in Microbiology*. - 2017. - Vol. 38, - P. 197-204.

394. Nubel, U. Frequent emergence and limited geographic dispersal of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* / U. Nubel, P. Roumagnac, M. Feldkamp, J. H. Song, K. S. Ko, Y. C. Huang, G. Coombs, M. Ip, H. Westh, R. Skov, M. J. Struelens, R. V. Goering, B. Strommenger, A. Weller, W. Witte, M. Achtman // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. - 2008. - Vol. 105, № 37. - P. 14130-14135.

395. O'Neill, A.J. Characterization of the epidemic European fusidic acid-resistant impetigo clone of *Staphylococcus aureus* / A. J. O'Neill, A. R. Larsen, R. Skov, A. S. Henriksen, I. Chopra // *Journal of Clinical Microbiology*. - 2007. - Vol. 45, № 5. - P. 1505-1510.

396. O'Hara, F.P. spa Typing and multilocus sequence typing show comparable performance in a macroepidemiologic study of *Staphylococcus aureus* in the United States / F. P. O'Hara, J. A. Suaya, G. T. Ray, R. Baxter, M. L. Brown, R. M. Mera, N. M. Close, E. Thomas, H. Amrine-Madsen // *Microbial Drug Resistance*. - 2016. - № 22. - P. 8-96.

397. Oliveira, D.C. The evolution of pandemic clones of methicillin resistant *Staphylococcus aureus*: identification of two ancestral genetic backgrounds and the

associated mec elements / D. C. Oliveira, A. Tomasz, H. de Lencastre // *Microbial Drug Resistance*. - 2001. - Vol. 7, - P. 349–361.

398. Oliveira, D.C. Multiplex PCR strategy for rapid identification of structural types and variants of the mec element in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* / D. C. Oliveira, H. de Lencastre // *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. - 2002. - Vol. 46, № 7. - P. 2155-2161.

399. Opota, O. Blood culture-based diagnosis of bacteraemia: state of the art / O. Opota, A. Croxatto, G. Prod'hom, G. Greub // *Clinical Microbiology and Infection*. - 2015. - Vol. 21, - P. 313-322.

400. Orth, D. Characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* from Ulaanbaatar, Mongolia / D. Orth, K. Grif, L. Erdenechimeg, C. Battogtokh, T. Hosbayar, B. Strommenger, C. Cuny, G. Walder, C. Lass-Florl, M. P. Dierich, W. Witte // *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*. - 2006. - Vol. 25, № 2. - P. 104-107.

401. Ortwine, J.K. Morbidity, mortality, and management of methicillin-resistant *S. aureus* bacteremia in the US: update on antibacterial choices and understanding / J. K. Ortwine, Bhavan, K. // *Hospital practice (1995)*. - 2018. - Vol. 46, № 2. - P. 64-72.

402. Otto, M. Community-associated MRSA: What makes them special? / M. Otto // *International Journal of Medical Microbiology*. - 2013. - Vol. 303, № 6-7. - P. 324-330.

403. Painter, K.L. What role does the quorum-sensing accessory gene regulator system play during *Staphylococcus aureus* bacteremia? / K. L. Painter, A. Krishna, S. Wigneshweraraj, A. M. Edwards // *Trends in Microbiology*. - 2014. - Vol. 22, № 12. - P. 676-685.

404. Pantosti, A. Mechanisms of antibiotic resistance in *Staphylococcus aureus* / A. Pantosti, A. Sanchini, M. Monaco // *Future Microbiology*. - 2007. - Vol. 2, № 3. - P. 323-334.

405. Pantosti, A. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* associated with animals and Its relevance to human health / A. Pantosti // *Frontiers in Microbiology*. - 2012. - Vol. 3, № 127. - P. 1-12.

406. Pantrangi, M. Staphylococcal superantigen-like genes, *ssl5* and *ssl8*, are positively regulated by *Sae* and negatively by *Agr* in the Newman strain / M. Pantrangi, V. K. Singh, C. Wolz, S. K. Shukla // *Fems Microbiology Letters*. - 2010. - Vol. 308, № 2. - P. 175-184.

407. Pantrangi, M. Regulation of Staphylococcal superantigen-like gene, *ssl8*, expression in *Staphylococcus aureus* strain, RN6390 / M. Pantrangi, V. K. Singh, S. K. Shukla // *Clinical Medicine & Research*. - 2015. - 13, № 1. - P. 7-11.

408. Paterson, G.K. The emergence of *mecC* methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* / G. K. Paterson, E. M. Harrison, M. A. Holmes // *Trends in Microbiology*. - 2014. - Vol. 22, № 1. - P. 42-47.

409. Patti, J.M. The *Staphylococcus aureus* collagen adhesin is a virulence determinant in experimental septic arthritis / J. M. Patti, T. Bremell, D. Krajewskapietrasik, A. Abdelnour, A. Tarkowski, C. Ryden, M. Hook // *Infection and Immunity*. - 1994. - Vol. 62, № 1. - P. 152-161.

410. Pearson, A. Voluntary and mandatory surveillance for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) and methicillin-susceptible *S. aureus* (MSSA) bacteraemia in England / A. Pearson, A. Chronias, M. Murray // *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. - 2009. - Vol. 64, № 4. - P. 11-17.

411. Peck, K.R. Comparison of genotypes and enterotoxin genes between *Staphylococcus aureus* isolates from blood and nasal colonizers in a Korean hospital / K. R. Peck, J. Y. Baek, J. H. Song, K. S. Ko // *Journal of Korean Medical Science*. - 2009. - № 24. - P. 585-591.

412. Peng, J. Epidemiological, clinical and microbiological characteristics of patients with post-traumatic osteomyelitis of limb fractures in Southwest China: A hospital-based study / J. Peng, Y. Ren, W. He, Z. Li, J. Yang, Y. Liu, Z. Zheng, S. L. Kates, E. M. Schwarz, C. Xie, Y. Xu // *Journal of Bone and Joint Infection*. - 2017. - Vol. 2, № 3. - P. 149-153.

413. Penn, C. Wound infections caused by inducible methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains / C. Penn, C. Moddrell, I. A. Tickler, M. A. Henthorne, M. Kehrl, R. V. Goering, F. C. Tenover // *Journal of Global Antimicrobial Resistance*. - 2013. - Vol. 1, - P. 79-83.

414. Pinchuk, I.V. Staphylococcal enterotoxins / I. V. Pinchuk, E. J. Beswick, V. E. Reyes // *Toxins*. - 2010. - Vol. 2, № 8. - P. 2177-2197.

415. Planet, P.J. Parallel epidemics of community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* USA300 infection in North and South America / P. J. Planet, L. Diaz, S. O. Kolokotronis, A. Narechania, J. Reyes, G. L. Xing, S. Rincon, H. Smith, D. Panesso, C. Ryan, D. P. Smith, M. Guzman, J. Zurita, R. Sebra, G. Deikus, R. L. Nolan, F. C. Tenover, G. M. Weinstock, D. A. Robinson, C. A. Arias // *Journal of Infectious Diseases*. - 2015. - Vol. 212, № 12. - P. 1874-1882.

416. Planet, P.J. Architecture of a species: Phylogenomics of *Staphylococcus aureus* / P. J. Planet, A. Narechania, L. Chen, B. Mathema, S. Boundy, G. Archer, B. Kreiswirth // *Trends in Microbiology*. - 2017. - Vol. 25, № 2. - P. 153-166.

417. Planet, P.J. Life after USA300: The rise and fall of a superbug / P. J. Planet // *Journal of Infectious Diseases*. - 2017. - Vol. 215, - P. 71-77.

418. Pollet, R.M. Processing of nonconjugative resistance plasmids by conjugation nicking enzyme of staphylococci / R. M. Pollet, J. D. Ingle, J. P. Hymes, T. C. Eakes, K. Y. Eto, S. M. Kwong, J. P. Ramsay, N. Firth, M. R. Redinbo // *Journal of Bacteriology*. - 2016. - Vol. 198, № 6. - P. 888-897.

419. Popovich, K.J. Are community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) strains replacing traditional nosocomial MRSA strains? / K. J. Popovich, R. A. Weinstein, B. Hota // *Clinical Infectious Diseases*. - 2008. - Vol. 46, № 6. - P. 787-794.

420. Popovich, K.J. Genomic and epidemiological evidence for community origins of hospital-onset methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* bloodstream infections / K. J. Popovich, E. S. Snitkin, B. Hota, S. J. Green, A. Pirani, A.

Aroutcheva, R. A. Weinstein // *Journal of Infectious Diseases*. - 2017. - Vol. 215, № 11. - P. 1640-1647.

421. Post, V. Phenotypic and genotypic characterisation of *Staphylococcus aureus* causing musculoskeletal infections / V. Post, P. Wahl, I. Uckay, P. Ochsner, W. Zimmerli, S. Corvec, C. Loiez, R. G. Richards, T. F. Moriarty // *International Journal of Medical Microbiology*. - 2014. - Vol. 304, № 5-6. - P. 565-576.

422. Pragman, A.A. Characterization of virulence factor regulation by SrrAB, a two-component system in *Staphylococcus aureus* / A. A. Pragman, J. M. Yarwood, T. J. Tripp, P. M. Schlievert // *Journal of Bacteriology*. - 2004. - № 186. - P. 2430–2438.

423. Prevost, G. DNA fingerprinting by pulsed-field gel-electrophoresis is more effective than ribotyping in distinguishing among methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates / G. Prevost, B. Jaulhac, Y. Piemont // *Journal of Clinical Microbiology*. - 1992. - Vol. 30, № 4. - P. 967-973.

424. Prina, E. Community-acquired pneumonia / E. Prina, O. T. Ranzani, A. Torres // *The Lancet* - 2015. - Vol. 386, № 9998. - P. 1097-1108.

425. Qin, L. PSM-mec-A virulence determinant that connects transcriptional regulation, virulence, and antibiotic resistance in staphylococci / L. Qin, J. W. McCausland, G. Y. C. Cheung, M. Otto // *Frontiers in Microbiology*. - 2016. - Vol. 7, - P. 1-8.

426. Quiles-Puchalt, N. Staphylococcal pathogenicity island DNA packaging system involving cos-site packaging and phage-encoded HNH endonucleases / N. Quiles-Puchalt, N. Carpena, J. C. Alonso, R. P. Novick, A. Marina, J. R. Penades // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. - 2014. - Vol. 111, № 16. - P. 6016-6021.

427. Qureshi, N.K. The role of the staphylococcal vraTSR regulatory system on vancomycin resistance and vanA operon expression in vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* / N. K. Qureshi, S. H. Yin, S. Boyle-Vavra // *PloS One*. - 2014. - Vol. 9, № 1. - P. 1-7.

428. Ram, G. Staphylococcal pathogenicity island interference with helper phage reproduction is a paradigm of molecular parasitism / G. Ram, J. Chen, K. Kumar, H. F. Ross, C. Ubeda, P. K. Damle, K. D. Lane, J. R. Penades, G. E. Christie, R. P. Novick // Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. - 2012. - Vol. 109, № 40. - P. 16300-16305.

429. Reveles, K.R. Epidemiology of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* diabetic foot infections in a large academic hospital: implications for antimicrobial stewardship / K. R. Reveles, B. M. Duhon, R. J. Moore, E. O. Hand, C. K. Howell // PloS One. - 2016. - Vol. 11, № 8. - P. 1-8.

430. Reyes, J. Dissemination of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* USA300 sequence type 8 lineage in Latin America / J. Reyes, S. Rincon, L. Diaz, D. Panesso, G. A. Contreras, J. Zurita, C. Carrillo, A. Rizzi, M. Guzman, J. Adachi, S. Chowdhury, B. E. Murray, C. A. Arias // Clinical Infectious Diseases. - 2009. - Vol. 49, № 12. - P. 1861-1867.

431. Rhoads, A. PacBio sequencing and its applications / A. Rhoads, K. F. Au // Genomics Proteomics Bioinformatics. - 2015. - Vol. 13, - P. 278-289.

432. Richardson, J.F. Characterization of a strain of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (EMRSA-15) by conventional and molecular methods / J. F. Richardson, S. Reith // Journal of Hospital Infection. - 1993. - Vol. 25, № 1. - P. 45-52.

433. Riley, M. Evolution of the bacterial genome / M. Riley, A. Anilionis // Annual Reviews in Microbiology. - 1978. - № 32. - P. 519–560.

434. Roberts, J.C. Community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* epidemic clone USA100; more than a nosocomial pathogen / J. C. Roberts // Springerplus. - 2013. - Vol. 2, - P. 1-3.

435. Rolo, J. High genetic diversity among community-associated *Staphylococcus aureus* in Europe: results from a multicenter study / J. Rolo, M. Miragaia, A. Turlej-Rogacka, J. Empel, O. Bouchami, N. A. Faria, A. Tavares, W. Hryniewicz, A. C. Fluit, H. de Lencastre // PloS One. - 2012. - Vol. 7, № 4. - P. 1-10.

436. Rolston, K.V. Current microbiology of surgical site infections in patients with cancer: a retrospective review / K. V. Rolston, L. Neshor, J. T. Tarrand // *Infectious Diseases and Therapy*. - 2014. - № 3. - P. 245–256.

437. Rossney, A.S. The emergence and importation of diverse genotypes of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) harboring the Panton-Valentine leukocidin gene (pvl) reveal pvl is a poor marker for MRSA strains community-acquired in Ireland / A. S. Rossney, A. C. Shore, P. M. Morgan, M. M. Fitzgibbon, B. O'Connell, D. C. Coleman // *Journal of Clinical Microbiology*. - 2007. - Vol. 45, № 8. - P. 2554-2563.

438. Sa-Leao, R. Detection of an archaic clone of *Staphylococcus aureus* with low-level resistance to methicillin in a pediatric hospital in Portugal and in international samples: Relics of a formerly widely disseminated strain? / R. Sa-Leao, I. S. Sanches, D. Dias, I. Peres, R. M. Barros, H. de Lencastre // *Journal of Clinical Microbiology*. - 1999. - Vol. 37, № 6. - P. 1913-1920.

439. Sanger, F. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors / F. Sanger, S. Nicklen, R. Coulson // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. - 1977. - № 74. - P. 5463-5467.

440. Sasson, G. *Staphylococcus aureus* bacteremia in immunosuppressed patients: a multicenter, retrospective cohort study / G. Sasson, A. D. Bai, A. Showler, L. Burry, M. Steinberg, D. R. Ricciuto, T. Fernandes, A. Chiu, S. Raybardhan, M. Science, E. Fernando, A. M. Morris, C. M. Bell // *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*. - 2017. - Vol. 36, № 7. - P. 1231-1241.

441. Sawanobori, E. Emergence of Panton-Valentine leukocidin-positive ST59 methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* with high cytolytic peptide expression in association with community-acquired pediatric osteomyelitis complicated by pulmonary embolism / E. Sawanobori, W. C. Hung, T. Takano, K. Hachuda, T. Horiuchi, W. Higuchi, W. W. Hung, Y. Iwao, A. Nishiyama, I. Reva, G. Reva, L. J. Teng, T. Yamamoto // *Journal of Microbiology Immunology and Infection*. - 2015. - Vol. 48, № 5. - P. 565-573.

442. Schaefer, S. Emergence of gentamicin- and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains in New York City hospitals / S. Schaefer, D. Jones, W. Perry, L. Ruvinskaya, T. Baradet, E. Mayr, M. E. Wilson // Journal of Clinical Microbiology. - 1981. - № 13. - P. 754-759.

443. Schlievert, P.M. Secreted virulence factor comparison between methicillin-resistant and methicillin-sensitive *Staphylococcus aureus*, and its relevance to atopic dermatitis / P. M. Schlievert, K. L. Strandberg, Y. C. Lin, M. L. Peterson, D. Y. M. Leung // Journal of Allergy and Clinical Immunology. - 2010. - Vol. 125, № 1. - P. 39-49.

444. Schmitt, S.K. Osteomyelitis / S. K. Schmitt // Infectious Disease Clinics of North America. - 2017. - № 31. - P. 325-338.

445. Scicluna, E. Characterisation of MRSA from Malta and the description of a Maltese epidemic MRSA strain / E. Scicluna, A. Shore, A. Thuermer, R. Ehricht, P. Slickers, M. C. Borg, D.C., M. S. // European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases. - 2010. - № 29. - P. 163-170.

446. See, I. Socioeconomic factors explain racial disparities in invasive community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* disease rates / I. See, P. Wesson, N. Gualandi, G. Dumyati, L. H. Harrison, L. Leshner, J. Nadle, S. Petit, C. Reisenauer, W. Schaffner, A. Tunali, Y. Mu, J. Ahern // Clinical Infectious Diseases. - 2017. - Vol. 64, № 5. - P. 597-604.

447. Seybold, U. Prevalence and risk factors of nasal colonization with *Staphylococcus aureus* - Association with HIV infection in older patients / U. Seybold, B. Supthut-Schroder, R. Draenert, M. Hogardt, J. Bogner // Scandinavian Journal of Infectious Diseases. - 2009. - Vol. 41, № 1. - P. 63-66.

448. Sheng, W.H. Epidemiology and susceptibilities of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Taiwan: emphasis on chlorhexidine susceptibility / W. H. Sheng, J. T. Wang, T. L. Lauderdale, C. M. Weng, D. L. Chen, S. C. Chang // Diagnostic Microbiology and Infectious Disease. - 2009. - Vol. 63, № 3. - P. 309-313.

449. Shi, D. Bullous impetigo in children infected with methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* alone or in combination with methicillin-susceptible *S. aureus*: analysis of genetic characteristics, including assessment of exfoliative toxin gene carriage / D. Shi, W. Higuchi, T. Takano, K. Saito, K. Ozaki, M. Takano, Y. Nitahara, T. Yamamoto // *Journal of Clinical Microbiology*. - 2011. - № 49. - P. 1972–1974.

450. Shore, A. Seven novel variants of the staphylococcal chromosomal cassette *mec* in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates from Ireland / A. Shore, A. S. Rossney, C. T. Keane, M. C. Enright, D. C. Coleman // *Antimicrobial Agents Chemotherapy*. - 2005. - № 49. - P. 2070-2083.

451. Shore, A.C. Detection of staphylococcal cassette chromosome *mec* type XI carrying highly divergent *mecA*, *mecI*, *mecR1*, *blaZ*, and *ccr* genes in human clinical isolates of clonal complex 130 methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* / A. C. Shore, E. C. Deasy, P. Slickers, G. Brennan, B. O'Connell, S. Monecke, R. Ehricht, D. C. Coleman // *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. - 2011. - Vol. 55, № 8. - P. 3765-3773.

452. Shukla, S.K. Optical mapping reveals a large genetic inversion between two methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains / S. K. Shukla, J. Kislw, A. Briska, J. Henkhaus, C. Dykes // *Journal of Bacteriology*. - 2009. - № 91. - P. 5717–5723.

453. Shuping, L.L. Hospital-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: A cross-sectional analysis of risk factors in South African tertiary public hospitals / L. L. Shuping, L. Kuonza, A. Musekiwa, S. Iyaloo, O. Perovic // *PloS One*. - 2017. - Vol. 12, № 11. - P 1-14.

454. Sievert, D.M. Vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* in the United States, 2002-2006 / D. M. Sievert, J. T. Rudrik, J. B. Patel, L. C. McDonald, M. J. Wilkins, J. C. Hageman // *Clinical Infectious Diseases*. - 2008. - Vol. 46, № 5. - P. 668-674.

455. Sievert, D.M. Antimicrobial-resistant pathogens associated with healthcare-associated infections: summary of data reported to the national

healthcare safety network at the centers for disease control and prevention, 2009-2010 / D. M. Sievert, P. Ricks, J. R. Edwards, A. Schneider, J. Patel, A. Srinivasan, A. Kallen, B. Limbago, S. Fridkin // *Infection Control and Hospital Epidemiology*. - 2013. - Vol. 34, № 1. - P. 1-14.

456. Simpson, A.E. A single gene on the staphylococcal multiresistance plasmid pSK1 encodes a novel partitioning system / A. E. Simpson, R. A. Skurray, N. Firth // *Journal of Bacteriology*. - 2003. - № 185. - P. 2143–2152.

457. Skinner, S. Failure of cloxacillin in treatment of a patient with borderline oxacillin-resistant *Staphylococcus aureus* endocarditis / S. Skinner, M. Murray, T. Walus, J. A. Karlowsky // *Journal of Clinical Microbiology*. - 2009. - Vol. 47, - P. 859-861.

458. Smyth, D.S. Integrative and sequence characteristics of a novel genetic element, ICE6013, in *Staphylococcus aureus* / D. S. Smyth, D. A. Robinson // *Journal of Bacteriology*. - 2009. - № 191. - P. 5964–5975.

459. Smyth, D.S. Population structure of a hybrid clonal group of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, ST239-MRSA-III / D. S. Smyth, L. K. McDougal, F. W. Gran, A. Manoharan, M. C. Enright, J. H. Song, H. de Lencastre, D. A. Robinson // *PloS One*. - 2010. - Vol. 5, 1. - P. 1-10.

460. Snustad, D.P. Principles of genetics, binder ready version. 7th ed / D. P. Snustad, M. J. Simmons - New Jersey: Wiley, 2015. -

461. Soge, O.O. A novel transposon, Tn6009, composed of a Tn916 element linked with a *Staphylococcus aureus* mer operon / O. O. Soge, N. K. Beck, T. M. White, D. B. No, M. C. Roberts // *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. - 2008. - Vol. 62, № 4. - P. 674-680.

462. Somerville, G.A. At the crossroads of bacterial metabolism and virulence factor synthesis in staphylococci / G. A. Somerville, R. A. Proctor // *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. - 2009. - Vol. 73, № 2. - P. 233-248.

463. Sorensen, A.I.V. A mechanistic model for spread of livestock-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (LA-MRSA) within a pig

herd / A. I. V. Sorensen, N. Toft, A. Boklund, C. Espinosa-Gongora, K. Graesboll, J. Larsen, T. Halasa // PloS One. - 2017. - Vol. 12, № 11. - P. 1-18.

464. Stach, C.S. Staphylococcal superantigens interact with multiple host receptors to cause serious diseases / C. S. Stach, A. Herrera, P. M. Schlievert // Immunologic Research Journal. - 2014. - № 59. - P. 177-181.

465. Stefani, S. Meticillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA): global epidemiology and harmonisation of typing methods / S. Stefani, D. R. Chung, J. A. Lindsay, A. W. Friedrich, A. M. Kearns, H. Westh, F. M. MacKenzie // International Journal of Antimicrobial Agents. - 2012. - Vol. 39, № 4. - P. 273-282.

466. Stegger, M. Origin and evolution of European community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* / M. Stegger, T. Wirth, P. S. Andersen, R. L. Skov, A. De Grassi, P. M. Simoes, A. Tristan, A. Petersen, M. Aziz, K. Kiil, I. Cirkovic, E. E. Udo, R. del Campo, J. Vuopio-Varkila, N. Ahmad, S. Tokajian, G. Peters, F. Schaumburg, B. Olsson-Liljequist, M. Givskov, E. E. Driebe, H. E. Vigh, A. Shittu, N. Ramdani-Bougessa, J. P. Rasigade, L. B. Price, F. Vandenesch, A. R. Larsen, F. Laurent // MBio. - 2014. - Vol. 5, № 5. - P. 1-12.

467. Stratchounski, L.S. Antimicrobial resistance of nosocomial strains of *Staphylococcus aureus* in Russia: results of a prospective study / L. S. Stratchounski, A. V. Dekhnich, V. A. Kretchikov, I. A. Edelstain, A. D. Narezkina, G. E. Afinogenov, L. I. Akhmetova, L. G. Boronina, E. N. Gugutcidze, L. V. Gudkova, D. E. Zdzitovetcki, V. N. Ilyina, O. I. Kretchikova, N. E. Marusina, I. G. Multih, S. I. Pylaeva, I. V. Smirnov, T. N. Suborova, V. K. Taraban, N. M. Furletova, S. G. Hasanova, E. V. Schetinin // Journal of Chemotherapy. - 2005. - Vol. 17, № 1. - P. 54-60.

468. Strauss, L. Origin, evolution, and global transmission of community-acquired *Staphylococcus aureus* ST8 / L. Strauss, M. Stegger, P. E. Akpaka, A. Alabi, S. Breurec, G. Coombs, B. Egyir, A. R. Larsen, F. Laurent, S. Monecke, G. Peters, R. Skov, B. Strommenger, F. Vandenesch, F. Schaumburg, A. Mellmann //

Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. - 2017. - Vol. 114, № 49. - P. 10596-10604.

469. Strommenger, B. Obvious lack of association between dynamics of epidemic methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Central Europe and agr specificity groups / B. Strommenger, C. Cuny, G. Werner, W. Witte // European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases. - 2004. - Vol. 23, № 1. - P. 15-19.

470. Struelens, M.J. Concordant clonal delineation of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by macrorestriction analysis and polymerase chain-reaction genome fingerprinting / M. J. Struelens, R. Bax, A. Deplano, W. G. V. Quint, A. Vanbelkum // Journal of Clinical Microbiology. - 1993. - Vol. 31, № 8. - P. 1964-1970.

471. Stryjewski, M.E. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: An evolving pathogen / M. E. Stryjewski, G. R. Corey // Clinical Infectious Diseases. - 2014. - Vol. 58, - P. 10-19.

472. Sutcliffe, J. Detection of erythromycin-resistant determinants by PCR / J. Sutcliffe, T. Grebe, A. TaitKamradt, L. Wondrack // Antimicrobial Agents and Chemotherapy. - 1996. - Vol. 40, № 11. - P. 2562-2566.

473. Szczepanik, A. Spread of a single multiresistant methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clone carrying a variant of staphylococcal cassette chromosome mec type III isolated in a university hospital / A. Szczepanik, M. Koziol-Montewka, Z. Al-Doori, D. Morrison, D. Kaczor // European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases. - 2007. - Vol. 26, № 1. - P. 29-35.

474. Takano, T. Novel characteristics of community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains belonging to multilocus sequence type 59 in Taiwan / T. Takano, W. Higuchi, H. Zaraket, T. Otsuka, T. Baranovich, S. Enany, K. Saito, H. Isobe, S. Dohmae, K. Ozaki, M. Takano, Y. Iwao, M. Shibuya, T. Okubo, S. Yabe, D. Shi, I. Reva, L. J. Teng, T. Yamamoto // Antimicrobial Agents and Chemotherapy. - 2008. - № 52. - P. 837-845.

475. Takano, T. Superior in vitro activity of carbapenems over anti-methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) and some related antimicrobial agents for community-acquired MRSA but not for hospital-acquired MRSA / T. Takano, W. Higuchi, T. Yamamoto // Journal of Infection and Chemotherapy. - 2009. - № 15. - P. 54-57.

476. Takano, T. Novel characteristics of community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains belonging to multilocus sequence type 59 in Taiwan / T. Takano, W. Higuchi, H. Zaraket, T. Otsuka, T. Baranovich, S. Enany, K. Saito, H. Isobe, S. Dohmae, K. Ozaki, M. Takano, Y. Iwao, M. Shibuya, T. Okubo, S. Yabe, D. Shi, I. Reva, L. J. Teng, T. Yamamoto // Antimicrobial Agents and Chemotherapy. - 2012. - Vol. 56, № 12. - P. 6441-6441.

477. 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, № 4. - P. 1589-1595.

478. Takizawa, Y. A Panton-Valentine leucocidin (PVL)-positive community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) strain, another such strain carrying a multiple-drug resistance plasmid, and other more-typical PVL-negative MRSA strains found in Japan / Y. Takizawa, I. Taneike, S. Nakagawa, T. Oishi, Y. Nitahara, N. Iwakura, K. Ozaki, M. Takano, T. Nakayama, T. Yamamoto // Journal of Clinical Microbiology. - 2005. - Vol. 43, № 7. - P. 3356-3363.

479. Talan, D.A. Comparison of *Staphylococcus aureus* from skin and soft-tissue infections in us emergency department patients, 2004 and 2008 / D. A. Talan, A. Krishnadasan, R. J. Gorwitz, G. E. Fosheim, B. Limbago, V. Albrecht, G. J. Moran // Clinical Infectious Diseases. - 2011. - Vol. 53, № 2. - P. 144-149.

480. Tenover, F.C. Comparison of traditional and molecular methods of typing isolates of *Staphylococcus aureus* / F. C. Tenover, R. Arbeit, G. Archer, J.

Biddle, S. Byrne, R. Goering, G. Hancock, G. A. Hebert, B. Hill, R. Hollis, W. R. Jarvis, B. Kreiswirth, W. Eisner, J. Maslow, L. K. McDougal, J. M. Miller, M. Mulligan, M. A. Pfaller // *Journal of Clinical Microbiology*. - 1994. - Vol. 32, № 2. - P. 407-415.

481. Tenover, F.C. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing / F. C. Tenover, R. D. Arbeit, R. V. Goering, P. A. Mickelsen, B. E. Murray, D. H. Persing, B. Swaminathan // *Journal of Clinical Microbiology*. - 1995 -Vol. 33, № 9. - P. 2233-2239.

482. Tenover, F.C. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strain USA300: origin and epidemiology / F. C. Tenover, R. V. Goering // *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. - 2009. - Vol. 64, № 3. - P. 441-446.

483. Thomas, S. Community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections in Aboriginal children attending hospital emergency departments in a regional area of New South Wales, Australia: a seven-year descriptive study / S. Thomas, K. Crooks, F. Islam // *Western Pacific Surveillance and Response*. - 2017. - Vol. 8, № 4. - P. 6-12.

484. Thompson, M.K. Structure and function of the genomically encoded fosfomycin resistance enzyme, FosB, from *Staphylococcus aureus* / M. K. Thompson, M. E. Keithly, M. C. Goodman, N. D. Hammer, P. D. Cook, K. L. Jagessar // *Biochemistry*. - 2014. - № 53. - P. 755-765.

485. Thurlow, L.R. Virulence strategies of the dominant USA300 lineage of community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (CA-MRSA) / L. R. Thurlow, G. S. Joshi, A. R. Richardson // *FEMS Immunology and Medical Microbiology*. - 2012. - № 65. - P. 5–22.

486. Tokajian, S.T. Molecular characterization of *Staphylococcus aureus* in Lebanon / S. T. Tokajian, P. Abou Khalil, D. Jabbour, M. Rizk, M. J. Farah, F. A. Hashwa, G. F. Araj // *Epidemiology and Infection*. - 2010. - Vol. 138, № 5. - P. 707-712.

487. Tong, S.Y.C. *Staphylococcus aureus* infections: epidemiology, pathophysiology, clinical manifestations, and management / S. Y. C. Tong, J. S. Davis, E. Eichenberger, T. L. Holland, V. G. Fowler // *Clinical Microbiology Reviews*. - 2015. - Vol. 28, № 3. - P. 603-661.

488. Tormo-Mas, M.A. Moonlighting bacteriophage proteins derepress staphylococcal pathogenicity islands / M. A. Tormo-Mas, I. Mir, A. Shrestha, S. M. Tallent, S. Campoy, I. Lasa, J. Barbe, R. P. Novick, G. E. Christie, J. R. Penades // *Nature*. - 2010. - Vol. 465, № 7299. - P. 1-10.

489. Tormo, M.A. Bap-dependent biofilm formation by pathogenic species of *Staphylococcus*: evidence of horizontal gene transfer? / M. A. Tormo, E. Knecht, F. Gotz, M. Lasa, J. R. Penades // *Microbiology-Sgm*. - 2005. - Vol. 151, - P. 2465-2475.

490. Tracy, L.A. *Staphylococcus aureus* Infections in US Veterans, Maryland, USA, 1999-2008 / L. A. Tracy, J. P. Furuno, A. D. Harris, M. Singer, P. Langenberg, M. C. Roghmann // *Emerging Infectious Diseases*. - 2011. - Vol. 17, № 3. - P. 441-448.

491. Travers, K.J. A flexible and efficient template format for circular consensus sequencing and SNP detection / K. J. Travers, C. S. Chin, D. R. Rank, J. S. Eid, S. W. Turner // *Nucleic Acids Research*. - 2010. - Vol. 38, № 15. - P. 1-8.

492. Trzcinski, K. Expression of resistance to tetracyclines in strains of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* / K. Trzcinski, B. S. Cooper, W. Hryniewicz, C. G. Dowson // *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. - 2000. - Vol. 45, № 6. - P. 763-770.

493. Ubeda, C. SaPI operon I is required for SaPI packaging and is controlled by LexA / C. Ubeda, E. Maiques, M. A. Tormo, S. Campoy, I. Lasa, J. Barbé, R. P. Novick, J. R. Penadés // *Molecular Microbiology*. - 2007. - Vol. 65, № 1. - P. 41-50.

494. Uddin, M.J. Associations between resistance phenotype and gene expression in response to serial exposure to oxacillin and ciprofloxacin in

Staphylococcus aureus / M. J. Uddin, J. Ahn // Letters in Applied Microbiology. - 2017. - Vol. 65, № 6. - P. 462-468.

495. Uhlemann, A.C. Evolution of community- and healthcare-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* / A. C. Uhlemann, M. Otto, F. D. Lowy, F. R. Deleo // Infection Genetics and Evolution. - 2014. - Vol. 21, - P. 563-574.

496. Van der Aart, L.T. Substrate inhibition of vanA by D-alanine reduces vancomycin resistance in a vanX-dependent manner / L. T. Van der Aart, N. Lemmens, W. J. van Wamel, G. P. van Wezel // Antimicrobial Agents and Chemotherapy. - 2016. - Vol. 60, № 8. - P. 4930-4939.

497. Van der Zwaluw, K. The carbapenem inactivation method (CIM), a simple and low-cost alternative for the carba NP test to assess phenotypic carbapenemase activity in gram-negative rods / K. Van der Zwaluw, A. de Haan, G. N. Pluister, H. J. Bootsma, A. J. de Neeling, L. M. Schouls // PloS One. - 2015. - Vol. 10, № 3. - P. 1-13.

498. Van Rensburg, J.M.J. The dominant methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clone from hospitals in Cape Town has an unusual genotype: ST612 / J. M. J. Van Rensburg, V. E. Madikane, A. Whitelaw, M. Chachage, S. Haffejee, B. Gay Elisha // Clinical Microbiology Infection. - 2011. - № 17. - P. 785-792.

499. Van Wamel, W.J. The innate immune modulators staphylococcal complement inhibitor and chemotaxis inhibitory protein of *Staphylococcus aureus* are located on beta-hemolysin-converting bacteriophages / W. J. Van Wamel, S. H. Rooijackers, M. Ruyken, K. P. van Kessel, J. A. van Strijp // Journal of Bacteriology. - 2006. - № 188. - P. 1310-1313.

500. Vandenesch, F. Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* carrying Pantone-Valentine leukocidin genes: Worldwide emergence / F. Vandenesch, T. Naimi, M. C. Enright, G. Lina, G. R. Nimmo, H. Heffernan, N. Liassine, M. Bes, T. Greenland, M. E. Reverdy, J. Etienne // Emerging Infectious Diseases. - 2003. - Vol. 9, № 8. - P. 978-984.

501. Vaser, R. Fast and accurate de novo genome assembly from long uncorrected reads / R. Vaser, I. Sovic, N. Nagarajan, M. Sikic // *Genome Research*. - 2017. - № 27. - P. 737-746.

502. Vivoni, A.M. Clonal composition of *Staphylococcus aureus* isolates at a Brazilian university hospital: identification of international circulating lineages / A. M. Vivoni, B. A. Diep, A. C. de Gouveia Magalhaes, K. R. Santos, L. W. Riley, G. F. Sensabaugh, B. M. Moreira // *Journal of Clinical Microbiology*. - 2006. - № 44. - P. 1686-1691.

503. Vojtov, N. Global repression of exotoxin synthesis by staphylococcal superantigens / N. Vojtov, H. F. Ross, R. P. Novick // *PNAS*. - 2002. - № 99. - P. 10102-10107.

504. Vorobieva, V. Clinical isolates of *Staphylococcus aureus* from the Arkhangelsk region, Russia: antimicrobial susceptibility, molecular epidemiology, and distribution of Panton-Valentine leucocidin genes / V. Vorobieva, T. Bazhukova, A. M. Hanssen, D. A. Caugant, N. Semenova, B. C. Haldorsen, G. S. Simonsen, A. Sundsfjord // *Journal of pathology, microbiology and immunology*. - 2008. - Vol. 116, № 10. - P. 877-887.

505. Wan, T.W. Complete circular genome sequence of successful ST8/SCCMECIV community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (OC8) in Russia: one-megabase genomic inversion, IS256's spread, and evolution of Russia ST8-IV / T. W. Wan, O. E. Khokhlova, Y. Iwao, 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. - Vol. 11, № 10. - P. 1-23.

506. Wan, T.W. Novel structure of *Enterococcus faecium* originated ermB-positive Tn1546-like element in *Staphylococcus aureus* / T. W. Wan, W. C. Hung, J. C. Tsai, Y. T. Lin, H. Lee, P. R. Hsueh, T. F. Lee, L. J. Teng // *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. - 2016. - Vol. 60, № 10. - P. 6108-6114.

507. Wang, A.H. A potential role of transposon IS431 in the loss of *mecA* gene / A. H. Wang, K. Zhou, Y. Liu, L. Yang, Q. Zhang, J. Guan, N. S. Zhong, C. Zhuo // *Scientific Reports*. - 2017. - Vol. 7, - P. 1-11.

508. Wang, R. Identification of novel cytolytic peptides as key virulence determinants for community-associated MRSA / R. Wang, K. R. Braughton, D. Kretschmer, T. H. Bach, S. Y. Queck, M. Li, A. D. Kennedy, D. W. Dorward, S. J. Klebanoff, A. Peschel, F. R. DeLeo, M. Otto // *Nature Medicine*. - 2007. - № 3. - P. 1510–1151.

509. Wang, T. Detection of *grlA* and *gyrA* mutations in 344 *Staphylococcus aureus* strains / T. Wang, M. Tanaka, K. Sato // *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. - 1998. - № 42. - P. 236–240.

510. Waterer, G.W. Community-acquired pneumonia: A global perspective / G. W. Waterer // *Seminars in respiratory and critical care medicine*. - 2016. - № 37. - P. 799-80.

511. Weiner, L.M. Antimicrobial-resistant pathogens associated with healthcare-associated infections: summary of data reported to the national healthcare safety network at the centers for disease control and prevention, 2011-2014 / L. M. Weiner, A. K. Webb, B. Limbago, M. A. Dudeck, J. Patel, A. J. Kallen, J. R. Edwards, D. M. Sievert // *Infection Control and Hospital Epidemiology*. - 2016. - Vol. 37, № 11. - P. 1288-1301.

512. Wendlandt, S. Complete sequence of the multi-resistance plasmid pV7037 from a porcine methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* / S. Wendlandt, B. B. Li, Z. Y. Ma, S. Schwarz // *Veterinary Microbiology*. - 2013. - Vol. 166, № 3-4. - P. 650-654.

513. Wertheim, H.F.L. The role of nasal carriage in *Staphylococcus aureus* infections / H. F. L. Wertheim, D. C. Melles, M. C. Vos, W. van Leeuwen, A. van Belkum, H. A. Verbrugh, J. L. Nouwen // *Lancet Infectious Diseases*. - 2005. - Vol. 5, № 12. - P. 751-762.

514. Wichelhaus, T.A. Molecular characterization of *rpoB* mutations conferring cross-resistance to rifamycins on methicillin-resistant *Staphylococcus*

aureus / T. A. Wichelhaus, V. Schäfer, V. Brade, B. Böddinghaus // Antimicrobial Agents and Chemotherapy. - 1999. - № 43. - P. 2813–2816.

515. Wielders, C.L.C. Evidence for in-vivo transfer of *mecA* DNA between strains of *Staphylococcus aureus* / C. L. C. Wielders, M. R. Vriens, S. Brisse, L. A. M. de Graaf-Miltenburg, A. Troelstra, A. Fler, F. J. Schmitz, J. Verhoef, A. C. Fluit // Lancet. - 2001. - Vol. 357, № 9269. - P. 1674-1675.

516. Williamson, D.A. *Staphylococcus aureus* 'Down Under': contemporary epidemiology of *S. aureus* in Australia, New Zealand, and the South West Pacific / D. A. Williamson, G. W. Coombs, G. R. Nimmo // Clinical Microbiology and Infection. - 2014. - Vol. 20, № 7. - P. 597-604.

517. Williamson, D.A. Contemporary genomic approaches in the diagnosis and typing of *Staphylococcus aureus* / D. A. Williamson, H. Heffernan, G. Nimmo // Pathology. - 2015. - Vol. 47, № 3. - P. 270-275.

518. Winstanley, T. Expert systems in clinical microbiology / T. Winstanley, P. Courvalin // Clinical Microbiology Reviews. - 2011. - Vol. 24, - P. 515-556.

519. Wisplinghoff, H. Molecular evolution of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in the Metropolitan Area of Cologne, Germany, from 1984 to 1998 / H. Wisplinghoff, B. Ewertz, S. Wisplinghoff, D. Stefanik, G. Plum, F. Perdreau-Remington, H. Seifert // Journal of Clinical Microbiology. - 2006. - Vol. 44, № 2. - P. 676-676.

520. Witte, W. Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: what do we need to know? / W. Witte // Clinical Microbiology and Infection. - 2009. - Vol. 15, - P. 17-25.

521. Woodhead, M. Guidelines for the management of adult lower respiratory tract infections - Full version / M. Woodhead, F. Blasi, S. Ewig, J. Garau, G. Huchon, M. Ieven, A. Ortqvist, T. Schaberg, A. Torres, G. van der Heijden, R. Read, T. J. M. Verheij // Clinical Microbiology and Infection. - 2011. - Vol. 17, - P.1-59.

522. Wu, S.W. Tracking the evolutionary origin of the methicillin resistance gene: Cloning and sequencing of a homologue of *mecA* from a methicillin

susceptible strain of *Staphylococcus sciuri* / S. W. Wu, C. Piscitelli, H. deLencastre, A. Tomasz // Microbial Drug Resistance-Mechanisms Epidemiology and Disease. - 1996. - Vol. 2, № 4. - P. 435-441.

523. Wu, T.D. GMAP and GSNAP for genomic sequence alignment: enhancements to speed, accuracy, and functionality / T. D. Wu, J. Reeder, M. Lawrence, G. Becker, M. J. Brauer // Methods in Molecular Biology. - 2016. - № 1418. - P. 283-334.

524. Wu, T.H. Prevalence and molecular characteristics of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* among nasal carriage strains isolated from emergency department patients and healthcare workers in central Taiwan / T. H. Wu, C. Y. Lee, H. J. Yang, Y. P. Fang, Y. F. Chang, S. L. Tzeng, M. C. Lu // Journal of Microbiology, Immunology and Infection. - 2018 -Vol. 1684, № 18. - P. 30352-30359.

525. Wu, Z. Novel type XII staphylococcal cassette chromosome mec harboring a new cassette chromosome recombinase, CcrC2 / Z. Wu, F. Li, D. Liu, H. Xue, X. Zhao // Antimicrobial Agents and Chemotherapy. - 2015. - Vol. 59, - P. 7597-7601.

526. Wyllie, D. Waves of trouble: MRSA strain dynamics and assessment of the impact of infection control / D. Wyllie, J. Paul, D. Crook // Journal of Antimicrobial Chemotherapy. - 2011. - Vol. 66, № 12. - P. 2685-2688.

527. Xia, G.Q. Phages of *Staphylococcus aureus* and their impact on host evolution / G. Q. Xia, C. Wolz // Infection Genetics and Evolution. - 2014. - Vol. 21, - P. 593-601.

528. Xiao, C.L. MECAT: fast mapping, error correction, and de novo assembly for single-molecule sequencing reads / C. L. Xiao, Y. Chen, S. Q. Xie, K. N. Chen, Y. Wang, Y. Han, F. Luo // Nature Methods. - 2017. - № 14. - P. 1072-1074.

529. Xu, B.L. Predominance of the Hungarian clone (ST 239-III) among hospital-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates recovered throughout mainland China / B. L. Xu, G. Zhang, H. F. Ye, E. J. Feil, G. R. Chen,

X. M. Zhou, X. M. Zhan, S. M. Chen, W. B. Pan // Journal of Hospital Infection. - 2009. - Vol. 71, № 3. - P. 245-255.

530. Xu, S.X. Superantigens subvert the neutrophil response to promote abscess formation and enhance *Staphylococcus aureus* survival *in vivo* / S. X. Xu, K. J. Gilmore, P. A. Szabo, J. J. Zeppa, M. L. Baroja, S. M. Haeryfar // Infection and Immunity. - 2014. - № 82. - P. 3588-3598.

531. Yamamoto, T. Antiseptic and antibiotic-resistance plasmid in *Staphylococcus aureus* that possesses ability to confer chlorhexidine and acrinol resistance / T. Yamamoto, Y. Tamura, T. Yokota // Antimicrobial Agents and Chemotherapy. - 1988. - Vol. 32, № 6. - P. 932-935.

532. Yamamoto, T. Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: community transmission, pathogenesis, and drug resistance / T. Yamamoto, A. Nishiyama, T. Takano, S. Yabe, W. Higuchi, O. Razvina, D. Shi // Journal of Infection and Chemotherapy. - 2010. - Vol. 16, № 4. - P. 225-254.

533. Yamamoto, T. Comparative genomics and drug resistance of a geographic variant of ST239 methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* emerged in Russia / T. Yamamoto, T. Takano, W. Higuchi, Y. Iwao, O. Singur, I. Reva, Y. Otsuka, T. Nakayashiki, H. Mori, G. Reva, V. Kuznetsov, V. Potapov // Plos One. - 2012. - Vol. 7, № 1. - P. 1-13.

534. Yarwood, J.M. Characterization and expression analysis of *Staphylococcus aureus* pathogenicity island 3 - Implications for the evolution of staphylococcal pathogenicity islands / J. M. Yarwood, J. K. McCormick, M. L. Paustian, P. M. Orwin, V. Kapur, P. M. Schlievert // Journal of Biological Chemistry. - 2002. - Vol. 277, № 15. - P. 13138-13147.

535. Yeap, A.D. Molecular epidemiology of *Staphylococcus aureus* skin and soft tissue infections in the Lao people's Democratic Republic / A. D. Yeap, K. Woods, D. A. B. Dance, B. Pichon, S. Rattanavong, V. Davong, Phetsouvanh, R., P. N. Newton, N. Shetty, A. M. Kearns // The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene. - 2017. - № 97. - P. 423-428.

536. Yilmaz, S.K. Infectivity-resistotype-genotype clustering of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains in the central blacksea region of Turkey / S. K. Yilmaz, I. C. Acuner, B. Strommenger, Y. Bek, W. Witte // Bulletin of Microbiology. - 2014. - Vol. 48, № 1. - P. 14-27.

537. Zhan, X.Y. Evolution of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: Evidence of positive selection in a penicillin-binding protein (PBP) 2a coding gene *mecA* / X. Y. Zhan, Q. Y. Zhu // Infection Genetics and Evolution. - 2018. - Vol. 9, - P. 16-22.

538. Zhang, K. Novel multiplex PCR assay for characterization and concomitant subtyping of staphylococcal cassette chromosome *mec* types I to V in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* / K. Zhang, J. A. McClure, S. Elsayed, T. Louie, J. M. Conly // Journal of Clinical Microbiology. - 2005 -Vol. 43, № 10. - P. 5026-5033.

539. Zhang, K. Coexistence of Panton-Valentine leukocidin-positive and-negative community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* USA400 sibling strains in a large Canadian health-care region / K. Zhang, J. A. McClure, S. Elsayed, J. Tan, J. M. Conly // Journal of Infection Diseases. - 2008. - № 197. - P. 195-204.

540. Zheng, B.W. Community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* pneumonia in China / B. W. Zheng, H. Xu, A. Li, J. R. Ji, Y. Wang, Y. H. Xiao, L. J. Li // Lancet Infectious Diseases. - 2017. - Vol. 17, № 1. - P. 26-26.

541. Zhu, W.M. Vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates associated with Inc18-like *vanA* plasmids in Michigan / W. M. Zhu, N. C. Clark, L. K. McDougal, J. Hageman, L. C. McDonald, J. B. Patel // Antimicrobial Agents and Chemotherapy. - 2008. - Vol. 52, № 2. - P. 452-457.

542. Ziebuhr, W. A novel mechanism of phase variation of virulence in *Staphylococcus epidermidis*: evidence for control of the polysaccharide intercellular adhesin synthesis by alternating insertion and excision of the insertion sequence element IS256 / W. Ziebuhr, V. Krimmer, S. Rachid, I. Loßsner, F. Goßtz, J. Hacker // Molecular Microbiology. - 1999. - № 32. - P. 345-356.

543. Zurita, J. Local circulating clones of *Staphylococcus aureus* in Ecuador / J. Zurita, P. Barba, D. Ortega-Paredes, M. Mora, S. Rivadeneira // The Brazilian Journal Infectious Diseases. - 2016. - № 20. - P. 525-533.