На правах рукописи

СКРЯБИН ЮРИЙ ПАВЛОВИЧ

МОЛЕКУЛЯРНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ШТАММОВ *STAPHYLOCOCCUS AUREUS*, ВОЗБУДИТЕЛЕЙ ТОКСИКОИНФЕКЦИЙ, ИЗОЛИРОВАННЫХ В РАЗНЫХ РЕГИОНАХ РОССИИ

03.02.03 – микробиология

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Оболенск – 2021

Работа выполнена в Федеральном бюджетном учреждении науки «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека.

Научный руководитель:

Абаев Игорь Валентинович, кандидат медицинских наук, Федеральное бюджетное учреждение науки «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, лаборатория антимикробных препаратов отдела молекулярной микробиологии, ведущий научный сотрудник.

Официальные оппоненты:

Припутневич Татьяна Валерьевна, доктор медицинских наук (специальность 03.02.03 – микробиология), Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии имени академика В.И. Кулакова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Институт микробиологии, антимикробной терапии и эпидемиологии, директор, г. Москва

Мавзютов Айрат Радикович, доктор медицинских наук (специальность 03.02.03 – микробиология), профессор, заслуженный деятель науки Республики Башкортостан, Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Башкирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, кафедра фундаментальной и прикладной микробиологии, заведующий кафедрой, г. Уфа.

Ведущая организация:

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное учреждение «Детский научно-клинический центр инфекционных болезней Федерального медико-биологического агентства», г. Санкт-Петербург

Защита диссертации состоится «11» июня 2021 г. в 11-00 часов на заседании диссертационного совета Д 350.002.01 на базе Федерального бюджетного учреждения науки «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека по адресу: 142279, Московская область, г.о. Серпухов, п. Оболенск, территория «Квартал А», дом 24.

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

Автореферат разослан «___» _____ 2021 г.

Ученый секретарь диссертационного совета,
кандидат биологических наук Фурсова Надежда Константиновна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность исследования

Staphylococcus aureus – это один из ведущих возбудителей внутрибольничных и внебольничных инфекций человека. *S. aureus* способен вызывать разные по форме и тяжести заболевания: от поверхностных кожных инфекций до тяжёлых форм пневмонии, менингита, эндокардита и др. (Plata et al, 2009), и обладает устойчивостью к различным группам антибактериальных препаратов. Метициллинрезистентные штаммы *S. aureus* (MRSA) относятся к внутрибольничным возбудителям с наибольшей клинической значимостью (Peng et al., 2018). Стоит отметить, что количество смертельных случаев от инфекций, вызываемых метициллинчувствительными штаммами *S. aureus* (MSSA), сравнимо с количеством смертельных случаев от MRSA-инфекций (Yilmaz et al, 2016; Kourtis et al., 2019). Наиболее массовые вспышки стафилококковых инфекций происходят за счёт токсигенных штаммов MSSA. Золотистый стафилококк способен продуцировать большое количество разных токсинов, наиболее актуальными из которых являются энтеротоксины. Стафилококки, продуцирующие энтеротоксины, вызывают пищевые токсикоинфекции. Среди возбудителей пищевых инфекций, *S. aureus* занимают третье место по частоте встречаемости. Наибольшей опасности подвергается иммунодефицитный контингент, в частности, люди старшего возраста и дети (Fisher et al., 2018). Вирулентность штаммов *S. aureus*, продуцирующих энтеротоксины, связана с высокой стабильностью энтеротоксинов в окружающей среде и способностью энтеротоксинов сохранять активность в желудочно-кишечном тракте человека (Pinchuk et al., 2010). Энтеротоксины имеют свойства суперантигенов и могут вызывать неспецифическую пролиферацию Т-лимфоцитов (Gerard et al., 2004). Регуляция продукции энтеротоксинов зависит от особенностей генома штаммов *S. aureus*, принадлежащих к разным клональным комплексам (Clonal Complex, CC). Штаммы *S. aureus* различных CC с разной частотой ассоциируются с пищевыми инфекциями. При этом в различных географических зонах наблюдается различие в частоте выделяемых CC. Так в Европе вспышки стафилококковой пищевой инфекции связаны со штаммами *S. aureus* клональных комплексов CC5 и CC45, в Южной Корее – клональных комплексов CC1, CC30 и CC59, в Японии – клональных комплексов CC45 и CC81, в Китае – клональных комплексов CC1, CC6 и CC7 (Yang et al., 2018; Chen et al., 2019).

Среди энтеротоксинов *S. aureus*, наибольшее значение имеет энтеротоксин A, ведущий этиологический фактор пищевой стафилококковой инфекции. Штаммы *S. aureus* приобретают способность продуцировать энтеротоксин A в результате конверсии бактериофагами Sa3int типа, кодирующими ген энтеротоксина A (*sea*). Другими клинически важными энтеротоксинами *S. aureus* являются энтеротоксины B и C.

Эксфолиативный дерматит, известный также как болезнь Риттера, синдром ошпаренной кожи или пузырчатка новорождённых, также является примером широко распространённой токсикоинфекции *S. aureus.* Эксфолиативный дерматит встречается у новорождённых, но может поражать людей старшего возраста, у которых болезнь протекает с большими осложнениями и с большой вероятностью вызывает летальный исход (Mockenhaupt, 2005). Специфическая клиническая картина эксфолиативного дерматита возникает вследствие воздействия эксфолиативных токсинов (ET), разрушающих дейсмоглеин 1 в зернистом слое эпидермиса с последующим отслоением поверхностного слоя эпидермиса, что приводит к образованию пузырей на коже (Amagai et al, 2002). К настоящему времени известно 4 типа эксфолиативных токсинов, но клиническую роль имеют два из них: эксфолиативные токсины A и B (ETA и ETB) (Holochova et al, 2010). Эксфолиативный токсин A продуцируется штаммами *S. aureus*, подвергшимся ETA-конверсии бактериофагом Sa1int типа. По литературным данным, ET-продуцирующие штаммы *S. aureus* наиболее часто ассоциированы с CC9, CC15, CC88 и

CC121 (Lamand et al, 2012). В Японии, помимо штаммов *S. aureus* CC121, часто встречаются метициллинрезистентные штаммы *S. aureus* CC509 (Shi et al, 2011; Hisata et al, 2011). В Европе, кроме штаммов *S. aureus* CC121, часто выделяются *S. aureus* CC9 и CC15 (Ruzickova et al, 2012; Lamand et al, 2012).

Таким образом, в разных регионах мира вспышки пищевых инфекций и эксфолиативного дерматита вызывают штаммы *S. aureus* разных клональных комплексов, продуцирующие различные профильные токсины. Генотипирование основных эпидемических клонов возбудителей позволяет контролировать эпидемическую обстановку, эффективно проводить меры профилактической борьбы, отслеживать эпидемиологические связи между изолятами. Использование генотипирования дает возможность установить степень генетической близости изолятов *S. aureus*, и определить, может ли изучаемый изолят *S. aureus* быть возбудителем данной стафилококковой инфекции. В странах, где проводится постоянный молекулярно-эпидемиологический надзор, количество инфекций, вызываемых *S. aureus*, значительно уменьшилось за последнее десятилетие.

Степень разработанности темы исследования

Изучению штаммов *S. aureus*, способных вызывать пищевые инфекции и эксфолиативный дерматит, посвящены многочисленные работы исследователей Западной Европы и Японии (Argudin et al, 2010; Suzuki et al, 2014; Lamand et al, 2012; Shi et al, 2011, Yang et al., 2018; Chen et al., 2019). Благодаря этим исследованиям были определены этиологические агенты пищевых инфекций и эксфолиативного дерматита, установлены основные клональные комплексы *S. aureus*, которые ассоциируются с данными инфекциями. С накоплением данных о генетике возбудителей было выявлено, что специфика развития и тяжести пищевых инфекций и эксфолиативного дерматита зависят от мобильных генетических элементов (МГЭ) и генетического окружения, определяемого в соответствии с клональными комплексами *S. aureus* (Sato'o et al., 2014; Lamand et al, 2012, Yang et al., 2018; Chen et al., 2019). Особое значение придаётся фаговой конверсии штаммов *S. aureus*, которая во многих случаях является определяющим фактором в развитии токсикоинфекций *S. aureus*.

Проведение генотипирования при изучении вспышек стафилококковых токсикоинфекций позволяет прослеживать эпидемическую связь штаммов-возбудителей, определять и локализовать источник инфекции. Следует отметить, что в РФ до последнего времени генотипирование изолятов *S. aureus* при расследовании вспышек токсикоинфекций не проводилось, поэтому данные о генотипах штаммов *S. aureus* и ассоциированных с ними генов токсинов отсутствуют. Только в последние годы, в рамках данного исследования, были получены сведения о генотипах возбудителей стафилококковых токсикоинфекций в России (Онищенко и др., 2014; Абаев и др., 2014; Abaev et al., 2016; Абаев и др., 2017; Abaev et al., 2018; Абаев и др., 2019).

Цель исследования – геномный и молекулярно-эпидемиологический анализ штаммов *Staphylococcus aureus*, выделенных при вспышках пищевой инфекции и эксфолиативного дерматита новорождённых в период с 2012 по 2018 гг. в разных регионах Российской Федерации.

Задачи исследования:

1. Разработка алгоритма экспресс-анализа изолятов *S. aureus* для расследования вспышек пищевой инфекции и эксфолиативного дерматита новорождённых.
2. Характеристика штаммов *S. aureus*, выделенных во время вспышек пищевой инфекции и эксфолиативного дерматита новорождённых в разных регионах РФ.
3. Полногеномный сравнительный анализ штаммов *S. aureus* – возбудителей вспышек пищевой инфекции и эксфолиативного дерматита новорождённых.
4. Создание коллекции референсных штаммов *S. aureus* – возбудителей пищевой инфекции и эксфолиативного дерматита новорождённых, циркулирующих в РФ.

Научная новизна исследования

Впервые идентифицированы и охарактеризованы на геномном уровне 104 штамма *S. aureus*, возбудителей пищевой инфекции и эксфолиативного дерматита новорождённых на территории Российской Федерации, принадлежащие клональным комплексам CC1, CC5, CC8, CC12, CC15, CC30, CC45 и CC121.

Впервые обнаружен феномен ETA-конверсии штамма *S. aureus* клонального комплекса CC8 бактериофагом Sa1int типа, что привело к формированию нового эпидемического клона *S. aureus*, способного вызывать эксфолиативный дерматит новорождённых.

Определены методом сравнительного генетического анализа уникальные для геномов ETA-конвертирующих бактериофагов *S. aureus* гены профагов phiETA_B-7772 и phiETA_B-7777, ответственные за эксцизию бактериофага и метаболизм нуклеиновых кислот.

Впервые при вспышке пищевой инфекции выявлена динамическая картина формирования вариантов штаммов *S. aureus* клонального комплекса CC1 за счёт изменения состава мобильных генетических элементов, несущих гены энтеротоксинов A и B: бактериофага Sa3int типа и острова патогенности SaPI3, соответственно.

Впервые установлена ассоциация между географической локализацией и клональным комплексом *S. aureus* возбудителей эксфолиативного дерматита новорождённых в РФ: в Европейском регионе России выявлены штаммы *S. aureus* CC8 и CC15, в восточных регионах – CC121.

Определён новый сиквенс-тип штамма *S. aureus*, возбудителя эксфолиативного дерматита новорождённых, который был зарегистрирован в базе данных https://pubmlst.org/saureus/ под номером ST2993.

Теоретическая и практическая значимость исследования

Предложен алгоритм идентификации штаммов *S. aureus*, возбудителей пищевой инфекции и эксфолиативного дерматита новорождённых, для расследования вспышек стафилококковых токсикоинфекций, подготовлены методические рекомендации «Генотипирование изолятов *Staphylococcus aureus* при расследовании вспышек стафилококковых токсикоинфекций», утвержденные Учёным советом ФБУН ГНЦ ПМБ 18.03.2019 г., протокол № 2 – учрежденческий уровень внедрения.

В Государственной коллекции патогенных микроорганизмов и клеточных культур («ГКПМ-Оболенск») депонировано 60 охарактеризованных штаммов *S. aureus* – возбудителей пищевой инфекции и эксфолиативного дерматита новорождённых, выделенных в 2012-2018 гг. – федеральный уровень внедрения.

В базе данных GenBank размещены 42 полногеномные последовательности штаммов *S. aureus* – возбудителей пищевой инфекции и эксфолиативного дерматита новорождённых – международный уровень внедрения.

Разработана ПЦР-тест система в реальном времени для выявления метициллинрезистентных штаммов *S. aureus* и *Staphylococcus epidermidis*, и определения генов токсинов (токсина синдрома токсического шока, лейкоцидина Пантон-Валентайна и эксфолиативного токсина B). Проведены межлабораторные испытания, подготовлена нормативная документация: Технические Условия 21.20.23-318-78095326-2019, Инструкция по применению набора реагентов для идентификации и характеристики ДНК основных клональных комплексов бактерий *Staphylococcus aureus* методом полимеразной цепной реакции в реальном времени («ПЦР тест-система *S.aureus*-MRS+TOX»), Технологическая схема производства набора реагентов для идентификации и характеристики ДНК основных клональных комплексов бактерий *Staphylococcus aureus* методом полимеразной цепной реакции в реальном времени «ПЦР тест-система *S.aureus*-MRS+TOX» – учрежденческий уровень внедрения.

Создана База данных «Клинические штаммы *Staphylococcus aureus*, выделенные в центральном регионе России» (Свидетельство о государственной регистрации базы данных № 2019620329 от 27.02.2019 г.) – федеральный уровень внедрения.

Материалы диссертации используются в лекциях и семинарских занятиях при подготовке магистрантов Пущинского государственного естественно-научного института и аспирантов ФБУН ГНЦ ПМБ (Справка об использовании материалов диссертационного исследования № 150-50/21-04-469-2021 от 18.03.2021).

Методология и методы исследования

Для исследования изолятов *S. aureus*, выделенных при вспышках пищевой инфекции и эксфолиативного дерматита новорождённых в Российской Федерации, использовали комплексный подход, включающий в себя изучали фенотипические и генетические особенности изолятов *S. aureus*, обеспечивающие проявление специфических клинических симптомов. В работе использовались микробиологические, иммунологические, молекулярно-генетические и биоинформационные методы исследований.

Штаммы. В работе использовали изоляты *S. aureus* (n=515), выделенные при расследовании вспышек инфекционных заболеваний, этиологическим агентом которых являлся *S. aureus*, в период с 2012 по 2018 гг. из 15 городов России: Белгорода (n=72), Оренбурга (n=113), Пскова (n=27), Москвы (n=4), Санкт-Петербурга (n=15), Калининграда (n=8), Красногорска (n=2), Твери (n=54), Саранска (n=38), Ульяновска (n=43), Химки (n=3), Южно-Сахалинска (n=52), Якутска (n=42), Перми (n=16), Вологды (n=14); и с поезда Абакан-Москва (n=12).

Микробиологические методы. Для выращивания бактериальных культур использовали питательные среды № 1 ГРМ и № 10 ГРМ (ФБУН ГНЦ ПМБ, Оболенск, Россия). Культивирование микроорганизмов осуществляли при температуре 37 °С в течение 18-24 ч. Видовую идентификацию бактерий проводили с помощью биохимических тестов API Staph (bioMerieux, Франция), прибора MALDI-TOF Biotyper (Bruker, Франция) и биохимического анализатора VITEK 2 Compact (bioMerieux, Франция) согласно инструкциям производителей.

Молекулярно-генетические методы. Выделение тотальной ДНК штаммов *S. aureus* проводили CTAB-методом (Wilson, 2001). Определение генов факторов вирулентности проводили с использованием специфичных праймеров и амплификатора «Gradient Palm Cycler» CG1-96 (Corbett Research, Австралия). Режимы амплификации варьировали в зависимости от требуемых задач. Изготовление олигонуклеотидов и секвенирование последовательностей методом Сэнгера производили в ЗАО Евроген (Москва, Россия). Анализ полиморфизма длин рестрикционных фрагментов продуктов амплификации вариабельного региона гена коагулазы (coa-ПЦР-ПДРФ) осуществляли согласно Hookey et al, 1998.

Мультилокусное сиквенс-типирование (MLST) штаммов *S. aureus* проводили на сервере pubmlst (https://pubmlst.org/saureus/). *Spa*-типирование проводили на сервере Ridom SpaServer (http://spaserver.ridom.de/).

Полногеномное секвенирование штаммов *S. aureus* проводили на платформе Ion Torrent PGM с использованием чипа Ion 318™ Chip Kit, набора Ion PGM 400 Sequencing Kit и набора для приготовления библиотек Ion Plus Fragment Library Kit (Life Technologies, США); и на платформе Illumina MiSeq с использованием Nextera DNA Library Preparation Kit и MiSeq Reagent Kits v3 (Illumina, США).

Биоинформационные методы. Сборку осуществляли с помощью ассемблеров Newbler 2.9 (Roche) (http://www.454.com/products/analysis-software/) и SPAdes версий 3.8.1 и 3.13.0 (Nurk et al., 2013). Аннотацию собранных геномов проводили на сервере NCBI Prokaryotic Genome Annotation Pipeline (Angiuoli et al, 2008).

Для поиска генов факторов вирулентности в геномах использовали программный пакет Ugene (Okonechnikov et al, 2012), инструмент VirulenceFinder (Joensen et al,

2014), и BLAST (The Basic Local Alignment Search Tool) (Zhang et al., 2000). Для поиска плазмид, использовали программы PlasmidFinder (Carattoli et al, 2014) и Mauve (Darling et al, 2004). Поиск профагов осуществляли с помощью программного обеспечения PHAST (PHAge Search Tool) (Zhou et al, 2011) и BLAST. Филогенетический анализ геномов штаммов *S. aureus* проводили с использованием программного обеспечения wombac (https://github.com/tseemann/wombac), Clustal W (Larkin et al., 2007). Для визуализации использовали SplitsTree (Huson et al, 2006).

Иммунологические методы. Иммуноферментный анализ для раздельного определения стафилококковых энтеротоксинов с помощью набора Ridascreen SET A, B, C, D, E (R-Biopharm AG) проводили согласно МУК 4.2.2429-08. В качестве положительного контроля использовали штамм *S. aureus* MRSA252. Также использовали автоматический анализатор VIDAS (bioMerieux, Франция) с набором тестов VIDAS Staph Enterotoxin II (SET2) (bioMerieux, Франция).

Положения, выносимые на защиту

1. Алгоритм экспресс-анализа изолятов *S. aureus*, основанный на методе полиморфизма длин рестрикционных фрагментов вариабельного участка гена *coa*, позволяет осуществлять быструю идентификацию возбудителей эпидемических вспышек пищевой инфекции и эксфолиативного дерматита новорождённых.
2. Штаммы *S. aureus*, возбудители массовых вспышек пищевой инфекции в Санкт-Петербурге, Тверской области и Якутске в 2013-2018 гг., принадлежат к двум клональным комплексам: CC1 и CC30, и кодируют в различных комбинациях такие факторы патогенности, как энтеротоксины A и B, и токсин синдрома токсического шока.
3. Впервые в процессе развития стафилококковой инфекции выявлено формирование генетических вариантов штамма *S. aureus* с различным набором этиологических факторов инфекции за счёт изменения состава мобильных генетических элементов.
4. Штаммы *S. aureus*, возбудители эксфолиативного дерматита новорождённых в Белгороде, Красногорске, Оренбурге, Пскове, Ульяновске и Южно-Сахалинске в 2012-2016 гг., принадлежат к трём клональным комплексам: в Европейском регионе России – ETA-продуцирующие штаммы клонального комплекса CC15 и CC8, в восточных регионах России – штаммы клонального комплекса CC121, продуцирующие ETA и ETB одновременно или один из них.
5. Впервые выявлена вспышка эксфолиативного дерматита новорождённых, обусловленная новым ETA-продуцирующим штаммом *S. aureus* клонального комплекса CC8, сформировавшимся в результате лизогенной конверсии бактериофагом Sa1int-типа.

Степень достоверности и апробация результатов

Работа выполнена в Федеральном бюджетном учреждении науки «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека в рамках НИР 049 Роспотребнадзора (2015-2020 гг.).

Достоверность результатов обеспечивается проведением исследовательских работ современными методами в соответствии с международными рекомендациями.

Основные результаты диссертационной работы были представлены, доложены и обсуждены на 18 Всероссийских и международных конференциях: 24th ECCMID (Барселона, Испания, 10-13 мая 2014 г.); XVI МАКМАХ/ESCMID (Москва, 21-23 мая 2014 г.); 25th ECCMID (Копенгаген, Дания, 25-28 апреля 2015 г.); XVIII Кашкинские чтения (Санкт-Петербург, 09-11 июня 2015 г.); XIX Кашкинские чтения (Санкт-Петербург, 14-16 июня 2016 г.); III научно-практической конференции с международным

участием «Бактериофаги: теоретические и практические аспекты применения в медицине, ветеринарии и пищевой промышленности» (Москва, 13-15 октября 2016 г.); XX Кашкинские чтения (Санкт-Петербург, 14-16 июня 2017 г.); XI съезде Всероссийского научно-практического общества эпидемиологов, микробиологов и паразитологов (Москва, 15-17 ноября 2017 г.); XXI Кашкинские чтения (Санкт-Петербург, 6-8 июня 2018 г.); IV Национальном конгрессе бактериологов (Омск, 12-13 сентября 2018 г.); IV научно-практической конференции с международным участием «Бактериофаги: теоретические и практические аспекты применения в медицине, ветеринарии и пищевой промышленности» (Нижний Новгород, 24-26 сентября 2018 г.); XXII Кашкинские чтения (Санкт-Петербург, 12-15 июня 2019 г.), 30th ECCMID (Париж, Франция, 18-21 апреля 2020 г.); XXIII Кашкинские чтения (Санкт-Петербург, 9-11 ноября 2020 г.).

Личное участие автора в получении результатов

Личное участие автора заключалось в анализе научной литературы, планировании экспериментов, в выполнении молекулярно-генетических экспериментов, биоинформационном анализе, в подготовке публикаций, в представлении устных и постерных докладов на конференциях. Отдельные разделы работы выполнены совместно с к.м.н. Абаевым И.В., к.б.н. Коробовой О.В., к.м.н. Борзиловым А.И., Мицевич И.П., к.б.н. Кисличкиной А.А., к.б.н. Богуном А.Г., к.м.н. Карцевым Н.Н.

Публикации

По материалам диссертационной работы опубликована 26 научных работ, в том числе 6 статей в рецензируемых научных журналах и 20 тезисов в материалах международных и Всероссийских научных конференций, зарегистрирована 1 База данных.

Объём и структура диссертации

Диссертация изложена на 145 страницах машинописного текста и состоит из Введения, Обзора литературы, Результатов и обсуждения, Заключения, Выводов и Списка литературных источников, включающего 7 работ отечественных и 227 работ зарубежных авторов. Работа иллюстрирована 15 рисунками и 19 таблицами.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Разработка алгоритма экспресс-анализа изолятов *S. aureus* при расследовании вспышек пищевой инфекции и эксфолиативного дерматита новорождённых

С 2012 г. в ФБУН ГНЦ ПМБ проводили исследование изолятов *S. aureus*, выделенных при вспышках пищевой инфекции и эксфолиативного дерматита новорождённых. Целью исследования являлась идентификация этиологического агента вспышки и определение источников инфекции.

S. aureus часто выделяется при патологиях, вызванных другими микроорганизмами, поэтому выделение золотистого стафилококка не может являться подтверждением стафилококковой этиологии инфекции. Для идентификации *S. aureus* в качестве этиологического агента необходимым этапом является проведение молекулярно-генетического типирования. Существующая в настоящее время нормативная документация по мониторингу инфекций *S. aureus* базируется, в основном, на фенотипических методах. В 2014 году были выпущены федеральные клинические рекомендации «Молекулярно-эпидемиологический мониторинг в системе эпидемиологического надзора за инфекциями, связанными с оказанием медицинской помощи» (Гончаров и др., 2014), в которых были отмечены следующие недостатки фенотипических методов типирования: невысокая информативность данных методов и низкая дискриминирующая способность; недостаточная воспроизводимость результатов фенотипических методов типирования.

Молекулярно-генетические методы типирования штаммов MRSA регламентированы в методических рекомендациях (МР) «Метициллинрезистентные *Staphylococcus aureus* – возбудители внутрибольничных инфекций: идентификация и генотипирование» (Дмитренко и др., 2006). При возникновении массовых вспышек

токсикоинфекций, как правило, выделяются изоляты MSSA, для которых типирование, оптимизированное для MRSA, мало пригодно. Поэтому для проведения сравнительного анализа образцов, выделенных во время вспышек пищевой инфекции и эксфолиативного дерматита новорождённых от заболевших, родственников, персонала, из пищевых продуктов и объектов окружающей среды, нами был разработан алгоритм, позволяющий провести экспресс-анализ данного типа изолятов *S. aureus*. Алгоритм предназначен для молекулярно-генетических исследований выделенных чистых культур *S. aureus* и включает следующие этапы: 1) экспресс-выделение ДНК *S. aureus*; 2) проверка на принадлежность виду *S. aureus* методом ПЦР с праймерами на ген нуклеазы (*nuc*) и вариабельный участок гена коагулазы (*coa*), при этом одновременно проводится первичное типирование исследуемых культур за счёт разности в размере амплифицируемого продукта вариабельного участка гена коагулазы; 3) проведение *coa*-ПЦР-ПДРФ типирования исследуемых изолятов *S. aureus* с помощью рестриктазы AluI и поиск генов факторов вирулентности (генов энтеротоксинов и эксфолиативных токсинов); 4) сравнительный анализ полученных данных; 5) проведение сиквенс-типирования: MLST и *spa*-типирование; 6) анализ полученных данных, сравнение данных исследуемых изолятов между собой и с международными базами данных, определение клональных комплексов исследуемых изолятов *S. aureus*; 7) проведение полногеномного секвенирования; 8) анализ полученных геномов *S. aureus*: сравнение с опубликованными полногеномными последовательностями *S. aureus*, поиск МГЭ, нетипичных геномных последовательностей, полногеномный SNP анализ и другое.

В результате, после *coa*-ПЦР-ПДРФ типирования, на четвёртом этапе в большинстве случаев удаётся установить наличие штамма *S. aureus*, этиологического агента инфекции. В дальнейшем для более точного определения штамма-возбудителя и сравнения его характеристик с международными базами данных необходимым является этап *spa*-типирования. Для использования в рутинной практике *coa*-ПЦР-ПДРФ типирование является экономически эффективным решением и позволяет с высокой эффективностью устанавливать генетическую близость исследуемых изолятов *S. aureus*. Таким образом, проведение начальных этапов экспресс-анализа позволяет на местах проводить первичное расследование вспышек инфекций, вызванных токсигенными штаммами *S. aureus*.

Идентификация и анализ циркулирующих на территории РФ штаммов *S. aureus* – возбудителей пищевой инфекции

В период с 2013 по 2018 гг. был проведён анализ 10 вспышек пищевой инфекции в 8 регионах России и одна вспышка, произошедшая на поезде Абакан-Москва (Рисунок 1, Таблица 1). Всего было исследовано 212 изолятов *S. aureus*, из них 121 от больных, 52 от сотрудников пищеблоков, 36 из пищевых продуктов и три изолята были выделены из смывов с оборудования (Таблица 2). Полученные изоляты тестировали на принадлежность к виду *S. aureus* фенотипическими и генетическими методами.

Эффективность работы алгоритма экспресс-анализа изолятов *S. aureus* была продемонстрирована при расследовании трёх пищевых инфекций, зарегистрированных в Ульяновской, Вологодской и Калининградской областях (Рисунок 1, Таблицы 1, 2). С помощью фенотипических и молекулярно-генетических методов тестировали полученные изоляты на принадлежность к виду *S. aureus*. Далее изоляты *S. aureus* типировали методом *coa*-ПЦР-ПДРФ. Среди изолятов, выделенных от больных, были выявлены различные варианты *coa*-ПЦР-ПДРФ паттернов для каждой вспышки. Уже на ранней стадии расследования было установлено, что изоляты *S. aureus*, выделенные от больных, принадлежат к множественному числу генотипов по данным *coa*-ПЦР-ПДРФ и по анализу генов энтеротоксинов (*sea, seb, sec, sed, see*). Эти данные свидетельствовали о том, что *S. aureus* не является возбудителем вышеперечисленных вспышек пи-

щевой инфекции. Изоляты *S. aureus*, выделенные от сотрудников пищеблоков и из пищевых продуктов от изолятов *S. aureus*, выделенных от больных. Расследование рассмотренных трёх вспышек пищевой инфекции продемонстрировало эффективность разработанного алгоритма и целесообразность его применения.

Рисунок 1 – Локализация расследованных в данной работе вспышек пищевой инфекции в период с 2013 по 2018 гг.

Таблица 1 – Вспышки пищевой инфекции, изученные в ходе данной работы

Регион	Контингент	Дата	Число заболевших	Госпитализировано
Ленинградская область	Рабочие-строители аэропорта Пулково, г. Санкт-Петербург	Август, 2013	363	223, из них 7 – интенсивная терапия
Республика Мордовия	Учащиеся средней школы г. Саранск	Май, 2014	72	16
Тверская область	Молодёжный форум «Селигер-2014»	Июль, 2014	145	38
Поезд Абакан-Москва	Учащиеся и преподаватели средней школы	Август, 2014	58	58
Ульяновская область	Учащиеся, детский санаторий «Белый Яр»	Ноябрь, 2014	46	2
Республика Саха	Население г. Якутск	Декабрь, 2015	67	41
Вологодская область	Детский оздоровительный лагерь «Жемчужина Мологи»	Август, 2016	32	26
Калининградская область	Детский оздоровительный лагерь «Огонёк»	Август, 2016	42	1
Пермский край	Учащиеся средней школы г. Верещагино	Ноябрь, 2016	40	27
Республика Саха	Население г. Якутск	Август, 2018	13	0
Всего			878	439

При анализе вспышек пищевой инфекции, в которых была установлена стафилококковая этиология заболевания, изоляты *S. aureus*, выделенные от заболевших, имели идентичные характеристики и представляли эпидемический штамм *S. aureus*. В нашей работе такие штаммы были идентифицированы в семи вспышках пищевой инфекции, зарегистрированных в шести регионах России.

Три массовые вспышки стафилококковой пищевой инфекции были зарегистрированы в Санкт-Петербурге, Тверской области и Якутске. Масштабность вышеприведённых вспышек пищевой инфекции объясняется централизованным снабжением пищей, обсеменённой штаммами *S. aureus*, продуцирующими энтеротоксины. В результате пострадало 575 человек, из которых 302 человека были госпитализированы, часть из которых были доставлены в отделения реанимации и интенсивной терапии (Таблица 1). При проведении расследования вышеперечисленных вспышек пищевой инфекции было изучено 102 изолята *S. aureus* (Таблица 2).

Таблица 2 – Изоляты *S. aureus*, полученные в ходе расследования вспышек пищевой инфекции в 2013-2018 гг.

Место возникновения вспышки пищевой инфекции	Изолятов *S. aureus* исследовано			Всего изолятов
	от заболевших	от сотрудников пищеблоков	из пищевых продуктов / окружающей среды	
Санкт-Петербург, 2013	14	0	1	15
Саранск, 2014	30	6	2	38
Молодёжный форум «Селигер-2014»	28	26	0	54
Поезд Абакан-Москва, 2014	3	6	3	12
Ульяновск, 2014	8	4	1	13
Якутск, 2015	12	3	18	33
Вологда, 2016	8	5	1	14
Калининград, 2016	5	0	2 / 1	8
Пермь (Верещагино), 2016	9	2	3 / 2	16
Якутск, 2018	4	0	5	9
Всего	121	52	36 / 3	212

Таблица 3 – Результаты генотипирования штаммов *S. aureus* – возбудителей пищевой инфекции

Регион	Клональный комплекс	Выявленные гены токсинов[1]	Продукция энтеротоксинов[2]	Возможный источник заражения[3]	
				Продукты питания	Персонал
Санкт-Петербург, 2013	CC30, t2509	*sea, tst*	SEA	+	-
Саранск, 2014	CC12, t888	*seb*	SEB	+	-
«Селигер-2014», 2014	CC30, t122	*sea, tst*	SEA	+	+
Поезд Абакан-Москва, 2014	CC5, t002	*sea, tst*	SEA	+	+
Якутск, 2015	CC1, t948	*seb* | *sea, seb*	SEB | SEA, SEB	+	-
Верещагино (Пермский край), 2016	CC1	*sea, tst*	ND[4]	+	+
Якутск, 2018	CC1, t127	*sea, seb*	ND	+	ND

[*1] При расследовании вспышки пищевой инфекции, зарегистрированной в Якутске в 2015 году, в 29 исследуемых изолятах *S. aureus* был выявлен ген энтеротоксина B, в 19 из них также был выявлен ген энтеротоксина A. [*2] Проверка на продукцию энтеротоксинов проводилась с помощью системы RIDASCREEN иммуноферментным методом. [*3] «+» - был обнаружен выявленный штамм-возбудитель инфекции; «-» - штамм-возбудитель инфекции не был выделен. [*4] Проверка на продукцию энтеротоксинов не проводилась.

В результате при расследовании семи вспышек пищевой инфекции были определены штаммы *S. aureus,* возбудители пищевых инфекций, относящиеся к четырём клональным комплексам: CC1, CC5, CC12 и CC30 (Таблица 3). При этом, для штаммов *S. aureus* клональных комплексов CC5 и CC30 выявлена ассоциация с геном энтеротоксина A, для штаммов *S. aureus* CC12 – с геном энтеротоксина B, для штаммов *S. aureus* CC1 – с генами энтеротоксинов A и B.

Идентификация и анализ циркулирующих на территории РФ штаммов *S. aureus* – возбудителей эксфолиативного дерматита новорождённых

Был проведён анализ изолятов *S. aureus*, выделенных во время вспышек эксфолиативного дерматита (пузырчатки новорождённых) в шести городах России в период с 2012 по 2016 гг. (Таблица 4). Исследовали 303 изолята *S. aureus*, из них 87 – от заболевших, 169 – от сотрудников медицинских учреждений, 25 изолятов из объектов окружающей среды и 23 изолята от родственников пострадавших (Таблица 5).

При анализе изолятов *S. aureus*, выделенных от заболевших, были выявлены доминантные штаммы *S. aureus*, которые кодируют ген эксфолиативного токсина A или гены эксфолиативных токсинов A и B одновременно (Таблица 4). Методами *coa*-ПЦР-ПДРФ и сиквенс-типирования было установлено, что четыре вспышки эксфолиативного дерматита были вызваны штаммами *S. aureus* CC121 с coa-ПЦР-ПДРФ паттернами 676(381;295) и 838(324;295;219). В двух вспышках были выявлены штаммы другого клонального комплекса *S. aureus* – CC15, имеющие *coa*-ПЦР-ПДРФ паттерны 514(300;214) и 595(381;214).

Рисунок 2 – Локализация расследованных в данной работе вспышек эксфолиативного дерматита новорождённых в период с 2012 по 2016 гг.

Обращает на себя внимание выявление в качестве возбудителя эксфолиативного дерматита новорождённых штамма *S. aureus* CC8 с паттерном 595(214;162;138;81) (Таблица 6). До этого исследования не были известны штаммы *S. aureus* CC8, способные вызывать эксфолиативный дерматит новорождённых. Данный факт интересен тем, что среди внутригоспитальных штаммов *S. aureus*, штаммы *S. aureus* CC8 занимают первое место по частоте встречаемости в России, и расширение патогенетического потенциала данных штаммов представляет существенную угрозу для здравоохранения.

Стоит отметить, что в смывах с объектов окружающей среды не были выявлены возбудители эксфолиативного дерматита новорождённых. При анализе изолятов *S. aureus*, выделенных от сотрудников лечебного учреждения в двух случаях были выявлены штаммы *S. aureus*, кодирующие ген эксфолиативного токсина А, но отличающиеся от штаммов *S. aureus*, выделенных от заболевших (Таблица 6). Данные штаммы потенциально способны вызывать эксфолиативный дерматит. Более того, аналогичные штаммы являются возбудителями эксфолиативного дерматита в Западной Европе.

Таблица 4 – Вспышки и спорадические случаи инфекций эксфолиативного дерматита новорождённых, изученные в данной работе

Регион	Контингент	Дата	Число заболевших
Оренбургская область	Роддом ГБУЗ «ООКБ № 2» г. Оренбург	Июнь, 2012	21
Белгородская область	Родильный дом г. Белгород	Август, 2013	10
Белгородская область	Родильный дом г. Белгород	Июнь, 2014	13
Псковская область	ГБУЗ «Псковский перинатальный центр», г. Псков	Октябрь, 2014	16
Оренбургская область	Роддом ГБУЗ «ГКБ № 2» г. Оренбург	Ноябрь, 2014	8
Московская область	Акушерское отделение родильного дома г. Химки	Июнь, 2015	1
Сахалинская область	Акушерский родильный корпус ГБУЗ «Сахалинская областная больница», Южно-Сахалинск	Март, 2015	8
Ульяновская область	Родильный дом ГУЗ «Ульяновская областная клиническая больница»	Август, 2016	5
Московская область	ГБУЗ МО Красногорская Городская Больница №2, г. Красногорск	2015	1
Москва*	ГБУЗ «ДГКБ №9 им. Г. Н. Сперанского ДЗМ»	2007	4
Всего			87

* Изоляты *S. aureus* были выделены от заболевших детей в стационаре.

При анализе данных была установлена связь между клональными комплексами штаммов *S. aureus*, вызывающими эксфолиативный дерматит новорождённых, и географической локализацией вспышек. Так, в западных регионах России при вспышках эксфолиативного дерматита новорождённых выделялись штаммы *S. aureus* CC15, кодирующие эксфолиативный токсин A, а в восточных регионах Европейской части России и Дальнего Востока – штаммы *S. aureus* CC121, кодирующие эксфолиативные токсины A и B.

Таблица 5 – Количество изолятов *S. aureus*, изученных в ходе расследования вспышек эксфолиативного дерматита новорождённых

Регион	Изоляты *S. aureus*			Всего изолятов
	от больных	от сотрудников / родственников	с объектов окружающей среды	
Оренбург, 2012	14	25 / 5	0	44
Белгород, 2013	20	18	0	38
Белгород, 2014	21	1 / 7	5	34
Псков, 2014	6	18	3	27
Оренбург, 2014	8	43 / 10	7	68
Химки, 2015	1	2	0	3
Южно-Сахалинск, 2015	8	32	12	52
Ульяновск, 2016	3	27	0	30
Красногорск, 2015	1	1	0	2
Москва, 2007	4	0	0	4
Всего	87	169 / 23	25	303

Таблица 6 – Молекулярно-генетические характеристики штаммов *S. aureus* – возбудителей эксфолиативного дерматита новорождённых

Вспышка	Клональный комплекс, *spa*-тип	Гены токсинов	coa-ПЦР-ПДРФ паттерн	Изоляты *S. aureus(eta)*, выявленные у персонала
Оренбург, 2012	CC121, t272	*eta, etb*	838(324;295;219)	-
Белгород, 2013	CC15, t084	*eta*	514(300;214)	CC8, t211, *eta*
Белгород, 2014	CC8, t211	*eta*	595(214;162;138;81)	-
Псков, 2014	CC15, t084	*eta*	514(300;214)	-
Оренбург, 2014	CC121, t272	*eta*	676(381;295)	CC121, t272, *eta*
Химки, 2015	ND	-	838(324;295;219)	-
Южно-Сахалинск, 2015	CC121, t645	*eta, etb*	838(324;295;219)	-
Красногорск, 2015	CC15, t279	*eta*	595(381;214)	-
Ульяновск, 2016	CC121, t645	*eta*	838(324;295;219)	CC9, t209, *eta*

Таким образом, использование разработанного нами алгоритма при расследовании вспышек стафилококковой пищевой инфекции и эксфолиативного дерматита новорождённых позволило охарактеризовать штаммы *S. aureus*, возбудители стафилококковых инфекций, и установить эпидемиологические связи между изолятами *S. aureus*, выделенными от заболевших, от сотрудников, от родственников, из пищевых продуктов и со смывов с объектов окружающей среды. При изучении изолятов *S. aureus*, выделенных при вспышках эксфолиативного дерматита новорождённых, не было обнаружено возбудителей в смывах с объектов внутрибольничной среды. Использование алгоритма позволило выявить эпидемические цепочки распространения штаммов *S. aureus*, возбудителей стафилококковых инфекций. В трёх случаях эксфолиативного дерматита новорождённых у сотрудников лечебных учреждений были обнаружены изоляты *S. aureus*, кодирующие ген эксфолиативного токсина A, но только в одном из них изоляты *S. aureus* от сотрудников были идентичны изолятам *S. aureus*, выделенным от заболевших. Наши данные по эпидемиологической связи при вспышках эксфолиативного дерматита новорождённых совпадают с описанными случаями в зарубежной литературе, где также, как правило, не удаётся выявить возбудителей эксфолиативного дерматита у сотрудников и в смывах с объектов внутрибольничной среды (Lamand et al., 2012).

Полногеномный сравнительный анализ штаммов *S. aureus* – возбудителей вспышек пищевой инфекции

Для проведения полногеномного секвенирования использовали 23 штамма *S. aureus*, изолированных при вспышках пищевой инфекции в шести различных регионах России. Геномы штаммов *S. aureus* были размещены в базе данных GenBank. Три штамма *S. aureus*, выделенные в 2018 году в Якутске, находятся в процессе размещения (Таблица 7).

Таблица 7 – Генотипы штаммов *S. aureus*, изолированных при вспышках пищевой инфекции в РФ в период с 2013 по 2018 гг.

Штамм	Клональный комплекс	Сиквенс-тип	*spa*-тип	*coa*-ПЦР-ПДРФ	Номер GenBank	Место и год выделения
B-7438	CC30	ST30	t2509	514(219;214;81)	LWRA00000000	Санкт-Петербург, 2013
B-7439	CC30	ST30	t2509	514(219;214;81)	LWRB00000000	Санкт-Петербург, 2013
B-7778	CC30	ST30	t122	433(219;214)	LWRC00000000	Тверь, 2014
B-7779	CC30	ST30	t122	433(219;214)	LWRD00000000	Тверь, 2014
B-8380	CC12	ST12	t888	676(243;219;214)	PXVB00000000	Саранск, 2014
B-8475	CC12	ST12	t888	676(243;219;214)	SDWP00000000	Саранск, 2014
B-8476	CC12	ST12	t888	676(243;219;214)	SDWQ00000000	Саранск, 2014
B-8477	CC12	ST12	t888	676(243;219;214)	SJEL00000000	Саранск, 2014
B-8472	CC15	новый	t084	514(300;214)	SJEM00000000	Ульяновск, 2014
B-8473	CC15	новый	t084	514(300;214)	SJEN00000000	Ульяновск, 2014
B-8474	CC15	новый	t084	514(300;214)	SJEO00000000	Ульяновск, 2014
B-8478	CC5	ST5	t002	676(295;243;138)	SJEI00000000	Поезд Абакан-Москва, 2014
B-8479	CC5	ST5	t002	676(295;243;138)	SJEJ00000000	Поезд Абакан-Москва, 2014
B-8480	CC5	ST5	t002	676(295;243;138)	SJEK00000000	Поезд Абакан-Москва, 2014
B-7903	CC1	ST1	t948	595(300;214;81)	SDXI00000000	Якутск, 2015
B-7904	CC1	ST1	t948	595(300;214;81)	NIDA00000000	Якутск, 2015
B-7905	CC1	ST1	t948	595(300;214;81)	NIDB00000000	Якутск, 2015
B-7906	CC1	ST1	t948	595(300;214;81)	NIDD00000000	Якутск, 2015
B-7907	CC1	ST1	t948	595(300;214;81)	NIDC00000000	Якутск, 2015
B-7908	CC1	ST1	t948	595(300;214;81)	SDXH00000000	Якутск, 2015
B-8775	CC1	ST1	t127	595(300;214;81)	-	Якутск, 2018
B-8776	CC1	ST1	t127	595(300;214;81)	-	Якутск, 2018
B-8777	CC1	ST1	t127	595(300;214;81)	-	Якутск, 2018

Полученные полногеномные последовательности были проанализированы на наличие генов вирулентности. Установлено, что геномы штаммов *S. aureus* CC5 и CC30 кодируют гены энтеротоксинов A (*sea*) и G (*seg*), пять генов энтеротоксин-подобных белков (*sei, sem, sen, seo, seu*) и ген токсина синдрома токсического шока (*tst*). Кроме того, в штаммах *S. aureus* CC5 были выявлены гены энтеротоксина D и энтеротоксин-подобных белков J и R. Штаммы *S. aureus* CC1 несут гены лейкоцидина LukED, энтеротоксинов B и H (*seb, seh*), и могут нести ген энтеротоксина A. В штаммах *S. aureus* CC12 выявлены гены энтеротоксинов A, B и P. Штаммы *S. aureus* CC15, выделенные в Ульяновске в 2014 году не несут генов энтеротоксинов и энтеротоксин-подобных белков.

В штаммах *S. aureus* CC5 и CC30 представлен близкий по составу набор МГЭ, кодирующих гены, ассоциированные с пищевыми инфекциями. Штаммы *S. aureus* CC5 дополнительно включают плазмиду, кодирующую ген энтеротоксина D. Стоит отметить, что в штаммах *S. aureus* CC5 и CC30 был обнаружен остров патогенности SaPI2, кодирующий ген токсина синдрома токсического шока. Близкородственные штаммы *S. aureus* CC1, выделенные в Якутске с разницей в три года, имеют идентичный набор МГЭ. В штаммах *S. aureus* CC1 присутствует плазмида pMW2 и остров патогенности SaPI3, кодирующий энтеротоксин B. В части штаммов *S. aureus* CC1 присутствует бактериофаг, кодирующий ген энтеротоксина A. В штаммах *S. aureus*, выделенных в Ульяновске, обнаружена плазмида pWBG757 и профаг Sa1int типа, кодирующий ген

эксфолиативного токсина А. Штаммы *S. aureus* CC12, выделенные в Республике Мордовия, несут в геноме остров патогенности SaPI3 и профаг Sa3int типа, кодирующие гены энтеротоксинов В и Р, соответственно (Таблица 8). Таким образом, в геномах исследованных штаммов наблюдается ассоциация между клональными комплексами *S. aureus* и определённым набором МГЭ, ответственных за кодирование генов вирулентности.

Таблица 8 – МГЭ в геномах штаммов *S. aureus*, изолированных при вспышках пищевой инфекции в России

Клональный комплекс	Штамм	Остров патогенности и кодируемый ген вирулентности			бактериофаг и кодируемый ген вирулентности		Плазмида (аналог)	Кластер egc
		SaPI2 (*tst*)	SaPI3 (*seb*)	SaPI4	Sa1int (*eta*)	Sa3int (*sea*/*sep*)		
CC1	B-7903	-	+	-	-	-	pMW2	-
	B-7904	-	+	-	-	+	pMW2	-
	B-7905	-	+	-	-	-	pMW2	-
	B-7906	-	+	-	-	-	pMW2	-
	B-7907	-	+	-	-	+	pMW2	-
	B-7908	-	+	-	-	-	pMW2	-
	B-8775	-	+	-	-	+	pMW2	-
	B-8776	-	+	-	-	+	pMW2	-
	B-8777	-	+	-	-	+	pMW2	-
CC5	B-8478	+	N.D.[1]	N.D.	-	+	pLUH02	egc3
	B-8479	+	N.D.	N.D.	-	+	pLUH02	egc3
	B-8480	+	N.D.	N.D.	-	+	pLUH02	egc3
CC12	B-8380	-	+	N.D.	-	-	N.D.	-
	B-8475	-	+	N.D.	-	-	N.D.	-
	B-8476	-	+	N.D.	-	-	N.D.	-
	B-8477	-	+	N.D.	-	-	N.D.	-
CC15	B-8472	-	-	-	+	-	pWBG757	-
	B-8473	-	-	-	+	-	pWBG757	-
	B-8474	-	-	-	+	-	pWBG757	-
CC30	B-7438	+	-	+	-	+	-	egc3
	B-7439	+	-	+	-	+	-	egc3
	B-7778	+	-	+	-	+	-	egc3
	B-7779	+	-	+	-	+	-	egc3

[*1] – Не определено (Not determined).

Для штаммов *S. aureus* CC1 и CC30 был проведён сравнительный полногеномный анализ на основе коровых SNP с последующим построением филогенетического дерева. При анализе 71 геномов штаммов *S. aureus* CC30 было обнаружено 7729 коровых SNP, на дендрограмме выявлено три кластера (Рисунок 3). Кластер, включающий такие референс-штаммы *S. aureus*, как MN8 и MRSA252, подразделяется, на две клады, в одну из которых входят штаммы *S. aureus*, близкие к штамму MRSA252, а во вторую входят штаммы *S. aureus*, находящиеся в одной группе со штаммом MN8 (Рисунок 3). При этом, штаммы *S. aureus* B-7438 и B-7439, выделенные в Санкт-Петербурге, входят в кладу штаммов *S. aureus* MN8 типа. Неожиданным оказался факт выделения на филогенетическом дереве штаммов *S. aureus* B-7778 и B-7779, возбудителей вспышки пищевой инфекции в Тверской области, в отдельную обособленную кладу.

При полногеномном SNP анализе 100 геномов штаммов *S. aureus* CC1 было обнаружено 448 SNP, что в 17 раз меньше, чем для штаммов *S. aureus* CC30 (7729 SNP). Данный факт показывает, что клональный комплекс *S. aureus* CC30 является эволюционно более активным по сравнению с клональным комплексом CC1. Геномы изученных нами штаммов CC1 размещены на филогенетическом дереве без особенностей.

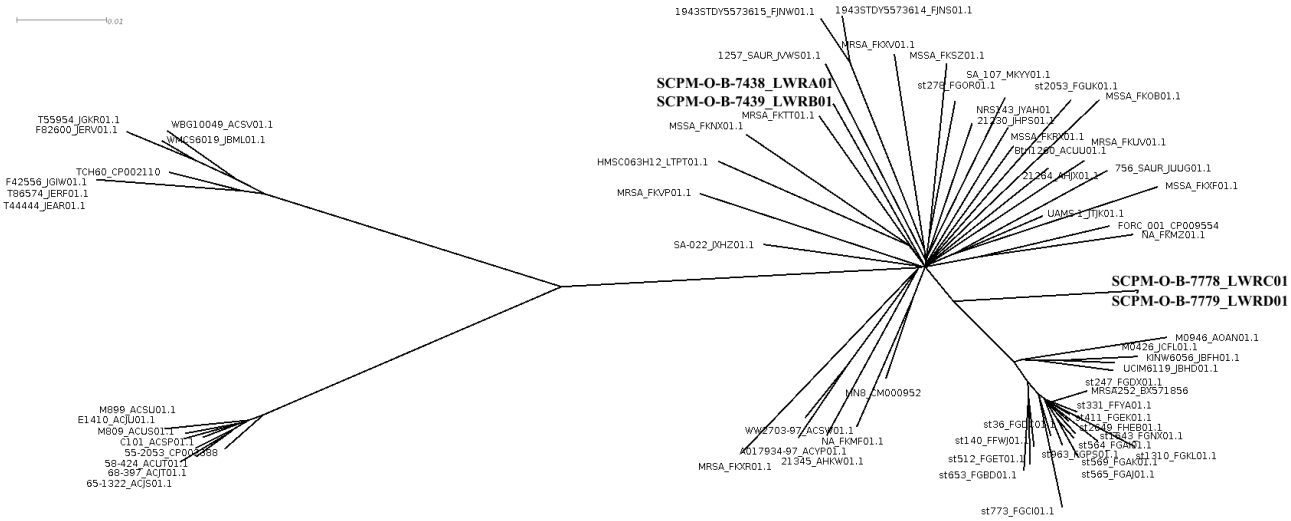

Рисунок 3 – Филогенетическое дерево 71 генома штаммов *S. aureus* CC30, построенное на основе 7729 коровых SNP выявленных с помощью программы wombac, визуализация с помощью SplitsTree

По результатам биоинформационного анализа выявлена близость состава МГЭ в геномах штаммов *S. aureus* CC5 и CC30. Геномы штаммов *S. aureus* CC1 и CC12 несут принципиально другой набор МГЭ. Интересным фактом является циркуляция на протяжении нескольких лет в Якутске близкородственных штаммов *S. aureus* CC1, возбудителей вспышек пищевых инфекций в 2015 и 2018 гг.

Анализ последовательностей SEA-конвертирующих бактериофагов *Staphylococcus aureus*

При анализе полногеномных последовательностей штаммов *S. aureus* было выявлено 16 вариантов геномов бактериофагов Sa3int типа, кодирующих гены энтеротоксинов A или P. Обнаружена полная идентичность нуклеотидных последовательностей Sa3int бактериофагов в геномах штаммов *S. aureus* CC30, вызвавших пищевые вспышки в Санкт-Петербурге и Тверской области, и в геноме штамма *S. aureus* MRSA252, выделенного при летальной инфекции в 1998 году в Великобритании. Высокая гомология бактериофагов Sa3int типа, локализованных в геномах штаммов *S. aureus*, изолированных на протяжении двух десятков лет в разных географических точках, говорит о строгой консервативности геномов данных бактериофагов.

Анализ последовательностей бактериофагов Sa3int типа из геномов штаммов *S. aureus* CC1, возбудителей пищевой инфекции в Якутске в 2015 и 2018 гг., также показал их полную идентичность, за исключением делеции, длиной 38 пн. При этом, бактериофаги Sa3int типа из геномов штаммов *S. aureus* CC1, возбудителей пищевой инфекции в Якутске, имеют ряд уникальных отличий при сравнении с последовательностями бактериофагов Sa3int типа из геномов штаммов *S. aureus* CC1, представленных в GenBank. Основные отличия были сосредоточены в регионах, ответственных за регуляцию транскрипции и репликации ДНК.

Для сравнительного анализа структуры бактериофагов Sa3int типа, в базе данных GenBank были выявлены последовательности 35 бактериофагов из геномов штаммов *S. aureus* шести клональных комплексов: CC1, CC5, CC8, CC30, CC239 и CC298. Таким образом, в филогенетическом SNP анализе использовали всего 51 последовательность бактериофагов Sa3int типа. Было показано, что геномы бактериофагов Sa3int типа формируют восемь кластеров, коррелирующих с определёнными клональными комплексами *S. aureus*. Исключение составили бактериофаги из геномов *S. aureus* CC8, разделенные на три удалённых друг от друга кластера. Таким образом, среди изученных бактериофагов Sa3int типа, фаги, выявленные в геномах штаммов *S. aureus* CC8,

обладают наибольшим разнообразием. Анализ структуры бактериофагов из разных кластеров выявил области фагового генома с высокой и низкой гомологией.

Таким образом, филогенетический анализ геномных последовательностей бактериофагов показал различные эволюционные пути развития геномной структуры бактериофагов в разных клональных комплексах *S. aureus*. Бактериофаги, близкие бактериофагу MRSA252, формируют уникальный кластер с высококонсервативными последовательностями. Остальные кластеры бактериофагов содержат гетерогенные геномы.

Полногеномный сравнительный анализ штаммов *S. aureus* – возбудителей вспышек эксфолиативного дерматита новорождённых

19 штаммов *S. aureus*, возбудителей вспышек эксфолиативного дерматита новорождённых, были секвенированы на платформах Ion Torrent PGM (Life Technologies, США) и Illumina MiSeq (Illumina, США). Сборка геномов была осуществлена с помощью Newbler и SPAdes, для аннотации использовали NCBI Prokaryotic Genome Annotation Pipeline (Таблица 9).

Таблица 9. Генотипы штаммов *S. aureus*, выделенных во время вспышек эксфолиативного дерматита новорождённых в России в период с 2012 по 2016 гг.

Штамм	Клональный комплекс	Сиквенс-тип	*spa*-тип	соа-ПЦР-ПДРФ	Номер GenBank	Место и год выделения
B-7772	CC8	ST2993	t211	595(214;162;138;81)	LJBK00000000	Белгород, 2013
B-7774	CC15	ST15	t084	514(300;214)	LJBL00000000	Белгород, 2013
B-7777	CC8	ST2993	t211	595(214;162;138;81)	LJBM00000000	Белгород, 2014
B-7803	CC121	ST121	t645	838(324;295;219)	PXUZ00000000	Южно-Сахалинск, 2015
B-7804	CC15	ST582	t279	595(381;214)	PXUS00000000	Красногорск, 2015
B-8371	CC121	ST121	t272	838(324;295;219)	SELV00000000	Оренбург, 2012
B-8372	CC121	ST121	t272	838(324;295;219)	PXUW00000000	Оренбург, 2012
B-8374	CC121	новый	t272	676(381;295)	PXUU00000000	Оренбург, 2014
B-8375	CC121	новый	t272	676(381;295)	PXUT00000000	Оренбург, 2014
B-8376	CC121	ST121	t812	757(295;243;219)	PXUX00000000	Оренбург, 2014
B-8377	CC121	ST121	t159	838(324;295;219)	PXUY00000000	Оренбург, 2014
B-8379	CC121	ST121	t645	838(324;295;219)	PXVA00000000	Южно-Сахалинск, 2015
B-8468	CC15	ST582	t084	595(381;214)	SDXL00000000	Москва, 2007
B-8469	CC121	ST121	t308	919(324;295;219;81)	SDXK00000000	Москва, 2007
B-8471	CC121	ST121	t4169	919(324;295;219;81)	SDXJ00000000	Москва, 2007
B-8680	CC15	ST2126	t084	514(300;214)	SGBV00000000	Псков, 2014
B-8681	CC15	ST2126	t084	514(300;214)	SGBW00000000	Псков, 2014

В геномах *S. aureus*, выделенных при эксфолиативном дерматите новорождённых, осуществляли поиск генов вирулентности. Штаммы *S. aureus* CC8, выделенные в Белгороде в 2013 и 2014 гг., имеют идентичный набор генов вирулентности: ген эксфолиативного токсина A, гены энтеротоксинов D и R, ген энтеротоксин-подобного белка J и гены лейкоцидина LukED. В штаммах *S. aureus* CC15 обнаружен ген эксфолиативного токсина A и гены лейкоцидина LukED, отсутствуют ген стафилокиназы и гены энтеротоксинов и энтеротоксин-подобных белков. Интересно отметить, что состав генов вирулентности полностью идентичен составу генов, выявленных в штаммах *S. aureus*, выделенных в 2014 г. в Ульяновске при пищевой инфекции. В штаммах *S. aureus* CC121 был выявлен ген эксфолиативного токсина A или гены эксфолиативных токсинов A и B одновременно, гены энтеротоксин-подобных белков I, M, N, O и U и, в части случаев, гены лейкоцидина LukED и ген энтеротоксина G. Исключение составляют штаммы *S. aureus* B-8469 и B-8471, в которых не выявлено генов эксфолиативных токсинов, но в штамме B-8471 обнаружены гены лейкоцидина Пантон-Валентайна.

В штаммах *S. aureus* B-7804, B-8374, B-8375 и B-8468 не было обнаружено плазмид (Таблица 10). В большей части штаммов *S. aureus* выявлен профаг Sa1int типа, несущий ген эксфолиативного токсина A. В штаммах *S. aureus* CC121 был обнаружен

кластер egc3, идентичный обнаруженному в штаммах *S. aureus* CC30. Плазмида, несущая ген эксфолиативного токсина B, выявлена только в штаммах CC121. В штаммах *S. aureus* CC15 отсутствует профаг Sa2int типа, а также кластер egc.

Таблица 10 – Мобильные генетические элементы, выявленные в штаммах *S. aureus*, возбудителях эксфолиативного дерматита новорождённых

Клональный комплекс	Штамм	Бактериофаг Sa1int	Бактериофаг Sa2int	SaPI2	SaPI3	SaPI4	Плазмида (аналог)	Кластер egc
CC8	B-7772	+	+	-	-	-	pLUH02	-
	B-7777	+	+	-	-	-	pLUH02	-
CC15	B-7774	+	-	-	-	-	pWBG757	-
	B-7804	+	-	-	-	-	-	-
	B-8468	+	-	-	-	-	-	-
	B-8680	+	-	-	-	-	pWBG757	-
	B-8681	+	-	-	-	-	pWBG757	-
CC121	B-7803	+	+	-	-	-	pETB	egc3
	B-8371	+	+	-	-	-	pETB	egc3
	B-8372	+	+	-	-	-	pETB	egc3
	B-8374	+	+	-	-	-	pSAP065A	egc3
	B-8375	+	+	-	-	-	pSAP065A	egc3
	B-8376	+	+	-	-	-	pETB	egc3
	B-8377	+	+	-	-	-	pETB	egc3
	B-8379	+	+	-	-	-	pETB	egc3
	B-8469	-	-	N.D.[1]	N.D.	N.D.	N.D.	egc3
	B-8471	-	-	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	egc3

[1] – N.D. – Not Determinent, не определено

Для штаммов *S. aureus* CC8, CC15 и CC121 был проведён сравнительный полногеномный анализ на основе коровых SNP с геномами штаммов *S. aureus*, доступных в базе данных GenBank. Для построения дендрограммы геномов штаммов *S. aureus* CC8 использовали 19 полногеномных последовательностей из базы данных GenBank и две геномных последовательности, выделенные в Белгороде в 2013 и 2014 гг. В результате было обнаружено 24094 коровых SNP, что демонстрирует еще более высокую эволюционную пластичность генома CC8 по сравнению с геномом CC30. На дендрограмме штаммы *S. aureus* эпидемического клона USA300 формируют кластер. Геномы остальных штаммов CC8 кластеров не формируют. Геномы идентифицированных нами штаммов *S. aureus* B-7772 и B-7777 (Белгород, 2013 и 2014 гг.) на филогенетическом дереве находятся между кластером USA300 и остальными штаммами CC8. Таким образом, штаммы *S. aureus* CC8, возбудители эксфолиативного дерматита, представлены на дендрограмме обособленно от известных штаммов CC8.

Для сравнительного полногеномного SNP анализа штаммов *S. aureus* CC15 и CC121 было использовано 110 и 104 геномных последовательностей, соответственно. В результате, в штаммах *S. aureus* CC15 обнаружено 8668 коровых SNP, CC121 – 12996 коровых SNP. Штаммы *S. aureus* CC15 на филогенетическом дереве разделяются на два кластера. Среди геномов малого кластера находятся геномы штаммов *S. aureus* B-7804 (Красногорск, 2015) и B-8468 (Москва, 2007). На одной ветке большого кластера выявлены геномы штаммов *S. aureus* B-7774 (Белгород, 2013), B-8680 и B-8681 (Псков, 2014). Таким образом, среди возбудителей эксфолиативного дерматита клонального комплекса CC15 обнаружено две неродственных линии штаммов *S. aureus*.

Анализ филогенетического дерева штаммов *S. aureus* CC121 показал, что геномы штаммов *S. aureus* формируют четыре основных кластера. Все геномы *S. aureus* CC121, секвенированные нами, локализованы в одном кластере, но в пределах разных ветвей – отдельно штаммы из Оренбурга от штаммов из Южно-Сахалинска.

Таким образом, при анализе геномных последовательностей штаммов *S. aureus*, возбудителей эксфолиативного дерматита в России, были выявлены различия в составе

МГЭ и кодируемых генах факторов вирулентности в разных клональных комплексах *S. aureus*. Анализ коровых SNP показал наибольшую вариабельность штаммов *S. aureus* CC8 по сравнению со штаммами *S. aureus* других исследуемых клональных комплексов.

Сравнительный анализ последовательностей ETA-конвертирующих бактериофагов *Staphylococcus aureus*

В полученных нами полногеномных последовательностях штаммов *S. aureus*, возбудителей вспышек эксфолиативного дерматита новорождённых, были выявлены 18 последовательностей ETA-конвертирующих бактериофагов Sa1int типа.

Для последовательностей ETA-конвертирующих бактериофагов, локализованных в геномах штаммов *S. aureus* B-7804 и B-8468, изолированных в Москве с разницей восемь лет, была установлена полная идентичность. Последовательность бактериофага, обнаруженного в геноме штамма *S. aureus* B-7774, выделенного в 2013 году в Белгороде, полностью идентична последовательностям бактериофагов из штаммов *S. aureus*, выделенных в Пскове. Последовательности ETA-конвертирующих бактериофагов, локализованные в геномах штаммов *S. aureus* CC121, показали полную идентичность, за исключением бактериофагов из штаммов *S. aureus*, изолированных в Южно-Сахалинске (B-7803 и B-8379), и Оренбурге (B-8377). Таким образом, последовательности ETA-конвертирующих бактериофагов образовали шесть групп гомологии.

Для проведения сравнительного филогенетического анализа геномов ETA-конвертирующих бактериофагов в базе данных GenBank были найдены последовательности 34 геномов бактериофагов. Всего в работе использовали 52 последовательности ETA-конвертирующих бактериофагов. При филогенетическом анализе было обнаружено, что последовательности бактериофагов формируют три крупных кластера, коррелирующие с клональными комплексами штаммов *S. aureus*, в которых они были обнаружены. Два кластера включают в себя бактериофаги, выявленные в геномах *S. aureus* CC88 и CC121. Третий кластер обладает большим разнообразием и включает в себя бактериофаги, выявленные в геномах штаммов *S. aureus* CC8, CC9, и CC15. Фаги из геномов штаммов *S. aureus* CC15, выделенные в Ульяновске при пищевой инфекции, были локализованы в кластере фагов из геномов *S. aureus* CC121. ETA-конвертирующие бактериофаги, выявленные в штаммах CC8, формируют отдельную ветвь в третьем кластере, в которую также входит бактериофаг из штамма *S. aureus* LGWW клонального комплекса CC88.

При анализе геномной структуры ETA-конвертирующих бактериофагов, было установлено, что ген интегразы и регионы, отвечающие за формирование структурных компонентов бактериофагов и лизис бактериальной клетки, имеют высокую гомологию. Различия в строении геномов ETA-конвертирующих бактериофагов сосредоточены в регионах, отвечающих за эксцизию и метаболизм ДНК.

Таким образом, кластеризация большинства геномов ETA-конвертирующих бактериофагов коррелирует с клональными комплексами штаммов *S. aureus*, в которые данные бактериофаги интегрированы. Однако один кластер на филогенетическом дереве объединяет бактериофаги, выявленные в геномах штаммов *S. aureus* CC8, CC9 и CC15.

Создание коллекции референсных штаммов *S. aureus*, возбудителей пищевой инфекции и эксфолиативного дерматита новорожденных

В период с 2012 по 2018 гг. было изучено 515 изолятов *S. aureus*, выделенных во время вспышек пищевой инфекции и эксфолиативного дерматита новорождённых, среди которых 207 были выделены от заболевших, 221 от сотрудников, 23 от родственников заболевших, 36 из пищевых продуктов и 28 из смывов с объектов окружающей среды. Все изоляты *S. aureus* были охарактеризованы фенотипическими и молеку-

лярно-генетическими методами. В результате 60 штаммов *S. aureus*, возбудителей пищевых инфекций и эксфолиативного дерматита новорождённых, были депонированы в Государственную коллекцию патогенных микроорганизмов и клеточных культур («ГКПМ-Оболенск»). 42 штамма *S. aureus* охарактеризованы на уровне полногеномной последовательности и депонированы в базе данных GenBank. Депонированные штаммы *S. aureus*, возбудители пищевых инфекций, относятся к CC1, CC5, CC12 и CC30; возбудители эксфолиативного дерматита новорождённых – к CC8, CC15 и CC121.

Все штаммы *S. aureus*, выбранные в качестве референсных, охарактеризованы на уровне полногеномной последовательности, проведён анализ генов вирулентности и токсинов, мобильных генетических элементов, проведён филогенетический анализ как геномов штаммов *S. aureus*, так и конвертирующих бактериофагов Sa1int- и Sa3int-типов, кодирующих гены эксфолиативного токсина А и энтеротоксина А, соответственно. Данные штаммы *S. aureus* используются в качестве контрольных образцов при расследовании вспышек пищевой инфекции и эксфолиативного дерматита новорождённых в России.

Таблица 11 – Референсные штаммы *S. aureus*, возбудители вспышек пищевой инфекции и эксфолиативного дерматита новорождённых в России

Штамм	Номер GenBank	Клональный комплекс	Сиквенс-тип	*spa*-тип	*coa*-ПЦР-ПДРФ	Профильные гены	Место и год выделения
B-7438	LWRA00000000	CC30	ST30	t2509	514(219;214;81)	*sea, tst*	Санкт-Петербург, 2013
B-7778	LWRC00000000	CC30	ST30	t122	433(219;214)	*sea, tst*	Тверь, 2014
B-8380	PXVB00000000	CC12	ST12	t888	676(243;219;214)	*seb*	Саранск, 2014
B-8478	SJEI00000000	CC5	ST5	t002	676(295;243;138)	*sea, tst*	Поезд Абакан-Москва, 2014
B-7903	SDXI00000000	CC1	ST1	t948	595(300;214;81)	*seb*	Якутск, 2015
B-7904	NIDA00000000	CC1	ST1	t948	595(300;214;81)	*sea, seb*	Якутск, 2015
B-8775	-	CC1	ST1	t127	595(300;214;81)	*sea, seb*	Якутск, 2018
B-7777	LJBM00000000	CC8	ST2993	t211	595(214;162;138;81)	*eta*	Белгород, 2014
B-7774	LJBL00000000	CC15	ST15	t084	514(300;214)	*eta*	Белгород, 2013
B-8680	SGBV00000000	CC15	ST2126	t084	514(300;214)	*eta*	Псков, 2014
B-7804	PXUS00000000	CC15	ST582	t279	595(381;214)	*eta*	Красногорск, 2015
B-8379	PXVA00000000	CC121	ST121	t645	838(324;295;219)	*eta, etb*	Южно-Сахалинск, 2015
B-8371	SELV00000000	CC121	ST121	t272	838(324;295;219)	*eta, etb*	Оренбург, 2012
B-8374	PXUU00000000	CC121	новый	t272	676(381;295)	*eta*	Оренбург, 2014

Заключение

В данной работе изучены штаммы *S. aureus*, являющиеся возбудителями вспышек пищевой инфекции и эксфолиативного дерматита новорождённых в период с 2012 по 2018 гг. в различных регионах России. В процессе расследования вспышек стафилококковой пищевой инфекции и эксфолиативного дерматита новорождённых был разработан алгоритм экспресс-анализа изолятов *S. aureus*, позволяющий в краткие сроки установить стафилококковую этиологию вспышки и генетическую близость исследуемых изолятов. В ходе данной работы с 2012 по 2018 гг. было расследовано 10 вспышек пищевой инфекции и восемь вспышек эксфолиативного дерматита новорождённых, в которых была определена эффективность предлагаемого алгоритма. Использование алгоритма экспресс-анализа позволяет выявлять инфекционные вспышки, в которых *S. aureus* заведомо не является этиологическим агентом инфекции. Так, при расследовании четырёх вспышек было установлено, что представленные для анализа изоляты *S. aureus* не являются этиологическим фактором расследуемых инфекций. По результатам работы, охарактеризованы штаммы *S. aureus*, возбудители пищевой инфекции в России, которые относятся к четырём клональным комплексам: CC1, CC5, CC12 и CC30. Возбудители эксфолиативного дерматита новорождённых в РФ относятся к трём

клональным комплексам: СС8, СС15 и СС121. В ходе данного исследования получено подтверждение высокой эволюционной изменчивости штаммов *S. aureus*, принадлежащих к клональному комплексу СС8. Впервые выявлен штамм *S. aureus* СС8, способный вызывать эксфолиативный дерматит новорождённых. При филогенетическом анализе показана близость данного штамма *S. aureus* СС8 штаммам эпидемического клона USA300, которые представляют серьёзную угрозу для здравоохранения. Установлена ассоциация между географической локализацией и клональной принадлежностью штаммов *S. aureus*, возбудителей эксфолиативного дерматита новорождённых. Выявлено, что штаммы *S. aureus* СС30, возбудители пищевой инфекции в Тверской области, при филогенетическом анализе отличаются от известных штаммов СС30. Установлена высокая интенсивность обмена генетической информацией для штаммов *S. aureus* СС1 за счёт изменения состава мобильных генетических элементов с различными генами токсинов. При филогенетическом анализе геномов бактериофагов Sa1int и Sa3int-типов впервые выявлена ассоциация между генетической изменчивостью конвертирующих бактериофагов и клональной принадлежностью штаммов *S. aureus*.

Выводы

1. Разработан и апробирован алгоритм экспресс-анализа изолятов *S. aureus*, предназначенный для типирования и идентификации штаммов *S. aureus*, возбудителей вспышек пищевой инфекции и эксфолиативного дерматита новорождённых; алгоритм включает этапы микробиологического, молекулярно-генетического и биоинформационного анализа.

2. Пищевые инфекции, вызванные *S. aureus* в различных регионах РФ, ассоциированы со штаммами *S. aureus* клональных комплексов СС30, СС1, СС5 и СС12, несущими комбинации генов этиологических факторов инфекции: энтеротоксинов А, В, и токсина синдрома токсического шока.

3. Охарактеризованные в данном исследовании возбудители эксфолиативного дерматита новорождённых в России принадлежат к штаммам *S. aureus* клональных комплексов СС15 и СС121; установлена ассоциация между географической локализацией и клональной принадлежностью идентифицированных нами штаммов: в Европейском регионе России выявлены штаммы *S. aureus* СС8 и СС15, в восточных регионах – СС121; впервые выявлен ЕТА-продуцирующий штамм *S. aureus* клонального комплекса СС8, сформировавшийся в результате лизогенной конверсии бактериофагом Sa1int-типа.

4. При сравнительном полногеномном анализе установлены филогенетические связи изученных штаммов: выявлен штамм *S. aureus* СС30, возбудитель пищевой инфекции в России, филогенетически обособленный от известных штаммов СС30; ЕТА-продуцирующий штамм *S. aureus* СС8 наиболее близок к штаммам эпидемического клона USA300; в восточных регионах России циркулируют близкородственные штаммы *S. aureus* СС1, возбудители пищевой инфекции, несущие комбинации генов этиологических факторов инфекции: энтеротоксинов А и В.

5. Посредством филогенетического анализа выявлены различные эволюционные пути развития геномов бактериофагов: а) полная консервативность нуклеотидной последовательности бактериофагов Sa1int-типа в геномах *S. aureus* СС15 и бактериофагов Sa3int-типа в геномах *S. aureus* СС30; б) мозаицизм нуклеотидной последовательности бактериофагов Sa1int-типа в геномах *S. aureus* СС8 и СС121, и бактериофагов Sa3int-типа в геномах *S. aureus* СС1, СС5 и СС12.

6. Создана коллекция из 14 референсных штаммов *S. aureus*, возбудителей токсикоинфекций, семи разных клональных комплексов, выделенных в различных географических зонах; штаммы коллекции охарактеризованы методами фенотипического

анализа, иммуноферментного анализа, полногеномного секвенирования и биоинформатического анализа; штаммы коллекции могут быть использованы как стандартные при расследовании вспышек токсикоинфекций *S. aureus* в РФ.

Рекомендации по использованию результатов диссертационного исследования

1. Разработанный алгоритм экспресс-анализа рекомендуется использовать для идентификации и типирования изолятов *S. aureus*, выделяемых при вспышках пищевой инфекции и эксфолиативного дерматита новорождённых в клинических лабораториях.
2. Полногеномные последовательности референсных штаммов *S. aureus* из коллекции ГНЦ ПМБ предназначены для использования при сравнительном анализе геномов *S. aureus*.
3. Созданная коллекция референсных штаммов *S. aureus* может быть использована при сравнительном анализе со штаммами *S. aureus* из других коллекций, при изучении вирулентности штаммов *S. aureus*, при разработке диагностических систем.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

А. Статьи в реферируемых научных журналах

1. Абаев, И.В. Генотипирование изолятов *Staphylococcus aureus*, выделенных при вспышке эксфолиативного дерматита новорождённых / 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. Scopus, РИНЦ, IF = 1,904, Цит. = 1.
2. Онищенко, Г.Г. Молекулярно-генетическая идентификация штамма *Staphylococcus aureus* – возбудителя пищевой токсикоинфекции при вспышке в Санкт-Петербурге в 2013 г. / Г.Г. Онищенко, И.В. Абаев, И.А. Дятлов, **Ю.П. Скрябин**, О.В. Коробова, П.В. Соловьёв, А.Г. Богун // Вестн. Рос. Акад. Мед. Наук. – 2014. – Т. 9-10. – С. 33-38. Scopus, РИНЦ, IF = 1,499, Цит. = 5.
3. Abaev, I. Draft Genome Sequences of Exfoliative Toxin A-Producing *Staphylococcus aureus* Strains B-7772 and B-7777 (CC8/ST2993) and B-7774 (CC15/ST2126), Isolated in a Maternity Hospital in the Central Federal District of Russia / I. Abaev, **Y. Skryabin**, A. Kislichkina, A. Bogun, O. Korobova, N. Mayskaya, I. Shemyakin, I. Dyatlov // Genome Announc. – 2016. – Vol 4, N 2. Web of Science, Scopus, РИНЦ, IF = 0,89, Цит. = 3.
4. Абаев, И.В. Геномный анализ штаммов *Staphylococcus aureus* клональной линии 30 – возбудителей пищевой инфекции в Российской Федерации / И.В. Абаев, **Ю.П. Скрябин**, А.А. Кисличкина, О.В. Коробова, И.П. Мицевич, Т.Н. Мухина, А.Г. Богун, И.А. Дятлов // Вестн. Рос. Акад. Мед. Наук. – 2017. – № 5, Т 72. – С. 346-354. Scopus, РИНЦ, IF = 1,499, Цит. = 3.
5. Abaev, I. Draft Genome Sequences of Eight *Staphylococcus aureus* Strains Isolated during Foodborne Outbreaks / I. Abaev, **Y. Skryabin**, A. Kislichkina, A. Bogun, O. Korobova, I. Dyatlov // Genome Announcements. – Feb, 2018. – 6(5). Web of Science, Scopus, РИНЦ, IF = 0,89, Цит. = 1.
6. Абаев, И.В. Сравнение гемолитической активности и генов гемолитических токсинов клинических штаммов *Staphylococcus aureus*, изолированных на территории РФ. / И.В. Абаев, **Ю.П. Скрябин**, О.В. Коробова, О.В. Полосенко, А.П. Шепелин // Клин. Лаб. Диагн. – 2019. – Т. 64, №. 5. – С. 294-298. Scopus, РИНЦ IF = 0,544, Цит. = 0.

Б. Зарегистрированные базы данных

1. Абаев, И.В. Клинические штаммы *Staphylococcus aureus*, выделенные в центральном регионе России / И.В. Абаев, **Ю.П. Скрябин**, И.Г. Говорунов // База данных № 2019620329 от 27.02.2019 г.

В. Тезисы всероссийских и международных научных конференций

1. **Skryabin, Y**. Relationship between evolution of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and internal structure of variable-number tandem repeat regions / **Y. Skryabin**, I. Abaev, I. Dyatlov, D. Donovan // Materials of the 24th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, Barcelona, Spain, 10-13 May 2014 г. – eP163. – ePoster Presentation.

2. **Скрябин, Ю.П.** Сравнительная характеристика штаммов *S. aureus*, возбудителей стафилодермии новорожденных / **Ю.П. Скрябин**, О.В. Коробова, И.В. Абаев, Э.А. Светоч // Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. – 2014. – Т. 16, № 2, прил. 1 – С. 36.
3. **Skryabin, Y.** Niche expansion of *Staphylococcus aureus* clonal complex 8 by the acquisition of exfoliative toxin A gene / **Y. Skryabin**, I. Abaev, O. Korobova, A. Bogun, N. Mayskaya, I. Dyatlov // Materials of the 25th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, Copenhagen, Denmark, 25-28 April 2015 г. – EV0876 – ePoster Presentation.
4. Абаев, И.В. Характеристика штаммов *Staphylococcus aureus* – возбудителей пищевых токсикоинфекций и стафилодермии новорожденных, изолированных в России в 2012-2014 гг. / И.В. Абаев, **Ю.П. Скрябин**, О.В. Коробова, И.А. Дятлов // Проблемы медицинской микологии. – 2015. – Т. 17, № 2. – С. 32.
5. Абаев, И.В. Геномный анализ продуцирующих эксфолиативный токсин А штаммов *Staphylococcus aureus* B-7772 и B-7777 (CC8/ST2993) и B-7774 (CC15/ST2126), ассоциированных со стафилодермией новорожденных / И.В. Абаев, **Ю.П. Скрябин** // Проблемы медицинской микологии. – 2016. – Т. 18, № 2. – С. 32.
6. Абаев, И.В. Геномный анализ ETA-конвертирующих бактериофагов *Staphylococcus aureus* phiB-7772 и phiB-7774 / И.В. Абаев, **Ю.П. Скрябин**, И.А. Дятлов // Бактериофаги: теоретические и практические аспекты применения в медицине, ветеринарии и пищевой промышленности: материалы 3-й научно-практической конференции с международным участием. – Москва: Медицинское маркетинговое агентство. – 2016. – С. 5.
7. Абаев, И.В. Геномный анализ штаммов *Staphylococcus aureus*, возбудителей вспышек пищевых инфекций в Российской Федерации в 2013-2015 годах / И.В. Абаев, **Ю.П. Скрябин**, А.А. Кисличкина, О.В. Коробова, А.Г. Богун // Проблемы медицинской микологии. – 2017. – Т. 19, № 2. – С. 29.
8. **Скрябин, Ю.П.** Анализ генетических вариантов штамма *Staphylococcus aureus* генетической линии CC1, возбудителя вспышки пищевой инфекции в Якутске в 2015 г. / **Ю.П. Скрябин**, А.А. Кисличкина, О.В. Коробова, А.Г. Богун, И.В. Абаев // Проблемы медицинской микологии. – 2017. – Т. 19, № 2. – С. 136.
9. Абаев, И.В. Молекулярно-эпидемиологические особенности штаммов *Staphylococcus aureus* с точки зрения расследования вспышек стафилококковых инфекций / И.В. Абаев, **Ю.П. Скрябин** // Обеспечение эпидемиологического благополучия: вызовы и решения. Материалы XI съезда Всероссийского научно-практического общества эпидемиологов, микробиологов и паразитологов. – Москва. – 2017. – С. 90.
10. Скрябин, Ю.П. Методы диагностики штаммов *Staphylococcus aureus* при расследовании вспышек инфекции кожных покровов детей первых месяцев жизни / Ю.П. Скрябин, О.В. Коробова, И.П. Мицевич, И.В. Абаев // Обеспечение эпидемиологического благополучия: вызовы и решения. Материалы XI съезда Всероссийского научно-практического общества эпидемиологов, микробиологов и паразитологов. – Москва. – 2017. – С. 473.
11. Абаев, И.В. Молекулярно-эпидемиологическая характеристика изолятов *Staphylococcus aureus*, возбудителей эксфолиативного дерматита новорожденных в Российской Федерации / И.В. Абаев, **Ю.П. Скрябин**, А.А. Кисличкина, О.В. Коробова, А.Г. Богун, И.А. Дятлов // Проблемы медицинской микологии. – 2018. – Т. 20, № 2. – С. 45.
12. **Скрябин, Ю.П.** Сравнительный анализ ETA-конвертирующих бактериофагов в геномах штаммов *Staphylococcus aureus*, возбудителей эксфолиативного дерматита новорождённых в России / **Ю.П. Скрябин**, А.А. Кисличкина, О.В. Коробова, А.Г. Богун, И.В. Абаев, И.А. Дятлов // Проблемы медицинской микологии. – 2018. – Т. 20, № 2. – С. 113.
13. Абаев, И.В. Роль генотипирования *Staphylococcus aureus* при расследовании вспышек стафилококковых инфекций / И.В. Абаев, **Ю.П. Скрябин**, И.А. Дятлов // Материалы IV Национального конгресса бактериологов и Международного симпозиума «Микроорганизмы и биосфера «Microbios-2018». – Омск. – 2018. – С. 5.
14. **Скрябин, Ю.П.** Идентификация факторов патогенности в клинике и эпидемиологии *Staphylococcus aureus* / **Ю.П. Скрябин**, О.В. Коробова, И.В. Абаев, И.А. Дятлов // Материалы IV Национального конгресса бактериологов и Международного симпозиума «Микроорганизмы и биосфера «Microbios-2018». – Омск. – 2018. – С. 64.

15. Абаев, И.В. Сравнительный анализ конвертирующих профагов семейства Siphoviridae в геномах штаммов *Staphylococcus aureus*, изолированных при вспышках стафилококковых инфекций в России / И.В. Абаев, **Ю.П. Скрябин**, А.А. Кисличкина, О.В. Коробова, А.Г. Богун, И.А. Дятлов // Бактериофаги: теоретические и практические аспекты применения в медицине, ветеринарии и пищевой промышленности: Материалы Четвертой научно-практической конференции с международным участием. – Нижний Новгород – 2018. – С. 7.
16. Абаев, И.В. Молекулярно-эпидемиологическая характеристика штаммов *Staphylococcus aureus*, возбудителей стафилококковых токсикоинфекций в Российской Федерации / И.В. Абаев, **Ю.П. Скрябин**, И.А. Дятлов // Проблемы медицинской микологии. – 2019. – Т. 21, № 2. – С. 32.
17. Абаев, И.В. Сравнение гемолитической активности и геномной структуры штаммов *Staphylococcus aureus*, возбудителей стафилококковых инфекций на территории России / И.В. Абаев, **Ю.П. Скрябин**, О.В. Коробова, И.А. Дятлов // Проблемы медицинской микологии. – 2019. – Т. 21, № 2. – С. 32.
18. **Скрябин, Ю.П.** Вспышки стафилококковых токсикоинфекций в России: роль конвертирующих профагов семейства Siphoviridae / **Ю.П. Скрябин**, И.В. Абаев, И.А. Дятлов // Проблемы медицинской микологии. – 2019. – Т. 21, № 2. – С. 129.
19. Abaev, I. Exfoliative toxin A-producing *Staphylococcus aureus* clonal complex 8 strains causing staphylococcal scalded skin syndrome in newborns / I. Abaev, **Y. Skryabin**, N. Fursova, I. Dyatlov // Materials of the 30th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, Paris, France, 18-21 April 2020 г. – Abstract Book 2020 – 2020. – P. 2289
20. Абаев, И.В. Геномные различия и вирулентные свойства штаммов *Staphylococcus aureus* − возбудителей эксфолиативного дерматита новорождённых / И.В. Абаев, М.В. Фурсов, О.В. Коробова, **Ю.П. Скрябин**, А.И. Борзилов, И.А. Дятлов // Проблемы медицинской микологии. – 2020. – Т. 22, № 3. – С. 43.

Перечень сокращений

MRSA – метициллин-резистентный *Staphylococcus aureus*.
MSSA – метициллин-чувствительный *Staphylococcus aureus*.
ET – эксфолиативный токсин.
ETA – эксфолиативный токсин A.
ETB – эксфолиативный токсин B.
SEA – энтеротоксин A.
SEB – энтеротоксин B.
CC – клональный комплекс.
МГЭ – мобильный генетический элемент.
ПЦР – полимеразная цепная реакция.
coa-ПЦР-ПДРФ – полиморфизм длин рестрикционных фрагментов вариабельного участка гена коагулазы.
MLST – мультилокусное сиквенс-типирование.
SNP – единичная нуклеотидная замена.