

Федеральное бюджетное учреждение науки «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека

На правах рукописи

Скрябин Юрий Павлович

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

03.02.03 – микробиология

Диссертация
на соискание учёной степени
кандидата биологических наук

Научный руководитель:

к.м.н. И.В. Абаев

Оболенск – 2021

СОДЕРЖАНИЕ

СОДЕРЖАНИЕ	2
ВВЕДЕНИЕ	4
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	13
1.1 Характеристика <i>Staphylococcus aureus</i>	13
1.2 Генетическая характеристика <i>Staphylococcus aureus</i>	14
1.3. Генотипирование <i>S. aureus</i>	22
1.4. Стафилококковые энтеротоксины и пищевая инфекция	27
1.5. Эксфолиативные токсины и эксфолиативный дерматит новорождённых ...	38
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ	43
2.1. Штаммы <i>S. aureus</i> , использованные в работе	43
2.2. Условия культивирования.....	43
2.3. Видовая идентификация микроорганизмов	43
2.4. Выделение ДНК.....	44
2.4.1. Приготовление лизатов для ПЦР	44
2.4.2. Выделение тотальной ДНК для полногеномного секвенирования	44
2.5. Полимеразная цепная реакция.....	45
2.6. Проведение электрофореза в агарозном геле и регистрация результатов	45
2.7. Анализ полиморфизма длин рестрикционных фрагментов амплифицированных продуктов гена коагулазы.....	46
2.8. Генотипирование штаммов <i>S. aureus</i>	47
2.9. Определение продукции энтеротоксинов.....	48
2.10. Полногеномное секвенирование	49
2.11. Биоинформатический анализ	50

ГЛАВА 3. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ	52
РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ	52
3.1. Разработка алгоритма экспресс-анализа изолятов <i>S. aureus</i> при расследовании вспышек пищевой инфекции и эксфолиативного дерматита новорождённых	52
3.2. Идентификация и анализ циркулирующих на территории РФ штаммов <i>S. aureus</i> – возбудителей пищевой инфекции	57
3.3. Идентификация и анализ циркулирующих на территории РФ штаммов <i>S. aureus</i> – возбудителей эксфолиативного дерматита новорождённых.....	67
3.4. Полногеномный сравнительный анализ штаммов <i>S. aureus</i> – возбудителей вспышек пищевой инфекции	74
3.4.1. Анализ последовательностей SEA-конвертирующих бактериофагов <i>Staphylococcus aureus</i>	82
3.5. Полногеномный сравнительный анализ штаммов <i>S. aureus</i> , возбудителей вспышек эксфолиативного дерматита новорождённых.....	86
3.5.1. Сравнительный анализ последовательностей ETA-конвертирующих бактериофагов <i>Staphylococcus aureus</i>	94
3.6. Создание коллекции референсных штаммов <i>S. aureus</i> – возбудителей пищевой инфекции и эксфолиативного дерматита новорожденных в РФ	102
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	104
ВЫВОДЫ	108
РЕКОМЕНДАЦИИ ПО ИСПОЛЬЗОВАНИЮ РЕЗУЛЬТАТОВ ДИССЕРТАЦИОННОГО ИССЛЕДОВАНИЯ	109
ПЕРЕЧЕНЬ СОКРАЩЕНИЙ	110
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ	111
СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ	141

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность исследования. *Staphylococcus aureus* – это один из ведущих возбудителей как внутрибольничных, так и внебольничных инфекций человека [169]. *S. aureus* вызывает самые разные по форме и тяжести заболевания: от лёгких кожных до тяжёлых форм пневмонии, менингита, эндокардита и др. [171]. Золотистый стафилококк входит в группу «ESKAPE» патогенов (*Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, и *Enterobacter spp*), для которых характерна устойчивость к широкому спектру антибактериальных препаратов [34]. Одной из острых проблем клинической микробиологии является борьба с метициллинрезистентными штаммами *S. aureus* (MRSA), которые часто устойчивы не только к бета-лактамам, включая метициллин, но и к другим группам антибактериальных препаратов. Тем не менее, несмотря на трудность лечения MRSA-инфекций, следует заметить, что смертность от инфекций, вызываемых метициллинчувствительными штаммами *S. aureus* (MSSA) нередко бывает значительно выше, чем от MRSA-инфекций [232]. Массовые вспышки стафилококковых заболеваний, как правило, вызываются MSSA [116].

Одной из наиболее часто встречающихся эпидемически важных форм стафилококковых заболеваний, являются пищевые инфекции, которые регистрируются как в виде спорадических случаев, так и в виде эпидемических вспышек [108, 201]. Клинические симптомы стафилококковой пищевой инфекции развиваются очень быстро, течение болезни может приобретать различную степень тяжести: от лёгкой до тяжёлой. Наибольшей опасности при этом подвергаются люди старшего возраста и дети [150]. Факторами, обуславливающими специфическую клиническую картину и патогенез пищевой инфекции, являются энтеротоксины, для которых характерны высокая стабильность в условиях окружающей среды и способность сохранять физиологическую активность в желудочно-кишечном тракте человека [170]. Энтеротоксины обладают свойствами суперантигенов и способны вызывать

неспецифическую пролиферацию Т-лимфоцитов [131]. В настоящее время известно 9 типов энтеротоксинов и 11 типов энтеротоксин-подобных белков. У последних либо не была проверена, либо не обнаружена эметическая активность [131, 15]. Чаще всего возбудители пищевой инфекции продуцируют энтеротоксины типов А и В, гены которых входят в состав мобильных генетических элементов (МГЭ) [15]. В частности, ген энтеротоксина А локализуется на бактериофагах, а ген энтеротоксина В – на плазидах [170]. Показано, что вспышки пищевой инфекции чаще всего ассоциированы со штаммами *S. aureus*, принадлежащими к определённым клональным комплексам (clonal complex, CC), которые могут различаться в разных странах. Так, в Испании вспышки пищевой инфекции связаны, в основном, с *S. aureus* клональных комплексов CC5, CC30 и CC45 [16, 43]. В Японии наиболее часто выделяют штаммы *S. aureus*, принадлежащие CC45 и CC81, реже – к клональным комплексам CC8, CC6 и CC5 [201, 187, 43]. В Китае вспышки пищевой инфекции чаще всего вызывают штаммы *S. aureus* CC1, CC5, CC6, CC7 и CC8 [226, 231, 43]. В России до последнего времени подобные исследования не проводились.

Другой клинически значимой нозологической формой стафилококковых заболеваний является эксфолиативный дерматит, который также известен как болезнь Риттера, синдром ошпаренной кожи и пузырчатка новорождённых. Как правило, эксфолиативный дерматит встречается у новорождённых, но может поражать и людей старшего возраста, у которых болезнь протекает с большими осложнениями и может привести к гибели пациента [149, 53, 130]. Специфическая клиническая картина эксфолиативного дерматита возникает вследствие воздействия эксфолиативных токсинов (ЕТ), которые разрушают дейсмоглеин 1 в зернистом слое эпидермиса, вызывая, таким образом, его отслоение, что приводит к образованию пузырей на коже [130, 12]. К настоящему времени известно 4 типа эксфолиативных токсинов, но доказанную клиническую роль имеют только два из них: токсины А и В (ЕТА и ЕТВ) [90, 9]. Гены данных токсинов, как и гены энтеротоксинов, локализованы на МГЭ. Ген эксфолиативного токсина А (*eta*) находится на бактериофаге, ген эксфолиативного токсина В (*etb*) – на плазмиде. Интересно отметить, что в Европе, США и Африке около 80 % ЕТ-продуцирующих штаммов экспрессируют

ETA [90, 9, 56], в то время как в Японии преобладают ЕТВ-продуцирующие штаммы [114, 230]. Важно также заметить, что наиболее распространёнными ЕТА-продуцирующими штаммами *S. aureus* являются штаммы, относящиеся к клональным комплексам CC9, CC15, CC88 и CC121. Штаммы *S. aureus* CC121, в отличие от других клональных комплексов, могут кодировать *etb*, либо *eta* и *etb* одновременно [182, 121]. Во Франции, Японии и Чехии преобладающим клональным комплексом среди возбудителей эксфолиативного дерматита является CC121 [90, 121, 193]. Следующими по частоте распространённости среди возбудителей эксфолиативного дерматита в Европе являются CC15 и CC9 [182, 121]. В Японии второе и третье места после CC121 по частоте встречаемости среди возбудителей эксфолиативного дерматита занимают уникальные метициллинрезистентные ЕТВ-продуцирующие штаммы *S. aureus* CC89 и CC91 [193, 87]. Данные о распространённости возбудителей эксфолиативного дерматита на территории Российской Федерации отсутствуют.

Степень разработанности темы исследования. Изучению генетики штаммов *S. aureus*, способных вызывать пищевую инфекцию и эксфолиативный дерматит, посвящено множество работ исследователей Западной Европы и Японии [108, 201, 187, 230, 182, 121, 193, 87]. Благодаря этим работам были определены этиологические агенты пищевой инфекции и эксфолиативного дерматита и установлены основные клональные комплексы *S. aureus*, способные их вызывать. С накоплением данных о генетике возбудителей было выявлено, что специфика развития и тяжести данных инфекций зависят от клонального комплекса и набора МГЭ *S. aureus*, циркулирующих в том или ином географическом регионе [187, 226, 182, 121, 193].

В Российской Федерации методический уровень лабораторной диагностики не позволяет определять клональные группы выделяемых штаммов *S. aureus* и специфические гены их токсинов. Вследствие этого молекулярная эпидемиология возбудителей пищевой инфекции и эксфолиативного дерматита в Российской Федерации остаётся неизученной. Немногочисленные исследования *S. aureus* в России посвящены, в основном, генетике резистентности штаммов MRSA, в то время как

роль штаммов MSSA в развитии стафилококковых инфекций практически неизвестна [6]. Предлагаемый нами способ экономически дешёвого варианта экспресс-анализа, способного определять гены токсинов и основные клональные комплексы *S. aureus*, может позволить диагностическим лабораториям эффективно отслеживать возбудителей пищевых инфекций и эксфолиативного дерматита, циркулирующих в регионах Российской Федерации.

Данная работа посвящена изучению штаммов *S. aureus*, возбудителей эпидемических вспышек инфекций, зарегистрированных в Российской Федерации в период с 2012 по 2018 гг. Исследованы изоляты *S. aureus*, выделенные от заболевших при пищевых инфекциях и эксфолиативном дерматите, от носителей и родственников заболевших, а также выделенные из пищи и из смывов с объектов окружающей среды.

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 А и В: 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 В). 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 Пушкинского 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, изучали фенотипические и генетические особенности изолятов *S. aureus*, обеспечивающие проявление специфических клинических симптомов. В работе использовались микробиологические, иммунологические, молекулярно-генетические и биоинформационные методы исследований.

Положения, выносимые на защиту

1. Алгоритм экспресс-анализа изолятов *S. aureus*, основанный на методе *coa*-ПЦР-ПДРФ, 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, принадлежат к двум клональным комплексам: СС1 и СС30, и кодируют в различных комбинациях такие факторы патогенности, как энтеротоксины А и В, 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, принадлежат к трём клональным комплексам: в Европейском регионе России – ЕТА-продуцирующие штаммы клонального комплекса СС15 и СС8, в Восточном регионе России – штаммы клонального комплекса СС121, продуцирующие ЕТА и ЕТВ одновременно или один из них.

5. Впервые выявлена вспышка эксфолиативного дерматита новорождённых, обусловленная новым ЕТА-продуцирующим штаммом *S. aureus* клонального комплекса СС8, 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.

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 European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (Барселона, Испания, 10-13 мая 2014 г.); XVI Международном Конгрессе по антимикробной терапии МАКМАХ/ESCMID (Москва, 21-23 мая 2014 г.); 25th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (Копенгаген, Дания, 25-28 апреля 2015 г.); Всероссийской научно-практической конференции по медицинской микробиологии и клинической микологии (XVIII Кашкинские чтения) (Санкт-Петербург, 09-11 июня 2015 г.); Всероссийской научно-практической конференции по медицинской микробиологии и клинической микологии (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.); Российско-китайском конгрессе по медицинской микробиологии, эпидемиологии и клинической микологии (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.); Российско-Китайском конгрессе по медицинской микробиологии, эпидемиологии

и клинической микологии (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.); Российско-китайском конгрессе по медицинской микробиологии, эпидемиологии, клинической микологии и иммунологии (XXII Кашкинские чтения) (Санкт-Петербург, 12-15 июня 2019 г.), 30th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (Париж, Франция, 18-21 апреля 2020 г.); Российско-китайский конгресс по медицинской микробиологии, эпидемиологии, клинической микологии и иммунологии (XXII Кашкинские чтения) (Санкт-Петербург, 12-15 июня 2019 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. и к.м.н. Карцевым Н.Н.

Публикации

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

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Характеристика *Staphylococcus aureus*

Впервые бактерии рода *Staphylococcus* были обнаружены в 1878 г. при гнойной инфекции Робертом Кохом [32]. Позднее, Александр Огстон на Девятом Хирургическом Конгрессе в Берлине в 1880 г. доложил о результатах исследования «микрোকков» из гноя, выделенного при хирургических раневых инфекциях. В 1882 г. он назвал обнаруженную им бактерию «*Staphylococcus*» за характерное расположение клеток в виде гроздьев винограда [52, 44, 25]. В 1884 г. основные свойства стафилококков подробно описал Фридрих Юлиус Розенбах и дал видовое название *Staphylococcus aureus* [52, 25, 64].

В настоящее время в род *Staphylococcus* включено более 40 видов микроорганизмов, которые подразделяются на коагулазоположительные и коагулазоотрицательные в зависимости от наличия плазмакоагулазы. Патогенными для человека являются коагулазоположительный микроорганизм *Staphylococcus aureus*, а также коагулазоотрицательные виды – *S. epidermidis*, *S. haemolyticus*, *S. hominis*, *S. capitis*, *S. warneri*, *S. simulans* и некоторые другие [25]. Наибольшим медицинским значением обладает *S. aureus*.

Золотистые стафилококки являются факультативными анаэробами. При окраске по Граму – грамположительны, сферической или околосферической формы диаметром 0,7-1,0 микрометра, располагающиеся парами или небольшими группами в виде гроздьев винограда, не имеют жгутиков и не образуют споры [52]. Оптимум температуры роста 30-37° С, но способны расти при 7-48° С. Оптимум значения рН для роста 6-7, могут выживать в диапазоне значений 4-10. Отличительной особенностью является способность выдерживать до 25 % NaCl, что часто используется при диагностике *S. aureus*. Всё это способствует выживанию и росту *S. aureus* в широком спектре условий окружающей среды, а также персистировать в неблагоприятных условиях среды [212].

Staphylococcus aureus распространен по всему миру [75]. Штаммы *S. aureus* возможно обнаружить практически в любом лечебном учреждении [76]. Бессимптомное носительство в носовой полости среди здорового населения составляет около от 20 до 70 % для различных контингентов здорового населения [113], в то время как носительство в кишечнике составляет около 20 % [1].

Staphylococcus aureus уникальный микроорганизм, способный поражать различные системы и органы, вызывая более 100 нозологических форм заболеваний [171]. В своем геноме может кодировать большое число факторов патогенности: факторы агглютинации А и В (ClfA, ClfB); белок, связанный с формированием биопленок (Var); фибронектин связывающие белки А и В (FnBPA, FnBPB); коллаген связывающий белок (Cna); железо регулируемые поверхностные детерминанты А и В (Isd A, Isd B); плазмакоагулаза (Coa); белок А (Spa); внутриклеточные адгезины оперонов *ica* (*icaA*, *icaB*, *icaC* и *icaD*); энтеротоксины (SE); эксфолиативные токсины А и В (ETA, ETB); лейкоцидин Пантон-Валентайна (PVL) и лейкоцидин ED (LukED); гемолизины (α , β и γ) и токсин синдрома токсического шока (TSST-1) [171, 21, 31, 74, 119, 145, 174]. Большинство факторов патогенности *S. aureus* располагаются на мобильных генетических элементах (МГЭ), к которым относятся плазмиды, бактериофаги, острова патогенности, транспозоны и другие элементы [10]. Такое количество разнообразных МГЭ может говорить о пластичности *S. aureus*, благодаря которой патоген способен приспосабливаться к различным воздействиям внешней среды и занимать различные экологические ниши.

1.2 Генетическая характеристика *Staphylococcus aureus*

Размер генома *Staphylococcus aureus* составляет от 2,7 до 3,2 миллионов пар нуклеотидов [88, 46]. Совокупность генов из известных геномов *S. aureus*, составляет пан-геном вида (Рисунок 1.1), который включает в себя «коровый геном» (от англ. core – ядро, основной), включающий гены, представленные во всех штаммах вида и кодирует функции, необходимые для базовой жизнедеятельности

клетки; и дополнительный геном, который включает в себя хромосомные гены, представленные в части штаммов *S. aureus*, в том числе «мобильный геном», включающий в себя мобильные генетические элементы (МГЭ), такие как профаги, плазмиды, острова патогенности, транспозоны и IS-последовательности [10, 33], способные нести гены, кодирующие факторы вирулентности и/или детерминанты устойчивости, а также гены, ответственные за передачу МГЭ и их интеграцию в хромосому хозяина [71].

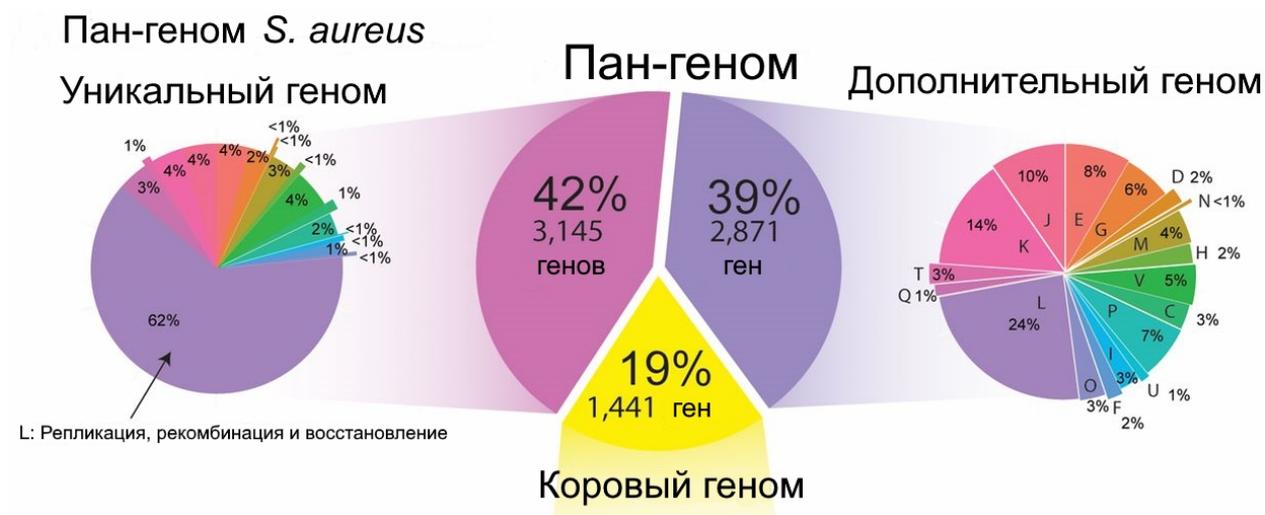


Рисунок 1.1 – Статистика пан-генома *S. aureus*. Пан-геном *S. aureus* может быть подразделён на три категории: «коровый геном» (набор генов, присутствующий во всех геномах вида), вспомогательный геном (набор генов, представленный не во всех геномах вида) и уникальный геном (гены, уникальные для одного генома) [33]

«Коровый геном»

«Коровый геном» *S. aureus* составляет примерно 56 % ДНК [33], что выше, чем у большинства других видов. Например, коровый геном *Clostridium difficile* составляет 25 %, а *Escherichia coli* – 40 % [65, 173, 189]. Большинство генов «корового генома» кодируют белки «домашнего хозяйства», обеспечивающие транскрипцию, трансляцию, формирование рибосомальных структур и биогенез, синтез РНК и её модификацию, обеспечение метаболических путей и синтез структурных компонентов клетки. «Коровый геном» *S. aureus* консервативен, эволюция происходит за счёт простых нуклеотидных замен и, гораздо реже,

рекомбинационных событий, что говорит о том, что данный вид является высоко клональным [65, 66]. Более консервативен «коровый геном» у *H. pylori*. Большинство же бактериальных видов эволюционирует с преобладанием рекомбинационных событий, что хорошо видно на рисунке 1.2, такие виды называются панмиксивными.

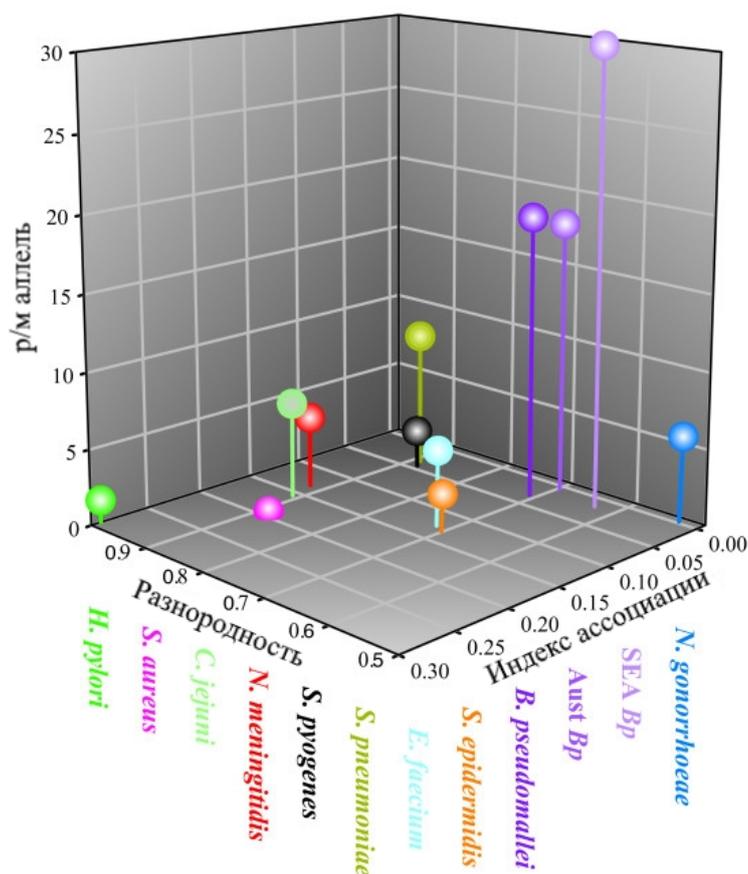


Рисунок 1.2 – Сравнение показателей изменчивости популяций 11 бактериальных видов. Отношение частоты рекомбинаций к частоте мутаций на аллель (р/м аллель) показывает, что аллели *S. aureus*, в основном, образуются за счёт единичных мутаций, а не рекомбинаций. Стандартизованный индекс ассоциации показывает, к каким популяционным типам ближе микроорганизм: чем меньше значение, тем более панмиксивной является популяция. Индекс разнородности показывает, насколько разнообразны виды [168]

Таким образом, геном *S. aureus* имеет строгую клональную структуру, вариабельность которой обеспечивается за счёт единичных нуклеотидных замен,

небольших хромосомных рекомбинаций, включающих несколько десятков нуклеотидов, и, намного реже, крупных геномных рекомбинаций, включающих тысячи нуклеотидов. Благодаря этому, штаммы *S. aureus* смогли распространиться по всему миру и занять самые разнообразные экологические ниши, что говорит об их достаточно высоком уровне адаптации к условиям окружающей среды.

Дополнительный геном

Дополнительный геном включает в себя набор генов, благодаря которым увеличивается разнообразие вида и адаптация к различным условиям окружающей среды. В состав дополнительного генома входят хромосомные гены, представленные в части штаммов *S. aureus*, и «мобильный геном», включающий мобильные генетические элементы (МГЭ), различающиеся у разных клональных комплексов. Происхождение хромосомных генов дополнительного генома часто установить не удаётся. Предполагается, что это могут быть дефектные бактериофаги, дублицированные гены и т. д. Совокупность всех МГЭ в геноме называют «мобиломом» [195]. В состав МГЭ входят профаги, плазмиды, острова патогенности, транспозоны и IS-последовательности [10, 33], способные нести гены, кодирующие факторы вирулентности и/или детерминанты устойчивости, а также гены, ответственные за передачу МГЭ и их интеграцию в хромосому хозяина [71]. МГЭ играют важную роль в пластичности геномов бактерий, облегчая их адаптацию к воздействиям окружающей среды [79, 133].

По разным данным, от 15 до 24 % генома *S. aureus* приходится на мобильные генетические элементы [10, 33]. Дополнительный геном *S. aureus* включает также гены, обеспечивающие аминокислотный обмен, транспорт ионов, обмен углеводов [33]. Разнообразие генов, входящих в мобильный геном, способствуют выживанию штаммов *S. aureus* и распространению их в различных экологических нишах.

Плазмиды

Одной из наиболее важных составных частей МГЭ являются плазмиды, которые представляют собой небольшие самореплицирующиеся молекулы ДНК, способные самостоятельно автономно существовать в клетке подходящего хозяина. Плазмиды способны передавать детерминанты устойчивости и

вирулентности от одной бактерии к другой (иногда даже другого вида) с помощью горизонтального переноса генов. Большинство штаммов *S. aureus* содержат одну или более плазмид размерами от 1 до 60 тпн (тысяч пар нуклеотидов) [148]. Плазмиды *S. aureus* разделяют на три класса. В класс I входят небольшие (от 1,3 до 4,6 тпн) многокопийные (10-55 копий в клетке) плазмиды, несущие одну, реже две, детерминанты устойчивости (pT181, pC194, pSN2 и pE194). Плазмиды II класса имеют большие размеры (от 15 до 46 тпн) и в клетке находятся в меньшем количестве (4-6 на клетку). Эта группа включает большинство плазмид с устойчивостью к пенициллинам и аминогликозидам/триметопримам (например, pSK 1 и pIP630). Плазмиды III класса, это большие конъюгативные плазмиды (от 30 до 60 тпн), большинство из них несут целый набор детерминант устойчивости к антибактериальным препаратам. В эту группу входят плазмиды устойчивости к аминогликозидам (pGO1, pG0400, и pCRG1600). Они могут включать один или два транспозона и множество копий инсерционных последовательностей [148, 192].

Плазмиды *S. aureus* переносят не только гены устойчивости к антибактериальным препаратам, но и гены токсинов, что позволяет им адаптироваться к условиям внешней среды, расширяя ареал обитания.

Плазмиды II класса способны переносить гены энтеротоксинов и эксфолиативных токсинов. Первой открытой плазмидой, несущей ген энтеротоксина, является плазида pIB485, в составе которой обнаружен ген энтеротоксина D [24]. Впервые описанной плазмидой, несущей ген эксфолиативного токсина, является плазида pRW001, кодирующая ген эксфолиативного токсина B [100]. В настоящее время известно шесть генов энтеротоксинов и один ген эксфолиативного токсина, которые переносятся с помощью плазмид [15, 10].

Транспозоны

Транспозоны, это МГЭ, фланкированные инсерционными последовательностями. Инсерционные последовательности представляют собой мобильный элемент, который несёт информацию, необходимую для перемещения. Сами инсерционные последовательности не несут детерминант вирулентности, но

ответственны за рекомбинацию и стабилизацию транспозонов в составе хромосомной ДНК. Транспозоны способны переносить некоторые гены устойчивости, например, Tn554 несёт гены устойчивости к эритромицину, спектиномицину, макролидам, линкозамидам и стрептограмину В. Множество копий этих элементов может быть интегрировано в стафилококковую хромосомную кассету, плазмиду или в хромосому [132, 182]. Также часто транспозоны выполняют роль регуляторных факторов в геноме *S. aureus*, так как они могут изменять экспрессию хромосомных генов [148], в том числе инактивировать их [152].

Профаги

Интегрированные в хромосому бактериальной клетки бактериофаги называют профагами. Они активно участвуют в горизонтальной передаче генов и играют важную роль в бактериальной эволюции и адаптации [77]. Фаги *S. aureus* с двухцепочечной ДНК образуют три группы: литические, умеренные и хронические. Все они относятся к порядку Caudovirales (хвостатые фаги) и разделяются на три семейства: Podoviridae, куда входят литические и хронические фаги; Myoviridae, также включающее литические и хронические фаги; и Siphoviridae, куда входят умеренные бактериофаги, способные жить очень долго в хозяйской клетке, превращаясь в профагов и интегрируя свою ДНК в хромосому хозяина [141, 72]. Вирулентные фаги, которые входят в семейства Myoviridae и Podoviridae, используются для фаготерапии при стафилококковых инфекциях и для защиты пищевых продуктов [154]. По размерам стафилококковые бактериофаги разделяют на три группы: I класса (размер генома от 16 до 20 тпн), II класса (от 35 до 40 тпн) и III класса (от 120 до более 140 тпн) [59, 118]. Бактериофаги семейства Podoviridae относятся к первому классу, Siphoviridae и Myoviridae – ко второму и третьему соответственно [118].

Большая часть умеренных стафилококковых бактериофагов относятся к семейству Siphoviridae. Геномы бактериофагов данного семейства функционально можно разбить на 6 регионов: лизогенный, метаболизма ДНК (репликация и регуляция), упаковки, капсида, хвоста и лизиса клетки хозяина [73, 225]. Одной из

ключевых особенностей устройства геномов бактериофагов является мозаицизм, что приводит к большому разнообразию бактериофагов и осложняет их классификацию [73, 35, 38]. Лизогенный модуль характерен только для умеренных бактериофагов, и наиболее важной его частью является ген интегразы. По гомологии нуклеотидных последовательностей генов интегразы стафилококковых профагов выделяют двенадцать типов интеграз [73].

Умеренные бактериофаги, способные интегрироваться в геном *S. aureus*, в подавляющем большинстве несут гены, кодирующие различные факторы вирулентности, такие как стафилокиназа, белки-ингибиторы хемотаксиса, стафилококковые ингибиторы комплемента, энтеротоксины, лейкоцидин Пантон-Валентайна и эксфолиативный токсин А [225, 38].

Острова патогенности

Острова патогенности – это МГЭ, локализованные в хромосомах большого числа бактериальных патогенов человека, животных и растений [79]. Острова патогенности рода *Staphylococcus* имеют размеры от 12 до 27 тпн и кодируют интегразу, гены устойчивости и вирулентности, а также другие факторы, облегчающие адаптацию бактерий к хозяину [141, 154, 155, 211]. К настоящему времени известно 23 типа островов патогенности *S. aureus* [154, 186, 217], которые встраиваются в специфичные сайты интеграции в строгой ориентации. Обычно острова патогенности содержат фагоподобные гены интегразы, репрессора и терминазы, но не содержат гены, кодирующие известные структурные белки, и стабильно существуют в хромосоме хозяина под контролем основного репрессора подобно профагам [210]. Гены островов патогенности очень важны в бактериальной эволюции и способны передаваться в горизонтальном направлении с очень высокой частотой при помощи специфических стафилококковых хелперных фагов [79, 147, 80]. Стафилококковые бактериофаги или индуцированные эндогенные профаги принимают участие в перемещении стафилококковых островов патогенности (например, фаги φ11, φ13, 80, 80α и не хелперные фаги, такие как 147 и 85) [154, 58, 139].

Геномные острова

Термином геномные острова (vSa) обозначают нефаговые и не-SCC геномные острова, которые присутствуют в геноме *S. aureus*, способны кодировать детерминанты вирулентности, встраиваться в специфические локусы в хромосоме и приобретаются при горизонтальной передаче генов [86, 62]. К настоящему моменту среди секвенированных штаммов *S. aureus* известно три семейства геномных островов [133, 72, 18, 99]. Эти три семейства названы vSa α , vSa β и vSa γ . Первый геномный остров несёт кластеры генов липопротеинов и энтеротоксин-подобных генов [131]. vSa β (или SaPIn3/m3) кодирует бактериоцин, энтеротоксины, гиалуронат лиазу и кластер генов сериновых протеаз [88, 18, 209]. Геномный остров vSa γ содержит гены, кодирующие фенол-растворимые модулины β -типа и кластер энтеротоксин-подобных генов, схожий с кластером *egc* в геномном острове vSa α [72]. Часто геномные острова фланкируются прямыми повторами длиной 16-20 пар нуклеотидов. По литературным данным, большинство геномных островов потеряли свою мобильность [106]. Тем не менее, по некоторым критериям геномные острова являются чужеродной ДНК, среди этих критериев обращают на себя внимание различия в последовательностях геномных островов и хозяйской ДНК, GC состав и частота специфических ди- и тринуклеотидов [93, 109, 124].

Стафилококковые хромосомные кассеты

Стафилококковыми хромосомными кассетами (SCC) называют относительно большие фрагменты ДНК, которые встраиваются в хромосому *S. aureus* в ген *orfX*. SCC могут кодировать детерминанты антибиотико-резистентности и/или вирулентности, и способны нести одну из основных детерминант устойчивости к широкому спектру бета-лактамов, кодируемую геном *mecA*. Таким образом, SCC обычно разделяют на две группы: SCC $_{mec}$ и не-SCC $_{mec}$ [10]. Все штаммы MRSA содержат SCC $_{mec}$. Предполагается, что приобретение SCC $_{mec}$ *S. aureus* могло произойти от *S. sciuri* [191]. Не-SCC $_{mec}$ содержат детерминанты вирулентности и адаптации/выживания. Также стафилококки могут нести SCC-подобные регионы, похожие на SCC, встраиваются в те же сайты интегрирования,

в которые встраиваются SCC, но отличаются тем, что не несут генов *ccr*. Они отличаются размерами, от маленьких, размером 0,1 тпн, до больших, размером около 34 тпн. Предложено называть такие элементы псевдо-SCC элементами (ψ SCC) [97].

1.3. Генотипирование *S. aureus*

Методы генетической характеристики *S. aureus*

Генетическая характеристика (генотипирование) осуществляется на основе последовательности ДНК. Генотипирование позволяет получать стабильные результаты, чем отличается от фенотипических методов, обладает большей чувствительностью и возможностями для стандартизации. Часть методов работает с коровым геномом: классический метод мультилокусного сиквенс-типирования (MLST), *coa*-типирование, *sra*-типирование и некоторые другие. Их главным достоинством является высокий уровень стандартизации [7]. Другая часть учитывает мобилом: пульс-электрофорез (PFGE), анализ множественных tandemных повторов (MLVA), типирование по хромосомной кассете *mec* (SCC*mec* типирование) и другие. Данные методы обладают повышенной дискриминирующей способностью, что актуально при расследовании локальных эпидемических вспышек инфекций [7].

Мультилокусное сиквенс-типирование (MLST – MultiLocus Sequence Typing) основано на определении нуклеотидной последовательности семи генов «домашнего хозяйства»: карбаматкиназы (*arcC*), шикиматдегидрогеназы (*aroE*), глицеролкиназы (*glpF*), гуанилаткиназы (*gmk*), фосфатацетилтрансферазы (*pta*), триозофосфатизомеразы (*tpi*) и ацетилкоэнзим А ацетилтрансферазы (*yqiL*) [7, 63]. На каждый локус разработаны стандартные праймеры, с помощью которых нужные последовательности амплифицируются в ПЦР, после чего определяется нуклеотидная последовательность (секвенирование) [63]. Затем определяются аллели согласно инструкции на сайте pubmlst.org/saureus/, и из набора аллелей семи генов определяется сиквенс-тип (ST – Sequence Type). Если пять генов из семи

идентичны, штаммы с разными ST объединяют в клональные комплексы (CC – Clonal Complex). Огромным преимуществом MLST является стандартизованная база данных, позволяющая сравнивать данные по всему миру. К недостаткам метода можно отнести его трудоемкость [84].

Spa-типирование основано на секвенировании переменного участка гена стафилококкового белка А (региона X). Тандемные повторы (повторы последовательностей ДНК из нескольких пар нуклеотидов, следующие друг за другом) в регионе X, как правило, длиной 24 пары нуклеотидов [70]. Вариабельность данного региона заключается в точковых мутациях в повторах и в изменении числа повторов. Главным достоинством этого метода является секвенирование одного участка. Полученная последовательность используется для определения количества и типа повторов, что позволяет определить с помощью сервера Ridom SpaServer (<https://spa.ridom.de/>) *spa*-тип. Дискриминирующая способность находится на уровне между PFGE и MLST [84].

Coa-типирование основано на амплификации переменного участка гена коагулазы с последующей рестрикцией продукта реакции ферментом AluI (*coa*-ПЦР-ПДРФ) [92]. Подобно гену *spa*, в гене *coa* переменный участок состоит из тандемных повторов, длиной 81 пн [98]. В зависимости от типа и количества тандемных повторов, при проведении рестрикции исходный продукт расщепляется на паттерны строго определённой длины. Это простой и доступный метод, который широко применялся до распространения секвенирования. Предлагались методы *coa*-типирования, основанные на секвенировании, но они не получили широкого распространения [129, 112, 221, 222].

Пульс-электрофорез (PFGE – Pulsed Field Gel Electrophoresis, электрофорез в пульсирующем поле) до сих пор считается золотым стандартом для молекулярно-генетических методов типирования *S. aureus*. Данный метод основан на расщеплении хромосомной ДНК рестриктазами (для *S. aureus* это SmaI), которые распознают небольшое число сайтов на хромосоме, в результате чего образуется лишь несколько крупных фрагментов ДНК, которые невозможно проанализировать с помощью обычного электрофореза. Для анализа используют

специальное оборудование, которое позволяет разделять крупные фрагменты ДНК. Главными недостатками являются сложность в интерпретации результатов и необходимость ведения референсной коллекции штаммов. Данный метод обладает очень высокой дискриминирующей способностью, но в настоящее время он уступает место другим методам типирования [208].

Мультилокусный анализ тандемных повторов с переменным числом звеньев (Multilocus variable number tandem repeat (VNTR) analysis – MLVA). Этот метод основан на амплификации переменных участков ДНК, содержащих тандемные повторы. Такие участки часто реплицируются с ошибками, что приводит к изменению числа тандемных повторов. Эти изменения возможно оценить ПЦР с фланкирующими праймерами (отжигаются на консервативной части ДНК) и последующим измерением длины амплифицированного продукта. В настоящее время для MLVA типирования *S. aureus* используются два способа. Первый способ разработан Sabat, второй разработан Hardy и развит Ikawaty [83, 96, 183]. Основное различие в способах состоит в том, что для первого метода используются тандемные повторы, находящиеся в генах, а для второго используются повторы, располагающиеся в межгенном пространстве. Данный метод обладает хорошей разрешающей способностью [7].

SCCmec типирование возможно только для метициллин-резистентных штаммов *S. aureus*, несущих стафилококковую хромосомную кассету (SCC) с геном устойчивости к метициллину (*mec*). Типирование происходит по трём участкам: *mec*-комплекса, *scg*-комплекса и J-регионам. Комплекс *mec* состоит из гена *mecA*, одного или нескольких инсерционных последовательностей и регуляторных генов *mecR1* и *mecI*. Комплекс *scg* кодирует гены рекомбиназ, обеспечивающих вырезание и интегрирование кассеты. Остальная часть кассеты представлена тремя J-регионами. По комбинациям типов *mec*-комплекса и *scg*-комплекса определяют тип SCCmec кассеты, по J-регионам определяют подтипы [42, 115, 135, 146, 157, 213]. Данный метод основан на ПЦР и ограничен только метициллин-резистентными штаммами *S. aureus*.

Типирование по открытым рамкам считывания, связанным с фагами (PDORF – phage-derived open reading frame typing), основано на наличии или отсутствии 16 вариабельных элементов в геноме *S. aureus*: 13 из них локализованы в профагах, один в геномном острове и два в кассете SCCmec [200]. Данный метод основан на четырёх четырёх-плексных ПЦР с дальнейшей детекцией продуктов электрофорезом. Данный метод разработан для типирования MRSA и показал дискриминирующую способность на уровне PFGE, но не получил широкого распространения [7].

Dru-типирование использует прямые повторы (dru – direct repeat units), находящиеся в некодирующем регионе кассеты SCCmec. В зависимости от количества и состава повторов, получаемых при секвенировании амплифицированного продукта с фланкирующими праймерами, определяется dru-тип с помощью сайта dru-typing.org. Этот метод применим только для метициллин-резистентных штаммов, но позволяет типировать коагулазо-негативные стафилококки [151].

Типирование методом ПЦР с использованием специфичных праймеров

Для проверки наличия определённых генов используют ПЦР со специфичными праймерами. В настоящее время существует множество апробированных праймеров на наличие разных генов *S. aureus*. Наиболее простым способом применения ПЦР является идентификация. Также с помощью ПЦР можно определять гены токсинов (энтеротоксинов, токсина синдрома токсического шока, лейкоцидинов и т. д.), резистентности, адгезинов, регуляторов и других [226, 63, 115, 146]. Определяя клональные комплексы и наличие генов токсинов, можно определить опасные клоны штаммов *S. aureus*.

ПЦР часто используется в других методах как вспомогательный этап [63, 84, 92]. Одной из уникальных возможностей обладает ПЦР с обратной транскриптазой, благодаря которой можно наблюдать изменение количества РНК в клетке. Метод ПЦР, несмотря на свою простоту, обладает очень большой гибкостью и широко используется для самых разнообразных задач.

Роль полногеномного секвенса при типировании *S. aureus*

Полногеномное секвенирование (WGS – whole genome sequencing), позволяет получить большой массив данных, включающий полную или практически полную последовательность ДНК секвенируемого организма (более 90 % геномной последовательности) [107]. Это позволяет применять остальные методы генотипирования, например, MLST, сразу на полногеномной последовательности. В настоящее время разрабатываются новые методы типирования, основанные на полногеномном секвенировании, такие как расширенное MLST или MLST корового генома (MLST+, cgMLST – core genome MLST), полногеномное MLST (wgMLST – whole genome MLST), анализ полиморфизма единичных нуклеотидов (SNP – single nucleotide polymorphism) и другие [127, 138]. Следует отметить, моделирование некоторых методов на основе данных полногеномного секвенирования не всегда является точным. Одним из ярких примеров является PFGE, даже при полной сборке хромосомы микроорганизма в единую хромосому, виртуальная картина расщепления ДНК может отличаться от реальной [184]. Возможно, это связано с модификациями ДНК [27]. Не всегда удаётся провести MLVA, что связано с ошибками секвенирования (недостатки оборудования и/или реагентов). Основными недостатками полногеномного секвенирования являются цена, трудоёмкость и дальнейший анализ полученных данных [111]. Методы полногеномного секвенирования совершенствуются и становятся доступнее, что позволяет накапливать массив данных о геномах, но значительная часть этой информации в настоящее время не используется. Но данная информация может быть востребована в задачах в будущем. В настоящее время такие данные обеспечивают большую глубину эпидемиологического анализа и позволяют сравнивать полногеномные последовательности изучаемых организмов с последовательностями в общедоступных базах данных (например, EMBL, NCBI, DDBJ).

1.4. Стафилококковые энтеротоксины и пищевая инфекция

Стафилококковой пищевой инфекцией называют интоксикации, являющиеся результатом употребления пищевых продуктов, контаминированных одним или несколькими стафилококковыми энтеротоксинами [61, 125]. Пищевые инфекции являются одними из наиболее распространённых причинами возникновения пищевых отравлений [21, 37]. *S. aureus* вызывает около 241 000 пищевых инфекций в США за год [150]. Подсчитано, что каждый случай пищевой инфекции, вызванный *S. aureus*, стоит 695 долларов, что ежегодно составляет около 167 597 860 долларов [37]. Тем не менее, вклад золотистого стафилококка в возникновение пищевых инфекций, вероятно, выше, так как многие случаи пищевых отравлений не регистрируются [21, 125, 26, 45].

Впервые документированная пищевая инфекция, вызванная *Staphylococcus aureus*, зарегистрирована в городе Мичиган и расследовалась двумя исследователями, Воном и Штернбергом, в 1884 году в США. Возникла она при употреблении контаминированного сыра [85].

Наиболее часто случаи пищевой инфекции связывают с мясом, птицей, яйцами, молоком, кондитерскими изделиями и начинками сэндвичей, которые могут быть оптимальными средами для роста *S. aureus* [15, 125, 205, 223]. Основным источником контаминации являются, как правило, ошибки при приготовлении пищи, самыми значимыми из которых являются недостаточные время и температура при начальной термообработке пищи (40 %), при удерживании тепла (33 %) и в процессе подогрева (57 %); длительное хранение пищи при комнатной температуре или на открытом воздухе (58 %); медленное охлаждение приготовленной пищи (44 %); неадекватная температура холодного хранения (22 %); а также приготовление пищи задолго до подачи на стол [26]. Наиболее массовые пищевые инфекции случаются при централизованном снабжении пищей, контаминированной энтеротоксин-продуцирующими штаммами *S. aureus* или только энтеротоксинами, как это произошло в Японии в 2000 году [17].

Развивается стафилококковая пищевая инфекция быстро, примерно через 3-5 часов после употребления контаминированных продуктов [150, 21, 125]. Основные симптомы включают повышенное слюноотделение, тошноту, сильную рвоту и боли в животе, сопровождающиеся или не сопровождающиеся диареей [150, 21]. При сильной потере жидкости может произойти обезвоживание и понижение артериального давления [150, 15, 21]. Как правило, пищевая инфекция без лечения проходит за 24-48 часов после первых симптомов, но может протекать тяжело, особенно у детей, людей старшего возраста и иммунокомпрометированных пациентов [150, 15, 21]. Для терапии антибиотики не используются [188], лечение осуществляется поддержкой организма. В одном исследовании, включающем 7 126 случаев пищевой инфекции, показано, что частота смертности от данного заболевания составляет 0,03 %, но все смертельные случаи произошли у людей старшего возраста. Полное выздоровление занимает около 20 часов [150].

Характерную клиническую картину пищевой инфекции вызывают стафилококковые энтеротоксины. Энтеротоксины, продуцируемые *S. aureus*, являются экзотоксинами с сильным действием на желудочно-кишечный тракт. Синтезируются энтеротоксины на логарифмической фазе роста или во время перехода из экспоненциальной фазы роста в стационарную [30, 164]. Энтеротоксины устойчивы к воздействиям внешней среды, таким как высокие и низкие температуры, высушивание, низкие значения pH и устойчивы к протеолитическим ферментам. Благодаря этим свойствам, энтеротоксины способны функционировать в желудочно-кишечном тракте после проглатывания [15, 125, 85]. Энтеротоксины очень активны и действуют в концентрациях от нескольких сотен нанограммов до единиц микрограммов. Было установлено, что для возникновения пищевой инфекции достаточно 0,1 мкг энтеротоксина [125].

Стафилококковые энтеротоксины (SE) являются семейством из девяти основных серологических типов термостабильных энтеротоксинов (SEA, SEB, SEC, SED, SEE, SEG, SEH, SEI, и SEJ), которые относятся к семейству пирогенных токсинов суперантигенов [15, 21]. Пирогенные токсины вызывают суперантигенную активность за счёт неспецифического взаимодействия с T-

клеточными рецепторами на Т-клетках [125, 206]. Предполагают, что суперантигенная активность SE помогает проникать сквозь клетки, что позволяет токсину входить в кровяное русло, делая возможным его взаимодействие с антиген-презентирующими клетками и Т-клетками.

Стафилококковые энтеротоксины предложено именовать согласно эметической активности [131]. Только суперантигены, вызывающие рвоту после орального введения в приматов обозначают как энтеротоксины. Родственные токсины, у которых отсутствует эметическая активность или не проверена, обозначают как энтеротоксин-подобные суперантигены. Новые открытые токсины с более чем 90 % идентичностью аминокислотной последовательности с существующими энтеротоксинами или энтеротоксин-подобными белками обозначают как пронумерованный подтип [15].

К настоящему времени спектр энтеротоксинов и энтеротоксин-подобных белков *S. aureus* включает 22 типа, не считая молекулярные варианты (Таблица 1.1): (i) классические SEA, SEB, SEC (с подтипами SEC1, SEC2 и SEC3), SED и SEE, которые были открыты при изучении штамма *S. aureus*, вызвавшего вспышку пищевой инфекции, и классифицированы на разные серологические группы [28, 40]; и (ii) новые типы энтеротоксинов (SEG, SEH, SEI, SER, SES, SET) и энтеротоксин-подобных белков (SEIJ, SEIK, SEIL, SEIM, SEIN, SEIO, SEIP, SEIQ, SEIU, SEIU2, и SEIV) [207, 158, 161, 162, 196]. TSST-1, токсин синдрома токсического шока, изначально обозначенный, как SEF, не обладает эметической активностью, поэтому он не относится к энтеротоксинам [176].

Стафилококковые энтеротоксины и энтеротоксин-подобные белки образуют семейство родственных по структуре экзобелков с молекулярным весом от 22 до 28 kDa. По идентичности аминокислотных последовательностей их разделяют на четыре группы. Для некоторых энтеротоксинов были определены трёхмерные структуры с помощью кристаллографии (Таблица 1.1) [67, 78, 81, 190, 202]. Эти структуры консервативны, несмотря на то, что они взаимодействуют с разными молекулами главного комплекса гистосовместимости II класса и показывают разную специфичность по отношению к Т-клеточным рецепторам [142]. По форме

они являются компактными эллипсоидными белками с двумя неравными доменами.

Таблица 1.1 – Основные свойства стафилококковых энтеротоксинов и энтеротоксин-подобных белков и геномная локализация кодирующих генов

Токсин	Молекулярная масса (kDa)	Эметическая активность	Кристаллическая структура	Ген	Мобильный генетический элемент
SEA	27.1	да	да	<i>sea</i>	ΦSa3ms, ΦSa3mw, Φ252B, ΦNM3, ΦМу50a
SEB	28.4	да	да	<i>seb</i>	pZA10, SaPI3
SEC	27.5–27.6	да	да	<i>sec</i>	SaPI _n 1, SaPI _m 1, SaPI _m 2, SaPI _{bov} 1
SED	26.9	да	да	<i>sed</i>	pIB485-like
SEE	26.4	да	нет	<i>see</i>	ΦSa ⁶
SEG	27.0	да	да	<i>seg</i>	<i>egc1</i> (vSaβ I); <i>egc2</i> (vSaβ III); <i>egc3</i> ; <i>egc4</i>
SEH	25.1	да	да	<i>seh</i>	MGEmw2/mssa476 <i>seh/Δseo</i>
SEI	24.9	слабая	да	<i>sei</i>	<i>egc1</i> (vSaβ I); <i>egc2</i> (vSaβ III); <i>egc3</i>
SEJ	28.5	не определена	нет	<i>selj</i>	pIB485-like; pF5
SEK	26.0	не определена	да	<i>selk</i>	ΦSa3ms, ΦSa3mw, SaPI1, SaPI3, SaPI _{bov} 1, SaPI5
SEL	26.0	нет ^a	нет	<i>sell</i>	SaPI _n 1, SaPI _m 1, SaPI _m 2, SaPI _{bov} 1
SEM	24.8	не определена	нет	<i>selm</i>	<i>egc1</i> (vSaβ I); <i>egc2</i> (vSaβ III)
SEN	26.1	не определена	нет	<i>seln</i>	<i>egc1</i> (vSaβ I); <i>egc2</i> (vSaβ III); <i>egc3</i> ; <i>egc4</i>
SEO	26.7	не определена	нет	<i>selo</i>	<i>egc1</i> (vSaβ I); <i>egc2</i> (vSaβ III); <i>egc3</i> ; <i>egc4</i> ; MGEmw2/mssa476 <i>seh/Δseo</i>
SEP	27.0	не определена ^a	нет	<i>selp</i>	ΦN315, ΦМу3A
SEQ	25.0	нет	нет	<i>selq</i>	ΦSa3ms, ΦSa3mw, SaPI1, SaPI3, SaPI5
SER	27.0	да	нет	<i>ser</i>	pIB485-like; pF5
SES	26.2	да	нет	<i>ses</i>	pF5
SET	22.6	слабая	нет	<i>set</i>	pF5
SEU	27.1	не определена	нет	<i>selu</i>	<i>egc2</i> (vSaβ III); <i>egc3</i>
SE/U2 (SEW)	не определена	не определена	нет	<i>selu2</i>	<i>egc4</i>
SE/V	не определена	не определена	нет	<i>selv</i>	<i>egc4</i>

^a – эметическая активность показана на кроликах (SEL; [163]) или в небольших насекомоядных *Suncus murinus* (SEP; [158]), но не на приматах;

⁶ – предположительная локализация в профаге [51].

В отличие от других бактериальных энтеротоксинов, особые клетки и рецепторы в пищеварительной системе не были однозначно связаны с отравлением стафилококковыми энтеротоксинами. Было предположено, что стафилококковые энтеротоксины воздействуют на желудочно-кишечный тракт, стимулируя блуждающий нерв, который передаёт рвотный сигнал в головной мозг [197]. Согласно этой теории, рецепторы на нейронах блуждающего нерва имеют значение для проявления эметической активности, активируемой SEA [94]. Также, стафилококковые энтеротоксины способны проникать через оболочку кишечника

и активировать местный и системный иммунный ответ [194]. Местная активация иммунной системы может иметь значение при желудочно-кишечных повреждениях, связанных с проглатыванием стафилококковых энтеротоксинов [89]. Воспалительные изменения наблюдаются в нескольких областях желудочно-кишечного тракта, но наиболее тяжелые повреждения появляются в желудке и в верхней части тонкого кишечника [110]. Диарея, иногда связанная с интоксикацией стафилококковыми энтеротоксинами, может быть следствием ингибции реабсорбции воды и электролитов в тонком кишечнике [198]. В попытке связать два различных свойства стафилококковых энтеротоксинов, т.е. суперантигенность и энтеротоксичность, было постулировано, что энтеротоксигенные свойства помогают токсину войти в кровяное русло и циркулировать по телу, позволяя, таким образом, взаимодействовать с антиген-презентирующими клетками и Т-клетками, что приводит к суперантигенной активности [21]. Таким образом, циркуляция стафилококковых энтеротоксинов после употребления в пищу, а также их распространение из очага инфекции *S. aureus*, может произвести больший эффект на хозяина в сравнении с тем, если токсин остался локализованным [123].

Способы передачи

Все стафилококковые энтеротоксины и энтеротоксин-подобные белки располагаются на дополнительных генетических элементах, таких как плазмиды, профаги, острова патогенности (SaPI), геномные острова vSa или рядом с элементами стафилококковой хромосомной кассеты (SCC) (Таблица 1.1) [15]. Большинство из вышеперечисленного относится к мобильным генетическим элементам, и их распространение в популяции *S. aureus* может повлиять на их способность вызывать заболевания и вносить вклад в эволюцию микробов, как патогенов.

Плазмиды

Плазмиды давно известны, как эффективный механизм распространения детерминант резистентности и вирулентности с помощью горизонтального переноса генов. В стафилококках охарактеризовано два вида плазмид, несущих гены стафилококковых энтеротоксинов и энтеротоксин-подобных белков

(Таблица 1.1). Обе эти плазмиды несут гены *sej* и *ser*, связанных либо с *sed* (pIB485-like), либо с *ses* и *set* (pF5) [161, 160].

Первой описанной плазмидой, несущей ген стафилококкового энтеротоксина, была плазида pIB485 размером 27,6 тпн (тысяч пар нуклеотидов), в которой сперва был найден ген *sed*, а позднее ген *selj* [24]. Стафилококковый энтеротоксин SER был впервые открыт в штаммах *S. aureus*, связанных со вспышками пищевых токсико-инфекций в Фукуоке, Япония, 1997 г. [160]. Ген *ser*, как было обнаружено, локализуется на семействе близко родственных плазмид, обозначенных как pF5 и pF5-подобные плазмиды. Эти плазмиды имеют схожие рестрикционные профили и несут *selj* вместе с *ser*. Позже было обнаружено два новых гена стафилококковых энтеротоксинов (*ses* и *set*), находящихся на плазмидах Фукуока [161, 160]. Интересно, что ген *ser*, вместе с *sed* и *selj*, также был обнаружен в pIB485-подобных плазмидах в лабораторных штаммах и изолятах, полученных при вспышках пищевой инфекции и от здоровых людей в Японии [160], и в pIB485-подобных плазмидах, отличающихся по размеру и/или рестрикционному профилю, представленных в изолятах *S. aureus*, выделенных в Испании от носителей из носовой полости и из вручную обработанной пищи [73]. Две из таких плазмид, названные pUO-Sa-SED1 (~33 тпн) и pUO-Sa-SED2 (~36 тпн), несут гены *sed*, *selj* и *ser*, и имеют рестрикционные паттерны идентичные или схожие с паттернами pIB485, в то время как pUO-Sa-SED3 (53,5 тпн; содержит гены *sed*, *selj* и *ser*-подобный), имеет другой профиль. К настоящему времени эволюционные отношения между этими двумя типами плазмид неизвестны [15].

Профаги

Как и большинство опубликованных фагов *S. aureus*, фаги, несущие гены стафилококковых энтеротоксинов и энтеротоксин-подобных белков (*sea*, *selk*, *selp* и *selq*) относятся к семейству Siphoviridae. Умеренные хвостатые бактериофаги этого семейства классифицируются по трём особенностям: (i) модуль лизогении, особенно интегразы, которая определяет сайт вставки фага в бактериальную хромосому; (ii) серогруппа, основанная на отличиях в капсиде, хвосте и дополнительных хвостовых белках; и (iii) ген холина и модуль лизиса [73].

Профаги семейства Siphoviridae, несущие гены стафилококковых энтеротоксинов и энтеротоксин-подобных белков относятся группе интегразы Sa3int, серогруппам Fa и Fb, и группам холина 255a и 255b. Три гена стафилококковых энтеротоксинов и энтеротоксин-подобных белков (*sea*, *selk* и *selq*) представлены вместе в фагах ΦSa3ms и ΦSa3mw, в то время как одиночные гены стафилококковых энтеротоксинов и энтеротоксин-подобных белков (*sea* или *selp*) переносятся другими профагами (Таблица 1.1) [15].

Кроме энтеротоксинов, факторы вирулентности, участвующие в уклонении от врождённого иммунного ответа, также кодируются на этих фагах. К этим факторам относятся белок-ингибитор хемотаксиса (CHIP, продукт гена *chp*), который связывается с хозяйскими рецепторами к хемокинам, в частности с рецептором C5a и с формилированным пептидным рецептором, предотвращая хемотаксис нейтрофилов и их активацию [57]; стафилококковый ингибитор комплемента (SCIN, кодируемый геном *scn*), который вмешивается во все пути активации комплемента, блокируя C3 конвертазу [180]; стафилокиназа (продукт гена *sak*), которая приводит к деградации двух основных опсоинов (IgG и C3b), превращая поверхностно-связанный плазминоген в плазмин, а также ингибирует бактерицидный эффект α-дефенсина [103, 179]. Регион, кодирующий эти факторы вирулентности, известен как "innate immune evasion cluster" (кластер уклонения от врождённого иммунитета) [214] и находится на одном или на обоих концах бактериофага. Встраивание этих бактериофагов в хромосому *S. aureus* происходит через сайт-специфическую рекомбинацию между сайтом attP в геноме фага и сайтом attB, расположенном внутри гена β-гемолизина в бактериальной хромосоме [48]. Во время интеграции происходит негативная конверсия гена β-гемолизина, при этом появляются новые гены вирулентности.

Острова патогенности *Staphylococcus aureus*

Острова патогенности *Staphylococcus aureus* (SaPI – *Staphylococcus aureus* Pathogenicity Island) – это мобильные элементы, которые широко распространены в *S. aureus*, а также найдены в других видах рода *Staphylococcus*. SaPI имеют высоко консервативную общую организацию, схожую с таковой у типичных умеренных

бактериофагов. Каждый из них занимает специфический сайт в хромосоме (*att*) и всегда в одной и той же ориентации. SaPI могут быть индуцированы для выхода из специфического сайта и репликации одним или несколькими специфическими стафилококковыми вспомогательными фагами [134, 204]. Последующая репликация ДНК SaPI эффективно инкапсулируется в инфекционную фагоподобную частицу с маленькой головкой, что приводит к очень высокой частоте передачи.

SaPI очень распространены в *Staphylococcus aureus* (Таблица 1.1). Их размер колеблется в пределах 15-17 тпн, кроме SaPI_{bov2} размером 27 тпн и сильно вырожденного SaPI размером 3,14 тпн, который присутствует в некоторых опубликованных полногеномных последовательностях. Полная нуклеотидная последовательность известна для 20 SaPI, некоторые из них несут гены, кодирующие TSST-1 и/или один или несколько генов стафилококковых энтеротоксинов/энтеротоксин-подобных белков (Рисунок 1.5). Например, *tst* обнаружен вместе с *selk* и *selq* в SaPI1, с *sec3* и *sell* в SaPI_{m1} и SaPI_{n1}, и с *sell* и *sec* в SaPI_{bov1}; *seb*, *selq* и *selk* были найдены в SaPI3; *selk* и *selq* в SaPI5; *sec4* и *sell2* в SaPI_{m2} [155]. Индукция SaPI, вероятно, происходит при увеличении числа копий генов токсинов и, таким образом, увеличении продукции токсина, как описано для лизогенных фагов [199].

Геномные острова *Staphylococcus aureus*

Термином геномные острова (*vSa*) обозначают нефаговые и не-SCC геномные острова, которые присутствуют исключительно в *S. aureus*, часто кодируют детерминанты вирулентности, встраиваются в специфические локусы в хромосоме и связаны с неповреждёнными или остаточными ДНК рекомбиназами [18]. Два главных *vSa* геномных острова, *vSa α* и *vSa β* , размерами от 20 до 30 тпн, присутствуют во всех геномах *S. aureus*, секвенированных до настоящего времени, но отсутствуют в других видах *Staphylococcus*, включая *S. epidermidis*. Хотя *vSa α* и *vSa β* могли быть приобретены с помощью горизонтального переноса генов, нет никаких доказательств, что они могут передаваться. Каждый из этих островов несёт две копии генов, кодирующих распознавание (*hsdS*) и метилирование (*hsdM*)

субъединиц системы рестрикции-модификации *SauI* I типа. Одна копия гена для субъединицы рестрикции находится в другом месте в хромосоме *S. aureus* [219]. Гены *hsdS* системы *SauI* существенно различаются у штаммов *S. aureus* разных клональных комплексов, что определяет вариации в последовательностях, которые будут специфически распознаваться в качестве цели для модификации метилированием. Как только модифицированные последовательности будут защищены от рестрикции, обмен ДНК в пределах одного клонального комплекса будет возможен, в то время как ДНК, переданная между изолятами разных клональных комплексов, будет расщепляться. Поэтому, система *SauI* рассматривается, как ключевой фактор в контроле эволюции клональных комплексов.

И *vSaa*, и *vSaf*, содержат кластеры генов, кодирующие известные или предполагаемые факторы вирулентности. *vSaa* несёт кластер генов, кодирующих липопротеины (кластер *lpl*), и кластер *set* (стафилококковый экзотоксин-подобный) [68], позднее переименованный как кластер *ssl* (стафилококковый суперантиген-подобный) [131]. Кластер *ssl* состоит из серии родственных генов (от 7 до 11), кодирующих белки, которые имеют общую структуру с суперантигенами, но не имеют их свойств [69]. Тем не менее, у них есть альтернативные способы воздействия на иммунную систему хозяина, воздействие на иммуноглобулин А (IgA), фактор комплемента C5 (как показано для *SSL7*; [122]), или на нейтрофилы (*SSL5* [29] и *SSL11* [47]). *vSaf* несёт кластер гена серин протеазы (*spl*), гены компонентов для лейкоцидина *LukED* (*LukD* и *LukE*), гены для биосинтеза лантибиотика (*bsa*) и/или кластер генов энтеротоксинов (*egc*), который включает разное количество генов стафилококковых энтеротоксинов/энтеротоксин-подобных белков, образуя оперон [101].

Было предположено, что кластер *egc* возник из предкового гена энтеротоксина через тандемную дупликацию и дальнейшую вариацию, в то время как генная рекомбинация создала варианты токсинов с разными биологическими свойствами [207, 101]. Динамическая эволюция этого кластера, который рассматривался как источник возникновения генов энтеротоксинов и

энтеротоксин-подобных белков [101], отражён в ряде уже известных вариантов данных генов.

Первый кластер *egc* (*egc1*) был открыт в 2001 году и состоит из двух генов SE (*seg* и *sei*), трёх SEI генов (*selm*, *seln* и *selo*), и двух псевдогенов (*фent1* и *фent2*) [101]. Позже, был описан второй вариант *egc* (*egc2*), содержащий дополнительный ген SEI (*selu*) [128]. Последний ген произошёл при слиянии двух псевдогенов *egc1*, вследствие вставки 15 нуклеотидов в *фent1* и одиночной делеции аденина, что отменило стоп-кодон в этом гене. В дополнение, аллельные вариации каждого из генов *egc2* составляют кластер *egc3* [88, 49, 128]; новый вариант *selu* (*selu2*) и новый ген *sel* (*selv*) представлены в *egc4* [207]. В результате рекомбинационных событий между *selm* и *sei* получился *selv*, в то время как делеция одного аденина между перекрывающимися 5' и 3' концами псевдогенов *фent2* и *фent1* привела к появлению *selu2* (который был переименован в *selw*) [50]. Были описаны дефектные *egc* кластеры, в которых нет одного или более генов классического *egc1*, а также варианты, несущие вставки последовательностей *seln*, *seg* или *sei* [207, 159]. Эти структуры рассматривались в качестве промежуточных элементов кластера *egc* [207]. Более того, тот факт, что каждая из трёх основных групп гомологии SE/SEI (Таблица 1.2) содержат энтеротоксины, кодируемые генами оперона *egc*, приводит к предположению, что все гены энтеротоксинов и энтеротоксин-подобных белков произошли из кластера *egc* [206].

Гены энтеротоксинов, локализованные рядом со Стафилококковой Хромосомной Кассетой *mec* (SCC*mec*)

Рядом с не содержащим ген *mecA* SCC-элементом, который присутствует в штамме MSSA476; SCC*mec* элементом IV типа в штамме *S. aureus* MW2; и SCC*mec* элементом IV типа из коллекции близкородственных внебольничных *S. aureus* был обнаружен ген *seh*, фланкируемый укороченным геном *selo* и, предположительно, геном транспозазы. У более поздних штаммов приобретение элемента *seh* могло стабилизировать интеграцию SCC*mec* IV типа, который не способен вырезаться и, таким образом, потерял свою мобильность [153].

Заключение

Staphylococcus aureus является третьим по частоте встречаемости возбудителем пищевой инфекции, что говорит о его высокой вирулентности для человека. Он способен нести большое количество генов, продукты которых являются этиологическими агентами пищевой инфекции. Существуют штаммы *S. aureus*, в которых отсутствуют гены энтеротоксинов и энтеротоксин-подобных белков. Подобные штаммы не способны вызывать клинические проявления пищевой инфекции, но могут быть обнаружены в пищевых продуктах и сотрудников пищеблоков. Поэтому важным этапом при расследовании вспышек пищевой инфекции является проведение генотипирования с поиском генов энтеротоксинов и/или продуктов данных генов для установления источника инфекции.

1.5. Эксфолиативные токсины и эксфолиативный дерматит новорождённых

Впервые стафилококковый синдром ошпаренной кожи (Staphylococcal Scalded Skin Syndrome – SSSS) описал Барон Готфрид Риттер фон Риттершайн в 1878 г. [218]. SSSS, также известный как болезнь Риттера или эксфолиативный дерматит Риттера, характеризуется отслаиванием кожи [53, 82]. Локализованную форму называют буллезным импетиго [117]. Оба заболевания имеют одну и ту же этиологию, вызываются воздействием эксфолиативных токсинов (Exfoliative Toxin – ET), и отличаются только степенью поражения кожи [36]. В России наиболее часто данную болезнь называют пузырчаткой новорождённых, не подразделяя на локализованную и генерализованную формы.

Клиника

В первую очередь эксфолиативный дерматит новорождённых проявляется лихорадкой, недомоганием и вялостью. Эти симптомы сопровождаются эритематозной сыпью и формированием на коже крупных, хрупких, заполненных жидкостью пузырей, соответствующих симптому Никольского [144, 227]. Пузыри лопаются при механическом воздействии, оставляя поражённые участки тела без защитных слоёв эпидермиса [119, 136]. Поражается только кожа, но не слизистые [167]. Эксфолиативный дерматит новорождённых поражает большие части тела и повреждения часто стерильны [36].

Биохимия

С помощью электронной микроскопии было обнаружено расслоение в зернистом слое эпидермиса в результате разрушения пептидной связи в молекуле десмоглеина 1 (Dsg 1) [130, 12, 13] под воздействием ET. Была установлена белковая природа этих токсинов и определена их аминокислотная последовательность [227, 126, 54], что позволило определить родство между токсинами и сериновыми протеазами. Каталитические основания триады из хемотрипсинового семейства протеаз являются консервативными в ET [54]. Также была обнаружена эстеролитическая активность ET [19], потеря которой ведет к потере эпидермолитической активности [19, 172, 175]. Ингибиторы сериновых

протеаз широкого спектра не ингибируют вздутия, вызываемые ЕТ [54, 20]. Были определены кристаллические структуры ЕТ, которые были близки к таковым у сериновых протеаз семейства хемотрипсинов и, особенно, к глутаминовым кислото-специфическим протеазам. Конформация каталитической триады консервативна, но не было сформированной оксианионной дыры, характерной для каталитической структуры сериновых протеаз, необходимой для успешного катализа протеолитических реакций [41, 166, 216, 215].

Установлено, что ЕТ являются суперантигенами и их митогенная активность независима от протеолитической активности, но митогенные свойства гораздо слабее, чем у других стафилококковых суперантигенов. Так как при эксфолиативном дерматите новорождённых не выявлено неспецифической пролиферации Т-клеток, суперантигенные свойства ЕТ не участвуют в патогенезе. Именно воздействием ЕТ объясняется характерная клиническая картина эксфолиативного дерматита новорождённых и стерильность пузырей [119, 216].

Гены и переносчики

Около 5 % штаммов *Staphylococcus aureus* человека и животных продуцируют эксфолиативные токсины (ЕТ) [13, 228]. В настоящее время известно четыре изоформы ЕТ (ЕТА, ЕТВ, ЕТС и ЕТД), но только ЕТА и ЕТВ являются агентами, вызывающими клинические симптомы эксфолиативного дерматита новорождённых [120]. Ген *eta*, кодирующий ЕТА [42], находится на профаге *S. aureus* семейства Siphoviridae [165, 229], ген *etb*, кодирующий ЕТВ, находится на большой плазмиде рЕТВ [154, 227], ген *etd* находится внутри острова патогенности размером 14,8 тпн [228]. ЕТС был обнаружен в штамме *S. aureus*, выделенном от лошадей [185], но не был ассоциирован с заболеваниями человека, и, соответственно, не был охарактеризован.

Некоторые исследования показывают, что в США, Европе и Африке ЕТА экспрессируется более чем в 80 % ЕТ-продуцирующих штаммах [53, 9, 56]; однако в Японии преобладают ЕТВ-продуцирующие штаммы [114, 230]. Штаммы *Staphylococcus aureus*, несущие *eta*, часто выделяются от пациентов с буллезным импетиго, в то время как штаммы с *etb* выделяются от пациентов с SSSS [230].

Штаммы *S. aureus* с *etd* выделяются, в основном, от пациентов с глубокой пиодермией, а не с буллезным импетиго или SSSS [228].

Конверсия

Для клинически значимых эксфолиативных токсинов конверсия осуществляется двумя путями. ЕТА-конверсия штаммов *S. aureus* осуществляется с помощью лизогенных бактериофагов, кодирующих ген *eta* в своем геноме [229]. ЕТВ-конверсия происходит при получении плазмиды типа рЕТВ, кодирующей ген *etb* [227].

Многочисленными опытами показано, что характерную клиническую картину обеспечивают ЕТ и не было выявлено штаммов *S. aureus*, способных вызывать эксфолиативный дерматит новорождённых и не несущих генов ЕТ. Интересно отметить, что существует феномен отрицательной ЕТВ-конверсии [87].

ЕТА-конвертирующие бактериофаги, как и SEA-конвертирующие бактериофаги, имеют аналогичную морфологию и относятся к семейству Siphoviridae. В настоящий момент их классифицируют как Царство: Viruses; dsDNA viruses, no RNA stage; Отряд: Caudovirales; Семейство: Siphoviridae; Род: *Phietaivirus*.

Данные бактериофаги встраиваются в сайт интегрирования (*att*), расположенный рядом с геном, кодирующим белок FeS assembly protein SufB. Сайт интегрирования консервативен, встречаются единичные замены, которые, возможно, влияют на способность бактериофагов встраиваться в данный сайт. Отмечено, что в данный сайт интегрируются бактериофаги, несущие ген интегразы *Salint* типа. Геномы ЕТА-конвертирующих бактериофагов имеют типичную для умеренных бактериофагов структуру и включают модули лизогении, транскрипции и репликации, упаковки, головки, хвоста и литического модуль. По различиям в строении модулей генома ЕТА-фаги можно разделить на шесть типов [91].

Эпидемиология

Гены эксфолиативных токсинов не так широко распространены в популяциях *S. aureus*, как другие гены токсинов. Ранее было описано, что лишь около 5 % штаммов *Staphylococcus aureus*, выделенных от человека и животных, продуцируют эксфолиативные токсины [13, 228]. Но в зависимости от ареала

обитания штаммов *S. aureus*, гены эксфолиативных токсинов могут встречаться в 4-40 % выделяемых штаммов, либо могут не встречаться совсем [226, 119]. В специфических выборках, большинство штаммов выделяется от новорожденных и детей, частота встречаемости ЕТ-продуцирующих штаммов *S. aureus* увеличивается, в других выборках частота встречаемости подобных штаммов значительно ниже [226, 178].

Наиболее часто ЕТ-продуцирующие штаммы *S. aureus* встречаются в родильных домах и детских клиниках, в которых до 90 % изолятов могут нести гены ЕТ. Из двух клинически значимых генов токсинов, ген *eta* более широко распространен, чем ген *etb*.

Было замечено, что только определенные клональные комплексы *S. aureus* вызывают эксфолиативный дерматит новорождённых. Так, описано, что штаммы *S. aureus* клональных комплексов CC9, CC15 и CC88 (ST88) несут только ген *eta*, в то время как штаммы *S. aureus* клонального комплекса CC121 могут нести *eta* и/или *etb* [182].

Следует отметить, что в географическом распределении клональных комплексов *S. aureus*, способных вызывать эксфолиативный дерматит новорождённых, также есть особенности. Так, в Чехии преобладают ЕТА и ЕТВ-продуцирующие штаммы *S. aureus* клонального комплекса CC121, на втором и третьем местах ЕТА-продуцирующие штаммы клональных комплексов CC15 и CC9, соответственно [182]. Во Франции преобладают ЕТА и ЕТВ-продуцирующие штаммы *S. aureus* CC121 (75 %), реже выделяются ЕТА-продуцирующие штаммы CC15 (18 %), значительно реже встречаются ЕТА-продуцирующие штаммы *S. aureus* CC9 [121]. В Японии преобладают ЕТА- и ЕТВ-продуцирующие штаммы *S. aureus* CC121, реже встречаются уникальные для Японии метициллин-резистентные ЕТВ-продуцирующие штаммы *S. aureus* клональных линий CC89 и CC91, способные вызывать эксфолиативный дерматит новорождённых, гораздо реже встречаются ЕТА-продуцирующие штаммы *S. aureus* клональных комплексов CC15 и CC88 [193, 87].

Заключение

Эксфолиативные токсины – это уникальные токсины, продуцируемые *S. aureus*, ответственные за характерную клиническую картину эксфолиативного дерматита новорождённых. Вздутия на коже, как правило, стерильны, и вызываются только воздействием токсина. ET обладают слабо выраженными суперантигенными и протеолитическими свойствами, но обладают ярко выраженными эпидермолитическими свойствами. К ET формируется устойчивый иммунитет, но они представляют опасность для новорождённых, а также для людей с ослабленным иммунитетом. Наибольшей опасности подвергаются родильные дома, так как у взрослых носителей возбудитель не вызывает клинических проявлений и может находиться на поверхности кожи в составе микрофлоры. Вследствие широкого распространения *S. aureus*, для точного определения возбудителя эксфолиативного дерматита новорождённых необходимо осуществлять генотипирование штаммов золотистого стафилококка, в том числе проводить поиск генов эксфолиативных токсинов.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1. Штаммы *S. aureus*, использованные в работе

В работе использовали 515 изолятов *S. aureus*, выделенных при расследовании вспышек инфекционных заболеваний, этиологическим агентом которых являлся *Staphylococcus aureus*, в период с 2012 по 2018 гг. из 14 регионов 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), Химок (n=3), Южно-Сахалинска (n=52), Якутска (n=42), Перми (n=16), Вологды (n=14); и с поезда Абакан-Москва (n=12).

В качестве референтных штаммов использовали штаммы *S. aureus* из Американской Коллекции Типовых Культур (ATCC): MRSA252 (GenBank BX571856); MSSA476 (GenBank BX571857); Mu50 (GenBank BA000017); MW2 (GenBank BA000033) и USA300_TCH1516 (GenBank CP000730).

2.2. Условия культивирования

Для выращивания бактериальных культур использовали питательную среду № 1 ГРМ и № 10 ГРМ (ФБУН ГНЦ ПМБ, Оболенск, Россия). Культивирование микроорганизмов осуществляли при температуре 37 °С в течение 18-24 ч.

2.3. Видовая идентификация микроорганизмов

Видовую идентификацию бактерий осуществляли с помощью биохимических тестов API Staph (bioMérieux, Франция), системы MALDI Biotyper (Bruker, Франция) и биохимического анализатора VITEK 2 Compact (bioMérieux, Франция) с картами VITEK® 2 GP ID card (bioMérieux, Франция) согласно инструкциям производителей.

2.4. Выделение ДНК

2.4.1. Приготовление лизатов для ПЦР

Для приготовления лизатов использовали свежевыращенную культуру бактерий, которая культивировалась при 37° С в течение 18 часов. Культуру переносили в микропробирки, содержащие 100 мкл деионизованной воды и ресуспендировали. Далее полученную смесь прогревали в твердотельном термостате «Гном» (ДНК-Технология, Россия) при 95° С в течение 30 минут, после чего замораживали в морозильной камере. Затем смесь размораживали при комнатной температуре, центрифугировали при 10000 g на центрифуге Centrifuge 5804 R (Eppendorf, Германия) с ротором F45-30-11 (Eppendorf, Германия), отбирали супернатант, который использовался в качестве матрицы для проведения ПЦР.

2.4.2. Выделение тотальной ДНК для полногеномного секвенирования

Выделение тотальной ДНК проводили с помощью СТАВ-метода (ЦТАБ – цетилтриметиламмонийбромид) согласно Wilson et al, 2001 [224]. Штаммы *S. aureus* выращивали на ГРМ при 37° С в течение 18 часов. Свежевыращенную культуру переносили в 400 мкл раствора буфера TE (10 mM Трис и 1 mM ЭДТА, pH 8,0). Далее полученную смесь прогревали на водяной бане при 75° С в течение 40 минут и охлаждали до комнатной температуры. Затем добавляли 50 мкл лизоцима (10 мг/мл), после чего инкубировали 1,5 часа при 37° С. После инкубации вносили 75 мкл смеси SDS и протеиназы К (70 мкл 10 % SDS и 5 мкл протеиназы К), 100 мкл 5M NaCl и 100 мкл смеси СТАВ и NaCl (4,1 г NaCl, 10 г СТАВ, 100 мл деионизованной воды), прогретой на водяной бане при 65° С. Далее смесь перемешивали с помощью вортекса, после чего инкубировали 10 минут при 65° С. Затем вносили 750 мкл смеси хлороформа и изоамилового спирта (в пропорции 24:1), и полученную смесь центрифугировали 5 минут при 12000 g. Далее отбирали супернатант,

содержащий ДНК, добавляли 450 мкл изорпопилового спирта и инкубировали 10 минут в ледяной бане. После этого смесь центрифугировали в течение 15 минут при 10000 g, промывали осадок 1 мл 70 % этанола, снова центрифугировали 15 минут при 4° С при 10000 g. После этого супернатант удаляли, осадок подсушивали и к нему добавляли 20 мкл деионизованной воды. Выделенную тотальную ДНК хранили в морозильной камере при -20° С.

2.5. Полимеразная цепная реакция

Определение генов вирулентности проводили с использованием специфических праймеров. Полимеразную цепную реакцию проводили в 25 мкл реакционной смеси, которая содержала 2,5 мкл 10-кратного буфера DreamTaq Green (Thermo Fisher Scientific, США), 0,5 мкМ прямого и обратного праймера, 150 мкМ каждого дезоксинуклеотидтрифосфата (Thermo Fisher Scientific, США), 1 ед. DreamTaq ДНК полимеразы (Thermo Fisher Scientific, США) и 50 нг бактериальной ДНК. Амплификацию проводили с использованием амплификатора «Gradient Palm Cycler» CG1-96 (Corbett Research, Австралия). Режимы амплификации варьировались в зависимости от требуемых задач.

2.6. Проведение электрофореза в агарозном геле и регистрация результатов

Анализ продуктов амплификации проводили в агарозном геле. Концентрация агарозы варьировалась от 0,7 до 2,5 % в зависимости от требуемых задач. Для приготовления агарозы и для проведения электрофореза использовали трисборатный буфер (ТВЕ, двадцатикратный буфер содержит 216 г основного триса, 108 г борной кислоты, 80 мл 0,5 М ЭДТА, рН 8,0 на 1 л дистиллированной воды). Электрофорез проводили в электрофорезной камере Sub-Cell Model 192 (BioRad,

США). Напряжение электрического поля варьировалось в зависимости от задач от 2 до 10 В/см.

После электрофореза гель окрашивали в течение 10 мин в растворе бромистого этидия (5 мкг/мл) при активном покачивании на шейкере Orbital Shaker OS-20 (Biosan, Латвия). После окрашивания гель отмывали в течение 10 мин в дистиллированной воде и фотографировали в проходящем ультрафиолетовом свете с длиной волны 254 нм при помощи системы гель-документации BioRAD GelDoc™ XR Molecular Imager (BioRad, США).

2.7. Анализ полиморфизма длин рестрикционных фрагментов амплифицированных продуктов гена коагулазы

Анализ полиморфизма длин рестрикционных фрагментов продуктов амплификации переменного региона коагулазного гена (*coa*-ПЦР-ПДРФ) осуществляли стандартным методом согласно Hookey et al, 1998 [92]. Переменный участок гена коагулазы *S. aureus* содержит различное число tandemных повторов длиной 81 пн [92].

Согласно доступным базам данных, число tandemных повторов гена *coa* варьирует от 1 до 9, последовательность tandemных повторов одинаковой размерности различается по локализации сайтов рестрикции для эндонуклеазы *AluI*. Нуклеотидная последовательность гена *coa* является надежным маркером генетических линий *S. aureus* и используется для быстрого типирования клинических изолятов *S. aureus* методом *coa*-ПЦР-ПДРФ. В данной работе при выполнении *coa*-типирования использована следующая система обозначения *coa*-ПЦР-ПДРФ паттернов: размер исходного амплифицированного продукта (размеры фрагментов при проведении рестрикции через точку с запятой). Таким образом, запись была следующего вида: 676(300;214;162), расшифровывается следующим образом: размер амплифицированного переменного участка гена коагулазы 676 пн, в результате проведения рестрикции были получены фрагменты размером 300, 214 и 162 пн.

2.8. Генотипирование штаммов *S. aureus*

Маркерное типирование штаммов *S. aureus* проводили методом ПЦР с использованием специфичных праймеров, представленных в таблице 2.1.

Таблица 2.1 – Праймеры, использованные в работе

Название	Последовательность 5`-3`	Локализация праймера	Ссылка
nuc1	GCGATTGATGGTGATACGGTT	Ген нуклеазы	233
nuc2	AGCCAAGCCTTGACGAACTAAAGC		
coa-F	ATAGAGATGCTGGTACAGG	Варибельный участок гена коагулазы	92
coa-R	GCTTCCGATTGTTTCGATGC		
luk-PV-1F	ATCATTAGGTA AAAATGTCTGGACATGATCCA	Гены лейкоцидина Пантон–Валентайна	140
luk-PV-2R	GCATCAAGTGTATTGGATAGCAAAAGC		
lukED-F1	CAGATGTGAAGGGTAGTGGA	Гены лейкоцидина LukED	203
lukED-R5	TCATTATCAGATGTTGCTGTTG		
hla-F	GAAGTCTGGTGAAAACCTGA	Ген гемолизина А	220
hla-R	TGAATCCTGTGCTAATGCC		
hlb-F	CAATAGTGCCAAAGCCGAAT	Ген гемолизина В	220
hlb-R	TCCAGCACCACAACGAGAAT		
tst-F	ACCCCTGTCCCTTATCATC	Ген токсина синдрома токсического шока	143
tst-R	TTTTCAGTATTTGTAACGCC		
sea-F	GGTTATCAATGTGCGGGTGG	Ген энтеротоксина А	143
sea-R	CGGCACTTTTTTCTCTTCGG		
seb-F	GTATGGTGGTGTAAGTGAAGC	Ген энтеротоксина В	143
seb-R	CCAAATAGTGACGAGTTAGG		
sec-F	AGATGAAGTAGTTGATGTGTAT	Ген энтеротоксина С	143
sec-R	CACACTTTTAGAATCAACCG		
sed-F	CTAGTTTGGTAATATCTCCT	Ген энтеротоксина D	105
sed-R	TAATGCTATATCTTATAGGG		
see-F	TAGATAAAGTTAAAACAAGC	Ген энтеротоксина Е	105
see-R	ТААСТТАССТГТТГАСССТТТ		
seo-F	AGTTTGTGTAAGAAGTCAAGTGTAGA	Ген энтеротоксин-подобного белка О	102
seo-R	ATCTTTAAATTCAGCAGATATCCATCTAAC		
eta-F	ACTGTAGGAGCTAGTGCATTTGT	Ген эксфолиативного токсина А	102
eta-R	TGGATACTTTTGTCTATCTTTTTCATCAAC		
etb-F	CAGATAAAGAGCTTTATACACACATTAC	Ген эксфолиативного токсина В	102
etb-R	AGTGAACCTATCTTTCTATTGAAAAACACTC		

Сиквенс-типирование штаммов *S. aureus*

Мультилокусное сиквенс-типирование (MLST) штаммов *S. aureus*, основанное на определении нуклеотидной последовательности семи генов «домашнего хозяйства» и идентификации аллельного профиля, выполняли согласно информации, представленной на сервере *Staphylococcus aureus* MLST Databases [<http://pubmlst.org/saureus/>].

Spa-типирование проводили посредством определения нуклеотидной последовательности вариабельного региона гена белка А с последующим анализом данных согласно инструкциям сервера Ridom SpaServer [<http://spaserver.ridom.de/>].

Coa-типирование основано на секвенировании вариабельного региона гена коагулазы. Данный регион амплифицировали с праймерами 5'-АТАGАGАТGСTGGTACAGG-3' и 5'-GСTТССGАТТGТТССGАТGС-3' в объёме ПЦР смеси 50 мкл, которая содержала 5 мкл 10-кратного буфера DreamTaq Green (Thermo Fisher Scientific, США), 1 мкМ прямого и обратного праймера, 300 мкМ каждого дезоксинуклеотидтрифосфата (Fermentas), 2 ед. DreamTaq ДНК полимеразы (Thermo Fisher Scientific, США) и 100 нг бактериальной ДНК. Амплификацию проводили с температурой отжига праймеров 57 °С. Продукты амплификации анализировали в 1 % агарозном геле. Далее продукты амплификации очищали с помощью набора Silica Bead DNA Gel Extraction Kit (Thermo Fisher Scientific, США) согласно инструкции производителя и секвенировали в фирме ЗАО Евроген (Москва, Россия).

2.9. Определение продукции энтеротоксинов

Иммуноферментный анализ для отдельного определения стафилококковых энтеротоксинов с помощью набора Ridascreen SET A,B,C,D,E (R-Biopharm AG) проводили согласно МУК 4.2.2429-08. Ridascreen SET A,B,C,D,E позволяет выявить продукцию индивидуального энтеротоксина из группы А, В, С, D и E посред-

ством постановки иммунохимических тестов непрямого твердофазного иммуноферментного анализа. В качестве положительного контроля использовали штаммы *S. aureus* MRSA252 и MW2.

Также проверяли способность изолятов *S. aureus* к продукции стафилококковых энтеротоксинов на автоматическом анализаторе VIDAS (bioMérieux, Франция) с помощью теста VIDAS Staph Enterotoxin II (SET2) (bioMérieux, Франция) согласно инструкции производителя.

2.10. Полногеномное секвенирование

Для проведения полногеномного секвенирования использовали платформы Ion Torrent PGM (Life Technologies, США) и Illumina MiSeq (Illumina, США). Геномные библиотеки для штаммов *S. aureus* B-7438, B-7439, B-7778 и B-7779 были приготовлены с помощью набора реагентов для подготовки библиотек фрагментов ДНК Ion Plus Fragment Library Kit (Life Technologies). ДНК в количестве 500 нг с помощью ультразвука (Diagenode BioRuptor, США) была расщеплена на фрагменты длиной около 400 п.н. Далее, к полученным фрагментам пришивались баркоды (уникальные молекулярные метки, по которым различаются секвенируемые геномные библиотеки) с помощью набор Ion Xpress Barcode Adapters Kit (Life Technologies). С помощью ПЦР в реальном времени была определена концентрация геномных библиотек, по которой определяли количество библиотеки, необходимой для секвенирования. Для этого разводили полученные библиотеки в сто раз и сравнивали с разведениями стандартной библиотеки Ion Library Quantification Kit (Life Technologies). Эмульсионную ПЦР полученных геномных библиотек проводили с использованием Ion One Touch с набором реагентов Ion One Touch 400 Template Kit (Life Technologies). Далее проводили очистку (селекцию) геномных библиотек с помощью Ion One Touch ES и магнитных частиц Dynabeads My One Streptavidin C1 (Life Technologies). Далее проводили полногеномное секвенирование полученных геномных библиотек на платформе Ion Torrent PGM (Life Technologies) с использованием чипа Ion 318™

Chip Kit (Life Technologies) и набора Ion PGM 400 Sequencing Kit (Life Technologies).

Секвенирование остальных исследуемых штаммов *S. aureus* проводили на платформе Illumina MiSeq с использованием Nextera DNA Library Preparation Kit и MiSeq Reagent Kits v3 (Illumina, США) согласно инструкции производителя.

Сборка и аннотация. Полученные риды (короткие секвенированные последовательности) были собраны в контиги, представляющие собой консенсную последовательность из перекрывающихся ридов, с помощью сборщиков (ассемблеров) Newbler 2.9 (Roche) [<http://www.454.com/products/analysis-software/>] и SPAdes версий 3.7.2 и 3.13.0 [22]. Аннотация собранных геномов была проведена при помощи сервера NCBI Prokaryotic Genome Annotation Pipeline [14].

2.11. Биоинформатический анализ

Для поиска факторов вирулентности в секвенированных геномах использовали Ugene [156], VirulenceFinder [104] и BLAST (The Basic Local Alignment Search Tool) [137].

Так как для секвенирования выделялась тотальная ДНК, в полученных данных содержатся также последовательности плазмид. Для поиска контигов, которые предположительно могут принадлежать плазмиде, использовали PlasmidFinder [39]. Поиск контигов, которые могут принадлежать плазмидам, проводили также с помощью программы Mauve [55]. Для этого в программу загружали полученные сборки и референсный геном, после чего контиги, для которых не была найдена гомология с референсным геномом, проверялись на принадлежность к плазмидам с помощью BLAST.

Наличие контигов, в которых присутствовали последовательности, предположительно принадлежащие профагам, определяли с помощью PHAST [234]. Если последовательности, принадлежащие профагам, находились в длинных контигах, определялись координаты начала и конца последовательности профага. Для этого использовали BLAST, с помощью которого искали последовательности,

идентичные контигам, но не имеющие профагов в своём составе. Затем, из контига вырезалась последовательность профага и далее последовательность полученного контига с вырезанной последовательностью профага анализировалась в BLAST. При подобном поиске можно с точностью до нуклеотида определить точки начала и конца профага в бактериальной последовательности.

Также был проведен филогенетический анализ секвенированных штаммов, для чего использовали wombac [<https://github.com/tseemann/wombac>] – для поиска простых нуклеотидных замен (SNP – single nucleotide polymorphism) в коровом геноме, в результате получается файл с выравниванием последовательностей из нуклеотидов, принадлежащих сайтам с нуклеотидными заменами. С помощью SplitsTree [95] полученные результаты визуализировали и строили филогенетическое дерево.

Полногеномное выравнивание проводили с помощью программ Mauve [55] и BRIG (BLAST Ring Image Generator) [11].

ГЛАВА 3. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

3.1. 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 инфекции 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» [1], где были отмечены следующие недостатки фенотипических методов типирования:

1. Невысокая информативность данных методов и низкая дискриминационная способность. Штаммы разного происхождения могут иметь одинаковые фенотипические свойства вследствие единообразия условий окружающей среды.

2. Недостаточная воспроизводимость результатов фенотипических методов типирования. В процессе культивирования микроорганизмов на различных питательных средах могут происходить изменения биологических свойств.

В ГОСТ 31746-2012 [2] регламентируется процесс анализа пищевых продуктов на присутствие коагулазоположительных стафилококков фенотипическими методами, представлены два алгоритма проведения исследований на качественное и количественное определение. Фенотипические методы позволяют оценить обсемененность пищевых продуктов, но не дают информацию о генотипе возбудителя и не позволяют установить эпидемиологическую цепочку распространения штамма возбудителя.

В МУК 4.2.2746-10 [4] и в МУК 4.2.2872-11 [5] регламентируется проведение молекулярно-генетических методов выявления и идентификации патогенных бактерий-возбудителей при вспышках пищевой инфекции методом ПЦР в реальном времени, и приведён обобщённый алгоритм исследования. В данных документах в списке типизируемых микроорганизмов *S. aureus* не представлен, хотя и является одним из ведущих возбудителей пищевой инфекции. Однако и здесь алгоритм проведения внутривидового генетического типирования отсутствует.

Молекулярно-генетические методы типирования штаммов *S. aureus* регламентированы в методических рекомендациях «Метициллинрезистентные *Staphylococcus aureus* – возбудители внутрибольничных инфекций: идентификация и генотипирование» [3], в которых представлен алгоритм генотипирования штаммов MRSA по SCCmec комплексу. Однако данный подход к генотипированию изолятов *S. aureus* при расследовании вспышек пищевой инфекции и эксфолиативного дерматита не приемлем в силу того, что такие изоляты, как правило, относятся к MSSA и не могут быть типированы по SCCmec комплексу.

Таким образом, в настоящее время отсутствуют нормативные документы, содержащие алгоритм действий для исследования изолятов MSSA молекулярно-генетическими методами.

В ходе анализа вспышек пищевой инфекции и эксфолиативного дерматита, вызванных *S. aureus*, нами был разработан алгоритм исследования, предназначенный для генотипирования изолятов *S. aureus*, направленный на идентификацию штамма-возбудителя стафилококковой токсикоинфекции и его связи с заболевшими, носителями и объектами окружающей среды.

Сам факт выделения штаммов *S. aureus* из клинических образцов не может служить подтверждением стафилококковой этиологии инфекции, для этого необходимо проведение комплекса исследований, направленных на идентификацию штамма возбудителя, обладающего соответствующим генетическим профилем, который ассоциируется с исследуемой инфекцией. Предлагаемый алгоритм при условии использования предварительно выделенной чистой культуры *S. aureus* включает следующие этапы:

- 1) экспресс-выделение тотальной ДНК *S. aureus*;
- 2) определение принадлежности исследуемой культуры к виду *S. aureus* методом ПЦР с видоспецифическими праймерами на ген нуклеазы (*nuc*) и переменный участок гена коагулазы (*coa*). При этом одновременно проверяется чистота изолированной культуры *S. aureus* (наличие в образце смеси двух или более штаммов *S. aureus*) и проводится первичное типирование по размеру амплифицированного продукта переменного участка гена коагулазы;
- 3) проведение *coa*-ПЦР-ПДРФ типирования исследуемых изолятов *S. aureus* с помощью рестриктазы *AluI* и поиск методом ПЦР генов вирулентности (генов энтеротоксинов и эксфолиативных токсинов), продукты которых вызывают характерные клинические симптомы расследуемой инфекции;
- 4) сравнительный анализ полученных данных, формирование первичных результатов;
- 5) проведение сиквенс-типирования: *sra*-типирование и МЛСТ;
- 6) анализ полученных данных с привлечением международных баз 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 уже на четвёртом этапе, что занимает с момента выделения чистой культуры не более 24 часов, удаётся установить в образцах, выделенных из различных источников: от заболевших, сотрудников, контактных лиц, из смывов с

объектов окружающей среды, из пищевых продуктов и других источников, наличие доминантного штамма *S. aureus*. Для определения стафилококковой природы вспышки, по меньшей мере, большая часть клинических образцов, полученных от заболевших, должна содержать изоляты с идентичным генотипом, соответствующим профилю инфекции. Изоляты с таким же генотипом могут быть представлены и в других образцах, например, в образцах, полученных из пищевых продуктов и от сотрудников медицинского учреждения.

Основным критерием соответствия профилю инфекции доминантного штамма *S. aureus* является наличие гена токсина, этиологического агента инфекции. Так, этиологическим фактором пищевой инфекции служат различные энтеротоксины, этиологическим фактором эксфолиативного дерматита – эксфолиативные токсины А и В. Выделение от заболевших изолятов *S. aureus* с идентичным генотипом при наличии генов этиологических агентов инфекции позволяет определить доминантный штамм *S. aureus*, который может быть определен как возбудитель инфекционной вспышки. Следует отметить, что идентифицированный доминантный штамм *S. aureus* должен принадлежать клональному комплексу *S. aureus*, который соответствует профилю инфекции. Так, возбудители эксфолиативного дерматита новорожденных принадлежат к ограниченному числу клональных комплексов – СС9, СС15, СС88 и СС121, что позволяет отнести принадлежность к одному из этих клональных комплексов, как обязательное условие идентификации возбудителя эксфолиативного дерматита при расследовании вспышки.

Выявление в образцах, полученных от сотрудников, контактных лиц, из смывов с объектов окружающей среды, из пищевых продуктов и других источников, изолятов идентичных доминантному штамму *S. aureus*, выделенного от заболевших, позволяет предположить возможный источник инфекции. Так, например, при выявлении в продукте изолятов *S. aureus* идентичных штамму *S. aureus*, возбудителю пищевой инфекции, предположение о том, что данный продукт являлся источником пищевой инфекции является обоснованным.

Следует отметить, что первые четыре этапа алгоритма могут быть проведены на базе любой клинической лаборатории при первичном расследовании групповых

и массовых вспышек стафилококковой инфекции. Использование в рутинной практике *coa*-ПЦР-ПДРФ типирования и определение генов токсинов методом ПЦР является экономически эффективным решением, которое позволяет с достаточно высокой эффективностью, скоростью и экономичностью устанавливать генетическую близость исследуемых изолятов *S. aureus*.

Для определения генетических характеристик обнаруженного штамма-возбудителя и сравнения его с штаммами *S. aureus* из международных баз данных необходимы являются этапы сиквенс-типирования, которые формализованы

Для дальнейшего проведения расследования вспышек стафилококковых инфекций используются методы сиквенс-типирования: *sra*-типирования и МЛСТ. Сиквенс-типирование позволяет получать формализованные данные и имеет высокую разрешающую способность. В результате появляется возможность проводить сравнительный анализ исследуемых штаммов *S. aureus* со штаммами из открытых баз данных, что позволяет выявить эпидемические линии штаммов *S. aureus*, циркулирующие в разных регионах и странах. Проведение данного анализа требует подготовки квалифицированного персонала и сложное оборудование, вследствие чего сложно использовать в рутинной практике.

Следующим и заключительным этапом является проведение полногеномного секвенирования, в результате которого определяется нуклеотидная последовательность генома, что позволяет использовать дополнительные методы типирования – такие как SNP-типирование, полный профиль генов вирулентности и резистентности, типирование по мобильным генетическим элементам и др. Проведение подобного объема работ требует подготовки специалистов и дорогостоящего оборудования. Основным преимуществом проведения полногеномного секвенирования является объем получаемой информации, его формализованность и возможность использования данных, полученных при обработке результатов, для последующих работ и сравнения с последовательностями других геномов *S. aureus*. К настоящему времени в GenBank депонировано более 12 000 геномов *S. aureus* и каждый год эта цифра увеличивается. Меняются технологии секвенирования и обработки данных,

позволяя с большей вероятностью собирать секвенируемый геном в единую хромосому, что серьёзно увеличивает возможности полногеномного анализа.

Таким образом, предложенный алгоритм исследования изолятов *S. aureus*, изолированных во время вспышки стафилококковой инфекции, позволяет в пределах суток после выделения чистой культуры провести генотипирование изолятов, определить вероятность стафилококковой природы инфекции, сделать вывод о предполагаемом источнике инфекции. Методы, применяемые на этом этапе, доступны в большинстве клинических лабораторий. Последующий сравнительный анализ данных устанавливает эпидемические связи как среди изолятов *S. aureus* в пределах расследуемой вспышки, так и позволяет получить информацию о степени родства штаммов *S. aureus*, циркулирующих в данном регионе, в стране и в мире.

3.2. 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 восьми регионах России и одна вспышка, произошедшая на поезде Абакан-Москва (Рисунок 3.1, Таблица 3.1).

Изученные вспышки пищевой инфекции имели схожие клинические признаки. Наиболее выраженными из них являются тошнота, многократная рвота, жидкий стул, слабость, повышенная температура тела, а также боли в животе. Подобные симптомы характерны для многих заболеваний, связанных с желудочно-кишечным трактом, вследствие чего точный диагноз можно установить только после выяснения этиологического агента, вызвавшего заболевание.



Рисунок 3.1 – Локализация изученных в данной работе вспышек пищевой инфекции в период с 2013 по 2018 гг.

Таблица 3.1 – 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

Для проведения расследования исследовали 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 пищеблока (Таблица 3.2). Полученные изоляты были проверены на принадлежность к виду *S. aureus* фенотипическими и генетическими методами.

Таблица 3.2 – Изоляты *S. aureus*, полученные в ходе расследования вспышек пищевой инфекции в 2013-2018 гг.

Место и год возникновения вспышки пищевой инфекции	Количество изолятов, шт.			Всего
	от заболевших	от сотрудников пищеблоков	из пищевых продуктов / окружающей среды	
Санкт-Петербург, 2013	14	0	1	15
Мордовия, 2014	30	6	2	38
«Селигер-2014», 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

Исследование полученных изолятов проводили согласно алгоритму, приведённому в главе «Разработка алгоритма экспресс-анализа изолятов *S. aureus* при расследовании вспышек пищевой инфекции и эксфолиативного дерматита» с модификациями для расследования вспышек пищевой инфекции. Методом ПЦР с праймерами на ген стафилококковой нуклеазы (*nuc*) и на вариабельный участок гена коагулазы (*coa*) изоляты *S. aureus* проверяли на принадлежность виду *S. aureus*. Для быстрого, экономически эффективного определения генетической близости изучаемых изолятов проводили рестрикционный анализ полученных амплифицированных продуктов вариабельного участка гена коагулазы (*coa*-ПЦР-ПДРФ), в результате получали специфические *coa*-ПЦР-ПДРФ паттерны, которые сравнивали между собой. В ходе исследований была накоплена статистика, позволяющая соотносить получаемые *coa*-ПЦР-ПДРФ паттерны исследуемых изолятов *S. aureus* с таковыми паттернами возбудителей пищевой инфекции. Большинство штаммов *S. aureus* не способны вызывать пищевую инфекцию, клинические симптомы которой обуславливаются воздействием энтеротоксинов. Поэтому далее осуществляли поиск наиболее значимых генов энтеротоксинов методом ПЦР, к которым относятся гены энтеротоксинов А, В, С, D и Е. Затем использовали методы сиквенс-типирования: *sra*- и МЛСТ-типирование. Данные методы более трудоёмки

и занимают больше времени для проведения анализа, но более точны и формализованы, что позволяет сравнивать полученные данные с открытыми базами данных. Благодаря вышеперечисленным действиям удаётся установить, могут ли исследуемые изоляты *S. aureus* вызывать пищевую инфекцию.

Эффективность используемого метода расследования вспышек пищевой инфекции продемонстрирована на трёх вспышках, произошедших в 2014 г. в Ульяновской области и в 2016 г. в Вологодской и Калининградской областях (Рисунок 3.1, Таблица 3.1). Для проведения расследования перечисленных вспышек исследовали 35 изолятов *S. aureus*, выделенных от заболевших, сотрудников пищеблоков и из пищевых продуктов. С помощью фенотипических и молекулярно-генетических методов была установлена принадлежность полученных изолятов к виду *S. aureus*. Далее было проведено *coa*-ПЦР-ПДРФ типирование, в результате которого были выявлены разные варианты *coa*-ПЦР-ПДРФ паттернов среди заболевших в каждой вспышке. Далее методом ПЦР был осуществлён поиск основных генов энтеротоксинов (*sea*, *seb*, *sec*, *sed*, *see*), продукты которых вызывают симптомы пищевых отравлений. В одном из изолятов *S. aureus*, выделенных от больных, полученных из Ульяновской области, был обнаружен ген *sec*. Среди изолятов *S. aureus*, полученных от заболевших в Калининградской области, был обнаружен один изолят с геном *seb*. При типировании изолятов *S. aureus*, выделенных от сотрудников пищеблоков и из пищевых продуктов, было установлено, что они также отличаются между собой. Изоляты *S. aureus*, выделенные от сотрудников пищеблока в Ульяновской области, были разделены на два *coa*-ПЦР-ПДРФ паттерна, которые не имели генов энтеротоксинов. Среди изолятов *S. aureus*, выделенных из пищевых продуктов, со смывов с оборудования и от сотрудников пищеблока в Калининградской области, было выявлено три *coa*-ПЦР-ПДРФ паттерна. В одном изоляте *S. aureus*, выделенном из пищевого продукта, был выявлен ген энтеротоксина В с *coa*-ПЦР-ПДРФ паттерном, отличающимся от изолята *S. aureus* с геном энтеротоксина В, выделенного от заболевшего. Изоляты *S. aureus*, выделенные во время вспышки пищевой инфекции в Вологодской области из пищевого продукта и от сотрудников пищеблока были разделены на три *coa*-ПЦР-ПДРФ паттерна,

один из которых является общим для изолятов *S. aureus*, выделенных из пищевого продукта, от сотрудника пищеблока и от больного. Тем не менее, данные изоляты *S. aureus* не имели генов энтеротоксинов, а методом *spa*-типирования было показано, что вышеперечисленные изоляты *S. aureus* отличаются друг от друга. В результате было установлено, что изоляты *S. aureus*, выделенные от сотрудников пищеблока, из пищевых продуктов и из смывов с оборудования не являются возбудителями вспышек пищевой инфекции. Стоит отметить, что обнаружение изолятов *S. aureus* в пищевых продуктах и инвентаре говорит о низких санитарно-гигиенических условиях в учреждениях, где были зарегистрированы вышеперечисленные вспышки пищевой инфекции.

Таким образом, доминирующего штамма *S. aureus* способного вызвать пищевую инфекцию среди изолятов *S. aureus*, выделенных от заболевших в Вологодской, Калининградской и Ульяновской областях, обнаружено не было. Три рассмотренные выше вспышки пищевой инфекции позволили продемонстрировать эффективность алгоритма исследования изолятов *S. aureus* при поиске источника инфекции.

При расследовании остальных вспышек пищевой инфекции, было установлено, что возбудителями пищевой инфекции являются штаммы *S. aureus*, кодирующие гены энтеротоксинов. Такие штаммы выделялись из разных источников (от заболевших, сотрудников пищеблоков, из пищевых продуктов и смывов с оборудования).

Отдельно стоит отметить три наиболее массовые вспышки пищевой инфекции, которые произошли в 2013 году в Санкт-Петербурге, в 2014 году на X Молодёжном форуме «Селигер-2014» в Тверской области и в 2015 году в Якутске. Масштабность вышеприведённых вспышек пищевой инфекции объясняется централизованным снабжением обсеменённой энтеротоксин-продуцирующими штаммами *S. aureus* пищи, о чём стало известно в ходе расследования. Наиболее тяжёлая и масштабная из рассматриваемых вспышек произошла в 2013 году в Санкт-Петербурге, в результате которой пострадало 363 человека, 223 из которых были госпитализированы. Вторая по масштабности вспышка пищевой инфекции произошла в

2014 году во время проведения X Молодёжного форума «Селигер-2014» в Тверской области, в ходе которой пострадало 145 человек, 38 было госпитализировано. В 2015 году в Якутске, пострадало 67 человек, 41 из них были госпитализированы. Таким образом, в результате трёх вспышек пищевой инфекции пострадало 575 человек, из которых 302 человека были госпитализированы. При проведении расследования вышеперечисленных вспышек пищевой инфекции исследовали 102 изолята *S. aureus* (Таблица 3.1).

Coa-ПЦР-ПДРФ типирование позволило установить наличие доминантных штаммов *S. aureus* в этих вспышках. От всех или подавляющего большинства больных были выделены изоляты *S. aureus* с одинаковыми *coa*-ПЦР-ПДРФ паттернами: в Санкт-Петербурге 514(219;214;81); на форуме «Селигер-2014» 433(219;214); и в Якутске 595(300;214;81). При поиске генов патогенности, был выявлен ген энтеротоксина А в изолятах *S. aureus* из Санкт-Петербурга и Тверской области, и гены энтеротоксинов А и В в изолятах *S. aureus*, выделенных в Якутске. Все изоляты *S. aureus* с *coa*-ПЦР-ПДРФ паттерном 595(300;214;81), выделенные от больных в Якутске, несли ген энтеротоксина В, часть из них также несла ген энтеротоксина А (Таблица 3.2). Таким образом, установлено, что возбудителями указанных вспышек инфекций являются золотистые стафилококки, кодирующие гены энтеротоксинов.

При анализе изолятов *S. aureus*, выделенных из пищевых продуктов и от сотрудников пищеблоков при расследовании вышеперечисленных вспышек, были обнаружены изоляты *S. aureus*, имеющие одинаковые *coa*-ПЦР-ПДРФ паттерны с изолятами, выделенными от больных, а также несущие те же гены энтеротоксинов. Таким образом, в краткие сроки без использования методов сиквенс-типирования появилась возможность определить предполагаемую эпидемиологическую цепочку распространения возбудителя.

Методами сиквенс-типирования установлено, что штаммы *S. aureus*, вызвавшие вспышки пищевой инфекции в Санкт-Петербурге и в Тверской области на форуме «Селигер-2014» относятся к клональному комплексу СС30 и имеют *sra*-типы

t2509 и t122, соответственно. Штаммы *S. aureus*, вызвавшие вспышку пищевой инфекции в Якутске относятся к клональному комплексу CC1 и имеют *spa*-тип t948. По литературным данным, оба клональных комплекса *S. aureus* выделяются при пищевой инфекции. Интересно отметить, что изоляты *S. aureus*, выделенные из пищевых продуктов при вспышке в Якутске также разделились на две части, одна из которых имела только ген энтеротоксина В, другая несла гены энтеротоксинов А и В одновременно (Таблица 3.3). В литературе не описано случаев одновременного выделения при вспышках инфекций родственных штаммов *S. aureus* с разным набором генов энтеротоксинов. Можно предположить, что в данном случае наблюдается формирование новых эпидемических линий *S. aureus* за счёт приобретения/утраты фаговой ДНК, в которой закодирован ген энтеротоксина А.

Использование алгоритма экспресс-анализа изолятов *S. aureus*, позволило в краткие сроки определить возбудителя инфекции и источник распространения пищевой инфекции. Для подтверждения полученных результатов и определения клональных комплексов возбудителей проводилось сиквенс-типирование исследуемых изолятов *S. aureus*. Таким образом, при расследовании массовых вспышек пищевой инфекции, разработанный алгоритм показал высокую эффективность при определении этиологического возбудителя и прослеживания эпидемиологической цепочки его распространения.

Остальные четыре вспышки пищевой инфекции, произошедшие в 2014 году в Саранске, на поезде Абакан-Москва, в 2016 году в городе Верещагино Пермского края и в 2018 году в Якутске, также носили массовый характер, при этом большинство пострадавших были детьми школьного возраста. Так, в Саранске, Верещагино и Якутске пострадало 125 человек, в поезде Абакан-Москва пострадало 58 человек. Таким образом, всего пострадало 183 человека, из которых только 11 взрослых; 101 человек были госпитализированы (Таблица 3.1). Для проведения расследования исследовали 46 изолятов *S. aureus*, выделенных от больных, 14 от сотрудников пищеблоков, 13 из пищевых продуктов и 2 из смывов с оборудования (Таблица 3.2).

Исследование изолятов *S. aureus*, выделенных от больных, методом *coa*-ПЦР-ПДРФ показало, что большинство изолятов имеют одинаковые *coa*-ПЦР-

ПДРФ паттерны. Так, среди изолятов *S. aureus*, полученных от больных в Саранске, все изоляты имели *coa*-ПЦР-ПДРФ паттерн 676(243;219;214); на поезде Абакан-Москва все изоляты *S. aureus*, кроме одного, имели паттерн 676(295;243;138); в Пермском крае у большинства больных выявлен паттерн 595(219;214;162), за исключением двух изолятов *S. aureus*; в Якутске среди возбудителей был выявлен паттерн 595(300;214;81). В результате были выявлены доминирующие *coa*-ПЦР-ПДРФ паттерны среди изолятов *S. aureus*, выделенных от больных, что с высокой вероятностью говорит о том, что данные изоляты могут являться возбудителями пищевой инфекции.

Для подтверждения способности полученных изолятов *S. aureus* вызывать пищевую инфекцию, методом ПЦР был осуществлён поиск основных генов энтеротоксинов. Установлено, что изоляты *S. aureus*, выделенные от больных в Саранске, несут ген энтеротоксина В; большинство изолятов *S. aureus*, выделенных от больных на поезде Абакан-Москва и в Пермском крае, несут ген энтеротоксина А; изоляты *S. aureus*, выделенные в Якутске, несли гены энтеротоксинов А и В.

Для определения источника инфекции поиск генов энтеротоксинов и *coa*-ПЦР-ПДРФ типирование было проведено для изолятов *S. aureus*, полученных от сотрудников пищеблоков, из пищевых продуктов и из смывов с оборудования. Было установлено, что изоляты *S. aureus*, выделенные из пищевых продуктов в Саранске, несут ген энтеротоксина В, в то время как изоляты *S. aureus*, выделенные из пищевых продуктов во время вспышек на поезде Абакан-Москва и в Пермском крае, несут ген энтеротоксина А. Изоляты *S. aureus*, выделенные в Пермском крае со смывов с оборудования, несли ген энтеротоксина А, а изоляты *S. aureus*, выделенные в Якутске, несут одновременно гены энтеротоксинов А и В. В перечисленных вспышках изоляты *S. aureus*, выделенные из пищевых продуктов и со смывов с оборудования, имеют те же *coa*-ПЦР-ПДРФ паттерны, что и изоляты *S. aureus*, выделенные от больных. Все изоляты *S. aureus*, выделенные от сотрудников пищеблока на поезде Абакан-Москва, кроме одного, и от сотрудников пищеблока в Пермском крае, также несут ген энтеротоксина А и имеют те же *coa*-ПЦР-ПДРФ паттерны, что и изоляты *S. aureus*, выделенные от больных. В изолятах *S. aureus*,

выделенных от сотрудников пищеблока в Саранске, не обнаружено генов энтеротоксинов, также они имеют другие *coa*-ПЦР-ПДРФ паттерны. Таким образом, можно установить, что инфекция распространялась через обсеменённые энтеротоксин-продуцирующими штаммами *S. aureus* пищевые продукты. Возможным источником энтеротоксин-продуцирующих стафилококков на поезде Абакан-Москва и в Пермском крае могут быть сотрудники пищеблока. Таким образом, были определены возбудители трёх вышеперечисленных вспышек пищевой инфекции в краткие сроки до использования методов секвенирования, требующих дорогостоящего оборудования и подготовки персонала.

Таблица 3.3 – 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	<i>sea, tst</i>	SEA	+	-
Саранск, 2014	CC12, t888	<i>seb</i>	SEB	+	-
«Селигер-2014», 2014	CC30, t122	<i>sea, tst</i>	SEA	+	+
Поезд Абакан-Москва, 2014	CC5, t002	<i>sea, tst</i>	SEA	+	+
Якутск, 2015	CC1, t948	<i>seb</i> <i>sea, seb</i>	SEB SEA, SEB	+	-
Верещагино (Пермский край), 2016	CC1	<i>sea, tst</i>	ND ⁴	+	+
Якутск, 2018	CC1, t127	<i>sea, seb</i>	ND	+	ND

¹ При расследовании вспышки пищевой инфекции, произошедшей в Якутске в 2015 году, в 29 исследуемых изолятах *S. aureus* был выявлен ген энтеротоксина В, в 19 из них также был выявлен ген энтеротоксина А.

² Проверка на продукцию энтеротоксинов показала, что изоляты, в которых был обнаружен только ген энтеротоксина В, не продуцируют энтеротоксин А.

³ «+» - был обнаружен выявленный штамм-возбудитель инфекции; «-» - штамм-возбудитель инфекции не был выделен.

⁴ Проверка на продукцию энтеротоксинов не проводилась.

Методами сиквенс-типирования был определены клональные комплексы изолятов *S. aureus*, возбудителей пищевой инфекции. Было установлено, что возбудитель пищевой инфекции в Саранске относится к CC12 и имеет *sra*-тип t888; возбудитель вспышки инфекции на поезде Абакан-Москва относится к CC5 и имеет *sra*-тип t002; возбудитель инфекции в Верещагино относится к CC1, *sra*-тип не определён; возбудитель вспышки инфекции в Якутске в 2018 г. относится к CC1 и имеет *sra*-тип t127. В литературе для всех обнаруженных клональных комплексов *S. aureus* описаны случаи возникновения пищевой инфекции.

Таким образом, при расследовании вышеперечисленных вспышек пищевой инфекции в краткие сроки до использования методов сиквенс-типирования выявлены этиологические возбудители инфекции и определена взаимосвязь между изолятами *S. aureus*, выделенными от больных, от сотрудников пищеблоков, из пищевых продуктов и со смывов с оборудования. Методами сиквенс-типирования определены клональные комплексы *S. aureus*, вызвавшие вспышки пищевой инфекции, что важно для отслеживания эпидемиологической обстановки (Таблица 3.3). В трёх вспышках с помощью разработанного алгоритма исследования изолятов *S. aureus* удалось в краткие сроки выявить, что возбудителем является не *S. aureus*. В остальных семи вспышках пищевой инфекции возбудителями являлись штаммы *S. aureus*, относящиеся к четырём различным клональным комплексам: CC1, CC5, CC12 и CC30 (Рисунок 3.2, Таблица 3.3). Стоит отметить, что перечисленные клональные комплексы *S. aureus* являются одними из самых частых возбудителей пищевой инфекции в мире. Так, нередко при расследовании вспышек пищевой инфекции, в Европе выявляются штаммы *S. aureus* CC5 и CC30 [12]. Штаммы *S. aureus* других клональных комплексов выявляются гораздо реже. Отдельно стоит отметить, что в четырёх из шести вспышек пищевой инфекции, заболевание было вызвано штаммами *S. aureus*, способными продуцировать энтеротоксин А и токсин синдрома токсического шока одновременно. Остальные вспышки пищевой инфекции были вызваны штаммами *S. aureus*, продуцирующими энтеротоксин В. Стоит отметить, что при расследовании вспышек пищевой инфекции в Якутске в 2015 и в 2018 годах были выявлены штаммы *S. aureus*, несущие помимо гена энтеротоксина В, также и ген энтеротоксина А. Интересно, что при изучении изолятов *S. aureus*, выделенных от сотрудников пищеблоков в нескольких случаях, был обнаружен ген энтеротоксина С. Подобные штаммы могут быть потенциальными возбудителями пищевой инфекции.

Часть изученных изолятов *S. aureus*, имеющих гены энтеротоксинов, была проверена на продукцию энтеротоксинов с помощью набора RIDASCREEN® SET

А,В,С,Д,Е (Таблица 3.3). Все исследованные штаммы *S. aureus* продуцировали энтеротоксины. Было показано, что изоляты *S. aureus* из Якутска, несущие гены энтеротоксинов А и В одновременно, продуцируют оба энтеротоксина.



Рисунок 3.2 – Клональные комплексы штаммов *S. aureus*, вызвавших вспышки пищевой инфекции в период с 2013 по 2018 гг.

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

В период с 2012 по 2016 гг. было расследовано 10 вспышек инфекций эксфолиативного дерматита новорождённых, зарегистрированных в 6 городах РФ (Таблица 3.4, Рисунок 3.3). Основным симптомом данной инфекции является отслоение верхних слоёв эпидермиса, что приводит к образованию пузырей на коже, заполненных жидкостью. Было получено 303 изолята *S. aureus*, из них 87 от заболевших, 169 от сотрудников медицинских учреждений, 25 из объектов окружающей среды и 23 от родственников заболевших (Таблица 3.5).

Изоляты *S. aureus* исследовали в соответствии с разработанным алгоритмом с учётом специфики эксфолиативного дерматита новорождённых. Полученные изоляты проверяли на принадлежность к виду *S. aureus* методом ПЦР с праймерами на ген стафилококковой нуклеазы (*nuc*) и на переменный участок гена коагулазы (*coa*), а также оценивали чистоту полученных культур *S. aureus*. Далее методом *coa*-ПЦР-ПДРФ оценивали генетическую близость исследуемых изолятов *S. aureus*. Накопленная в процессе работы база данных позволяет соотносить полученные *coa*-ПЦР-ПДРФ паттерны исследуемых изолятов с теми *coa*-ПЦР-ПДРФ паттернами, которые наиболее часто встречаются у возбудителей эксфолиативного дерматита новорождённых в РФ и ассоциированы с наличием генов эксфолиативных токсинов, продукты которых обеспечивают характерную клиническую картину инфекции.



Рисунок 3.3 – Локализация расследованных в данной работе вспышек эксфолиативного дерматита новорождённых в период с 2012 по 2016 гг.

Методом ПЦР осуществляли поиск генов эксфолиативных токсинов А и В, продукты которых способны разрушать десмоглеин I, тем самым вызывая отслое-

ние верхних слоёв эпидермиса. Затем проводили типирование исследуемых изолятов *S. aureus* методами сиквенс-типирования: *spa*- и МЛСТ-типирование. Данные методы формализованы и обеспечивают возможность сравнения с характеристиками штаммов *S. aureus*, опубликованных в открытых базах данных. Приведённый подход позволяет определить возбудителя эксфолиативного дерматита новорождённых и проследить его взаимосвязь с изолятами, выделенными от носителей и из окружающей среды.

Таблица 3.4 – 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 исследовании изолятов *S. aureus* выделенных при вспышках эксфолиативного дерматита новорождённых были выделены штаммы – возбудители инфекции, кодирующие один или два гена эксфолиативных токсинов. Две вспышки эксфолиативного дерматита новорождённых были зарегистрированы в родильных домах г. Оренбург в 2012 и 2014 гг., в которых пострадали 21 и 8 новорождённых, соответственно. В одном из родильных домов г. Белгород с разницей около года произошло две вспышки эксфолиативного дерматита новорождённых в 2013 и

2014 г., в которых пострадало 10 и 13 новорождённых, соответственно. В родильном доме г. Псков в 2014 г. от эксфолиативного дерматита новорождённых пострадало 16 новорождённых, в родильном доме г. Южно-Сахалинск в 2015 г. пострадало 8 новорождённых, в родильном доме г. Ульяновск в 2016 г. пострадало 5 новорождённых. В результате, всего за период с 2012 по 2016 гг. в родильных домах в разных регионах России от эксфолиативного дерматита новорождённых пострадало 82 ребёнка (Таблица 3.4). Для проведения исследований вышеперечисленных вспышек эксфолиативного дерматита новорождённых было получено 294 изолята *S. aureus*, из них 80 были выделены от больных, 166 от сотрудников родильных домов, 23 от родственников заболевших и 25 со смывов с объектов окружающей среды (Таблица 3.5).

Таблица 3.5 – Количество изолятов *S. aureus*, изученных в ходе расследования вспышек эксфолиативного дерматита новорождённых

Место и год возникновения вспышки	Количество изолятов, шт.			Всего изолятов
	от заболевших	от сотрудников / родственников	с объектов окружающей среды	
Оренбург, 2012	14	25 / 5	0	45
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

Методом *coa*-ПЦР-ПДРФ типирования было установлено, что большинство изолятов *S. aureus*, выделенных от больных в вышеперечисленных вспышках эксфолиативного дерматита новорождённых, относятся к одному *coa*-ПЦР-ПДРФ паттерну, за исключением вспышки, зарегистрированной в 2016 году в родильном доме г. Ульяновск. Два изолята *S. aureus*, выделенные от больных в родильном доме г. Ульяновск, имели *coa*-ПЦР-ПДРФ паттерн 595(214;162;138;81), один изолят *S. aureus* имел *coa*-ПЦР-ПДРФ паттерн 838(324;295;219). Точно такой же *coa*-

ПЦР-ПДРФ имели большинство изолятов *S. aureus*, выделенные от больных в родильных домах г. Оренбург в 2012 году и г. Южно-Сахалинск в 2015 г. В двух вспышках эксфолиативного дерматита новорождённых, зарегистрированных в родильных домах г. Белгород в 2013 г. и г. Псков в 2014 г. большинство изолятов *S. aureus*, выделенные от больных, имели *coa*-ПЦР-ПДРФ паттерн 514(300;214). Большая часть изолятов *S. aureus*, выделенных от больных во время вспышки в Оренбурге в 2014 г. имели *coa*-ПЦР-ПДРФ паттерн 676(381;295), выделенные во время вспышки в г. Белгород в 2014 г. имели *coa*-ПЦР-ПДРФ паттерн 595(214;162;138;81) (Таблица 3.6). Таким образом, в трёх вспышках среди выделенных от больных изолятов *S. aureus*, преобладали изоляты с *coa*-ПЦР-ПДРФ паттерном 838(324;295;219), в двух преобладали изоляты с *coa*-ПЦР-ПДРФ паттерном 514(300;214), и по одной вспышке, в которых преобладали изоляты *S. aureus* с *coa*-ПЦР-ПДРФ паттернами 676(381;295) и 595(214;162;138;81).

Таблица 3.6 – Молекулярно-генетические характеристики штаммов *S. aureus* – возбудителей эксфолиативного дерматита новорождённых

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

При определении генов эксфолиативных токсинов, в семи вспышках эксфолиативного дерматита новорождённых был выявлен штамм *S. aureus*, кодирующий ген эксфолиативного токсина А. В двух вспышках эксфолиативного дерматита новорождённых, зарегистрированных в Оренбурге в 2012 году и в Южно-Сахалинске в 2015 году, были обнаружены штаммы *S. aureus*, несущие одновременно гены эксфолиативных токсинов А и В. Интересно отметить, что *coa*-ПЦР-ПДРФ паттерн у данных штаммов *S. aureus* был одинаковым: 838(324;295;219). Таким образом,

были изолированы штаммы *S. aureus*, являющиеся возбудителями инфекции и кодирующими один или два эксфолиативных токсина.

Отдельно стоит отметить, что штаммы *S. aureus*, несущие гены эксфолиативных токсинов, но выделенные от сотрудников родильных домов, были выявлены только в трёх вспышках: в 2013 году в родильном доме г. Белгород, в 2014 году в родильном доме г. Оренбург и в 2016 году в родильном доме г. Ульяновск. При этом, *coa*-ПЦР-ПДРФ паттерн совпадал с выделенными от больных детей только в одном случае, в 2014 году в Оренбурге. Наиболее интересным является тот факт, что штамм *S. aureus*, выделенный от сотрудников в родильном доме города Белгород в 2013 году имеет тот же *coa*-ПЦР-ПДРФ паттерн, что и выделенный от заболевших детей в том же родильном доме в 2014 году.

Методами сиквенс-типирования было установлено, что из семи вспышек эксфолиативного дерматита новорождённых, четыре были вызваны штаммами *S. aureus*, относящимися к СС121, при этом они имели *coa*-ПЦП-ПДРФ паттерны в одном случае 676(381;295) и в трёх случаях 838(324;295;219) (Таблица 3.6). В двух вспышках были выявлены штаммы *S. aureus* СС15, которые имели *coa*-ПЦР-ПДРФ паттерн 514(300;214).

В Белгороде в 2013 году при вспышке эксфолиативного дерматита новорождённых среди сотрудников и в 2014 году у заболевших был выявлен уникальный штамм *S. aureus* СС8, несущий ген эксфолиативного токсина А. В литературе отсутствуют данные о встречаемости в штаммах *S. aureus* СС8 гена *eta*. Это первый случай возникновения эксфолиативного дерматита новорождённых, вызванный *S. aureus* данного клонального комплекса.

Таким образом, за период с 2012 по 2016 гг. было расследовано 8 вспышек эксфолиативного дерматита новорождённых, произошедших в родильных домах на территории Российской Федерации. Спорадический случай, зарегистрированный в г. Химки позволил продемонстрировать эффективность используемого алгоритма расследования вспышек, благодаря которому в краткие сроки было установлено, что среди полученных для проведения расследования изолятов *S. aureus* воз-

будитель отсутствует. В остальных семи случаях в результате проведения расследования были установлены штаммы-возбудители, которые относятся к трём клональным комплексам: CC8, CC15 и CC121. Из семи случаев четыре были вызваны штаммами *S. aureus* CC121. Три вспышки эксфолиативного дерматита новорождённых были вызваны штаммами *S. aureus* CC15, которые оказались вторыми по частоте встречаемости. Эти данные согласуются с данными, полученными Lamand et al, 2012 [25].

Интересно отметить тот факт, что штаммы *S. aureus* CC121 при вспышках эксфолиативного дерматита новорождённых выделялись в Восточном регионе России, в то время как штаммы *S. aureus* CC15 – в Западном. Штамм *S. aureus* клонального комплекса CC8, способный вызывать эксфолиативный дерматит новорождённых, также был обнаружен в Западном регионе России.

При вспышке эксфолиативного дерматита новорождённых, произошедшей в Ульяновске в 2016 г., был выявлен штамм *S. aureus* CC9, кодирующий эксфолиативный токсин А и способный, по литературным данным, вызывать эксфолиативный дерматит новорождённых. По данным Botka et al. [236], штаммы данного клонального комплекса распространены, в основном, в Чехии и Польше. Штаммы *S. aureus* CC9 являются третьими по частоте встречаемости при эксфолиативном дерматите новорождённых в мире.

Таким образом, по результатам исследований за период с 2012 по 2016 года были идентифицированы штаммы *S. aureus*, возбудители эксфолиативного дерматита новорождённых. Отдельно стоит отметить уникальный штамм *S. aureus* клонального комплекса CC8. Только в двух случаях при вспышке эксфолиативного дерматита новорождённых от сотрудников и/или носителей были выделены изоляты *S. aureus* с теми же генетическими маркерами, что и от заболевших новорождённых. Изолятов *S. aureus* с генами эксфолиативных токсинов, выделенных из объектов окружающей среды, обнаружено не было.

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

Для изучения генетического разнообразия возбудителей вспышек стафилококковой пищевой инфекции, было отобрано 23 штамма *S. aureus*, выделенных в шести регионах России (Таблица 3.7).

Таблица 3.7 – Генотипы штаммов *S. aureus*, изолированных при вспышках пищевой инфекции в РФ в период с 2013 по 2018 гг.

Штамм	Клональный комплекс	Сиквенс-тип	<i>sra</i> -тип	<i>coa</i> -ПЦР-ПДРФ	Место и год выделения
B-7438	CC30	ST30	t2509	514(219;214;81)	Санкт-Петербург, 2013
B-7439	CC30	ST30	t2509	514(219;214;81)	Санкт-Петербург, 2013
B-7778	CC30	ST30	t122	433(219;214)	«Селигер-2014», 2014
B-7779	CC30	ST30	t122	433(219;214)	«Селигер-2014», 2014
B-8380	CC12	ST12	t888	676(243;219;214)	Саранск, 2014
B-8475	CC12	ST12	t888	676(243;219;214)	Саранск, 2014
B-8476	CC12	ST12	t888	676(243;219;214)	Саранск, 2014
B-8477	CC12	ST12	t888	676(243;219;214)	Саранск, 2014
B-8472	CC15	новый	t084	514(300;214)	Ульяновск, 2014
B-8473	CC15	новый	t084	514(300;214)	Ульяновск, 2014
B-8474	CC15	новый	t084	514(300;214)	Ульяновск, 2014
B-8478	CC5	ST5	t002	676(295;243;138)	Поезд Абакан-Москва, 2014
B-8479	CC5	ST5	t002	676(295;243;138)	Поезд Абакан-Москва, 2014
B-8480	CC5	ST5	t002	676(295;243;138)	Поезд Абакан-Москва, 2014
B-7903	CC1	ST1	t948	595(300;214;81)	Якутск, 2015
B-7904	CC1	ST1	t948	595(300;214;81)	Якутск, 2015
B-7905	CC1	ST1	t948	595(300;214;81)	Якутск, 2015
B-7906	CC1	ST1	t948	595(300;214;81)	Якутск, 2015
B-7907	CC1	ST1	t948	595(300;214;81)	Якутск, 2015
B-7908	CC1	ST1	t948	595(300;214;81)	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

Полногеномное секвенирование проводилось на платформах Ion Torrent PGM (Life Technologies, США) и Illumina MiSeq (Illumina, США). В результате для штаммов *S. aureus* B-7438, B-7439, B-7778, B-7779, B-7904, B-7905, B-7906 и B-7907 было получено 860392, 445398, 705890, 1354128, 601444, 1168235, 466955 и 402992 ридов, соответственно. Сборку штаммов *S. aureus* B-7438, B-7439, B-7778 и B-7779 проводили с помощью Newbler 2.9, штаммов B-7904, B-7905, B-7906 и B-7907 с помощью SPAdes 3.8.1. Все полученные последовательности геномов *S. aureus* были размещены в GenBank под номерами LWRA00000000,

LWRB00000000, LWRC00000000, LWRD00000000, NIDA00000000, NIDB00000000, NIDD00000000 и NIDC00000000, соответственно (Таблица 3.8).

Для штаммов *S. aureus* В-8775, В-8776, В-8777, выделенных при вспышке пищевой инфекции в Якутске в 2018 г., полногеномное секвенирование осуществлялось на платформе Illumina MiSeq. В результате было получено 625249, 968700 и 504094 ридов, соответственно. Сборку геномов секвенированных штаммов осуществляли с помощью SPAdes 3.13.0.

Для анализа полученных полногеномных последовательностей использовали программы *wombac*, *Mauve*, *SplitsTree*, *MEGAX*, *Ugene*, *VirulenceFinder*, *PlasmidFinder*, *PHASTER*, *BLAST*, *BRIG*. Аннотация собранных геномов была проведена при помощи инструмента *NCBI Prokaryotic Genome Annotation Pipeline*.

Таблица 3.8 – Данные полногеномного секвенирования штаммов *S. aureus*, выделенных во время вспышек пищевой инфекции

Штамм	Количество ридов	Общая длина контигов	Глубина покрытия	Всего контигов (>200 bp)	Наибольший контиг (bp)	Количество CDS	Номер GenBank
В-7438	860,392	2,794,755	50	75	251,119	2,798	LWRA00000000
В-7439	445,398	2,792,264	25	94	251,116	2,804	LWRB00000000
В-7778	705,890	2,745,109	54	80	265,929	2,744	LWRC00000000
В-7779	1,354,128	2,750,534	112	72	370,416	2,744	LWRD00000000
В-7903	1,504,110	2,685,414	104	91	1,105,130	2,693	SDXI00000000
В-7904	601,444	2,748,412	40	56	513,336	2,788	NIDA00000000
В-7905	1,168,235	2,704,426	72	40	379,542	2,720	NIDB00000000
В-7906	466,955	2,700,794	28	48	183,938	2,715	NIDD00000000
В-7907	402,992	2,752,673	23	93	289,039	2,804	NIDC00000000
В-7908	1,262,136	2,685,876	153	33	1,105,163	2,777	SDXH00000000
В-8380	667,818	2,729,935	28	77	278,852	2,809	PXVB00000000
В-8472	1,057,164	2,714,280	73	39	611,131	2,764	SJEM00000000
В-8473	2,042,598	2,713,576	142	35	611,199	2,762	SJEN00000000
В-8474	412,610	2,713,906	35	37	612,088	2,765	SJEO00000000
В-8475	583,554	2,755,425	31	273	136,739	2,975	SDWP00000000
В-8476	957,880	2,724,362	89	32	1,297,085	2,775	SDWQ00000000
В-8477	835,018	2,728,208	39	70	462,990	2,808	SJEL00000000
В-8478	797,162	2,752,378	46	41	697,422	2,808	SJEI00000000
В-8479	1,144,390	2,752,026	67	41	696,643	2,803	SJEJ00000000
В-8480	511,486	2,752,116	67	39	784,273	2,799	SJEK00000000
В-8775	625249	2,741,534	30	18	530,949	-	-
В-8776	968700	2,742,210	41	22	850,291	-	-
В-8777	504094	2,742,719	35	19	850,436	-	-

После получения аннотированных полногеномных последовательностей был проведён поиск мобильных генетических элементов и генов вирулентности. Выявлено, что штаммы *S. aureus* СС30: В-7438, В-7439 (Санкт-Петербург, 2013), В-7778

и В-7779 (Селигер, 2014), имеют идентичный набор МГЭ и генов вирулентности (Таблицы 3.9 и 3.10). В данных штаммах *S. aureus* не обнаружено плазмид, присутствуют острова патогенности 2 и 4 типов и кластер генов энтеротоксинов. Штаммы *S. aureus* СС1, выделенные в Якутске, несут плазмиду, идентичную рMW2, и остров патогенности 3 типа. Штаммы *S. aureus* В-7904, В-7905, В-7906 и В-7907 (Якутск, 2015), различаются наличием профага, несущего ген энтеротоксина А. Данный профаг присутствует в штаммах *S. aureus* В-7904 и В-7907 (Таблица 3.10). Аналогичные штаммы *S. aureus* СС1: В-8775, В-8776 и В-8777, были выделены в 2018 году в Якутске при вспышке пищевой инфекции (Таблица 3.9), для которых также показана гетерогенность по наличию профага, несущего ген энтеротоксина А.

Таким образом, при изучении полногеномных последовательностей штаммов *S. aureus*, было установлено, что штаммы, выделенные при вспышках пищевой инфекции в Санкт-Петербурге в 2013 году и в 2014 году на форуме «Селигер-2014», обладают идентичными наборами МГЭ и факторов вирулентности. Штаммы *S. aureus*, выделенные во время вспышки пищевой инфекции в Якутске в 2015 и 2018 годах, согласно данным полногеномного анализа имеют варианты по носительству профага, несущего ген энтеротоксина А.

Полученные полногеномные последовательности анализировали на наличие генов вирулентности с помощью сервиса VirulenceFinder на сервере genomicerpidemiology.org. Стоит отметить, что в геномах штаммов *S. aureus* СС30 присутствует кластер egc третьего типа, несущий шесть генов энтеротоксин-подобных белков (*seg, sei, sem, sen, seo, seu*), а также ген токсина синдрома токсического шока *tst*, локализованный на острове патогенности второго типа. В геномах штаммов *S. aureus* СС1 выявлены гены лейкоцидина LukED, энтеротоксинов В и Н, кластер egc и ген *tst* в этих геномах отсутствуют.

Таблица 3.9 – Гены вирулентности, обнаруженных в геномах секвенированных штаммов *S. aureus*, возбудителей пищевой инфекции

Ген	Кодируемый продукт	Штамм																						
		CC1							CC5			CC12			CC15			CC30						
		B-7903	B-7904	B-7905	B-7906	B-7907	B-7908	B-8775	B-8776	B-8777	B-8478	B-8479	B-8480	B-8380	B-8475	B-8476	B-8477	B-8472	B-8473	B-8474	B-7438	B-7439	B-7778	B-7779
aur	aureolysin	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
splA	serine protease splA	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
splB	serine protease splB	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
splE	serine protease splE	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+
sak	staphylokinase	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+
scn	staphylococcal complement inhibitor	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
hlgA	gamma-hemolysin chain II precursor	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
hlgB	gamma-hemolysin component B precursor	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
hlgC	gamma-hemolysin component C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
sea	enterotoxin A	-	+	-	-	+	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	
seb	enterotoxin B	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
sed	enterotoxin D	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
seg	enterotoxin G	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	
seh	enterotoxin H	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
sei	enterotoxin I	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	
sej	enterotoxin J	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
sek	enterotoxin K	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
sem	enterotoxin M	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	
sen	enterotoxin N	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	
seo	enterotoxin O	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	
sep	enterotoxin P	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
seq	enterotoxin Q	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ser	enterotoxin R	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
seu	enterotoxin U	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	
tst	toxic shock syndrome toxin-1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	
lukD	leukocidin D component	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	
lukE	leukocidin E component	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	
eta	exfoliative toxin A	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-

Дополнительный геном штаммов *S. aureus* CC1 и CC30 отличается, при этом выявлена ассоциация между набором МГЭ и клональным комплексом, соответственно, отличается набор генов вирулентности, которые переносятся с помощью МГЭ. Можно предположить, что это связано со структурой генома, с которой взаимодействуют МГЭ.

Сравнительный полногеномный анализ штаммов *S. aureus* осуществляли с помощью программы wotbac для определения филогенетических связей по коровым SNP изучаемых штаммов *S. aureus*.

Таблица 3.10 – 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		Плаزمид (аналог)	Кластер egc
		SaPI2 (<i>tst</i>)	SaPI3 (<i>seb</i>)	SaPI4	Sa1int (<i>eta</i>)	Sa3int (<i>sea/sep</i>)		
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. ¹	-	-	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).

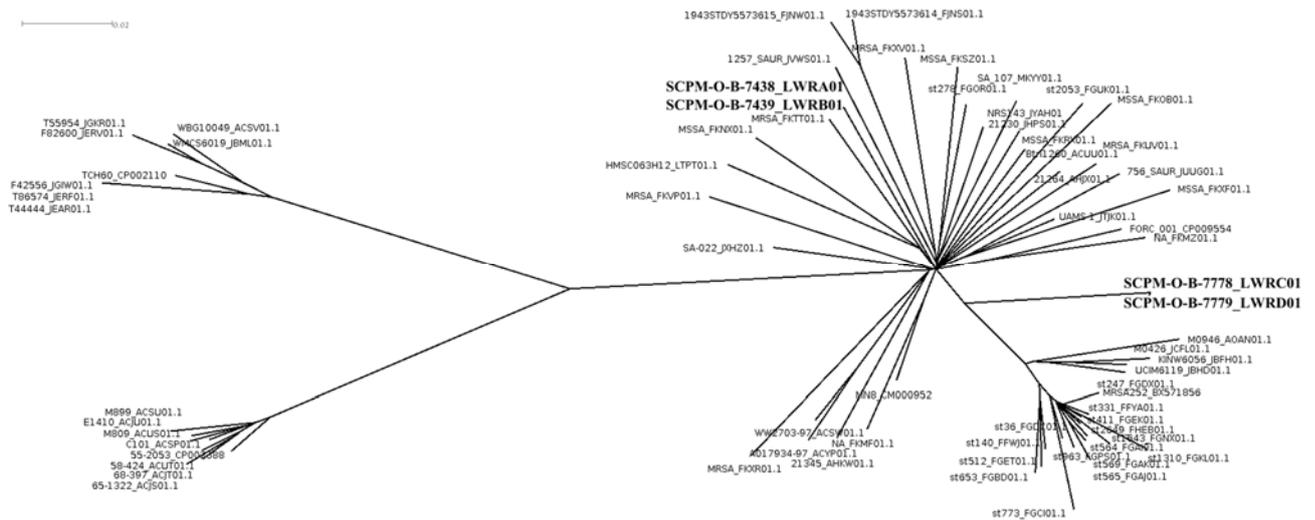


Рисунок 3.4 – Филогенетическое дерево штаммов *S. aureus* CC30, построенное на основе 7729 коровых SNP, определённых с помощью программы wombas в 71 геноме штаммов *S. aureus*. Визуализация с помощью SplitsTree

Для этого с помощью сервиса NCBI Genome Neighbor report были отобраны 67 геномных последовательностей *S. aureus* клонального комплекса CC30 с идентичностью к геному штамма В-7778 до 96,5758 %. Отобранные полногеномные последовательности были проверены на принадлежность к клональному комплексу CC30 с помощью сервиса MLST 2.0 (Multi-Locus Sequence Typing) на сервере genomiceridemiology.org. Таким образом, для построения филогенетического дерева штаммов *S. aureus* клонального комплекса CC30 была использована 71 последовательность геномов штаммов *S. aureus*, четыре из которых (В-7438, В-7439, В-7778 и В-7779) были получены нами.

Установлено, что штаммы *S. aureus* CC30 разделяются на три большие группы (клады): группа фагового типа 80/81, состоящая из восьми штаммов, включая штамм 55-2053; группа гипервирулентных для лабораторных животных штаммов MRSA, состоящая также из восьми штаммов, в том числе TCH60; и группа штаммов *S. aureus*, в которую входят MRSA252 и MN8, наиболее активно эволюционирующие в настоящее время (Рисунок 3.4). Последняя группа подразделяется также на два кластера, в один из которых входят штаммы *S. aureus*, близкие к штамму MRSA252, а во второй входят штаммы *S. aureus*, близкие к штамму MN8 (Рисунок 3.4). Интересно, что штаммы *S. aureus* В-7778 и В-7779, выделенные во

время вспышки пищевой инфекции на форуме «Селигер-2014», на филогенетическом дереве находятся обособленно, формируя собственный подкластер. В то же время штаммы *S. aureus* В-7438 и В-7439, выделенные во время вспышки пищевой инфекции в Санкт-Петербурге, входят в тот же кластер, что и штамм *S. aureus* MN8.

Аналогичным образом, для проведения сравнительного полногеномного SNP анализа штаммов *S. aureus* клонального комплекса CC1 с помощью сервиса NCBI Genome Neighbor report было отобрано 93 генома штаммов *S. aureus* с идентичностью к геному В-7904 до 97,137 %. Таким образом, для сравнительного полногеномного SNP анализа штаммов *S. aureus* было использовано 100 геномов *S. aureus*. Все отобранные геномы были проверены на принадлежность к CC1 с помощью сервиса MLST 2.0 (Multi-Locus Sequence Typing) на сервере genomicepidemiology.org.

При визуализации полученных данных было установлено, что общая картина филогении штаммов *S. aureus* CC1 сильно отличается от таковой для CC30. В отличие от *S. aureus* CC30, для *S. aureus* CC1 не наблюдается чётко оформленных кластеров. Из наиболее близких к штаммам *S. aureus* В-7904, В-7905, В-7906 и В-7907, вызвавшим вспышку пищевой инфекции в Якутске, стоит отметить четыре штамма *S. aureus*, один из которых выделен из раны пациента, другой из носоглотки носителя, и для последних двух источник выделения не указан (Рисунок 3.5).

Таким образом, методом полногеномного SNP-анализа были выявлены принципиальные отличия в распределении штаммов *S. aureus* CC1 и CC30 на филогенетическом дереве. Существующие штаммы *S. aureus* CC1 равноудалены друг от друга и не образуют кластеров, в то время как штаммы *S. aureus* CC30 формируют, по меньшей мере, три кластера. Были показаны различия между *S. aureus* CC1 и CC30, связанные с переносом генов вирулентности, локализуемых на МГЭ, обнаружена ассоциация между клональным комплексом и МГЭ. Интересно отметить, что для построения филогенетических деревьев на основе коровых геномов штаммов *S. aureus*, с помощью программы *wombac*, для штаммов *S. aureus* CC1 было выявлено примерно в семнадцать раз меньше сайтов, содержащих единичные нук-

3.4.1. Анализ последовательностей SEA-конвертирующих бактериофагов *Staphylococcus aureus*

После получения полногеномных последовательностей штаммов *S. aureus*, возбудителей вспышек пищевой инфекции, был проведён поиск носителей генов энтеротоксинов, обуславливающих клиническую картину данных инфекций. Ген энтеротоксина А переносится в составе бактериофагов Sa3int типа, которые способны интегрироваться в ген *hemB* *S. aureus*, ответственный за продукцию гемолизина В. Интеграция бактериофагов Sa3int типа приводит к негативной конверсии по гену *hemB*.

Для поиска последовательностей профагов, локализованных в геномах секвенированных штаммов *S. aureus* использовались программы Ugene, MEGA, а также онлайн-сервисы PHASTER и BLAST. Были определены последовательности SEA-конвертирующих бактериофагов, обозначенные как phiSEA_B-7438, phiSEA_B-7439, phiSEA_B-7778, phiSEA_B-7779, phiSEA_B-7904, phiSEA_B-7907, phiSEA_B-8775, phiSEA_B-8776 и phiSEA_B-8777 (Таблица 3.12).

Таблица 3.12 – Характеристика SEA-конвертирующих бактериофагов

Бактериофаг	Размер (пн)	Штамм, клональный комплекс, место и год выделения
phiSEA_B-7438	43947	В-7438, СС30, Санкт-Петербург, 2013
phiSEA_B-7439	43947	В-7439, СС30, Санкт-Петербург, 2013
phiSEA_B-7778	43954	В-7778, СС30, «Селигер-2014», 2014
phiSEA_B-7779	43953	В-7779, СС30, «Селигер-2014», 2014
phiSEA_B-7904	42926	В-7904, СС1, Якутск, 2015
phiSEA_B-7907	42927	В-7907, СС1, Якутск, 2015
phiSEA_B-8478	43511	В-8478, СС5, Поезд Абакан-Москва, 2014
phiSEA_B-8479	43511	В-8479, СС5, Поезд Абакан-Москва, 2014
phiSEA_B-8480	43511	В-8480, СС5, Поезд Абакан-Москва, 2014
phiSEA_B-8775	42888	В-8775, СС1, Якутск, 2018
phiSEA_B-8776	42888	В-8776, СС1, Якутск, 2018
phiSEA_B-8777	42889	В-8777, СС1, Якутск, 2018

При проведении сравнительного анализа профагов phiSEA_B-7438, phiSEA_B-7439, phiSEA_B-7778, phiSEA_B-7779, выявленных в геномах штаммов *S. aureus* СС30, было установлено, что последовательности фаговых геномов практически полностью гомологичны и отличаются единичными заменами, которые

могут являться ошибками секвенирования. При сравнительном анализе нуклеотидной последовательности данных бактериофагов с базой данных GenBank, была обнаружена высокая гомология между SEA-конвертирующими бактериофагами, выявленными в секвенированных нами геномах *S. aureus* CC30 и профагом Sa3int типа из генома штамма MRSA252, выделенного при смертельной инфекции в 1998 году. Обнаруженные профаги обладают гомологией на уровне 99,99 %. Таким образом, несмотря на разницу в месте и времени выделения, SEA-конвертирующие бактериофаги в изученных штаммах *S. aureus* CC30 обладают высокой консервативностью.

Сравнительный анализ последовательностей профагов, выявленных в штаммах *S. aureus* CC1, показал, что профаги phiSEA_B-8775 phiSEA_B-8776 и phiSEA_B-8777, из геномов штаммов *S. aureus*, выделенных в Якутске в 2018 г., отличаются от профагов phiSEA_B-7904 и phiSEA_B-7907, выявленных в геномах штаммов *S. aureus* в 2015 г., делецией последовательности из 38 нуклеотидов в области, отвечающей за нуклеотидный обмен бактериофага. При сравнительном анализе с последовательностями SEA-конвертирующих бактериофагов в базе данных GenBank, была выявлена высокая гомология указанных профагов с фагом, локализованным в геноме штамма *S. aureus* MW2.

Для проведения сравнительного анализа, был осуществлён поиск SEA-конвертирующих бактериофагов в базе GenBank среди полногеномных последовательностей штаммов *S. aureus*. Для этого с помощью BLAST определяли геномы *S. aureus*, несущие ген *sea*, после чего искали координаты att сайтов бактериофагов. Всего среди полногеномных последовательностей *S. aureus* было выявлено 35 SEA-конвертирующих бактериофагов, интегрированных в штаммы *S. aureus* шести клональных комплексов: CC1, CC5, CC8, CC30, CC239 и CC398. Таким образом, всего было использовано 44 генома SEA-конвертирующих бактериофагов для проведения филогенетического анализа.

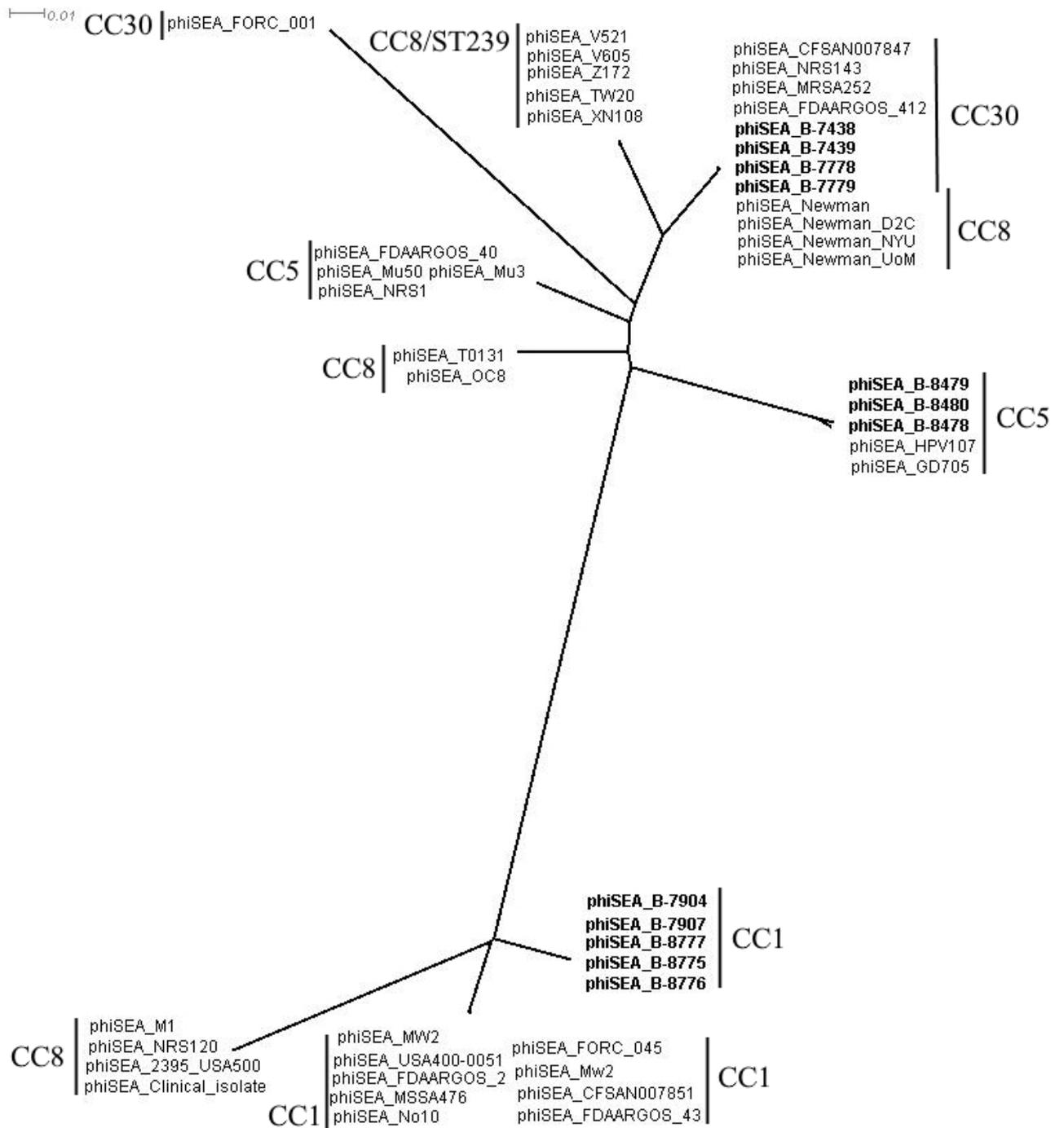


Рисунок 3.6 – Филогенетическое дерево 44 SEA-конвертирующих бактериофагов, построенное на основе полногеномных выравниваний с помощью программы ClustalW. Визуализация SplitsTree, выявлено максимум 20490 различий, из которых 14308 SNP и 6182 разрывов

Для полученных геномов SEA-конвертирующих бактериофагов было проведено выравнивание последовательностей с помощью программы ClustalW. Полученное выравнивание визуализировали с помощью SplitsTree с использованием алгоритма Neighbor-Joining.

Далее был проведён сравнительный анализ последовательностей бактериофагов из разных кластеров с помощью программы Easyfig. Данная программа попарно сравнивает исследуемые последовательности между собой и хорошо работает с аннотированными последовательностями, что позволяет проводить анализ последовательностей генов. Для проведения анализа были выбраны геномы бактериофагов, на филогенетическом дереве входящие в разные кластеры, и выявленные в разных клональных комплексах *Staphylococcus aureus*. Таким образом, всего в анализе участвовали девять геномных последовательностей бактериофагов (Рисунок 3.7).

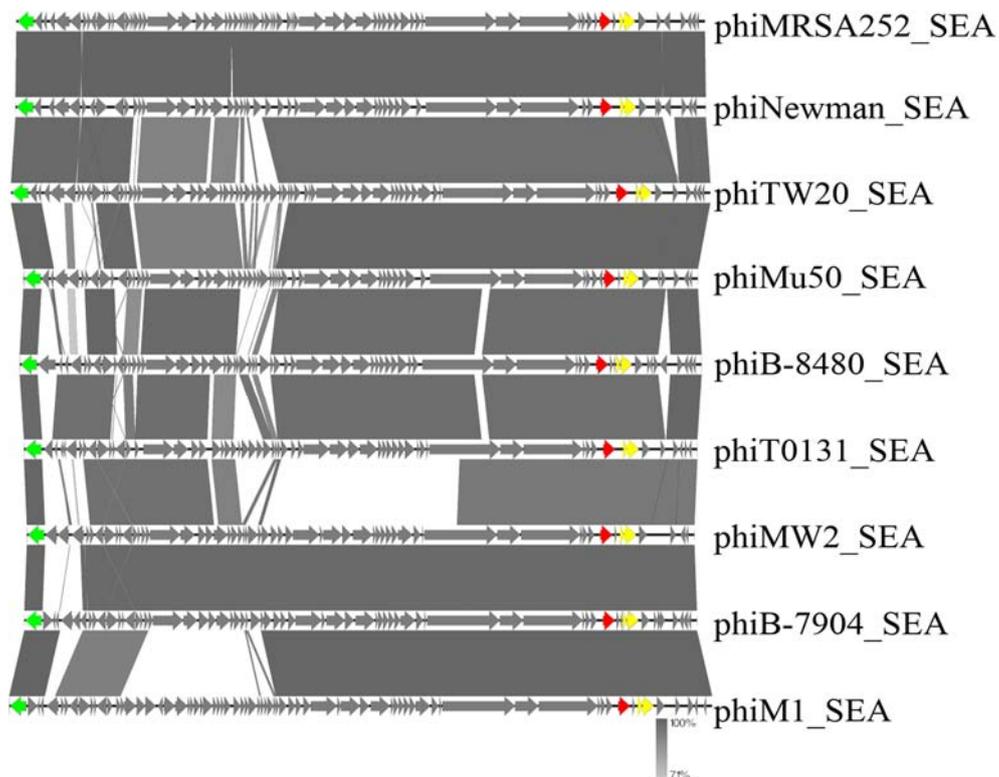


Рисунок 3.7 – Геномные карты SEA-конвертирующих бактериофагов. Зелёный – ген интегразы, жёлтый – гены холина и амидазы, красный – ген энтеротоксина А

Таким образом, геномные последовательности SEA-конвертирующих бактериофагов обладают высокой степенью гомологии в трёх функциональных регионах, отвечающих за интеграцию бактериофага, формирование структурных компонентов и лизис клетки-хозяина. Наибольшим разнообразием обладает регион, кодирующий гены нуклеотидного обмена и их регуляцию. На филогенетическом дереве исследованные бактериофаги формируют кластеры, в основном, ассоциированные с клональными комплексами *S. aureus*, в которых геномы бактериофагов были обнаружены.

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

Для изучения генетического разнообразия возбудителей вспышек эксфолиативного дерматита новорождённых было проведено полногеномное секвенирование 17 штаммов *S. aureus* CC8, CC15 и CC121, представленным в таблице 3.13.

Таблица 3.13 – 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	<i>spa</i> -тип	<i>coa</i> -ПЦР-ПДРФ	Номер GenBank	Место и год выделения
В-7772	CC8	ST2993	t211	595(214;162;138;81)	LJBK00000000	Белгород, 2013
В-7774	CC15	ST15	t084	514(300;214)	LJBL00000000	Белгород, 2013
В-7777	CC8	ST2993	t211	595(214;162;138;81)	LJBM00000000	Белгород, 2014
В-7803	CC121	ST121	t645	838(324;295;219)	PXUZ00000000	Южно-Сахалинск, 2015
В-7804	CC15	ST582	t279	595(381;214)	PXUS00000000	Красногорск, 2015
В-8371	CC121	ST121	t272	838(324;295;219)	SELV00000000	Оренбург, 2012
В-8372	CC121	ST121	t272	838(324;295;219)	PXUW00000000	Оренбург, 2012
В-8374	CC121	новый	t272	676(381;295)	PXUU00000000	Оренбург, 2014
В-8375	CC121	новый	t272	676(381;295)	PXUT00000000	Оренбург, 2014
В-8376	CC121	ST121	t812	757(295;243;219)	PXUX00000000	Оренбург, 2014
В-8377	CC121	ST121	t159	838(324;295;219)	PXUY00000000	Оренбург, 2014
В-8379	CC121	ST121	t645	838(324;295;219)	PXVA00000000	Южно-Сахалинск, 2015
В-8468	CC15	ST582	t084	595(381;214)	SDXL00000000	Москва, 2007
В-8469	CC121	ST121	t308	919(324;295;219;81)	SDXK00000000	Москва, 2007
В-8471	CC121	ST121	t4169	919(324;295;219;81)	SDXJ00000000	Москва, 2007
В-8680	CC15	ST2126	t084	514(300;214)	SGBV00000000	Псков, 2014
В-8681	CC15	ST2126	t084	514(300;214)	SGBW00000000	Псков, 2014

Для штаммов *S. aureus* В-7772, В-7774 и В-7777, выделенных во время вспышки эксфолиативного дерматита новорождённых в Белгороде в 2013 и 2014 гг., секвенирование осуществлялось на платформе Ion Torrent PGM (Life Technologies, США). Остальные штаммы *S. aureus*, несущие ген *eta*, секвенировали на платформе Illumina MiSeq (Illumina, США). Сборку геномов штаммов *S. aureus* В-7772, В-7774 и В-7777 производили с помощью Newbler 2.9, для остальных штаммов использовали программу SPAdes 3.13.0. Для аннотации собранных геномов использовали NCBI Prokaryotic Genome Annotation Pipeline. Объём данных, полученных при секвенировании, результат сборки и аннотации геномов *S. aureus*, представлены в таблице 3.14.

Таблица 3.14 – Результаты проведения полногеномного секвенирования возбудителей эксфолиативного дерматита

Штамм	Количество ридов	Общая длина контигов (пн)	Покры- тие	Всего конти- гов (>200 bp)	Наибольший контиг (пн)	Количество CDS	Номер GenBank
В-7772	737,623	2,777,063	64	79	214,182	2,748	LJBK00000000
В-7774	1,171,947	2,705,467	128	71	213,605	2,625	LJBL00000000
В-7777	525,784	2,778,291	44	59	435,740	2,714	LJBM00000000
В-7803	469,440	2,840,406	30	70	371,303	2,893	PXUZ00000000
В-7804	485,238	2,773,306	37	45	439,257	2,832	PXUS00000000
В-8371	242,642	2,828,435	23	86	230,461	2,758	SELV00000000
В-8372	253,664	2,823,955	23	62	346,439	2,878	PXUW00000000
В-8374	387,501	2,803,954	34	64	371,326	2,855	PXUU00000000
В-8375	508,914	2,806,124	27	76	369,821	2,858	PXUT00000000
В-8376	320,366	2,828,745	29	64	370,890	2,884	PXUX00000000
В-8377	479,741	2,847,430	39	60	371,371	2,896	PXUY00000000
В-8379	521,847	2,845,683	31	107	154,694	2,920	PXVA00000000
В-8468	305,077	2,718,342	59	46	492,735	2,754	SDXL00000000
В-8469	840,384	2,776,570	69	62	466,916	2,835	SDXK00000000
В-8471	537,968	2,824,300	76	57	303,062	2,908	SDXJ00000000
В-8680	697,853	2,719,394	104	46	426,335	2,768	SGBV00000000
В-8681	594,085	2,718,625	118	50	382,931	2,766	SGBW00000000

Для анализа полученных полногеномных последовательностей использовали программы *wombac*, *Mauve*, *SplitsTree*, *MEGAX*, *Ugene*, *VirulenceFinder*, *PlasmidFinder*, *PHASTER*, *BLAST*, *BRIG*.

Таблица 3.15 – Гены вирулентности, обнаруженных в геномах секвенированных штаммов *S. aureus*, несущих гены эксфолиативных токсинов

Ген	Кодируемый продукт	Штамм																
		CC8		CC15						CC121								
		B-7772	B-7777	B-7774	B-7804	B-8468	B-8680	B-8681	B-7803	B-8371	B-8372	B-8374	B-8375	B-8376	B-8377	B-8379	B-8469	B-8471
aur	aureolysin	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
splA	serine protease splA	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+
splB	serine protease splB	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+
splE	serine protease splE	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
sak	staphylokinase	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
scn	staphylococcal complement inhibitor	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
hlgA	gamma-hemolysin chain II precursor	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
hlgB	gamma-hemolysin component B precursor	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
hlgC	gamma-hemolysin component C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
sed	enterotoxin D	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
seg	enterotoxin G	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+
sei	enterotoxin I	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
sej	enterotoxin J	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
sem	enterotoxin M	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
sen	enterotoxin N	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
seo	enterotoxin O	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
ser	enterotoxin R	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
seu	enterotoxin U	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
lukD	leukocidin D component	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+
lukE	leukocidin E component	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+
lukF-PV	Panton Valentine leukocidin F component	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
lukS-PV	Panton Valentine leukocidin S component	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
eta	exfoliative toxin A	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
etb	exfoliative toxin B	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	+	+	+	-	-
edinB	epidermal cell differentiation inhibitor B	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
edinC	epidermal cell differentiation inhibitor C	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	+	+	+	-	-

В секвенированных геномах штаммов *S. aureus* осуществляли поиск генов вирулентности и МГЭ. Было показано, что штаммы *S. aureus* B-7772 и B-7777, выделенные в Белгороде в 2013 и 2014 гг. и принадлежащие клональному комплексу CC8, имеют идентичный набор МГЭ и генов вирулентности (Таблицы 3.15 и 3.16).

Стоит отметить, что помимо профага Sa1int-типа, кодирующего ген эксфолиативного токсина А, продукт которого обуславливает клиническую картину эксфолиативного дерматита, была выявлена плаزمид, несущая гены энтеротоксинов D и R, а также ген энтеротоксин-подобного белка J. Установлено, что в штаммах *S. aureus* В-7774, В-7804, В-8468, В-8680 и В-8681, которые относятся к клональному комплексу CC15, отсутствует кластер *egc*, отсутствует ген стафилокиназы, присутствующий в секвенированных штаммах *S. aureus* других клональных комплексов, а также гены энтеротоксинов и энтеротоксин-подобных белков. В штаммах *S. aureus* В-7803, В-8371, В-8372, В-8374, В-8375, В-8376, В-8377 и В-8379, относящихся к клональному комплексу CC121, был выявлен кластер *egc* 3 типа, несущий пять генов энтеротоксин-подобных белков, который аналогичен кластеру *egc* в изученных нами штаммах *S. aureus* CC30. В штаммах *S. aureus* В-7803, В-8371, В-8372, В-8376, В-8377 и В-8379 была обнаружена плаزمид, переносящая ген эксфолиативного токсина В (Таблицы 3.15, 3.16). Таким образом, для штаммов *S. aureus* трёх различных клональных комплексов выявлена ассоциация между клональным комплексом и кодируемыми генами токсинов.

Таблица 3.16 – Мобильные генетические элементы, выявленные в штаммах *S. aureus*, возбудителях эксфолиативного дерматита новорождённых

Клональный комплекс	Штамм	Бактериофаг Sa1int	Бактериофаг Sa2int	SaPI2	SaPI3	SaPI4	plasmid	<i>egc</i>
CC8	В-7772	+	+	-	-	-	pLUH02	-
	В-7777	+	+	-	-	-	pLUH02	-
CC15	В-7774	+	-	-	-	-	pWBG757	-
	В-7804	+	-	-	-	-	-	-
	В-8468	+	-	-	-	-	-	-
	В-8680	+	-	-	-	-	pWBG757	-
	В-8681	+	-	-	-	-	pWBG757	-
CC121	В-7803	+	+	-	-	-	pETB	<i>egc</i> 3
	В-8371	+	+	-	-	-	pETB	<i>egc</i> 3
	В-8372	+	+	-	-	-	pETB	<i>egc</i> 3
	В-8374	+	+	-	-	-	pSAP065A	<i>egc</i> 3
	В-8375	+	+	-	-	-	pSAP065A	<i>egc</i> 3
	В-8376	+	+	-	-	-	pETB	<i>egc</i> 3
	В-8377	+	+	-	-	-	pETB	<i>egc</i> 3
	В-8379	+	+	-	-	-	pETB	<i>egc</i> 3
	В-8469	-	-	N.D. ¹	N.D.	N.D.	N.D.	<i>egc</i> 3
	В-8471	-	-	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	<i>egc</i> 3

¹ – N.D. – Not Determinant, не определено

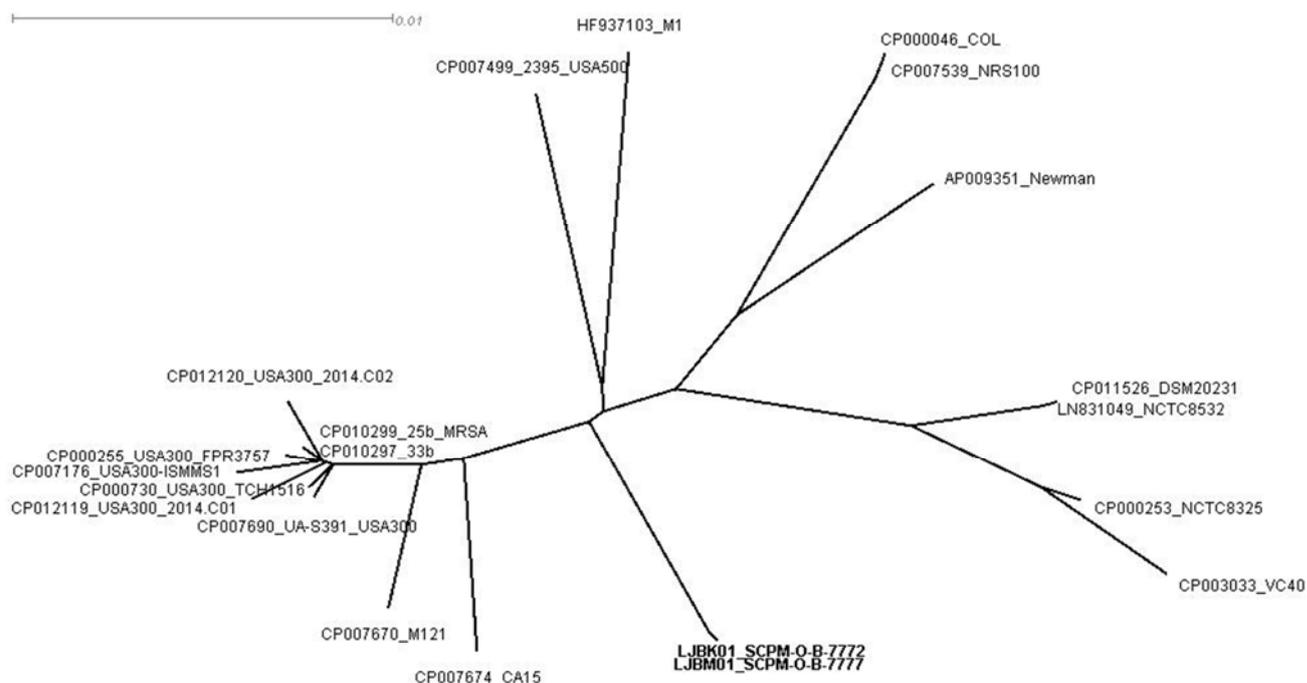


Рисунок 3.8 – Филогенетическое дерево штаммов *S. aureus* CC8, построенное на основе 24094 коровых SNP, выявленных с помощью программы wombas в 21 геноме *S. aureus*

Стоит заметить, что плаزمид, несущая ген эксфолиативного токсина В, была выявлена только в штаммах *S. aureus* CC121. Интересной особенностью является отсутствие профагов Sa2int-типа в геномах штаммов *S. aureus* CC15. Данные факты свидетельствуют о том, что существует ассоциация между штаммами *S. aureus* определённого клонального комплекса и набором МГЭ.

Для проведения полногеномного филогенетического анализа использовали программу wombas для определения коровых SNP, которые в дальнейшем были визуализированы в программах SplitsTree и MEGA.

Был проведён полногеномный сравнительный SNP анализ штаммов *S. aureus* CC8. Для этого с помощью NCBI Genome Neighbor report был отобран 21 геном *S. aureus* CC8 с идентичностью к геному В-7772 выше 95,012 %. Все выбранные геномы были проверены на принадлежность к CC8. На филогенетическом дереве геномов *S. aureus* CC8 близкородственных геному В-7772, выявлена группа штаммов *S. aureus* эпидемического клона USA300. Другие штаммы *S. aureus* CC8 на данном филогенетическом дереве кластеры не образуют. Штаммы *S. aureus* В-7772 и

В-7777 занимают промежуточное положение между кластером USA300 и другими штаммами *S. aureus* CC8.

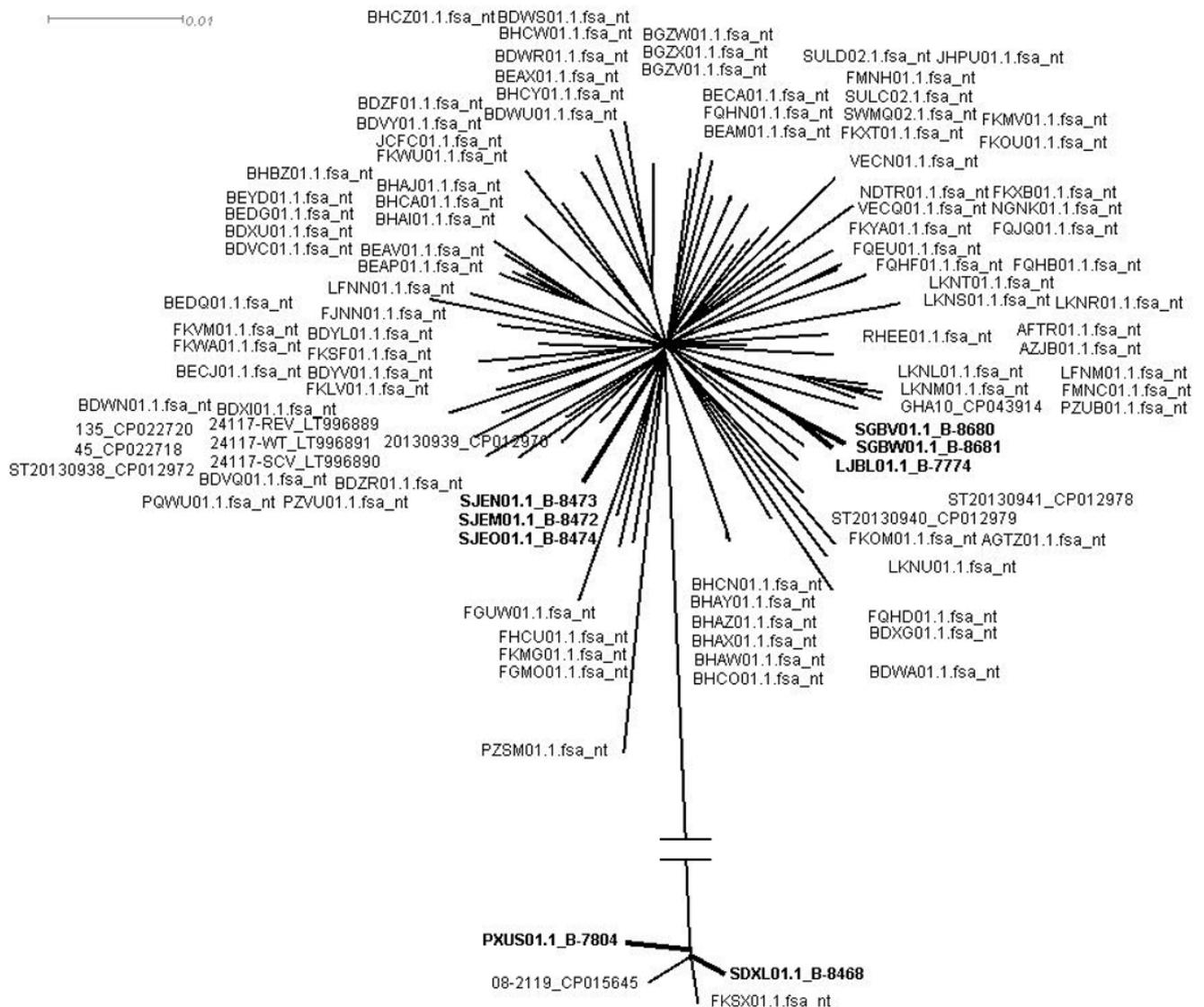


Рисунок 3.9 – Филогенетическое дерево штаммов *S. aureus* CC15, построенное на основе 8668 коровых SNP, обнаруженных с помощью программы wotbac среди 110 геномов штаммов *S. aureus*. Между кластерами расстояние составляет около 0,139 (примерно 1205 SNP); в пределах большого кластера – $<0,03$ (около 260 SNP); в пределах малого кластера – $<0,004$ (около 35 SNP)

Также был проведён сравнительный полногеномный SNP анализ геномов *S. aureus* CC15 и CC121. С помощью сервиса NCBI Genome Neighbor report для штаммов *S. aureus* CC15 было отобрано 102 полногеномные последовательности из

базы данных GenBank с идентичностью к геному штамма *S. aureus* В-7774 выше 96,9492 %. Для штаммов *S. aureus* СС121 было отобрано 96 последовательностей геномов с идентичностью к геному штамма *S. aureus* В-8371 выше 95,4177 %. Таким образом, для построения филогенетических деревьев для штаммов *S. aureus* СС15 и СС121 было использовано 110 и 104 полногеномных последовательности, соответственно.

Анализ филогенетического дерева на основе коровых SNP штаммов *S. aureus* СС15 показал, что геномы штаммов *S. aureus* СС15 разделяются на два неравных кластера (Рисунок 3.9). Интересно отметить, что среди геномов малого кластера находятся геномы штаммов *S. aureus* В-7804 и В-8468, выделенные в Красногорске и Москве, соответственно. Геномы штаммов *S. aureus* В-7774 (Белгород, 2013), В-8680 и В-8681 (Псков, 2014), находятся на одной ветке первого кластера, то есть генетически родственны друг другу. Геномы штаммов *S. aureus* В-8472, В-8473 и В-8474, выделенные в Ульяновске во время пищевой инфекции и кодирующие ген *eta*, также локализованы в первом кластере, но находятся на другой ветке. Таким образом, геномы выделенных нами штаммов *S. aureus* СС15, при проведении филогенетического анализа, разделяются на три группы.

Анализ филогенетического дерева штаммов *S. aureus* СС121 показал, что геномы штаммов *S. aureus* формируют четыре основных кластера (Рисунок 3.10). Интересен тот факт, что все геномы *S. aureus* СС121, секвенированные нами, на филогенетическом дереве локализованы в одном кластере. Геномы штаммов В-7803 и В-8379, выделенные в Южно-Сахалинске, находятся на другой ветке, чем штаммы В-8371, В-8372, В-8374, В-8375, В-8376 и В-8377, выделенные в Оренбурге. Из штаммов *S. aureus*, выделенных в Оренбурге, штаммы В-8371 и В-8372, а также штаммы В-8374 и В-8375, являются одним клоном.

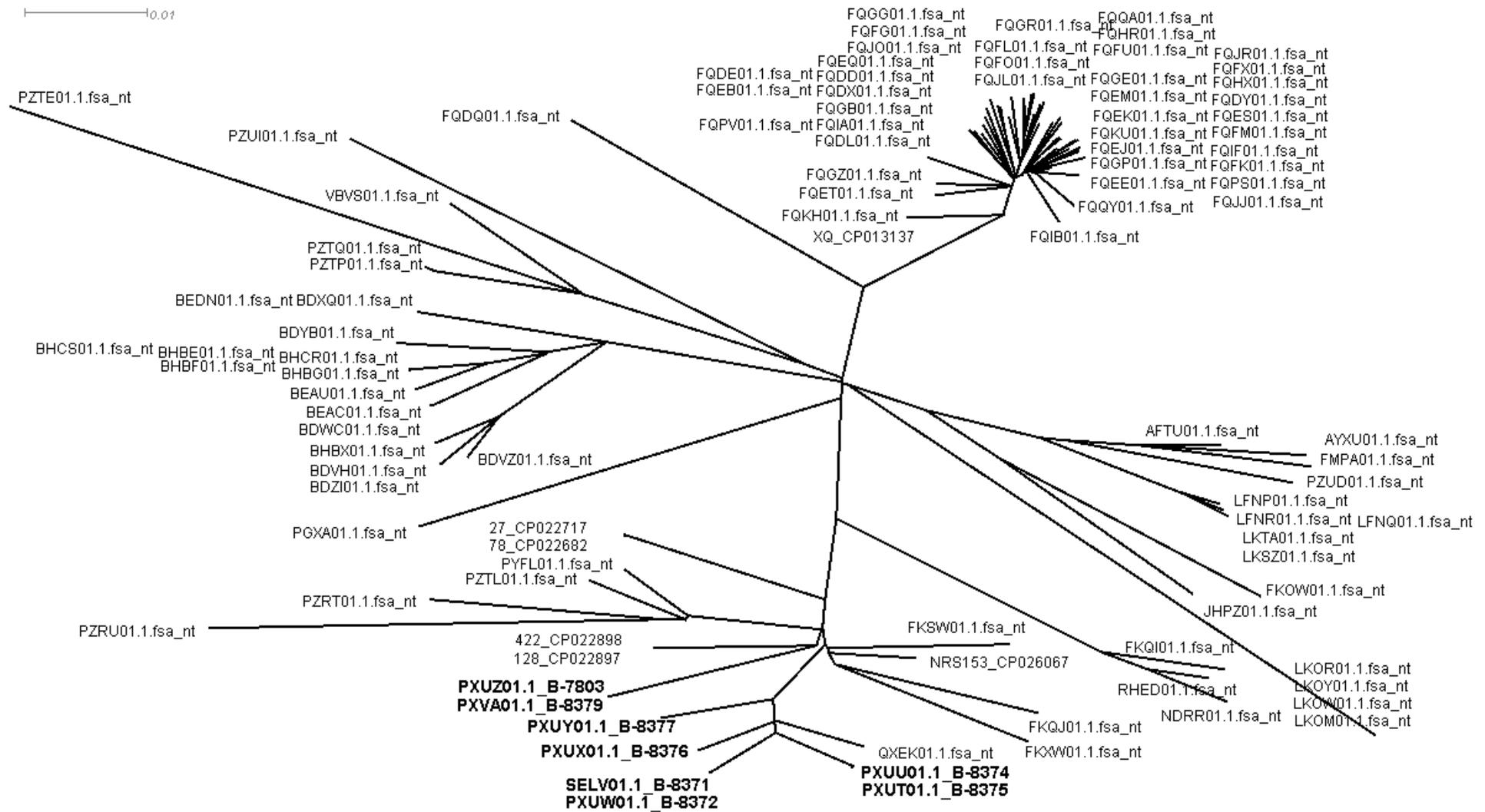


Рисунок 3.10 – Филогенетическое дерево штаммов *S. aureus* CC121, построенное на основе 12996 коровых SNP, выявленных wombac среди 104 геномов штаммов *S. aureus*

Филогенетический анализ геномных последовательностей штаммов *S. aureus*, выделенных во время вспышек эксфолиативного дерматита, показал принципиальные различия в распределении штаммов *S. aureus* на филогенетических деревьях для каждого клонального комплекса. Изолированные нами штаммы *S. aureus* CC8, несущие ген эксфолиативного токсина А, на филогенетическом дереве формируют отдельную группу между типичными штаммами *S. aureus* CC8 и группой штаммов эпидемического клона USA300, в который входят мультирезистентные штаммы *S. aureus*, способные вызывать тяжёлые инвазивные инфекции. Изолированные нами штаммы *S. aureus* CC15 на филогенетическом дереве относятся к различным неродственным кластерам. Все изолированные нами штаммы *S. aureus* CC121 принадлежат к одному из основных кластеров. Таким образом, сравнительный полногеномный анализ показал различия в структуре филогенетических связей штаммов *S. aureus* клональных комплексов CC8, CC15 и CC121, и позволил выявить ассоциацию между клональным комплексом и МГЭ, кодирующими гены вирулентности.

3.5.1. Сравнительный анализ последовательностей ETA-конвертирующих бактериофагов *Staphylococcus aureus*

В геномах штаммов *S. aureus*, возбудителей эксфолиативного дерматита провели поиск последовательностей профагов Salint типа, несущих ген эксфолиативного токсина А. Был определён сайт интегрирования профагов, который является общим для всех ETA-конвертирующих бактериофагов. Сайт интеграции находится частично в гене *sufB*, отвечающем за обмен железа и серы в клетке [208]. Литературных данных о том, нарушает ли работу гена *sufB* интеграция бактериофага в настоящий момент нет. Были идентифицированы последовательности ETA-конвертирующих бактериофагов, и обозначены по номеру соответствующего штамма *S. aureus*: phiETA_B-7772, phiETA_B-7774, phiETA_B-7777, phiETA_B-7803, phiETA_B-7304, phiETA_B-8371, phiETA_B-8372, phiETA_B-8374, phiETA_B-8375, phiETA_B-8376, phiETA_B-8377, phiETA_B-8379, phiETA_B-8468,

phiETA_B-8472, phiETA_B-8473, phiETA_B-8474, phiETA_B-8680 и phiETA_B-8681.

Таблица 3.17 – ETA-конвертирующие бактериофаги из штаммов *S. aureus*, возбудителей эксфолиативного дерматита

Бактериофаг	Размер (пн)	Штамм, клональный комплекс, место и год выделения
phiETA_B-7772	41167	B-7772, CC8, Белгород, 2013
phiETA_B-7774	42061	B-7774, CC15, Белгород, 2013
phiETA_B-7777	41165	B-7777, CC8, Белгород, 2014
phiETA_B-7803	42927	B-7803, CC121, Южно-Сахалинск, 2015
phiETA_B-7804	43111	B-7804, CC15, Красногорск, 2015
phiETA_B-8371	42801	B-8371, CC121, Оренбург, 2012
phiETA_B-8372	42801	B-8372, CC121, Оренбург, 2012
phiETA_B-8374	42801	B-8374, CC121, Оренбург, 2014
phiETA_B-8375	42795	B-8375, CC121, Оренбург, 2014
phiETA_B-8376	42801	B-8376, CC121, Оренбург, 2014
phiETA_B-8377	43178	B-8377, CC121, Оренбург, 2014
phiETA_B-8379	42927	B-8379, CC121, Южно-Сахалинск, 2015
phiETA_B-8468	43111	B-8468, CC15, Москва, 2007
phiETA_B-8680	42063	B-8680, CC15, Псков, 2014
phiETA_B-8681	42063	B-8681, CC15, Псков, 2014

При сравнительном анализе бактериофагов phiETA_B-7772 (Белгород, 2013) и phiETA_B-7777 (Белгород, 2014) выявлена гомология на уровне 99,99 %. Указанные последовательности имеют 2 замены и 2 делеции, что может быть связано с ошибками секвенирования или обработки полученных при секвенировании данных. Сравнительный анализ геномов бактериофагов phiETA_B-7804 (Красногорск, 2015) и phiETA_B-8468 (Москва, 2007), показал полную идентичность последовательностей. Бактериофаг phiETA_B-7774 (Белгород, 2013), при сравнительном анализе показал гомологию на уровне 99,99 % с бактериофагами phiETA_B-8680 и phiETA_B-8681 (Псков, 2014). Сравнительный анализ последовательностей бактериофагов phiETA_B-8371, phiETA_B-8372 (Оренбург, 2012), phiETA_B-8374, phiETA_B-8375, phiETA_B-8376 (Оренбург, 2014), phiETA_B-8472, phiETA_B-8473 и phiETA_B-8472 (Ульяновск, 2014) показал гомологию на уровне 99,99 %. Последовательности геномов бактериофагов phiETA_B-7803 и phiETA_B-8379 (Южно-Сахалинск, 2015) показали полную идентичность между собой. Бактериофаг phiETA_B-8377 (Оренбург, 2014) при сравнительном анализе не показал высокой гомологии с бактериофагами из других секвенированных штаммов

S. aureus. Таким образом, бактериофаги, идентифицированные в пределах секвенированных нами геномов, образовали шесть групп гомологии.

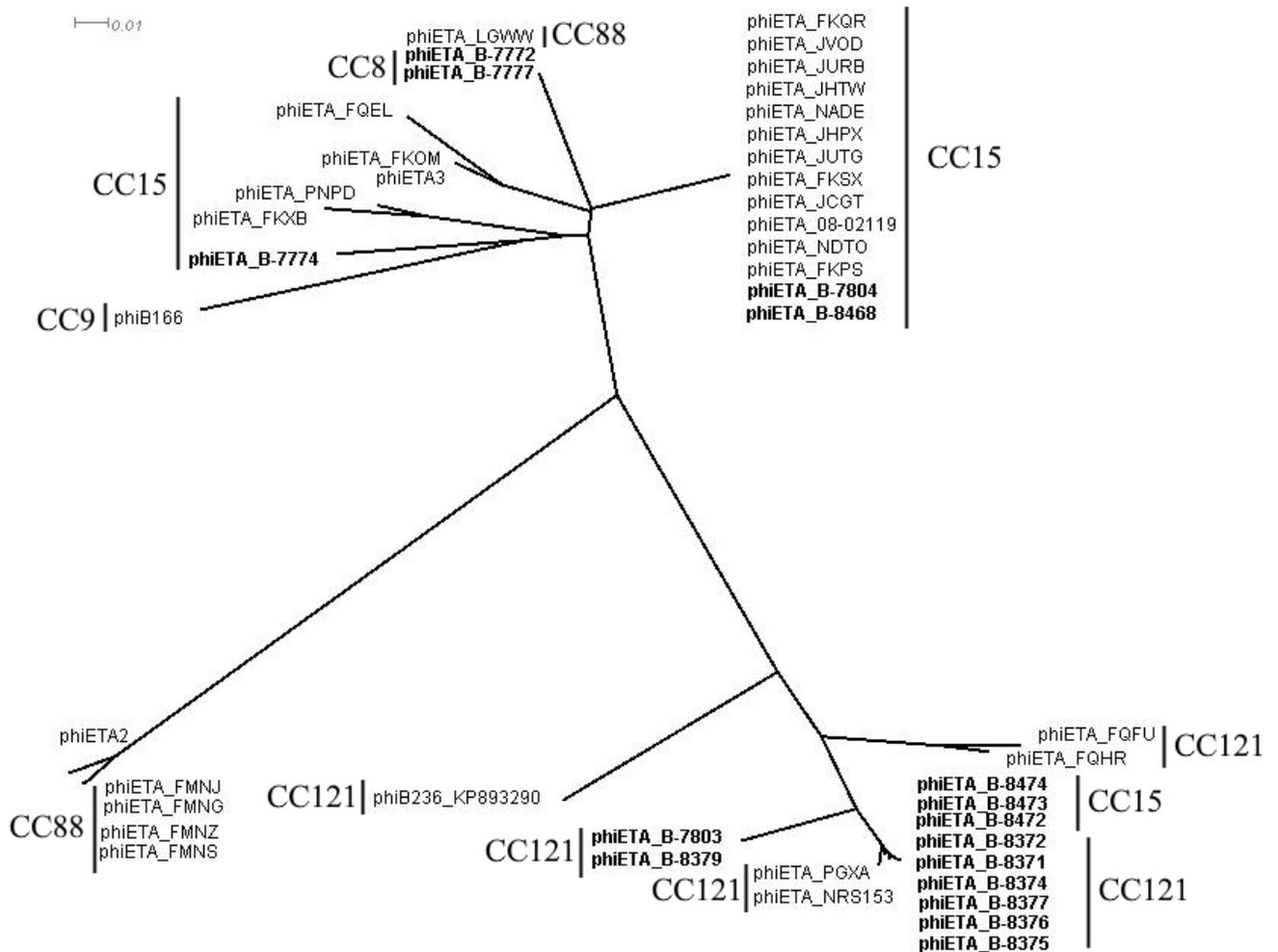


Рисунок 3.11 – Филогенетическое ETA-конвертирующих бактериофагов, построенное на основе выравниваний 52 полногеномных последовательностей бактериофагов, выявлено 21965 сайтов с отличиями, из которых 17379 SNP и 4586 разрывов

Для проведения дальнейшего сравнительного анализа был проведён поиск ETA-конвертирующих бактериофагов в базе GenBank как среди полногеномных последовательностей *S. aureus*, так и среди геномов, собранных до уровня контигов. На первом этапе с помощью BLAST искали геномы *S. aureus*, несущие ген эксфолиативного токсина A, и определяли координаты att сайтов бактериофагов. Всего было найдено 34 генома ETA-конвертирующих профагов, из них два были

найденны в полногеномных последовательностях штаммов *S. aureus*. Таким образом, для построения филогенетического дерева было использовано 52 генома ETA-конвертирующих бактериофагов.

Для выявленных таким образом последовательностей ETA-конвертирующих бактериофагов был проведён филогенетический анализ. Для этого с помощью программы ClustalW было получено выравнивание полногеномных последовательностей бактериофагов, которое использовали для построения филогенетического дерева программой SplitsTree с использованием алгоритма Neighbor-Joining.

При построении филогенетического дерева, все ETA-конвертирующие бактериофаги сформировали, по меньшей мере, три основных кластера. Было установлено, что полученные кластеры, в основном, соответствуют клональным комплексам штаммов *S. aureus*, в геномах которых были выявлены бактериофаги. Два кластера включают в себя бактериофаги, выявленные в геномах *S. aureus* CC88 и CC121, соответственно. Третий кластер обладает большим разнообразием и включает в себя бактериофаги, выявленные в геномах *S. aureus* CC8, CC9, и CC15.

Стоит отметить, что на данном филогенетическом дереве есть исключения. Так, в кластере, сформированном бактериофагами, обнаруженными в штаммах *S. aureus* CC121, присутствуют геномные последовательности бактериофагов, которые были обнаружены в последовательностях *S. aureus* CC15: phiETA_B-8472, phiETA_B-8473 и phiETA_B-8474. Нужно отметить, что штаммы, несущие данные бактериофаги были выделены при вспышке пищевой инфекции в 2014 году в Ульяновске и не являются возбудителями эксфолиативного дерматита. Их способность вызывать данное заболевание остаётся неизвестной. Также стоит отметить бактериофаг phiETA_LGWW, который на филогенетическом дереве лежит на одной ветке с бактериофагами phiETA_B-7772 и phiETA_B-7777, последовательности которых были обнаружены в штаммах *S. aureus* CC8, но штамм *S. aureus*, хозяин бактериофага phiETA_LGWW, при этом относится к CC88. Интересен тот факт, что бактериофаги, обнаруженные в штаммах CC15, были разбиты на две группы в пределах одного кластера, причём одна из групп состоит из близкородственных бакте-

риофагов, которые на филогенетическом дереве расположены крайне близко. Таким образом, с помощью филогенетического анализа были выявлены три больших кластера, сформированные бактериофагами Sa1int типа, несущими ген эксфолиативного токсина A, и способными интегрироваться в геномы *S. aureus* разных клональных комплексов.

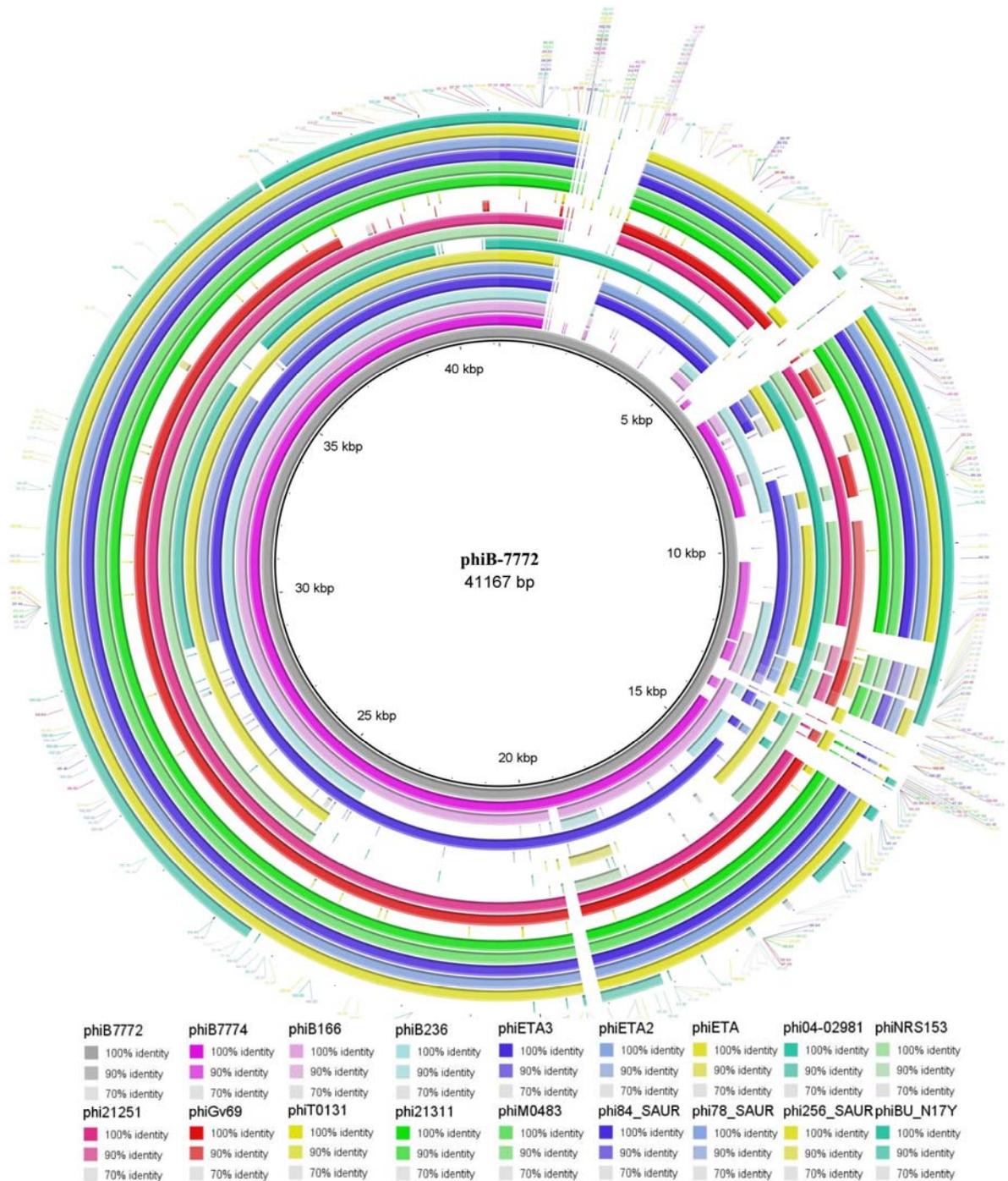


Рисунок 3.12 – Геномные карты ETA-конвертирующих и близких по структуре бактериофагов. Использовано 18 геномов бактериофагов, визуализация BRIG

Для последующего анализа с помощью программы BRIG были отобраны представители из каждого кластера, всего 18 бактериофагов (рисунок 3.12). Следует обратить внимание, что эта программа способна сравнивать исследуемые последовательности только с референсной последовательностью. Так как наибольший интерес представлял бактериофаг, способный конвертировать штаммы *S. aureus* CC8, в качестве референсной последовательности был выбран бактериофаг phiETA_B-7772. При анализе было установлено, области геномов бактериофагов, отвечающие за структурные компоненты (капсид и хвостовая часть), а также за литический путь развития, высоко консервативны. Наибольшие различия наблюдаются в области, отвечающей за репликацию ДНК. Интересно отметить, что единственный из исследованных бактериофагов, имеющий схожую структуру данного региона, имеет бактериофаг phi04-02981, который не имеет гена *eta*, но несёт ген *ear*. Этот бактериофаг обнаружен в штамме *S. aureus* 04-02981, который относится к CC5. Стоит отметить небольшой регион в бактериофаге phiETA_B-7772, с координатами от 5500 до 6500, который не имеет гомологичных участков среди исследованных бактериофагов.

Также был проведён сравнительный анализ геномных последовательностей бактериофагов с помощью программы Easyfig. При сравнении аннотированных последовательностей ETA-конвертирующих бактериофагов, было подтверждено, что области, отвечающие за формирование структурных компонентов бактериофагов и лизис бактериальной клетки, имеют высокую гомологию. Также ген интегразы у всех исследуемых бактериофагов имеет высокую гомологию. Отличия в строении геномов ETA-конвертирующих бактериофагов, как и на картине, показанной BRIG, сосредоточены в регионах, отвечающих за регуляцию транскрипции и репликацию ДНК. В результате, разными программами показана модульность структуры геномов бактериофагов и установлены регионы, обладающие консервативностью и вариабельностью.

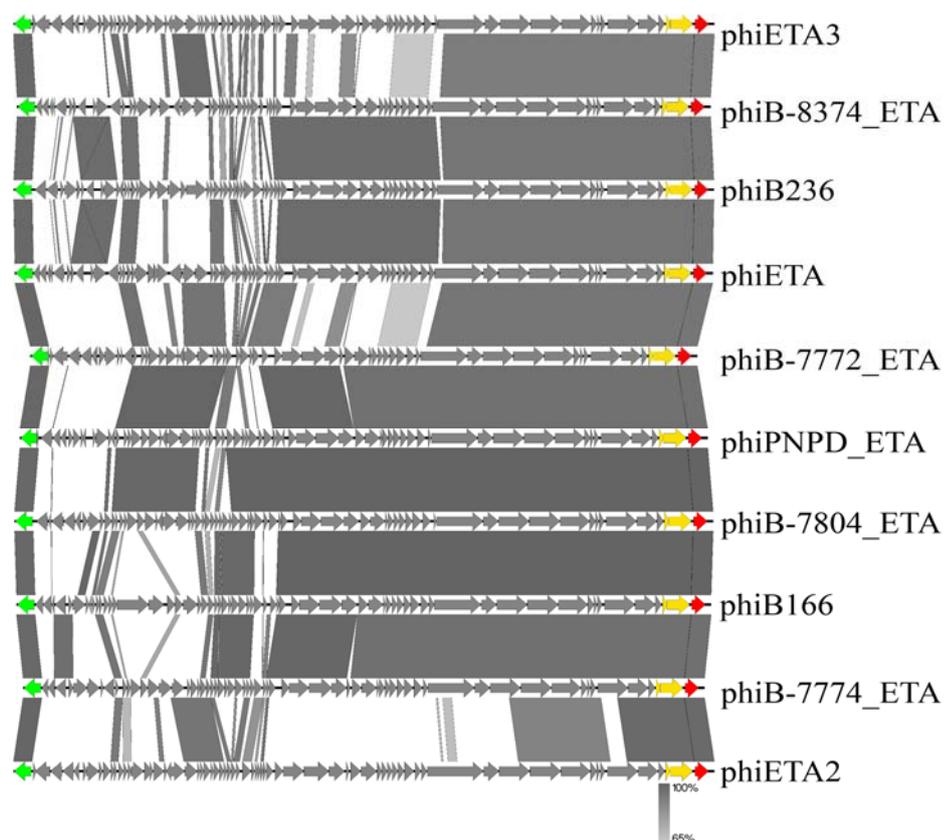


Рисунок 3.13 – Геномные карты ETA-конвертирующих бактериофагов. Зелёный – ген интегразы, жёлтый – гены холина и амидазы, красный – ген эксфолиативного токсина А

Особенностью бактериофагов phiETA_B-7772 и phiETA_B-7777, конвертировавших штаммы CC8 в возбудители эксфолиативного дерматита, являются уникальные последовательности генов, ответственных за эксцизию и метаболизм ДНК. Выявлено, что ген эксцизии бактериофагов phiETA_B-7772 и phiETA_B-7777 негомологичен практически всем генам эксцизии ETA-конвертирующих бактериофагов. Единственный близкородственный ген эксцизии выявлен в профаге генома штамма *S. aureus* UC54 клонального комплекса CC88 (GenBank LGWW01). Штамм MRSA UC54 был выделен при бактериемии и обладает SCCmec кассетой IVa типа. В составе профагов phiETA_B-7772 и phiETA_B-7777 в регионе, ответственном за метаболизм ДНК, присутствуют два участка (всего около 2 т.п.н.), негомологичных геномам других ETA-конвертирующих бактериофагов из базы данных GenBank.

Таким образом, следует отметить, что 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, последовательно-сти которых были выделены из геномов штаммов *S. aureus* CC8, CC9 и CC15.

3.6. Создание коллекции референсных штаммов *S. aureus* – возбудителей пищевой инфекции и эксфолиативного дерматита новорожденных в РФ

В период с 2012 по 2018 гг. было изучено 515 изолятов *S. aureus*, выделенных во время вспышек пищевой инфекции и эксфолиативного дерматита, 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 молекулярно-генетическими методами. Из исследованных изолятов *S. aureus*, 60 штаммов *S. aureus*, возбудителей пищевой инфекции и эксфолиативного дерматита, были депонированы в Государственную коллекцию патогенных микроорганизмов и клеточных культур («ГКПМ-Оболенск»). Из них, 42 штамма *S. aureus* охарактеризованы на уровне полногеномной последовательности и депонированы в базе данных GenBank (Приложение 1). Депонированные штаммы *S. aureus*, возбудители пищевой инфекции, относятся к CC1, CC5, CC12 и CC30; возбудители эксфолиативного дерматита – к CC8, CC15 и CC121.

В результате комплексного анализа были определены референсные штаммы *S. aureus*, возбудители вспышек пищевой инфекции. Всего таких штаммов было идентифицировано: возбудителей вспышек пищевой инфекции – два штамма CC30, три штамма CC1, и по одному штамму CC5 и CC12 (Таблица 3.18). Это штаммы *S. aureus*, возбудителей массовых вспышек пищевой инфекции в 2013-2018 гг.: в 2013 г. в Санкт-Петербурге, в 2014 г. в Тверской области, в Саранске и на поезде Абакан-Москва, два в 2015 г. в Якустке и в 2018 г. в Якустке. Данные штаммы *S. aureus* были подробно изучены на молекулярно-генетическом уровне и исследованы на продукцию генов энтеротоксинов А, В, С, D и Е.

В результате комплексного анализа были определены референсные штаммы *S. aureus*, возбудители вспышек эксфолиативного дерматита новорожденных в 2012-2018 гг. – три штамма CC15, три штамма CC121 и один штамм CC8 (Таблица 3.18). Эти штаммы представляют все основные генетические варианты *S. au-*

reus, выделенные во время вспышек эксфолиативного дерматита: два штамма *S. aureus* в Белгороде, два - в Оренбурге, по одному в Пскове, Красногорске и Южно-Сахалинске.

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 в России.

Таблица 3.18 – Референсные штаммы *S. aureus*, возбудители вспышек пищевой инфекции и эксфолиативного дерматита новорождённых в России

Штамм	Номер GenBank	Клональный комплекс	Сиквенс-тип	<i>spa</i> -тип	<i>coa</i> -ПЦР-ПДРФ	Профильные гены	Место и год выделения
B-7438	LWRA000000000	CC30	ST30	t2509	514(219;214;81)	<i>sea, tst</i>	Санкт-Петербург, 2013
B-7778	LWRC000000000	CC30	ST30	t122	433(219;214)	<i>sea, tst</i>	Тверь, 2014
B-8380	PXVB000000000	CC12	ST12	t888	676(243;219;214)	<i>seb</i>	Саранск, 2014
B-8478	SJEI000000000	CC5	ST5	t002	676(295;243;138)	<i>sea, tst</i>	Поезд Абакан-Москва, 2014
B-7903	SDXI000000000	CC1	ST1	t948	595(300;214;81)	<i>seb</i>	Якутск, 2015
B-7904	NIDA000000000	CC1	ST1	t948	595(300;214;81)	<i>sea, seb</i>	Якутск, 2015
B-8775	-	CC1	ST1	t127	595(300;214;81)	<i>sea, seb</i>	Якутск, 2018
B-7777	LJBM000000000	CC8	ST2993	t211	595(214;162;138;81)	<i>eta</i>	Белгород, 2014
B-7774	LJBL000000000	CC15	ST15	t084	514(300;214)	<i>eta</i>	Белгород, 2013
B-8680	SGBV000000000	CC15	ST2126	t084	514(300;214)	<i>eta</i>	Псков, 2014
B-7804	PXUS000000000	CC15	ST582	t279	595(381;214)	<i>eta</i>	Красногорск, 2015
B-8379	PXVA000000000	CC121	ST121	t645	838(324;295;219)	<i>eta, etb</i>	Южно-Сахалинск, 2015
B-8371	SELV000000000	CC121	ST121	t272	838(324;295;219)	<i>eta, etb</i>	Оренбург, 2012
B-8374	PXUU000000000	CC121	новый	t272	676(381;295)	<i>eta</i>	Оренбург, 2014

Таким образом, в результате проведённого исследования получена коллекция референсных штаммов *S. aureus* – возбудителей пищевой инфекции и эксфолиативного дерматита новорождённых в РФ, в которую вошли 14 штаммов *S. aureus* семи разных клональных комплексов, выделенных в различных географических зонах. Данные штаммы депонированы в Государственной коллекции «ГКПМ-Оболенск», геномы штаммов депонированы в базе данных GenBank.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В данной работе были изучены штаммы *S. aureus*, выделенные во время 10 вспышек пищевой инфекции и восьми вспышек эксфолиативного дерматита новорождённых в 2012-2018 гг. Для проведения быстрого исследования изучаемых изолятов *S. aureus* был разработан алгоритм исследования, позволяющий в течение суток после выделения чистой культуры провести генотипирование, определить вероятность стафилококковой природы инфекции, сделать вывод о предполагаемом источнике инфекции. Используемые на первых этапах данного алгоритма методы доступны в большинстве клинических лабораторий. Для проведения более детального изучения возбудителя и получения эпидемиологической картины, используются методы исследования, включающие в себя в том числе полногеномное секвенирование, что позволяет получить информацию о генетической близости штаммов *S. aureus*, циркулирующих в данном регионе, в стране и в мире, провести сравнительный и ретроспективный анализ.

При исследовании вспышек пищевой инфекции, в краткие сроки были установлены возбудители инфекции и определена взаимосвязь между изолятами *S. aureus*, выделенными от больных, от сотрудников пищеблоков, из пищевых продуктов, и со смывов с оборудования. С помощью методов сиквенс-типирования были определены spa- и MLST- типы штаммов *S. aureus*, этиологических агентов пищевой инфекции, что полезно для отслеживания эпидемиологической обстановки, определения источников инфекции и путей передачи. В результате было установлено, что возбудителями пищевой инфекции являлись штаммы *S. aureus*, относящиеся к четырём клональным комплексам: CC1, CC5, CC12 и CC30. Перечисленные клональные комплексы *S. aureus* являются одними из самых частых возбудителей пищевой инфекции в мире. Характерной особенностью штаммов *S. aureus* CC30 наличие генов энтеротоксина А и токсина синдрома токсического шока. Штаммы *S. aureus* CC1, возбудители пищевой инфекции в Якутске, могут нести комбинации генов энтеротоксинов А и В. Продукция энтеротоксинов была показана с помощью набора RIDASCREEN® SET A, B, C, D, E.

В ходе данной работы также было изучено восемь вспышек эксфолиативного дерматита новорождённых за период с 2012 по 2016 года. Основными клональными комплексами среди возбудителей эксфолиативного дерматита новорождённых являлись штаммы *S. aureus* CC15 и CC121. В ходе данного исследования был выявлен уникальный штамм *S. aureus* CC8/ST2993, кодирующий ген эксфолиативного токсина А. Штаммы *S. aureus* CC8 по литературным данным ранее не ассоциировались с эксфолиативным дерматитом. Стоит отметить, что только в штаммах *S. aureus* CC121 был обнаружен ген эксфолиативного токсина В, причём одновременно с геном энтеротоксина А. Только в двух случаях при вспышке эксфолиативного дерматита новорождённых от сотрудников и/или носителей были выделены изоляты *S. aureus* с теми же генетическими маркерами, что и от заболевших новорождённых. Не было обнаружено изолятов *S. aureus* с генами эксфолиативных токсинов, выделенных из объектов окружающей среды.

Использование методов полногеномного секвенирования позволило определить филогенетические взаимосвязи секвенированных возбудителей пищевой инфекции и эксфолиативного дерматита новорождённых как между собой, так и со штаммами из базы данных GenBank. Неожиданным оказался факт выделения на филогенетическом дереве штаммов *S. aureus* CC30 В-7778 и В-7779, возбудителей вспышки пищевой инфекции в Тверской области, в отдельную обособленную кладу. Все выделенные нами штаммы *S. aureus* CC1 генетически близки. Установлена высокая интенсивность обмена генетической информацией для штаммов *S. aureus* CC1 за счёт изменения состава мобильных генетических элементов с разными генами токсинов.

Штаммы *S. aureus* CC8, несущие ген эксфолиативного токсина А, на филогенетическом дереве формируют отдельную группу, между типичными штаммами *S. aureus* CC8 и группой штаммов эпидемического клона USA300, к который относятся мультирезистентные штаммы *S. aureus*, способные вызывать тяжёлые инвазивные инфекции. Установлена ассоциация между географической локализацией и клональной принадлежностью штаммов *S. aureus*, возбудителей эксфолиативного дерматита новорождённых. Среди штаммов *S. aureus* CC15, идентифицированных

в данном исследовании, обнаружено две неродственных линии штаммов *S. aureus*, возбудителей эксфолиативного дерматита новорождённых. Штаммы *S. aureus* CC121, секвенированные нами, локализованы в одном кластере, но в пределах разных ветвей, формируя две генетически близкие линии.

Был проведён анализ на наличие мобильных генетических элементов, кодирующих этиологические агенты пищевой инфекции и эксфолиативного дерматита. В результате было выявлено, что для геномных последовательностей SEA-конвертирующих Sa3int бактериофагов основные отличия сосредоточены в регионах, ответственных за регуляцию транскрипции и репликации ДНК. При филогенетическом анализе исследованные бактериофаги формируют кластеры, в основном, ассоциированные с клональными комплексами *S. aureus*, в которых геномы бактериофагов были обнаружены. Подобным образом, большинство последовательностей ETA-конвертирующих бактериофагов Sa1int типа объединяются в кластеры по тем клональным комплексам *S. aureus*, в которые они способны интегрироваться. Различия в строении геномов ETA-конвертирующих бактериофагов Sa1int типа сосредоточены в регионах, ответственных за эксцизию и регуляцию транскрипции и репликации ДНК.

Филогенетический анализ геномных последовательностей бактериофагов показал различные эволюционные пути развития геномной структуры бактериофагов в разных клональных комплексах *S. aureus*. Бактериофаги Sa3int типа, близкие бактериофагу MRSA252, формируют уникальный кластер с высококонсервативными геномами. Остальные кластеры бактериофагов Sa3int типа содержат гетерогенные геномы. В данном исследовании впервые выявлена ассоциация между генетической изменчивостью конвертирующих бактериофагов Sa1int- и Sa3int- типов и клональной принадлежностью штаммов-хозяев *S. aureus*.

Наиболее охарактеризованные штаммы *S. aureus*, являющиеся возбудителями пищевой инфекции и эксфолиативного дерматита новорождённых, были отобраны для создания референсной коллекции и депонированы в Государственной коллекции «ГКПМ-Оболенск». Все штаммы *S. aureus*, выбранные в качестве рефе-

ренских, 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.

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 CC30, CC1, CC5 и CC12, 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 CC15 и CC121; установлена ассоциация между географической локализацией и клональной принадлежностью идентифицированных нами штаммов: в Европейском регионе России выявлены штаммы *S. aureus* CC8 и CC15, в восточных регионах – CC121; впервые выявлен ЕТА-продуцирующий штамм *S. aureus* клонального комплекса CC8, сформировавшийся в результате лизогенной конверсии бактериофагом Salint-типа.

4. При сравнительном полногеномном анализе установлены филогенетические связи изученных штаммов: выявлен штамм *S. aureus* CC30, возбудитель пищевой инфекции в России, филогенетически обособленный от известных штаммов CC30; ЕТА-продуцирующий штамм *S. aureus* CC8 наиболее близок к штаммам эпидемического клона USA300; в восточных регионах России циркулируют близкородственные штаммы *S. aureus* CC1, 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 Salint-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 ГНЦПМБ предназначены для использования при сравнительном анализе геномов *S. aureus* и мобильных генетических элементов.

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.

ПЕРЕЧЕНЬ СОКРАЩЕНИЙ

MRSA – метициллин-резистентный *Staphylococcus aureus*.

MSSA – метициллин-чувствительный *Staphylococcus aureus*.

ET – эксфолиативный токсин.

ETA – эксфолиативный токсин А.

ETB – эксфолиативный токсин В.

SEA – энтеротоксин А.

SEB – энтеротоксин В.

СС – 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.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Гончаров, А.Е. Молекулярно-генетический мониторинг в системе эпидемиологического надзора за инфекциями, связанными с оказанием медицинской помощи / А.Е. Гончаров, Л.П. Зуева, В.В. Колоджиева, Л.А. Кафтырева, С.А. Егорова, М.А. Макарова // Федеральные клинические рекомендации. – 2014. – 45с.
2. ГОСТ 31746-2012. Продукты пищевые. Методы выявления и определения количества коагулазоположительных стафилококков и *Staphylococcus aureus*. – М., 2013. 23 с.
3. Метициллинрезистентные *Staphylococcus aureus* – возбудители внутрибольничных инфекций: идентификация и генотипирование: Методические рекомендации. – М.: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2006. – 43 с.
4. МУК 4.2.2746-10. Порядок применения молекулярно-генетических методов при обследовании очагов острых кишечных инфекций с групповой заболеваемостью: Методические указания. – М.: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2011. – 16 с.
5. МУК 4.2.2872-11. Методы выявления и идентификации патогенных бактерий-возбудителей инфекционных заболеваний с пищевым путём передачи в продуктах питания на основе ПЦР с гибридизационно-флуоресцентной детекцией: Методические указания. – М.: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2011. – 47 с.
6. Романов, А.В. Молекулярная эпидемиология штаммов *Staphylococcus aureus* в детских стационарах РФ / А.В. Романов, А.В. Дехнич, М.В. Эйдельштейн // Вестник Смоленской государственной медицинской академии. – 2012. – №3.
7. 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. – С168-176.

8. Acton, D.S. Intestinal carriage of *Staphylococcus aureus*: how does its frequency compare with that of nasal carriage and what is its clinical impact? / D.S. Acton, M.J. Plat-Sinnige, W. van Wamel, N. de Groot, A. van Belkum // Eur J Clin Microbiol Infect Dis. – 2009. – V. 28, N. 2. – P115-27. – doi: 10.1007/s10096-008-0602-7.
9. Adesiyun, A.A. Exfoliative toxin production by *Staphylococcus aureus* strains isolated from animals and human beings in Nigeria / A.A. Adesiyun, W. Lenz, K.P. Schaal // Microbiologica. – 1991. – V. 14, N. 4. – P357-62.
10. Alibayov, B. *Staphylococcus aureus* mobile genetic elements / B. Alibayov, L. Baba-Moussa, H. Sina, K. Zdeňková, K. Demnerová // Mol Biol Rep. – 2014. – V. 41, N. 8. – P5005-18. – doi: 10.1007/s11033-014-3367-3.
11. Alikhan, N.F. BLAST Ring Image Generator (BRIG): simple prokaryote genome comparisons / N.F. Alikhan, N.K. Petty, N.L. Ben Zakour, S.A. Beatson // BMC Genomics. – 2011. – N. 12. – P402. – doi:10.1186/1471-2164-12-402.
12. Amagai, M. Staphylococcal exfoliative toxin B specifically cleaves desmoglein 1 / M. Amagai, T. Yamaguchi, Y. Hanakawa, K. Nishifuji, M. Sugai, J.R. Stanley // J Invest Dermatol. – 2002. – V. 118, N. 5. – P845-50.
13. Amagai, M. Toxin in bullous impetigo and staphylococcal scalded-skin syndrome targets desmoglein 1 / M. Amagai, N. Matsuyoshi, Z.H. Wang, C. Andl, J.R. Stanley // Nat Med. – 2000. – V. 6, N. 11. – P1275-7.
14. Angiuoli, S.V. Toward an online repository of Standard Operating Procedures (SOPs) for (meta)genomic annotation / S.V. Angiuoli, A. Gussman, W. Klimke, G. Cochrane, D. Field, G. Garrity, C.D. Kodira, N. Kyrpides, R. Madupu, V. Markowitz, T. Tatusova, N. Thomson, O. White // OMICS. – 2008. – V. 12, N. 2. – P137-41. – doi: 10.1089/omi.2008.0017.
15. Argudín, M.Á. Food poisoning and *Staphylococcus aureus* enterotoxins / M.Á. Argudín, M.C. Mendoza, M.R. Rodicio // Toxins (Basel). – 2010. – V. 2, N. 7. – P1751-1773. – doi:10.3390/toxins2071751.

16. Argudín, M.A. Genotypes, Exotoxin Gene Content, and Antimicrobial Resistance of *Staphylococcus aureus* Strains Recovered from Foods and Food Handlers / Argudín M.Á., M.C. Mendoza, M.A. González-Hevia, M. Bances, B. Guerra, M.R. Rodicio // *Applied and Environmental Microbiology*. – 2012. – V. 78, N. 8. – P2930-2935. – <https://doi.org/10.1128/aem.07487-11>.
17. Asao, T. An extensive outbreak of staphylococcal food poisoning due to low-fat milk in Japan: estimation of enterotoxin A in the incriminated milk and powdered skim milk / T. Asao, Y. Kumeda, T. Kawai, T. Shibata, H. Oda, K. Haruki, H. Nakazawa, S. Kozaki // *Epidemiol Infect.* – 2003. – V. 130, N. 1. – P33-40. – doi: 10.1017/s0950268802007951.
18. Baba, T. Genome sequence of *Staphylococcus aureus* strain Newman and comparative analysis of staphylococcal genomes: polymorphism and evolution of two major pathogenicity islands / T. Baba, T. Bae, O. Schneewind, F. Takeuchi, K. Hiramatsu // *J Bacteriol.* – 2008. – V 190, N. 1. – P300-310. – doi:10.1128/JB.01000-07.
19. Bailey, C.J. The esterolytic activity of epidermolytic toxins / C.J. Bailey, M.B. Redpath // *Biochem J.* – 1992. – V. 284, N. 1. – P177-180. – doi:10.1042/bj2840177.
20. Bailey, C.J. The reactive serine residue of epidermolytic toxin A / C.J. Bailey, T.P. Smith // *Biochem J.* – 1990. – V. 269, № 2. – P535-537. – doi:10.1042/bj2690535.
21. Balaban, N. Staphylococcal enterotoxins / N. Balaban, A. Rasooly // *Int J Food Microbiol.* – 2000. – V. 61, N. 1. – P1-10.
22. Bankevich, A. SPAdes: a new genome assembly algorithm and its applications to single-cell sequencing / A. Bankevich, S. Nurk, D. Antipov, A.A. Gurevich, M. Dvorkin, A.S. Kulikov, V.M. Lesin, S.I. Nikolenko, S. Pham, A.D. Prjibelski, A.V. Pyshkin, A.V. Sirotkin, N. Vyahhi, G. Tesler, M.A. Alekseyev, P.A. Pevzner // *J Comput Biol.* – 2012 – V. 19, N. 5. – P455-77. – doi: 10.1089/cmb.2012.0021.
23. Baquero, F. Multilevel population genetics in antibiotic resistance / F. Baquero, T.M. Coque // *FEMS Microbiol Rev.* – 2011. – V. 35, N. 5. – P705-6. – doi: 10.1111/j.1574-6976.2011.00293.x.

24. Bayles, K.W. Genetic and molecular analyses of the gene encoding staphylococcal enterotoxin D / K.W. Bayles, J.J. Iandolo // *J Bacteriol.* – 1989. – V. 171, N. 9. – P4799-4806. – doi:10.1128/jb.171.9.4799-4806.1989.
25. Becker, K. Coagulase-negative staphylococci / K. Becker, C. Heilmann, G. Peters // *Clin Microbiol Rev.* – 2014. – V. 27, N. 4. – P870-926. – doi:10.1128/CMR.00109-13.
26. Bennett, S.D. Foodborne disease outbreaks caused by *Bacillus cereus*, *Clostridium perfringens*, and *Staphylococcus aureus* -- United States, 1998-2008 / S.D. Bennett, K.A. Walsh, L.H. Gould // *Clin Infect Dis.* – 2013. – V. 57, N. 3. – P425-33. – doi: 10.1093/cid/cit244.
27. Bens, C.C. Presence of a novel DNA methylation enzyme in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates associated with pig farming leads to uninterpretable results in standard pulsed-field gel electrophoresis analysis / C.C. Bens, A. Voss, C.H. Klaassen // *J Clin Microbiol.* – 2006. – V. 44, N. 5. – P1875-6.
28. Bergdoll, M.S. Staphylococcal enterotoxin. Identification of a specific precipitating antibody with enterotoxin-neutralizing property / M.S. Bergdoll, M.J. Surgalla, G.M. Dack // *J Immunol.* – 1959. – N. 83. – 334-8.
29. Bestebroer, J. Staphylococcal superantigen-like 5 binds PSGL-1 and inhibits P-selectin-mediated neutrophil rolling / J. Bestebroer, M.J. Poppelier, L.H. Ulfman, P.J. Lenting, C.V. Denis, K.P. van Kessel, J.A. van Strijp, C.J. de Haas // *Blood.* – 2007. – V. 109, N. 7. – P2936-43.
30. Betley, M.J. Staphylococcal enterotoxins, toxic shock syndrome toxin and streptococcal pyrogenic exotoxins: a comparative study of their molecular biology / M.J. Betley, D.W. Borst, L.B. Regassa // *Chem Immunol.* – 1992. – N. 55. – P1-35.
31. Bien, J. Characterization of Virulence Factors of *Staphylococcus aureus*: Novel Function of Known Virulence Factors That Are Implicated in Activation of Airway Epithelial Proinflammatory Response / J. Bien, O. Sokolova, P. Bozko // *J Pathog.* – 2011. – 601905. – doi:10.4061/2011/601905.

32. Blevins, S.M. Robert Koch and the 'golden age' of bacteriology / S.M. Blevins, M.S. Bronze // *Int J Infect Dis.* – 2010. – V. 14, N. 9. – P744-51. – doi: 10.1016/j.ijid.2009.12.003.
33. Bosi, E. Comparative genome-scale modelling of *Staphylococcus aureus* strains identifies strain-specific metabolic capabilities linked to pathogenicity / E. Bosi, J.M. Monk, R.K. Aziz, M. Fondi, V. Nizet, B.Ø. Palsson // *Proc Natl Acad Sci U S A.* – 2016. – V. 113, N. 26. – P3801-3809. – doi:10.1073/pnas.1523199113.
34. Boucher, H.W. Bad Bugs, No Drugs: No ESKAPE! An Update from the Infectious Diseases Society of America / H.W. Boucher, G.H. Talbot, J.S. Bradley, J.E. Edwards, D. Gilbert, L.B. Rice, M. Scheld, B. Spellberg, J. Bartlett // *Clinical Infectious Diseases.* – 2009. – V. 48, N. 1. – P1-12. – <https://doi.org/10.1086/595011>.
35. Brüssow, H. Comparative phage genomics and the evolution of Siphoviridae: insights from dairy phages / H. Brüssow, F. Desiere // *Mol Microbiol.* – 2001. – V. 39, N. 2. – P213-22.
36. Bukowski, M. Exfoliative toxins of *Staphylococcus aureus* / M. Bukowski, B. Wladyka, G. Dubin // *Toxins (Basel).* – 2010. – V. 2, N. 5. – P1148-65. – doi: 10.3390/toxins2051148.
37. Byrd-Bredbenner, C. Food safety in home kitchens: a synthesis of the literature / C. Byrd-Bredbenner, J. Berning, J. Martin-Biggers, V. Quick // *Int J Environ Res Public Health.* – 2013. – V. 10, N. 9. – P4060-4085. – doi:10.3390/ijerph10094060.
38. Canchaya, C. Prophage genomics / C. Canchaya, C. Proux, G. Fournous, A. Bruttin, H. Brüssow // *Microbiol Mol Biol Rev.* – 2003. – V. 67, N. 2. – P238-276. – doi:10.1128/mmbr.67.2.238-276.2003.
39. Carattoli, A. In silico detection and typing of plasmids using PlasmidFinder and plasmid multilocus sequence typing / A. Carattoli, E. Zankari, A. García-Fernández, M. Voldby Larsen, O. Lund, L. Villa, F. Møller Aarestrup, H. Hasman // *Antimicrob Agents Chemother.* – 2014. – V. 58, N. 7. – P3895-3903. – doi:10.1128/AAC.02412-14.
40. Casman, E.P. Further serological studies of staphylococcal enterotoxin // *J Bacteriol.* – 1960. – V. 79, N. 6. – P849-856.

41. Cavarelli, J. The structure of *Staphylococcus aureus* epidermolytic toxin A, an atypic serine protease, at 1.7 Å resolution / J. Cavarelli, G. Prévost, W. Bourguet, L. Moulinier, B. Chevrier, B. Delagoutte, A. Bilwes, L. Mourey, S. Rifai, Y. Piémont, D. Moras // *Structure*. – 1997. – V. 5, N. 6. – P813-24.
42. Chen, L. Multiplex real-time PCR for rapid *Staphylococcal* cassette chromosome mec typing / L. Chen, J.R. Mediavilla, D.C. Oliveira, B.M. Willey, H. de Lencastre, B.N. Kreiswirth // *J Clin Microbiol*. – 2009. – V. 47, N. 11. – P3692-706.
43. Chen, Q. Genotypes, Enterotoxin Gene Profiles, and Antimicrobial Resistance of *Staphylococcus aureus* Associated with Foodborne Outbreaks in Hangzhou, China / Q. Chen, S. Xie // *Toxins*. – 2019. – V. 11, N. 6:307. – doi:10.3390/toxins11060307.
44. Cheng, A.G. A play in four acts: *Staphylococcus aureus* abscess formation / A.G. Cheng, A.C. DeDent, O. Schneewind, D. Missiakas // *Trends Microbiol*. – 2011. – V. 19, N. 5. – P225-232. – doi:10.1016/j.tim.2011.01.007.
45. Chiang, Y.C. PCR detection of *Staphylococcal* enterotoxins (SEs) N, O, P, Q, R, U, and survey of SE types in *Staphylococcus aureus* isolates from food-poisoning cases in Taiwan / Y.C. Chiang, W.W. Liao, C.M. Fan, W.Y. Pai, C.S. Chiou, H.Y. Tsen // *Int J Food Microbiol*. – 2008. – V. 121, N. 1. – P66-73.
46. Chua, K.Y. Population genetics and the evolution of virulence in *Staphylococcus aureus* / K.Y. Chua, B.P. Howden, J.H. Jiang, T. Stinear, A.Y. Peleg // *Infect Genet Evol*. – 2014. – V. 21. – P554-62. – doi: 10.1016/j.meegid.2013.04.026.
47. Chung, M.C. The crystal structure of staphylococcal superantigen-like protein 11 in complex with sialyl Lewis X reveals the mechanism for cell binding and immune inhibition / M.C. Chung, B.D. Wines, H. Baker, R.J. Langley, E.N. Baker, J.D. Fraser // *Mol Microbiol*. – 2007. – V. 66, N. 6. – P1342-55.
48. Coleman, D.C. *Staphylococcus aureus* bacteriophages mediating the simultaneous lysogenic conversion of beta-lysin, staphylokinase and enterotoxin A: molecular mechanism of triple conversion / D.C. Coleman, D.J. Sullivan, R.J. Russell, J.P. Arbuthnott, B.F. Carey, H.M. Pomeroy // *J Gen Microbiol*. – 1989. – V. 135, N. 6. – P1679-97.

49. Collery, M.M. Associations between enterotoxin gene cluster types *egc1*, *egc2* and *egc3*, *agr* types, enterotoxin and enterotoxin-like gene profiles, and molecular typing characteristics of human nasal carriage and animal isolates of *Staphylococcus aureus* / M.M. Collery, D.S. Smyth, J.J. Tumilty, J.M. Twohig, C.J. Smyth // J Med Microbiol. – 2009. – V. 58, N. 1. – P13-25. – doi: 10.1099/jmm.0.005215-0.
50. Collery, M.M. Rapid differentiation of *Staphylococcus aureus* isolates harbouring *egc* loci with pseudogenes *psient1* and *psient2* and the *selu* or *seluv* gene using PCR-RFLP / M.M. Collery, C.J. Smyth // J Med Microbiol. – 2007. – V. 56, N. 2. – P208-16.
51. Couch, J.L. Cloning and nucleotide sequence of the type E staphylococcal enterotoxin gene / J.L. Couch, M.T. Soltis, M.J. Betley // J Bacteriol. – 1988. – V. 170, N. 7. – P2954-2960. – doi:10.1128/jb.170.7.2954-2960.1988.
52. Cowan, S.T. Type strain for *Staphylococcus aureus* Rosenbach / S.T. Cowan, C. Shaw, R.E. Williams // J Gen Microbiol. – 1954. – V. 10, N. 1. – P174-6.
53. Cribier, B. Staphylococcal scalded skin syndrome in adults. A clinical review illustrated with a new case / B. Cribier, Y. Piemont, E. Grosshans // J Am Acad Dermatol. – 1994. – V. 30, N. 2, Pt2. – P319-24.
54. Dancer, S.J. The epidermolytic toxins are serine proteases / S.J. Dancer, R. Garratt, J. Saldanha, H. Jhoti, R. Evans // FEBS Lett. – 1990. – V. 268, N. 1. – P129-32.
55. Darling, A.C. Mauve: multiple alignment of conserved genomic sequence with rearrangements / A.C. Darling, B. Mau, F.R. Blattner, N.T. Perna // Genome Res. – 2004. – V. 14, N. 7. – P1394-1403. – doi:10.1101/gr.2289704.
56. de Azavedo, J. Prevalence of epidermolytic toxin in clinical isolates of *Staphylococcus aureus* / J. de Azavedo, J.P. Arbuthnott // J Med Microbiol. – 1981. – V. 14, N. 3. – P341-4.
57. de Haas, C.J. Chemotaxis inhibitory protein of *Staphylococcus aureus*, a bacterial antiinflammatory agent / C.J. de Haas, K.E. Veldkamp, A. Peschel, F. Weerkamp, W.J. Van Wamel, E.C. Heezius, M.J. Poppelier, K.P. Van Kessel, J.A. van Strijp // J Exp Med. – 2004. – V. 199, N. 5. – P687-695. – doi:10.1084/jem.20031636.

58. Dearborn, A.D. Mobilization of pathogenicity islands by *Staphylococcus aureus* strain Newman bacteriophages / A.D. Dearborn, T. Dokland // *Bacteriophage*. – 2012. – V. 2, N. 2. – P70-78. – doi:10.4161/bact.20632.
59. 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. Drèze, E.P. Rocha, M. Touchon, L. Van Melderen // *J Bacteriol*. – 2012. – V. 194, N. 21. – P5829-5839. – doi:10.1128/JB.01085-12.
60. Deghorain, M. The Staphylococci phages family: an overview / M. Deghorain, L. Van Melderen // *Viruses*. – 2012. – V. 4, N. 12. – P3316-3335. – doi:10.3390/v4123316.
61. Dinges, M.M. Exotoxins of *Staphylococcus aureus* / M.M. Dinges, P.M. Orwin, P.M. Schlievert // *Clin Microbiol Rev*. – 2000. – V. 13, N. 1. – P16-34. – doi:10.1128/cmr.13.1.16-34.2000.
62. Dobrindt, U. Genomic islands in pathogenic and environmental microorganisms / U. Dobrindt, B. Hochhut, U. Hentschel, J. Hacker // *Nat Rev Microbiol*. – 2004. – V. 2, N. 5. P414-424. – doi:10.1038/nrmicro884.
63. Enright, M.C. Multilocus sequence typing for characterization of methicillin-resistant and methicillin-susceptible clones of *Staphylococcus aureus* / M.C. Enright, N.P. Day, C.E. Davies, S.J. Peacock, B.G. Spratt // *J Clin Microbiol*. – 2000. – V. 38, N. 3. – P1008-15.
64. Evans, A.C. The Bacteria of Milk Freshly Drawn from Normal Udders // *The Journal of Infectious Diseases*. – 1916. – V. 18, N. 5. – P437-476.
65. Feil, E.J. How clonal is *Staphylococcus aureus*? / E.J. Feil, J.E. Cooper, H. Grundmann, D.A. Robinson, M.C. Enright, T. Berendt, S.J. Peacock, J.M. Smith, M. Murphy, B.G. Spratt, C.E. Moore, N.P. Day // *J Bacteriol*. – 2003. – V. 185, N. 11. – P3307-3316. – doi:10.1128/jb.185.11.3307-3316.2003.
66. Feng, Y. Evolution and pathogenesis of *Staphylococcus aureus*: lessons learned from genotyping and comparative genomics / Y. Feng, C.J. Chen, L.H. Su, S. Hu, J. Yu, C.H. Chiu // *FEMS Microbiol Rev*. – 2008. – V. 32, N. 1. – P23-37.

67. Fernández, M.M. Superantigen natural affinity maturation revealed by the crystal structure of staphylococcal enterotoxin G and its binding to T-cell receptor Vbeta8.2 / M.M. Fernández, S. Bhattacharya, M.C. De Marzi, P.H. Brown, M. Kerzic, P. Schuck, R.A. Mariuzza, E.L. Malchiodi // *Proteins*. – 2007. – V. 68, N. 1. – P389-402.
68. 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. Liu, R. Cole, P. Kuusela, P.M. Schlievert, A. Järvinen, J.M. Musser // *Infect Immun*. – 2003. – V. 71, N. 5. – P2827-2838. – doi:10.1128/iai.71.5.2827-2838.2003.
69. Fraser, J.D. The bacterial superantigen and superantigen-like proteins / F.D. Fraser, T. Proft // *Immunol Rev*. – 2008. – N. 225. – P226-43. – doi: 10.1111/j.1600-065X.2008.00681.x.
70. Frénay, H.M. Discrimination of epidemic and nonepidemic methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains on the basis of protein A gene polymorphism / H.M. Frénay, J.P. Theelen, L.M. Schouls, C.M. Vandenbroucke-Grauls, J. Verhoef, W.J. van Leeuwen, F.R. Mooi // *J Clin Microbiol*. – 1994. – V. 32, N. 3. – P846-847.
71. Frost, L.S. Mobile genetic elements: the agents of open source evolution / L.S. Frost, R. Leplae, A.O. Summers, A. Toussaint // *Nat Rev Microbiol*. – 2005. – V. 3, N. 9. – P722-32.
72. 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. Jiang, H. Qin, J. Weidman, K. Tran, K. Kang, I.R. Hance, K.E. Nelson, C.M. Fraser // *J Bacteriol*. – 2005. – V. 187, N. 7. – P2426-2438. – doi:10.1128/JB.187.7.2426-2438.2005.

73. Goerke, C. Diversity of prophages in dominant *Staphylococcus aureus* clonal lineages / C. Goerke, R. Pantucek, S. Holtfreter, B. Schulte, M. Zink, D. Grumann, B.M. Bröker, J. Doskar, C. Wolz // J Bacteriol. – 2009. – V. 191, N. 11. – P3462-3468. – doi:10.1128/JB.01804-08.
74. Gordon, R.J. Pathogenesis of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection / R.J. Gordon, E.D. Lowy // Clin Infect Dis. – 2008. – V. 46. – P350–S359. – doi:10.1086/533591
75. Goss, C.H. Review: *Staphylococcus aureus* and MRSA in cystic fibrosis / C.H. Goss, M.S. Muhlebach // J Cyst Fibros. – 2011. – V. 10, N. 5. – P298-306. – doi: 10.1016/j.jcf.2011.06.002.
76. Grothe, C. Screening and treatment for *Staphylococcus aureus* in patients undergoing hemodialysis: a systematic review and meta-analysis / C. Grothe, M. Taminato, A. Belasco, R. Sesso, D. Barbosa // BMC Nephrol. – 2014. – V. 15, N. 202. – doi:10.1186/1471-2369-15-202.
77. Guinane, C.M. The role of horizontal gene transfer in *Staphylococcus aureus* host adaptation / C.M. Guinane, J.R. Penadés, J.R. Fitzgerald // Virulence. – 2011. – V2, N. 3. – P241-243.
78. Günther, S. A novel loop domain in superantigens extends their T cell receptor recognition site / S. Günther, A.K. Varma, B. Moza, K.J. Kasper, A.W. Wyatt, P. Zhu, A.K. Rahman, Y. Li, R.A. Mariuzza, J.K. McCormick, E.J. Sundberg // J Mol Biol. – 2007. – V. 371, N. 1. – P210-221. – doi:10.1016/j.jmb.2007.05.038.
79. Hacker, J. Pathogenicity islands and the evolution of microbes / J. Hacker, J.B. Kaper // Annu Rev Microbiol. – 2000. – N. 154. – P641-79.
80. Hacker, J. Pathogenicity islands of virulent bacteria: structure, function and impact on microbial evolution / J. Hacker, G. Blum-Oehler, I. Mühldorfer, H. Tschäpe // Mol Microbiol. – 1997. – V. 23, N. 6. – P1089-97.
81. Håkansson, M. The crystal structure of staphylococcal enterotoxin H: implications for binding properties to MHC class II and TcR molecules / M. Håkansson, K. Petersson, H. Nilsson, G. Forsberg, P. Björk, P. Antonsson, L.A. Svensson // J Mol Biol. – 2000. – V. 302, N. 3. – P527-37.

82. Hardwick, N. Staphylococcal scalded skin syndrome in an adult. Influence of immune and renal factors / N. Hardwick, C.M. Parry, G.R. Sharpe // *Br J Dermatol.* – 1995. – V. 132, N. 3. – P468-71.
83. Hardy, K.J. Distribution and characterization of staphylococcal interspersed repeat units (SIRUs) and potential use for strain differentiation / K.J. Hardy, D.W. Ussery, B.A. Oppenheim, P.M. Hawkey // *Microbiol.* – 2004. – V. 150. – P4045-52.
84. Harmsen, D. Typing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in a university hospital setting by using novel software for spa repeat determination and database management / D. Harmsen, H. Claus, W. Witte, J. Rothgänger, H. Claus, D. Turnwald, U. Vogel // *J Clin Microbiol.* – 2003. – V. 41, N. 12. – P5442-5448. – doi:10.1128/jcm.41.12.5442-5448.2003.
85. Hennekinne, J.A. *Staphylococcus aureus* and its food poisoning toxins: characterization and outbreak investigation / J.A. Hennekinne, M.L. De Buyser, S. Dragacci // *FEMS Microbiol Rev.* – 2012. – V. 36, N. 4. – P815-36. – doi: 10.1111/j.1574-6976.2011.00311.x.
86. Hentschel, U. Pathogenicity islands: the tip of the iceberg / U. Hentschel, J. Hacker // *Microbes Infect.* – 2001. – V. 3, N. 7. – P545-548.
87. Hisata, K. Dissemination of multiple MRSA clones among community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections from Japanese children with impetigo / K. Hisata, T. Ito, N. Matsunaga, M. Komatsu, J. Jin, S. Li, S. Watanabe, T. Shimizu, K. Hiramatsu // *J. Infect. Chemother.* – 2011. – V. 17. – P609-621.
88. Holden, M.T. Complete genomes of two clinical *Staphylococcus aureus* strains: evidence for the rapid evolution of virulence and drug resistance / M.T. Holden, E.J. Feil, J.A. Lindsay, S.J. Peacock, N.P. Day, M.C. Enright, T.J. Foster, C.E. Moore, L. Hurst, R. Atkin, A. Barron, N. Bason, S.D. Bentley, C. Chillingworth, T. Chillingworth, C. Churcher, L. Clark, C. Corton, A. Cronin, J. Doggett, L. Dowd, T. Feltwell, Z. Hance, B. Harris, H. Hauser, S. Holroyd, K. Jagels, K.D. James, N. Lennard, A. Line, R. Mayes, S. Moule, K. Mungall, D. Ormond, M.A. Quail, E. Rabinowitsch, K. Rutherford, M. Sanders, S. Sharp, M. Simmonds, K. Stevens,

- S. Whitehead, B.G. Barrell, B.G. Spratt, J. Parkhill // Proc Natl Acad Sci U S A. – 2004. – V. 101, N. 26. – P9786-9791. – doi:10.1073/pnas.0402521101.
89. Holmberg, S.D. Staphylococcal food poisoning in the United States. New facts and old misconceptions / S.D. Holmberg, P.A. Blake // JAMA. – 1984. – V. 251, N. 4. – P487-9.
90. Holochová, P. Genomic diversity of two lineages of exfoliative toxin A-converting phages predominating in *Staphylococcus aureus* strains in the Czech Republic / P. Holochová, V. Růžicková, R. Pantůček, P. Petrás, R. Janisch, J. Doskar // Res Microbiol. – 2010. – V. 161, N. 4. – P260-7. – doi:10.1016/j.resmic.2010.03.008.
91. Holochová, P. Rapid detection and differentiation of the exfoliative toxin A-producing *Staphylococcus aureus* strains based on phiETA prophage polymorphisms / P. Holochová, V. Růžicková, L. Dostálová, R. Pantůček, P. Petrás, J. Doskar // Diagn Microbiol Infect Dis. – 2010. – V. 66, N. 3. – P248-52. – doi: 10.1016/j.diagmicrobio.2009.10.008.
92. Hookey, J.V. Molecular typing of *Staphylococcus aureus* based on PCR restriction fragment length polymorphism and DNA sequence analysis of the coagulase gene / J.V. Hookey, J.F. Richardson, B.D. Cookson // J Clin Microbiol. – 1998. – V. 36, N. 4. – P1083-1089.
93. Hooper, S.D. Detection of genes with atypical nucleotide sequence in microbial genomes / S.D. Hooper, O.G. Berg // J Mol Evol. – 2002. – V. 54, N. 3. – P365-375. – doi:10.1007/s00239-001-0051-8.
94. Hu, D.L. Staphylococcal enterotoxin induces emesis through increasing serotonin release in intestine and it is downregulated by cannabinoid receptor 1 / D.L. Hu, G. Zhu, F. Mori, K. Omoe, M. Okada, K. Wakabayashi, S. Kaneko, K. Shinagawa, A. Nakane // Cell Microbiol. – 2007. – V. 9, N. 9. – P2267-77.
95. Huson, D.H. Application of phylogenetic networks in evolutionary studies / D.H. Huson, D. Bryant // Mol Biol Evol. – 2006. – V. 23, N. 2. – P254-67.
96. Ikawaty, R. Novel multiple-locus variable-number tandem-repeat analysis method for rapid molecular typing of human *Staphylococcus aureus* / R. Ikawaty, R.J.

- Willems, A.T. Box, J. Verhoef, A.C. Fluit // J Clin Microbiol. – 2008. – V. 46, N. 9. – P3147-51.
97. International Working Group on the Classification of Staphylococcal Cassette Chromosome Elements (IWG-SCC). Classification of staphylococcal cassette chromosome mec (SCCmec): guidelines for reporting novel SCCmec elements. Antimicrob Agents Chemother. – 2009. – V. 53, N. 12. – P4961-4967. – doi:10.1128/AAC.00579-09.
98. Ishino, K. Usefulness of PCR-restriction fragment length polymorphism typing of the coagulase gene to discriminate arbekacin-resistant methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains / K. Ishino, N. Tsuchizaki, J. Ishikawa, K. Hotta // J Clin Microbiol. – 2007. – V. 45, N. 2. – P607-609. – doi:10.1128/JCM.02099-06.
99. Ito, T. Insights on antibiotic resistance of *Staphylococcus aureus* from its whole genome: genomic island SCC / Ito T, Okuma K, Ma XX, Yuzawa H, Hiramatsu K // Drug Resist Updates. – 2003. – V. 6, N. 1. – P41-52.
100. Jackson, M.P. Cloning and expression of the exfoliative toxin B gene from *Staphylococcus aureus* / M.P. Jackson, J.J. Iandolo // J Bacteriol. – 1986. – V. 166, N. 2. – P574-580. – doi:10.1128/jb.166.2.574-580.1986.
101. Jarraud, S. egc, a highly prevalent operon of enterotoxin gene, forms a putative nursery of superantigens in *Staphylococcus aureus* / S. Jarraud, M.A. Peyrat, A. Lim, A. Tristan, M. Bes, C. Mougel, J. Etienne, F. Vandenesch, M. Bonneville, G. Lina // J Immunol. – 2001. – V. 166, N. 1. – 669-77.
102. Jarraud, S. Relationships between *Staphylococcus aureus* genetic background, virulence factors, agr groups (alleles), and human disease / S. Jarraud, C. Mougel, J. Thioulouse, G. Lina, H. Meugnier, F. Forey, X. Nesme, J. Etienne, F. Vandenesch // Infect Immun. – 2002 – V70, N. 2. – P631-41. – doi: 10.1128/iai.70.2.631-641.2002.
103. Ji, Y. Validation of antibacterial mechanism of action using regulated antisense RNA expression in *Staphylococcus aureus* / Y. Ji, D. Yin, B. Fox, D.J. Holmes, D. Payne, M. Rosenberg // FEMS Microbiol Lett. – 2004. – V. 231, N. 2. – P177-84.

104. Joensen, K.G. Real-time whole-genome sequencing for routine typing, surveillance, and outbreak detection of verotoxigenic *Escherichia coli* / K.G. Joensen, F. Scheutz, O. Lund, H. Hasman, R.S. Kaas, E.M. Nielsen, F.M. Aarestrup // J Clin Microbiol. – 2014. – V. 52, N. 5. – P1501-1510. – doi:10.1128/JCM.03617-13.
105. Johnson, W.M. Detection of genes for enterotoxins, exfoliative toxins, and toxic shock syndrome toxin 1 in *Staphylococcus aureus* by the polymerase chain reaction / W.M. Johnson, S.D. Tyler, E.P. Ewan, F.E. Ashton, D.R. Pollard, K.R. Rozee // J Clin Microbiol. – 1991. – V. 29, N. 3. – P426-30.
106. Juhas, M. Novel type IV secretion system involved in propagation of genomic islands / M. Juhas, D.W. Crook, I.D. Dimopoulou, G. Lunter, R.M. Harding, D.J. Ferguson, D.W. Hood // J Bacteriol. – 2007. – V. 189, N. 3. – P761-771. – doi:10.1128/JB.01327-06.
107. Jünemann, S. Updating benchtop sequencing performance comparison / S. Jünemann, F.J. Sedlazeck, K. Prior, A. Albersmeier, U. John, J. Kalinowski, A. Mellmann, A. Goesmann, A. von Haeseler, J. Stoye, D. Harmsen // Nat Biotechnol. – 2013. – V. 31, N. 4. – P294-6. – doi: 10.1038/nbt.2522.
108. Kadariya, J. *Staphylococcus aureus* and staphylococcal food-borne disease: an ongoing challenge in public health / J. Kadariya, T.C. Smith, D. Thapaliya // Biomed Res Int. – 2014. – 827965. – doi:10.1155/2014/827965.
109. Karlin, S. Detecting anomalous gene clusters and pathogenicity islands in diverse bacterial genomes // Trends Microbiol. – 2001. – V. 9, N. 7. – P335-343.
110. Kent, T.H. Staphylococcal enterotoxin gastroenteritis in rhesus monkeys // Am J Pathol. – 1966. – V. 48, N. 3. – P387-407.
111. Khromykh, A. The Benefits of Whole-Genome Sequencing Now and in the Future / A. Khromykh, B.D. Solomon // Mol Syndromol. – 2015. – V. 6, N. 3. – P108-109. – doi:10.1159/000438732.
112. Kinoshita, M. Diversity of staphylocoagulase and identification of novel variants of staphylocoagulase gene in *Staphylococcus aureus* / M. Kinoshita, N. Kobayashi, S. Nagashima, M. Ishino, S. Otokozawa, K. Mise, A. Sumi, H. Tsutsumi, N.

- Uehara, N. Watanabe, M. Endo // *Microbiol Immunol.* – 2008. – V. 52, N. 7. – P334-48. – doi: 10.1111/j.1348-0421.2008.00045.x.
113. Kluytmans, J. Nasal carriage of *Staphylococcus aureus*: epidemiology, underlying mechanisms, and associated risks / J. Kluytmans, A. van Belkum, H. Verbrugh // *Clin Microbiol Rev.* – 1997. – V. 10, N. 3. – P505-520.
114. Kondo, I. Two serotypes of exfoliatin and their distribution in staphylococcal strains isolated from patients with scalded skin syndrome / I. Kondo, S. Sakurai, Y. Sarai, S. Futaki // *J Clin Microbiol.* – 1975. – V. 1, N. 5. – P397-400.
115. 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 // *Antimicrob Agents Chemother.* – 2007. – V. 51. – P264-74.
116. Kourtis, A.P. Vital Signs: Epidemiology and Recent Trends in Methicillin-Resistant and in Methicillin-Susceptible *Staphylococcus aureus* Bloodstream Infections / A.P. Kourtis, K. Hatfield, J. Baggs, Y. Mu, I. See, E. Epton, J. Nadle, M.A. Kainer, G. Dumyati, S. Petit, S.M. Ray, Emerging Infections Program MRSA author group, D. Ham, C. Capers, H. Ewing, N. Coffin, L.C. McDonald; J. Jernigan, D. Cardo // *United States. MMWR Morb Mortal Wkly Rep.* – 2019. – V. 68. – P214–219. – doi: <http://dx.doi.org/10.15585/mmwr.mm6809e1>.
117. Kreiswirth, B.N. The toxic syndrome exotoxin structural gene is not detectably transmitted by a phage / B.N. Kreiswirth, S. Löfdahl, M.J. Betley, M. O'Reilly, P.M. Schlievert, M.S. Bergdoll, R.P. Novick // *Nature.* – 1983. – N. 305. – P704-712.
118. Kwan, T. The complete genomes and proteomes of 27 *Staphylococcus aureus* bacteriophages / T. Kwan, J. Liu, M. DuBow, P. Gros, J. Pelletier // *Proc Natl Acad Sci U S A.* – 2005. – V. 102, N. 114. – P5174-5179. – doi:10.1073/pnas.0501140102.
119. Ladhani, S. Clinical, microbial, and biochemical aspects of the exfoliative toxins causing staphylococcal scalded-skin syndrome / S. Ladhani, C.L. Joannou, D.P.

- Lochrie, R.W. Evans, S.M. Poston // Clin Microbiol Rev. – 1999. – V. 12, N. 2. – P224–242.
120. Ladhani, S. Staphylococcal scalded skin syndrome / S. Ladhani, R.W. Evans // Arch Dis Child. – 1998. – V. 78, N. 1. – P85-88. – doi:10.1136/adc.78.1.85.
121. Lamand, V. Epidemiological data of staphylococcal scalded skin syndrome in France from 1997 to 2007 and microbiological characteristics of *Staphylococcus aureus* associated strains / V. Lamand, O. Dauwalder, A. Tristan, J.S. Casalegno, H. Meugnier, M. Bes, O. Dumitrescu, M. Croze, F. Vandenesch, J. Etienne, G. Lina // Clin Microbiol Infect. – 2012. – V. 18, N. 12. – P514-21. – doi:10.1111/1469-0691.12053.
122. 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 // J Immunol. – 2005. – V. 174, N. 5. – P2926-33.
123. Larkin, E.A. *Staphylococcus aureus*: the toxic presence of a pathogen extraordinaire / E.A. Larkin, R.J. Carman, T. Krakauer, B.G. Stiles // Curr Med Chem. – 2009. – V. 16, N. 30. – P4003-19.
124. Lawrence, J.G. Molecular archaeology of the *Escherichia coli* genome / J.G. Lawrence, H. Ochman // Proc Natl Acad Sci USA. – 1998. – V. 95, N. 16. – P9413-9417.
125. Le Loir, Y. *Staphylococcus aureus* and food poisoning / Y. Le Loir, F. Baron, M. Gautier // Genet Mol Res. – 2003. – V. 2, N. 1. – P63-76.
126. Lee, C.Y. Sequence determination and comparison of the exfoliative toxin A and toxin B genes from *Staphylococcus aureus* / C.Y. Lee, J.J. Schmidt, A.D. Johnson-Winegar, L. Spero, J.J. Iandolo // J Bacteriol. – 1987. – V. 169, N. 9. – P3904-3909. – doi:10.1128/jb.169.9.3904-3909.1987.
127. Leopold, S.R. Bacterial whole-genome sequencing revisited: portable, scalable, and standardized analysis for typing and detection of virulence and antibiotic resistance genes / S.R. Leopold, R.V. Goering, A. Witten, D. Harmsen, A.

- Mellmann // J Clin Microbiol. – 2014. – V. 52, N. 7. – P2365-70. – doi: 10.1128/JCM.00262-14.
128. Letertre, C. Identification of a new putative enterotoxin SEU encoded by the egc cluster of *Staphylococcus aureus* / C. Letertre, S. Perelle, F. Dilasser, P. Fach // J Appl Microbiol. – 2003. – V. 95, N. 1. – P38-43.
129. Li, Q.T. A novel sequence-based coa genotyping method to discriminate nosocomial methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates / Q.T. Li, Y.Z. Zhu, K. Dong, C. Liu, Y.H. Zhou, Y.X. Ni, X.K. Guo // Ir J Med Sci. – 2011. – V. 180, N. 2. – P463-8. – doi: 10.1007/s11845-011-0680-x.
130. Lillibridge, C.B. Site of action of exfoliative toxin in the staphylococcal scaled-skin syndrome / C.B. Lillibridge, M.E. Melish, L.A. Glasgow // Pediatrics. – 1972. – V. 50, N. 5. – P728-38.
131. Lina, G. Standard nomenclature for the superantigens expressed by *Staphylococcus* / G. Lina, G.A. Bohach, S.P. Nair, K. Hiramatsu, E. Jouvin-Marche, R. Mariuzza // J Infect Dis. – 2004. – V. 189, N. 12. – P2334-2336. – doi:10.1086/420852.
132. Lindsay, J.A. Genomic variation and evolution of *Staphylococcus aureus* / J.A. Lindsay // Int J Med Microbiol. – 2010. – V. 300, N. 2-3. – P98-103. – doi: 10.1016/j.ijmm.2009.08.013.
133. Lindsay, J.A. *Staphylococcus aureus*: superbug, super genome? / J.A. Lindsay, M.T. Holden // Trends Microbiol. – 2004. – V. 12, N. 8. – P378-385.
134. Lindsay, J.A. The gene for toxic shock toxin is carried by a family of mobile pathogenicity islands in *Staphylococcus aureus* / J.A. Lindsay, A. Ruzin, H.F. Ross, N. Kurepina, R.P. Novick // Mol Microbiol. – 1998. – V. 29, N. 2. – P527-43.
135. Lu, P.L. One tube multiplex PCR for simple screening of SCCmec I-V types of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* / P.L. Lu, J.C. Chang, H.T. Hsu, J.H. Chen, F.J. Chen, S.F. Lin, L.K. Siu // J Chemother. – 2008. – V. 20, N. 6. – P690-6.
136. Lyell, A. Toxic epidermal necrolysis // Nurs. Mirror Midwives J. – 1973. – N. 136. – P42-45.

137. Madden, T.L. Applications of network BLAST server / T.L. Madden, R.L. Tatusov, J. Zhang // *Methods Enzymol.* – 1996. – N. 266. – P131-41.
138. Maiden, M.C. MLST revisited: the gene-by-gene approach to bacterial genomics / M.C. Maiden, M.J. Jansen van Rensburg, J.E. Bray, S.G. Earle, S.A. Ford, K.A. Jolley, N.D. McCarthy // *Nat Rev Microbiol.* – 2013. – V. 11, N. 110. – P728-36. – doi: 10.1038/nrmicro3093.
139. Maiques, E. Role of staphylococcal phage and SaPI integrase in intra- and interspecies SaPI transfer / E. Maiques, C. Úbeda, M.Á. Tormo, M.D. Ferrer, Í. Lasa, R.P. Novick, J.R. Penadés // *J Bacteriol.* – 2007. – V. 189, N. 15. – P5608-5616. – doi:10.1128/JB.00619-07.
140. Makgotlho, P.E. Molecular identification and genotyping of MRSA isolates / P.E. Makgotlho, M.M. Kock, A. Hoosen, R. Lekalakala, S. Omar, M. Dove, M.M. Ethlers // *FEMS Immun. Med. Microbiol.* – 2009. – V. 57, N. 2. – P104-115.
141. Malachowa, N. Mobile genetic elements of *Staphylococcus aureus* / N. Malachowa, F.R. DeLeo // *Cell Mol Life Sci.* – 2010. – V. 67, N. 18. – P3057-3071. – doi:10.1007/s00018-010-0389-4.
142. McCormick, J.K. Toxic shock syndrome and bacterial superantigens: an update / J.K. McCormick, J.M. Yarwood, P.M. Schlievert // *Annu Rev Microbiol.* – 2001. – N. 55. – P77-104.
143. Mehrotra, M. Multiplex PCR for detection of genes for *Staphylococcus aureus* enterotoxins, exfoliative toxins, toxic shock syndrome toxin 1, and methicillin resistance / M. Mehrotra, G. Wang, W.M. Johnson // *J. Clin. Microbiol.* – 2000. – V. 38, N. 3. – P1032-1035.
144. Melish, M.E. The staphylococcal scalded-skin syndrome / M.E. Melish, L.A. Glasgow // *N Engl J Med.* – 1970. – V. 282, N. 20. – P1114-9.
145. Middleton, J.R. *Staphylococcus aureus* antigens and challenges in vaccine development // *Expert Rev Vaccines.* – 2008. – V. 7, N. 6. – P805-15. – doi: 10.1586/14760584.7.6.805.

146. Milheiriço, C. Update to the multiplex PCR strategy for assignment of mec element types in *Staphylococcus aureus* / C. Milheiriço, D.C. Oliveira, H. de Lencastre // *Antimicrob Agents Chemother.* – 2007. – V. 51, N. 9. – P3374-7.
147. Mir-Sanchis, I. Control of *Staphylococcus aureus* pathogenicity island excision / I. Mir-Sanchis, R. Martínez-Rubio, M. Martí, J. Chen, Í. Lasa, R.P. Novick, M.Á. Tormo-Más, J.R. Penadés // *Mol Microbiol.* – 2012. – V. 85, N. 5. – P833-45. – doi: 10.1111/j.1365-2958.2012.08145.x.
148. Młynarczyk, A. The genome of *Staphylococcus aureus*: a review / A. Młynarczyk, G. Młynarczyk, J. Jeljaszewicz // *Zentralbl Bakteriolog.* – 1998. – V. 287, N. 4. – P277-314.
149. Mockenhaupt, M. Epidemiology of staphylococcal scalded skin syndrome in Germany / M. Mockenhaupt, M. Idzko, M. Grosber, E. Schöpf, J. Norgauer // *J Invest Dermatol.* – 2005. – V. 124, N. 4. – P700-3.
150. Murray, R.J. Recognition and management of *Staphylococcus aureus* toxin-mediated disease // *Intern Med J.* – 2005. – V. 35. – P106-19.
151. Nahvi, M.D. Sequence analysis of dru regions from methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and coagulase-negative staphylococcal isolates / M.D. Nahvi, J.E. Fitzgibbon, J.F. John, D.T. Dubin // *Microb Drug Resist.* – 2001. – V. 7, N. 1. – P1-12.
152. Needham, C. The staphylococcal insertion sequence IS257 is active / C. Needham, W.C. Noble, K.G. Dyke // *Plasmid.* – 1995. – V. 34. I3. – P198-205.
153. Noto, M.J. A subset of *Staphylococcus aureus* strains harboring staphylococcal cassette chromosome mec (SCCmec) type IV is deficient in CcrAB-mediated SCCmec excision / M.J. Noto, G.L. Archer // *Antimicrob Agents Chemother.* – 2006. – V. 50, N. 8. – P2782-2788. – doi:10.1128/AAC.00032-06.
154. Novick, R.P. Mobile genetic elements and bacterial toxinoses: the superantigen-encoding pathogenicity islands of *Staphylococcus aureus* // *Plasmid.* – 2003. – V. 49, N. 2. – P93-105.
155. Novick, R.P. The SaPIs: mobile pathogenicity islands of *Staphylococcus* / R.P. Novick, A. Subedi // *Chem Immunol Allergy.* – 2007. – N. 93. – P42-57.

156. Okonechnikov, K. Unipro UGENE: a unified bioinformatics toolkit / K. Okonechnikov, O. Golosova, M. Fursov; UGENE team // *Bioinformatics*. – 2012. – V. 28, N. 8. – P1166-7. – doi: 10.1093/bioinformatics/bts091.
157. 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 // *Antimicrob Agents Chemother*. – 2002. – V. 46, N. 7. – P2155-61.
158. Omoe, K. Characterization of novel staphylococcal enterotoxin-like toxin type P / K. Omoe, K. Imanishi, D.L. Hu, H. Kato, Y. Fugane, Y. Abe, S. Hamaoka, Y. Watanabe, A. Nakane, T. Uchiyama, K. Shinagawa // *Infect Immun*. – 2005. – V. 73, N. 9. – P5540-5546. – doi:10.1128/IAI.73.9.5540-5546.2005.
159. Omoe, K. Comprehensive analysis of classical and newly described staphylococcal superantigenic toxin genes in *Staphylococcus aureus* isolates / K. Omoe, D.L. Hu, H. Takahashi-Omoe, A. Nakane, K. Shinagawa // *FEMS Microbiol Lett*. – 2005. – V. 246, N. 2. – P191-8.
160. Omoe, K. Identification and characterization of a new staphylococcal enterotoxin-related putative toxin encoded by two kinds of plasmids / K. Omoe, D.L. Hu, H. Takahashi-Omoe, A. Nakane, K. Shinagawa // *Infect Immun*. – 2003. – V. 71, N. 10. – P6088-6094. – doi:10.1128/iai.71.10.6088-6094.2003.
161. Ono, H.K. Identification and characterization of two novel staphylococcal enterotoxins, types S and T / H.K. Ono, K. Omoe, K. Imanishi, Y. Iwakabe, D.L. Hu, H. Kato, N. Saito, A. Nakane, T. Uchiyama, K. Shinagawa // *Infect Immun*. – 2008. – V. 76, N. 11. – P4999-5005. – doi:10.1128/IAI.00045-08.
162. Orwin, P.M. Characterization of a novel staphylococcal enterotoxin-like superantigen, a member of the group V subfamily of pyrogenic toxins / P.M. Orwin, D.Y. Leung, T.J. Tripp, G.A. Bohach, C.A. Earhart, D.H. Ohlendorf, P.M. Schlievert // *Biochemistry*. – 2002. – V. 41, N. 47. – P14033-40.
163. Orwin, P.M. Characterization of *Staphylococcus aureus* enterotoxin L / P.M. Orwin, J.R. Fitzgerald, D.Y. Leung, J.A. Gutierrez, G.A. Bohach, P.M. Schlievert

- // Infect Immun. – 2003. – V. 71, N. 5. – P2916-2919. – doi:10.1128/iai.71.5.2916-2919.2003.
164. Otero, A. Production of staphylococcal enterotoxins C1 and C2 and thermonuclease throughout the growth cycle / A. Otero, M.L. García, M.C. García, B. Moreno, M.S. Bergdoll // Appl Environ Microbiol. – 1990. – V. 56, N. 2. – P555-559.
165. O'Toole, P.W. Nucleotide sequence of the epidermolytic toxin A gene of *Staphylococcus aureus* / P.W. O'Toole, T.J. Foster // J Bacteriol. – 1987. – V. 169, N. 9. – P3910-3915. – doi:10.1128/jb.169.9.3910-3915.1987.
166. Papageorgiou, A.C. Structural similarities and differences in *Staphylococcus aureus* exfoliative toxins A and B as revealed by their crystal structures / A.C. Papageorgiou, L.R. Plano, C.M. Collins, K.R. Acharya // Protein Sci. – 2000. – V. 9, N. 3. – P610-618. – doi:10.1110/ps.9.3.610.
167. Payne, A.S. Desmosomes and disease: pemphigus and bullous impetigo / A.S. Payne, Y. Hanakawa, M. Amagai, J.R. Stanley // Curr Opin Cell Biol. – 2004. – V. 16, N. 5. – P536-43.
168. Pearson, T. Phylogeographic reconstruction of a bacterial species with high levels of lateral gene transfer / T. Pearson, P. Giffard, S. Beckstrom-Sternberg, R. Auerbach, H. Hornstra, A. Tuanyok, E.P. Price, M.B. Glass, B. Leadem, J.S. Beckstrom-Sternberg, G.J. Allan, J.T. Foster, D.M. Wagner, R.T. Okinaka, S.H. Sim, O. Pearson, Z. Wu, J. Chang, R. Kaul, A.R. Hoffmaster, T.S. Brettin, R.A. Robison, M. Mayo, J.E. Gee, P. Tan, B.J. Currie, P. Keim // BMC Biol. – 2009. – V. 7, N. 78. – doi:10.1186/1741-7007-7-78.
169. Peng, H. Comparison of community- and healthcare-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates at a Chinese tertiary hospital, 2012-2017 / H. Peng, D. Liu, Y. Ma, W. Gao // Sci Rep. – 2018. – V. 8, N. 1. – 17916. – doi:10.1038/s41598-018-36206-5.
170. Pinchuk, I.V. Staphylococcal enterotoxins / I.V. Pinchuk, E.J. Beswick, V.E. Reyes // Toxins (Basel). – 2010. – V. 2, N. 8. – P2177–2197. – doi:10.3390/toxins2082177.

171. Plata, K. *Staphylococcus aureus* as an Infectious Agent: Overview of Biochemistry and Molecular Genetics of Its Pathogenicity / K. Plata, A.E. Rosato, G. Wegrzyn // *Acta Biochimica Polonica* – 2009. – V. 56. – P597-612.
172. Prévost, G. Functional evidence that the Ser-195 residue of staphylococcal exfoliative toxin A is essential for biological activity / G. Prévost, S. Rifai, M.L. Chaix, Y. Piémont // *Infect Immun.* – 1991. – V. 59, N. 9. – P3337-3339.
173. Rasko, D.A. The pangenome structure of *Escherichia coli*: comparative genomic analysis of *E. coli* commensal and pathogenic isolates / D.A. Rasko, M.J. Rosovitz, G.S. Myers, E.F. Mongodin, W.F. Fricke, P. Gajer, J. Crabtree, M. Sebaihia, N.R. Thomson, R. Chaudhuri, I.R. Henderson, V. Sperandio, J. Ravel // *J Bacteriol.* – 2008. – V. 190, N. 20. – P6881-6893. – doi:10.1128/JB.00619-08.
174. Rasmussen, G. Prevalence of clonal complexes and virulence genes among commensal and invasive *Staphylococcus aureus* isolates in Sweden / G. Rasmussen, S. Monecke, R. Ehricht, B. Söderquist // *PLoS One.* – 2013. – V. 8, N. 10. – e77477. – doi:10.1371/journal.pone.0077477.
175. Redpath, M.B. The role of the serine protease active site in the mode of action of epidermolytic toxin of *Staphylococcus aureus* / M.B. Redpath, T.J. Foster, C.J. Bailey // *FEMS Microbiol Lett.* – 1991. – V. 65, N. 2. – P151-5.
176. Reiser, R.F. Purification and some physicochemical properties of toxic-shock toxin / R.F. Reiser, R.N. Robbins, G.P. Khoe, M.S. Bergdoll // *Biochemistry.* – 1983. – V. 22, N. 16. – P3907-12.
177. Robinson, D.A. Evolution of *Staphylococcus aureus* by large chromosomal replacements / D.A. Robinson, M.C. Enright // *J Bacteriol.* – 2004. – V. 186, N. 4. – P1060-1064. – doi:10.1128/jb.186.4.1060-1064.2004.
178. Romaniszyn, D. Epidemiology, antibiotic consumption and molecular characterisation of *Staphylococcus aureus* infections--data from the Polish Neonatology Surveillance Network, 2009-2012 / D. Romaniszyn, A. Róžańska, J. Wójkowska-Mach, A. Chmielarczyk, M. Pobiega, P. Adamski, E. Helwich, R. Lauterbach, M. Borszewska-Kornacka, E. Gulczyńska, A. Kordek, M. Bulanda // *BMC Infect Dis.* – 2015. – V. 15, N. 169. – doi:10.1186/s12879-015-0890-3.

179. Rooijackers, S.H. Anti-opsonic properties of staphylokinase / S.H. Rooijackers, W.J. van Wamel, M. Ruyken, K.P. van Kessel, J.A. van Strijp // *Microbes Infect.* – 2005. – V. 7, N. 3. – P476-84.
180. Rooijackers, S.H. Immune evasion by a staphylococcal complement inhibitor that acts on C3 convertases / S.H. Rooijackers, M. Ruyken, A. Roos, M.R. Daha, J.S. Presanis, R.B. Sim, W.J. van Wamel, K.P. van Kessel, J.A. van Strijp // *Nat Immunol.* – 2005. – V. 6, N. 9. – P920-7.
181. Rowland, S.J. Characterization of the staphylococcal beta-lactamase transposon Tn552 / S.J. Rowland, K.G. Dyke // *EMBO J.* – 1989. – V. 8, N. 9. – P2761-2773.
182. Růžičková, V. Major clonal lineages in impetigo *Staphylococcus aureus* strains isolated in Czech and Slovak maternity hospitals / V. Růžičková, R. Pantůček, P. Petráš, I. Machová, K. Kostýlková, J. Doškař // *Int J Med Microbiol.* – 2012. – V. 302, N. 6. – P237-41. – doi: 10.1016/j.ijmm.2012.04.001.
183. Sabat, A. New method for typing *Staphylococcus aureus* strains: multiple-locus variable-number tandem repeat analysis of polymorphism and genetic relationships of clinical isolates / A. Sabat, J. Krzyszton-Russjan, W. Strzalka, R. Filipek, K. Kosowska, W. Hryniewicz, J. Travis, J. Potempa // *J Clin Microbiol.* – 2003. – V. 41, N. 4. – P1801-4.
184. Salipante, S.J. Application of whole-genome sequencing for bacterial strain typing in molecular epidemiology / S.J. Salipante, D.J. SenGupta, L.A. Cummings, T.A. Land, D.R. Hoogestraat, B.T. Cookson // *J Clin Microbiol.* – 2015. – V. 53, N. 4. – P1072-9. – doi: 10.1128/JCM.03385-14.
185. Sato, H. A new type of staphylococcal exfoliative toxin from a *Staphylococcus aureus* strain isolated from a horse with phlegmon / H. Sato, Y. Matsumori, T. Tanabe, H. Saito, A. Shimizu, J. Kawano // *Infect Immun.* – 1994. – V. 62, N. 9. – P3780-3785.
186. Sato'o, Y. A novel comprehensive analysis method for *Staphylococcus aureus* pathogenicity islands / Y. Sato'o, K. Omoe, H.K. Ono, A. Nakane, D.L. Hu // *Microbiol Immunol.* – 2013. – V. 57, N. 2. – P91-99. – doi: 10.1111/1348-0421.12007.

187. Sato'o, Y. Molecular epidemiology and identification of a *Staphylococcus aureus* clone causing food poisoning outbreaks in Japan / Y. Sato'o, K. Omoe, I. Naito, H.K. Ono, A. Nakane, M. Sugai, N. Yamagishi, D.L. Hu // J Clin Microbiol. – 2014. – V. 52, N. 7. – P2637-2640. – doi:10.1128/JCM.00661-14.
188. Scallan, E. Factors associated with seeking medical care and submitting a stool sample in estimating the burden of foodborne illness / E. Scallan, T.F. Jones, A. Cronquist, S. Thomas, P. Frenzen, D. Hoefler, C. Medus, F.J. Angulo, FoodNet Working Group // Foodborne Pathog Dis. – 2006. – V. 3, N. 4. – P432-8.
189. Scaria, J. Analysis of ultra low genome conservation in *Clostridium difficile* / J. Scaria, L. Ponnala, T. Janvilisri, W. Yan, L.A. Mueller, Y.F. Chang // PLoS One. – 2010. – V. 5, N. 12. – e15147. – doi:10.1371/journal.pone.0015147.
190. Schad, E.M. Crystal structure of the superantigen staphylococcal enterotoxin type A / E.M. Schad, I. Zaitseva, V.N. Zaitsev, M. Dohlsten, T. Kalland, P.M. Schlievert, D.H. Ohlendorf, L.A. Svensson // EMBO J. – 1995. – V. 14, N. 14. – P3292-3301.
191. Severin, A. High-level (beta)-lactam resistance and cell wall synthesis catalyzed by the mecA homologue of *Staphylococcus sciuri* introduced into *Staphylococcus aureus* / A. Severin, S.W. Wu, K. Tabei, A. Tomasz // J Bacteriol. – 2005. – V. 187, N. 19. – P6651-6658. – doi:10.1128/JB.187.19.6651-6658.2005.
192. Sharma, V.K. Transcriptional regulation by TrsN of conjugative transfer genes on staphylococcal plasmid pGO1 / V.K. Sharma, J.L. Johnston, T.M. Morton, G.L. Archer // J Bacteriol. – 1994. – V. 176, N. 12. – P3445-3454. – doi:10.1128/jb.176.12.3445-3454.1994.
193. 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 // J Clin Microbiol. – 2011. – V. 49, N. 5. – P1972-1974. – doi:10.1128/JCM.01742-10.

194. Shupp, J.W. Identification of a transcytosis epitope on staphylococcal enterotoxins / J.W. Shupp, M. Jett, C.H. Pontzer // *Infect Immun.* – 2002. – V. 70, N. 4. – P2178-2186. – doi:10.1128/iai.70.4.2178-2186.2002.
195. Siefert, J.L. Defining the mobilome // *Methods Mol Biol.* – 2009. – N. 532. – P13-27. – doi: 10.1007/978-1-60327-853-9_2.
196. Su, Y.C. Identification and purification of a new staphylococcal enterotoxin, H / Y.C. Su, A.C. Wong AC // *Appl Environ Microbiol.* – 1995. – V. 61, N. 4. – P1438-43.
197. Sugiyama, H. Abdominal viscera as site of emetic action for staphylococcal enterotoxin in the monkey / H. Sugiyama, T. Hayama // *J Infect Dis.* – 1965. – V115, N. 4. – P330-6.
198. Sullivan, R. Effects of enterotoxin B on intestinal transport in vitro // *Proc Soc Exp Biol Med.* – 1969. – V. 131, N. 4. – P1159-62.
199. Sumbly, P. Transcription of the toxin genes present within the Staphylococcal phage phiSa3ms is intimately linked with the phage's life cycle / P. Sumbly, M.K. Waldor // *J Bacteriol.* – 2003. – V. 185, N. 23. – P6841-6851. – doi:10.1128/jb.185.23.6841-6851.2003.
200. Suzuki, M. Development of a rapid strain differentiation method for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolated in Japan by detecting phage-derived open-reading frames / M. Suzuki, Y. Tawada, M. Kato, H. Hori, N. Mamiya, Y. Hayashi, M. Nakano, R. Fukushima, A. Katai, T. Tanaka, M. Hata, M. Matsumoto, M. Takahashi, K. Sakae // *J. Appl. Microbiol.* – 2006. – V. 101. – P938-947.
201. Suzuki, Y. Molecular epidemiological characterization of *Staphylococcus aureus* isolates originating from food poisoning outbreaks that occurred in Tokyo, Japan / Y. Suzuki, K. Omoe, D.L. Hu, Y. Sato'o, H.K. Ono, C. Monma, T. Arai, N. Konishi, R. Kato, A. Hirai, A. Nakama, A. Kai, Kamata Y. // *Microbiol Immunol.* – 2014. – V. 58, N. 10. – P570-80. – doi: 10.1111/1348-0421.12188.
202. Swaminathan, S. Crystal structure of staphylococcal enterotoxin B, a superantigen / S. Swaminathan, W. Furey, J. Pletcher, M. Sax // *Nature.* – 1992. – V. 359, N. 6398. – P801-6.

203. 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, S. Shi, I. Reva, L.J. Teng, T. Yamamoto // *Antimicrob. Agents Chemother.* – 2008. – V 52, N. 3. – P837-845.
204. Tallent, S.M. Transducing particles of *Staphylococcus aureus* pathogenicity island SaPI1 are comprised of helper phage-encoded proteins / S.M. Tallent, T.B. Langston, R.G. Moran, G.E. Christie // *J Bacteriol.* – 2007. – V. 189, N. 20. – P7520-7524. – doi:10.1128/JB.00738-07.
205. Tamarapu, S. Development of a multiplex polymerase chain reaction assay for detection and differentiation of *Staphylococcus aureus* in dairy products / S. Tamarapu, J.L. McKillip, M. Drake // *J Food Prot.* – 2001. – V. 64, N. 5. – P664-8.
206. Thomas, D. Diversity in *Staphylococcus aureus* enterotoxins / D. Thomas, S. Chou, O. Dauwalder, G. Lina // *Chem Immunol Allergy.* – 2007. – N. 93. – P24-41.
207. Thomas, D.Y. Staphylococcal enterotoxin-like toxins U2 and V, two new staphylococcal superantigens arising from recombination within the enterotoxin gene cluster / D.Y. Thomas, S. Jarraud, B. Lemercier, G. Cozon, K. Echasserieau, J. Etienne, M.L. Gougeon, G. Lina, F. Vandenesch // *Infect Immun.* – 2006. – V. 74, N. 8. – P4724-4734. – doi:10.1128/IAI.00132-06.
208. Trindade, P.A. Molecular techniques for MRSA typing: current issues and perspectives / P.A. Trindade, J.A. McCulloch, G.A. Oliveira, E.M. Mamizuka // *Braz J Infect Dis.* – 2003. – V. 7, N. 1. – P32-43.
209. Tsuru, T. Multiple genome comparison within a bacterial species reveals a unit of evolution spanning two adjacent genes in a tandem paralog cluster / T. Tsuru, I. Kobayashi // *Mol Biol Evol.* – 2008. – V. 25, N. 11. – P2457-2473. – doi:10.1093/molbev/msn192.

210. Ubeda, C. A pathogenicity island replicon in *Staphylococcus aureus* replicates as an unstable plasmid / C. Ubeda, P. Barry, J.R. Penadés, R.P. Novick // Proc Natl Acad Sci U S A. – 2007. – V. 104, N. 36. – P14182-14188. – doi:10.1073/pnas.0705994104.
211. Úbeda, C. Sip, an integrase protein with excision, circularization and integration activities, defines a new family of mobile *Staphylococcus aureus* pathogenicity islands / C. Úbeda, M.Á. Tormo, C. Cucarella, P. Trotonda, T.J. Foster, Í. Lasa, J.R. Penadés // Molecular Microbiology. – 2003. – N. 49. – P193-210. – doi:10.1046/j.1365-2958.2003.03577.x.
212. Valero, A. Modelling the growth boundaries of *Staphylococcus aureus*: Effect of temperature, pH and water activity / A. Valero, F. Pérez-Rodríguez, E. Carrasco, J.M. Fuentes-Alventosa, R.M. García-Gimeno, G. Zurera // Int J Food Microbiol. – 2009. – V. 133, N. 1-2. – P186-94. – doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2009.05.023.
213. Valvatne, H. A rapid, 2-well, multiplex real-time polymerase chain reaction assay for the detection of SCCmec types I to V in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* / H. Valvatne, M.I.A. Rijnders, A. Budimir, M-L. Boumans, A.J. de Neeling, P.S. Beisser, E.E. Stobberingh, R.H. Deurenberg, // Diagn Microbiol Infect Dis. – 2009. – V. 65, N. 4. – P384-91.
214. 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 // J Bacteriol. – 2006. – V. 188, N. 4. – P1310-1315. – doi:10.1128/JB.188.4.1310-1315.2006.
215. Vath, G.M. The crystal structure of exfoliative toxin B: a superantigen with enzymatic activity / G.M. Vath, C.A. Earhart, D.D. Monie, J.J. Iandolo, P.M. Schlievert, D.H. Ohlendorf // Biochemistry. – 1999. – V. 38, N. 32. – P10239-46.
216. Vath, G.M. The structure of the superantigen exfoliative toxin A suggests a novel regulation as a serine protease / G.M. Vath, C.A. Earhart, J.V. Rago, M.H. Kim, G.A. Bohach, P.M. Schlievert, D.H. Ohlendorf // Biochemistry. – 1997. – V. 36, N. 7. – P1559-66.

217. Viana, D. Adaptation of *Staphylococcus aureus* to ruminant and equine hosts involves SaPI-carried variants of von Willebrand factor-binding protein / D. Viana, J. Blanco, M.A. Tormo-Más, L. Selva, C.M. Guinane, R. Baselga, J. Corpa, I. Lasa, R.P. Novick, J.R. Fitzgerald, J.R. Penadés // *Mol Microbiol.* – 2010. – V. 77, N. 6. – P1583-94.
218. Von Rittershain, G.R. Die exfoliative dermatitis jungener senglunge. // *Z. Kinderheilkd.* – 1878. – N. 2. – P3-23.
219. Waldron, D.E. Saul: a novel lineage-specific type I restriction-modification system that blocks horizontal gene transfer into *Staphylococcus aureus* and between *S. aureus* isolates of different lineages / D.E. Waldron, J.A. Lindsay // *J Bacteriol.* – 2006. – V. 188, N. 15. – P5578-5585. – doi:10.1128/JB.00418-06.
220. Wang, F. Study on the hemolysin phenotype and the genotype distribution of *Staphylococcus aureus* caused bovine mastitis in Shandong dairy farms / F. Wang, H. Yang, H.-B. He, C. Wang, Y. Gao, Q. Zhong, W. Xiaohong, Z. Yanjun // *International Journal of Applied Research in Veterinary Medicine.* – 2009. – N. 9. – P416-421.
221. Watanabe, S. Genetic diversity of staphylocoagulase genes (*coa*): insight into the evolution of variable chromosomal virulence factors in *Staphylococcus aureus* / S. Watanabe, T. Ito, T. Sasaki, S. Li, I. Uchiyama, K. Kishii, K. Kikuchi, R.L. Skov, K. Hiramatsu. // *PLoS One.* – 2009. – V. 4, N. 5. – e5714. – doi:10.1371/journal.pone.0005714.
222. Watanabe, S. Structural comparison of ten serotypes of staphylocoagulases in *Staphylococcus aureus* / S. Watanabe, T. Ito, F. Takeuchi, M. Endo, E. Okuno, K. Hiramatsu // *J Bacteriol.* – 2005. – V. 187, N. 11. – P3698-3707. – doi:10.1128/JB.187.11.3698-3707.2005.
223. Wieneke, A.A. Staphylococcal food poisoning in the United Kingdom, 1969-90 / A.A. Wieneke, D. Roberts, R.J. Gilbert // *Epidemiol Infect.* – 1993. – V. 110, N. 3. – P519-531. – doi:10.1017/s0950268800050949.

224. Wilson, K. Preparation of Genomic DNA from Bacteria // Current Protocols in Molecular Biology. – 2006. – Chapter 2, Unit 2.4. – doi: 10.1002/0471142727.mb0204s56.
225. Xia, G. Phages of *Staphylococcus aureus* and their impact on host evolution / G. Xia, C. Wolz // Infect Genet Evol. – 2014. – N. 21. – P593-601. – doi: 10.1016/j.meegid.2013.04.022.
226. Xie, Y. Genotypes and Toxin Gene Profiles of *Staphylococcus aureus* Clinical Isolates from China / Y. Xie, Y. He, A. Gehring, Y. Hu, Q. Li, S.I. Tu, X. Shi // PloS one. – 2011. – V. 6, N. 12. – e28276. – <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0028276>.
227. Yamaguchi, T. Complete nucleotide sequence of a *Staphylococcus aureus* exfoliative toxin B plasmid and identification of a novel ADP-ribosyltransferase, EDIN-C / T. Yamaguchi, T. Hayashi, H. Takami, M. Ohnishi, T. Murata, K. Nakayama, K. Asakawa, M. Ohara, H. Komatsuzawa, M. Sugai // Infect Immun. – 2001. – V. 69, N. 12. – P7760-7771. – doi:10.1128/IAI.69.12.7760-7771.2001.
228. Yamaguchi, T. Identification of the *Staphylococcus aureus* etd pathogenicity island which encodes a novel exfoliative toxin, ETD, and EDIN-B / T. Yamaguchi, K. Nishifuji, M. Sasaki, Y. Fudaba, M. Aepfelbacher, T. Takata, M. Ohara, H. Komatsuzawa, M. Amagai, M. Sugai // Infect Immun. – 2002. – V. 70, N. 10. – P5835-5845. – doi:10.1128/iai.70.10.5835-5845.2002.
229. Yamaguchi, T. Phage conversion of exfoliative toxin A production in *Staphylococcus aureus* / T. Yamaguchi, T. Hayashi, H. Takami, K. Nakasone, M. Ohnishi, K. Nakayama, S. Yamada, H. Komatsuzawa, M. Sugai // Mol Microbiol. – 2000. – V. 38, N. 4. – P694-705.
230. Yamasaki, O. The Association between *Staphylococcus aureus* Strains Carrying Pantone-Valentine Leukocidin Genes and the Development of Deep-Seated Follicular Infection / O. Yamasaki, J. Kaneko, S. Morizane, H. Akiyama, J. Arata, S. Narita, J. Chiba, Y. Kamio, K. Iwatsuki // Clinical Infectious Diseases. – 2005. – V. 40, N. 3. – P381-385. – <https://doi.org/10.1086/427290>.

231. Yang, X. Multilocus Sequence Typing and Virulence-Associated Gene Profile Analysis of *Staphylococcus aureus* Isolates From Retail Ready-to-Eat Food in China / X. Yang, S. Yu, Q. Wu, J. Zhang, S. Wu, D. Rong // *Front. Microbiol.* – 2018. – V. 9, N. 197. – P1-8. – doi: 10.3389/fmicb.2018.00197.
232. Yilmaz, M. Mortality predictors of *Staphylococcus aureus* bacteremia: a prospective multicenter study / M. Yilmaz, N. Elaldi, İ.İ. Balkan, F. Arslan, A.A. Batirel, M.Z. Bakıcı, M.G. Gozel, S. Alkan, A.D. Çelik, M.A. Yetkin, H. Bodur, M. Sınırtaş, H. Akalın, F.A. Altay, İ. Şencan, E. Azak, S. Gündeş, B. Ceylan, R. Öztürk, H. Leblebicioglu, H. Vahaboglu, A. Mert // *Ann Clin Microbiol Antimicrob.* – 2016. – V. 5, N. 7. – doi:10.1186/s12941-016-0122-8.
233. Zhang, K. New quadriplex PCR assay for detection of methicillin and mupirocin resistance and simultaneous discrimination of *Staphylococcus aureus* from coagulase-negative staphylococci / K. Zhang, J. Sparling, B.L. Chow, S. Elsayed, Z. Hussain, D.L. Church, D.B. Gregson, T. Louie, J.M. Conly // *J. Clin. Microbiol.* – 2004. – V. 42, N. 11. – P4947-4955.
234. Zhou, Y. PHAST: a fast phage search tool / Y. Zhou, Y. Liang, K.H. Lynch, J.J. Dennis, D.S. Wishart // *Nucleic Acids Res.* – 2011. – N. 39 (Web Server issue). – P347-352. – doi:10.1093/nar/gkr485.

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 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. 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. She-myakin, 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. – 2018. – Vol. 6, N. 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. Скрыбин, 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. Скрыбин, 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. Скрыбин, Ю.П. Сравнительная характеристика штаммов *S. aureus*, возбудителей стафилодермии новорожденных / Ю.П. Скрыбин, 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. Скрыбин, 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* В-7772 и В-7777 (СС8/ST2993) и В-7774 (СС15/ST2126), ассоциированных со стафилодермией новорожденных / И.В. Абаев, **Ю.П. Скрыбин** // Проблемы медицинской микологии. – 2016. – Т. 18, № 2. – С. 32.
6. Абаев, И.В. Геномный анализ ETA-конвертирующих бактериофагов *Staphylococcus aureus* phiВ-7772 и phiВ-7774 / И.В. Абаев, **Ю.П. Скрыбин**, 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. Скрыбин**, А.А. Кисличкина, О.В. Коробова, А.Г. Богун // Проблемы медицинской микологии. – 2017. – Т. 19, № 2. – С. 29.
8. **Скрыбин, Ю.П.** Анализ генетических вариантов штамма *Staphylococcus aureus* генетической линии СС1, возбудителя вспышки пищевой инфекции в Якутске в 2015 г. / **Ю.П. Скрыбин**, 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. Скрыбин** // Обеспечение эпидемиологического благополучия: вызовы и решения. Материалы XI съезда Всероссийского научно-практического общества эпидемиологов, микробиологов и паразитологов. – Москва. – 2017. – С. 90.
10. Скрыбин, Ю.П. Методы диагностики штаммов *Staphylococcus aureus* при расследовании вспышек инфекции кожных покровов детей первых месяцев жизни / Ю.П. Скрыбин, О.В. Коробова, И.П. Мицевич, И.В. Абаев // Обеспечение эпиде-

миологического 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. Скрыбин**, А.А. Кисличкина, О.В. Коробова, А.Г. Богун, И.А. Дятлов // Проблемы медицинской микологии. – 2018. – Т. 20, № 2. – С. 45.

12. **Скрыбин, Ю.П.** Сравнительный анализ ЕТА-конвертирующих бактериофагов в геномах штаммов *Staphylococcus aureus*, возбудителей эксфолиативного дерматита новорожденных в России / **Ю.П. Скрыбин**, 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. Скрыбин**, И.А. Дятлов // Материалы IV Национального конгресса бактериологов и Международного симпозиума «Микроорганизмы и биосфера «Microbios-2018». – Омск. – 2018. – С. 5.

14. **Скрыбин, Ю.П.** Идентификация факторов патогенности в клинике и эпидемиологии *Staphylococcus aureus* / **Ю.П. Скрыбин**, 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. Скрыбин**, 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.