

# ГЕНЕТИЧЕСКИЙ ПОЛИМОРФИЗМ ГОСПИТАЛЬНЫХ ШТАММОВ *STAPHYLOCOCCUS EPIDERMIDIS*, ВЫДЕЛЕННЫХ У НОВОРОЖДЕННЫХ ОТДЕЛЕНИЯ РЕАНИМАЦИИ И ИНТЕНСИВНОЙ ТЕРАПИИ

А. Б. Гордеев<sup>1✉</sup>, Л. А. Любасовская<sup>1</sup>, Ю. В. Родченко<sup>1</sup>, Д. В. Дубоделов<sup>1</sup>, И. С. Мукосей<sup>2</sup>, Т. О. Кочеткова<sup>2</sup>, И. В. Никитина<sup>3</sup>, О. В. Ионов<sup>3</sup>, В. В. Зубков<sup>3</sup>, Д. Ю. Трофимов<sup>2</sup>, Т. В. Припутневич<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Отдел микробиологии и клинической фармакологии,

Научный центр акушерства, гинекологии и перинатологии имени академика В. И. Кулакова, Москва

<sup>2</sup> Отдел клинической и молекулярной генетики,

Научный центр акушерства, гинекологии и перинатологии имени академика В. И. Кулакова, Москва

<sup>3</sup> Отдел неонатологии и педиатрии,

Научный центр акушерства, гинекологии и перинатологии имени академика В. И. Кулакова, Москва

*Staphylococcus epidermidis* — представитель нормальной микрофлоры человека, способный вызывать опасные заболевания у новорожденных с очень низкой и экстремально низкой массой тела при рождении. Различные штаммы *S. epidermidis* обладают разным спектром генов, ассоциированных с их резистентностью к антимикробным препаратам и патогенностью. По результатам анализа данных полных геномных секвенирований четырнадцати штаммов *S. epidermidis* изучено генетическое разнообразие штаммов, циркулирующих в отделении реанимации и интенсивной терапии новорожденных НЦАГиП им. В. И. Кулакова. Выявлена принадлежность штаммов к восьми сиквенс-типам, из которых чаще встречались ST2 и ST59, принадлежащие к единому клональному комплексу CC2. К данному клональному комплексу относились 10 из 14 штаммов. Показано, что изученные штаммы обладали широким спектром генов резистентности к антимикробным препаратам. Обнаружено 15 различных генов, обуславливающих резистентность штаммов к аминогликозидам, бета-лактамам антибиотикам, фузидиевой кислоте, макролидам, линкозамидам, стрептограмину В, тетрациклину и триметоприму. Выявлены гены, ассоциированные с патогенностью (*aae*, *atlE*, *aap*, *embp*), встречающиеся в геномах изученных штаммов с разной частотой. В геномах девяти штаммов был обнаружен инсерционный элемент *IS256*, а в геномах семи штаммов — гены *ica*-оперона, отвечающего за синтез белков матрикса биопленок.

**Ключевые слова:** полиморфизм, полногеномное секвенирование, патогенность, резистентность, *Staphylococcus epidermidis*, новорожденные, сиквенс-тип

**Финансирование:** работа выполнена при поддержке Министерства образования и науки РФ (соглашение № 14.607.21.0019 от 05.06.2014, шифр заявки 2014-14-579-0001-065).

✉ Для корреспонденции: Гордеев Алексей Борисович  
ул. Академика Опарина, д. 4, г. Москва, 117997; gordeew@vega.protres.ru

Статья получена: 02.02.2017 Статья принята в печать: 18.02.2017

## GENETIC POLYMORPHISM OF *STAPHYLOCOCCUS EPIDERMIDIS* STRAINS IN PATIENTS OF THE NEONATAL INTENSIVE CARE UNIT

Gordeev AB<sup>1✉</sup>, Lyubasovskaya LA<sup>1</sup>, Rodchenko JV<sup>1</sup>, Dubodelov DV<sup>1</sup>, Mukosey IS<sup>2</sup>, Kochetkova TO<sup>2</sup>, Nikitina IV<sup>3</sup>, Ionov OV<sup>3</sup>, Zubkov VV<sup>3</sup>, Trofimov DY<sup>2</sup>, Priputnevich TV<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Department of Microbiology and Clinical Pharmacology,

Kulakov Research Center for Obstetrics, Gynecology and Perinatology, Moscow, Russia

<sup>2</sup> Department of Clinical and Molecular Genetics,

Kulakov Research Center for Obstetrics, Gynecology and Perinatology, Moscow, Russia

<sup>3</sup> Department of Neonatology and Pediatrics,

Kulakov Research Center for Obstetrics, Gynecology and Perinatology, Moscow, Russia

*Staphylococcus epidermidis* is a member of the normal bacterial flora of humans capable of causing potentially dangerous diseases in neonates with very or extremely low birth weight. The number of genes responsible for virulence and antibiotic resistance may vary in different *S. epidermidis* strains. We sequenced isolates of *S. epidermidis* to explore genetic diversity of 14 strains circulating in the Neonatal Intensive Care Unit of Kulakov Research Center for Obstetrics, Gynecology and Perinatology. Among the studied strains, 8 sequence types were identified, the most frequent being ST2 and ST59, both of which belong to the clonal complex CC2. Of 14 studied strains, 10 were of CC2 type. The studied strains revealed a variety of genes responsible for antibiotic resistance. We found 15 genes that provided resistance to aminoglycosides, beta-lactam antibiotics, fusidic acid, macrolides, lincosamides, streptogramin B, tetracycline, and trimethoprim. We identified a number of genes associated with virulence (*aae*, *atlE*, *aap*, *embp*), whose frequency in the studied isolates was varied. The insertion element *IS256* was detected in 9 strains, and 7 strains revealed the presence of the *ica*-operon responsible for the biosynthesis of the biofilm matrix proteins.

**Keywords:** polymorphism, NGS, virulence, resistance, *Staphylococcus epidermidis*, neonates, sequence type

**Funding:** this study was supported by the Grant Agreement No. 14.607.21.0019 of the Ministry of Science and Education of the Russian Federation dated June 5, 2014 (ID 2014-14-579-0001-065).

✉ Correspondence should be addressed: Alexey Gordeev  
ul. Akademika Oparina, d. 4, Moscow, Russia, 117997; gordeew@vega.protres.ru

Received: 02.02.2017 Accepted: 18.02.2017

*Staphylococcus epidermidis* является представителем нормальной микрофлоры кожи и слизистых оболочек человека [1, 2]. Однако у новорожденных с очень низкой и экстремально низкой массой тела бактерии этого вида могут вызывать такие опасные заболевания, как пневмония, сепсис и катетер-ассоциированные инфекции. Патогенность разных штаммов *S. epidermidis* варьируется в широких пределах: от способности вызывать заболевания до комменсального способа существования. Несмотря на определенный прогресс в изучении механизмов патогенности *S. epidermidis*, они до сих пор изучены не полностью.

Различные штаммы *S. epidermidis* обладают разными генетическими свойствами. Разработан и широко используется метод мультилокусного секвенирования (Multilocus Sequence Typing, MLST), который позволяет подразделять штаммы бактерий на большое количество сиквенс-типов. Хотя число сиквенс-типов у *S. epidermidis* довольно велико, обнаружено, что большинство штаммов, циркулирующих в госпиталях различных стран мира, можно объединить в единый клональный комплекс CC2, к которому относятся близкородственные сиквенс-типы [2, 3]. Среди госпитальных штаммов *S. epidermidis* широко распространена устойчивость к метициллину, ассоциированная с мобильными генетическими элементами, которые получили название хромосомных стафилококковых кассет *mec* (*Staphylococcal cassette chromosome mec*, *SCCmec*) [1, 4]. Устойчивость к метициллину определяется геном *mecA*, который кодирует альтернативный пенициллин-связывающий белок, обладающий пониженным сродством к метициллину (оксациллину). Метициллин-резистентность крайне важна в клинической практике, поскольку наличие гена *mecA* обуславливает устойчивость штамма стафилококка ко всем бета-лактамам антибиотикам (пенициллины, включая защищенные, цефалоспорины и карбапенемы). Набор генов, находящихся в элементах *SCCmec*, может различаться. Среди них встречаются гены устойчивости к другим антибиотикам, инсерционные элементы, такие как *IS431*, плазмиды, такие как *pT181*, и транспозоны, например *Tn554*.

Среди госпитальных штаммов *S. epidermidis* также часто отмечают устойчивость к аминогликозидам и макролидам и, в меньшей степени, к тетрациклину, хлорамфениколу, ванкомицину и клиндамицину [5]. Устойчивость к метициллину (оксациллину) у госпитальных штаммов, по некоторым данным, превышает 70 % [6, 7]. Гены устойчивости к антимикробным препаратам у *S. epidermidis* часто находятся в мобильных генетических элементах. В целом отмечается высокий уровень корреляции между наличием генов резистентности и фенотипическим проявлением резистентности у штаммов бактерий [1, 8].

Штаммы *S. epidermidis* имеют ряд факторов патогенности — генов, кодирующих синтез белков, которые способствуют развитию инфекции и существованию бактерий в организме человека. Несмотря на наличие работ, связывающих уровень патогенности бактерий с какими-либо факторами патогенности, в настоящее время невозможно выделить маркеры патогенности, позволяющие однозначно отделить патогенные штаммы от непатогенных [1]. Возможно, что прогресс в решении этой задачи будет связан с изучением комплексных взаимодействий между бактериями и иммунной системой человека. Многие факторы патогенности входят в состав базовой части генома и имеются у всех или у подавляющего большинства штаммов *S. epidermidis*. Другие же факторы, ассоциированные с патогенностью, содержатся только у части штаммов.

Один из подходов к анализу генетических свойств штаммов микроорганизмов — это применение высокопроизводительного полногеномного секвенирования, которое позволяет проводить комплексный анализ генетических свойств штаммов с детекцией большого количества генов и их вариантов с помощью биоинформатического анализа полученных сборок. В НЦАГиП им. В. И. Кулакова проводятся исследования генетического полиморфизма различных видов микроорганизмов, циркулирующих в стационаре [2, 9].

Целью данной работы было изучение генетического полиморфизма госпитальных штаммов *S. epidermidis*, выделенных от новорожденных отделения реанимации и интенсивной терапии НЦАГиП им. В. И. Кулакова.

## ПАЦИЕНТЫ И МЕТОДЫ

У новорожденных отделения реанимации и интенсивной терапии (ОРИТ) НЦАГиП были выделены 14 штаммов *S. epidermidis*: у 5 новорожденных из образцов трахеобронхального аспирата (штаммы 3, 7, 8, 13, 14), у 3 — из кала (штаммы 1, 5, 9), у 2 — из зева (штаммы 4, 10), у 2 — из крови (штаммы 2, 11), у 1 — из отделяемого конъюнктивы глаза (штамм 12) и у 1 новорожденного из постмортального материала, ткани легкого (штамм 6). Все новорожденные на момент взятия биологического материала имели признаки инфекции (пневмония, сепсис, конъюнктивит), при вскрытии у погибшего ребенка была подтверждена пневмония. Все новорожденные имели низкую и экстремально низкую массу тела.

Посев клинического материала проводили на колумбийский агар (Bio-Rad, США) с добавлением 5 % бараньей крови («ЭкоЛаб», Россия) и маннитно-солевым агаром (Liofilchem, Италия). Чашки инкубировали в термостате при температуре 36–37 °С в течение 48 ч.

Видовую идентификацию выделенных культур осуществляли с помощью метода масс-спектрометрии матрично-активированной лазерной десорбцией/ионизацией с времяпролетным анализатором масс (MALDI-TOF MS). Образцы для масс-спектрометрического анализа готовили следующим образом. Суточные культуры микроорганизмов (1–2 колонии) наносили на ячейки стальной мишени, подсушивали в течение 1–2 мин, затем сверху наслаивали 2 мкл насыщенного раствора матрицы. В качестве матрицы применяли альфа-циано-4-гидроксикоричную кислоту (Bruker Daltonics, Германия) в виде насыщенных растворов в смеси 50 % ацетонитрила, 2,5 % трифторуксусной кислоты. Все использованные реактивы, включая воду, были аналитической чистоты или специальными для масс-спектрометрии. Кристаллы оставляли на воздухе в течение 5–10 мин до полного высыхания. Влажность и температуру при этом не контролировали. Каждый образец наносили на стальную мишень в двух повторах, с которых, в свою очередь, снимали масс-спектры в автоматическом режиме. Масс-спектрометрический анализ осуществляли с помощью времяпролетного MALDI масс-спектрометра Autoflex III (Bruker Daltonics, Германия), оснащенного азотным лазером 337 нм. Все измерения проводили в линейном режиме, детектируя положительные ионы. Для накопления масс-спектров мощность лазерного излучения устанавливали на уровне минимального порогового значения, достаточного для десорбции-ионизации образца. Параметры масс-спектрометра оптимизировали для диапазона *m/z* от 2000 до 20 000. Внешнюю калибровку проводили с использованием точных значений масс

известных белков *Escherichia coli*. Образец наносили на три ячейки стальной мишени, для каждой из которых записывали спектр, полученный в результате суммирования 10 серий измерений по 50 импульсов лазера в каждой. Для записи, обработки и анализа масс-спектров использовали программное обеспечение фирмы Bruker Daltonics (Германия): flexControl 2.4 (Build 38) и flexAnalysis 2.4 (Build 11). Точность измерения масс составляла  $\pm 2$  Да. Кластерный анализ, сопоставление получаемых масс-спектров с имеющимися в базах данных производили с помощью программного пакета Biotyper 1.1 (Bruker Daltonics, Германия).

Определение чувствительности штаммов к антибиотикам проводили на автоматическом бактериологическом анализаторе Vitek 2 Compact (bioMérieux, Франция) по протоколу производителя. Определяли чувствительность штаммов к набору антибиотиков, включавшему бензилпенициллин, цефокситин, гентамицин, клиндамицин, эритромицин, ванкомицин и фузидиевую кислоту. Интерпретацию результатов производили автоматически с помощью программного обеспечения прибора на основании критериев интерпретации, рекомендованных EUCAST, 2015 г.

Геномную ДНК выделяли из свежесывращенной культуры путем лизирования лизоцимом и протеиназой K, дальнейшую очистку ДНК проводили при помощи фенолхлороформной экстракции. Для получения библиотек ДНК использовали наборы Ion Xpress Plus Fragment Library Kit и Ion Xpress Barcode Adapters (Thermo Fisher Scientific, США) по протоколу производителя. Качество библиотек проверяли на приборе Agilent 2100 Bioanalyzer system с наборами HighSense DNA Kit (Agilent Technologies, США) согласно протоколу производителя. Для постановки эмульсионной полимеразной цепной реакции (ПЦР) и обогащения сфер использовали наборы Ion OneTouch Template Kit (Thermo Fisher Scientific) согласно протоколу производителя. Секвенирование проводили на платформе Ion PGM Torrent с наборами Ion Sequencing Kit и чипами 316 v1 (Thermo Fisher Scientific) согласно протоколу производителя. Сборку коротких прочтений (ридов) в последовательности большей длины (контиги) осуществляли

с помощью программного обеспечения MIRA 3 с использованием параметров genome, de novo, accurate.

Определение сиквенс-типов проводили с помощью программы MLST 1.8 [10]. Использовали результаты анализа полиморфизма по семи локусам: *arcC*, *aroE*, *gtr*, *mutS*, *pyr*, *tqi* и *yqiL* — проведенного для собранных нуклеотидных последовательностей (контигов). Поиск генов, ассоциированных с резистентностью к антимикробным препаратам, осуществляли с помощью программы ResFinder 2.1 [11]. Минимально допустимая степень сходства составляла 90 %, а минимальная длина перекрытия последовательностей — 70 %. Поиск генов и анализ локусов, ассоциированных с патогенностью, проводили путем анализа соответствующих нуклеотидных последовательностей, полученных из базы данных GenBank [12], с помощью программы BLAST [13].

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

У новорожденных ОРПТ НЦАГИП им. В. И. Кулакова выделено 14 штаммов *S. epidermidis*. Для каждого штамма выполнено полногеномное секвенирование, на основе полученных данных произведено сиквенс-типирование, поиск и анализ генов, ассоциированных с патогенностью штаммов и устойчивостью к антимикробным препаратам. Результаты сборки геномов представлены в табл. 1.

Сиквенс-типирование выявило принадлежность штаммов к восьми сиквенс-типам. Наиболее часто встречались сиквенс-типы ST2 и ST59 (по четыре штамма). Остальные шесть штаммов относились к сиквенс-типам: ST19, ST22, ST87, ST173, ST210, ST218. Штаммов с новыми неизвестными сиквенс-типами обнаружено не было.

Результаты поиска генов резистентности *S. epidermidis* к антимикробным препаратам представлены в табл. 2 и 3.

Среди штаммов *S. epidermidis* обнаружены гены резистентности к аминогликозидам *aacA-aphD*, *aadD* и *aphA*. Наиболее распространен ген *aacA-aphD*, обнаруженный в геномах двенадцати штаммов (штаммы 1–12). Ген *aadD* встречался в геномах пяти штаммов (штаммы 1, 2, 4, 9, 10), а ген *aphA* — в геномах двух штаммов (штаммы 3, 7).

Таблица 1. Характеристики сборки геномов штаммов *S. epidermidis* на основе полногеномного секвенирования

№ штамма	Количество контигов	Длина генома, млн п. н.	N50, п. н.	GC-состав, %
1	249	2,6	96 722	32,03
2	312	2,8	126 592	31,86
3	186	2,5	116 897	32,05
4	291	2,8	97 452	31,89
5	162	2,5	73 775	32,16
6	166	2,7	140 749	31,82
7	178	2,5	105 269	32,14
8	147	2,5	62 617	32,08
9	442	2,7	121 229	32,04
10	529	2,8	138 397	31,80
11	192	2,6	104 362	32,03
12	183	2,6	103 850	32,02
13	110	2,5	229 537	31,94
14	211	2,6	122 737	31,96

Таблица 2. Анализ антибиотикорезистентности штаммов *S. epidermidis*

Антимикробный препарат	Штамм /материал/													
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
	кал	кровь	трахеобронхи- альный аспират	зев	кал	ткань легкого	трахеобронхи- альный аспират	трахеобронхи- альный аспират	кал	зев	кровь	отделяемое конъюнктивы	трахеобронхи- альный аспират	трахеобронхи- альный аспират
Бензилпенициллин	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
Цефокситин	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
Гентамицин	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S
Клиндамицин	S	R	S	R	R	S	R	R	S	R	S	S	R	S
Эритромицин	R	S	R	S	R	R	R	R	S	R	R	R	S	R
Ванкомицин	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
Фузидиевая кислота	R	R	S	R	R	R	S	R	R	R	R	R	S	S

Примечание. R — резистентный штамм (resistant), S — чувствительный штамм (sensitive).

Таблица 3. Наличие генов резистентности у штаммов *S. epidermidis*

Ген резистентности	Штамм /материал/													
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
	кал	кровь	трахеобронхи- альный аспират	зев	кал	ткань легкого	трахеобронхи- альный аспират	трахеобронхи- альный аспират	кал	зев	кровь	отделяемое конъюнктивы	трахеобронхи- альный аспират	трахеобронхи- альный аспират
<i>aacA-aphD</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
<i>aadD</i>	+	+	-	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-
<i>aphA</i>	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
<i>blaZ</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>mecA</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+
<i>fusB</i>	-	+	-	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-
<i>fusC</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>vanA</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>vanB</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>vanZ</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Inu(A)</i>	+	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+
<i>vga(A)</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>vga(B)</i>	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>msr(A)</i>	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	+	+	-	-
<i>mph(C)</i>	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	+	-	-
<i>erm(A)</i>	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>erm(B)</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>erm(C)</i>	+	-	+	-	-	-	+	+	-	+	-	-	-	+
<i>vat(B)</i>	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>tet(M)</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>tet(K)</i>	+	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	+
<i>dfr(G)</i>	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>dfr(K)</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Сиквенс-тип	ST210	ST2	ST59	ST2	ST87	ST2	ST59	ST218	ST22	ST2	ST59	ST59	ST19	ST173

Примечание. Символами + и - обозначены наличие и отсутствие гена резистентности в геноме штамма. Ген *aacA-aphD* — устойчивость штаммов к амикацину, гентамицину, канамицину и тобрамицину; ген *aadD* — устойчивость к амикацину, канамицину, неомицину и тобрамицину; *aphA* — к канамицину и неомицину; *blaZ* — к пенициллинам; *mecA* — к бета-лактамам антибиотикам; *fusB*, *fusC* — к фузидиевой кислоте; *vanA*, *vanB*, *vanZ* — к ванкомицину; *Inu(A)*, *vga(A)*, *vga(B)* — к линкозамидам (клиндамицину); *msr(A)*, *mph(C)* — к макролидным антибиотикам (эритромицину); *erm(A)*, *erm(B)*, *erm(C)* — к макролидным антибиотикам и линкозамидам одновременно; *vat(B)* — к стрептограмину В; *tet(M)*, *tet(K)* — к тетрациклину; *dfr(G)*, *dfr(K)* — к триметоприму.

Считается, что эти гены фенотипически проявляются в наличии устойчивости не ко всему набору антибиотиков из группы аминогликозидов, а только к некоторым антибиотикам данной группы. Согласно данным, опубликованным в последние годы [8], локус *aacA-aphD* фенотипически проявляется в наличии устойчивости штаммов к амикацину, гентамицину, канамицину и тобрамицину. Ген *aadD* проявляется в наличии устойчивости к амикацину, канамицину, неомицину и тобрамицину, а ген *aphA* — в наличии устойчивости к канамицину и неомицину. В нашем исследовании тринадцать штаммов, несущих гены устойчивости, были фенотипически устойчивыми к гентамицину.

Обнаружено два гена, обуславливающих устойчивость к бета-лактамам антибиотикам. Ген *blaZ*, кодирующий бета-лактамазу, способную расщеплять пенициллины, встречался в геномах всех изученных штаммов. Фенотипически все штаммы были устойчивы к бензилпенициллину. Устойчивость к метициллину у стафилококков определяется геном *mecA*, который кодирует альтернативный пенициллин-связывающий белок, обладающий пониженным сродством к метициллину [1, 14]. Ген *mecA*, обуславливающий устойчивость к метициллину, обнаружен у тринадцати штаммов из четырнадцати (штаммы 1–12, 14). При этом фенотипически все четырнадцать штаммов проявляли устойчивость к метициллину (цефокситину), т. е. были метициллин-резистентными.

Из двух известных генов, обуславливающих устойчивость к фузидиевой кислоте, обнаружен только ген *fusB*, который встречается в геномах шести штаммов (штаммы 2, 4–6, 9, 10). Ген *fusC* обнаружен не был. При этом фенотипически к фузидиевой кислоте оказались устойчивыми десять штаммов из четырнадцати.

В некоторых работах у стафилококков были обнаружены гены *vanA*, характерные для ванкомицин-устойчивых стафилококков [8]. Однако у наших штаммов генов устойчивости к ванкомицину *vanA*, *vanB* и *vanZ*, а также фенотипически устойчивых к ванкомицину штаммов обнаружено не было.

Фенотипически устойчивость к линкозамидам (клиндамицину) проявлялась у семи штаммов. Обнаружено два гена, ассоциированных с резистентностью к линкозамидам.

Ген *lnu(A)* встречался в геномах четырех штаммов (штаммы 1, 3, 8, 14), а ген *vga(B)* — у одного штамма (штамм 5). Ген *vga(A)*, который также способен вызвать устойчивость к линкозамидам, обнаружен не был.

Выявлено десять штаммов, фенотипически устойчивых к макролидам (эритромицину). В геномах четырех штаммов (штаммы 6, 7, 11, 12) обнаружен ген *msr(A)*, а в геномах трех штаммов (штаммы 7, 11, 12) — ген *mph(C)*. Эти гены способны вызывать устойчивость бактерий к макролидам, в частности к эритромицину.

Из трех генов, обуславливающих устойчивость штаммов к макролидам и к линкозамидам одновременно [8, 11], в геномах бактерий обнаружено два. Ген *erm(C)* встречается в геномах шести штаммов (штаммы 1, 3, 7, 8, 10, 14), а ген *erm(A)* — у одного штамма (штамм 5). Ген *erm(B)* в геномах не обнаружен.

При лечении заболеваний, вызванных *S. epidermidis*, применяют ряд антибиотиков, для которых определяется фенотипическая устойчивость штаммов. В ходе работы для таких групп антибиотиков проводили поиск генов устойчивости, а также поиск генов резистентности к антибиотикам из других групп. Обнаружение генов резистентности к препаратам, не применяющимся при лечении заболеваний, представляет несомненный интерес. Во-первых, существует потенциальная возможность горизонтального переноса генов штаммам других видов микроорганизмов с помощью мобильных генетических элементов и плазмид. Во-вторых, анализ наличия/отсутствия таких генов позволяет оценить генетические свойства штаммов.

Ген *vat(B)*, способный вызывать устойчивость к стрептограмину В и, возможно, к линкозамидам [8], обнаружен у одного штамма (штамм 5). Из двух генов, обуславливающих устойчивость стафилококков к тетрациклину, в геномах обнаружен только ген *tet(K)*, встречающийся в четырех штаммах (штаммы 1, 7, 8, 14). Ген *tet(M)* не обнаружен. У двух штаммов (штаммы 1, 3) показано наличие гена *dfp(G)*, который ассоциирован с устойчивостью к триметоприму. Другой ген устойчивости к триметоприму, *dfp(K)*, в геномах не обнаружен.

Результаты поиска генов *S. epidermidis*, ассоциированных с патогенностью, представлены в табл. 4.

Таблица 4. Наличие генов, ассоциированных с патогенностью, у штаммов *S. epidermidis*

№ штамма	Ген						
	<i>icaA</i>	<i>icaD</i>	<i>IS256</i>	<i>aap</i>	<i>embp</i>	<i>atlE</i>	<i>aae</i>
1	–	–	+	–	+	+	+
2	+	+	+	+	–	+	+
3	–	–	–	+	+	+	+
4	+	+	+	+	–	+	+
5	–	–	+	–	+	+	+
6	+	+	+	+	–	+	+
7	–	–	–	+	+	+	+
8	+	+	+	+	+	+	+
9	+	+	+	–	+	+	+
10	+	+	+	+	–	+	+
11	–	–	–	+	+	+	+
12	–	–	–	+	+	+	+
13	–	–	–	+	+	+	+
14	+	+	+	+	+	+	+

Примечание. Символами + и – обозначены наличие и отсутствие гена резистентности в геноме штамма.

## ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Несмотря на разнообразие сиквенс-типов (восемь разных вариантов), десять штаммов из четырнадцати принадлежали к крупному клональному комплексу CC2. Эти штаммы относились к сиквенс-типам ST2, ST22, ST59 и ST87. По данным научной литературы, ST59 и ST22 относятся к наиболее распространенным в госпиталях сиквенс-типам *S. epidermidis* [2, 3]. Сиквенс-тип ST2 является родительским для одного из двух главных кластеров (кластер I) клонального комплекса CC2. В многоцентровом исследовании, проведенном M. Miragaia и соавт. в 2007 г. в 18 странах мира, было показано распространение близкородственных штаммов *S. epidermidis* в госпиталях различных точек мира [3], в 2013 г. аналогичные результаты были получены в России [2]. Эти данные позволяют сделать предположение о наличии у штаммов клонального комплекса CC2 генетических особенностей, позволяющих им длительно циркулировать и персистировать в условиях стационара. Такими свойствами могут быть как повышенная устойчивость к антибиотикам, так и особое сочетание генов антибиотикорезистентности в хромосомных элементах, повышенная способность к образованию биопленок и т. д. Требуется более глубокое изучение популяции штаммов, принадлежащих к CC2, выделенных из клинического материала.

Изученные штаммы стафилококков обладают различным спектром генов резистентности к ряду антимикробных препаратов. Аналогично другим исследованиям [1, 6, 7, 14], разные штаммы включают в себя различный набор генов резистентности. Гены устойчивости к пенициллинам обнаружены у всех четырнадцати (100 %) штаммов, к метициллину — у тринадцати (93 %) штаммов, к аминогликозидам — у двенадцати (86 %), к макролидам — у десяти (71 %), к линкозамидам — у семи (50 %), к фузидиевой кислоте — у шести (43 %), к тетрациклину — у четырех (29 %) и к триметоприму — у двух (14 %) штаммов. Гены устойчивости к ванкомицину не выявлены. Отдельные штаммы содержали от 1 (штамм 13) до 8 (штаммы 1, 7) генов резистентности к антимикробным препаратам каждый.

Следует отметить, что наличие того или иного гена резистентности не свидетельствует о его обязательной экспрессии в количестве, достаточном для фенотипического проявления. Однако в любом случае наличие нуклеотидных последовательностей генов может проявиться фенотипически: либо сразу в виде приобретения устойчивости к тому или иному антимикробному препарату, либо использоваться в качестве исходного материала для эволюционных процессов и возникновения устойчивости к антимикробным препаратам в дальнейшем.

С другой стороны, поиск генов антибиотикорезистентности у штаммов не охватывает все потенциально возможные механизмы резистентности. Известно, что ряд механизмов связан с мутациями собственных генов, и, соответственно, с модификацией или инактивацией собственных ферментов. К примеру, резистентность стафилококков к метициллину может быть связана не только с наличием кассеты *mec*, но и с модификацией нормального пенициллин-связывающего белка. Кроме того, снижение чувствительности штамма к антибиотикам может быть следствием повышения активности работы эффлюксных помп, выводящих антибиотик из клетки. Отмечены и другие механизмы антибиотикорезистентности. В задачи данной работы не входило проведение анализа нуклеотидных последовательностей генов и их локализа-

ции, выявление мутаций, способных повлиять на работу генов, и измерение уровня экспрессии генов. В проведенном исследовании наличие генов резистентности и фенотипическая устойчивость к антибиотикам полностью совпадали в отношении пенициллина, линкозамидов и макролидов. В отношении других антибиотиков фенотипическую устойчивость проявляло, наоборот, большее количество штаммов, чем было обнаружено генов резистентности, что говорит о наличии других механизмов антибиотикорезистентности. Исследования в этой области проводятся в настоящее время.

Таким образом, госпитальные штаммы, выделенные от новорожденных ОРПТ НЦАГиП им. В. И. Кулакова, обладают широким спектром генов резистентности к антимикробным препаратам.

У *S. epidermidis* существует большое количество генов, ассоциированных с патогенностью. Однако большая часть этих генов выполняет определенные функции и при патогенном, и при комменсальном способе существования *S. epidermidis*. Поэтому наличие таких генов патогенности у эпидермальных стафилококков не позволяет сделать вывод, является ли данный штамм *S. epidermidis* патогенным или нет [1, 14, 15]. При этом отмечены определенные корреляции между наличием у штаммов факторов патогенности и особенностями патогенеза госпитальных штаммов [16–18].

У всех четырнадцати штаммов обнаружены гены *aae* и *atlE*. Оба гена кодируют бифункциональные белки, выполняющие как функции аутолизина, так и адгезина, и принимают участие в процессе формирования биопленок. Эти гены широко распространены у *S. epidermidis*. Другие гены, ассоциированные с патогенностью, встречаются только у части изученных штаммов. Обнаружены штаммы, несущие гены *aar*, *embp*, и гены *icaA* и *icaD*, входящие в состав *ica*-оперона. Ген *aar* кодирует белок Аар, который является наиболее важным фактором, участвующим в белокзависимом пути формирования биопленок. Ген *embp* также участвует в образовании биопленок, а гены *ica*-оперона — в синтезе экзополисахаридного внутриклеточного адгезина, который принимает участие как в процессе формирования биопленок, так и в процессах иммунной эвазии.

У ряда штаммов также обнаружен инсерционный элемент *IS256*, для присутствия которого показано наличие корреляции с патогенностью штаммов [17].

Таким образом, спектр генов, ассоциированных с патогенностью, у разных госпитальных штаммов, выделенных от новорожденных ОРПТ НЦАГиП им. В. И. Кулакова, варьируется. Отдельные штаммы *S. epidermidis* содержали от 4 (штаммы 1, 3, 5, 7, 11, 12, 13) до 7 (штаммы 8, 14) генов, ассоциированных с патогенностью. Интересно, что в штаммах 1 и 7 обнаружено наибольшее количество генов резистентности, и в то же время эти штаммы содержали минимальное число генов патогенности.

## ВЫВОДЫ

Изучен генетический полиморфизм четырнадцати госпитальных штаммов *S. epidermidis*, выделенных у новорожденных, находившихся на лечении в ОРПТ НЦАГиП им. В. И. Кулакова. Выявлена принадлежность штаммов к восьми разным сиквенс-типам, причем 10 из 14 изученных штаммов принадлежали к крупному клональному комплексу CC2. Обнаружено, что госпитальные штаммы,

выделенные у новорожденных ОРВИ НЦАГИП им. В. И. Кулакова, обладают широким спектром генов резистентности к антимикробным препаратам и генов патогенности. У изученных штаммов обнаружено 15 различных генов, обуславливающих резистентность штаммов к аминогликозидам, бета-лактамам антибиотикам, фузидиевой кис-

лоте, макролидам, линкозамидам, стрептограмину В, тетрациклину и триметоприму. Выявлены гены, ассоциированные с патогенностью (*aae*, *atlE*, *aap*, *embp*, *icaA*, *icaD*), встречающиеся в геномах изученных штаммов с разной частотой, а также обнаружен инсерционный элемент IS256.

## Литература

- Otto M. Molecular basis of *Staphylococcus epidermidis* infections. *Semin Immunopathol.* 2012 Mar; 34 (2): 201–14.
- Любасовская Л. А., Корниенко М. А., Припутневич Т. В., Ильина Е. Н., Щеголев А. И. Микробиологическая и молекулярно-генетическая характеристика коагулазонегативных стафилококков, выделенных у новорожденных отделения реанимации и интенсивной терапии. *Антибиот. и химиотер.* 2013; 58 (3–4): 25–32.
- Miragaia M, Thomas JC, Couto I, Enright MC, de Lencastre H. Inferring a population structure for *Staphylococcus epidermidis* from multilocus sequence typing data. *J Bacteriol.* 2007 Mar; 189 (6): 2540–52.
- Salgueiro VC, Iorio NL, Ferreira MC, Chamon RC, Dos Santos KR. Methicillin resistance and virulence genes in invasive and nasal *Staphylococcus epidermidis* isolated from neonates. *BMC Microbiol.* 2017 Jan 13; 17 (1): 15.
- Becker K, Heilmann C, Peters G. Coagulase-negative staphylococci. *Clin Microbiol Rev.* 2014 Oct; 27 (4): 870–926.
- Flamm RK, Mendes RE, Ross JE, Sader HS, Jones RN. An international activity and spectrum analysis of linezolid: ZAAPS Program results for 2011. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2013 Jun; 76 (2): 206–13.
- Mendes RE, Deshpande LM, Costello AJ, Farrell DJ. Molecular epidemiology of *Staphylococcus epidermidis* clinical isolates from U.S. hospitals. *Antimicrob Agents Chemother.* 2012 Sep; 56 (9): 4656–61.
- McManus BA, Coleman DC, Deasy EC, Brennan GI, O'Connell B, Monecke S, et al. Comparative genotypes, staphylococcal cassette chromosome *mec* (SCC*mec*) genes and antimicrobial resistance amongst *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus haemolyticus* isolates from infections in humans and companion animals. *PLoS One.* 2015 Sep 17; 10 (9): e0138079.
- Дубоделов Д. В., Любасовская Л. А., Шубина Е. С., Мукосей И. С., Коростин Д. О., Кочеткова Т. О. и др. Генетические детерминанты резистентности к β-лактамам антибиотикам госпитальных штаммов *Klebsiella pneumoniae*, выделенных у новорожденных. *Генетика.* 2016; 52 (9): 1097–102.
- Larsen MV, Cosentino S, Rasmussen S, Friis C, Hasman H, Marvig RL, et al. Multilocus sequence typing of total-genome-sequenced bacteria. *J Clin Microbiol.* 2012 Apr; 50 (4): 1355–61.
- Zankari E, Hasman H, Cosentino S, Vestergaard M, Rasmussen S, Lund O, et al. Identification of acquired antimicrobial resistance genes. *J Antimicrob Chemother.* 2012 Nov; 67 (11): 2640–4.
- Benson DA, Cavanaugh M, Clark K, Karsch-Mizrachi I, Lipman DJ, Ostell J, et al. GenBank. *Nucleic Acids Res.* 2013 Jan; 41 (Database issue): D36–42.
- Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ. Basic local alignment search tool. *J Mol Biol.* 1990 Oct 5; 215 (3): 403–10.
- Rohde H, Kalitzky M, Kröger N, Scherpe S, Horstkotte MA, Knobloch JK, et al. Detection of virulence-associated genes not useful for discriminating between invasive and commensal *Staphylococcus epidermidis* strains from a bone marrow transplant unit. *J Clin Microbiol.* 2004 Dec; 42 (12): 5614–9.
- Thomas JC, Zhang L, Robinson DA. Differing lifestyles of *Staphylococcus epidermidis* as revealed through Bayesian clustering of multilocus sequence types. *Infect Genet Evol.* 2014 Mar; 22: 257–64.
- Rogers KL, Rupp ME, Fey PD. The presence of *icaA*DBC is detrimental to the colonization of human skin by *Staphylococcus epidermidis*. *Appl Environ Microbiol.* 2008 Oct; 74 (19): 6155–7.
- Gu J, Li H, Li M, Vuong C, Otto M, Wen Y, et al. Bacterial insertion sequence IS256 as a potential molecular marker to discriminate invasive strains from commensal strains of *Staphylococcus epidermidis*. *J Hosp Infect.* 2005 Dec; 61 (4): 342–8.
- Conlan S, Mijares LA; NISC Comparative Sequencing Program, Becker J, Blakesley RW, Bouffard GG, et al. *Staphylococcus epidermidis* pan-genome sequence analysis reveals diversity of skin commensal and hospital infection-associated isolates. *Genome Biol.* 2012 Jul 25; 13 (7): R64.

## References

- Otto M. Molecular basis of *Staphylococcus epidermidis* infections. *Semin Immunopathol.* 2012 Mar; 34 (2): 201–14.
- Lubasovskaya LA, Kornienko MA, Priputnevich TV, Ilyina EN, Shchegolev AI. [Microbiological and molecular genetic characteristics of coagulase-negative staphylococcal isolates from neonates in intensive care unit]. *Antibiot Khimioter.* 2013; 58 (3–4): 25–32. Russian.
- Miragaia M, Thomas JC, Couto I, Enright MC, de Lencastre H. Inferring a population structure for *Staphylococcus epidermidis* from multilocus sequence typing data. *J Bacteriol.* 2007 Mar; 189 (6): 2540–52.
- Salgueiro VC, Iorio NL, Ferreira MC, Chamon RC, Dos Santos KR. Methicillin resistance and virulence genes in invasive and nasal *Staphylococcus epidermidis* isolated from neonates. *BMC Microbiol.* 2017 Jan 13; 17 (1): 15.
- Becker K, Heilmann C, Peters G. Coagulase-negative staphylococci. *Clin Microbiol Rev.* 2014 Oct; 27 (4): 870–926.
- Flamm RK, Mendes RE, Ross JE, Sader HS, Jones RN. An international activity and spectrum analysis of linezolid: ZAAPS Program results for 2011. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2013 Jun; 76 (2): 206–13.
- Mendes RE, Deshpande LM, Costello AJ, Farrell DJ. Molecular epidemiology of *Staphylococcus epidermidis* clinical isolates from U.S. hospitals. *Antimicrob Agents Chemother.* 2012 Sep; 56 (9): 4656–61.
- McManus BA, Coleman DC, Deasy EC, Brennan GI, O'Connell B, Monecke S, et al. Comparative genotypes, staphylococcal cassette chromosome *mec* (SCC*mec*) genes and antimicrobial resistance amongst *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus haemolyticus* isolates from infections in humans and companion animals. *PLoS One.* 2015 Sep 17; 10 (9): e0138079.
- Dubodelov DV, Lyubasovskaya LA, Schubina ES, Mukosey IS, Korostin DO, Kochetkova TO, et al. Genetic determinants of resistance to beta-lactame antibiotics for *Klebsiella pneumoniae* clinical strains isolated from newborns. *Russ J Genet.* 2016; 52: 993–8.
- Larsen MV, Cosentino S, Rasmussen S, Friis C, Hasman H, Marvig RL, et al. Multilocus sequence typing of total-genome-sequenced bacteria. *J Clin Microbiol.* 2012 Apr; 50 (4): 1355–61.
- Zankari E, Hasman H, Cosentino S, Vestergaard M, Rasmussen S, Lund O, et al. Identification of acquired antimicrobial

- resistance genes. *J Antimicrob Chemother.* 2012 Nov; 67 (11): 2640–4.
12. Benson DA, Cavanaugh M, Clark K, Karsch-Mizrachi I, Lipman DJ, Ostell J, et al. GenBank. *Nucleic Acids Res.* 2013 Jan; 41 (Database issue): D36–42.
  13. Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ. Basic local alignment search tool. *J Mol Biol.* 1990 Oct 5; 215 (3): 403–10.
  14. Rohde H, Kalitzky M, Kröger N, Scherpe S, Horstkotte MA, Knobloch JK, et al. Detection of virulence-associated genes not useful for discriminating between invasive and commensal *Staphylococcus epidermidis* strains from a bone marrow transplant unit. *J Clin Microbiol.* 2004 Dec; 42 (12): 5614–9.
  15. Thomas JC, Zhang L, Robinson DA. Differing lifestyles of *Staphylococcus epidermidis* as revealed through Bayesian clustering of multilocus sequence types. *Infect Genet Evol.* 2014 Mar; 22: 257–64.
  16. Rogers KL, Rupp ME, Fey PD. The presence of *icaADBC* is detrimental to the colonization of human skin by *Staphylococcus epidermidis*. *Appl Environ Microbiol.* 2008 Oct; 74 (19): 6155–7.
  17. Gu J, Li H, Li M, Vuong C, Otto M, Wen Y, et al. Bacterial insertion sequence IS256 as a potential molecular marker to discriminate invasive strains from commensal strains of *Staphylococcus epidermidis*. *J Hosp Infect.* 2005 Dec; 61 (4): 342–8.
  18. Conlan S, Mijares LA; NISC Comparative Sequencing Program, Becker J, Blakesley RW, Bouffard GG, et al. *Staphylococcus epidermidis* pan-genome sequence analysis reveals diversity of skin commensal and hospital infection-associated isolates. *Genome Biol.* 2012 Jul 25; 13 (7): R64.