

# АНАЛИЗ ГЕНЕТИЧЕСКИХ ОСОБЕННОСТЕЙ ШТАММОВ *S. AUREUS*, ЦИРКУЛИРУЮЩИХ В МНОГОПРОФИЛЬНОМ СТАЦИОНАРЕ

## ANALYSIS OF THE GENETIC CHARACTERISTICS OF *S. AUREUS* STRAINS CIRCULATING IN A MULTIDISCIPLINARY HOSPITAL

**A. Tochilina  
I. Belova  
S. Molodtsova  
V. Kropotov  
I. Solovyova**

*Summary. Introduction.* Microbiological monitoring belongs to the most important components of the epidemiologic safety system and allows to observe the variability of epidemically significant microorganisms, their features and circulation. In modern conditions the representatives of ESKAPE group are in the zone of special attention, which often cause hospital infections and complicate the course of the main disease.

*Aims and objectives.* Characterization of phenotypic properties and molecular-genetic features of *S. aureus* strains, assimilated with CAIC, circulating in a multidisciplinary hospital.

*Materials and Methods.* Bacterial identification was performed by MALDI TOF mass spectrometry (Autoflex speed Bruker, Biotyper software); bacterial sensitivity to antibiotics was studied by the disc-diffusion method, and was evaluated according to the criteria of EUCAST v. 13.0. 13.0. Whole-genome sequencing was performed on the MiSeq platform «Illumina Inc.» (USA), processing was performed by the programs Spades v. 3.11.1 and Prokka v1.12. Full genome sequences were analyzed using PubMLST, VFDB, CARD web platforms, SCCmecFinder, VirulensFinder and PathogenFinder programs.

*Results.* *S. aureus* strains circulating in a large hospital and associated with CAIC were found to belong to ten different sequencing types — *S. aureus* ST8, ST45, ST5, ST1, ST398, ST97, ST6, ST707, ST12, ST1027 with predominance of *S. aureus* ST8 t008 SCCmec IV.

*Conclusion.* As a result of this work, the strains of *S. aureus* associated with CAIC circulating in a multidisciplinary hospital have been characterized in detail.

*Keywords:* *S. aureus*, CAIC, full genome sequencing, microbiologic monitoring.

### **Точилина Анна Георгиевна**

Кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории микробиома человека и средств его коррекции Федеральное бюджетное учреждение науки «Нижегородский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии» им. академика И.Н. Блохиной» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека; Федеральное государственное бюджетное общеобразовательное учреждение высшего образования «Приволжский исследовательский медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации lab-lb@yandex.ru

### **Белова Ирина Викторовна**

Кандидат медицинских наук, ведущий научный сотрудник лаборатории микробиома человека и средств его коррекции Федеральное бюджетное учреждение науки «Нижегородский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии» им. академика И.Н. Блохиной» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека; Приволжский научно-исследовательский медицинский университет

### **Молодцова Светлана Борисовна**

научный сотрудник лаборатории микробиома человека и средств его коррекции, Федеральное бюджетное учреждение науки «Нижегородский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии» им. академика И.Н. Блохиной» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека

### **Кропотов Василий Сергеевич**

Кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории микробиома человека и средств его коррекции, Федеральное бюджетное учреждение науки «Нижегородский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии» им. академика И.Н. Блохиной» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека; Приволжский научно-исследовательский медицинский университет

### **Соловьева Ирина Владленовна**

Доктор биологических наук, ведущий научный сотрудник — зав. лабораторией микробиома человека и средств его коррекции, Федеральное бюджетное учреждение науки «Нижегородский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии» им. академика И.Н. Блохиной» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека



### Введение

**М**икробиологический мониторинг позволяет следить за циркуляцией условно-патогенных микроорганизмов и направлен на обнаружение признаков возможных массовых случаев инфекции. Также к задачам микробиологического мониторинга относится обнаружение новых вариантов госпитальных штаммов и наблюдение за их изменчивостью [1, с. 54].

В настоящее время пристальное внимание уделяется слежению за представителями группы ESKAPE — частой причиной инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи (ИСМП), осложняющих течение основного заболевания и представляющих серьезную проблему в плане лечения. Среди представителей этой группы лидирующее положение занимает *S. aureus*, причем вызывает беспокойство растущее распространение штаммов *S. aureus* способных обуславливать развитие катетер ассоциированных инфекций кровотока (КАИК), в том числе из группы MRSA [2, с. 205; 3, с. 401]. Важным этапом эпиднадзора является внутривидовое типирование обнаруженных бактерий, так как это имеет значение для расшифровки спорадической и вспышечной заболеваемости, установления источника инфекции и про-

**Аннотация. Введение.** Микробиологический мониторинг относится к важнейшим составляющим системы эпидемиологической безопасности и позволяет наблюдать за изменчивостью эпидемиологически значимых микроорганизмов, их особенностями и циркуляцией. В современных условиях в зоне особого внимания находятся представители группы ESKAPE, которые часто являются причиной госпитальных инфекций и осложняют течение основного заболевания.

**Цели и задачи.** Характеристика фенотипических свойств и молекулярно-генетических особенностей штаммов *S. aureus*, ассоциированных с КАИК, циркулирующих в многопрофильном стационаре.

**Материалы и методы.** Идентификацию бактерий осуществляли с помощью MALDI TOF масс-спектрометрии (Autoflex speed Bruker, программное обеспечение Biotyper); чувствительность бактерий к антибиотикам изучали диско-диффузионным методом, оценку проводили в соответствии с критериями EUCAST v. 13.0. Полногеномное секвенирование проводили на платформе MiSeq «Illumina Inc.» (США), обработку осуществляли программами Spades v. 3.11.1 и Prokka v1.12. Анализ полногеномных последовательностей проводили с использованием веб-платформ PubMLST, VFDB, CARD, программ SCCmecFinder, VirulensFinder и PathogenFinder.

**Результаты.** Установлено, что штаммы *S. aureus*, циркулирующие в крупном стационаре и ассоциированные с КАИК, принадлежат к десяти различным сиквенс-типам — *S. aureus* ST8, ST45, ST5, ST1, ST398, ST97, ST6, ST707, ST12, ST1027 с преобладанием *S. aureus* ST8 t008 SCCmec IV.

**Заключение.** В результате проведения работы подробно охарактеризованы штаммы *S. aureus*, ассоциированные с КАИК, циркулирующие в многопрофильном стационаре.

**Ключевые слова:** *S. aureus*, КАИК, полногеномное секвенирование, микробиологический мониторинг.

гнозирования развития эпидемиологической ситуации [4, с. 641].

В связи с вышесказанным не вызывает сомнения актуальность цели проводимого исследования: углубленное изучение фенотипических и молекулярно-генетических свойств штаммов *S. aureus*, ассоциированных с КАИК, циркулирующих на территории региона

### Материалы и методы

Были изучены 22 штамма *S. aureus*, ассоциированных с КАИК, циркулирующих в отделении гемодиализа крупного многопрофильного стационара. Штаммы выделены от пациентов (кровь, отделяемое катетера), с объектов внешней среды (смывы) и от персонала (назальный мазок).

Культуры выращивали с использованием питательной среды «Питательный агар для выделения стафилококков — Стафилококк-агар» (ФБУН ГНЦ ПМБ Роспотребнадзора, Оболенск, Россия) с добавлением яичного желтка. Идентификацию бактерий осуществляли методом масс-спектрометрии с помощью времяпролетного MALDI масс-спектрометра Autoflex (Bruker Daltonics, Гер-

мания), оснащенного модифицированным твердотельным лазером.

Чувствительность бактерий к антибиотикам изучали диско-диффузионным методом на «Питательной среде для определения чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препаратам — агаре Мюллер-Хинтон II» (ФБУН ГНЦ ПМБ Роспотребнадзора, Оболенск, Россия) с дисками индикаторными картонными с противомикробными лекарственными средствами ДИ-ПЛС-50-01 (ООО «НИЦФ», СПб, Россия). Оценку проводили в соответствии с критериями EUCAST v. 13.0 [5].

Геномную ДНК выделяли с использованием коммерческого набора QIAamp DNA Mini Kit «QIAGEN» (Германия), секвенирование выполняли на платформе MiSeq «Illumina Inc.» (США). Исходные риды были обработаны утилитой Trimmomatic со стандартными параметрами для Illumina. Затем обработанные риды использовали для сборки генома de novo при помощи программы SPAdes v. 3.11.1 и Prokka v1.12 [6, с. 465; 7, с. 2068].

Анализ данных полногеномного секвенирования: выявление генов патогенности и антибиотикорезистентности проводили с использованием программ VirulensFinder [8], PathogenFinder [9], баз данных VFDB [10, с. 327] и CARD [11, с. 695]. MLST, обнаружение SCCmec каскет *S. aureus* осуществляли с помощью базы данных PubMLST (pubmlst.org) [12] программ Spa-typer и SCCmecFinder [13, с. 4963; 14, с. 88; 15, с. 98].

## Результаты

*Изучение чувствительности к антибиотикам.* При изучении антибиотикорезистентности *S. aureus*, обнаружено, что все штаммы демонстрировали фенотип MDR и были устойчивы к антибиотикам из групп цефалоспоринов, фторхинолонов, тетрациклинов, аминогликозидов, линкозамидов, отдельные штаммы были устойчивы к оксациллину и цефокситину.

### Анализ данных полногеномного секвенирования

В ходе анализа проводили MLST типирование всех штаммов, определение детерминант антибиотикорезистентности и генов патогенности: ответственных за синтез адгезинов, генов иммунного уклонения, системы секреции VII типа, экзоферментов и экзотоксинов (таблица 1).

В геномах всех исследованных штаммов *S. aureus* были обнаружены гены адгезинов — *clfA*, *fnbA*, *fnbB*, *icaA*, *icaB*, *ebp*, *efb*, *sdrC*, *sdrD* *spa*, (эластины, коллагену, фибронектину, фибриногену, витронектину, костному сиалопротеину, тромбоспондину и др.), а также к белку, присутствующему в местах повреждения эндотелия (фактору фон Виллебранда), гены иммунного уклонения, способные

обеспечивать защиту бактерий от действия неспецифического иммунитета хозяина — *sak*, *scn*, *chp*, *sea*, системы секреции VII типа, которая играет ключевую роль в обеспечении выживания и длительной персистенции данного микроорганизма — *esaA*, *esaB*, *esaD*, *esaE*, *esaG*, *essA*, *essC*, *esxA*, *esxB*, *esxC*, *esxD*. Также были обнаружены гены экзоферментов — сериновых и цистеиновых протеаз *sspB*, *sspC*, *sspA*, *splA*, *splB*, *splC*, *splD*, *splE*, *splF*, липаз *geh*, *lip*, гиалуронатлиазы *hysA*, стафилокоагулазы *coa* и термонуклеазы *nuc*, основные функции которых — деградация внеклеточного матрикса, приводящая к диссеминации инфекции, и обеспечение длительной сохранности патогена в условиях внешней среды. Кроме того, в геномах всех штаммов этой группы были обнаружены гены экзотоксинов —  $\alpha$ -,  $\beta$ - и  $\gamma$ -гемолизина *hly/hla*, *hlyB*, *hlyG*, *hlyC* и лейкотоксина D (*lukD*). Гемолизины способны повреждать нейтрофилы, вызывать синтез цитокинов и облегчать инвазию в ткани.

Выявлен спектр генов антибиотикорезистентности: детерминанты, обуславливающие устойчивость к антибиотикам из группы гликопептидов (*vanT*), фосфомицину (*murA*, *fosB*), пенициллинам и аминопенициллинам (*blaZ*), эритромицину (*ermC*), тетрациклину (*tetM*) и хлорамфениколу (*cat*). У отдельных штаммов, принадлежащих к 8 и 398 сиквенс-типам, в геномах были обнаружены SCCmec каскет IV типа, что позволяет отнести их к группе метициллин-резистентных *S. aureus* (Таблица 1).

## Обсуждение

При анализе штаммов *S. aureus*, ассоциированных с КАИК, было установлено, что случаи катетер ассоциированной инфекции кровотока были обусловлены штаммами, принадлежащими к разным сиквенс-типам, как широко распространённым и хорошо изученным — ST8 (CC8) MRSA, ST45 (CC45), ST5 (CC5), ST1 (CC1), ST398 MRSA [16–18] так и к редким — ST97, ST6, ST707, ST12, ST1027.

Преобладали штаммы восьмого, сорок пятого и первого сиквенс типов *S. aureus* (ST8, ST45, ST1). *S. aureus* ST8 входит в состав 8 клонального комплекса *S. aureus* (CC8), представители которого во многих случаях высоковирулентны и способны вызывать тяжелые инвазивные инфекции [16, с. 509]. В международной базе данных Pubmlst (<https://pubmlst.org/>) на настоящий момент имеется информация о 3717 изолятах *S. aureus* ST8, выделенных в разных странах. Сорок пятый сиквенс-тип *S. aureus* (ST45) входит в состав 45 клонального комплекса *S. aureus* (CC45) и относится к «клонам высокого риска» по развитию тяжелых инвазивных заболеваний (бактериемия, сепсис) [17]. В международной базе данных Pubmlst (<https://pubmlst.org/>) на настоящий момент имеется информация о 694 изолятах *S. aureus* ST45, выделенных в разных странах и ассоциированных в том числе с инфекциями кровотока. Все штаммы ST45 об-

Молекулярно-генетическая характеристика штаммов *S. aureus*, ассоциированных с КАИК, циркулирующих в многоприфильном стационаре

Штаммы <i>S. aureus</i> , номер в GenBank	Генотип	Spa-тип	Экзотоксины	Гены антибиотикорезистентности
3092 JAVFVQ000000000 3107 JAVGJR000000000 3196 JARQZ000000000 3197 JAVHUC000000000 2226 JAVGJM000000000	ST8	t008 t024 t008 t008 t008	<i>hly/hla, hlb, hlgA, hlgB, hlgC, lukD</i>	<i>vanT, murA, fosB, SCCmec</i>
3082 JAQFVY000000000 3094 JAVROA000000000 3102 JAVGJK000000000 2204 JAVBWQ000000000	ST45	t102 t5132 t8416 t362	<i>hly/hla, hlb, hlgA, hlgB, hlgC, sec, sel, sem, seo</i>	<i>vanT, murA</i>
3086 JAQFWB000000000 3087 JAQFWC000000000 3088 JAVGJI000000000	ST1	t127 t127 t127	<i>hly/hla, hlb, hlgA, hlgB, hlgC, hld, seg, sek, seo, lukD</i>	<i>ermC, vanT, blaZ</i>
3085 JAQFWA000000000 2219 JAQFWD000000000	ST5	t002 t688	<i>hly/hla, hlb, hlgA, hlgB, hlgC, sec, sel, seo, sep, lukD</i>	<i>fosB, vanT, ermC</i>
3100 JAVGJQ000000000 3133 JAVROB000000000	ST 398	t571 t011	<i>hly/hla, hlb, hlgA, hlgB, hlgC</i>	<i>tetM, vanT, SCCmec</i>
2215 JAVCZC000000000 2217 JAVCZD000000000	ST 1027	t unknown	<i>hly/hla, hlb, hlgA, hlgB, hlgC, lukD</i>	<i>vanT, murA, GlpT</i>
3101 JAVGJP000000000	ST97	t267	<i>hly/hla, hlb, hlgA, hlgB, hlgC, lukD</i>	<i>vanT, cat</i>
3089 JAVGJJ000000000	ST6	t unknown	<i>hly/hla, hlgA, hlgB, hlgC, lukD</i>	<i>vanT, blaZ</i>
3096 JAVHUA000000000	ST 707	t unknown	<i>hly/hla, hld, hlgA, hlgB, hlgC, sen, lukD, tsst</i>	<i>blaZ, vanT, murA, GlpT</i>
2209 JAVBWR000000000	ST12	t156	<i>hly/hla, hlb, hlgA, hlgB, hlgC</i>	<i>vanT</i>

ладают комплексом генов антибиотикорезистентности, ответственных за формирование устойчивости к антибиотикам из группы гликопептидов (*vanT*) и фосфомицину (*murA, fosB*). Сиквенс-тип *S. aureus* ST1 входит в состав 1 клонального комплекса *S. aureus* (CC1), на настоящий момент в международной базе данных Pubmlst имеется информация о 654 изолятах *S. aureus* ST1, выделенных в разных странах мира от здоровых носителей и больных с инфекциями кожи, эндокардитами и бактериемией. В геномах штаммов представлены гены антибиотикорезистентности, ответственные за формирование устойчивости к антибиотикам из группы гликопептидов (*vanT*), пенициллинов и аминопенициллинов (*blaZ*), эри-

тромицину (*ermC*) и тейкопланину (*teicoplanin resistance associated membrane protein*).

Все изученные штаммы обладали выраженным патогенным потенциалом, связанным с наличием генов, детерминирующих синтез адгезинов, экзоферментов, генов иммунного уклонения и экзотоксинов, что обуславливает способность бактерий к длительной персистенции, уклонению от иммунной системы, эффективной инвазии в ткани и активному образованию биопленок. Совокупность описанных свойств штаммов объясняет тот факт, что *S. aureus* являются одним из наиболее значимых возбудителей КАИК [19, с. 334]. В геномах всех

исследованных штаммов *S. aureus*, обнаружены детерминанты резистентности к антибиотикам из группы гликопептидов, пенициллинов и аминопенициллинов, фосфомицину, эритромицину, тетрациклину, что соотносится с их фенотипической резистентностью. У штаммов, принадлежащих к ST8 и ST398, присутствует SCCmec кассета IV типа, что позволяет отнести их к группе MRSA.

Таким образом, в результате проведенных исследований были изучены фенотипические и молекулярно-генетические свойства эпидемически значимых штаммов *S. aureus*, циркулирующих в многопрофильном стационаре.

Показано, что циркулирующие в регионе штаммы *S. aureus*, ассоциированные с КАИК, не однородны по фенотипу и генотипу: всего обнаружено 10 сиквенс-типов, как широко распространенных и хорошо изученных — ST8, ST45, ST5, ST1, ST398, так и редких — ST97, ST6, ST707, ST12, ST1027, преимущественно выделялись штаммы молекулярного типа *S. aureus* ST8 t008 SCCmec IV. Полученные данные свидетельствуют о необходимости проведения в стационаре профилактических противоэпидемических мероприятий с целью недопущения возникновения и распространения вспышек ИСМП.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Зубков В.В., Любасовская Л.А., Рюмина И.И. и др. Микробиологический мониторинг в системе инфекционного контроля неонатальных стационаров. Российский вестник перинатологии и педиатрии. 2014; 59(1): 51–56.
2. Романов А.В., Дехнич А.В., Эйдельштейн М.В. Молекулярная эпидемиология штаммов *Staphylococcus aureus* в детских стационарах России. Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. 2012; 14(3): 201–208.
3. Воронина О.Л., Кунда М.С., Рыжова Н.Н. и др. Геномные особенности резистентных изолятов *Klebsiella pneumoniae*, выделенных из кровяного русла и ликвора пациентов детского стационара. Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. 2023; 100(6):399–409. DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-430>.
4. Федотова О.С., Захарова Ю.А., Остапчук А.В. и др. Фенотипический профиль актуальных полирезистентных сиквенс-типов (ST 1167, ST 944, ST 208) *Acinetobacter baumannii*. Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. 2021; 98 (6): 639–647. DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-170>.
5. EUCAST. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 13.0. Available at: <https://www.antibiotic.ru/eucast/>. Accessed Feb 7, 2024. (<https://www.antibiotic.ru/eucast/>).
6. Bankevich A., Nurk S., Antipov D. et al. SPAdes: a new genome assembly algorithm and its applications to single-cell sequencing. *J. Comput. Biol.* 2012; 19 (5): 455–477. DOI: <https://doi.org/10.1089/cmb.2012.0021>
7. Seemann T. Prokka: rapid prokaryotic genome annotation. *Bioinformatics.* 2014; 30 (14): 2068–2069. DOI: <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu153>.
8. Malberg Tetzschner A.M., Johnson J.R., Johnston B.D., Lund O., Scheutz F. J. In Silico Genotyping of *Escherichia coli* Isolates for Extraintestinal Virulence Genes by Use of Whole-Genome Sequencing Data. *Clin. Microbiol.* 2020. 58(10): e01269-20. doi:10.1128/JCM.01269-20.
9. Cosentino S., Voldby Larsen M., Møller Aarestrup F., Lund O. PathogenFinder — Distinguishing Friend from Foe Using Bacterial Whole Genome Sequence Data. *PLoS ONE.* 2013; 8(10): e77302.
10. Chen L. H., Yang J., Yu J. et al. 16VFDB: a reference database for bacterial virulence factors. *Nucleic Acids Research.* 2005; 33 (1): D. 325–328. DOI: <https://doi.org/10.1093/nar/gki008>.
11. Alcock B.P., William H., Romeo C. et al. CARD 2023: Expanded Curation, Support for Machine Learning, and Resistome Prediction at the Comprehensive Antibiotic Resistance Database. *Nucleic Acids Research.* 2023; 51 (1): 690–699. DOI: <https://doi.org/10.1093/nar/gkac920>.
12. Jolley K.A., Bray J.E., Maiden M.C.J. Open-access bacterial population genomics: BIGSdb software, the PubMLST.org website and their applications. *Wellcome open research.* 2018; 3: 124. DOI: <https://doi.org/10.12688/wellcomeopenres.14826.1>.
13. Classification of staphylococcal cassette chromosome mec (SCCmec): guidelines for reporting novel SCCmec elements / International Working Group on The Classification of Staphylococcal Cassette Chromosome Elements (IWG-SCC). *Antimicrob Agents Chemother.* 2009; 56 (12): 4961–4967. DOI: <https://doi.org/10.1128/AAC.00579-09>.
14. 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 Dec; 56(12):4961-7 PMID: 19721075
15. Bartels M.D., Petersen A., Worning P. et al. Comparing whole-genome sequencing with Sanger sequencing for spa typing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Clin. Microbiol.* 2014. 52(12): 4305-8. SPA
16. Wang X., Zhao H., Wang B. et al. Identification of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* ST8 isolates in China with potential high virulence. *Emerging microbes and infections.* 2022; 11 (1): 507–518. DOI: <https://doi.org/10.1080/22221751.2022.2031310>.
17. Effelsberg N., Stegger M., Peitzmann L. et al. Global Epidemiology and Evolutionary History of *Staphylococcus aureus* ST45. *Journal of clinical microbiology.* 2020; 59 (1): e02198–02220. DOI: <https://doi.org/10.1128/JCM.02198-20>.
18. Jian Y., Zhao L., Zhao N. et al. Increasing prevalence of hypervirulent ST5 methicillin susceptible *Staphylococcus aureus* subtype poses a serious clinical threat. *Emerging microbes & infections.* 2021; 10 (1): 109–122. DOI: <https://doi.org/10.1080/22221751.2020.1868950>.
19. Станько О.В., Якубцевич Р.Э., Балла А.А., Дубровщик А.В. Катетер-ассоциированные инфекции кровотока в интенсивной терапии — современное состояние проблемы. *Журнал Гродненского государственного медицинского университета.* 2023; 21 (4): 327–336. DOI 10.25298/2221-8785-2023-21-4-327-336.