

## Распространение генов комплекса *Immune evasion cluster* и других факторов вирулентности у *Staphylococcus aureus*

В.В. Гостев<sup>1</sup>, А.Е. Гончаров<sup>2</sup>, М.А. Грачева<sup>3</sup>, С.В. Сидоренко<sup>1</sup>

<sup>1</sup> ФГБУ «НИИ детских инфекций ФМБА России», Санкт-Петербург, Россия

<sup>2</sup> ГБОУ ВПО «Северо-Западный государственный медицинский университет им. И.И. Мечникова» Минздрава России, Санкт-Петербург, Россия

<sup>3</sup> ООО «Рош Диагностика Рус», Москва, Россия

В горизонтальном переносе генов вирулентности у *Staphylococcus aureus* значительную роль играют бактериофаги семейства *Siphoviridae*. Так, фаги интегразной группы 3 переносят гены стафилокиназы (*sak*), ингибитора системы комплемента (*scn*), ингибитора хемотаксиса лейкоцитов (*chp*), энтеротоксинов А и Р (*sea*, *sep*). Перечисленные гены обеспечивают защиту бактерий от действия неспецифического иммунитета хозяина и объединяются в *Immune Evasion Cluster* – IEC (кластер уклонения от иммунитета). Распространение различных типов IEC, а также генов других факторов вирулентности (*seb*, *lukSF*, *tsst*) было изучено среди изолятов MRSA ( $n=231$ ) и MSSA ( $n=60$ ) различных *agr* групп. Комплекс IEC был выявлен у 99% *S. aureus*. Среди MRSA преобладали изоляты, относящиеся к *agr* I – 94% (218), среди них IEC типа D был выявлен у 65% (151); у 15% (35) изолятов выявлены F/A типы (*sak*, *chp*, *scn*, *sea/sep*),

типы E и B, нетипируемые варианты выявлены у 13% (29). Проведенное полногеномное секвенирование изолята MRSA с типом D показало, что IEC локализован в интактном профаге (40 тыс. п.н.). Гены *tsst* были обнаружены у 7% (16) изолятов MRSA, генов *lukSF* и *seb* обнаружено не было. Среди MSSA, напротив, были выявлены изоляты, относящиеся к различным *agr*-группам, но преобладали *agr* I с элементами IEC следующих типов: E (18%, 11), B (25%, 15), D (13%, 8). MSSA, относящиеся к *agr* II, имели IEC A/F (8%, 5), IEC B (8%, 5). У 20% (12) был выявлен *seb* и у 5% (3) обнаружены гены *lukSF*, которые всегда были ассоциированы с IEC E типа. Не выявлено зависимости между принадлежностью стафилококков к различным *agr* группам и IEC-типам или наличием *lukSF*, *seb* и *tsst*.

**Ключевые слова:** комплекс IEC (Immune evasion cluster), MRSA, MSSA, PVL, *agr*-типирование, вирулентность.

### Distribution of Immune Evasion Cluster Genes and Genes Encoding Other Virulence Factors among *Staphylococcus aureus*

V.V. Gostev<sup>1</sup>, A.E. Goncharov<sup>2</sup>, M.A. Grachyova<sup>3</sup>, S.V. Sidorenko<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Research Institute of Pediatric Infections, Saint-Petersburg, Russia

<sup>2</sup> North-Western State Medical University named after I.I. Mechnikov, Saint-Petersburg, Russia

<sup>3</sup> LLC «Roche Diagnostics Rus», Moscow, Russia

Siphoviridae family bacteriophages are known to play a major role in horizontal transfer of virulence genes among *Staphylococcus aureus*. Integrase group 3 phages trans-

fer genes encoding staphylokinase (*sak*), staphylococcal complement inhibitor (*scn*), chemotaxis-inhibitor protein (*chp*), enterotoxins A and P (*sea*, *sep*). These genes protect bacteria from host innate immunity and jointly referred as to *Immune Evasion Cluster* (IEC). Distribution of different IEC types as well as genes encoding other virulence factors (*seb*, *lukSF*, *tsst*) was studied among

Контактный адрес:  
Сергей Владимирович Сидоренко  
Эл. почта: sidorserg@niidi.ru

MRSA ( $n=231$ ) and MSSA ( $n=60$ ) isolates belonging to different *agr* groups. IEC was found in 99% of *S. aureus* isolates. The most prevalent among MRSA isolates were *agr* I (94%), of which IEC type D was detected in 65%; IEC types F/A (*sak*, *chp*, *scn*, *sea/sep*), types E and B were found in 15%; non-typing variants were revealed in 13% of isolates. Genome-wide sequencing of a MRSA isolate with IEC type D showed that IEC is located in the intact prophage (40 kbp). *Tsst* genes were found in 7% (16) of MRSA isolates; there were no *lukSF* and *seb* genes detected. In contrast, isolates from different *agr* groups

were found in MSSA; however, isolates from *agr* I group were predominant and had the following IEC types: E (18%), B (25%), and D (13%). MSSA isolates from *agr* II group had IEC types A/F (8%) and type B (8%). *Seb* gene was detected in 20% of isolates; *lukSF* genes were found in 5% of isolates and associated with IEC type E. No relationship between *agr* groups and IEC types or presence/absence of *lukSF*, *seb* and *tsst* genes was determined.

**Key words:** immune evasion cluster (IEC), MRSA, MSSA, PVL, *agr* typing, virulence.

## Введение

*Staphylococcus aureus* традиционно относят к условным патогенам, инфекции кожи и мягких тканей – наиболее частые нозологические формы, вызываемые *S. aureus*, однако он может вызывать инфекционные процессы практически любой локализации. По сравнению с другими представителями этого рода золотистый стафилококк обладает существенно более широким набором факторов вирулентности [1–2]. На сегодняшний день у *S. aureus* описано 16 различных адгезинов, 8 экзонзимов, 4 гемолизина, 20 энтеротоксинов, а также эксфолиативные токсины, экзотоксины, лейкоцидины [2]. Некоторые из перечисленных факторов опосредуют развитие специфических поражений тканей и характерной клинической картины. Так, энтеротоксины вызывают тяжелый гастроэнтерит, токсин синдрома токсического шока активирует экспрессию *интерлейкинов* (ИЛ-1 и ИЛ-2) и фактора некроза опухолей, что и приводит к развитию токсического шока [3–5]. Порообразующий токсин – лейкоцидин Пантона-Валентайна (**P**anton-**V**alentine **l**eukocidin, PVL), лизирующий лейкоциты, моноциты и макрофаги, участвует в развитии геморрагических явлений в различных тканях и некротизирующих пневмоний [6–7].

Факторы, защищающие бактерии от действия системы врожденного иммунитета хозяина, учитывая их общую функциональную направленность, предлагается объединять в одну группу, охватив 38 таких факторов, описанных на сегодняшний день [8]. В эту группу включают и факторы, входящие в состав недавно охарактеризованного комплекса IEC (**I**mmune **e**vadion **c**luster) [9]. В IEC могут входить: стафилокиназа (ген *sak*), обладающая фибринолитической активностью, активирующая плазминоген и инактивирующая  $\alpha$ -дефензины [10]; ингибитор активации комплемента, блокирующий C3-конвертазу (ген *scn*), [11]; ингибитор хемотаксиса лейкоцитов (ген *chp*) [12]; активатор Т-клеточного звена иммунитета, обладающий свой-

ствами суперантигена и обуславливающий мощную активацию Т-клеток, что приводит к развитию токсического шока (ген *sea*); энтеротоксин Р (ген *sep*), также обладающий свойствами суперантигена. Описано 7 типов IEC комплекса (А – G), различающихся по составу входящих в них факторов вирулентности [9].

Многие детерминанты патогенности закодированы в стафилококковых профагах семейства *Siphoviridae*, которые могут входить в состав островков патогенности в структуре геномов *S. aureus* [13]. Как правило, один профаг привносит в хромосому только одну какую-либо детерминанту вирулентности (например, фаг  $\Phi$ -PVL), однако существуют фаги, которые встраивают сразу несколько генов. Примером таких вирусов служат бактериофаги интегразной группы 3, несущие описанный выше IEC комплекс, и встраивающиеся в ген  $\beta$ -гемолизина (*hly*) в уникальном локусе, «разрывая» его на две части. Считается, что бактериофаги, несущие IEC, в отличие от других вирусов, выявляются у 90% *S. aureus*, выделенных от человека, и проявляют необычно высокую степень стабильности в геноме бактериальной клетки [14], однако детали распространения разных типов IEC и возможность его ассоциации с другими факторами вирулентности изучены недостаточно.

Говоря о патогенности, нельзя не упомянуть о регуляторных системах *S. aureus*, участвующих в контроле экспрессии генов – детерминант вирулентности. Одна из таких систем – *agr* (**A**ccessory **g**ene **r**egulator), регулирующая, как экспрессию различных генов домашнего хозяйства, так и многих факторов вирулентности, и участвующая в реакциях *quorum sensing*. Эта система состоит из пяти генов (*agrABCD* и  $\delta$ -гемолизин), при этом область *agrD* – *agrC* генов имеет варибельную структуру. По варибельным участкам выделяют четыре группы *agr* (I–IV) и множество типов, именно на этом основано *agr*-типирование [15–16]. В ряде работ была продемонстрирована связь *agr* групп/типов с принадлежностью *S. aureus* к различным

генетическим линиям, а также связь с наличием разных факторов вирулентности [17–18]. В ранних работах даже высказывалось мнение о взаимосвязи стафилококков *agr* группы II со снижением чувствительности к гликопептидам [19]. В нашем исследовании в качестве дифференцировки изолятов мы использовали этот вариант типирования.

**Целью** настоящей работы была оценка распространения среди MRSA и MSSA разных типов IEC-комплекса и таких факторов вирулентности как *lukSF*, *tsst* и *seb*.

### Материалы и методы исследования

**Бактериальные изоляты.** В работу включены изоляты MRSA ( $n=231$ ) и MSSA ( $n=60$ ), выделенные от больных с разными формами стафилококковых инфекций, включая носителей. Штаммы были собраны в 2011–2012 гг. из 9 регионов страны. В исследовании использованы следующие контрольные штаммы: *S. aureus* NCTC 8325 (*hly*<sup>+</sup>, *sak*<sup>+</sup>, *chp*<sup>+</sup>, *scn*<sup>+</sup>), *S. aureus* CCUG 47167 (PVL<sup>+</sup>), *S. aureus* SMI Sa778 (*tsst*<sup>+</sup>), *S. aureus* SMI Sa774 (*sea*<sup>+</sup>).

**Идентификация культур.** Идентификацию *S. aureus* проводили на MALDI-TOF масс-спектрометре «Microflex LT» (Bruker Daltonics, Германия). Дифференцировку MRSA и MSSA проводили по уровню чувствительности к *цефокситину* (FOX), в соответствии с критериями CLSI 2011-2012, детекцию гена *tesA* осуществляли методом ПЦР.

**ПЦР типирование.** Выделение тотальной бактериальной ДНК проводили с помощью наборов «ДНК-сорб Б» (АмплиСенс, Россия). Подбор праймеров, а также расчет мультиплексных сетов, множественные выравнивания и оценку специфичности осуществляли соответственно в Oligo v.7.0, ClustalW и NCBI BLAST. В качестве мишеней для ПЦР были выбраны следующие гены IEC: *chp*, *scn*, *sak*, *sea*, *sep*, а также гены других факторов вирулентности: *tsst*, *lukS* и *lukF* (PVL), *seb*. Детекцию IEC и PVL проводили в мультиплексных реакциях, детекция остальных мишеней была в моноплексном варианте. Комбинации праймеров и их концентрации в реакционных смесях, а также размеры ампликонов представлены в табл. 1. Праймеры Seap амплифицируют оба энтеротоксина (А и Р), поэтому дополнительно детектировали *sep*, а *agr*-типирование проводили по [20]. Праймеры синтезированы в ЗАО «Евроген» (Россия). Для ПЦР использовали готовые мастермиксы «HS-ScreenMix» (ЗАО «Евроген») в конечном объеме 25 мкл на реакцию/мультиплекс. Амплификацию проводили в термоциклере «Терцик» («ДНК-Технология», Россия). Для всех ПЦР, за исключением мультиплекса IEC 2, был подобран следующий температурный

протокол: предварительная денатурация при 95 °С – 5 мин., далее 32 цикла: 95 °С – 10 с, 50 °С – 10 с (для мультиплекса IEC 2 этот этап изменен: 56 °С – 15 с), 72 °С – 20 с, финальная элонгация при 72 °С – 5 мин.

**Полногеномное секвенирование.** В работе частично представлены результаты секвенирования (локус профага с комплексом IEC) одного клинического изолята SA0077. Полногеномное секвенирование проводили на приборе «GS Junior» («454/Roche») с приготовлением библиотек случайных фрагментов ДНК (ShotGun) по стандартному протоколу Rapid Library.

### Результаты и обсуждение

**IEC и *agr*-типирование.** Проведенное *agr*-типирование показало гомогенную структуру популяции MRSA, подавляющее большинство изолятов относилось к *agr* I группы (94%). Среди MSSA были выявлены *agr* II (28%), *agr* III (9%), *agr* IV (5%), но преобладали *agr* I группы (56%). Как отмечалось ранее, разные *agr*-группы могут быть ассоциированы с определенными факторами вирулентности. Так, в работе [17] авторы, используя различные методы молекулярного типирования, выявили следующие особенности. Изоляты *S. aureus*, принадлежащие к *agr* I, представляли собой весьма разнородную группу, куда входили внутри- и внебольничные изоляты, архаичные варианты MRSA и редкие спорадические штаммы; *agr* II–III групп авторы описывают как преимущественно внутрибольничные эпидемические клоны MRSA. И, наконец, *agr* IV –достаточно редкая группа, имеющая сходство с *agr* I.

Дальнейшей нашей задачей было определить зависимость между различными типами IEC и принадлежностью стафилококков к *agr* группам. Результаты *agr* и IEC-типирования представлены в табл. 2. Так, гены комплекса IEC были обнаружены у 99% стафилококков из всей выборки, и только у трех изолятов MRSA они не детектировались. Среди MRSA *agr* I преобладали IEC, относящиеся к D типу (65%); изоляты, обладающие полным комплексом генов, F и A типы, составили соответственно 15 и 0,4%. Стоит отметить, что такие стафилококки были выделены преимущественно от больных с тяжелыми формами инфекций. Типы E и B были определены соответственно у 9 и 1% изолятов. Не классифицированные варианты IEC, положительные только по *sak* или по двум генам *sak* и *sea*, обнаружены у 3% MRSA. Среди MRSA, относящихся к II–IV группам *agr*, на долю которых приходится 6%, встречаются преимущественно также IEC с D типом (5,4%). Тип C не был выявлен.

Таблица 1. Праймеры и мультиплексы, использованные в работе

Название	Последовательность праймеров 5'–3'	Ампликон, п.н.*	C**	Мишень
<b>Детекция <i>mecA</i></b>				
Mec-F	AAGTTTGCATAAGATCTATAA	672	0,6	<i>mecA</i> , маркер MRSA
Mec-R	ATTTATGTATGGCATGAGTAA			
<b>IEC Мультиплекс 1</b>				
Chp-F	AACCGTTTCCTACAAATGAAG	318	0,8	<i>chp</i> , ингибитор хемотаксиса
Chp-R	TTACATAAGATGATTTAGACT			
Scin-F	TGTTTAAACTTCCAGTAGCTA	192	0,4	<i>scn</i> , ингибитор комплемента
Scin-R	AATCTATACTTGCGGGAACCTTAGC			
<b>IEC Мультиплекс 2</b>				
Seap-F	AGCGAGAAAAGCGAAGAAATAAATG	611	0,8	<i>sea/sep</i> энтеротоксины А, Р
Seap-R	TGTCSTTGAGCACCAAATAAATCG			
Tsst-F	ACCACCCGTTTTATCGCTTGAAC	348	0,4	<i>tsst</i> , токсический шок
Tsst-R	AACACAGATGGCAGCATCAGC			
Sak-F	ACSTTTGTAATTAAGTTGAATCCAG	250	0,6	<i>sak</i> , стафилокиназа
Sak-R	СТАТТАААССТGGGACTACACTTAC			
<b>PVL мультиплекс 3</b>				
Pvl1-F	GCATGAGTAACATCCATATT	120	0,6	<i>lukS</i> -субъединица PVL
Pvl1-R	CCCATTAGTACACAGTGGTT			
Pvl2-F	TTCAACATCCCAACCAATTT	349	0,6	<i>lukF</i> -субъединица PVL
Pvl2-R	AATACTCAAAGCTGCTGGAA			
<b>Детекция <i>seb</i></b>				
Seb-F	AACCAGATCCTAAACCAGATGAG	604	0,6	<i>seb</i> , энтеротоксин В
Seb-R	GGTGCAGGCATCATGTCATAC			
<b>Детекция <i>sep</i></b>				
SEP-F	AATCATAACCAACCGAATCA	500	0,6	<i>sep</i> , энтеротоксин Р [9]
SEP-R	TCATAATGGAAGTGCTATAA			

**Примечание:** \* – пар нуклеотидов; \*\* – конечная концентрация каждого праймера в реакционной смеси, мкмоль.

Несколько иначе выглядит распределение IEC у MSSA. Так, у стафилококков *agr* I группы преобладали В (25%) и Е (18%) типы IEC. Изоляты, принадлежащие к *agr* II (28%), имели различные комплексы IEC (Е, С, D, А), но преимущественно типировались как В (8%) и F (8%). Среди MSSA *agr* III группы выявлены В, D и Е типы IEC и один изолят, положительный по генам *sak*; *chp* не классифицирован. Не было выявлено комбинации генов *sep*, *sak* и *scn* (G-тип) ни среди MRSA, ни среди MSSA. Следовательно, у MSSA доминирующими комплексами IEC выступают В и Е типы, причем последний, как будет отмечено ниже, наиболее часто ассоциирован с другими факторами вирулентности.

Таким образом, не выявлено прямой зависимости между наличием IEC и принадлежностью *S. aureus* к определенной *agr* группе. Однако четко

прослеживается один доминирующий кластер MRSA, относящийся к *agr* I и имеющий IEC D. В исследовании van Wamel W. с соавт. [9] распределение IEC отличается: так, в частности у изолятов *S. aureus*, относящихся к *agr* I, чаще выявлялся В тип (19%), F тип не обнаруживался. Среди *agr* II преимущественно типировались стафилококки с IEC С типа (12%).

Строение наиболее часто встречающегося D-типа IEC было полностью подтверждено проведенным полногеномным секвенированием изолята SA0077 (схема). IEC входит в структуру интактного профага (40 тыс. п.н.), который встроен в ген бета-гемолизина, представленный в виде двух частей размером 240 и 870 п.н. Рассматриваемый комплекс имеет неизменные гены *scn*, *sak* и *sea*, ген вирусной интегразы *int* (1038 п.н.) относится к

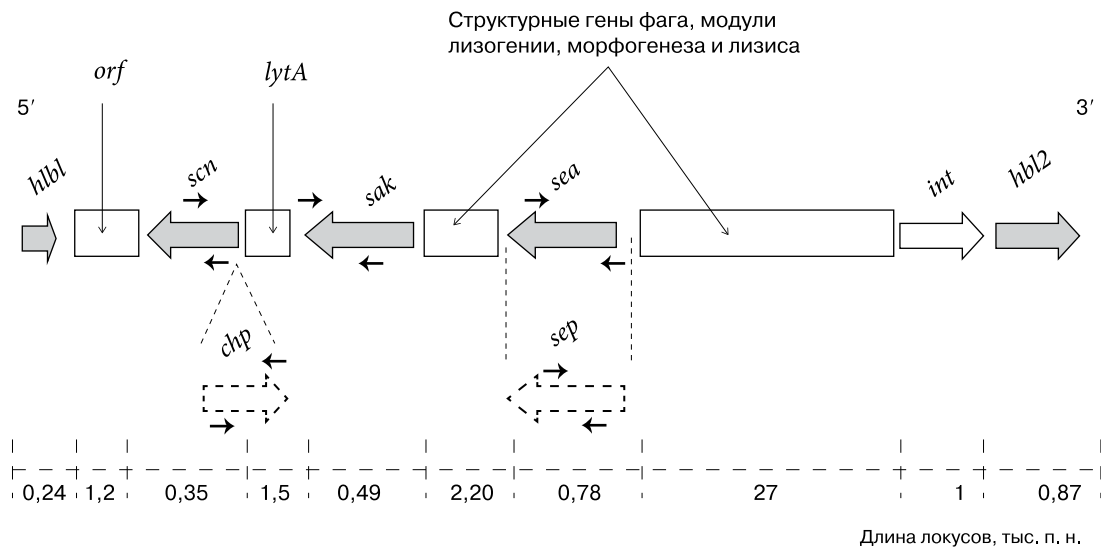
Таблица 2. Результаты *agr*-типирования и детекции ИЕС

Изоляты	Группа <i>agr</i>	ИЕС		% (n) <sup>1</sup>	Источники выделения
		тип	гены		
MRSA <i>mecA</i> <sup>+</sup> FOX(R) n=231	I (94%)	D	<i>scn, sak, sea</i>	65 (151)	Различные <sup>2</sup>
		F	<i>scn, chp, sak, sep</i>	15 (34)	Ожоговые раны, сепсис
		E	<i>sak, scn</i>	9 (19)	Остеомиелиты, флегмоны, пневмонии, сепсис, абсцессы
		– <sup>3</sup>	<i>sak, sea</i>	2 (5)	Различные
		B	<i>scn, chp, sak</i>	1 (3)	Различные
		–	<i>sak</i>	1 (2)	Различные
		A	<i>scn, chp, sak, sea</i>	0,4 (1)	Ожоговая рана
	–	– <sup>4</sup>	1 (3)	Различные	
	II (5%)	D	<i>scn, sak, sea</i>	5 (11)	Различные
	III (0,4%)	E	<i>sak, scn</i>	0,4 (1)	Рана, остеомиелит
IV (0,4%)	D	<i>scn, sak, sea</i>	0,4 (1)	Нет данных	
MSSA <i>mecA</i> <sup>–</sup> FOX (S) n=60	I (56%)	B	<i>scn, chp, sak</i>	25 (15)	Носители, кровь/сепсис <sup>5</sup>
		E	<i>sak, scn</i>	18 (11)	Носители, носоглотка, мокрота, пневмония, раны, остеомиелит
		D	<i>scn, sak, sea</i>	13 (8)	Рана, остеомиелит
	II (28%)	F	<i>scn, chp, sak, sep</i>	7 (4)	Различные
		B	<i>scn, chp, sak</i>	8 (5)	Абсцессы, различные
		E	<i>sak, scn</i>	7 (4)	Носители, носоглотка
		C	<i>scn, chp</i>	3 (2)	Носители, носоглотка
		D	<i>scn, sak, sea</i>	1,6 (1)	Носитель, носоглотка
		A	<i>scn, chp, sak, sea</i>	1,6 (1)	Нет данных
	III (9%)	B	<i>scn, chp, sak</i>	3 (2)	Носители, носоглотка, кожа
		D	<i>scn, sak, sea</i>	3 (2)	Различные
		E	<i>sak, scn</i>	1,6 (1)	Носитель, носоглотка
		–	<i>sak, chp</i>	1,6 (1)	Носитель, носоглотка
IV (5%)	E	<i>sak, scn</i>	5 (3)	Носитель, носоглотка	

**Примечание:** <sup>1</sup> – данные представлены в %, в скобках – абсолютные значения; <sup>2</sup> – наиболее распространенный тип ИЕС среди MRSA; <sup>3</sup> – неклассифицированные варианты; <sup>4</sup> – результаты ПЦР по всем пяти генам ИЕС отрицательные; <sup>5</sup> – только один изолят в этой группе был выделен из крови при сепсисе.

III группе, и степень нуклеотидной гомологии при сравнении с другими геномами *S. aureus* составляет при выравнивании в BLAST 92–100%. Как было продемонстрировано в работе С. Goerke и соавт. [21], такие фаги широко распространены, как среди изолятов, колонизирующих носоглотку носителей, так и среди инвазивных изолятов и встречаются среди важнейших генетических линий *S. aureus*. Считавшееся ранее утверждение, что гемолизин-продуцирующие стафилококки могут быть маркером инвазивности, стоит теперь интерпретировать по-другому: как видно, исчезновение функции гемолиза связано с наличием профага, который, в свою очередь, несет дополнительные потенции для развития инфекционного процесса.

Бактериофаги являются для прокариот важным механизмом обмена генетической информацией, при этом выступая как векторы и как элементы, привносящие новые функциональные возможности. Конечно, при этом неизбежен «биологический компромисс» между механизмами защиты от лизогенных фагов, а с другой стороны, наоборот, он необходим для интеграции вируса [13, 21]. Именно поэтому у *S. aureus* имеется выраженная регуляция этого процесса: во-первых, исследования показывают, что разные генетические линии обладают своими уникальными паттернами генов, в том числе и ИЕС, обуславливающих «уход» от действия иммунной системы (т.е. внутри каждой линии существует своя фаговая селекция); во-вторых, при попадании



**Схема строения IEC D-типа изолята MRSA SA0077 по данным полногеномного секвенирования**

**Примечание.** Комплекс генов *scn*, *sak* и *sea* (серая заливка) входит в состав профага, который встроен в ген *hbl* (две части: *hbl1*, *hbl2*). Пунктирными линиями обозначены участки локализации генов *chp* (IEC – A, B, C, F) и *sep* (IEC – F, G). Прямоугольные участки (без заливки) соответствуют структурным генам профага. Гены *lytA* – фаговые амидазы участвуют в процессах перестройки пептидогликана при лизисе, *orf* – не охарактеризованные фаговые гены, *int* – интеграз (ген, участвующий в процессе интеграции вируса в хромосому). Черные стрелки указывают точки отжига специфических праймеров, использованных в исследовании. Схема составлена на основе анализа и аннотаций, полученных с помощью PHAST PHAge Search Tool (<http://phast.wishartlab.com/>).

в новую среду (например, при смене хозяина) стафилококкам необходимы механизмы, повышающие адаптационный потенциал. Этот факт подтверждается тем, что у «ветеринарных» *S. aureus* отсутствует IEC, но при смене хозяина на человека происходит интеграция вирусов [8, 14, 22].

**Типирование *lukSF*, *tsst* и *seb*.** Известно, что MSSA и MRSA различаются, как по принадлежности к различным генетическим линиям (клональности), так и по спектру детерминант вирулентности, причем оказывается, что госпитальные MRSA фенотипически часто оказываются менее вирулентными [1, 23]. Ситуация кардинальным образом изменилась с появлением в 1990 г. внебольничных MRSA в человеческой популяции – *community acquired* MRSA (CA-MRSA). CA-MRSA обладают отличительной чертой – это высокая вирулентность наряду с отсутствием ассоциированной антибиотикорезистентности. Одним из маркерных признаков CA-MRSA является наличие токсина PVL [24]. На сегодняшний день CA-MRSA (PVL<sup>+</sup>) распространены во многих странах мира, например в США циркулирует клон USA300, в странах Европы – клональный комплекс 80 [25–26]. Неблагоприятными регионами можно считать страны Азии, где частота выявления CA-MRSA достигает 30–40%. В географически близких к России регионах Европы, в частности в Польше [27] и Латвии [28] также

описаны случаи внебольничных инфекций MRSA (PVL<sup>+</sup>). Данные о распространении CA-MRSA в России немногочисленные, но первые сообщения были с Дальнего Востока [29–30]. В настоящем исследовании MRSA (*lukSF*<sup>+</sup>) не выявлены. Из других генов вирулентности у MRSA были выявлены только *tsst* (7,2%) и в большинстве случаев они ассоциированы с E-типом IEC комплекса (табл. 3). Все MRSA *tsst* (+) были выделены из одного региона и относились к *agr* I.

В отличие от MRSA, среди MSSA были выявлены изоляты, имеющие все рассматриваемые гены вирулентности. Так, были выявлены стафилококки с *lukSF*, все они были ассоциированы с E-типом IEC (5%), но относились к *agr* II и IV. Подобные изоляты представляют определенный интерес, поскольку они могут являться источником распространения такого опасного фактора. В целом, частота выделения рассматриваемых стафилококков, по данным различных авторов, колеблется в пределах 5–30%. Так, например, в США частота встречаемости MSSA (PVL<sup>+</sup>), выделенных из носоглотки здоровых людей, составляет не более 5% [31–32]. Противоположная ситуация наблюдается в странах Азии, где этот показатель достигает 30% [33]. Конечно, как отмечалось выше, наибольшую тревогу вызывают CA-MRSA (PVL<sup>+</sup>), которые циркулируют на всех континентах. В проведенном исследовании

Таблица 3. Типирование PVL, *tsst*, *seb* и ассоциации с ИЕС

Изоляты	Группа <i>agr</i>	Тип ИЕС	Гены вирулентности	% (n)	Источники выделения
MRSA	I	E	<i>tsst</i>	6 (13)	Остеомиелиты, флегмоны
		B	<i>tsst</i>	1 (2)	Носоглотка
		D	<i>tsst</i>	0,4 (1)	Рана, остеомиелит
MSSA	I	B	<i>seb</i>	15 (9)	Носители, кровь/сепсис
		E	<i>seb</i>	1,6 (1)	Носители, носоглотка
		D	<i>tsst</i>	3 (2)	Рана, остеомиелит
	II-IV	E	<i>tsst</i>	1,6 (1)	Мокрота, пневмония
		B	<i>seb</i>	3 (2)	Абсцессы
		E	<i>lukS, lukF</i> (PVL)	3 (2)	Носители, носоглотка
		B	<i>tsst</i>	3 (2)	Носители, носоглотка, кожа
IV	E	<i>lukS</i> (PVL)	1,6 (1)	Носитель, носоглотка	

довании обращает на себя внимание также высокая доля *seb*-позитивных MSSA (20%). Стафилококки, имеющие *seb*, относились к *agr* I и II группы и имели ИЕС В-типа (18%) или Е-типа (1,6%). Здесь стоит отметить, что ген *seb* встречается только среди изолятов с вышеуказанными ИЕС, в структуре этих комплексов отсутствует энтеротоксин А. Действительно, если проанализировать сравнительную патогеномику *S. aureus*, то можно обратить внимание, что оба рассматриваемых энтеротоксина не встречаются вместе в одной стафилококковой хромосоме [2]. Ген токсического шока (*tsst*) был выявлен у нескольких изолятов (8%), относящихся к различным *agr*-группам (I, III) и имеющих разные типы ИЕС (E, D, B).

Как видно, исходя из сравнения частоты встречаемости ИЕС, *lukSF*, *tsst* и *seb* у MRSA и MSSA, последние проявляют выраженную гетерогенность, а также имеют в популяции значительно больше факторов вирулентности. Это может быть объяснено разной биологической стратегией выживания этих двух групп стафилококков. Так, в популяции человека MSSA крайне разнообразны и образуют мультиклональные структуры, при этом ассоциированы они с различными факторами вирулентности, селекция штаммов в данном случае носит неопределенный характер. Экологической нишей MRSA преимущественно выступает стационарная среда, где условия относительно постоянны, но при этом такие стафилококки накапливают детерминанты устойчивости к антибактериальным препаратам, что опосредовано селекцией штаммов. Иными словами, MRSA биологически выгоднее аккумуляиро-

вать резистентность, но при этом лимитироваться в наборе значимых факторов вирулентности, хотя такая точка зрения остается дискуссионной.

### Заключение

Таким образом, среди MRSA и MSSA преобладают изоляты, принадлежащие к I группе *agr*. Среди MRSA подавляющее большинство изолятов имеет ИЕС D типа (отсутствует ген *chp*). Этот комплекс закодирован в профаге, который имеет характерное для этой группы вирусов строение, что было продемонстрировано на примере секвенированного изолята SA0077. Комплексы ИЕС F- и А-типов встречались преимущественно среди изолятов MRSA, выделенных от больных с тяжелыми формами инфекций. G-тип ИЕС не был выявлен у исследуемых стафилококков. Нами было отмечено также, что Е-тип ИЕС ассоциирован с наличием дополнительных генов вирулентности, в частности с *tsst* у MRSA и *lukSF* у MSSA. Количественное и качественное сравнение факторов вирулентности у MRSA и MSSA показало, что последние, несмотря на немногочисленную выборку, имеют гетерогенную структуру, и среди них были *lukSF*-, *seb*- и *tsst*-положительные изоляты. В работе не выявлено зависимости между принадлежностью стафилококков к различным *agr* группам и конкретными ИЕС типами, либо связи с рассматриваемыми факторами вирулентности. Распространение различных детерминант вирулентности и частота встречаемости MSSA (*lukSF*<sup>+</sup>), а также их молекулярная эпидемиология требуют детального изучения.

## Литература

- Watkins R.R., David M.Z., Salata R.A. Current concepts on the virulence mechanisms of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. J Med Microbiol 2012; 61:1179-93.
- Virulence factors of pathogenic bacteria database (VFDB). In: <http://www.mgcaccn/cgi-bin/VFs/compvfscgi?Genus=Staphylococcus>.
- Papageorgiou A.C., Acharya K.R. Microbial superantigens: from structure to function. Trends Microbiol 2000; 8(8):369-75.
- McCormick J.K., Yarwood J.M., Schlievert P.M. Toxic shock syndrome and bacterial superantigens: an update. Annu Rev Microbiol 2001; 55:77-104.
- Dinges M.M., Orwin P.M., Schlievert P.M. Exotoxins of *Staphylococcus aureus*. Clin Microbiol Rev 2000; 13(1):16-34.
- Lina G., Piemont Y., Godail-Gamot F., et al. Involvement of Panton-Valentine leukocidin-producing *Staphylococcus aureus* in primary skin infections and pneumonia. Clin Infect Dis 1999; 29(5):1128-32.
- Labandeira-Rey M., Couzon F., Boisset S., et al. *Staphylococcus aureus* Panton-Valentine leukocidin causes necrotizing pneumonia. Science 2007; 315(5815):1130-3.
- McCarthy A.J., Lindsay J.A. *Staphylococcus aureus* innate immune evasion is lineage-specific: a bioinformatics study. Infect Genet Evol 2013; 19C:7-14.
- van Wamel W.J., Rooijakkers S.H., Ruyken M., van Kessel K.P., van Strijp J.A. The innate immune modulators staphylococcal complement inhibitor and chemotaxis inhibitory protein of *Staphylococcus aureus* are located on beta-hemolysin-converting bacteriophages. J Bacteriol 2006; 188(4):1310-5.
- Jin T., Bokarewa M., Foster T., Mitchell J., Higgins J., Tarkowski A. *Staphylococcus aureus* resists human defensins by production of staphylokinase, a novel bacterial evasion mechanism. J Immunol 2004; 172(2):1169-76.
- Ricklin D., Tzekou A., Garcia B.L., et al. A molecular insight into complement evasion by the staphylococcal complement inhibitor protein family. J Immunol 2009; 183(4):2565-74.
- de Haas C.J., Veldkamp K.E., Peschel A., et al. Chemotaxis inhibitory protein of *Staphylococcus aureus*, a bacterial anti-inflammatory agent. J Exp Med 2004; 199(5):687-95.
- Canchaya C., Proux C., Fournous G., Bruttin A., Brussow H. Prophage genomics. Microbiol Mol Biol Rev 2003; 67(2):238-76.
- McCarthy A.J., Witney A.A., Lindsay J.A. *Staphylococcus aureus* temperate bacteriophage: carriage and horizontal gene transfer is lineage associated. Front Cell Infect Microbiol 2012; 2:6.
- Novick R.P. Autoinduction and signal transduction in the regulation of staphylococcal virulence. Mol Microbiol 2003; 48(6):1429-49.
- Francois P., Koessler T., Huyghe A., et al. Rapid *Staphylococcus aureus agr* type determination by a novel multiplex real-time quantitative PCR assay. J Clin Microbiol 2006; 44(5):1892-5.
- Goerke C., Esser S., Kummel M., Wolz C. *Staphylococcus aureus* strain designation by *agr* and *cap* polymorphism typing and delineation of *agr* diversification by sequence analysis. Int J Med Microbiol 2005; 295(2):67-75.
- Collery M.M., Smyth D.S., Tumilty J.J., Twohig J.M., Smyth C.J. 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*. J Med Microbiol 2009; 58(Pt 1):13-25.
- Sakoulas G., Eliopoulos G.M., Moellering R.C., et al. *Staphylococcus aureus* accessory gene regulator (*agr*) group II: is there a relationship to the development of intermediate-level glycopeptide resistance? J Infect Dis 2003; 187(6):929-38.
- Gilot P., Lina G., Cochard T., Poutrel B. Analysis of the genetic variability of genes encoding the RNA III-activating components Agr and TRAP in a population of *Staphylococcus aureus* strains isolated from cows with mastitis. J Clin Microbiol 2002; 40(11):4060-7.
- Goerke C., Pantucek R., Holtfreter S., et al. Diversity of prophages in dominant *Staphylococcus aureus* clonal lineages. J Bacteriol 2009; 191(11):3462-8.
- Verkaik N.J., Benard M., Boelens H.A., et al. Immune evasion cluster-positive bacteriophages are highly prevalent among human *Staphylococcus aureus* strains, but they are not essential in the first stages of nasal colonization. Clin Microbiol Infect 2011; 17(3):343-8.
- Goering R.V., Shawar R.M., Scangarella N.E., et al. Molecular epidemiology of methicillin-resistant and methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* isolates from global clinical trials. J Clin Microbiol 2008; 46(9):2842-7.
- David M.Z., Daum R.S. Community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: epidemiology and clinical consequences of an emerging epidemic. Clin Microbiol Rev 2010; 23(3):616-87.
- Rolo J., Miragaia M., Turlej-Rogacka A., et al. High genetic diversity among community-associated *Staphylococcus aureus* in Europe: results from a multicenter study. PLoS ONE 2012; 7(4):e34768.
- Li M., Diep B.A., Villaruz A.E., et al. Evolution of virulence in epidemic community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Proc Natl Acad Sci U S A 2009; 106(14):5883-8.
- Bogut A., Koziol-Montewka M., Baranowicz I., et al. Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (CA-MRSA) in Poland: further evidence for the changing epidemiology of MRSA. New Microbiol 2008; 31(2):229-34.
- Miklasevics E., Haeggman S., Balode A., et al. Report on the first PVL-positive community acquired MRSA strain in Latvia. Euro Surveill 2004; 9(11):29-30.
- Baranovich T., Potapov V., Yamamoto T. The first isolation of Panton-Valentine leukocidin (PVL) positive community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus*



- aureus* (CA-MRSA) in Russia. Euro Surveill 2007; 12(3):E070315 070314.
30. Baranovich T., Zaraket H., Shabana I.I., Nevzorova V., Turcutyucov V., Suzuki H. Molecular characterization and susceptibility of methicillin-resistant and methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* isolates from hospitals and the community in Vladivostok, Russia. Clin Microbiol Infect 2010; 16(6):575-82.
  31. Kuehnert M.J., Kruszon-Moran D., Hill H.A., et al. Prevalence of *Staphylococcus aureus* nasal colonization in the United States, 2001-2002. J Infect Dis 2006; 193(2):172-9.
  32. Munckhof W.J., Nimmo G.R., Schooneveldt J.M., et al. Nasal carriage of *Staphylococcus aureus*, including community-associated methicillin-resistant strains, in Queensland adults. Clin Microbiol Infect 2009; 15(2):149-55.
  33. Severin J.A., Lestari E.S., Kuntaman K., et al: Unusually high prevalence of panton-valentine leukocidin genes among methicillin-sensitive *Staphylococcus aureus* strains carried in the Indonesian population. J Clin Microbiol 2008; 46(6):1989-95.