

## Генотипирование изолятов *Staphylococcus aureus*, выделенных при вспышке эксфолиативного дерматита новорожденных

И. В. Абаев<sup>1</sup>, Ю. П. Скрябин<sup>1</sup>, Э. И. Печерских<sup>1</sup>, И. П. Мицевич<sup>1</sup>,  
Е. В. Мицевич<sup>1</sup>, О. В. Коробова<sup>1</sup>, В. А. Гриценко<sup>2</sup>, Э. А. Светоч<sup>1</sup>

<sup>1</sup> ФБУН «ГНЦ прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора, Оболенск, Россия

<sup>2</sup> Институт клеточного и внутриклеточного симбиоза УрО РАН, Оренбург, Россия

*Staphylococcus aureus* известен как ведущий инфекционный агент при внутрибольничных инфекциях и самый частый возбудитель инфекций кожи и мягких тканей человека. Цель данного исследования — определение генетической структуры метициллиночувствительных изолятов *S. aureus*, выделенных от больных детей и носителей (медицинского персонала и посетителей) при локальной внутрибольничной вспышке эксфолиативного дерматита. Изоляты *S. aureus* изучали методами *spa*-, *MLST*-, *coa*- и *agr*-типирования, а также определяли наличие 11 генов токсинов. Показано, что все изоляты от больных детей идентичны и представляют собой штамм *S. aureus* t272 (ST121). Особенностью генома данного штамма является наличие двух генов эксфолиативных токсинов *eta* и *etb* и кассеты энтеротоксиновых генов *egc*. Результаты анализа структуры генома штамма *S. aureus* t272 (ST121) свидетельствуют о клональном родстве этого штамма с циркулирующими во Франции штаммами и о различии со штаммами, циркулирующими в Японии и Китае. Изоляты, выделенные от медицинского

персонала и посетителей, были разделены на 9 генетических вариантов *S. aureus*. Один изолят, *S. aureus* t284 (ST121), относится к генетической линии, которая может вызывать стафилодермию, но в его геноме отсутствуют основные детерминанты вирулентности, ответственные за патогенез инфекции. Остальные выделенные от носителей изоляты относятся к 8 генетическим вариантам *S. aureus*, которые не выявляются среди штаммов, вызывающих эксфолиативный дерматит. Большинство этих изолятов относится к таким известным клонам *S. aureus*, как t002 (ST5), t012 (ST30) и t015 (ST45), которые характеризуются повышенной вирулентностью, высокой частотой горизонтального переноса SCC *mec*-кассет и генов токсинов. Все выявленные в исследовании изоляты *S. aureus* t012 (ST30) несут ген токсина синдрома токсического шока, часть из них несёт также ген лейкоцидина Пантона-Валентайна.

**Ключевые слова:** *Staphylococcus aureus*, эксфолиативные токсины, эксфолиативный дерматит.

## Genotyping of *Staphylococcus aureus* Isolates in Outbreak of Exfoliative Dermatitis in Neonates

I.V. Abaev<sup>1</sup>, Yu.P. Skryabin<sup>1</sup>, E.I. Petcherskyh<sup>1</sup>, I.P. Mitsevitch<sup>1</sup>, E.V. Mitsevitch<sup>1</sup>, O.V. Korobova<sup>1</sup>, V.A. Gritsenko<sup>2</sup>, E.A. Svetoch<sup>1</sup>

<sup>1</sup> State Scientific Center of Applied Microbiology and Biotechnology, Obolensk, Russia

<sup>2</sup> Institute of Cellular and Intracellular Symbiosis, Orenburg, Russia

*Staphylococcus aureus* is known as the leading pathogen in hospital-acquired infections and the most common cause of skin and soft tissues. The present study aimed to test the genetic background of MSSA isolates obtained from pediatric patients and carriers (medical personnel and visitors) during local outbreak of exfoliative dermatitis. *S. aureus* isolates were analyzed by *spa*-, MLST-, *coa*-, SCC *mec*- и *agr*-typing, and 11 toxin- encoding genes were tested. All pediatric patient isolates were identical and have characteristics: *S. aureus* t272 (ST121). The main genomic features of this strain are genes of exfoliative toxins *eta* and *etb*, and the enterotoxin gene cluster. The analysis of the genetic structure of the *S. aureus* t272 (ST121) demonstrates clonal relationship with the strains circulating in France and the difference with the strains circulating in the Far East region. Isolates obtained from medical personnel

and visitors divided to 9 *S. aureus* lineages. One isolate, *S. aureus* t284 (ST121), belongs to the genetic lineage, which can cause exfoliative dermatitis, but specific exfoliative dermatitis determinants are absent at the same time. The rest were belonging to the 8 genetic variants of *S. aureus*, which were not detected among strains causing exfoliative dermatitis. Most of the isolates were identified as the known *spa* types *S. aureus*: t002 (ST5), t012 (ST30) и t015 (ST45). These genetic lineages are characterized by high-frequency of horizontal virulence gene transfer, which includes SCC *mec* and toxin genes. All *spa* type t012 isolates carried toxic shock syndrome toxin gene and some of them carried the gene Pantone-Valentine leukocidin.

**Key words:** *Staphylococcus aureus*, exfoliative toxins, exfoliative dermatitis.

### Введение

*Staphylococcus aureus* является одним из наиболее часто встречающихся возбудителей инфекций человека и представляет опасность, прежде всего, как ведущий патоген при внутрибольничных инфекциях и инфекциях кожи и мягких тканей [1]. Учитывая тот факт, что *S. aureus* является этиологическим агентом более 100 нозологических форм заболеваний, выявление корреляции между клиническими проявлениями стафилококковой инфекции и особенностями структуры генома золотистого стафилококка представляет практический интерес. Тем не менее, попытки установить такую корреляцию между проявлениями различных синдромов заболевания и определенными генетическими маркерами возбудителя, в особенности такими, как гены токсинов, в целом, оказались безуспешными [2].

В то же время, показана связь между генетическими линиями *S. aureus* и специфическими нозологическими формами стафилококковой инфекции, а также продемонстрирована различная predisposition определенных клональных групп *S. aureus* к модификациям генома посредством горизонтального переноса генов, способствующих повышению вирулентности штаммов и тяжести вызываемой ими патологии [3]. По результатам исследования аллельных вариаций большого числа

различных генов вид *S. aureus* был разделен на три основных ветви [4]. В состав первой ветви входят крупные клональные группы, названные по наиболее представительным сиквенс-типам: ST5, ST8, ST1 и ST25. Вторая ветвь включает клональные группы ST30-, ST45- и ST22-типов. Третья ветвь представлена сиквенс-типами ST121 и ST151. Даже на таком уровне клональности можно отметить явную корреляцию между определенными генетическими группами штаммов и нозологическими формами заболеваний. Например, при исследовании внутри- и внегоспитальных штаммов возбудителей стафилодермии показано, что более 75% изолятов относятся к клональной группе ST121 [5]. Установление связи между определенными формами инфекции и типом генетической структуры *S. aureus* позволяет обоснованно выявлять источники инфекции и, в частности, оценивать вклад бессимптомного носительства *S. aureus* (которое регистрируется у 30% населения) в возникновение эпидемических вспышек стафилококковой инфекции [6].

В России недостаточно полно исследована популяционная структура клинических метициллинчувствительных *S. aureus* (MSSA) и изолятов, выделяемых у здоровых носителей. Для практического здравоохранения несомненную актуальность представляет вопрос о возможной связи между штам-

мами *S. aureus*, вызвавшими внутрибольничную вспышку инфекции, и штаммами *S. aureus*, носителями которых является медицинский персонал лечебных учреждений. Медицинские работники как группа носителей *S. aureus* привлекают наибольший интерес, будучи возможным резервуаром специфических штаммов золотистого стафилококка вследствие частых контактов персонала с источником инфекции. Значение такого резервуара для развития внутрибольничных вспышек инфекции *S. aureus* исследовано недостаточно. Генетическое типирование штаммов *S. aureus*, выделенных от больных и медицинского персонала, с учетом современных данных о корреляции между генетическими линиями и нозологическими формами стафилококковой инфекции, позволяет доказательно рассматривать возможную роль носительства *S. aureus* среди медицинских работников в возникновении внутрибольничных вспышек инфекции.

В данном исследовании представлены результаты молекулярно-генетического анализа изолятов *S. aureus*, выделенных от больных детей и носителей (медицинского персонала и посетителей) при локальной вспышке эксфолиативного дерматита в одной из клиник г. Оренбурга.

### Материал и методы исследования

В исследовании использовали изоляты *S. aureus*, выделенные при вспышке эксфолиативного дерматита в 2012 г. в ООКБ № 2 г. Оренбурга, среди них: 14 изолятов от больных детей, 26 — от сотрудников клиники и 5 — от посетителей клиники. Видовую идентификацию бактерий осуществляли с помощью биохимических тестов API Staph (bioMérieux, Франция). Определение профиля антибиотико-чувствительности изолятов *S. aureus* проводили на агаре Мюллера–Хинтон диско-диффузионным методом в соответствии с рекомендациями МУК 4.2.1890–04 [7] с использованием следующих препаратов: бензилпенициллин, оксациллин, гентамицин, амикацин, цiproфлоксацин, тетрациклин, эритромицин, клиндамицин, ванкомицин, хлорамфеникол, ко-тримоксазол, рифампицин.

Для генетического анализа в качестве референтных использовали штаммы *S. aureus* из Американской коллекции типовых культур (ATCC): MRSA252 (GenBank BX571856); MSSA476 (GenBank BX571857); Mu50 (GenBank BA000017); MW2 (GenBank BA000033) и USA300\_TCH1516 (GenBank CP000730) и штаммы *S. aureus* из российской Государственной коллекции патогенных микроорганизмов и клеточных культур «ГКПМ-Оболенск»: В-6833, В-6836, В-6837 и В-6840.

После биохимического исследования все исследуемые образцы изолятов идентифицировали генетическими методами: проводили определение наличия специфического для *S. aureus* участка гена термостабильной нуклеазы (*nuc*) [8] и варибельного участка гена коагулазы (*coa*) [9] посредством амплификации в ПЦР. Мультилокусное секвенирование (MLST) штаммов *S. aureus*, основанное на определении нуклеотидной последовательности 7 генов «домашнего хозяйства» и идентификации аллельного профиля, выполняли с использованием информации, представленной на mlst.net сервере (<http://www.mlst.net/>). Spa-типирование проводили путем определения нуклеотидной последовательности гена белка А с последующим анализом при использовании базы данных Ridom SpaServer (<http://spaserver.ridom.de/>). Анализ полиморфизма длин рестриционных фрагментов продуктов амплификации варибельного региона коагулазного гена (*coa*-ПЦР-ПДРФ) осуществляли стандартным методом [8]. *Coa*-ПЦР-ПДРФ паттерны представляли в цифровой записи, где размер ПЦР продукта указан до косой черты, а размеры рестриционных AluI-фрагментов указаны после косой черты через точку с запятой. Детекцию аллеля гена *agr*, контролирующего экспрессию бактериальных факторов вирулентности, проводили с помощью амплификации со специфическими праймерами (табл. 1).

Наличие генов лейкоцидина Пантона-Валентайна (*pvI*), лейкоцидинов *lukE* и *lukD*, токсина синдрома токсического шока (*tst*), стафилококковых энтеротоксинов (*sea*, *seb*, *sec*), эксфолиативных токсинов (*eta* и *etb*), альфа- и бета-гемолизина (*hema* и *hemb*), маркера кассеты энтеротоксиновых генов *egc* — гена *seo* определяли методом ПЦР с помощью специфических праймеров (см. табл. 1).

Для подтверждения наличия в изолятах *S. aureus* генов эксфолиативных токсинов определяли нуклеотидную последовательность ПЦР-продуктов генов *eta* и *etb*. Гомологичный анализ нуклеотидных последовательностей проводили с помощью BLAST сервера (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>).

### Результаты и обсуждение

Как известно, варибельный участок гена коагулазы *S. aureus* содержит различное число тандемных повторов длиной в 81 нуклеотид [9]. Согласно доступным базам данных, число тандемных повторов гена *coa* варьирует от 3 до 9, последовательность тандемных повторов одинаковой размерности различается по локализации сайтов рестрикции для эндонуклеазы AluI. Нуклеотидная последовательность гена *coa* является надежным марке-

Таблица 1. Олигонуклеотидные праймеры, использованные в работе

| №  | Праймер   | Последовательность праймера (5'-3') | Мишень  | Ссылка |
|----|-----------|-------------------------------------|---|--------|
| 1  | nuc1      | GCGATTGATGGTGATACGGTT               | Ген нуклеазы  | [9]    |
| 2  | nuc2      | AGCCAAGCCTTGACGAACATAAAGC           |   |        |
| 3  | coa1      | ATAGAGATGCTGGTACAGG                 | Ген коагулазы   | [8]    |
| 4  | coa2      | GCTTCCGATTGTTTCGATGC                |   |        |
| 5  | spa-1113f | TAAAGACGATCCTTCGGTGAGC              | Ген белка А   | [10]   |
| 6  | spa-1514r | CAGCAGTAGTGCCGTTTGCTT               |   |        |
| 7  | pan       | ATGCACATGGTGCACATGC                 | Ген, контролирующей экспрессию факторов вирулентности | [11]   |
| 8  | agr1      | GTCACAAGTACTATAAGCTGCGAT            |   |        |
| 9  | agr2      | TATTAATAATTGAAAAGTGGCCATAGC         |   |        |
| 10 | agr3      | GTAATGTAATAGCTTGTATAATAATACCCAG     |   |        |
| 11 | agr4      | CGATAATGCCGTAATACCCG                |   |        |
| 12 | luk-PV-1F | ATCATTAGGTAATAATGTCTGGACATGATCCA    | Ген лейкоцидина Пантон-Валентайна                     | [12]   |
| 13 | luk-PV-2R | GCATCAAGTGTATTGGATAGCAAAAAGC        |   |        |
| 14 | lukED-F1  | CAGATGTGAAGGGTAGTGGA                | Ген лейкоцидина ED                                    | [13]   |
| 15 | lukED-R5  | TCATTATCAGATGTTGCTGTTG              |   |        |
| 16 | eta-F     | ACTGTAGGAGCTAGTGCATTTGT             | Ген эксфолиативного токсина А                         | [2]    |
| 17 | eta-R     | TGGATACTTTTGTCTATCTTTTTCATCAAC      |   |        |
| 18 | etb-F     | CAGATAAAGAGCTTTATACACACATTAC        | Ген эксфолиативного токсина В                         | [2]    |
| 19 | etb-R     | AGTGAACCTATCTTTCTATTGAAAAACACTC     |   |        |
| 20 | hla-F     | GAAGTCTGGTGAAAACCCTGA               | Ген гемолизина А                                      | [14]   |
| 21 | hla-R     | TGAATCCTGTCGCTAATGCC                |   |        |
| 22 | hlb-F     | CAATAGTGCCAAAGCCGAAT                | Ген гемолизина В                                      | [14]   |
| 23 | hlb-R     | TCCAGCACCACAACGAGAAT                |   |        |
| 24 | tst-F     | ACCCCTGTTCCCTTATCATC                | Ген токсина синдрома токсического шока                | [15]   |
| 25 | tst-R     | TTTTCAAGTATTTGTAACGCC               |   |        |
| 26 | sea-F     | GGTTATCAATGTGCGGGTGG                | Ген энтеротоксина А                                   | [15]   |
| 27 | sea-R     | CGGCACTTTTTTCTCTTCGG                |   |        |
| 28 | seb-F     | GTATGGTGGTGTAAGTACTGAGC             | Ген энтеротоксина В                                   | [15]   |
| 29 | seb-R     | CCAAATAGTGACGAGTTAGG                |   |        |
| 30 | sec-F     | AGATGAAGTAGTTGATGTGTAT              | Ген энтеротоксина С                                   | [15]   |
| 31 | sec-R     | CACACTTTTAGAATCAACCG                |   |        |
| 32 | seo-F     | AGTTTGTGTAAGAAGTCAAGTGTAGA          | Ген энтеротоксина О                                   | [16]   |
| 33 | seo-R     | ATCTTTAAATTCAGCAGATATTCATCTAAC      |   |        |
| 34 | mecA mA1  | ACTGCTATCCACCCTCAAAC                | Ген mecA  | [17]   |
| 35 | mecA mA2  | CTGGTGAAGTTGTAATCTGG                |   |        |

ром генетических линий *S. aureus* и используется для быстрого типирования клинических изолятов *S. aureus* методом *coa*-ПЦР-ПДРФ.

При амплификации варибельного региона гена *coa* среди 44 изолятов *S. aureus* выявили 5 вариантов ПЦР продуктов с количеством тандемных повторов от 4 до 8. При рестрикционном анализе ПЦР продуктов с помощью эндонуклеазы AluI

получили 9 вариантов *coa*-ПЦР-ПДРФ паттернов (табл. 2). Все 14 изолятов *S. aureus*, выделенные от 8 инфицированных новорожденных, принадлежали к *coa*-ПЦР-ПДРФ варианту 838 /324;295;219 (см. табл. 2). К этому же варианту принадлежал один изолят, полученный от медицинского персонала. Среди изолятов, выделенных от сотрудников больницы и посетителей, было выявлено еще 8

Таблица 2. Распределение *coa*-ПЦР-ПДРФ паттернов при анализе 45 изолятов *S. aureus*, выделенных от здоровых носителей и от больных

| Число изолятов | Источник выделения |   |   | <i>coa</i> -ПЦР-ПДРФ тип* | <i>spa</i> -тип | MLST-тип | Устойчивость к лекарственным препаратам |
|----------------|--------------------|---|---|---------------------------|-----------------|----------|---|
|                | НР                 | С | П |                           |                 |          |   |
| 14             | 8                  | – | – | 838 /324;295;219          | t272            | ST-121   | Pc+Co +C                                |
| 1              | –                  | 1 | – | 838 /324;295;219          | t284            | ST-121   | Pc+Co                                   |
| 8              | –                  | 5 | 1 | 514 /219;214;81           | t012            | ST30     | Pc+Co                                   |
| 4              | –                  | 4 |   | 676 /295;162;138;81       | t002            | ST5      | Pc+Co                                   |
| 10             | –                  | 7 | 1 | 676 /676                  | t015            | ST45     | Pc+Co +Ak+E+/-                          |
| 4              | –                  | 3 | 1 | 676 /243;219;214          | t10519          | STND**   | Pc+Co +Ak                               |
| 1              | –                  | – | 1 | 595 /300;214;81           | t056            | ST101    | Pc+Co                                   |
| 1              | –                  | 1 | – | 595 /300;295              | t731            | STND**   | Pc+Co                                   |
| 1              | –                  | 1 | – | 676 /381;214;81           | t349            | ST25     | Pc+Co +Ak                               |
| 1              | –                  | 1 | – | 838 /381;295;162          | t267            | ST97     | Pc+Co                                   |

**Примечание.** НР – новорожденные; С – сотрудники клиники; П – посетители клиники; \**coa*-ПЦР-ПДРФ паттерны; \*\* сиквенс тип не представлен на сервере mlst.net. Препараты: Pc – бензилпенициллин, Co – ко-тримоксазол, С – хлорамфеникол, Ak – амикацин, E – эритромицин.

*coa*-ПЦР-ПДРФ вариантов, отличных от варианта 838 /324;295;219. Таким образом, на данном этапе типирования только один изолят *S. aureus* от медицинского персонала мог иметь клональное родство с изолятами, выделенными от больных.

Как известно, *spa*-типирование позволяет формализовать генотип изолята *S. aureus* и соотнести его с данными из международных информационных баз и научных публикаций (<http://spaserver.ridom.de/>). В наших экспериментах при *spa*-типировании изолятов каждый из *coa*-ПЦР-ПДРФ типов соответствовал одному *spa*-типу, за исключением *coa*-ПЦР-ПДРФ варианта 838 /324;295;219, который показал расщепление: все изоляты от больных принадлежали к *spa*-типу t272, тогда как единственный изолят варианта 838 /324;295;219, выделенный от медицинского персонала, относится к *spa*-типу t284 (см. табл. 2).

Для определения MLST типа использовали по одному представителю каждого *spa*-типа, выявленного в исследовании. Результаты MLST типирования коррелируют с данными *spa*-типирования, причем для двух *spa*-типов – t10519 и t731 идентифицированные нами сиквенс-типы отсутствуют в базе данных на сервере saureus.mlst.net.

Изоляты, относящиеся к *coa*-ПЦР-ПДРФ вариантам с числом изолятов более одного (см. табл. 2), были охарактеризованы по широкому спектру генетических детерминант, ответственных за вирулентность *S. aureus*. Все изоляты отнесены к MSSA, поскольку при амплификации со специфическими праймерами у них не был обнаружен ген *mecA*, что подтверждало данные фенотипического исследо-

вания. Все изоляты показали устойчивость к бензилпенициллину и ко-тримоксазолу. Изоляты *spa*-типа t272 показали устойчивость к хлорамфениколу, а *spa*-типов t015, t349 и t10519 – к амикацину (табл. 3).

Как показали результаты комплексного исследования, все 14 изолятов от больных детей идентичны и представляют собой штамм, характеристики которого соответствуют специфическому варианту *S. aureus*. Идентифицированный нами штамм *S. aureus* t272 (ST121), вызвавший вспышку заболевания, содержит гены эксфолиативных токсинов *eta* и *etb* и ген *seo* – маркер кассеты энтеротоксиновых генов *egc*, локализованной на геномном острове vSAb [16]. Данный штамм несет четвертую аллель гена *agr* (*agr4*), регулирующего синтез белковых токсинов и ферментов *S. aureus* на уровне транскрипции. Аллель регуляторного гена *agr* тесно связана с типом инфекционного процесса, вызываемого *S. aureus*, причем вариант *agr4* преимущественно ассоциируется с сиквенс-типом ST121. Генетическая характеристика штамма включает следующие маркеры: t272, ST121, *agr4*, *eta*, *etb*, *seo*, *hemA*, *hemB*. Нуклеотидные последовательности генов *eta* и *etb* были полностью идентичны известным последовательностям гена *eta* (GenBank: M17347) и гена *etb* (GenBank: M17348).

Следует отметить, что изолят *coa*-ПЦР-ПДРФ варианта 838 /324;295;219, выделенный от медицинского персонала, представляет собой штамм *S. aureus* t284 (ST121), отличный от штамма, вызвавшего вспышку эксфолиативного дерматита. Его

Таблица 3. Молекулярно-генетическая характеристика изолятов *S. aureus* разных *spa*-типов, выделенных от здоровых носителей и от больных

| <i>Spa</i> -тип | <i>agr</i> -тип | Гены токсинов |               |            |            |            |             |             |            |            |            |            |
|-----------------|-----------------|---------------|---------------|------------|------------|------------|-------------|-------------|------------|------------|------------|------------|
|                 |                 | <i>pvl</i>    | <i>lukE-D</i> | <i>tst</i> | <i>eta</i> | <i>etb</i> | <i>hema</i> | <i>hemb</i> | <i>sea</i> | <i>seb</i> | <i>sec</i> | <i>seo</i> |
| t272            | 4               | –             | –             | –          | +          | +          | +           | +           | –          | –          | –          | +          |
| t284            | 4               | –             | +             | –          | –          | –          | +           | +           | –          | –          | –          | –          |
| t012            | 3               | +/-           | –             | +          | –          | –          | –           | +           | +          | –          | –          | –          |
| t002            | 2               | –             | +             | –          | –          | –          | +           | +           | +          | –          | –          | –          |
| t015            | 1               | –             | –             | –          | –          | –          | +           | –           | –          | –          | +          | –          |
| t10519          | 1               | –             | +             | –          | –          | –          | +           | –           | –          | –          | +          | –          |

**Примечание.** *agr*-тип – аллель гена, контролирующего экспрессию факторов вирулентности, *pvl* – лейкоцидин Пантон-Валентайна; *lukE-D* – лейкоцидины *lukE* и *lukD*; *tst* – токсин синдрома токсического шока; *eta* – эксфолиативный токсин А; *etb* – эксфолиативный токсин В; *hema* – гемолизин А, *hemb* – гемолизин В; *sea*, *seb*, *sec* – стафилококковые энтеротоксины А, В и С соответственно; *seo* – стафилококковый энтеротоксин, подобный О.

характеристика – t284, ST121, *agr4*, *hemA*, *hemB*, *lukE-D*, что позволяет утверждать отсутствие клональной связи между этим штаммом и штаммом, вызвавшим вспышку, на основании различий по пяти независимо наследуемым генетическим маркерам, таким как *spa*-тип, гены *eta*, *etb*, *seo* и *lukE-D*, причем три из них – гены *eta*, *etb* и *seo* относятся к основным детерминантам вирулентности для эпидемических линий золотистого стафилококка, связанных со стафилодермией.

Способность штаммов *S. aureus* продуцировать эксфолиативные токсины ЕТА и ЕТВ – основной признак патогена, который ассоциируется со стафилодермией. Эксфолиативные токсины селективно переваривают десмоглеин 1, одну из молекул десмосом – клеточных структур, ответственных за межклеточные адгезионные контакты в эпителии [18]. Большинство штаммов золотистого стафилококка, которые вызывают стафилодермию, кодируют либо ЕТА, либо ЕТВ. Эксфолиативные токсины ЕТА и ЕТВ серологически различны, причем гены данных токсинов имеют различную локализацию: *eta* кодируется геномом фага, а *etb* кодируется геномом большой трансмиссивной плазмиды. Для обоих токсинов используются близкие, но, тем не менее, различающиеся системы контроля продукции этих белков [19].

Показано, что штаммы *S. aureus*, вызывающие такую форму стафилодермии, как буллезное импетиго, чаще коррелируют с ЕТА, а штаммы, связанные с эксфолиативным дерматитом – с ЕТВ [5]. Анализ штаммов *S. aureus*, ответственных за стафилодермию в Японии и Китае, показал отсутствие в этих странах вариантов, кодирующих одновременно ЕТА и ЕТВ [20–22]. В то же время во Франции при анализе коллекции из 283 штаммов, ответственных за стафилодермию, комбинация

генов *eta-etb* встречается более чем в 50% случаев [5]. Аналогичные данные получены в независимом исследовании с другой коллекцией штаммов, связанных со стафилодермией во Франции [23]. Идентифицированный нами штамм *S. aureus* t272 (ST121) принадлежит к большому клональному кластеру *spa*CC159 ST121, который ответственен за 75% случаев эксфолиативного дерматита в Европе [5].

Изоляты, выделенные от медицинского персонала и посетителей, за исключением клона *S. aureus* t284 (ST121), относятся к 8 генетическим вариантам *S. aureus*, которые, по данным литературы, не выявляются среди штаммов, вызывающих эксфолиативный дерматит. Большинство изученных изолятов от носителей распределяется в три генетических варианта, которые относятся к известным клонам *S. aureus*: t002 (ST5), t012 (ST30) и t015 (ST45). Данные клоны характеризуются повышенной вирулентностью, высокой частотой горизонтального переноса *SCCmec*-кассет и генов токсинов. Именно эти клоны фактически являются предшественниками крупных клональных групп, в состав которых входят наиболее опасные эпидемические клоны *метициллинорезистентных штаммов S. aureus* (MRSA) и MSSA [24, 25]. Только для клональных типов ST5, ST30 и ST45 характерно наличие одновременно циркулирующих штаммов с различными типами *SCCmec*-кассет. Генетические линии, принадлежащие к клонам t002 (ST5) и t012 (ST30), часто несут ген лейкоцидина Пантона-Валентайна (*pvl*), причем это относится как к MRSA, так и MSSA. В нашем исследовании все выявленные изоляты t012 (ST30) несут ген токсина синдрома токсического шока *tst*, часть из них несёт также ген *pvl* (см. табл. 3).

Таким образом, выявленное в данном исследовании преобладание прототипов наиболее опасных эпидемических клонов золотистого стафилококка среди циркулирующих у медицинского персонала клиники штаммов *S. aureus*, указывает на необходимость систематических исследований по определению ведущих клональных типов *S. aureus* в клинических учреждениях различных регионов страны. Наличие таких данных позволит оценить возможное эпидемическое значение циркулирующих у медицинского персонала штаммов *S. aureus* и своевременно предпринимать меры к предотвращению возникновения стафилококковых инфекций в клинических учреждениях.

Результаты нашей работы подтверждают высокую разрешающую способность метода при анализе вспышек на местах. Быстрый и дешевый метод *coa*-ПЦР-ПДРФ анализа может быть полезен для выявления связи между изолятами *S. aureus*, выделенными от больных детей и от носителей (медицинского персонала), при локальной вспышке эксфолиативного дерматита. Данный метод позволяет резко сузить круг исследуемых изолятов в пределах нескольких часов. Дорогостоящие и затратные по времени методы *spa*-типирования и MLST обладают несомненной ценностью для эпидемиологического анализа, но, как показали наши исследования, эти методы фактически дублируют результаты *coa*-

ПЦР-ПДРФ анализа. Следует отметить, что при дифференциации штамма *S. aureus* t272 (ST121), вызвавшего вспышку эпидемического дерматита, и штамма *S. aureus* t284 (ST121), выделенного от медицинского персонала, ценность методов *coa*-ПЦР-ПДРФ и MLST оказалась идентичной, при несопоставимых требованиях к подготовке персонала, стоимости анализа и временным затратам на исследование.

### Заключение

При внутрибольничной вспышке эксфолиативного дерматита новорожденных выявлен высокоспецифичный для этой формы стафилодермии генетический вариант *S. aureus* t272 (ST121). Результаты анализа молекулярно-генетической структуры штамма *S. aureus* t272 (ST121) демонстрируют его клональное родство со штаммами, циркулирующими во Франции, и отличие от штаммов, циркулирующих в Японии и Китае. Представляется практически важным проведение дальнейших исследований по выявлению и анализу вызывающих стафилодермию штаммов в различных регионах страны, что позволит оценить эпидемическую обстановку по данной инфекции в РФ и соотнести ее с известными данными для других стран мира.

### Литература

1. Lowy F.D. *Staphylococcus aureus* infections. N Engl J Med 1998; 339(8):520-32.
2. Jarraud S., Mougel C., Thioulouse J., et al. Relationships between *Staphylococcus aureus* genetic background, virulence factors, agr groups(alleles), and human disease. Infect Immun 2002; 70(2):631-41.
3. Wehrhahn M.C., Robinson J.O., Pascoe E.M., et al. Illness severity in community-onset invasive *Staphylococcus aureus* infection and the presence of virulence genes. J Infect Dis 2012; 205(12):1840-8.
4. Monecke S., Slickers P., and Ehrlich R. Assignment of *Staphylococcus aureus* isolates to clonal complexes based on microarray analysis and pattern recognition. FEMS Immunol Med Microbiol 2008; 53(2):237-51.
5. Lamand V., Dauwalder O., Tristan A., et al. Epidemiological data of staphylococcal scalded skin syndrome in France from 1997 to 2007 and microbiological characteristics of *Staphylococcus aureus* associated strains. Clin Microbiol Infect 2012; 18(12):E514-21.
6. Wertheim H.F., Melles D.C., Vos M.C., et al. The role of nasal carriage in *Staphylococcus aureus* infections. Lancet Infect Dis 2005; 5(12):751-62.
7. МУК № 4.2.1890-04 Методические указания. Определение чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препаратам. М., 2004.
8. Hookey J.V., Richardson J.F., Cookson B.D. Molecular typing of *Staphylococcus aureus* based on PCR restriction fragment length polymorphism and DNA sequence analysis of the coagulase gene. J Clin Microbiol 1998; 36(4):1083-9.
9. Zhang K., Sparling J., Chow B.L., et al. New quadruplex PCR assay for detection of methicillin and mupirocin resistance and simultaneous discrimination of *Staphylococcus aureus* from coagulase-negative staphylococci. J Clin Microbiol 2004; 42(11):4947-55.
10. Schouls L.M., Spalburg E.C., van Luit M., et al. Multiple-locus variable number tandem repeat analysis of *Staphylococcus aureus*: comparison with pulsed-field gel electrophoresis and spa-typing. PLoS ONE 2009; 4(4):e5082.
11. 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.
12. Makgotlho P.E., Kock M.M., Hoosen A., et al. Molecular identification and genotyping of MRSA isolates. FEMS Immunol Med Microbiol 2009; 57(2):104-15.
13. Takano T., Higuchi W., Otsuka T., et al. Novel characteristics of community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains belonging to multilo-

- cus sequence type 59 in Taiwan. *Antimicrob Agents Chemother* 2008; 52(3):837-45.
14. Fei W., Hongjun Y., Hong-bin H., et al. Study on the hemolysin phenotype and the genotype distribution of *Staphylococcus aureus* caused bovine mastitis in Shandong dairy farms. *Intern J Appl Res Vet Med* 2011; 9(4):416-21.
  15. Mehrotra M., Wang G., Johnson W.M. Multiplex PCR for detection of genes for *Staphylococcus aureus* enterotoxins, exfoliative toxins, toxic shock syndrome toxin 1, and methicillin resistance. *J Clin Microbiol* 2000; 38(3):1032-35.
  16. Xie Y., He Y., Gehring A., et al. Genotypes and toxin gene profiles of *Staphylococcus aureus* clinical isolates from China. *PLoS One* 2011; 6(12): e28276.
  17. Okuma K., Iwakawa K., Turnidge J.D., et al. Dissemination of new methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clones in the community. *J Clin Microbiol* 2002; 40(11):4289-94.
  18. Nishifuji K., Sugai M., Amagai M. Staphylococcal exfoliative toxins: «molecular scissors» of bacteria that attack the cutaneous defense barrier in mammals. *J Dermatol Sci* 2008; 49(1):21-31.
  19. Kato F., Kadomoto N., Iwamoto Y., Bunai K., Komatsuzawa H., Sugai M. Regulatory mechanism for exfoliative toxin production in *Staphylococcus aureus*. *Infect Immun* 2011; 79(4):1660-70.
  20. Nakaminami H., Noguchi N., Ikeda M., et al. Molecular epidemiology and antimicrobial susceptibilities of 273 exfoliative toxin-encoding-gene-positive *Staphylococcus aureus* isolates from patients with impetigo in Japan. *J Med Microbiol* 2008; 57(Pt 10):1251-8.
  21. Yamaguchi T., Yokota Y., Terajima J., et al. Clonal association of *Staphylococcus aureus* causing bullous impetigo and the emergence of new methicillin-resistant clonal groups in Kansai district in Japan. *J Infect Dis* 2002; 185(10):1511-6.
  22. Shi D., Higuchi W., Takano T., et al. Bullous impetigo in children infected with methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* alone or in combination with methicillin-susceptible *S. aureus*: analysis of genetic characteristics, including assessment of exfoliative toxin gene carriage. *J Clin Microbiol* 2011; 49(5):1972-74.
  23. Yamasaki O., Yamaguchi T., Sugai M., et al. Clinical manifestations of staphylococcal scalded-skin syndrome depend on serotypes of exfoliative toxins. *J Clin Microbiol* 2005; 43(4):1890-3.
  24. Enright M.C., Robinson D.A., Randle G., Feil E.J., Grundmann H., Spratt B.G. The evolutionary history of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*(MRSA). *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002; 99(11):7687-92.
  25. Gomes A.R., Westh H., de Lencastre H. Origins and evolution of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clonal lineages. *Antimicrob Agents Chemother* 2006; 50(10):3237-44.