

Межрегиональная ассоциация по клинической микробиологии и антимикробной химиотерапии

Научно-исследовательский институт антимикробной химиотерапии ФГБОУ ВО СГМУ Минздрава России

Учредитель

Межрегиональная ассоциация по клинической микробиологии и антимикробной химиотерапии

Издатель

Межрегиональная ассоциация по клинической микробиологии и антимикробной химиотерапии

www.iacmac.ru

Журнал зарегистрирован Комитетом РФ по печати 30.09.1999 г. (№019273) Тираж 3000 экз.

Подписка на сайте издателя
<https://service.iacmac.ru>

Адрес для корреспонденции
 214019, г. Смоленск, а/я 5.
 Тел./факс: (4812)45 06 02

Электронная почта:
info@cmac-journal.ru

Электронная версия журнала:
<https://cmac-journal.ru>

Журнал входит в Перечень рецензируемых научных изданий, в которых должны быть опубликованы основные научные результаты диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук, на соискание ученой степени доктора наук

Присланные в редакцию статьи проходят рецензирование

Мнение редакции может не совпадать с точкой зрения авторов публикуемых материалов

Ответственность за достоверность рекламных публикаций несут рекламодатели

При перепечатке ссылка на журнал обязательна

Журнал является научным изданием для врачей, в связи с чем на него не распространяются требования Федерального закона от 29.12.2010 436-ФЗ «О защите детей от информации, причиняющей вред их здоровью и развитию»

© Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия, 2023.

Содержание

Болезни и возбудители

- Гостев В.В., Сулян О.С., Павлова П.А., Нестерова Е.В., Калиногорская О.С., Чулкова П.С., Трофимова Н.Н., Агеевец В.А., Агеевец И.В., Сидоренко С.В.
- 116** Геномная характеристика *mecA*-положительных *Staphylococcus aureus* ST59, проявляющих чувствительность к оксациллину
- Носов Н.Ю., Образцова О.А., Катунин Г.Л., Плахова К.И., Соломка В.С.
- 123** Филогенез и антибиотикорезистентность *Treponema pallidum* subsp. *pallidum*
- Сацук А.В., Солопова Г.Г., Плоскирева А.А., Акимкин В.Г.
- 131** Систематический обзор серопревалентности маркеров гепатита В, С и ВИЧ среди пациентов онкогематологического профиля
- Тряпышко А.А., Дехнич Н.Н.
- 142** Комбинация гастропротекторов и пробиотиков в эрадикации инфекции *H. pylori*: результаты рандомизированного сравнительного клинического исследования

Антимикробные препараты

- Белькова Ю.А., Рачина С.А., Козлов Р.С., Кулешов В.Г., Васильева И.С., Куркова А.А., Бочанова Е.Н., Елохина Е.В., Попов Д.А., Портнягина У.С., Решетько О.В., Сычев И.Н., Шегимова В.Д., Дрогашевская Д.В., Чеснокова М.С. и российская рабочая группа проекта Global PPS
- 150** Одномоментное многоцентровое исследование использования антимикробных препаратов в российских стационарах: результаты проекта Global-PPS 2021
- Клабукова Д.Л., Титова А.Р., Крысанов И.С., Поливанов В.А., Крысанова В.С., Ермакова В.Ю.
- 159** Анализ летальных случаев при применении цефтриаксона по данным национальной базы спонтанных сообщений
- Ортенберг Э.А.
- 165** Перспективные антимикотики для терапии инвазивных грибковых инфекций (краткий обзор литературы)
- Петрушин М.А., Мельниченко П.И., Власов П.А., Никифоров И.С., Кудряшова Е.А., Глущенко И.А.
- 171** Особенности проведения антибактериальной терапии у пациентов с тяжелой дыхательной недостаточностью, получающих вено-венозную экстракорпоральную мембранную оксигенацию (ЭКМО)

Антибиотикорезистентность

- Виноградова А.Г., Кузьменков А.Ю., Трушин И.В., Сухорукова М.В., Козлов Р.С.
- 179** Системная оценка результатов определения чувствительности микроорганизмов к антимикробным препаратам в медицинских организациях Российской Федерации
- Бочарова Ю.А., Савинова Т.А., Чеботарь И.В.
- 187** Хромосомные гены *ESKAPE*-патогенов, мутации в которых индуцируют антибиотикорезистентность

Опыт работы

- Попов Д.А., Осокина Р.А., Вострикова Т.Ю.
- 202** Носительство *K. pneumoniae* и молекулярная структура продуцируемых ими карбапенемаз у детей первого года жизни с врожденными пороками сердца
- Кондратенко О.В., Зубова К.В.
- 211** Распределение значений минимальных подавляющих концентраций антибактериальных препаратов в отношении представителей порядка *Flavobacteriales*, выделенных из респираторных образцов от пациентов с муковисцидозом в Российской Федерации

Геномная характеристика *mecA*-положительных *Staphylococcus aureus* ST59, проявляющих чувствительность к оксациллину

Гостев В.В.^{1,2}, Сулян О.С.¹, Павлова П.А.^{1,3}, Нестерова Е.В.⁴, Калиногорская О.С.¹, Чулкова П.С.¹, Трофимова Н.Н.⁴, Агеевец В.А.¹, Агеевец И.В.¹, Сидоренко С.В.^{1,2}

¹ ФГБУ «Детский научно-клинический центр инфекционных болезней» ФМБА России, Санкт-Петербург, Россия

² ФГБОУ ВО «Северо-Западный государственный медицинский университет им. И.И. Мечникова» Минздрава России, Санкт-Петербург, Россия

³ ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный университет», Санкт-Петербург, Россия

⁴ СПб ГБУЗ «Городской кожно-венерологический диспансер», Санкт-Петербург, Россия

Контактный адрес:

Владимир Валерьевич Гостев
Эл. почта: gvestv11@gmail.com

Ключевые слова: оксациллин, цефокситин, MRSA, ST59, геномная эпидемиология.

Конфликт интересов: авторы заявляют об отсутствии конфликтов интересов.

Внешнее финансирование: исследование проведено без внешнего финансирования.

Цель. Провести геномную характеристику представителей *mecA*-положительных оксациллиночувствительных *Staphylococcus aureus* ST59, выделенных в Санкт-Петербурге.

Материалы и методы. В работу включены девять *mecA*-положительных оксациллиночувствительных изолятов *S. aureus* (OS-MRSA), относящихся к сиквенс-типу ST59. Изоляты были выделены в Санкт-Петербурге в 2018–2019 гг. у детей без признаков стафилококковых инфекций при скрининге на носительство *S. aureus*. Один изолят был выделен у взрослого пациента с инфекцией кожи и мягких тканей (ИКМТ). Проведена оценка чувствительности к антибиотикам и полногеномное секвенирование. Для сравнительной геномной эпидемиологии в работу включены 242 генома *S. aureus* ST59 из публичных репозиториях.

Результаты. Изоляты характеризовались фенотипической чувствительностью к оксациллину, определенной методом серийных разведений и с помощью системы VITEK. Диапазон значений диаметров зон ингибирования вокруг дисков с цефокситином составлял 17–22 мм. Изоляты имели МПК $\leq 0,5$ мкг/мл к пенициллину/клавуланату. *S. aureus*, выделенные от носителей, имели генотип ST59-t1950-SCCmec Vb (*seb+*); изолят, выделенный при ИКМТ, имел генотип ST59-t437-SCCmec Vb (*seb/lukF/lukS+*). Все изоляты имели мутации в промоторе *mecA* в положении -33 (C/T) и мутации в PBP2a (S225R + E246G). На основе филогенетического анализа и Байесовской кластеризации вся выборка геномов ST59 была разделена на четыре кластера; все российские геномы относились к Восточно-Азиатской сублинии ST59, для которой характерно наличие токсина PVL. Парные сравнения нуклеотидных замен между геномами российских изолятов показали высокую степень идентичности: медиана 13, межквартильный интервал 8 – 18 замен. Наличие энтеротоксина В, а также мутаций в промоторных областях гена *mecA* (-7 G/A или -33 C/T) и мутаций в PBP2a (S225R и E246G) являлись отличительной особенностью всех кластеров ST59, при этом для российских изолятов была характерна промоторная мутация только в положении -33. Геномы российских изолятов отличались от глобально циркулирующих ST59 уникальными мутациями в следующих локусах (относительно референс-генома *S. aureus* M013TW): регуляторе катаболизма лактозы RS03495 (N168D); рибосомальном белке L28 (V47A); предположительной глиоксалазе RS07825 (V42A); гипотетическом белке RS13235 (K32E).

Выводы. Российские изоляты MRSA-ST59 относятся к Восточно-Азиатской сублинии и характеризуются наличием гена энтеротоксина В. Отличительной фенотипической особенностью MRSA-ST59 является чувствительность к оксациллину и пограничная устойчивость к цефокситину. Для OS-MRSA фенотипов существует риск неправильной оценки чувствительности и, как следствие, назначение неадекватной антибактериальной терапии. Выявление гена *mecA* является наиболее точным методом для дифференциации MSSA и MRSA.

Original Article

Genomic characterization of oxacillin-susceptible *mecA*-positive *Staphylococcus aureus* ST59

Gostev V.V.^{1,2}, Sulian O.S.¹, Pavlova P.A.^{1,3}, Nesterova E.V.⁴, Kalinogorskaya O.S.¹, Chulkova P.S.¹, Trofimova N.N.⁴, Ageevets V.A.¹, Ageevets I.V.¹, Sidorenko S.V.^{1,2}

¹ Children Scientific Clinical Center of Infectious Diseases, Saint-Petersburg, Russia

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

³ Saint-Petersburg State University, Saint-Petersburg, Russia

⁴ City Skin and Venereal Diseases Dispensary, Saint-Petersburg, Russia

Гостев В.В. и соавт.

Contacts:
Vladimir V. Gostev
E-mail: guestvv11@gmail.com

Key words: oxacillin, ceftiofloxacin,
MRSA, ST59, molecular
epidemiology.

Conflicts of interest: all authors report no
conflicts of interest relevant to this article.

External funding source: no external funding
received.

Objective. To characterize the genomes of oxacillin-susceptible *mecA*-positive *Staphylococcus aureus* ST59 isolated in St. Petersburg.

Materials and methods. Nine oxacillin-susceptible *mecA*-positive of *S. aureus* isolates (OS-MRSA) of ST59 were included in the study. The isolates were obtained from children who showed no clinical signs of staphylococcal infections during nasal screening of *S. aureus* in St. Petersburg in 2018–2019. One isolate was obtained from an adult patient with skin and soft tissue infection (SSTI). The susceptibility to antibiotics and whole genome sequencing were performed. The analysis included 242 genomes of *S. aureus* ST59 from open access databases.

Results. By employing the broth serial dilution and VITEK, the isolates' phenotypic susceptibility to oxacillin was determined. The ceftiofloxacin inhibition zones ranged from 17 to 22 mm. All isolates showed a penicillin-clavulanate MIC ≤ 0.5 $\mu\text{g/mL}$. Isolates obtained from carriers belonged to the ST59-t1950-SCC*mec* Vb (*seb*+) genotype whereas the isolate obtained from SSTI belonged to the ST59-t437-SCC*mec* Vb (*seb*/*lukF*/*lukS*+) genotype. Nucleotide position -33 (C/T) of *mecA* promoter and mutations in PBP2a (S225R + E246G) were present in all isolates. Based on phylogenetic analysis and Bayesian clustering the ST59 genomes were divided into four clusters and all Russian genomes belonged to the East Asian ST59 sublineage. The PVL toxin was present in the genomes of the first cluster of the East Asian ST59 sublineage. Pairwise comparisons of nucleotide substitutions among the genomes of Russian isolates showed a high similarity: median 13, interquartile range 8–18. All ST59 clusters were characterized by the presence of enterotoxin B, as well as mutations in PBP2a (S225R and E246G) and the promoter regions of the *mecA* gene (-7 G/A or -33 C/T). The genomes of the Russian isolates differed from the globally spread ST59 by specific mutations at the following loci (relative to the reference genome of *S. aureus* M013TW): lactose catabolism regulator RS03495 (N168D), ribosomal protein L28 (V47A), putative glyoxalase RS07825 (V42A), and the hypothetical protein RS13235 (K32E).

Conclusions. Russian MRSA-ST59 isolates belong to the East Asian sublineage and are characterized by the presence of the enterotoxin B gene. Oxacillin susceptibility and borderline resistance to ceftiofloxacin are specific characteristics of MRSA-ST59. OS-MRSA phenotypes have a risk of improper sensitivity testing leading to ineffective antibiotic treatment. Detection of *mecA* gene is the most accurate method for differentiating between MSSA and MRSA.

Введение

Метициллинорезистентные *Staphylococcus aureus* (Methicillin-resistant *S. aureus*, MRSA) являются важными возбудителями как внутрибольничных, так и внебольничных инфекций во всем мире и ассоциированы с множественной устойчивостью к антибиотикам и высокой летальностью [1, 2]. MRSA проявляют устойчивость ко всем бета-лактамам антибиотикам, кроме анти-MRSA цефемов, за счет наличия гена *mecA* (или его аллелей: *mecC*, *mecB*). Однако экспрессия гена *mecA* зависит от множества факторов, и не всегда обуславливает высокие значения минимальных подавляющих концентраций (МПК) бета-лактамов антибиотиков. *mecA*-положительные *S. aureus*, проявляющие чувствительность к оксациллину и иногда к цефокситину (Oxacillin-susceptible MRSA, OS-MRSA), впервые были описаны в конце 1990-х гг. [3]. На сегодняшний день они встречаются во многих странах мира и чаще всего ассоциированы с определенными сиквенс-типами (ST), в частности с ST59 [4, 5]. Главная опасность таких фенотипов – это возможная некорректная оценка чувствительности к антибиотикам и, как следствие, назначение неадекватной антибактериальной терапии [6]. Чувствительность OS-MRSA к оксациллину (и возможно другим бета-лактамам) обусловлена несколькими основными механизмами. Это мутации в промоторе гена *mecA*, влияющие на снижение его экспрессии, или появление мутаций и стоп-кодонов в самом PBP2a. В последнем случае мо-

жет повышаться аффинность PBP2a к антибиотикам или же наблюдаться полное отсутствие экспрессии белка [7]. Другой механизм заключается в появлении мутаций в дополнительных факторах основного генома, регулирующих экспрессию гена *mecA* [8, 9]. Отмечается также, что мутации в промоторе *mecA* связаны с появлением необычной чувствительности MRSA к комбинации пенициллина и клавуланата [10]. Сиквенс-тип ST59 является превалирующим клоном MRSA, циркулирующим в Восточной, Юго-Восточной Азии, и ассоциирован как с внебольничными, так и внутрибольничными инфекциями. В Восточной Азии MRSA-ST59 является основным возбудителем стафилококковых инфекций кожи и мягких тканей [11, 12]. В Тайване на долю внебольничных инфекций у детей, вызванных MRSA-ST59, приходится около 56% [13], также ежегодно отмечается рост числа таких инфекций и в Китае [14]. Клон MRSA-ST59 также может вызывать тяжелые инвазивные инфекции, поскольку часто ассоциирован с наличием лейкоцидина Пантон-Валентайна (PVL) [15]. Несмотря на эндемичность, MRSA-ST59 спорадически выявляется в Северной Америке и Европе [16, 17]. На территории России клоны ST59-MRSA ранее не описывались. В этой связи целью настоящего исследования стала геномная характеристика представителей *mecA*-положительных оксациллиночувствительных ST59, выделенных в Санкт-Петербурге.

Материалы и методы

Бактериальные изоляты и оценка чувствительности к антибиотикам

В работу включены девять *mecA*-положительных изолятов *S. aureus*, проявляющих чувствительность к оксациллину из коллекции бактериальных культур ДНКЦИБ ФМБА России, собранные в Санкт-Петербурге в 2018–2019 гг. Все изоляты, включенные в исследование, были типированы по схеме MLST (Multilocus sequence typing) и относились к ST59. Оценка чувствительности к антибиотикам проводили с помощью диско-диффузионного метода (ДДМ), серийных разведений в бульоне, а также с использованием системы VITEK®2 compact с картами AST-GP67 (bioMérieux, Франция).

Полногеномное секвенирование

Геномную ДНК выделяли с помощью набора DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen™, Германия) с предварительным лизисом клеток в буфере, содержащем 5 мг/мл лизостафина (Sigma-Aldrich, США) и 50 мг/мл лизоцима (Amresco, США). Для подготовки ДНК-библиотеки использовался набор DNA Prep (Illumina, США) в соответствии с протоколом производителя. ДНК-библиотеки секвенировали на приборе MiSeq (Illumina, США) с получением парных ДНК-прочтений длиной 300 п.н. Первичные данные секвенирования депонированы в архив ДНК прочтений NCBI Sequence Read Archive (SRA) и доступны в проекте BioProject PRJNA872007.

Биоинформатический анализ

Сборку геномов *de novo* осуществляли в SPAdes [18]. В работу были включены геномы из других источников: геномы ST59 из NCBI GenBank ($n = 96$); геномы изолятов MRSA-ST59, проявляющие чувствительность к пенициллину/клавуланату из работы Harrison E. и соавт. ($n = 16$) [10]; геномы из работ по глобальной геномной эпидемиологии ST59 Ward M. и соавт. ($n = 93$) [16] и McClure J. и соавт. ($n = 37$) [17]. В тех случаях, когда данные секвенирования были представлены только ДНК ридами, геномы собирались *de novo*. Для всей выборки геномов *in silico* проверяли принадлежность к ST59 по стандартной схеме MLST и *spa*-типам, соответственно с помощью скриптов *mlst* (<https://github.com/tseemann/mlst>) и *spaTyper* (<https://github.com/HCGB-IGTP/spaTyper>). Из работы были исключены геномы с одно- и двухлокусными вариантами сиквенс-типа ST59. Также из анализа были исключены геномы с неудовлетворительным качеством сборок (при N50 менее 10К п.н. и при количестве контигов более 500 на геном). Для типирования *in silico* генов резистентности, стафилококковых *mec*-кассет SCC*mec*, генов вирулентности, использовали скрипт *abricate* (<https://github.com/tseemann/abricate>) с установленными базами данных ResFinder, SCC*mec* Finder (<https://www.genomicepidemiology.org/services/>), VFDB [19] соответственно. Для поиска мутаций в локусах интереса использовали локальный BLAST с использованием скрипта *ridiculus* (<https://github.com/dariader/Riddikulus>). Филогенетический анализ проводили с по-

мощью *snippy* (<https://github.com/tseemann/snippy>) и IQ-Tree [20] с автоматическим выбором оптимальной модели построения дерева. В качестве референс-генома использовали *S. aureus* M013 (CP003166.1). Полученное нуклеотидное выравнивание также использовали для Байесовской кластеризации с помощью *rhierbaps* [21]. Множественные попарные нуклеотидные сравнения проводили с помощью скрипта *pairwise_snp_differences* (https://github.com/MDU-PHL/pairwise_snp_differences). Вывод программы *snippy* использовали для поиска уникальных мутаций и уникальных локусов, в которых были обнаружены мутации. Аннотацию нуклеотидных замен относительно референс-генома осуществляли с помощью SNPeff [22]. Аннотацию и визуализацию филогенетического дерева проводили в iTOL [23].

Результаты

Анализ фенотипов и генотипов ST59

Восемь *mecA*-положительных изолятов *S. aureus* (*spa*-типа t1950, *seb*+) были выделены из носоглотки у детей без признаков стафилококковых инфекций при рутинном скрининге на носительство золотистого стафилококка в амбулаторно-поликлиническом отделении ДНКЦИБ. Изолят SA1155 (*mecA*+, *seb*+, *lukFS*+, *spa*-тип t437) был выделен у взрослого пациента с инфекцией кожи и мягких тканей в дерматологическом отделении специализированного стационара. Все изоляты характеризовались фенотипической чувствительностью к оксациллину, определенной методом серийных разведений и с помощью системы VITEK (Таблица 1). Разброс значений диаметра зон ингибирования роста вокруг дисков с цефокситином составлял 17–22 мм. При использовании системы VITEK, на основе результатов чувствительности к цефокситину, все изоляты были определены как устойчивые. Все изоляты характеризовались чувствительностью к не бета-лактамам антибиотикам: фторхинолонам, рифампицину, гликопептидам, мупироцину, триметоприму/сульфаметоксазолу, фузидиевой кислоте. Устойчивость была выявлена к эритромицину и клиндамицину (типирована метилаза *ermB*), гентамицину (*ant(6)-Ia_1*, *aph(3')-III_1*). Устойчивость к тетрациклину выявлена у одного изолята SA1155 (*tetK*). Два из девяти изолятов были *blaZ*-отрицательными. Изоляты характеризовались низкими значениями МПК комбинации пенициллина с клавуланатом, с МПК $\leq 0,5$ мкг/мл. Интактный вариант стафилококковой кассеты SCC*mec* Vb (5C2) был типирован во всех образцах.

Глобальный анализ ST59

После выравнивания геномов был получен конкатенат нуклеотидных замен ядерной части геномов (core-SNP) длиной 13247 нуклеотидов. На основе филогенетического анализа и Байесовской кластеризации вся выборка геномов ST59 была разделена на четыре кластера, VAPS 1 – 4 (Рисунок 1). Каждый кластер характеризовался определенными генотипическими особенностями (Таблица 2). Все российские изоляты были в

Таблица 1. Характеристика изолятов MRSA ST59-SCC_{mec} Vb

Изолят	Источник	spa-тип	seb	PVL	МПК, мкг/мл		ДДМ, мм		VITEK, мкг/мл	
					ОХА	FOX	ОХА*	FOX	ОХА	FOX
SA1111	Носитель	t1950	+	-	< 0,5 (S)	8	15 (S)	17 (R)	0,25	R
SA1129	Носитель	t1950	+	-	2 (S)	16	14 (S)	18 (R)	1	R
SA1130	Носитель	t1950	+	-	2 (S)	16	16 (S)	19 (R)	1	R
SA1155	ИКМТ	t437	+	+	2 (S)	16	21 (S)	22 (S)	2	R
SA1158	Носитель	t1950	+	-	< 0,5 (S)	16	16 (S)	19 (R)	1	R
SA1159	Носитель	t1950	+	-	< 0,5 (S)	16	16 (S)	17 (R)	1	R
SA1161	Носитель	t1950	+	-	2 (S)	32	15 (S)	18 (R)	1	R
SA1223	Носитель	t1950	+	-	< 0,5 (S)	8	13 (S)	19 (R)	2	R
SA1261	Носитель	t1950	+	-	< 0,5 (S)	8	13 (S)	21 (R)	1	R

ДДМ - диско-диффузионный метод; ИКМТ - инфекции кожи и мягких тканей.

* Для оксациллина пограничное значение считали как S > 10 мм.

составе кластера BAPS 1, куда также входили изоляты из Тайваня, Китая и Европы. Используя результаты предыдущих классификаций [16, 17], российские геномы относились к Восточно-Азиатской линии, которая представлена современными геномами, расчетное время происхождения которых датируется 1987 годом [17]. Для большинства ST59 (87%) было характерно наличие энтеротоксина В (*seb*), у 80% геномов, входящих

в состав кластера BAPS 1, был выявлен токсин PVL. У 70% *mecA*-положительных геномов были выявлены мутации в промоторе гена *mecA* в сочетании с аминокислотными заменами в PBP2a. Преимущественно это были комбинации замен -7G/A + E246G (по классификации Harrison E. и соавт. [10] категория Чувствительные-2) или -33C/T + E246G + S225R (категория Чувствительные-3).

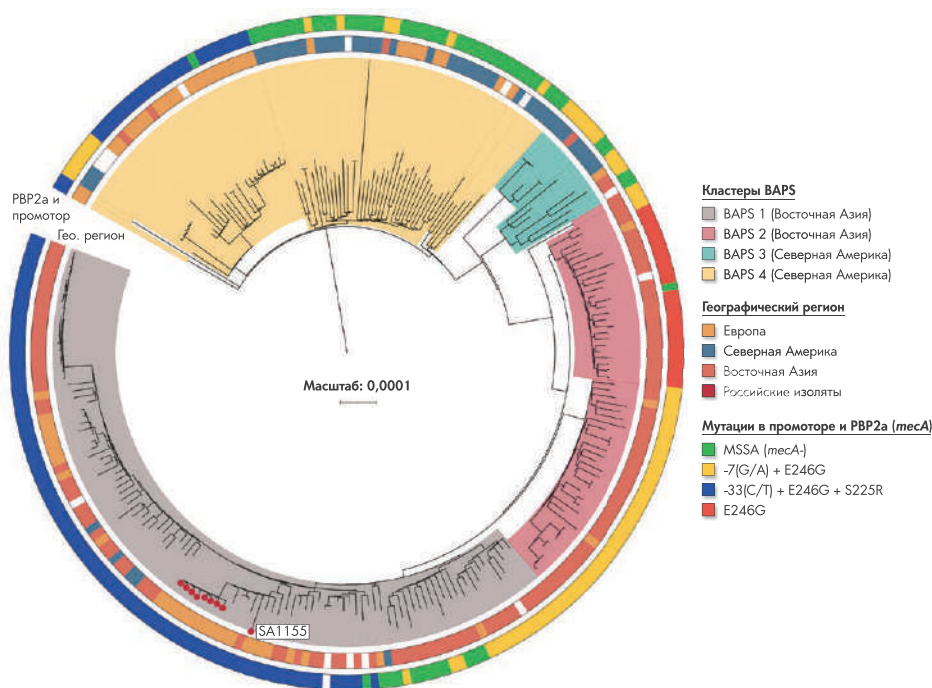


Рисунок 1. Филогенетическое дерево геномов ST59 (n = 251), построенное на основе выравнивания core-SNP с использованием расчетов максимального правдоподобия и Байесовской кластеризации. В качестве референс-генома использован *S. aureus* M013 (CP003166.1). В рамке отмечен изолят SA1155. Аннотация дерева, включающая BAPS-кластеры, географию и мутации в промоторе и PBP2a, представлена на рисунке.

Таблица 2. Особенности разных геномных кластеров глобально циркулирующих субклонов ST59

Свойство	Кластеры			
	BAPS 1	BAPS 2	BAPS 3	BAPS 4
Российские изоляты	+	-	-	-
SCC _{mecA}	Vb	IVa, IVg	IVa	IVd, V
spa-типы*	t441, t437, t1950	t441, t437	t163, t172	t216, t316
География распространения	Китай, Тайвань, Европа	Китай, Тайвань	США, Канада	США, Великобритания, Европа
Чувствительность MRSA к PEN/CLV [10]**	Чувствительные-3, Чувствительные-2	Чувствительные-2, Устойчивые-2	Чувствительные-2	Чувствительные-2, Чувствительные-3
Кластеры по McClure J. и соавт. [17], расчетное время появления, год	Восточно-Азиатская сублиния 1987	Восточно-Азиатская сублиния 1981	Северо-Американская сублиния 1954	Северо-Американская сублиния 1957
Гены резистентности*	<i>ant(6)-Ia_1, aph(3')-III_1, ermB, blaZ, tetK</i>	<i>ant(6)-Ia_1, aph(3')-III_1, ermB, blaZ, tetK</i>	<i>blaZ, mphC, msrA, tetK</i>	<i>blaZ</i>
Гены вирулентности*	<i>lukFS, seb, chp, scn, selk, selq</i>	<i>seb, sak, chp, scn, selk, selq</i>	<i>seb, sak, chp, scn, selk, selq</i>	<i>seb, sak, chp, scn, selk, selq</i>

* Отмечены наиболее представленные варианты, встречающиеся у более чем 75% геномов.

** Генотипы чувствительности к пенициллину/клавуланату (PEN/CLV): Чувствительные-2 (*mecA*(-7G/A) + E246G); Чувствительные-3 (*mecA*(-33C/T) + E246G + S225R); Устойчивые-2 (E246G).

Особенности российских изолятов ST59

Все изоляты имели мутацию С/Т в промоторе *mecA* в положении -33, а также мутации в самом PBP2a: S225R и E246G. Парные сравнения нуклеотидных замен между геномами российских изолятов показали высокую степень идентичности, которая составила (медиана, межквартильный интервал): 13 (8–18) замен. При сравнении российских геномов и геномов, входящих в состав кластера BAPS-1 количество замен составляло 142 (120–157). Парные сравнения нуклеотидных замен между геномами разных кластеров выявили относительно невысокую гетерогенность при медиане 442 (279–1003) замен. Геномы российских изолятов отличались от других, глобально распространенных ST59, наличием уникальных, характерных только для российских изолятов, мутаций в ядерном геноме. Для всех изолятов (кроме SA1155) было выявлено 34 core-SNP (относительно референс-генома), которые включали 20 миссенс-мутаций, 12 синонимичных и 2 мутации в межгенных областях. Значимые миссенс-мутации были выявлены в 20 различных генах, участвующих в различных метаболических путях микробной клетки, включая биосинтез различных аминокислот, витаминов и кофакторов, секреторной системе VII-типа, генах гликолиза и цикла Кребса. Геном изолята SA1155 (ST59-t437, PVL+) отличался по core-SNP, как от глобально представленных геномов, так и от российских геномов. Так, было выявлено 72 уникальные мутации, включающие 44 миссенс-мутации, 3 стоп-кодона, остальные представлены синонимическими и межгенными core-SNP. Стоп-кодона были выявлены в следующих генах: гене M013TW_RS00585, содержащем домен биосинтеза O-антигена; гене мембранного экспорта сульфитов (M013TW_RS04335); гене сульфотрансферазы (M013TW_RS10290). Миссенс-мутации были обнаружены в различных системах клетки, вклю-

чая профаговые области, регуляторные элементы, рибосомальные белки и различные транспортные системы. Геномные локусы и гены, в которых были обнаружены мутации, различались в группе российских изолятов между ST59-t1950 и ST59-t437. Исключением был ген M013TW_RS05840, кодирующий большую субъединицу карбамоилфосфатсинтетазы, участвующей в метаболизме пиримидинов. Мутации в этом гене обнаружены у всех российских изолятов ST59. Локусы и мутации с наибольшей дифференцирующей силой, которые уникальны только для российских изолятов, представлены в Таблице 3.

Обсуждение

Изоляты MRSA-ST59, выявленные в Санкт-Петербурге, характеризовались чувствительностью к оксациллину, и один изолят, выделенный у пациента с ИКМТ, характеризовался чувствительностью к цефокситину. Методы, основанные на серийных разведениях с цефокситином, демонстрировали наибольшую специфичность для фенотипической детекции OS-MRSA. Все изоляты MRSA-ST59 проявляли чувствительность к комбинации пенициллина и клавуланата за счет мутаций в промоторе *mecA* и PBP2a. При этом клавуланат выступает как ингибитор пенициллиназы у *blaZ*-положительных *S. aureus*. Связь мутаций в промоторе и PBP2a с чувствительностью к пенициллину/клавуланату была ранее описана в работе Harrison E. и соавт. [10]. Автор выделяет четыре генотипа в зависимости от комбинаций мутаций, которые ассоциированы с чувствительностью к пенициллину/клавуланату. При этом только промоторные мутации в положениях -7 (чувствительные-2) или -33 (чувствительные-3) играют ключевую роль в чувствительности. Очевидно, что существует связь между

Таблица 3. Уникальные генетические маркеры, характерные только для российских изолятов MRSA-ST59

Изоляты	Локус *, ген	Мутация	Белок	Функция
Все ST59	M013TW_RS03495, glpR	N168D (A502G)	Предположительный регулятор	Предположительно катаболизм лактозы
SA1155	M013TW_RS05945	V47A (T140C)	50S структурный рибосомальный белок L28	Биосинтез белка
	M013TW_RS07825	V42A (T125C)	Предположительная глиоксалаза	Предположительно детоксикация альдегидов
	M013TW_RS13235	K32E (A94G)	Гипотетический протеин семейства DUF2316	Неизвестно

* Локус в референс-геноме *S. aureus* M013 (CP003166.1).

чувствительностью к пенициллину/клавуланату и чувствительностью к оксациллину у *mesA*-положительных *S. aureus* за счет одного механизма, связанного с низкой экспрессией *mesA* [3]. Ввиду того, что существует риск пропустить такие фенотипы даже с помощью скрининга с диском, содержащим цефокситин, предпочтительным методом детекции метициллинорезистентности является детекция гена *mesA* в ПЦР. Целесообразно использовать ПЦР в сомнительных случаях, когда исследуемый изолят имеет пограничные значения зоны ингибирования роста в ДДМ с цефокситином. Анализ доступных геномов MRSA-ST59, проведенный в этом исследовании, показал, что подавляющее большинство геномов характеризуется наличием мутаций в промоторных областях, и по всей видимости, фенотип OS-MRSA является особенностью данного клона. В более ранних работах [14] ST59 был разделен на два субкластера, – высоковирулентный PVL-положительный «Тайваньский клон», вызывающий тяжелые инфекции и Азиатско-Тихоокеанский клон, менее вирулентный и встречающийся преимущественно у носителей. Современные данные показывают, что ST59 разделяется на две большие группы, это Восточно-Азиатская и Северо-Американская сублинии. При этом с точки зрения эволюции и молекулярной эпидемиологии архаичным вариантом является Северо-Американская сублиния, которая дивергировала в середине прошлого столетия [16]. Для этой сублинии характерно отсутствие токсина PVL и мобильных генетических элементов. Восточно-Азиатская сублиния, получившая наибольшее распространение в Азии, является потомком и характеризуется, напротив, наличием различных мобильных генетических элементов с генами устойчивости и профагов, где локализованы гены токсина PVL. Российские изоляты относились Восточно-Азиатской сублинии, характеризовались высокой нуклеотидной идентичностью, несмотря на отсутствие эпидемиологической связи между изолятами. По всем фенотипическим свойствам (прежде всего чувствительность к не

бета-лактамам антибиотикам) российские изоляты могут быть отнесены к внебольничным MRSA. Один PVL-положительный изолят был выделен у пациента со стафилококковой инфекцией в условиях стационара. По результатам разных исследований, клон ST59 часто колонизирует и вызывает инфекции у детей, в настоящей работе восемь из девяти изолятов были выделены у детей. Полученные данные свидетельствуют о циркуляции в человеческой популяции в России еще одного преобладающего клона – MRSA-ST59, ранее нами был описан «Газа клон» ST22, доминирующий среди здоровых носителей [24]. Очевидна необходимость проведения дополнительных исследований и мониторинг за циркуляцией и изменчивостью клонов MRSA (в частности PVL-или TSST-положительных) в человеческой популяции. Выявленные уникальные генетические маркеры, отличающие российские геномы от остальных представителей ST59, могут быть использованы в молекулярно-эпидемиологическом мониторинге для дифференциации от других сублиний при анализе возможного импорта *S. aureus* ST59 из других географических регионов.

Заключение

Таким образом, российские изоляты MRSA-ST59 относятся к Восточно-Азиатской сублинии ST59. Наличие уникальных генетических маркеров свидетельствует о самостоятельной эволюции MRSA-ST59 на территории России. Отличительной фенотипической особенностью является чувствительность к оксациллину и пограничная устойчивость к цефокситину при использовании ДДМ. Фенотипы OS-MRSA представляют собой определенную опасность вследствие возможной неправильной оценки чувствительности, что может повлиять на назначение неадекватной антибактериальной терапии.

Исследование поддержано грантом Российского Научного Фонда 18-75-10114-П.

Литература

- Lee A.S., de Lencastre H., Garau J., Kluytmans J., Malhotra-Kumar S., Peschel A., et al. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Nat Rev Dis Primers. 2018;4:18033. DOI: 10.1038/nrdp.2018.33
- GBD 2019 Antimicrobial Resistance Collaborators. Global mortality associated with 33 bacterial pathogens in 2019: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2019. Lancet. 2022;400(10369):2221-2248. DOI: 10.1016/S0140-6736(22)02185-7
- Hososaka Y., Hanaki H., Endo H., Suzuki Y., Nagasawa Z., Otsuka Y., et al. Characterization of oxacillin-susceptible *mecA*-positive *Staphylococcus aureus*: a new type of MRSA. J Infect Chemother. 2007;13(2):79-86. DOI: 10.1007/s10156-006-0502-7
- Liu J.L., Li T.M., Zhong N., Wang X., Jiang J., Zhang W.X., et al. Current status of oxacillin-susceptible *mecA*-positive *Staphylococcus aureus* infection in Shanghai, China: a multicenter study. J Microbiol Immunol Infect. 2021; 54(6):1070-1077. DOI: 10.1016/j.jmii.2020.07.021
- Ma M., Chu M., Tao L., Li J., Li X., Huang H., et al. First report of oxacillin susceptible *mecA*-positive *Staphylococcus aureus* in a children's hospital in Kunming, China. Infect Drug Resist. 2021;14:2597-2606. DOI: 10.2147/IDR.S317670
- Duarte F.C., Danelli T., Tavares E.R., Morguette A.E.B., Kerbauy G., Grion C.M.C., et al. Fatal sepsis caused by *mecA*-positive oxacillin-susceptible *Staphylococcus aureus*: first report in a tertiary hospital of southern Brazil J Infect Chemother. 2019;25(4):293-297. DOI: 10.1016/j.jiac.2018.09.010
- Gargis A.S., Yoo B.B., Lonsway D.R., Anderson K., Campbell D., Ewing T.O., et al. Difficult-to-detect *Staphylococcus aureus*: *mecA*-positive isolates associated with oxacillin and cefoxitin false-susceptible results. J Clin Microbiol. 2020;58(4):e02038-19. DOI: 10.1128/JCM.02038-19
- Miragaia M. Factors contributing to the evolution of *mecA*-mediated beta-lactam resistance in staphylococci: update and new insights from whole genome sequencing (WGS). Front Microbiol. 2018;9:2723. DOI: 10.3389/fmicb.2018.02723
- Bilyk B.L., Panchal V.V., Tinajero-Trejo M., Hobbs J.K., Foster S.J. An interplay of multiple positive and negative factors governs methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*. Microbiol Mol Biol Rev. 2022;86(2):e0015921. DOI: 10.1128/membr.00159-21
- Harrison E.M., Ba X., Coll F., Blane B., Restif O., Carvell H., et al. Genomic identification of cryptic susceptibility to penicillins and beta-lactamase inhibitors in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Nat Microbiol. 2019;4(10):1680-1691. DOI: 10.1038/s41564-019-0471-0
- Takano T., Saito K., Teng L.J., Yamamoto T. Spread of community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in hospitals in Taipei, Taiwan in 2005, and comparison of its drug resistance with previous hospital-acquired MRSA. Microbiol Immunol. 2007;51(6):627-632. DOI: 10.1111/j.1348-0421.2007.tb03949.x
- Chen C.J., Unger C., Hoffmann W., Lindsay J.A., Huang Y.C., Gotz F. Characterization and comparison of 2 distinct epidemic community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clones of ST59 lineage. PloS One. 2013;8(9):e63210. DOI: 10.1371/journal.pone.0063210
- Chuang Y.Y., Huang Y.C. Molecular epidemiology of community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Asia. Lancet Infect Dis. 2013;13(8):698-708. DOI: 10.1016/S1473-3099(13)70136-1
- Li S., Sun S., Yang C., Chen H., Yin Y., Li H., et al. The changing pattern of population structure of *Staphylococcus aureus* from bacteremia in China from 2013 to 2016: ST239-030-MRSA replaced by ST59-t437. Front Microbiol. 2018;9:332. DOI: 10.3389/fmicb.2018.00332
- Huang Y.C., Ho C.F., Chen C.J., Su L.H., Lin T.Y. Comparative molecular analysis of community-associated and healthcare-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates from children in northern Taiwan. Clin Microbiol Infect. 2008;14(12):1167-1172. DOI: 10.1111/j.1469-0691.2008.02115.x
- Ward M.J., Goncheva M., Richardson E., McAdam P.R., Raftis E., Kearns A., et al. Identification of source and sink populations for the emergence and global spread of the East-Asia clone of community-associated MRSA. Genome biology. 2016;17(1):160. DOI: 10.1186/s13059-016-1022-0
- McClure J.A., Lakhundi S., Niazy A., Dong G., Obasuyi O., Gordon P., et al. *Staphylococcus aureus* ST59: concurrent but separate evolution of North American and East Asian lineages. Fron Microbiol. 2021;12:631845. DOI: 10.3389/fmicb.2021.631845
- Bankevich A., Nurk S., Antipov D., Gurevich A.A., Dvorkin M., Kulikov A.S., et al. SPAdes: a new genome assembly algorithm and its applications to single-cell sequencing. J Comput Biol. 2012;19(5):455-477. DOI: 10.1089/cmb.2012.0021
- Chen L., Yang J., Yu J., Yao Z., Sun L., Shen Y., et al. VFDB: a reference database for bacterial virulence factors. Nucleic Acids Res. 2005;33(Database issue):D325-328. DOI: 10.1093/nar/gki008
- Minh B.Q., Schmidt H.A., Chernomor O., Schrempf D., Woodhams M.D., von Haeseler A., et al. IQ-TREE 2: new models and efficient methods for phylogenetic inference in the genomic era. Mol Biol Evol. 2020;37(5):1530-1534. DOI: 10.1093/molbev/msaa015
- Cheng L., Connor T.R., Siren J., Aanensen D.M., Corander J. Hierarchical and spatially explicit clustering of DNA sequences with BAPS software. Mol Biol Evol. 2013;30(5):1224-1228. DOI: 10.1093/molbev/mst028
- Cingolani P., Platts A., Wang le L., Coon M., Nguyen T., Wang L., et al. A program for annotating and predicting the effects of single nucleotide polymorphisms, SnpEff: SNPs in the genome of *Drosophila melanogaster* strain w1118; iso-2; iso-3. Fly. 2012;6(2):80-92. DOI: 10.4161/fly.19695
- Letunic I., Bork P. Interactive tree of life (iTOL) v3: an online tool for the display and annotation of phylogenetic and other trees. Nucleic Acids Res. 2016;44(W1):W242-245. DOI: 10.1093/nar/gkw290
- Gostev V., Ivanova K., Kruglov A., Kalinogorskaya O., Ryabchenko I., Zyryanov S., et al. Comparative genome analysis of global and Russian strains of community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* ST22, a 'Gaza clone'. Int J Antimicrob Agents. 2021;57(2):106264. DOI: 10.1016/j.ijantimicag.2020.106264