

На правах рукописи

Корниенко Мария Андреевна

**«Биохимические и генетические особенности реализации патогенности  
госпитальными штаммами *Staphylococcus epidermidis* и *Staphylococcus haemolyticus*»**

03.02.07- генетика

Автореферат диссертации на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук

Москва – 2016

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном учреждении «Федеральный Научно-клинический центр физико-химической медицины Федерального медико-биологического агентства», в лаборатории молекулярной генетики микроорганизмов

**Научные руководители:**

доктор биологических наук, профессор  
РАН

**Официальные оппоненты:**

**Ильина Елена Николаевна**  
**Романова Юлия Михайловна**

доктор биологических наук, профессор,  
ФБГУ «Федеральный научно-исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф.Гамалеи» МЗ РФ, лаборатория генной инженерии патогенных микроорганизмов, ведущий научный сотрудник

**Остерман Илья Андреевич**

кандидат химических наук, Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова, химический факультет, старший научный сотрудник

**Ведущая организация:**

«Институт микробиологии им. С.Н.Виноградского» Федерального государственного учреждения «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук»

Защита состоится « » \_\_\_\_\_ 2016 г. в \_\_ часов на заседании диссертационного совета Д.217.013.01 при ФГБУ «Государственный научно-исследовательский институт генетики и селекции промышленных микроорганизмов» по адресу 117545, Москва, 1-ый Дорожный пр., д.1.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГБУ «Государственный научно-исследовательский институт генетики и селекции промышленных микроорганизмов»

Автореферат разослан \_\_\_\_\_ 2016г.

Ученый секретарь диссертационного совета, кандидат химических наук, доцент

Т.Л.Воюшина

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

### Актуальность проблемы

С развитием хирургии, неонатологии, реаниматологии, а также инвазивных манипуляций возрос риск приобретенных госпитальных (нозокомиальных) инфекции, что в свою очередь ведет к возникновению дополнительных затрат на пребывания пациентов в стационаре и росту летальных исходов. Коагулазо-отрицательные стафилококки (КОС) являются причиной 30% - 40% случаев внутрибольничных инфекции кровотока [Rogers K.L., 2009] и выявляются у 30 % пациентов хирургических стационаров [Rahman A., 2012; Lepelletier D., 2013]. В группу риска также попадают новорожденные дети. В настоящее время около 30% случаев всех госпитальных инфекций в неонатальных отделениях интенсивной терапии, а также 73 % случаев bacteriemia вызвано КОС [Venkatesh M.P., 2006; Rogers K.L., 2009, Любасовская Л.А., 2013]. Среди КОС наибольшее клиническое значение имеют виды *Staphylococcus epidermidis* и *Staphylococcus haemolyticus*. Летальность при сепсисе, вызванным *S. epidermidis* составляет 27,0-44,7 %. Однако, данных о механизмах патогенности КОС существенно меньше по сравнению с таковыми для коагулазоположительного вида стафилококков - *Staphylococcus aureus* [Otto M., 2012]. Наиболее изученными факторами вирулентности и патогенности (ФВП) КОС являются факторы, ответственные за формирование биопленок [Fey P.D., 2010; Patel J.D., 2012]. Кроме того, к ФВП КОС относят: продукцию фенол-растворимых модулинов, гемолизинов, а также секретируемых ферментов (протеаз, липаз, эстераз, нуклеаз) [Otto M., 2012]. На сегодняшний день невозможно однозначно связать реализуемые КОС механизмы патогенности с наличием определенного набора ФВП, в частности, с наличием каких-либо токсинов. Для исследования молекулярных механизмов патогенности необходимо привлекать методы, описывающие биологию КОС на различных уровнях, начиная с хранения и реализации генетической информации и заканчивая профилем транскрибируемых в определенных условиях белков. Кроме того, подобное исследование должно подкрепляться сбором метаданных, включая информацию о клиническом происхождении изолята (диагноз и историю болезни пациента, от которого получен изолят), его морфологические и физиологические характеристики. Таким образом, применение комплексного (системного) подхода для выявления новых молекулярных механизмов, обуславливающие повышенную вирулентность КОС, видится актуальным научным исследованием.

**Целью настоящего исследования является раскрытие особенностей молекулярных механизмов проявления патогенности коагулазоотрицательными стафилококками**

Для достижения поставленной цели были решены следующие задачи:

1. Создание коллекции изолятов КОС, их фенотипическая характеристика (определение профиля лекарственной чувствительности)
2. Выявление группы госпитальных изолятов клинически-значимых КОС (*S. epidermidis*, *S. haemolyticus*) посредством молекулярного типирования изолятов
3. Полногеномное секвенирование отдельных госпитальных изолятов *S. epidermidis* и *S. haemolyticus*, общий анализ данных - выявление «основной» (core) и «дополнительной» (accessory) составляющих геномов
4. Описание мобильных элементов и потенциальных ФВП на основании анализа «дополнительной» составляющей геномов

5. Протеомный анализ секретируемых КОС белков, как потенциальных ФВП
6. Построение гипотез, объясняющих молекулярные механизмы реализации патогенности клиническими изолятами КОС и их проверка в модельных экспериментах

#### **Научная новизна работы:**

- Собрана коллекция КОС, циркулирующих на территории России, включающая изоляты, выявленные в неонатальных отделениях. Получена комплексная фенотипическая характеристика госпитальных штаммов КОС
- Предложены новые подходы типирования стафилококков на основании масс-спектрометрических данных, полученных в ходе идентификации стафилококков методом прямого масс-спектрометрического бактериального профилирования.
- Разработана оригинальная схема MLST (от англ. Multilocus Sequence Typing ) для вида *S. haemolyticus*.
- Впервые представлены данные полногеномного секвенирования госпитальных изолятов КОС, циркулирующих на территории России
- На основании данных полногеномного секвенирования, выявлены ФВП, характерные для КОС, циркулирующих на территории России
- Впервые описан случай псевдолизогении для КОС и выделен соответствующий фаг (Spϕlike)
- Предложен количественный способ оценки гемолитической активности КОС
- Исследован профиль секретируемых белков *S. haemolyticus*, выдвинута гипотеза об участии бактериальной липазы в реализации гемолитической активности
- Описаны характерологические особенности формирования биопленок изолятами КОС на культуре клеток человека
- Предложен метод количественной оценки цитотоксичности КОС, основанный на измерении активности клеточной лактатдегидрогеназы

#### **Личное участие автора в получении результатов**

- Вклад автора в проведенное исследование заключается в детальной проработке литературных данных, планировании и выполнении экспериментальной работы, анализе полученных данных и написании диссертационной работы. Автором предложены новые подходы типирования КОС с использованием методов масс-спектрометрии, кроме того разработана оригинальная схема мультилокусного типирования-секвенирования штаммов *S. haemolyticus*. Непосредственно при участии автора впервые получены данные полногеномного секвенирования госпитальных изолятов КОС, циркулирующих на территории России, проведен анализ секретируемых *S. haemolyticus* белков, отработан метод количественной оценки цитотоксичности КОС посредством измерения активности лактатдегидрогеназы, исследованы особенности формирования биопленки тестируемыми изолятами КОС.

#### **Основные положения диссертации, выносимые на защиту:**

1. Доминирующими видами КОС, выявляемым в стационарах России являются устойчивые к метициллину *S. epidermidis* и *S. haemolyticus*
2. Для популяций *S. epidermidis* и *S. haemolyticus* характерна клональная структура, что

подтверждено методом MLST, для вида *S.haemolyticus* эффективная MLST схема (D = 0,95) разработана в рамках данной работы

3. Случай псевдолизогении, описанный для изолята *S.epidermidis* SE36-1, можно рассматривать как потенциальный фактор вирулентности и патогенности КОС

4. Анализ полногеномных данных позволяет *in silico* обнаружить факторов вирулентности и патогенности КОС, спектр которых подтверждается наблюдаемыми фенотипическими проявлениями.

5. Неописанные ранее “острова патогенности”, содержащие гены токсинов, обнаружены в составе геномов госпитальных изолятов *S.haemolyticus*

#### **Апробация работы:**

Основные положения диссертационной работы доложены и обсуждены на расширенном межлабораторном заседании Отдела молекулярной биологии и генетики ФГБУ ФНКЦ ФХМ ФМБА России (29 июня 2016 года), на секции «Генетика» Диссертационного Совета Д.217.013.01 при Федеральном государственном бюджетном учреждении «Государственный научно-исследовательский институт генетики и селекции промышленных микроорганизмов» (10 октября 2016 года), а также в ходе ряда конференций:

- 22ой Европейский Конгресс по Клинической Микробиологии и Инфекционным Болезням, Лондон, Великобритания, март-апрель 2012
- III международной научно-практической конференции «Постгеномные методы анализа в биологии, лабораторной и клинической медицине», Казань, ноябрь 2012
- V Международная школа молодых ученых по молекулярной генетике «Непостоянство генома», Звенигород, 2012
- Международный конгресс МАКМАХ, Москва, 22-24 мая 2013г
- 24ый Европейский Конгресс по Клинической Микробиологии и Инфекционным Болезням, Барселона, Испания, май 2014
- Всероссийская научно-практическая конференция по медицинской микробиологии и клинической микологии (XVII Кашкинские чтения), Санкт-Петербург, 9–11 июня 2014 г
- 26ой Европейский Конгресс по Клинической Микробиологии и Инфекционным Болезням, Амстердам, Нидерланды, апрель 2016
- Российско-китайская научно-практическая конференция по медицинской микробиологии и клинической микологии (XIX Кашкинские чтения), Санкт-Петербург, 14 – 16 июня 2016 г

#### **Публикации:**

По теме диссертации опубликовано 9 научных работ, в том числе 4 статьи в рецензируемых научных журналах.

#### **Структура и объем диссертации:**

Диссертационная работа состоит из введения и 8 глав, включающих «Введение», «Обзор литературы», «Материалы и методы», «Результаты», «Обсуждение», а так же «Заключение», «Выводы» и «Список литературы». Работа изложена на 127 страницах машинописного текста, иллюстрирована 24 таблицами и 23 рисунками. Указатель литературы состоит из 187 источников.

## ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

### Материалы и методы

Клинические изоляты КОС (n = 169) получали из различных стационаров, преимущественно из ФГБУ «Научный центр акушерства, гинекологии и перинатологии имени академика В.И. Кулакова». Чистые культуры были выделены из клинического материала (из кала, соскобов из зева, бронхоальвеолярного аспирата и др.) путем пересева клеток на питательную среду (5% кровяной агар, Oxoid). Определение лекарственной чувствительности изолятов КОС проводили на автоматическом анализаторе Vitek2 Compact (BioMerieux). При интерпретации результатов тестирования руководствовались критериями Clinical and Laboratory Standards Institute (Институт клинических лабораторных стандартов).

Культуру клеток человека HT-29 (ATCC® HTB-38™) выращивали в 1 мл среды DMEM (Gibco) с 10% сывороткой (Fetal Bovine Serum, Gibco) в культуральных планшетах на 24 лунки (Greinerbio-one Ltd.) в 5% CO<sub>2</sub> при 37°C до образования монослоя (24 часа).

Видовую идентификацию КОС осуществляли методом прямого масс-спектрометрического профилирования бактериального лизата [Argemi X, 2015] с использованием времяпролетного масс-спектрометра Microflex и программного обеспечения Biotyper 3.0 (Bruker Daltonics). Сопоставление масс-спектров клинических изолятов осуществляли на основании матрицы корреляционных коэффициентов, рассчитанной с помощью программного обеспечения Biotyper 3.0.

Образования фаговых частиц индуцировали добавлением митомицина С (0,2 мкг/л) к бактериальной культуре *S. epidermidis*. Полученные частицы осаждали центрифугированием (7000 об/мин, 20 минут) и анализировали просвечивающей электронной микроскопией. Перед выделением ДНК из фаговых частиц препараты бактериофагов обрабатывали РНКазой (Thermo Fisher Scientific) и ДНКазой (Thermo Fisher Scientific) в соответствии с инструкциями производителя, после чего ДНК фаговых частиц выделяли стандартным методом [Sambrook, J., 1989].

Интенсивность формирования биопленок оценивали с помощью окраски раствором кристаллического фиолетового [Feu P.D., 2014]. Образование биопленок стафилококков на культуре клеток HT-29 визуализировали посредством электронной сканирующей микроскопии (СЭМ), фиксацию осуществляли 10 % раствором нейтрального формалина. Для создания электропроводящего слоя на поверхности образцов напыляли золото толщиной 5 нм с помощью напылительной установки SPI-MODULE Sputter Coater (SPI Supplies). Исследование проводили в дулучевом сканирующем ионно-электронном микроскопе Quanta 200 3D (FEI Company).

Гемолитическую активность изолятов *S. haemolyticus* на эритроциты человека оценивали следующим образом: культивировали *S. haemolyticus* 18 часов в триптон-соевом бульоне (Oxoid) при 37°C, культуральную жидкость пропускали через фильтр с диаметром пор 0,20 мкм (Minisart, Sartoriusstedim). К 125 мкл 10% раствору эритроцитов человека в 0,9% NaCl добавляли 600 мкл культуральной жидкости и инкубировали при 37°C. Непосредственно перед инкубацией, а так же через 3, 6 и 23 часа отбирали 100 мкл образца, центрифугировали (5 минут, 3000 об/мин) и измеряли оптическую плотность супернатанта при 540 нм на Multiskan Ascent (Thermo Electron corporation).

Для выделения ДНК стафилококков использовали набор «ДНК-экспресс» (ТУ–9398-450-17253567-03) (ООО НПФ Литех).

Мультилокусное секвенирование-типирование (MLST) от англ. Multilocus Sequence Typing)) изолятов *S. epidermidis* проводили по общепринятой схеме (<http://sepidermidis.mlst.net/>). Амплификацию отдельных локусов и генов стафилококков, в том числе кандидатных генов «домашнего хозяйства» (*mvaK*, *rphE*, *tphK*, *gtr*, *arcC*, *tpi*, *aroE*, *pta*, и др.) *S. haemolyticus* осуществляли с праймерами, приведенными в таблице 5 диссертации. При необходимости нуклеотидную последовательность фрагментов ДНК определяли методом Сенгера с модификациями (Sanger et al., 1997) с использованием прибора ABI Prism 3730xl Genetic Analyzer (Applied Biosystems).

Филогенетический анализ нуклеотидных последовательностей участков генов «домашнего хозяйства» осуществляли с помощью Vector NTI 9.0 (Informax Inc) и MEGA4.0 (<http://www.megasoftware.net>). Данные аллельных профилей были проанализированы с помощью программного обеспечения eBURST ([http://eburst.mlst.net/v3/enter\\_data/single/](http://eburst.mlst.net/v3/enter_data/single/)). Расчет коэффициента dn/ds для локусов MLST схемы (dn – отношение несинонимичных замен к несинонимичным сайтам, ds – отношение синонимичных замен к синонимичным сайтам) осуществляли с использованием Start2 (<http://pubmlst.org/software/analysis/start2/>). Дискриминационную способность MLST схемы определяли путем расчета дискриминационного коэффициент Хантер - Гастона (D) [Hunter, 1988]. Регистрационные номера последовательностей новых аллелей в GenBank - KC525159 - KC525182, KR011736 - KR011742.

Определение полногеномных нуклеотидных последовательностей изолятов *S. epidermidis* (SE36-1, SE41, SE528) и *S. haemolyticus* (SH527, SH421, SH39, SH864-1), а также ДНК фаговых частиц проводили с помощью метода высокопроизводительного секвенирования на приборе IonTorrent PGM (LifeTechnologies). Для приготовления библиотек использовали набор Ion Plus Fragment Library Kit (LifeTechnologies), для баркодирования - набор IonXpress Barcode Adapters 1-16 Kit. При подготовке библиотек к секвенированию на приборе IonTorrentPGM использовали системы One-Touch 2 и One-Touch ES (LifeTechnologies) и реактивы IonPGM TemplateOT2 Kit 200 (LifeTechnologies). При проведении секвенирования на приборе IonTorrent PGM использовали реактивы IonPGM Sequencing Kit 200 и чип 316 (318) (LifeTechnologies).

Сборку прочтений с прибора осуществляли *de novo* с помощью программного обеспечения GS *de novo* assembler версии 2.5 (Roche). Дополнительно для уточнения нуклеотидных последовательностей в составе генома проводили секвенирование по методу Сенгера. Аннотацию полнонуклеотидных последовательностей осуществляли с помощью сервиса "Prokaryotic Genome Annotation Pipeline" (NCBI). Аннотированные полнонуклеотидные последовательности представлены в базе данных под номерами APHS00000000, APHU00000000, APHT00000000 соответственно для изолятов *S. epidermidis* SE36-1, SE41, SE528; для изолятов SH39, SH527, SH864-1, SH421 *S. haemolyticus* -JRAW00000000, JRAZ00000000, JRAY00000000, JRAX00000000, соответственно; NC\_029119.1- для фага SPbeta-like.

Состав «основного» и «дополнительного» геномов рассчитывали при помощи пользовательских скриптов, написанных на языках программирования Perl и R. Сравнение

нуклеотидных последовательностей генов выполняли с использованием ClustalW для каждого гена основного генома в отдельности. Филогенетический анализ выровненных генов основного генома (конкатенантов) проводили помощью программного обеспечения Emboss по алгоритму Maximum Likelihoodtree.

Поиск ФВП в составе полнонуклеотидных последовательностей клинических изолятов осуществляли с помощью сервиса PATRIC ([www.patricbrc.org](http://www.patricbrc.org)) по двум базам данных: VFDB ([www.mgc.ac.cn/VFs/](http://www.mgc.ac.cn/VFs/)) и Victors ([www.phidias.us/victors/](http://www.phidias.us/victors/)), а также с помощью алгоритма BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) в базе GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>).

Структуру и функции аминокислотных последовательностей предсказывали с помощью on-line сервиса SUPERFAMILY

Для масс-спектрометрической идентификации секретлируемых белков *S.haemolyticus*, изолят SH 527 культивировали в течение 18 часов в триптон-соевом бульоне. Отделяли клетки от культуральной жидкости (20 минут; 4000 оборотов в мин.), супернатант пропускали через фильтр 0,22 мкм. Далее супернатант фракционировали хроматографически (DAE) с последующим измерением гемолитической активности всех фракций. После чего белки фракций, обладающих гемолитической активностью, разделяли с помощью одномерного электрофореза (7.5% ПААГ, 7-см гели) в денатурирующих условиях и осуществляли ферментативное расщепление белков трипсином в геле [Jensen O.N., 1999]. Пептидные экстракты анализировали с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографией в сочетании с тандемной масс-спектрометрией (LC-MS/MS) на приборе OrbitrapQ Exactive (ThermoScientific) в трех технических повторах. Для идентификации белков использовали - Mascot v.2.5.1. Клеточную локализацию определяли на основании базы данных psort [<http://psort.hgc.jp/>].

## **Благодарности**

Отдельные эксперименты были выполнены совместно с сотрудниками ФГБУ ФНКЦ ФХМ ФМБА России, в частности данные секвенирования полногеномных последовательностей *S. epidermidis* и *S. haemolyticus* были получены совместно с Карповой И. Ю. и Бабенко В.В.; аннотация и анализ полногеномных последовательностей клинических изолятов *S.epidermidis* и *S. haemolyticus* были выполнены совместно с Маноловым А.И. и Каныгиной А.В.; хроматографическое разделение фракций супернатанта выполнены с участием Мануверы В.А.; анализ данных протеомного профилирования – совместно с Алтуховым И.А. Создание коллекции КОС выполнено при участии сотрудников «Научного центра акушерства, гинекологии и перинатологии имени академика В.И. Кулакова» Любасовской Л.А., НИИ «Антимикробной химиотерапии СГМА» Эдельштейна М.В. и Сухоруковой М.В., Ульяновского государственного технического университета Фаловой О.Е. Получение масс-спектров культуральной жидкости *S.haemolyticus* выполнены с участием сотрудника «НИИ биомедицинской химии имени В.Н.Ореховича» Згоды В.Г.

## **Результаты исследования и их обсуждение**

В ходе работы собрана коллекция изолятов КОС, выделенных в различных стационарах. По данным видовой идентификации наиболее представленными видами



оказались *S. haemolyticus* (71/169, 42%) и *S. epidermidis* (64/169, 38%), что подтверждает их клиническую значимость. В плане исследования особенностей физиологии и механизмов патогенности *S. epidermidis* и *S. haemolyticus* наибольший интерес представляют госпитальные изоляты этих видов, поскольку подавляющее большинство инфекций, вызванных КОС, ассоциировано с пребыванием пациента в стационаре. Выявление группы госпитальных штаммов проведено на основании MLST. Исследуемые изоляты *S. epidermidis* (n = 64) были отнесены к 19 сиквенс-типам ((ST) от англ. sequence type) (рис. 1), при этом основную часть составили ST59 (18/64, 28%), ST22 (13/64, 20%), ST2 (11/64, 17%). Выявленные сиквенс-типы, помимо ST19, относились к клональному комплексу CC2, объединяющему госпитальные штаммы [Miragaia M., 2007]. Таким образом, 62/64, 96,9 % исследуемых *S. epidermidis* имели госпитальное происхождение.

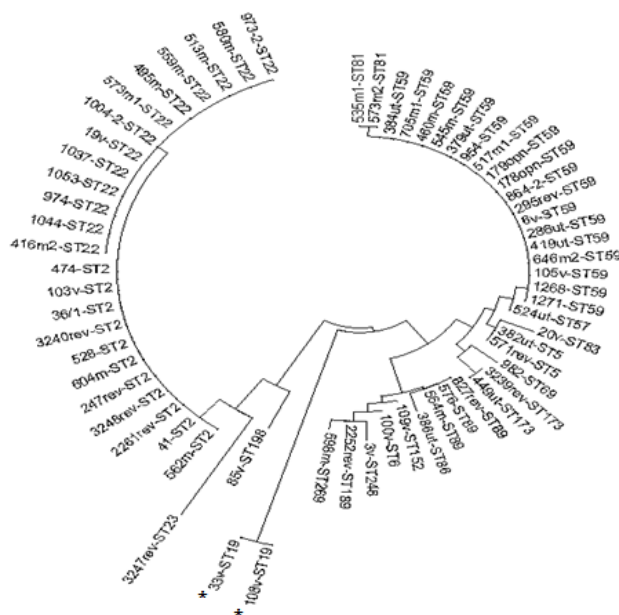


Рисунок 1. Сравнительный филогенетический анализ изолятов *S. epidermidis*, основанный на различиях в нуклеотидных последовательностях семи MLST локусов. (\*- не госпитальные изоляты)

Основываясь на результатах типирования и клинических данных, были отобраны три изолята (SE36-1, SE41, SE528) для углубленного системного исследования особенностей проявления патогенных свойств *S. epidermidis*. Выбор изолятов SE36-1 и SE41 был обусловлен тем, что инфекционные процессы, вызванные ими, привели к летальным исходам пациентов, у которых они были выделены. Изолят SE528 был получен при посеве из зева новорожденного ребенка и отобран как штамм, возможно, ассоциированный с колонизацией. По данным типирования все три изолята относились к клональному комплексу CC2, характеризующему госпитальные штаммы [M. Miragaia, 2007]. Проведено полногеномное секвенирование этих изолятов, данные депонированы в GenBank (APHS00000000, APNU00000000, APNT00000000).

На основании собственных данных полногеномного секвенирования и последовательностей геномной ДНК *S. epidermidis*, содержащихся в базе NCBI (n = 92), произведен расчёт числа генов, составляющих «основную» (от англ. core-genome) и «дополнительную» (от англ. accessory-genome) части пангенома. Для анализируемой выборки *S. epidermidis* «основной» геном включал 943 генов, а «дополнительный» - 7413 гена. Проведен кластерный анализ последовательностей генов «основного» генома, получена информация о положении на филогенетическом дереве исследуемых изолятов

относительно других *S. epidermidis* (рис. 2). Исследуемые изоляты кластеризовались совместно с госпитальными штаммами C10C, NH04008, NH051668, выделенными при инфекционных процессах из мокроты, крови и легких пациентов.

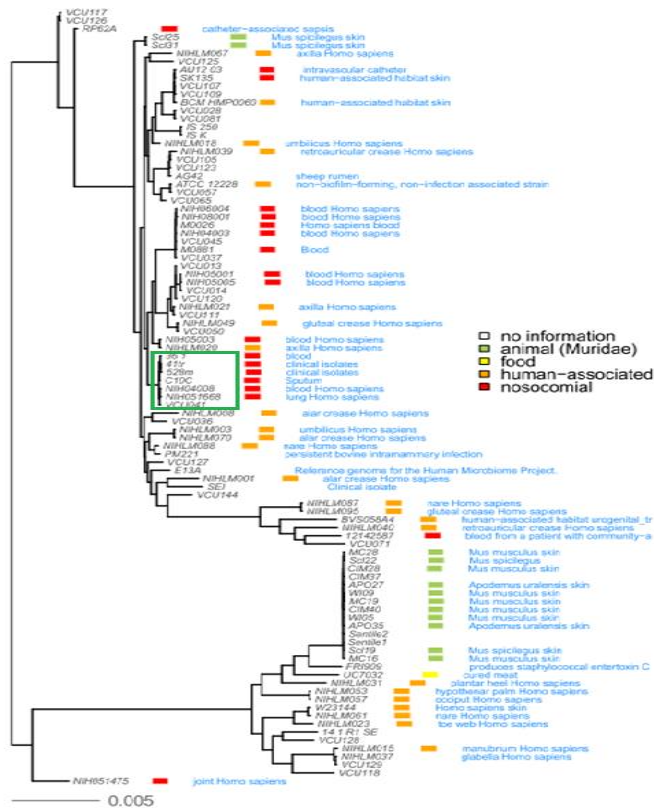


Рисунок 2. Сравнительный филогенетический анализ изолятов *S. epidermidis*, основанный на данных об однонуклеотидных заменах в генах «основного» генома (зеленой рамкой отмечен кластер близкородственных штаммов, включающий SE36-1, SE41 и SE528)

Поиск потенциальных ФВП проведен среди генов «дополнительной» части генома исследуемых изолятов, а также штаммов RP62A (CP000029.1) и ATCC12228 (AE015929.1). Лабораторный штамм ATCC12228 был выбран как референсный негоспитальный штамм, не образующий биопленок, штамм RP62A, напротив, был взят в качестве примера госпитального штамма, связанного с инфекционными процессами.

Исследуемые изоляты SE36-1, SE41 и SE528 обладали очень схожими профилями известных ФВП, обнаруживая присутствие фенол-растворимых модулинов типа  $\beta$ , токсинов, секретлируемых ферментов, белков, ответственных за синтез капсулы, факторов, ответственных за адгезию и образование биопленок. При сопоставлении профилей ФВП было выявлено, что изоляты SE41, SE528 и SE36-1, также как и штамм RP62A, содержат гены различных фенол-растворимых модулинов, в том числе и фенол-растворимого модулина  $\alpha$ , который отсутствует в геноме лабораторного штамма ATCC12228. На сегодняшний день принято связывать наличие фенол-растворимого модулина  $\alpha$  у *S. epidermidis* с их госпитальным происхождением и способностью вызывать инфекционные процессы, что еще раз подтвердилось в нашей работе. Кроме того, изоляты SE41, SE528 и SE36-1, как и госпитальный штамм RP62A обладали ФВП, обуславливающим образование биопленки, в том числе и гены *icaABCD* оперона, ответственные за синтез основного компонента матрикса биопленок *S. epidermidis*- полисахарида  $\beta$ -1,6-N ацетил-глюкозамина. Помимо этого найдены гены других белков, принимающих участие в

формировании биопленок: ген аутолизина (*atlE*), ген фибронектин связывающего белка (*ebh*), ген фибриноген связывающего белка (*sdrF*, *sdrG*), ген эластин связывающего белка (*ebp*), а также гены тейхоевых кислот (*tagA*, *tagH*, *tagG*, *tagB*, *tagX*, *tagF*). На основании этих данных можно сделать вывод о способности исследуемых изолятов *S. epidermidis* образовывать биопленки, что было подтверждено экспериментально путем окраски образующегося полисахаридного экзоматрикса кристаллическим фиолетовым (рис. 3).

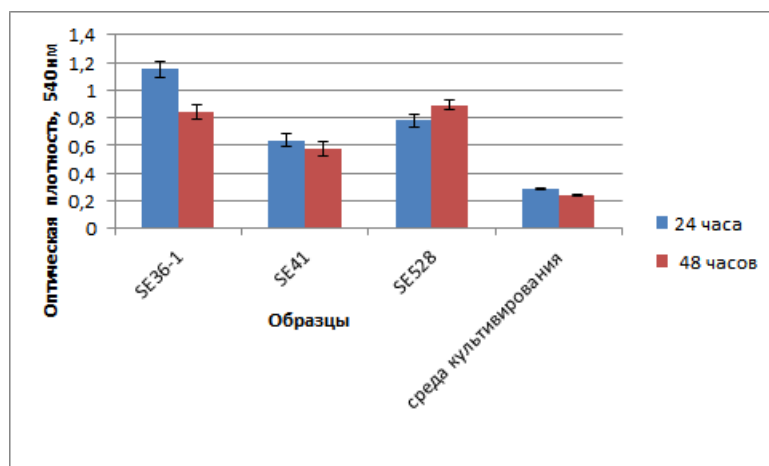
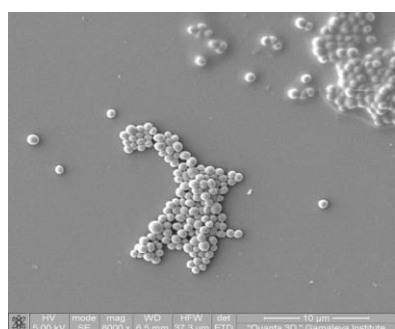
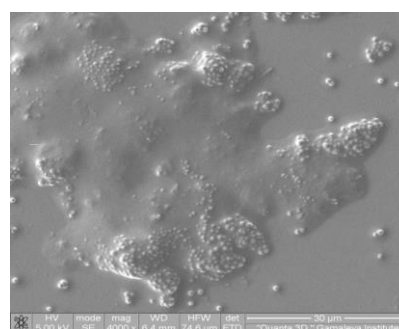


Рисунок 3. Сравнительная оценка способности формирования биопленок изолятами *S. epidermidis* на поверхности пластика (через 24 часа и 48 часов)

Биопленки, формируемые на пластике изолятом SE36-1 были дополнительно исследованы с помощью СЭМ (рис. 4). Через 24 часа инкубации наблюдали формирование биопленки, идущее параллельно с процессом адгезии (рис. 4А). Через 48 часов инкубации на фоне обширных участков, покрытых экзополисахаридным матриксом, было отмечено появление микроколоний (рис. 4В).



А



В

Рисунок 4. А, В Сканогаммы бактериальной культуры *S. epidermidis* SE36-1 увеличение X 8000 и X 4000, соответственно (срок инкубации: 24, 48 часов, соответственно)

В ходе детального анализа сборки нуклеотидной последовательности геномов изолятов SE36-1, SE41 и SE528, для SE36-1 были выявлены контиги (продолжительные участки ДНК, полученные в процессе сборки геномов), покрытие которых прочтениями с прибора в 30 раз превышало среднее покрытие по геному (табл. 1). Эти контиги включали нуклеотидную последовательность профага SP $\beta$ , впервые обнаруженного в составе генома госпитального штамма *S. epidermidis* RP62 [Gill S.R., 2005]. Подобные контиги, содержащие последовательность профага SP $\beta$ , также были найдены в геномах изолятов SE41 и SE528, но их покрытие не превышало среднее по геному.

Таблица 1. Покрытие прочтениями с прибора некоторых контигов в геноме клинического изолята *S.epidermidis* SE36-1 (среднее покрытие по геному - 9х)

Контиги с повышенным покрытием по отношению к среднему покрытию по геному			Контиги с покрытием, равным среднему покрытию по геному		
№ Контига	размер	покрытие	№ Контига	размер	покрытие
контиг00001	41870	219,0	контиг00002	33124	10,7
контиг00003	28702	316,6	контиг00004	28310	10,5
контиг00088	10173	265,1	контиг00019	20182	8,6
контиг00119	8589	283,4	контиг00033	17500	10,0

Последующий анализ показал, что все прочтения с прибора, соответствующие профагу SPβ клинического изолята SE36-1, не имеют общих участков с хромосомной ДНК этого изолята. Путем амплификации составных фрагментов нуклеотидной последовательности профага SPβ и их последующего секвенирования было доказано, что в изоляте SE36-1 эта последовательность не является частью хромосомы, а представляет собой внехромосомную кольцевую ДНК. При анализе данных геномного секвенирования изолятов SE41 и SE528 были обнаружены прочтения с прибора, одновременно содержащие части последовательности профага SPβ и хромосомной ДНК, что указывает на интеграцию этого профага в хромосому, что характерно и для штамма *S. epidermidis* RP62.

Кроме последовательности, гомологичной профагу SPβ, в геноме изолята SE36-1 была обнаружена последовательность, гомологичная фагу стафилококков StB20 (номер в базе данных NCBI- JN700521.1), гомология составила 96%. Покрытие данного участка прочтениями с прибора (x15,2) также несколько превышало среднее покрытие генома (x9), но незначительно. Кроме того прочтения с прибора, соответствующие фагу StB20, содержали также и участки хромосомной ДНК изолята SE36-1, что подтверждает нахождение StB20 в геноме изолята SE36-1 в виде профага.

Были проведены эксперименты по индукции фаговых частиц из бактериальных культур *S.epidermidis* SE36-1, SE41 и SE528 под действием митомицина С. Фаговые частицы были обнаружены только в случае бактериальной культуры SE36-1 (рис. 5).

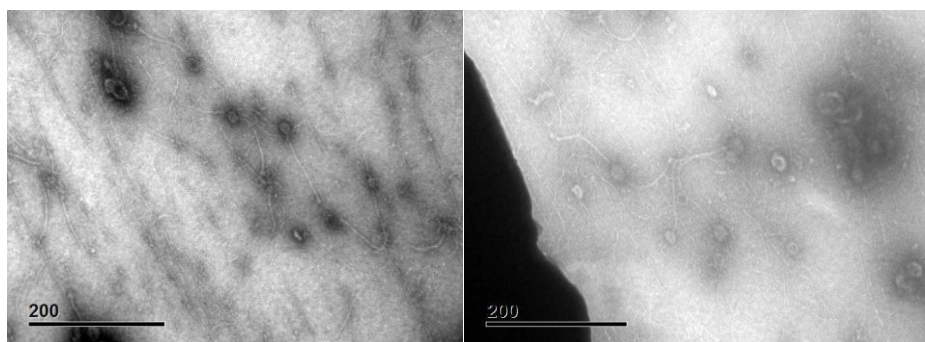


Рисунок 5. Электронная микроскопия фагового образца, полученного при воздействии митомицином С на бактериальную культуру SE36-1 (увеличение 200 нм).

Проведено полногеномное секвенирование тотальной ДНК, экстрагированной из выделенных фаговых частиц. По данным геномной аннотации в анализируемом образце было выявлено два различных фага, названных Spβlike и StB20like, гомологичных профагу SPβ штамма *S. epidermidis* RP62 и фагу стафилококков StB20, соответственно.

Таким образом, отличительной особенностью изолята SE36-1 по сравнению с SE41, SE528 является наличие в его геноме внехромосомной последовательности фага Spβlike. Взаимодействие фага Spβlike с изолятом SE36-1 можно охарактеризовать как случай псевдолизогении. Псевдолизогения - это «промежуточная» стадия между лизогенной и литической формами жизни бактериофага, которая характеризуется тем, что количество копий генома фага в клетке-хозяина не увеличивается (как при литическом пути развития фаговой инфекции), и репликация фагового генома не синхронизирована с клеточным циклом (как при лизогении), при этом деградации генома бактериофага не происходит [Łoś M., 2012]. Такая ситуация возможна в случае, когда геном фага не интегрирован в бактериальную хромосому, а сохраняется в цитоплазме бактерии в виде плазмиды-препрофага. Из стадии псевдолизогении бактериофаг может перейти как в состояние лизогении, так и уйти на литический путь развития. Случаи псевдолизогении описаны для *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Borrelia burgdorferi*, представителей родов *Clostridium* и *Vibrio* [Łoś M., 2012]. Не смотря на то, что случаи псевдолизогении известны давно, это явление остается мало изученным, так как псевдолизогения не является стабильным состоянием бактериофагов, и часто проявляется при неблагоприятных условиях роста бактерий. В рамках исследования ФВП КОС случай псевдолизогении фага Spβlike представляет несомненный интерес, так как посредством псевдолизогении может происходить регуляция количества бактериальных клеток в популяции, что может влиять на вирулентность изолята SE36-1. Так, при изменении условий, например, при возникновении иммунного ответа со стороны организма человека или воздействии антибиотика, препрофаг может перейти в литическую стадию жизненного цикла, вызвав синхронный лизис бактериальной популяции. При этом литические ферменты и другие составляющие бактериальных клеток одновременно попадут в межклеточное тканевое пространство и кровоток, оказывая токсическое воздействие на клетки организма хозяина.

Для визуализации особенностей взаимодействия изолята SE36-1 с клетками человека были поставлены эксперименты по совместному культивированию бактериальных клеток с клеточной линией рака толстой кишки человека HT-29 (рис 6). Выбор данной клеточной линии связан с тем, что HT-29 представляют собой эпителиальные клетки, которые следует рассматривать как первый барьер для бактериальных инфекций [Grice E.A., 2009]. Стоит отметить, что стафилококки часто являются причиной инфекционных поражений кишечника [al-Salem A.H., 1996], что свидетельствуют о тропности стафилококков к слизистой кишечника. При взаимодействии SE36-1 с культурой клеток человека HT-29 уже через 3 часа наблюдается деформация клеточного пласта, на сроке 24 часа деформация клеточного пласта отчетливо видна, через 48 часа инкубации деформация клеточного пласта была максимальна, наблюдалась массовая деструкция клеток HT-29 (рис. 6). В результате цитолитического действия SE36-1 на клетки HT-29 в течение 48 часов на поверхности стекла наблюдались структуры «остов» клеток, очевидно, представляющие собой неразрушенный цитоскелет клеток HT-29. Подобная картина не наблюдалась на этом сроке в образцах клеточной культуры, инфицированной золотистым и гемолитическим стафилококками. Возможная

причина этого явления – наличие у эпидермального стафилококка факторов, разрушающих, в первую очередь, матрикс, синтезируемый эукариотическими клетками культуры НТ-29, и менее выраженный цитолитический потенциал по сравнению с золотистым и гемолитическим стафилококками.

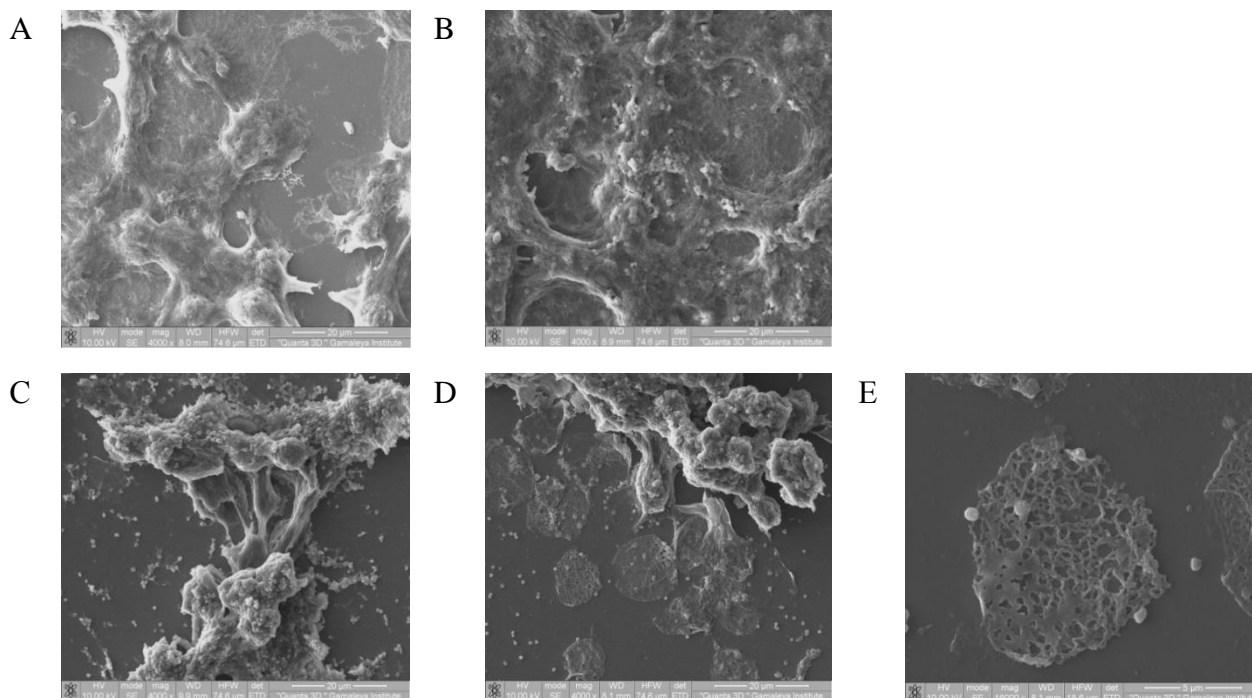


Рисунок 6. Сканограмма взаимодействия культуры клеток человека НТ-29 с *S. epidermidis* SE36-1: А - Препарат клеточной культуры НТ-29 (24 часа) (контроль), увеличение X 4000; В, С, D - Взаимодействие SE36-1 с НТ-29 (3 часа, 24 часа, 48 часов, соответственно), увеличение X 4000; Е - структура «остов» клеток НТ-29 при взаимодействии с SE36-1 (48 часов), увеличение X 16000

Полученные данные характеризуют стиль жизни *S. epidermidis*, ассоциированный с нозокомиальными инфекциями. Штаммы *S. epidermidis* способны вызывать инфекционные процессы, приводящие к летальным исходам, переходя от колонизации к инвазивному образу жизни, примером такого поведения может случить изолят SE36-1, выделенный из крови новорожденного ребенка с диагнозом сепсис, в результате которого ребенок умер. Данный изолят не отличается от других исследуемых изолятов наличием генов каких-либо токсинов, по данным СЭМ при взаимодействии с культурой клеток человека этого изолята образуются структуры «остов клеток», что, возможно, связано с невысокой токсигенностью. С другой стороны, данный изолят приспособлен к условиям окружающей среды за счет формирования биопленок на гетерологичной поверхности (пластик). Кроме того, при определенных условиях клетки изолята SE36-1 способны к спонтанному лизису за счет перехода препрофага Sp $\beta$ like на литический путь развития фаговой инфекции, что приводит к разрушению части бактериальной популяции, а так же выбросу литических ферментов и других составляющих бактериальной клетки, что, в свою очередь, вызывает повреждение клеток человека и способствует повышению уровня цитокинов. Этот процесс можно рассматривать как один из вероятных механизмов патогенности КОС.

Другим клинически значимым видом КОС, ассоциированным с госпитальными инфекциями, является *S.haemolyticus*. В ходе настоящей работы собраны 71 изолят *S.haemolyticus*, для которых проведено молекулярное типирование по двум протоколам - MLST и сопоставление масс-спектрометрических профилей, с целью выявления группы госпитальных изолятов.

На сегодняшний день нет апробированной схемы MLST для *S.haemolyticus*. Опубликовано несколько работ, посвященных разработке MLST схемы типирования, но предложенные схемы требуют доработки с целью повышения дискриминационного коэффициента [Воронина 2011; Cavanaghet., 2012]. В рамках диссертационной работы были протестированы 18 кандидатных генов «домашнего хозяйства» (*arcC*, *aroE*, *cfxE*, *gmk*, *gtr*, *hemH*, *leuB*, *mvaK*, *mutS*, *pta*, *pyrR*, *riboseABCD*, *rphE*, *sh1200*, *sh1431*, *tphK*, *tpi*, *ugi*). Их выбор осуществлялся по аналогии со схемами MLST для других видов стафилококков (*S. epidermidis* (<http://sepidermidis.mlst.net/>) и *S. aureus* (<http://saureus.mlst.net/>)), также были протестированы гены, предложенные в работах Ворониной О.Л., 2011; Cavanagh J.P., 2012.

На основании анализа варибельности кандидатных генов для исследуемой группы изолятов *S.haemolyticus* (n = 71) были выбраны семь MLST локусов (*tpi*, *pta*, *sh1200*, *rphE*, *tphK*, *mvaK*, *arcC*). Рассчитанный для предложенной схемы MLST дискриминационный коэффициент Хантана-Гастона составил D = 0,95, что согласно рекомендациям ESGEM (Study Group on Epidemiological Markers) the ESCMID (European Society for Clinical Microbiology and Infectious Diseases) является достаточным для методов типирования бактериальных штаммов.

Согласно предложенной схеме MLST, все тестируемые изоляты (n = 71) были отнесены к 23 различным сиквенс типам (рис.7а). Большинство изолятов принадлежало к ST17 (19/71, 26,8%), ST1 (12/71, 16,9%), и ST5 (9/71, 12,7%). Выявленные сиквенс-типы формируют три клональных комплекса и 14 сингл-тонов-единичных множеств (singletons) (рис. 7б). Как видно из анализа филогенетического дерева и данных, полученных на основе алгоритма eBURST, изоляты, принадлежащие к сиквенс-типам ST1, ST5, ST14, ST17, являются близкородственным и формируют единый кластер. Все изоляты, входящие в этот кластер (n = 45), устойчивы к ряду антибиотиков (оксациллину, эритромицину и гентамицину). На основании сопоставления метаданных о профиле лекарственной устойчивости изолятов из рассматриваемого кластера и диагнозов пациентов, от которых они были выделены, можно предположить, что входящие в этот кластер штаммы относятся к госпитальным.

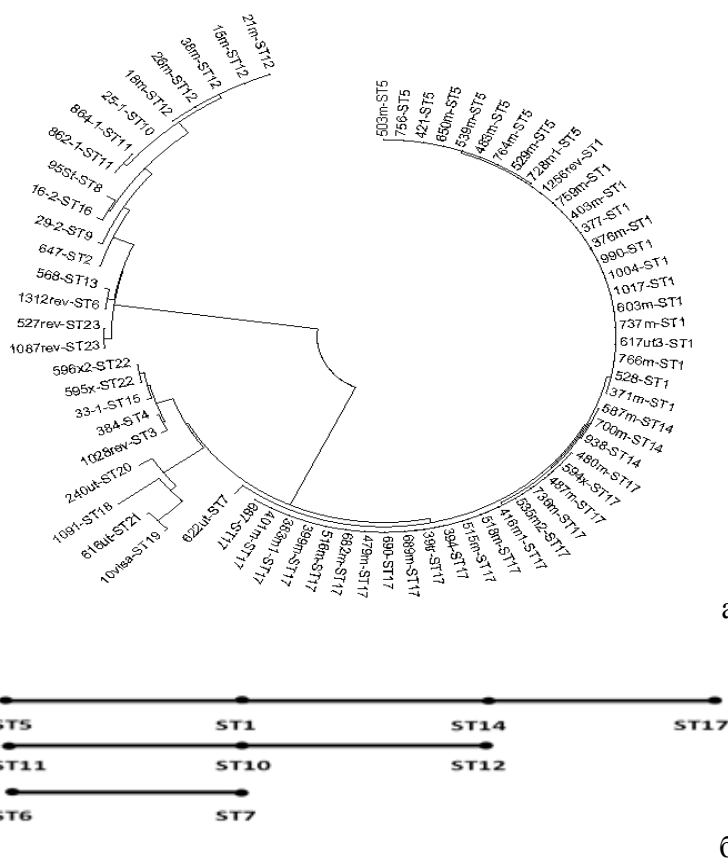


Рисунок 7. Анализ данных MLST изолятов *S. haemolyticus*: (а)

Филогенетическое дерево для исследуемых штаммов *S. haemolyticus*, построенное на основе различий в нуклеотидных последовательностях семи MLST локусов;

(б) Клональные комплексы изолятов *S. haemolyticus*, построенное с помощью алгоритма eBURST

а

б

Проведенное исследование подтверждает клональную структуру популяции и наличие эндемичных клонов у вида *S. haemolyticus*. А так же показывает, что в рамках одного стационара, в данном случае ФГБУ «Научный центр акушерства, гинекологии и перинатологии имени академика В.И. Кулакова» циркулирует ограниченная группа, приспособившихся к условиям стационара, госпитальных штаммов *S. haemolyticus*, сиквенс типы которых относятся к одному клональному комплексу.

Другим методом типирования, предложенным в рамках данной работы, является метод типирования на основании данных прямого бактериального профилирования. Метод прямого масс-спектрометрического профилирования бактериального лизата - один из наиболее востребованных, точных и быстрых методов идентификации микроорганизмов, в том числе и КОС. Он основан на сопоставлении спектров идентифицируемого микроорганизма со спектрами, содержащимися в базе данных. В рамках диссертационной работы был предложен метод типирования, основанный на расчете корреляционных коэффициентов (КК) МАЛДИ масс-спектров, полученных в ходе идентификации методом прямого масс-спектрометрического профилирования бактериального лизата и дальнейшем построении матрицы корреляционных коэффициентов. Изоляты *S. haemolyticus* коллекции были разделены на две группы: изоляты из ФГБУ «Научный центр акушерства, гинекологии и перинатологии имени академика В.И. Кулакова» (48 изолятов), а также изоляты из других больниц России (23 изолята). Значение КК для коллекции из ФГБУ «Научный центр акушерства, гинекологии



и перинатологии имени академика В.И. Кулакова» превышало значение КК для различных стационаров ( $0,666 \pm 0,241$  и  $0,577 \pm 0,220$ , соответственно). Эти данные свидетельствуют о том, что изоляты *S.haemolyticus*, циркулирующие в одном стационаре связаны более тесным родством, чем изоляты из нескольких различных стационаров, что хорошо согласуется с ранее опубликованными данными. Не смотря на это, нужно отметить, что группа, образованная изолятами из ФГБУ «Научный центр акушерства, гинекологии и перинатологии имени академика В.И. Кулакова» не является однородной. В составе этой группы можно выделить кластер близкородственных изолятов (50%; 24/48, КК  $0,904 \pm 0,005$ ), который доминирует в данном стационаре, а также единичные изоляты, не обладающие тесным родством с остальными изолятами стационара. Надо отметить, что данные типирования предлагаемым методом хорошо согласуются с данными MLST. Так среди изолятов, полученных из ФГБУ «Научный центр акушерства, гинекологии и перинатологии имени академика В.И. Кулакова» наиболее сильно отличаются КК масс-спектров изолятов 568 (КК  $0,064 \pm 0,037$ ), 647m (КК  $0,376 \pm 0,194$ ) и 1091 (КК  $0,436 \pm 0,158$ ), что также подтверждается данными MLST типирования. Сиквенс-типы этих изолятов (ST2, ST13, ST18) не входят в клональный комплекс, характеризующий изоляты ФГБУ «Научный центр акушерства, гинекологии и перинатологии имени академика В.И. Кулакова». Возможно данные изоляты (возможно и соответствующие сиквенс-типы) не являются госпитальными, и характеризуют случаи контаминации.

Как объекты для исследования потенциальных механизмов патогенности *S.haemolyticus* были отобраны три госпитальных изолята (SH39, SH421, SH527), и один, предположительно, негоспитальный изолят (SH864-1). Для этих изолятов проведено полногеномное секвенирование, данные депонированы в NCBI (JRAW000000000, JRAZ000000000, JRAY000000000, JRAX000000000). На основании полученных геномных секвенсов и 168 геномных последовательностей *S.haemolyticus*, представленных в базе NCBI, было рассчитано число генов «основного» и «дополнительного» геномов, 1439 и 5830 генов, соответственно.

Филогенетическое дерево, построенное на основании последовательностей генов «основного» генома показало, что изоляты SH39, SH421 являются близкородственными (рис. 8) и группируются совместно с госпитальными штаммами Sh29/312/L2 и 1HT3, выделенными из крови и кишечника человека. Два других изолята SH527 и SH864-1 располагаются на удаленных ветвях дерева. При этом изолят SH527, выделенный из крови человека, стоит отдельно, тогда как SH864-1 группируется со штаммами 1292SHAЕ и 51-72, которые выделены из организма человека, причем 51-72 получен из отделяемого носа.

В целом, филогенетическое распределение изолятов на основании полногеномных последовательностей согласуются с кластеризацией, полученной в результате их молекулярного типирования.

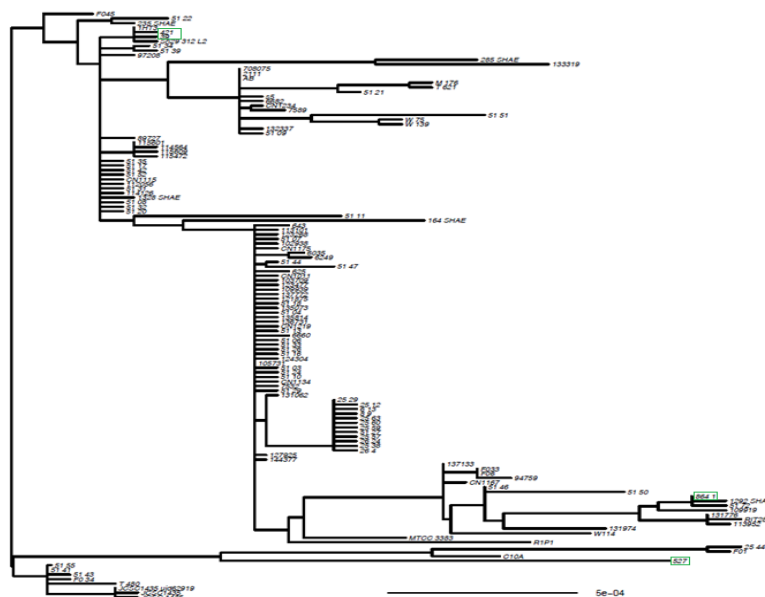


Рисунок 8. Сравнительный филогенетический анализ изолятов *S. haemolyticus*, основанный на данных об однонуклеотидных заменах в генах «основного» генома (зеленой рамкой отмечены исследуемые изоляты SH39, SH421, SH528, SH864-1)

Используя полученные данные полногеномного секвенирования изолятов SH528, SH39, SH421, SH864-1 произведен поиск известных ФВП стафилококков, а также различных мобильных элементов и профагов. В качестве референсного штамма использовали штамм *S. haemolyticus* JCSC1435 (AP006716.1), выделенный из клинического материала. В составе геномных последовательностей изолятов SH528, SH39, SH421, SH864-1 был выявлен ряд генов ФВП стафилококков: токсинов, гемолизинов, ферментов, участвующих в формировании капсулы и биопленки, различных секретируемых ферментов. Наибольший интерес представляют гены токсинов, обнаруженные у изолятов SH421, SH527 и SH864-1, а так же гены гемолизинов, присутствующие у всех исследуемых изолятов. Аминокислотные последовательности гипотетических токсинов SH527 и SH421 гомологичны на 85% при длине сопоставления 96%. Для изолята SH864-1 показано наличие аминокислотной последовательности гипотетического энтеротоксина. В профилях ФВП исследуемых изолятов присутствуют два типа гемолизинов, причем аминокислотная последовательность гемолизина III изолята SH864-1 нарушена. Кроме того, аминокислотные последовательности найденных секретируемых ферментов исследуемых изолятов отличаются от аналогичных последовательностей ферментов штамма JCSC1435. В частности, кодируемая геном *lip* липаза изолята SH527 идентична таковой штамма JCSC1435, однако у изолятов SH421, SH39 и SH864-1 последовательность этого белка сильно изменена. Обнаруженные многочисленные аминокислотные замены, 37 для липазы изолятов SH421, SH39 и 27 - для SH864-1, могли отразиться на функциональности этого белка, его ферментативной активности.

Важным механизмом патогенности стафилококков является их способность формировать биопленки. На сегодняшний день много работ, посвященных формированию биопленок бактериями видов *S. aureus*, *S. epidermidis*, но вопрос об образовании биопленки видом *S. haemolyticus* изучен не достаточно. На основании геномных данных у всех исследуемых изолятов *S. haemolyticus* выявлены гены, продукты которых

ответственны за формирование биопленок: ген фибронектин связывающего белка, ген эластин связывающего белка, ген аутолизина. Кроме того, у исследуемых изолятов *S. haemolyticus* обнаружен ген *icaC* оперона *icaABCD*, ответственного за формирование полисахаридного матрикса биопленки. Возможно, остальные гены этого оперона имеют сильно отличающуюся нуклеотидную последовательность от нуклеотидной последовательности генов *icaABCD* оперона *S.epidermidis*, на основании которой проводилась аннотация.

Часто гены токсинов и других ФВП находятся в геноме в составе так называемых островков патогенности, относящихся к мобильным элементам. Вследствие чего был осуществлен поиск мобильных элементов в составе геномов исследуемых изолятов. Так в ходе анализа «дополнительного» генома были выявлены нуклеотидные последовательности профагов, входящие в состав полногеномных последовательностей изолятов SH39, SH421, SH527. Нуклеотидные последовательности, гомологичные профагам, имели покрытие приблизительно равное среднему покрытию по геному, а короткие прочтения с прибора, содержащие профаги, имели общие участки бактериальной хромосомой. Эти данные свидетельствуют о том, что нуклеотидные последовательности профагов находятся в интегрированном состоянии в составе геномов SH39, SH421, SH527. Для некоторых профагов, содержащихся в последовательности контигов 47, 48 изолята SH527 и контига 8 изолята SH39 удалось установить ближайшего гомолога, им оказалась нуклеотидная последовательность фага стафилококков IME-SA4. У изолята SH864-1 профаговых последовательностей в составе генома выявлено не было. Установлено, что гены токсинов изолятов SH527 и SH421 располагаются в контигах, аннотированных как профаги. Сочетание генов токсинов с генами фаговых белков может рассматриваться как потенциальный мобильный элемент. Мобильные элементы, в том числе и профаги, вносят значительный вклад в патогенность стафилококков, что было показано на примере *S.aureus*. Они участвуют во внутри- и межвидовом переносе генов, который обуславливает распространение генов ФВП в популяции. Наличие в полногеномных последовательностях исследуемых изолятов *S. haemolyticus* профагов, содержащих в своем составе гены токсинов, повышает вирулентный потенциал данных изолятов за счет возможности горизонтального переноса генов ФВП.

Таким образом, с помощью полногеномного секвенирования были получены данные о наличии у исследуемых изолятов *S. haemolyticus* ряда генов, продукты которых являются потенциальными ФВП. Для подтверждения полученных данных были проведены эксперименты по определению способности этих изолятов образовывать биопленку на поверхности пластика; модельные эксперименты, описывающие взаимодействия исследуемых изолятов *S.haemolyticus* с культурой клеток человека; а также эксперименты по определению гемолитической активности исследуемых изолятов.

Способность к формированию биопленок на пластике изолятами *S.haemolyticus* SH39, SH421, SH527 и SH864-1 оценивали стандартным методом окраски полисахаридного экзоматрикса кристаллическим фиолетовым через 24 и 48 часов (рис.9). Изолят SH527 обладал наибольшей способностью к адгезии и был выбран для дальнейшего изучения процессов пленкообразования и взаимодействия с клетками человека с помощью СЭМ.

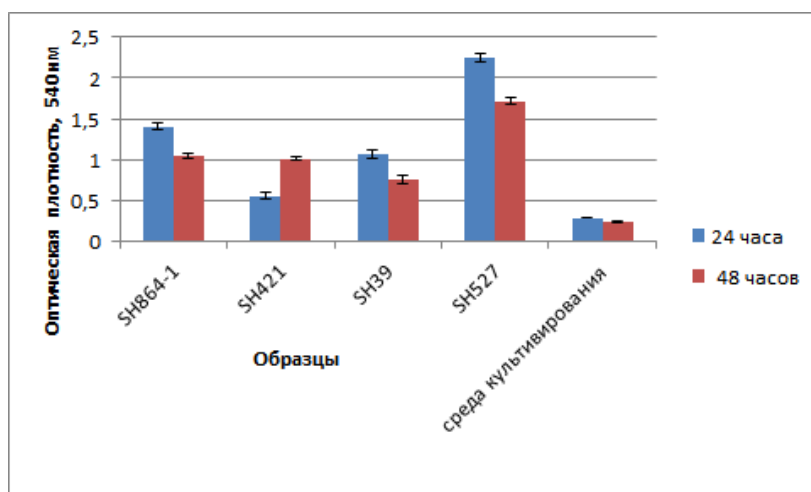
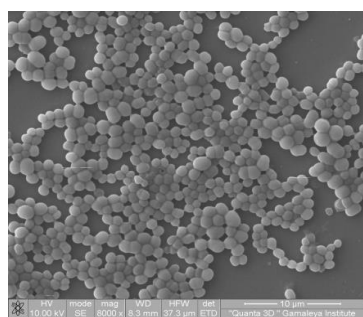
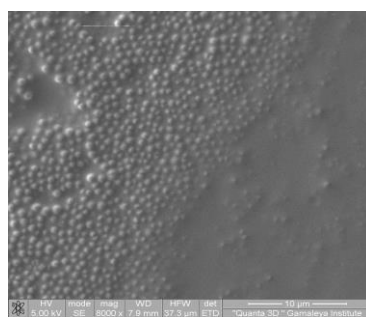


Рисунок 9. Сравнительная оценка способности формирования биопленок изолятами *S. haemolyticus* на поверхности пластика (через 24 часа и 48 часов)

Как и в случае изучения взаимодействия клеток человека с изолятами *S. epidermidis*, изоляты *S. haemolyticus* сокультивировали с культурой эпителиальных клеток HT-29. При изучении образования биопленок непосредственно на планшете изолят *S. haemolyticus* SH527 образовывал биопленку уже через 24 часа (рис. 10). В тоже время при его культивировании на монослое клеток HT-29 образование биопленки было зафиксировано только через 48 часов (рис.11). Эти данные свидетельствуют о том, что различия в условиях культивирования могут повлиять на факт формирования биопленки, образуемой стафилококками.

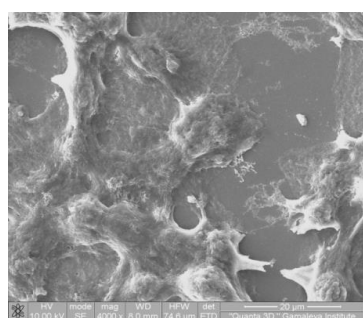


А

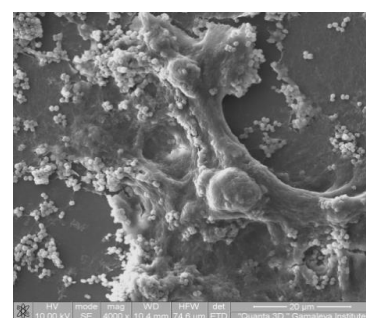


В

Рисунок 10. А, В Сканограммы бактериальной культуры *S. haemolyticus* SE527 увеличение X 8000 (срок инкубации: 24 часа, 48 часов, соответственно)

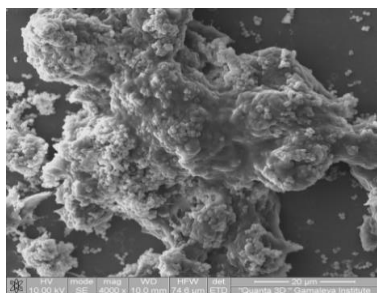


А

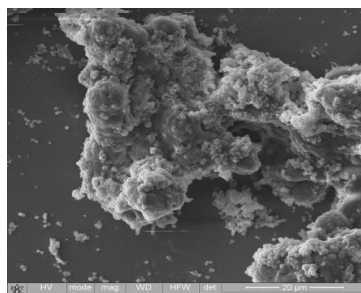


В

Рисунок 11. Сканограмма взаимодействия культуры клеток человека HT-29 с *S. haemolyticus* SH527: А - Препарат клеточной культуры HT-29 после 24 часов инкубации со средой культивирования стафилококков (контроль),



C



D

увеличение X 4000, В, С, D - Сканограмма препаратов, отражающих взаимодействие SH527 с HT-29 на сроках инкубации, соответственно 3 часа, 24 часа, 48 часов, соответственно

Инфицирование клеточного пласта HT-29 изолятом SH527 на первом этапе (1-2 часа) характеризуется адгезией бактерий к межклеточному матриксу культуры клеток HT29. В процессе взаимодействия с культурой клеток изолята SH527 происходило изменение архитектоники клеточного пласта HT-29 с последующим его разрушением, отчетливые признаки деструкции клеточного пласта наблюдали через 24 часа инкубации. Структур аналогичных «теням» клеток, наблюдаемых при взаимодействии клеток HT-29 с *S. epidermidis* SE36-1, выявлено не было.

Для изолятов *S. haemolyticus* SH527, SH39, SH421, SH864-1 была проведена оценка гемолитической активности в экспериментах по воздействию культуральной жидкости этих изолятов на эритроциты человека (рис.12). Госпитальные изоляты SH39, SH421, SH527 в большей степени вызывали гемолиз эритроцитов, чем изолят SH864-1, предположительно, имеющий негоспитальное происхождение. Максимальная гемолитическая активность была зафиксирована у изолята SH527, выделенного из крови пациента с диагнозом сепсис.

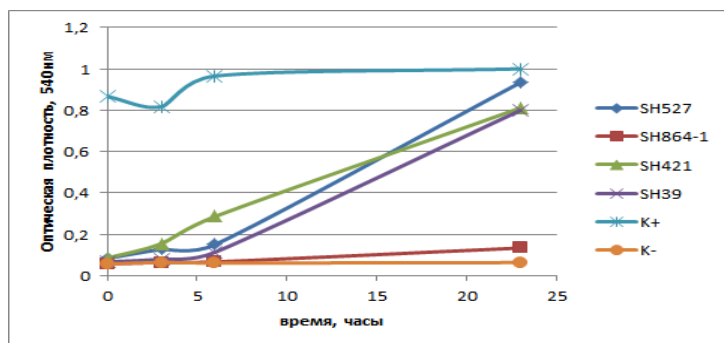


Рисунок 12. Гемолитическая активность культуральной жидкости *S. haemolyticus*. («K+» - положительный контроль (полный гемолиз эритроцитов); «K-» - отрицательный контроль (отсутствие гемолиза эритроцитов))

На примере этого изолята были поставлены эксперименты с использованием протеомных методов с целью уточнения ФВП, обуславливающих гемолитическую активность. Были получены белковые профили исходной культуральной жидкости SH527, а также ее хроматографических фракций 4 и 5, для которых предварительно была выявлена гемолитическая активность. Наиболее интересным из выявленных секретируемых белков, является гипотетический белок SH0168, обладающий триацилглицерол-липазной активностью (EC: 3.1.1.3), под действием которого на липиды мембран эритроцитов, может происходить их лизис. Надо отметить, что при анализе данных полногеномного секвенирования у изолятов SH527, SH39, SH421, SH864-1 были найдены нуклеотидные последовательности, кодирующие ген белка SH0168 - *lip*. АК последовательности этого белка у исследуемых изолятов сильно различались. Триацилглицерол-липаза SH 527 идентична липазе SH0168 референсного штамма JCSC

1435, АК последовательности этого белка для SH39 и SH421 содержала 37 АК замен по отношению к референсному штамму, 27 АК замен обнаружено для соответствующей последовательности SH864-1. Интересно, что наблюдается корреляция между гемолитической активностью изолятов и типом триацилглицерол-липазы. Так госпитальный изолят SH527, выделенный из крови у пациента с диагнозом сепсис, имеющий триацилглицерол-липазу гомологичную липазе референсного штамма, характеризуется максимальной гемолитической активностью. У госпитальных изолятов SH39 и SH421, выделенных из кишечника и зева, соответственно, снижена гемолитическая активность. Для этих изолятов характерна триацилглицерол-липаза второго типа. При этом у изолята SH864-1, негоспитальной природы, гемолитическая активность практически отсутствует, для него характерна триацилглицерол-липаза третьего типа. Для выяснения влияния АК замен в последовательностях липаз трех типов на ферментативную функцию этого белка, были построены структурные модели. На основании данных моделирования было выявлено, что основным структурным элементом исследуемых гипотетических белков является альфа/бета-гидролазный домен. Наличие АК замен в области альфа/бета-гидролазного домена может повлиять на структуру и вызвать нарушение функционирования гипотетических липаз изолятов. Наиболее близким структурным гомологом для гипотетических триацилглицерол-липаз исследуемых изолятов является липаза L1 *Bacillus stearothermophilus*. АК замены в последовательностях триацилглицерол-липаз изолятов SH39, SH421, и SH864-1 снижают гомологию соответствующих моделей с трехмерной структурой липазы *Bacillus stearothermophilus*, наиболее низка эта гомология для модели липазы изолята SH864-1. На основании этих данных можно предположить, что обнаруженные АК замены в последовательностях липаз нарушают структуру данных белков, что ведет к снижению их каталитической активности. Это подтверждают данные о сниженной гемолитической активности SH39 и SH421, а также отсутствие гемолитической активности у изолята SH864-1. Таким образом, можно предположить, что триацилглицерол-липаза, гомологичная белку SH0168 играет ключевую роль в процессе гемолиза эритроцитов человека под действием штаммов *S. haemolyticus*.

Полученные данные свидетельствуют о высоком вирулентном потенциале тестируемых госпитальных изолятов *S. haemolyticus* и указывают на возможность распространения обнаруживаемых ФВП за счет горизонтального переноса. Надо отметить, что проведенный анализ данных полногеномного секвенирования хорошо согласуется с фенотипическими характеристиками исследуемых изолятов - способность образовывать биопленки, гемолитическая активность, профиль лекарственной чувствительности. Среди всех исследуемых изолятов *S. haemolyticus* выделяется SH864-1. Этот изолят, выделенный из кала, чувствителен к оксациллину, не обладает гемолитической активностью, имеет отличный от других исследуемых изолятов профиль ФВП, в состав его генома не входят профаги. Выше перечисленные результаты подтверждают его негоспитальное происхождение. Таким образом, при типировании методом МЛСТ, сиквенс-тип ST-11, характеризующий изолят SH864-1, вероятно, будет ассоциирован с негоспитальными изолятами, что в дальнейшем можно использовать в эпидемиологических исследованиях.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Еще недавно КОС рассматривались исключительно как комменсальные микроорганизмы, колонизирующие кожу и слизистые человека и некоторых видов животных, но в процессе накопления клинических и микробиологических данных, описывающих особенности физиологии КОС, на сегодняшний день их клиническая значимость не вызывает сомнений. КОС относят к возбудителям оппортунистических инфекций, возникающих на фоне иммунодефицитного состояния пациента. При этом возбудителей оппортунистических инфекций характеризуют как микроорганизмы со слабовыраженной патогенностью, другими словами у них отсутствует «главный фактор патогенности», например, токсин, определяющий патогенез инфекции. Отсутствие основного агента, определяющего ход инфекционного процесса, сильно затрудняет объяснение механизмов патогенности КОС. Учитывая, что госпитальные изоляты КОС характеризуются множественной лекарственной устойчивостью, крайне необходим строгий эпидемиологический контроль за циркулирующими в стационарах штаммами. В свою очередь это влечет необходимость совершенствовать старые и разрабатывать новые методы типирования КОС, что отчасти было реализовано в настоящей диссертационной работе. К сожалению, на сегодняшний день получено крайне мало данных о молекулярных механизмах патогенности КОС, особенно штаммов вида *S.haemolyticus*, а также о взаимодействии КОС с клетками человека, в диссертационной работе, представлена новая информация, посвященная этим вопросам, позволяющая дополнить те данные, что известны нам о физиологии и механизмах патогенности КОС. В том числе показана роль псевдолизогении в механизмах патогенности изолятов *S.epidermidis*.

## ВЫВОДЫ

1. Среди КОС, выделяемых от пациентов в стационарах России, доминируют виды *S.epidermidis* и *S.haemolyticus*, подавляющее большинство госпитальных изолятов этих видов устойчивы к метициллину
2. С использованием разработанной эффективной схемы MLST для изолятов *S.haemolyticus* ( $D = 0,95$ ) установлена клональная структура популяции анализируемых изолятов *S.haemolyticus*, что также характерно для популяции *S.epidermidis*
4. Выявленный в составе генома госпитального изолята *S.epidermidis* SE36-1 препрофаг  $Sr\beta$  можно расценивать как фактор патогенности, способный в случае перехода на литический путь развития вызвать токсический шок, обусловленный гибелью части бактериальной популяции
5. Обнаруживаемые по результатам аннотации данных полногеномного секвенирования, потенциальные ФВП подтверждают наблюдаемые фенотипические особенности госпитальных изолятов КОС
6. Выявленные в составе геномов госпитальных изолятов *S.haemolyticus* гены токсинов группируются в “острова патогенности” в составе профагов, что указывает на возможность горизонтального переноса их в популяции

### Список работ, опубликованных по теме диссертации:

1. **Корниенко, М. А.**, Ильина, Е. Н., Боровская, А. Д., Эдельштейн, М. В., Сухорукова, М. В., Кострцева, М., Говорун, В. М. Прямое бактериальное профилирование посредством MALDI масс-спектрометрии как метод быстрой классификации штаммов *Staphylococcus aureus* // Биомедицинская химия. 2012. Т 5. С.501-513.
2. Любасовская, Л. А., **Корниенко, М. А.**, Припутневич, Т. В., Ильина, Е. Н., Щеголев, А. И. Микробиологическая и молекулярно-генетическая характеристика коагулазонегативных стафилококков, выделенных у новорожденных отделения реанимации и интенсивной терапии // «Антибиотики и Химиотерапия». 2013. Т. 58; С.3 — 4, 26 – 33.
3. **Корниенко, М. А.**, Копыльцов, В. Н., Шевлягина, Н. В., Диденко, Л. В., Любасовская, Л. А., Припутневич, Т. В., Ильина, Е. Н. Способность стафилококков различных видов к образованию биопленок и их воздействие на клетки человека // Молекулярная генетика микробиология и вирусология. 2016. Т. 1. С.18-25.
4. **Kornienko, M.**, Pina, E., Lubasovskaya, L., Pripudnevich, T., Falova, O., Sukchikch, G., Govorun, V. Analysis of nosocomial *Staphylococcus haemolyticus* by MLST and MALDI-TOF Mass Spectrometry // Infection, Genetics and Evolution. 2016. P. 99-105.

### Материалы трудов конференций:

5. **Kornienko, M.**, Pina, E., Borovskaya, A., Edelstein, M., Sukhorukova, M., Kostrzewa, M., Govorun, V. Direct bacterial profiling by means of MALDI mass-spectrometry as a method of rapid differentiation of *Staphylococcus aureus* strains // Clinical Microbiology and Infection. 2012. V. 18. № s3. P.574.
6. **Корниенко, М. А.**, Ильина, Е. Н., Любасовская, Л. А., Припутневич, Т. В., Говорун, В. М. Молекулярно-генетическая характеристика клинических изолятов *Staphylococcus haemolyticus* по MLST и анализа масс-спектров // Сборник тезисов III международной научно-практической конференции «Постгеномные методы анализа в биологии, лабораторной и клинической медицине». Казань. 2012. С. 147.
7. **Корниенко, М. А.**, Ильина, Е. Н., Любасовская, Л. А., Припутневич, Т. В., Говорун, В. М. типирование изолятов *S. haemolyticus* методами MLST и масс-спектрометрии // Сборник тезисов V Международной школы молодых ученых по молекулярной генетике. Звенигород. 2012. С. 36.
8. Любасовская, Л. А., Припутневич, Т. В., Ильина, Е. Н., **Корниенко, М. А.** Роль коагулазонегативных стафилококков в этиологии госпитальных инфекций у новорожденных ОРВИ // Тезисы XV Международного конгресса МАКМАХ. Москва. 2013. Т. 15, №2, С.27-28.
9. **Корниенко, М. А.**, Манолов, А. И., Каныгина, А. В., Алексеев, Д. Г., Кострюкова, Е. С., Жиленков, Е. Л., Любасовская, Л. А., Припутневич, Т. В., Ильина, Е. Н. Псевдолизогения и ее роль в механизмах патогенности коагулазоотрицательных стафилококков // Проблемы медицинской микологии. 2016. Т.18. N 2. С.80.