

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
«ФЕДЕРАЛЬНЫЙ НАУЧНО-КЛИНИЧЕСКИЙ ЦЕНТР ФИЗИКО-
ХИМИЧЕСКОЙ МЕДИЦИНЫ ФЕДЕРАЛЬНОГО МЕДИКО-
БИОЛОГИЧЕСКОГО АГЕНТСТВА»

на правах рукописи

Корниенко Мария Андреевна

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

(03.02.07 – Генетика)

Диссертация

на соискание ученой степени кандидата биологических наук

Научный руководитель:

доктор биологических наук, профессор РАН, Е.Н. Ильина

МОСКВА, 2016

Оглавление

СПИСОК ИСПОЛЬЗУЕМЫХ СОКРАЩЕНИЙ.....	4
ВЕДЕНИЕ	6
ГЛАВА 1 Современные представления о механизмах патогенности и вирулентности коагулазоотрицательных стафилококков (обзор литературы).....	15
1.1 Коагулазоотрицательные стафилококки - как важнейшие возбудители госпитальных инфекций.....	15
1.2 Факторы вирулентности и патогенности коагулазоотрицательных стафилококков	17
1.2.1 Биопленки коагулазоотрицательных стафилококков.....	17
1.2.2 Секретируемые ферменты и токсины.....	22
1.2.3 Фенол-растворимые модулины	27
1.3 Чувствительность коагулазоотрицательных стафилококков к антибактериальным препаратам.....	30
1.4 Современные подходы к комплексному изучению механизмов патогенности коагулазоотрицательных стафилококков.....	35
1.4.1 Методы идентификации КОС	35
1.4.2 Методы типирования КОС	38
1.4.3 Системный подход к изучению механизмов патогенности КОС	40
ГЛАВА 2 Материалы и методы исследования.....	47
2.1 Объекты исследования.....	47
2.2 Микробиологические и биохимические методы	48
2.3 Микроскопические методы.....	51
2.4 Молекулярно-генетические методы	52
2.5 Протеомные методы.....	63

2.6 Благодарности.....	66
ГЛАВА 3 Результаты.....	68
3.1 Характеристика коллекции КОС	68
3.2 Выявление госпитальных штаммов КОС	71
3.3 Системный анализ индивидуальных штаммов КОС.....	79
3.3.1 Полногеномное секвенирование клинических изолятов <i>S.epidermidis</i>	79
3.3.2 Полногеномное секвенирование клинических изолятов <i>S.haemolyticus</i>	94
3.3.3 Оценка вирулентности исследуемых изолятов КОС	105
Глава 4 Обсуждение	127
4.1 Особенности проявления патогенных свойств госпитальными штаммами <i>S. epidermidis</i>	127
4.2 Особенности проявления патогенных свойств госпитальными штаммами <i>S.haemolyticus</i>	142
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	160
ВЫВОДЫ	162
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ:	163

СПИСОК ИСПОЛЬЗУЕМЫХ СОКРАЩЕНИЙ

АК	-	Аминокислота
ДНК	-	Дезоксирибонуклеиновая кислота
КОЕ	-	колониеобразующие единицы
КОС	-	Коагулазо-отрицательные стафилококки
ЛДГ	-	Лактат дегидрогеназа
МАЛДИ	-	Матрично-активированная лазерная десорбция/ионизация
МПК	-	минимальная подавляющая концентрация
ОРС	-	открытые рамки считывания
РНК	-	Рибонуклеиновая кислота
СЭМ	-	Сканирующая электронная микроскопия
тыс. п.н.	-	тысяч пар нуклеотидов
ФВП	-	Факторы вирулентности и патогенности
ФРМ	-	фенол-растворимых модулинов
ФГБУ		ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ
ФНКЦ		УЧРЕЖДЕНИЕ «ФЕДЕРАЛЬНЫЙ НАУЧНО-
ФХМ		КЛИНИЧЕСКИЙ ЦЕНТР ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКОЙ
ФМБА		МЕДИЦИНЫ ФЕДЕРАЛЬНОГО МЕДИКО-
РОССИИ		БИОЛОГИЧЕСКОГО АГЕНТСТВА»
ЭНМТ	-	экстремально низкая масса тела
ЭПС	-	Экзополисахаридный матрикс
матрикс		
АТСС		AmericanTypeCultureCollection
АIP	-	Аутоиндукторы системы регуляции <i>agrABCD</i>
СС	-	Клональный комплекс от англ. Clonal complex
CLSI	-	Clinical and Laboratory Standards Institute (Институт клинических лабораторных стандартов)
DMEM	-	Dulbecco's Modified Eagle Medium
dNTP	-	Nucleoside triphosphate

ICAT	-	Isotope-Coded Affinity Tag
LC-MS/MS	-	Методы, основанные на жидкостной хроматографии в сочетании с тандемной масс-спектрометрией
MALDI	-	Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization
MLST	-	Мультилокусное-секвенирование типирование (от англ. Multilocus Sequence Typing)
MRM	-	Multiple reaction monitoring
MSCRAMM	-	microbial surface components recognizing adhesive matrix molecules
NCBI	-	The National Center for Biotechnology Information
PIA	-	Polysaccharide intercellular adhesion
PFGE	-	Pulsed field gel electrophoresis
QS	-	Quorum Sensing
SCC	-	Стафилококковая хромосомная кассета
кассета		
SILAC	-	Stable isotopic labeling with amino acids in cell culture
SRM	-	Selected reaction monitoring
ST	-	Сиквенс тип от англ. Sequence type

ВЕДЕНИЕ

Актуальность проблемы

С развитием хирургии, неонатологии, реаниматологии, а также инвазивных манипуляций (гемодиализ, различные катетеры, импланты) значительно возрос риск приобретенных госпитальных (нозокомиальных) инфекции. В свою очередь это привело к росту летальных исходов, вызванных возбудителями госпитальных инфекций, а также к возникновению дополнительных затрат на пребывания пациентов в стационаре. Госпитальные инфекции развиваются у 5-20% пациентов стационаров и в ряде стран являются одной из главных причин преждевременной смерти. В России ежегодно фиксируют 2-2,5 млн. случаев госпитальных инфекций, экономический ущерб при этом составляет ориентировочно 5 - 15 млрд. рублей по данным на 2014 год [1].

Подавляющее большинство инфекции, ассоциированных с пребыванием пациента в стационаре, вызвано условно-патогенными микроорганизмами, образующими биопленки, что способствует их выживанию в окружающей среде. Среди этиологических агентов госпитальных инфекции одну из ведущих ролей занимают коагулазо-отрицательные стафилококки (КОС). КОС выявляют у 30 % пациентов хирургических стационаров, в 30% - 40% случаев внутрибольничных инфекции кровотока [2, 3]. Кроме того, инфекционные процессы, вызываемые КОС, часто ассоциированы с длительным использованием катетеров. Наиболее подвержены КОС-инфекциям новорожденные дети [4-6]. Среди КОС наибольшее клиническое значение имеют виды *Staphylococcus epidermidis* и *Staphylococcus haemolyticus*. Летальность при сепсисе, вызванным *S. epidermidis* составляет 27,0 - 44,7 % [1]. Однако, данных о механизмах патогенности КОС существенно меньше по сравнению с таковыми для коагулазоположительного стафилококка - *Staphylococcus aureus* [7]. Наиболее изученными факторами вирулентности и патогенности (ФВП) КОС являются факторы, обуславливающие способность формирования биопленок [8, 9]. Кроме того, к

ФВП КОС относят: продукцию фенол-растворимых модулинов, гемолизинов, а также секретируемых ферментов (протеаз, липаз, эстераз, нуклеаз) [7]. Перечисленные факторы обнаруживают (за исключением ФВП, обеспечивающих формирование биопленки), как правило, почти у всех штаммов КОС, при этом вирулентность штаммов КОС может изменяться в широком диапазоне. Это и госпитальные изоляты, которые могут являться причиной летального исхода, и изоляты, выделенные с кожных покровов, ведущие комменсальный образ жизни. Эти данные говорят о присутствии неких дополнительных факторов, влияющих на патогенность и вирулентность КОС, которые требуют дальнейшего изучения. Мировым научным сообществом активно ведется поиск новых ФВП КОС, а также уточнение роли ранее выявленных факторов. Одним из наиболее перспективных методов изучения ФВП КОС является изучение полногеномных нуклеотидных последовательностей изолятов КОС. На сегодняшний день в базе данных NCBI (The National Center for Biotechnology Information) размещены данные 190 полногеномных проектов *S. epidermidis* (из них только в 5 проектах геном *S. epidermidis* представлен полностью собранной нуклеотидной последовательностью хромосомы). Для *S. haemolyticus* в базе данных NCBI содержатся полногеномные последовательности 178 различных штаммов, из них в виде полноразмерной хромосомы представлен геном только одного штамма. На примере использования данных полногеномного секвенирования, были получены интересные сведения об островках патогенности *S. epidermidis* содержащих энтеротоксин С3 и токсин L (SEIL) подобный энтеротоксинам стафилококков [10]. На сегодняшний день, по аналогии с описанными ФВП *S. aureus*, посредством анализа полнонуклеотидных последовательностей *S. epidermidis* выявлен основной набор ФВП для этого вида [11]. Несмотря на большое количество уже накопленных данных о ФВП КОС, вопрос об их роли в патогенезе КОС-ассоциированных инфекций остается открытым.

Параллельно ведутся работы по исследованию механизмов патогенности КОС с помощью активно развивающихся методов протеомики. В отличие от генома, бактериальный протеом является очень динамичной структурой, так как белки в клетке постоянно синтезируются, претерпевают модификации, секретируются и деградируют. Таким образом, протеом представляет собой набор белков, характеризующий клетку в определенных физиологических условиях в определенный момент времени. Протеомика позволяет определить профиль экспрессирующихся белков при воздействии на клетку различных стимулов, в том числе при взаимодействии хозяин-патоген, что делает протеомику удобным методом исследования механизмов вирулентности и патогенности бактерий. На сегодняшний день, опираясь на данные полногеномного секвенирования, с помощью методов протеомики (высоко эффективной жидкостной хроматографии в сочетании с масс-спектрометрией) для ряда микроорганизмов (*Mycobacterium tuberculosis*, *S.aureus*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli* и др.) было идентифицировано 60-97% белков от их теоретически предсказанного количества [12-15].

Современный подход исследований механизмов патогенности микроорганизмов, в том числе и КОС, базируется на комплексном исследовании, включающем в себя анализ микробиологических, биохимических, протеомных данных, а также данных полногеномного секвенирования. Кроме того, исследование должно включать данные о клиническом происхождении изолятов (диагноз и историю болезни пациента, от которого получен изолят). Большой вклад в исследование вносят данные модельных экспериментов, подтверждающие выдвинутые гипотезы о механизмах патогенности.

Целью настоящего исследования является

раскрытие особенностей молекулярных механизмов проявления патогенности коагулазоотрицательными стафилококками

Для достижения поставленной цели необходимо решить следующие задачи:

1. Создание коллекции КОС изолятов и изучение видового разнообразия КОС, а также фенотипическая характеристика госпитальных изолятов (определение профиля лекарственной чувствительности)
2. Выявление группы госпитальных изолятов клинически-значимых КОС (*S. epidermidis*, *S. haemolyticus*) посредством молекулярного типирования изолятов
3. Полногеномное секвенирование ДНК отдельных госпитальных изолятов *S. epidermidis* и *S. haemolyticus*, общий анализ данных полногеномного секвенирования (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 проверка выдвинутых гипотез 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 их идентификации 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 (Spβlike)
- Предложен количественный способ оценки гемолитической активности изолятов 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 посредством измерения активности клеточной лактатдегидрогеназы

Теоретическая и практическая значимость:

В рамках диссертационной работы описаны новые факторы, вносящие вклад в механизм патогенности КОС. Подробно рассмотрены процессы образования биопленок КОС, гемолиза эритроцитов человека под действием КОС, а также уточнены ФВП, характерные для госпитальных изолятов КОС, выделенных в стационарах России. Полученные данные позволяют более полно объяснить механизмы патогенности КОС. Кроме того, в ходе работы разработаны новые подходы типирования госпитальных изолятов КОС с целью улучшения качества эпидемиологических исследований, а также предложены количественные методы оценки гемолитической активности и цитотоксичности КОС.

Методология и методы исследования

Диссертация выполнена с использованием современных

микробиологических и биохимических методов (видовая идентификация микроорганизмов посредством автоматического бактериологического анализатора Vitek2Compact и МАЛДИ масс-спектрометрии, определение гемолитической активности КОС и активности лактатдегидрогеназы клеток человека), методов микроскопии (сканирующая электронная микроскопия, просвечивающая электронная микроскопия). В работе использованы новейшие методы работы с нуклеиновыми кислотами и белками (полногеномное секвенирование, протеомное профилирование), а также биоинформатические методы анализа данных.

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*

Степень достоверности и апробация результатов:

Достоверность результатов данной диссертационной работы

реализована за счет сочетания современных методов и оборудования, использованных при ее выполнении, а также новейших данных мирового научного сообщества по разрабатываемой тематике, учитываемых при анализе и обсуждении, полученных результатов. Научные положения и выводы, изложенные в диссертации, обоснованы и подтверждены фактическим материалом.

Основные положения и результаты, полученные в ходе диссертационной работы, были доложены на расширенном межлабораторном заседании Отдела молекулярной биологии и генетики ФГБУ ФНКЦ ФХМ ФМБА России (Москва, 29 июня 2016 г.), а также в ходе ряда конференций:

- 22nd European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, London, United Kingdom, 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 - 2013
- 24th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, Barcelona, Spain, май 2014
- Всероссийская научно-практическая конференция по медицинской микробиологии и клинической микологии (XVII Кашкинские чтения), Санкт-Петербург, 9 – 11 июня 2014
- 26th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, Amsterdam, Netherlands, апрель 2016
- Российско-китайская научно-практическая конференция по медицинской микробиологии и клинической микологии (XIX Кашкинские чтения), Санкт-Петербург, 14 – 16 июня 2016

Публикации:

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

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. **Kornienko, M.**, Ilina, 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*. V. 18. № s3. P.574.
3. **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.
4. **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.
5. 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.

6. 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.
7. **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.
8. **Kornienko, M.**, Ilina, E., Lubasovskaya, L., Priputnevich, T., Falova, O., Sukchikch, G., Govorun, V. Analysis of nosocomial *Staphylococcus haemolyticus* by MLST and MALDI-TOF Mass Spectrometry // Infection, Genetics and Evolutio. 2016. P. 99-105.
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.

Структура и объем диссертации:

Диссертационная работа состоит из введения и 8 глав, включающих введение, обзор литературы, материалы и методы, собственные исследования и их результаты, обсуждения результатов, а так же заключение, выводы и список литературы. Работа изложена на 186 страницах машинописного текста, иллюстрирована 24 таблицами и 23 рисунками.

Указатель литературы содержит 187 источника.

ГЛАВА 1 Современные представления о механизмах патогенности и вирулентности коагулазоотрицательных стафилококков (обзор литературы)

1.1 Коагулазоотрицательные стафилококки - как важнейшие возбудители госпитальных инфекций

Род *Staphylococcus* на сегодняшний день объединяет более 70 видов. Стафилококки различных видов могут вызывать такие инфекционные процессы как поражение мягких тканей, эндокардит, остеомиелит, сепсис, пневмонию, синдром токсического шока и пищевые отравления [16, 17], что обуславливает важность их исследования. Общий показатель смертности от бактериемии, вызванной стафилококками, колеблется от 11 до 43 % [18]. По способности коагулировать плазму кролика стафилококки подразделяют на две группы: коагулазоположительные и коагулазоотрицательные. Надо отметить, что представители этих групп характеризуются разной вирулентностью. Наиболее патогенным является коагулазоположительный вид *Staphylococcus aureus*. Эти бактерии обладают широким набором различных ФВП, которые обеспечивают их адгезию и инвазию, формирование биопленок, продукцию токсинов, а также способствуют подавлению иммунного ответа человека [19]. Частота послеоперационных осложнений, вызванных метициллин-устойчивыми *S. aureus*, достигает 33% [20]. В то время как, КОС являются представителями нормальной микрофлоры кожи и слизистых оболочек человека. На 1 см² кожи здорового взрослого человека находится от 10 до 10⁵ колониеобразующих единиц (КОЕ) КОС [21]. К КОС относят около 40 видов стафилококков, таких как: *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus haemolyticus*, *Staphylococcus capitis*, *Staphylococcus saprophyticus*, *Staphylococcus hominis* и др. С другой стороны, на сегодняшний день, КОС принято рассматривать как условно-патогенные микроорганизмы, являющиеся причиной госпитальных или нозокомиальных инфекций [22, 23].

По определению Всемирной Организации Здравоохранения госпитальной инфекцией считается любое клинически выраженное заболевание микробного происхождения, возникшее вследствие госпитализации пациента или посещения лечебного учреждения с целью лечения. Госпитальные инфекции обычно выявляют через 48 часов или более после поступления пациента в лечебное учреждение, при условии отсутствия клинических проявлений инфекционных процессов в момент госпитализации. Со второй половины XX века проблема госпитальных инфекций приобрела глобальный характер. Количество случаев госпитальных инфекций колеблется от 1% в Северной Европе и более чем 40% случаев в некоторых частях Азии, Южной Америки и Африки [24]. Для промышленно развитых стран в среднем у 8,7 % всех госпитализированных пациентов фиксируют случаи внутрибольничных инфекций.

КОС являются возбудителями от 30% до 40% случаев внутрибольничных инфекции кровотока, наиболее часто ассоциированных с длительным использованием катетеров [21]. Кроме того, КОС выявляют у 30 % пациентов хирургических стационаров [2, 25]. 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 бактериемии вызвано представителями КОС [4, 6, 21]. Высокие показатели случаев КОС-ассоциированных инфекций у новорожденных детей, особенно с низкой и экстремально низкой массой тела, связаны с наличием у них еще не до конца сформировавшейся иммунной системы. Кроме того, новорожденные дети с низкой и экстремально низкой массой тела подвергаются различным инвазивным процедурам (катетеризации, механической вентиляции легких, парентеральному питанию и др.), что также увеличивает риск возникновения инфекционных процессов.

Было установлено, что среди КОС наибольшее клиническое значение

имеют виды *S. epidermidis* и *S. haemolyticus* [21, 26]. При этом о механизмах вирулентности и патогенности этих видов известно крайне мало. Описано небольшое количество генов, ответственных за синтез потенциальных ФВП КОС. Наиболее изучены механизмы патогенности КОС связанные с формированием биопленок. Однако, полученных на сегодняшний день данных не достаточно для объяснения всего патогенного потенциала этих бактерий [7].

1.2 Факторы вирулентности и патогенности коагулазоотрицательных стафилококков

1.2.1 Биопленки коагулазоотрицательных стафилококков

Одним из важнейших ФВП КОС является способность формировать биопленки. Формирование биопленок имеет место на множестве медицинских поверхностей - на катетерах, эндоскопах, внутренних имплантатах, протезах. К инфекционным процессам, осложненным образованием биопленок, относят катетер-ассоциированные инфекции кровотока, инфекционный эндокардит, хроническую обструктивную болезнь лёгких, муковисцидоз, хронический остеомиелит, инфекции мочевыводящих путей, инфекции протезированных клапанов и суставов, инфекции ротовой полости (зубной камень, кариес, гингивит), и т.д. [27]. Бактериальная биопленка представляет собой сложную систему, состоящую из собственно бактерий и связанного с ними внеклеточного матрикса. В составе внеклеточного матрикса можно выделить несколько составляющих: экзополисахариды, белки, а также внеклеточная ДНК и липиды. [28, 29]. Бактерии в составе биопленки обладают повышенной толерантностью к эффекторам иммунной системы и к антибактериальным препаратам, что ведет к существенному снижению эффективности антибактериальной терапии. При этом микроорганизмы в составе биопленки чаще всего

проявляют устойчивость сразу к нескольким классам антибактериальных препаратов [28].

В процессе формирования биопленок различают несколько стадий: прикрепление к инородной поверхности клеток, адгезия, созревание и дисперсия биопленки. Прикрепление клеток к инородной поверхности происходит за счет неспецифических взаимодействий, основанных на физико-химических свойствах поверхности и клеток, таких, как полярность, заряд и т.п. Эта стадия является обратимой и длится несколько секунд. Во время последующей стадии – адгезии – происходит агрегация клеток на поверхности, синтез различных адгезинов и начало формирования экзополисахаридного матрикса (ЭПС матрикса). Способность к адгезии у стафилококков связана с синтезом поверхностных белков-адгезинов, так называемых микробных поверхностных компонентов, распознающих адгезивные матричные молекулы (MSCRAMM - “microbial surface components recognizing adhesive matrix molecules”) [30]. К семейству белков MSCRAMM относят бактериальные белки, которые способны связываться с такими белками человека, как фибриноген, фибронектин, коллаген, витронектин. Большинство этих белков имеют характерные С-концевые последовательности (LPXTG мотив), которые ковалентно связаны с клеточной стенкой стафилококков [11]. Белки этого семейства хорошо описаны для коагулазоположительного вида стафилококков- *S. aureus* (ClfA и ClfB- клампинг-факторы А и В, Spa-коллаген-связывающий белок, Eap-внеклеточный адгезивный белок, EbpS –эластин-связывающий белок, FnBPs – фибронектин-связывающие белки, SDr - Ser-Asp богатые белки) [31]. Для КОС также описаны белки этого семейства. Одним из ключевых белков MSCRAMM семейства у КОС является белок SdrG, так же называемый Fbe. Этот белок обладает фибриноген-связывающей способностью, что обеспечивает прикрепление клеток КОС к поверхностям, покрытым

фибриногеном, например, имплантам или катетерам [32, 33]. Белок SdrG присутствует у большинства штаммов *S. epidermidis*. Этот белок с молекулярной массой 119 кДа, гомологичен фибриноген-связывающим белкам *S. aureus*, клампинг-факторам ClfA и ClfB [34]. Другим представителем белков семейства MSCRAMM является белок - ассоциированный с аккумуляцией (the accumulation-associated protein, Aap). Aap отвечает за формирование цинк-зависимых фибрилл на поверхности клеток *S. epidermidis* [35-37]. Кроме этого у изолятов вида *S. epidermidis* был обнаружен еще один белок из этого семейства - фибронектин-связывающий белок Embp [38]. У нескольких представителей вида *S. epidermidis* был найден белок SdrF, который отвечает за взаимодействие с коллагеном первого типа [39].

При достижении определенной плотности клеток, прикрепившихся к поверхности, наступает стадия созревания биопленки, в ходе которой формируется собственно структура биопленки за счет синтеза клеткой полисахаридов. Среди биопленок, образуемых КОС, наиболее изучены механизмы и компоненты биопленок, формируемых *S. epidermidis*. Для других видов КОС, к сожалению, данных о компонентах биопленок, в том числе и полисахаридной составляющей, крайне мало или они отсутствуют. Было установлено, что большинство изолятов *S. epidermidis*, способных образовывать биопленку, формирует так называемые *ica*-зависимые биопленки. Основным компонентом, *ica*-зависимых биопленок является полисахарид-полимер β -1,6-N ацетилглюкозамина, получивший название полисахаридный межклеточный адгезин (от английского polysaccharide – intercellular adhesion (PIA)). За синтез PIA ответственен оперон *icaABCD* [40]. Он состоит из четырех генов: *icaA* (1238 п.н.), *icaD* (305 п.н.), *icaC* (869 п.н.), *icaB* (1238 п.н.) и находится под регуляцией гена репрессора *icaR*. Ген *icaA* кодирует мембранный белок IcaA, обладающий N-ацетилглюкозамин

трансферазной активностью. Белок IcaA при участии белка IcaD синтезирует из уридин-дифосфат- N-ацетилглюкозамина PIA [11, 41]. Растущую цепь полисахарида на поверхность мембраны клетки стафилококка транспортирует белок IcaC, хотя выявление всех функций белка IcaC требует дальнейших экспериментальных подтверждений [41]. После экспорта PIA на поверхность клетки происходит частичное деацетилирование полисахарида белком IcaB, что приводит к появлению частичного положительного заряда [42].

Также надо отметить, что некоторые изоляты *S.epidermidis* образуют биопленку другого типа, основными компонентами внеклеточного матрикса которой являются различные белковые молекулы, такие биопленки называются *ica*-независимыми [43, 44].

Помимо полисахаридов и белков, в состав зрелой биопленки входят внехромосомная ДНК и липиды. При этом в ходе формирования биопленки КОС некоторые ее компоненты, например, внеклеточная ДНК, поступают из лизировавшихся клеток популяции. При этом важно отметить роль лизировавшихся клеток при формировании архитектуры биопленки. В ходе лизиса бактериальных клеток в структуре биопленки формируются каналы, обеспечивающие доступность питательных веществ для клеток из более глубоких слоев биопленки [40].

После созревания биопленки может наступать стадия дисперсии биопленки. Эта стадия характеризуется отделением от «зрелой» биопленки планктонных клеток, которые способствуют дальнейшему распространению бактериальной биопленки.

Нужно отметить, что в зависимости от стадии развития биопленки сильно меняется профиль экспрессии белков бактериальных клеток. Регуляция такой сложной системы, как биопленка, состоящей из множества клеток иногда даже не одного, а нескольких видов микроорганизмов,

основана на так называемой Quorum Sensing (QS) регуляции экспрессии генов. Данный тип регуляции отражает зависимость уровня экспрессии генов микроорганизмов от количества клеток в популяции. Примером такой системы регуляции для стафилококков, в том числе и для КОС, является система регуляции *agrABCD*. Функционирование этой системы детально описано для *S. aureus* [45]. Это двухкомпонентная система, контролирующая экспрессию генов различных ФВП, в том числе генов токсинов и генов, отвечающих за синтез биопленки. Основным принципом этой системы сводится к следующему механизму: размножающиеся бактерии непрерывно выделяют аутоиндукторы (AIP)- небольшие сигнальные молекулы, концентрация которых растет по мере увеличения плотности клеток бактерий в популяции. В данном случае, аутоиндукторами выступают посттрансляционно измененные пептиды (7-9 аминокислотных остатков) - тиолактоны. Локус *agrABCD* транскрибируется с двух промоторов P2 и P3. С промотора P2 идет транскрипция генов *agrB*, *D*, *C* и *A*. *argB* и *argD*, ответственных за формирование AIP. Ген *argB* содержит последовательность пептида предшественника AIP, а продукт гена *argD* переводит пептид - предшественник в форму тиолактона. Белки *ArgA* и *ArgC* представляют собой классический двухкомпонентный сигнальный модуль. При достижении определенного значения концентрации AIP связываются с белком *ArgC*, который является гистидинпротеинкиназой, что приводит к активации *ArgA*, путем фосфорилирования. В свою очередь активированный *ArgA*, связываясь с промоторами P2 и P3, приводит к транскрипции *agrABCD* локуса с промотора P2, и синтезу РНКIII с промотора P3. РНКIII –это последовательность, содержащая 514 нуклеотида, кодирующая δ-гемолизин. Первичной функцией РНКIII является связывание с регуляторами синтеза секретлируемых белков посредством антисмыслового механизма, например, с *Rot* (repressor of toxin). Таким образом, активация *ArgA* ведет к инициации каскада, который контролирует экспрессию множества факторов

вирулентности (протеаз и токсинов), помимо этого происходит подавление синтеза белков - адгезинов, связанных с формированием биопленок, что было подтверждено в экспериментах по формированию биопленок мутантными *arg*-штаммами золотистого стафилококка [46]. Благодаря такому механизму регуляции происходит скоординированная регуляция экспрессии генов всей популяции. При этом, так как схожий механизм регуляции реализуется многими другими грамм положительными кокками, например, представителями рода *Enterococcus* и *Streptococcus* [47], то состав популяции может быть представлен как одним видом микроорганизмов, так и несколькими видами. Механизм QS у КОС является одним из основных механизмов регуляции, но не единственным. Описаны и другие механизмы, связанные с реализацией генетической программы в рамках формирования биопленок грамм положительных кокков. Например, это такие регуляторные системы как *SarA* (staphylococcal accessory regulator), сигма фактор В, *arlRS* (autolysis related locus).

Как видно из выше изложенного, на сегодняшний день мировым научным сообществом сформулированы основные положения процесса формирования биопленок стафилококков, описаны сложные механизмы их регуляции. Однако основной массив данных накоплен для коагулазоположительного вида *S.aureus*, значительно меньше данных, описывающих биопленки, образованные видом *S. epidermidis*, для вида *S.haemolyticus*—данных о механизме формирования и структуре биопленок практически нет.

1.2.2 Секретируемые ферменты и токсины

Стафилококки продуцируют широкий спектр токсинов: различные энтеротоксины, относящиеся к нескольким серологическим типам А-Е, G, H, I, J, К-R, гемолизины, лейкоцидин Пантона-Валентайна, токсин синдрома токсического шока, эксфолиативные токсины А и В. Большинство

вышеперечисленных токсинов способны синтезировать только штаммы коагулазоположительного вида *S. aureus*. Как показывают многочисленные исследования в отличие от представителей вида *S. aureus* КОС практически не продуцируют токсины [40]. Впервые данные об изолятах КОС, выделенных от пациентов с синдромом токсического шока и продуцировавших токсин термического шока (TSST-1) и энтеротоксин А (SEA) были описаны в работе Crass and Bergdoll (1986) [48]. Впоследствии данные о продукции различных энтеротоксинов и токсина термического шока изолятами КОС были подтверждены другими исследователями [49-52].

Некоторые штаммы видов *Staphylococcus piscifermentis*, *Staphylococcus equorum* и *Staphylococcus succinussub sp. casei*, используют в качестве заквасок в молочно-кислой промышленности [53]. Образование такими штаммами энтеротоксинов может обуславливать опасность пищевых продуктов, произведенных с их использованием. В исследовании Zell др. [54] с помощью метода иммуноблотинга, показано наличие у изолятов КОС (4 различных видов), выделенных из пищевых продуктов и заквасок, различных энтеротоксинов. Результаты, полученные в такого рода исследованиях, подчеркивают необходимость оценки безопасности заквасок на основе КОС, а также иллюстрируют актуальность исследований патогенного потенциала КОС.

Как правило, изоляты стафилококков, синтезирующие энтеротоксины, являются причиной пищевых отравлений. Энтеротоксины стафилококков, а также токсин термического шока относятся к семейству «суперантигенов». Данное семейство характеризуется способностью стимулировать клетки Т-лимфоцитов (~ 20-30%), что приводит к избыточной продукции цитокинов [55]. Различают более 20 серологических типов энтеротоксинов (А-Е, G, H, I, J, K-R). Аминокислотные последовательности энтеротоксинов типов А, D, E гомологичны на 70-90%, в то время как с аминокислотными последовательностями энтеротоксинов типов В, С и токсина термического

шока они гомологичны только на 40-60% [55]. Молекулярная масса энтеротоксинов в среднем составляет 25 кДа. При значительной вариабельности аминокислотной последовательности энтеротоксины обладают идентичными трехмерными структурами [56, 57]. Трехмерные структуры «суперантигенов» обуславливают термостабильность этих белков, а также их устойчивость к кислым значениям рН и воздействию протеаз [58].

Большинство генов, кодирующих энтероксины, расположены на мобильных элементах, в частности в составе плазмид, бактериофагов или островов патогенности [59, 60], что способствует горизонтальному переносу генов этих токсинов между штаммами.

Недавно на основании данных полногеномного секвенирования был описан остров патогенности *S. epidermidis*, содержащий в своем составе токсины- суперантигены: энтеротоксин С 3 (SEC 3) и токсин L подобный энтеротоксинам стафилококков (enterotoxin-like) [10].

Для КОС характерен довольно большой спектр секретируемых ферментов, таких как липазы, протеазы и других экзоферментов [61]. Наиболее хорошо изучены липазы *S. epidermidis*. У этого вида было обнаружено три различных липазы: GehC, GehD и Geh-1 [62, 63]. GehC и Geh1 обладают очень высокой степенью гомологии, и скорее всего, являются штаммовыми вариантами продукта одного гена [61]. Для таких видов КОС, как: *S. haemolyticus*, *Staphylococcus hyicus*, *Staphylococcus warneri* и *Staphylococcus xylosus*-описано по одному виду липаз [64]. Липазы КОС секретируются в виде проформ и затем под действием специфических протеаз переводятся в «зрелые» формы. Несмотря на высокую степень гомологии первичных структур, липазы КОС существенно отличаются друг от друга по биохимическим и каталитическим свойствам, например, по субстратной специфичности и оптимальному значению рН [64]. Липаза *S. hyicus* является уникальной среди липаз стафилококков, так как она обладает

липазной активностью, а также фосфо-липазной активностью. Регуляция продукции липаз у КОС осуществляется посредством системы QS [61]. Данных непосредственных экспериментов, подтверждающих участие липаз в механизмах патогенеза КОС, опубликовано не было. Была выдвинута гипотеза, говорящая о том, что липазы могут вносить вклад в вирулентность стафилококков, за счет сохранения жизнеспособности клеток стафилококков в липидной фракции секрета кожи человека и млекопитающих [61].

Секрецию штаммами КОС протеаз так же рассматривают как предполагаемый ФВП. Для *S. epidermidis* были описаны три различных протеазы: металлопротеаза SerP1, Esp, GluSE. Выше перечисленные протеазы отличаются механизмами действия и субстратной специфичностью. Протеаза SerP1-это белок с молекулярной массой 32739 Да. Частично очищенный белок обладает максимальной активностью при рН от 5 до 7. Его активность ингибируют вещества, взаимодействующие с ионами металлов, в частности с ионами Zn^{2+} , например, ЭДТА и 1,10-фенантролин. Этот факт свидетельствует о том, что данная протеаза относится к классу нейтральных металлопротеаз. SerP1 обладает низкой субстратной специфичностью [65]. Протеаза Esp -это белок молекулярной массой 41 кДа, относящийся к классу цистеиновых протеаз. Нуклеотидная последовательность Esp протеазы гомологична цистеиновой протеазе стафопаин (staphopain) *S. aureus*. Протеолитическую активность этого фермента ингибирует альфа-2-макроглобулин человека [66]. Протеаза GluSE, или как ее еще называют Esp-протеаза – это белок, кодируемый геном *gseA*, с молекулярной массой 27 кДа, относящийся к классу сериновых протеаз. Протеаза GluSE расщепляет белки после глутамата, оптимальным значением рН при этом является 8. Аминокислотная последовательность GluSE на 50,5% гомологична аминокислотной последовательности протеазы V8 (GluV8) *S.aureus*. Кроме того, было показано, что GluSE предпочтительно экспрессируется в

прикрепленной к подложке культуре, что свидетельствует о ее возможной роли в процессе формирования биопленки. Протеаза GluSE разрушает фибриноген, белок С5 комплемента, а также некоторые другие белки, что свидетельствует о ее возможном участии в процессах защиты микробных клеток от иммунной системы человека [66-68]. Были получены интересные данные о влиянии протеаз *S. epidermidis* на клетки коагулазоположительного стафилококка *S. aureus*. В работе Iwase T. и соавторов, 2010 было показано, что продукция сериновой протеазы GluSE *S. epidermidis* предотвращает формирование биопленок представителями вида *S. aureus* [69]. Эта протеиназа разрушает определенные белки матрикса биопленки *S. aureus*, а так же белки клеточной стенки *S. aureus*. По меньшей мере, 75 белков подвергаются деградации под действием этого фермента, включая 11 белков, участвующих в формировании биопленок. Кроме того, GluSE избирательно разрушает некоторые рецепторы *S. aureus*, которые связывают внеклеточные белки человека [70].

Приведенные данные говорят о значительной роли протеаз в механизмах патогенности КОС.

Еще одним важным ФВП стафилококков являются различные гемолизины. Для коагулазоположительного стафилококка *S. aureus* описаны α -, β -, δ -, γ - гемолизины. Гемолизины относятся к мембраноповреждающим токсинам. На сегодняшний день нет данных о чистых белковых препаратах гемолизинов, выделенных от КОС. Все данные о структуре и механизме действия получены на примере гемолизинов, синтезируемых штаммами *S. aureus*. Было установлено, что α -гемолизин, кодируемый геном *hla* (или *yidD*), имеет молекулярную массу 33 кДа [19] и обладает не только цитолитическими свойствами в отношении моноцитов, лимфоцитов, эритроцитов и тромбоцитов, но и необходим для образования биопленок, а так же адгезии бактериальных клеток на поверхности клеток хозяина [19, 71]. β -гемолизин, обладает фосфорилазной активностью и проявляет высокое

сродство к клеточной мембране различных типов клеток [72]. Наиболее детально для КОС описан δ -гемолизин, который на сегодняшний день относят к фенол-растворимым модулинам КОС [73]. На сегодняшний день нет данных о наличии γ -гемолизина у КОС. В основном данные о наличии гемолизинов у КОС получены на основании анализа нуклеотидных последовательностей геномов. Гены гемолизинов выявляют с помощью полимеразной цепной реакции [74], либо в ходе проектов секвенирования полногеномных нуклеотидных последовательностей КОС [11].

1.2.3 Фенол-растворимые модулины

Наиболее широко в последнее время обсуждается участие фенол-растворимых модулинов (ФРМ) в механизмах патогенности КОС. ФРМ впервые были описаны в 1999 как "провоспалительный комплекс", выделенный с помощью экстракции горячим фенолом из культуральной жидкости *S. epidermidis*. В данном исследовании были охарактеризованы три различных пептида, входящие в так называемый "провоспалительный комплекс": PSM α , PSM β и PSM γ [75]. При этом, оказалось, что пептид PSM γ идентичен ранее описанному δ -гемолизину *S. epidermidis* [76]. На сегодняшний день для *S. epidermidis* описаны следующие ФРМ: PSM α , PSM β 1, PSM β 2, PSM δ , PSM ϵ и δ -toxin [42, 77]. Надо отметить, что название ФРМ видоспецифично для стафилококков, т.е. название ФРМ могут совпадать для видов *S. epidermidis* и *S. aureus*, но их последовательности будут различны, далее речь будет идти только о ФРМ *S. epidermidis*. ФРМ классифицируют в соответствии с их длиной: ФРМ α -типа (PSM α , PSM δ , PSM ϵ и δ -токсин)- это пептиды, содержащие от 20 до 25 аминокислот, в то время как ФРМ β -типа (PSM β 1 и PSM β 2) содержат в своем составе 44 аминокислотных остатка. Основные типы ФРМ *S. epidermidis* и их последовательности представлены в **таблице 1**.

Таблица 1. Основные типы ФРМ *S. epidermidis* и их последовательности

ФРМ	Аминокислотная последовательность
PSM α	fMADVIAKIVEIVKGLIDQFTQK
PSM δ	fMSIVSTPEVVKTIVDIVKKFKK
PSM ϵ	fMFIINLVKKVISFIKGLFGNNENE
δ -токсин	fMAADIISTIGDLVKWIIDTVNKFKK
PSM β 1	fMSKLAEAIANTVCAAQDQDWTCLGTSIVDIVESGVSVLG KIFGF
PSM β 2	fMEQLFDAIRSVVDAGINQDWSQLASGIAGIVENGISVISKL LGQ

Все ФРМ имеют структуру α -спирали практически по всей своей длине для более коротких ФРМ α -типа и на карбоксильном конце для более длинных ФРМ β -типа. Для ФРМ характерен различный заряд: ФРМ β -типа заряжены отрицательно, при этом некоторые ФРМ α -типа заряжены положительно, а δ -токсин является нейтрально заряженной молекулой. Многие свойства ФРМ определяются их алифатической структурой, например, их тенденция к агрегации с последующим образованием олигомеров, а также их способность определенным образом располагаться на поверхности и участвовать в формировании структуры биопленки [78-80]. Эти особенности, вероятно, играют определяющую роль в процессах колонизации кожи КОС, а также колонизации ими инородных поверхностей внутри организма человека (имплантов и катетеров).

Помимо ФРМ *S. epidermidis* для других видов КОС были описаны пептиды подобные ФРМ (PSM-like peptides). Так у представителей вида *S. haemolyticus* был обнаружен пептид – ингибитор роста *Neisseria gonorrhoeae* относящийся к ФРМ β типа [81].

Вклад ФРМ в механизмы патогенности стафилококков связывают, во-первых, с цитотоксическими свойствами некоторых ФРМ, во-вторых с

участием ФРМ в синтезе биопленок, кроме того, как упоминалось выше, ФРМ могут обладать антибактериальными свойствами (ФРМ *S. haemolyticus* - как ингибитор роста *N. gonorrhoeae*).

ФРМ активируют HIV-1 LTR в клетках макрофагов, а также индуцируют продукцию цитокинов (TNF-alpha, IL-1beta, IL-6). Продукция ФРМ КОС может приводить к дегрануляции и окислительному взрыву у нейтрофилов [82]. Цитолитические свойства ФРМ были показаны, главным образом, для нейтрофилов человека и овец, а также эритроцитов человека [80, 83]: ФРМδ и ФРМε *S. epidermidis* обладают способностью вызывать лизис нейтрофилов человека [84, 80]. При этом ФРМ β-типа не способны вызывать лизис нейтрофилов [84, 80]. Кроме того, было установлено, что гемолитической активностью обладает только один ФРМ *S. epidermidis* – ФРМδ. Уровень гемолитической активности ФРМδ сопоставим с уровнем гемолитической активности ФРМ *S. aureus* - ФРМα3 [84]. Интересно что, не смотря на тот факт, что в геноме представителей *S. epidermidis* закодированы цитолитические ФМР, например, ФРМδ, уровень продукции цитолитических ФМР *S. epidermidis* очень низок. При этом уровень продукции нецитолитических ФМР β типа значительно выше [84]. Для более патогенного коагулазоположительного вида *S. aureus* наблюдается обратная картина: наиболее высок уровень продукции цитолитических ФМР. Возможно, продукция определенного типа ФМР стафилококками отражает их образ жизни и, соответственно, предполагает разные механизмы патогенеза КОС и *S. aureus* [84, 85].

Помимо цитолитической активности ФРМ принимают участие в формировании биопленок. На сегодняшний день установлено, что бактериальные биопленки имеют характерную трехмерную сложную структуру, пронизанную каналами, которые обеспечивают доступ питательных веществ в более глубокие слои биопленки [86]. Было установлено, что ФРМ β типа *S. epidermidis* участвуют в образовании таких

каналов в биопленке и в поддержании ее структуры [80]. Это подтверждают работы, изучающие образование биопленок у мутантных штаммов, не способных синтезировать ФРМ. Экспрессия ФРМ находится под строгим контролем QS регулятора Arg [42, 87]. Отсутствие у штамма генов, кодирующих ФРМ или регулятор Arg, приводит к уплотнению и утолщению биопленки, при этом биопленка не имеет в своей структуре каналов [79, 80, 88, 89].

Приведенные выше данные показывают, что ФРМ играют важную роль в механизмах патогенности КОС.

1.3 Чувствительность коагулазоотрицательных стафилококков к антибактериальным препаратам

Говоря о лекарственной чувствительности КОС важно отметить, что подавляющее большинство клинических изолятов КОС относится к госпитальным штаммам, которые, как правило, обладают широким спектром устойчивости к различным антибиотикам [90]. Большинство изолятов КОС (70-90% изолятов) устойчивы к метициллину и всем β -лактамным антибиотикам, в то время как для *S. aureus* устойчивыми являются только 20-30% изолятов [90-94]. Среди КОС наиболее часто выделяют устойчивые к метициллину изоляты видов *S. epidermidis* и *S. haemolyticus* [95-99]. Устойчивость стафилококков к метициллину и другим β -лактамным антибиотикам обусловлена продукцией штаммами стафилококка второго пенициллин связывающего белка (РВР2а или РВР2'). Белок РВР2а относится к классу транспептидаз и участвует в синтезе пептидогликана клеточной стенки стафилококков, при этом РВР2а имеет низкую аффинность к большинству полусинтетических пенициллинов, например, метициллину, нафциллину и оксациллину, а также большинству цефемов. Этот белок продолжает функционировать в присутствии β -лактамных антибиотиков. РВР2а кодируется геном *tesA*, входящим в состав мобильного элемента -

Стафилококковой хромосомной кассеты от англ. (Staphylococcal cassette chromosome elements) (SCC касета), размером 21–67 тыс. п. н. [100]. В состав SCC кассеты входят гены рекомбиназ (*ccrA* и *ccrB*), а так же, собственно *tec*-комплекс (оперон), работающий по принципу обратной связи. В состав этого оперона входят гены *tecA*, *tecI*, *tecR1*. Ген *tecA*, как упоминалось выше, кодирует РВР2а белок. Ген *tecI* кодирует белок-репрессор, выполняющий регуляторную функцию. *tecR1* - ген обратной связи, передающий внутрь клетки сигнал о наличии в среде бета-лактамного антибиотика. Кроме того, в состав комплекса входят инсерционные последовательности IS431 и IS1272. Рекомбиназы, кодируемые генами *ccrA* и *ccrB*, обеспечивают ориентацию и интеграцию SCC кассеты. Кроме того, в состав SCC кассеты могут входить дополнительные гены, находящиеся в регионах J1a, J1b. На сегодняшний день описано более 11 различных типов SCC, размером от 20 до 60 Кб [101-104]. Каждый тип SCC несет уникальную комбинацию генов комплекса *tec*, рекомбиназ, а так же дополнительных генов в J регионах [105]. Типы SCC-кассеты КОС отличаются от характерных типов этой кассеты для *S. aureus*. Наиболее высокий уровень устойчивости КОС к оксациллину или цефокситину были ассоциированы с наличием SCC_{tec} типа III [96, 98]. Основные типы SCC-кассет КОС приведены в **таблице 2** по данным обзора Garza-González E., 2010 [102].

Таблица 2. Основные типы SCC кассет КОС

Вид	Источник	Тип SCC кассеты
<i>S. epidermidis</i>	Человек	I, IIa, IIb, III, IV, IVa, IVb, IVc, IVd, V
	Кошки, собаки, курицы	IV, IVb
<i>S. haemolyticus</i>	Человек	I, II, III, IV, V
<i>S. warneri</i>	Человек	IVe
	Собаки	IVb
<i>S. lentus</i>	Овцы, козы,	III

	крупный рогатый скот	
<i>S. sciuri</i>	Человек	III
	Овцы, козы, крупный рогатый скот, свиньи	I, V
<i>S. xylosus</i>	крупный рогатый скот	III
<i>S. saprophyticus</i>	Человек	III (Схожа с типом II/III)
<i>S. hominis</i>	Человек	III
<i>S. capitis</i>	Человек	I, IA, II, III, IV, V

В случаях инфекций, вызванных штаммами КОС устойчивыми к β -лактамам антибиотикам применяют гликопептидные антибиотики, такие как ванкомицин и тейкопланин. Изолятов КОС устойчивых к ванкомицину описано не было, выявлены случаи промежуточной устойчивости КОС к ванкомицину [90]. Были обнаружены устойчивые к тейкопланину (МПК $>$ или $=$ 32 мкг/мл) изоляты КОС, относящиеся к виду *S. haemolyticus* [95].

Описаны изоляты КОС устойчивые к некоторым другим классам антибиотиков, таким как аминогликозиды, тетрациклины, макролиды, и фторхинолоны. КОС часто остаются восприимчивыми к триметоприм-сульфаметоксазолу (от 20% до 40%) и рифампицину. Однако, частота мутации в гене *rpoB*, обуславливающая их устойчивость к рифампицину, высока, из чего следует, что при назначении рифампицина необходимо сочетать его с другим противомикробным препаратом [21].

Одним из последних, разработанных и прошедших клинические испытания, антибиотиков, воздействующих на изоляты КОС, является линезолид. Линезолид введен в клиническую практику с 2001 года. Данный антибиотик относится к классу оксазолидинонов. Зарегистрированы

единичные случаи устойчивости изолятов КОС к этому антибиотику, связанные с мутациями в 23S рРНК, а также мутациями в генах рибосомальных белков L3 и L4, в участках связывания с линезолидом [106-109].

Кроме того, описаны множественные случаи выявления изолятов КОС устойчивых сразу к ряду антибактериальных препаратов [90].

Надо заметить, что образование биопленок изолятами КОС способствует формированию устойчивости к антибиотикам. Для многих антибиотиков, биопленка, сформированная изолятами КОС, является практически непроницаемым барьером. Устойчивость к антибиотикам клеток КОС в составе биопленки связана как с пространственными затруднениями прохождения молекулы антибиотика через биопленку, так и с изменением физиологического состояния бактерий в составе биопленки по сравнению с другими формами роста [110].

В **таблице 3** приведены основные антибактериальные препараты, используемые в борьбе с КОС, а также механизмы устойчивости КОС к этим препаратам [21].

Таблица 3. Основные антибактериальные препараты используемые в борьбе с КОС

Класс антимикробно го препарата	Антимикроб ный препарат	Мишень действия	Механизм, обуславливающи й резистентность	% КОС чувствительны х	
				МРКО С*	МЧК ОС*
Ингибиторы синтеза клеточной стенки					
β-лактамы	пенициллин	Клеточная стенка	β-лактаза (<i>blaZ</i>)	0	<10
β-лактамы	оксациллин	Клеточная стенка	Дополнительный пенициллин	0	100

			связывающий белок		
гликопептиды	ванкомицин	Клеточная стенка	<i>vanA</i>	>99	100
Ингибиторы транскрипции					
Рифамицин	рифампин	РНК полимераза	Мутации в <i>rpoB</i>	80-85	95-99
Ингибиторы ДНК					
Фторхинолоны	ципрофлоксацин	ДНК гираза, топоизомер аза IV	Мутации: <i>grlA</i> , <i>grlB</i> , <i>gyrA</i> , <i>gyrB</i> , <i>norA</i> , MDRpump	40-45	90-95
Ингибиторы синтеза белка					
Аминогликозиды	гентамицин	рибосома	Аминогликозид- модифицирующ ие ферменты (<i>aac</i> , <i>aph</i>)	40-45	90-95
Тетрациклины	тетрациклин	рибосома	Активный эффлюкс	75-80	80-85
Хлорамфеникол	хлорамфеникол	рибосома	Ацетилирование антибиотика	72-77	90-95
Макролиды	эритромицин	рибосома	Рибосомальные метилазы (<i>ermA</i> , <i>ermB</i> , <i>ermC</i>) Эффлюкс (<i>msrA</i>)	20-25	60-65
Линкозамиды	клиндамицин	рибосома	Рибосомальные метилазы	40-50	88-92
Стрептограмины	стрептограмины	рибосома	Рибосомальные	Резистентность	

н	нВ		метилазы	редка
Стрептограми н	стрептограми нА	рибосома	Ацетилтрансфер азы, эффлюкс	Резистентность редка
Оксазолидино н	линезолид	рибосома	23рРНК мутации, мутации в генах 50S субъединицы рибосомы	Резистентность редка
Глицилциклин	тигециклин	рибосома	Не известно	Резистентность редка
Изменение мембраны				
Липопептиды	даптомицин	Клеточная мембрана	Не известно	Резистентность редка

*МРКОС- устойчивые к метициллину КОС

МЧКОС- чувствительные к метициллину КОС

1.4 Современные подходы к комплексному изучению механизмов патогенности коагулазоотрицательных стафилококков

1.4.1 Методы идентификации КОС

Первоначально, различные виды КОС идентифицировали на основании морфологии колоний и результатов биохимических методов, таких как тест на коагуляцию плазмы крови кролика, а так же сбраживание различных сахаров, рост на агаре, содержащем различные концентрации NaCl, продукция ацетона и др. [111-113]. Разработаны коммерческие наборы для идентификации стафилококков на основании биохимических методов: ID 32 Staph (bioMérieux, Marcy l'Etoile, France) и VITEK 2 (bioMérieux). На сегодняшний день, широко используются молекулярно-генетические методы

идентификации КОС, обладающие большей дифференцирующей способностью, чем биохимические методы [114-116]. Наиболее распространенным молекулярно-генетическим методом является секвенирование рибосомальных генов *16SpPHK* идентифицируемых бактериальных культур [117-118]. Еще в 1980-х годах была продемонстрирована связь между изменениями очень консервативной нуклеотидной последовательности рибосомальных генов и филогенетическим родством различных видов микроорганизмов [119]. Использование именно нуклеотидной последовательности гена *16S pPHK* для идентификации микроорганизмов связана с тем, что этот ген, во-первых, кодирует малую субъединицу рибосомы, необходимую для жизнедеятельности клетки; во-вторых, его нуклеотидная последовательность консервативна для различных видов, и имеет достаточную длину (1550 пар оснований) для накопления полиморфизмов, отражающих статистически достоверные изменения, позволяющие различать виды микроорганизмов [120].

Идентификация КОС методом секвенирования рибосомального гена *16S pPHK*—это один из наиболее достоверных методов идентификации стафилококков, позволяющий идентифицировать стафилококки, в том числе и КОС, не только на уровне вида, но некоторые и на уровне подвидов, например, *Staphylococcus sciuri subsp. sciuri* [116]. Тем не менее, были выявлены случаи неправильной идентификации некоторых видов стафилококков, таких как: *Staphylococcus pulvereri* и *Staphylococcus vitulinus* [121]. Для уточнения результатов идентификации КОС методом секвенирования гена *16S pPHK* проводят секвенирование дополнительных генов (*gap*, *hsp60*, *rpoB*, *sodA*, и *tuf*) [122, 123], а также используют другие методы идентификации, например, биохимические методы или прямое масс-спектрометрическое профилирование бактериального лизата.

На сегодняшний день наиболее быстрым и достоверным методом

идентификации КОС, используемым во многих клинических и научных лабораториях, является метод прямого масс-спектрометрического профилирования бактериального лизата [124-128]. Впервые использование масс-спектрометрии для идентификации бактерий было предложено в 1975 году [129], в основе этого метода лежит сопоставление белковых профилей (спектров), полученных непосредственно с интактных клеток бактерий. Белковые спектры получают с использованием «мягкого» метода ионизации-Матрично-активированной лазерной десорбции/ионизации (МАЛДИ) (от английского *MALDI, Matrix Assisted Laser Desorbption/Ionization*) в сочетании с времяпролетным детектором (от английского *time-of-flight detector*). В данном случае ионизация белков, непосредственно содержащихся в интактных клетках бактерий, происходит совместно с легко ионизируемым веществом-матрицей под воздействием лазерного излучения. Белковые спектры, получаемые таким образом, уникальны для определенного вида бактерий. Данный факт объясняется тем, что большая часть белков, представленных на МАЛДИ масс-спектре, относится к очень консервативным рибосомальным белкам идентифицируемых бактериальных клеток [130].

При сравнении результатов идентификации КОС, полученных биохимическими методами (BD Phoenix (Becton Dickinson Diagnostic Systems, France) и VITEK-2 (bioMérieux, Marcy L'Etoile, France)), и методом прямого масс-спектрометрического профилирования бактериального лизата было показано, что из 234 клинических изолятов КОС, относящихся к 20 различным видам, 93,2% всех изолятов были идентифицированы верно методом прямого бактериального профилирования, для биохимических методов BD Phoenix и VITEK-2 эти значения составили - 75,6% и 75,2%, соответственно. В качестве «золотого» стандарта идентификации в данной работе был использован метод определения нуклеотидной последовательности гена *sodA* [126]. В более поздних исследованиях показано, что значение, верно идентифицированных изолятов КОС методом

прямого бактериального профилирования, составило 99,3% [127].

Цитируемое исследование демонстрирует надежность и высокую чувствительность данного метода, что сочетается с невысокой стоимостью проведения анализа и небольшими временными затратами.

1.4.2 Методы типирования КОС

Помимо видовой идентификации очень важным моментом при изучении КОС является их типирование, результатом которого является выявление госпитальных изолятов, что делает возможным дальнейшие эпидемиологические исследования. Основными методами типирования стафилококков являются: гель-электрофорез в пульсирующем поле – от английского Pulsed field gel electrophoresis (PFGE) и мультилокусное секвенирование-типирование - от английского Multi Locus Sequence Typing (MLST). Метод гель-электрофореза в пульсирующем поле предполагает изучение бактериального генома посредством фрагментации его редкощепящими ферментами рестрикции с дальнейшим разделением этих фрагментов под воздействием периодически меняющегося по направлению электрического поля, что позволяет разделять протяженные участки генома (от 10 т.п.н. до 10 млн.п.н). Этот метод используют для типирования различных видов КОС, в том числе и для видов *S. epidermidis*, *S. haemolyticus*, *S. hominis*, *S. capitis*, *S. warneri* [92, 131, 132]. Хотя дискриминационная способность метода PFGE высока, данный метод обладает рядом недостатков. Протоколы PFGE трудоёмки, требуют больших временных и материальных затрат, но главным недостатком является сложность сопоставления профилей фрагментов ДНК, полученных в разные промежутки времени и в различных лабораториях. В связи с этим были разработаны альтернативные методы типирования: случайная амплификация полиморфных участков ДНК (random amplification of polymorphic DNA, RAPD) [133], анализ мультилокусной вариабильности числа tandemных повторов (multilocus variable number of tandem repeats (VNTR) analysis) [131]

и MLST [133-136].

Метод MLST получил широкое распространение. Данный метод основан на определении последовательностей нескольких (чаще семи) генов «домашнего» хозяйства бактериальных штаммов и дальнейшего анализа варибельности этих последовательностей. С помощью метода MLST проводят типирование различных бактерий, таких как: *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*, *Haemophilus influenzae*, *Helicobacter pylori*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes* и др. На сегодняшний день для стафилококков разработана и апробирована схема MLST для двух видов: коагулазоположительного вида - *S.aureus* [137] и для КОС - *S. epidermidis* [138]. Для типирования изолятов *S.epidermidis* методом MLST определяют нуклеотидную последовательность следующих генов: карбаматкиназы (*arcC*), шикиматдегидрогеназы (*aroE*), ABC транспортера (*gtr*), белка исправления ошибок, связанных с неправильным сопоставлением нуклеотидов (DNA mismatch repair protein (*mutS*)), регуляторного белка пириимидинового оперона (*pyrR*), триозофосфатизомеразы (*tpiA*), ацетил- КоА- ацетил- трансферазы (*yqiL*). Эта MLST схема широко используется при типировании клинических изолятов *S. epidermidis* в рамках эпидемиологических исследований. К настоящему времени для *S. epidermidis* описано 587 различных сочетаний нуклеотидных последовательностей генов, входящих в MLST схему, так называемых сиквенс-типов (от англ. Sequence type, ST) [138]. Близкородственные сиквенс-типы, образуют клональные комплексы.

Большинство госпитальных изолятов *S. epidermidis* характеризуется вторым клональным комплексом (CC2) (от английского clonal complex, CC), в рамках которого выделяют два подкомплекса CC2-I и CC2-II, причем штаммы описываемые сиквенс-типами, входящими в подкомплекс CC2-I часто обладают повышенной устойчивостью к метициллину, линезолиду или обладают множественной лекарственной устойчивостью [139, 140].

Метод MLST зарекомендовал себя как наиболее удобный инструмент для типирования изолятов, выделенных в различных регионах, что необходимо для решения эпидемиологических задач мирового масштаба. Это связано с такими плюсами метода как однозначность результатов и наличие баз данных, позволяющих проводить сопоставление и анализ полученной информации об исследуемых клинических изолятах.

1.4.3 Системный подход к изучению механизмов патогенности КОС

Накопленные данные о физиологии бактериальных патогенов показывают необыкновенную сложность механизмов их жизнедеятельности и взаимодействия с человеком. Выявление и описание ФВП микроорганизма – это только одна из стадий изучения процесса взаимодействия патоген-хозяин. С появлением «омиксных» технологий открывается возможность системного подхода к изучению механизмов патогенности бактерий. Данный подход позволяет охарактеризовать поведение клетки патогена на разных уровнях: начиная с информации, закодированной в последовательности нуклеотидов ДНК бактерий, и заканчивая информацией о белках и метаболитах, синтезируемых клеткой в определенный момент времени при определенных условиях. Основными «ступеньками», при изучении бактерий в рамках системного подхода, являются: геномика, транскриптомика, протеомика, объектами которых соответственно являются ДНК, РНК, а также белки исследуемого организма.

По данным, полученным на сегодняшний день механизмы патогенности КОС не возможно однозначно связать с наличием определенного набора ФВП, в частности, с наличием каких-либо токсинов. Для исследования этих механизмов необходимо привлекать методы, описывающие физиологию КОС на различных уровнях, начиная с хранения и

реализации генетической информации и заканчивая профилем транслируемых в определенных условиях белков. Реализовать такое исследование позволяют «омиксные» технологии.

1.4.3.1 Полногеномное секвенирование и транскриптомные исследования КОС

Анализ полногеномных нуклеотидных последовательностей изолятов КОС является одним из наиболее перспективных методов изучения ФВП КОС. Данный метод широко используется в исследованиях механизмов патогенности различных возбудителей инфекционных процессов, в том числе и возбудителей бактериального происхождения [141-142]. Опубликованы первые работы по анализу полногеномной нуклеотидной последовательности КОС. На сегодняшний день определены и аннотированы по данным базы NCBI нуклеотидные последовательности многих видов КОС (**Таблица 4**). Надо отметить, что большинство полногеномных нуклеотидных последовательностей КОС в базах данных представлено в виде нескольких десятков участков полинуклеотидной цепи различной длины, так называемых контигов. Полностью определенных геномных последовательностей в базах данных значительно меньше, для вида *S. epidermidis* их 5. С помощью анализа данных полногеномного секвенирования был выявлен предварительный набор ФВП *S. epidermidis* по аналогии с найденными факторами *S. aureus* [11]. Данные полногеномного секвенирования КОС были использованы для изучения островков патогенности - мобильных элементов, переносящих в своем составе различные токсины стафилококков [10], так у штамма *S. epidermidis* были обнаружены островки патогенности, содержащие энтеротоксин С3 и белок подобный энтеротоксинам стафилококков - энтеротоксин L (SEIL).

Таблица 4. Количество, полногеномных последовательностей различных видов КОС в базе данных NCBI.

Вид КОС	Количество, полногеномных последовательностей, представленных в виде контигов	Количество, полногеномных последовательностей, в виде кольцевой хромосомы
<i>S. epidermidis</i>	190	5
<i>S. haemolyticus</i>	168	1
<i>S. lugdunensis</i>	6	2
<i>S. warneri</i>	7	1
<i>S. capitis</i>	6	0
<i>S. hominis</i>	4	0
<i>S. saprophyticus</i>	2	1
<i>S. equorum</i>	3	0
<i>S. xylosum</i>	3	3
<i>S. carnosus</i>	1	1

Исследование экспрессии генов, посредством анализа транскриптов является одним из современных методов биологии, позволяющим оценить состояние бактериальной клетки в определенное время в определенных условиях. Большая часть методов работы с основным объектом транскриптомики-РНК очень схожи с методами определения нуклеотидных последовательностей ДНК. Совокупность транскриптов-это промежуточное звено между генетической информацией (набором генов) и пулом белков, определяющих физиологию клетки. К сожалению, информация о совокупности транскриптов в определенный момент времени, не дает исчерпывающей информации о синтезированных в этот момент времени белках. Наиболее полно состояние клетки в определенный момент времени описывает протеомика - наука, изучающая совокупность белков организма.

Наиболее интересными работами в области транскриптомики КОС являются статьи Carvalhais V., 2014; França A., 2014; Carvalhais V., 2015 [144-146].

1.4.3.2 Протеомные методы исследования КОС

На сегодняшний день исследования механизмов патогенности стафилококков с использованием протеомных подходов представлены в печати научным мировым сообществом довольно широко, но чаще всего это работы, посвященные протеомике коагулазоположительного вида – *S. aureus*, выращенного в определенных условиях культивирования. Первые работы по изучению белковых профилей различных видов стафилококков основывались на сочетании методик 2-D гель электрофореза, ферментативного расщепления белков трипсином в геле и различных видов масс-спектрометрии. Наиболее часто такие исследования проводили с использованием МАЛДИ масс-спектрометрии. Сочетание данных 2-D гель электрофореза с масс-спектрометрией позволяет реализовать сравнительный подход в протеомике, который позволяет охарактеризовать изменение белкового профиля исследуемого микроорганизма при различных условиях культивирования, например, при воздействии стресса [147, 148]. Сочетание этих методик также использовалось для исследования биопленок стафилококков [149]. Так было проведено сравнение белкового профиля планктонных клеток с белковым профилем клеток, входящих в состав биопленок для вида *S. aureus*. Было описано 258 белков с различным уровнем экспрессии в планктонных клетках и клетках биопленки. Эти данные были подтверждены транскрипционным анализом, помимо этого данные были нанесены на метаболическую карту. К сожалению, методики 2D –фореза в сочетании с масс-спектрометрией имеют довольно много недостатков, таких как трудность анализа сильнокислых, щелочных и гидрофобных белков, а также идентификация только высоко-представленных белков. Данные

ограничения делают практически невозможным анализ, например, мембранных белков.

На сегодняшний день развитие методов протеомного анализа привело к совершенно новым возможностям в протеомике микроорганизмов, позволяющим оценивать не ограниченное количество белков, ответственных за какие-либо различия, а практически полный протеом микроорганизма в определенный момент времени. Кроме того современные методы протеомики позволяют проводить не только идентификацию, инвентаризацию и сравнение белков микроорганизмов (качественный анализ белковых профилей), но и определять количество белков в образце (количественный анализ). Для идентификации высоко и среднекопийных белков используют подходы, основанные на жидкостной хроматографии в сочетании с тандемной масс-спектрометрией (LC-MS/MS). Что касается количественной протеомики, то первыми в этой области были методы, основанные на использовании изотопов, например, метод SILAC (Stable isotopic labeling with amino acids in cell culture), основанный на культивировании исследуемых микроорганизмов на среде с N^{15} и C^{13} мечеными аминокислотами с последующим масс-спектрометрическим анализом. Другим используемым методом является ICAT (Isotope-Coded Affinity Tag), заключающийся в модификации цистеиновых остатков белков реагентами, содержащими биотин и изотопные линкеры с последующей масс-спектрометрией. В последнее время активно развивается безметочная количественная протеомика. Методы безметочной количественной протеомики являются более производительными и обладают очень высокой чувствительностью, к ним относятся: мониторинг выбранных реакций (SRM, от англ. Selected reaction monitoring) и мониторинг множественных реакций (MRM, от англ. Multiple reaction monitoring). Эти методы основаны на масс-спектрометрической детекции определенных заранее выбранных

протеотипических пептидов. При этом очень важным пунктом является выбор протеотипического пептида, который является фрагментом анализируемого белка, и должен отвечать следующим требованиям: быть уникальным, т.е. не являлся фрагментом других белков, хорошо ионизироваться, а также иметь характерный масс-спектр. Нормализация масс-спектров для количественного анализа проводится за счет стабильных меченных изотопом стандартов. MRM обеспечивает высокую чувствительность. Для дрожжей чувствительность этого метода составляет 10^{-12} - 10^{-14} М [150], что соответствует нескольким сотням копий белка на клетку. С помощью этих методов могут быть идентифицированы низкокопийные белки в составе протеома бактерий.

Надо отметить, что работ по количественной протеомике стафилококков мало, что связано со сложностью самого объекта и недостатком воспроизводимых методик разрушения биопленок, образуемых стафилококком *in vivo*. В 2014 году вышло несколько работ в области количественной протеомики биопленок стафилококков [144, 151, 152]. Solis N. и соавторы изучали профиль поверхностных белков (surfaceomes) трех различных штаммов *S.aureus* (метициллин-устойчивого штамма, лабораторного штамма COL и штамма COL, адаптированного к высоким уровням оксациллина). В ходе исследования у штамма COL, адаптированного к высоким уровням оксациллина были выявлены изменения морфологии клеток по сравнению с лабораторным штаммом COL и повышенная степень агрегации при формировании биопленки. Было идентифицировано 150 поверхностных белков штаммов COL лабораторного и адаптированного к высоким уровням оксациллина. Белки, уникальные для штамма COL, адаптированного к высоким уровням оксациллина, включали LytR-CPSA-PSR (LCP) домен. Найденные LCP- белки, участвуют в формировании капсулы и пептидогликана [151]. Во второй работе Islam N. и соавторов интересным

моментов в изучении биопленок стафилококков с помощью методов протеомики было исследование профиля биопленки, сформированной *S. aureus*, в соответствии со скоростью жидкости (50, 100, 500, 1000 с⁻¹). Модель, предложенная в этой работе, имитирует возникновение биопленок внутри катетеров, при прохождении через них физиологических жидкостей. В результате работы были идентифицированы 16 белков, мембранной фракции и 8 белков цитозольной фракции, экспрессия которых значительно изменялась ($p < 0,05$) при увеличении скорости жидкости [152]. Работ, посвященных протеомике и количественной протеомике КОС, опубликовано крайне мало. Очень интересной статьей, особенно в методическом плане является статья Carvalhais V. и соавторов [146]. В этой работе были проанализированы протеомные профили биопленок *S. epidermidis*, полученные с помощью различных методов подготовки биопленок для протеомного анализа с последующим применением метода гелелектрофореза-LC-MS/MS. В результате работы было идентифицировано 453 белка, данные, полученные с помощью методов протеомики были подтверждены данными экспериментов на уровне транскрипции [146].

Резюмируя вышесказанное, можно утверждать, что сегодняшний уровень развития методов биохимического и молекулярного анализа подразумевает при исследовании сложных объектов, какими являются КОС, использование комплексного (системного) подхода, обеспечивающего разносторонний анализ данных, в том числе и данных о механизмах вирулентности и патогенности, а также о взаимодействии объекта с организмом-хозяином.

ГЛАВА 2 Материалы и методы исследования

2.1 Объекты исследования

Бактериальные штаммы

Объектами данного исследования в рамках диссертационной работы являлись штаммы и изоляты разных видов стафилококков. В ходе исследования была собрана коллекция изолятов КОС (169 изолятов), включающая в себя:

71 изолят *S. haemolyticus*, выделенный в период 2010-2012;

64 изолята *S. epidermidis*, выделенные в период 2010-2012.

Кроме того, в исследование были включены лабораторные типовые штаммы:

S. aureus ATCC 29213, *S. epidermidis* ATCC 12228, полученные из американской коллекции типовых культур (American Type Culture Collection, ATCC).

Чистые культуры стафилококков были выделены из клинического материала (из кала, соскобов из зева, бронхоальвеолярного аспирата, отделяемого конъюнктивы, с поврежденной кожи, из крови, мочи, ликвора, асцитической и плевральной жидкости, аутопсийного материала), путем пересева клеток на питательную среду (5% кровяной агар, Oxoid). Для всех последующих манипуляций культивирование стафилококков проводили в триптон-соевом бульоне (TrypticSoyBroth, Oxoid) при 37°C в аэробных условиях.

Для системного анализа с целью расшифровки механизмов патогенности КОС были отобраны три клинических изолята *S. epidermidis* (SE36-1, SE41, SE528) и четыре изолята *S. haemolyticus* (SH39, SH421, SH527, SH864-1).

Изолят *S. epidermidis* SE36-1 был выделен из крови умершего новорожденного с экстремально низкой массой тела (ЭНМТ) и диагнозом врожденный сепсис. Изолят *S. epidermidis* SE41 выделен из аутопсийного

материала (ткань легких) новорожденного с ЭНМТ и диагнозом врожденный сепсис, осложненный пневмонией, вызванной данным штаммом стафилококка. Изолят *S. epidermidis* SE528 получен при посеве из зева новорожденного ребенка и отобран в качестве контрольного (как штамм, ассоциированный с колонизацией либо контаминацией).

Изолят *S. haemolyticus* SH39 выделен из аутопсийного материала (кишечник) новорожденного с ЭНМТ, изоляты SH421 и SH864-1 получены соответственно при посевах из зева и кала новорожденных детей. Изолят *S. haemolyticus* SH527 получен из крови взрослого пациента с диагнозом сепсис.

Культура клеток человека. Для модельных экспериментов взаимодействия КОС с организмом хозяина использовали перевиваемую клеточную линию рака толстой кишки человека HT-29 (ATCC[®] HTB-38[™]) (аденокарцинома человека), полученную из коллекции ATCC. Клетки выращивали в 1 мл среды в культуральных планшетах на 24 лунки (Greinerbio-one Ltd.). В каждую лунку предварительно помещали покровные стекла размером 0,5 x 0,5 см. Культивирование проводили в питательной среде DMEM (Gibco) с 10 % сывороткой (Fetal Bovine Serum, Gibco) в 5 % CO₂ при 37°C до образования монослоя (24 часа).

2.2 Микробиологические и биохимические методы

Первичную видовую идентификацию проводили через 24 часа на основании классических бактериологических тестов - окраска по Граму, тестов коагулазную активность, ферментации маннитола и с помощью автоматического бактериологического анализатора Vitek2Compact (BioMérieux, США).

Чувствительность к антибиотикам (оксациллину, ванкомицину, линезолиду, гентамицину, линкомицину (клиндамицину), эритромицину, ципрофлоксацину, хлорамфениколу, тетрациклину, фузидину) выделенных изолятов стафилококков определяли диско-диффузионным методом на агаре

Мюллер-Хинтон (HiMedia) с использованием стандартизованных дисков (BioRad Inc.) или путем определением минимальной подавляющей концентрации (МПК) антибиотика на автоматическом анализаторе Vitek2 Compact (BioMerieux, США). При интерпретации результатов тестирования руководствовались критериями Clinical and Laboratory Standards Institute (Институт клинических лабораторных стандартов) (CLSI).

Построение кривых роста: в 7 мл триптон-соевого бульона (Oxoid) вносили инокулят исследуемого бактериального штамма до конечной плотности суспензии 0,5 MF [153]. В качестве инокулята использовали ночную культуру. Последующие замеры оптической плотности (OD_{540}) проводили на планшетном денситометре Multiskan Ascent (Thermo Electron corporation, Финляндия). Тестирование осуществляли в трех биологических повторах.

Оценка интенсивности формирования биопленок с помощью окраски раствором кристаллического фиолетового: Культуры КОС выращивали в жидкой питательной среде (триптон-соевый бульон(Oxoid)) в течение суток при 37 °C. Для количественного учета интенсивности пленкообразования из суточных культур исследуемых штаммов в триптон-соевом бульон готовили суспензии с оптической плотностью 0,5 МакФарланд. Аликвоты бактериальных суспензий вносили в лунки 96-луночного планшета, заполненные триптон-соевым бульоном, и инкубировали при 37 °C в течение 24 ч или 2 суток. После этого культуральную жидкость осторожно удаляли, однократно промывали лунки раствором 0,9% NaCl и вносили в каждую лунку по 400 мкл 0,1% спиртового раствора кристаллического фиолетового для окрашивания сформировавшихся биопленок, за счет ионных взаимодействий с основными компонентами ЭПС матрикса. Окрашивание проводили при 37 °C в течение 1 часа. Раствор кристаллического фиолетового удаляли, два раза промывали лунки дистиллированной водой, и проводили экстракцию красителя из биопленки в 200 мкл 96% этанола в течение 1 часа при комнатной температуре. В качестве контроля

использовали среду для культивирования. Оптическую плотность измеряли на Multiskan ascent 354 (Thermo Electron Corporation, USA) при длине волны 540 нм. Для каждого образца проводили 3 измерения.

Гемолитическую активность изолятов КОС на эритроциты человека оценивали следующим образом: изоляты КОС 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, USA).

Оценка цитотоксического эффекта стафилококков. Токсичность воздействия стафилококков на клетки HT-29 оценивали по выбросу тканевой лактатдегидрогеназы (ЛДГ) в среду культивирования. Для этого ночную культуру бактериального штамма центрифугировали 10 минут при 1000g. Надосадок фильтровали через фильтр с диаметром пор 0,20 мкм (Minisart, Sartoriusstedim). Осадок двукратно отмывали в среде DMEM и получали суспензию бактериальных клеток в DMEM с оптической плотностью 0,5 при 540 нм (плотность суспензии 2 MF). К монослою клеток HT-29 в питательной среде DMEM (1 мл) добавляли бактериальную суспензию (1 мл), либо культуральную жидкость (1мл). В качестве контроля вместо суспензии бактериальных клеток и культуральной жидкости вносили либо 1 мл среды DMEM (первый контроль), либо 1 мл триптон-соевого бульона (второй контроль). Активность ЛДГ оценивали с помощью набора реагентов для определения общей активности ЛДГ в сыворотке (плазме) крови (Ольвекс Диагностикум, Россия) на спектрофотометре UV-1700 PharmaSpec (Shimadzu, Япония). Измерения проводили сразу после добавления тестируемых образцов к клеткам HT-29 и затем через 2, 4, 6 и 24 часа. Оценку токсичности

воздействия стафилококков на клетки НТ-29 осуществляли в трех биологических повторах.

Индукция образования фаговых частиц

S. epidermidis SE36-1 культивировали в бульоне с сердечно-мозговой вытяжкой (Brain Heart Infusion Broth, Oxoid) при 37° С на шейкере-инкубаторе ES-20 (BioSan) при 110 об/мин в течение 18 часов. Индукцию фаговых частиц инициировали посредством добавления митомицина С до конечной концентрации 0,2 мкг/л с последующей инкубацией в течение 10 часов. Затем проводили центрифугирование (7000 об/мин в течение 20 минут).

2.3 Микроскопические методы

Просвечивающая электронная микроскопия фаговых препаратов

Фаговые частицы, содержащиеся в лизате, адсорбировали на углеродную сетку и контрастировали 1%-фосфорновольфрамом Na, рН 7, в течение 1 мин. Просвечивающая микроскопия осуществлялась на электронном микроскопе JEOL 100CX2.

Приготовление образцов для сканирующей электронной микроскопии

Для изучения образования биопленок стафилококки культивировали в 1 мл триптон-соевого бульона в культуральных планшетах на 24 лунки (Greinerbio-one, Ltd.), содержащих в каждой лунке покровные стекла размером 0,5 x 0,5 см. Инокулят вносили до конечной плотности бактериальной суспензии 0,5 МФ. Инкубацию проводили при 37° С в аэробных условиях в течение 24 и 48 часов, после чего покровные стекла промывали двукратно стерильным раствором 0,9% NaCl и извлекали из планшета. Образцы фиксировали 10 % раствором нейтрального формалина.

При совместном культивировании стафилококков и клеток НТ-29 осуществляли визуальное наблюдение их взаимодействия. Клетки НТ-29 выращивали в культуральном планшете с покровными стеклами, как описано

выше в течение 24 часов до образования монослоя. К выращенному на стеклах пласту клеток НТ-29 в 1 мл среды культивирования добавляли 1 мл клеточной суспензии одного из следующих штаммов: *S.aureus* 29213, *S.epidermidis* SE36-1, *S.haemolyticus* SH527 (мутность суспензии 0,5MF) в триптон-соевом бульоне. Препараты инкубировали в течение 1 часа, 2 часов, 3 часов, 24 и 48 часов при 37° С и 5% CO₂, после чего проводили фиксацию образца на покровных стеклах описанным выше способом.

В качестве контроля использовали клетки НТ-29, к которым вместо клеточной суспензии добавляли 1 мл триптон-соевого бульона.

Сканирующая электронная микроскопия

Фиксированные образцы монтировали на алюминиевые столики с помощью угольного скотча. Для создания электропроводящего слоя на поверхности образцов проводили напыление золотом толщиной 5 нм с помощью напылительной установки SPI-MODULE Sputter Coater (SPI Supplies, USA). Исследование проводили в дулучевом сканирующем ионно-электронном микроскопе Quanta 200 3D (FEI Company, USA) в режиме высокого вакуума при ускоряющем напряжении 10 кВ в диапазоне рабочего увеличения объектов от х300 до х30000.

2.4 Молекулярно-генетические методы

Выделение ДНК

Для выделения геномной ДНК стафилококков использовался набор «ДНК-экспресс» (ТУ–9398-450-17253567-03) (ООО НПФ Литех, Россия), в соответствии с прилагаемыми инструкциями). Пробы ДНК хранились при – 20 °С.

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 [154].

Амплификация фрагментов генов

В ходе работы проводилась амплификация ряда генов «домашнего хозяйства»: для *S. epidermidis*-*arcC*, *aroE*, *gtr*, *mutS*, *pyrR*, *tpiA*, *ygiL*; для *S. haemolyticus*-*arcC*, *aroE*, *cfxE*, *gmk*, *gtr*, *hemH*, *leuB*, *mvaK*, *mutS*, *pta*, *pyrR*, *riboseABCD*, *rphE*, *sh1200*, *sh1431*, *tpiK*, *tpi*, *ygi*. Последовательности праймеров, использованных для постановки реакции амплификации указанных генов представлены в **таблице 5**. Амплификацию проводили в 25 мкл реакционной смеси, содержащей 66 mM Tris-HCl (pH 9,0), 16,6 mM (NH₄)₂SO₄, 2,5 mM MgCl₂, 250 мкМ каждого dNTP, 1ед. Taq ДНК полимеразы (ООО НПФ Литех, Россия), по 10 пмоль соответствующих праймеров. Реакцию проводили на TETRAD DNA ENGINE (MJ Research, Inc.) при 94°C 2 мин, далее 35 циклов: 94°C 30 сек, 58 °C 30 сек ,72 °C 30 сек. Продукты амплификации анализировали в 2 % агарозном геле с визуализацией бромистым этидием.

Полимеразную цепную реакцию в реальном времени проводили с использованием IQ SYBR Green Supermix (Bio-Rad) и CFX96™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad). Данные анализировали с помощью программного обеспечения CFX Manager (Bio-Rad). Праймеры подбирали с помощью программного обеспечения Oligo 6.71 (Molecular Biology Insights, Inc., Cascade, США). Используемые праймеры представлены в **таблице 5**. Эксперименты проводили в трех биологических и трех технических повторах.

Таблица 5. Последовательности праймеров, использованных для постановки реакции амплификации

Вид микроорганизма	Ген/ участок генома	Последовательность праймеров (5'-3')	Источник
Выявление факторов вирулентности и патогенности стафилококков			
MLST изолятов <i>S. epidermidis</i>			

<i>S. epidermidis</i>	<i>arcC</i>	tgtgatgagcacgctaccgtag	[138]
		tccaagtaaaccatcggtctg	
<i>S. epidermidis</i>	<i>aroE</i>	cattggattacctctttgttcagc	[138]
		caagcgaaatctggtgggg	
<i>S. epidermidis</i>	<i>gtr</i>	cagccaattctttatgactttt	[138]
		gtgattaaaggtattgattgaat	
<i>S. epidermidis</i>	<i>mutS</i>	gatataagaataagggttgtaa	[138]
		gtaatcgtctcagttatcatggt	
<i>S. epidermidis</i>	<i>pyrR</i>	gttactaataacttttgctgtggtt	[138]
		gtagaatgtaaagagactaaaatga a	
<i>S. epidermidis</i>	<i>tpiA</i>	atccaattagacgcttagtaac	[138]
		ttaatgatgcgccacctaca	
<i>S. epidermidis</i>	<i>ygiL</i>	cacgcatagtattagctgaag	[138]
		ctaatagccttcattcttgagaaataa	
MLST изолятов <i>S. haemolyticus</i>			
<i>S. haemolyticus</i>	<i>arcC</i>	agtgactcaagttgaa	[131]
		aatcttaccatctagg	
<i>S. haemolyticus</i>	<i>aroE</i>	ataaacatatccaggccattat	[155]
		caagcgaaatctggtgggg	
<i>S. haemolyticus</i>	<i>cfxE</i>	gaagcacaattgatggtctgc	[131]
		tctgccccattatcaacaca	
<i>S. haemolyticus</i>	<i>gmk</i>	atcgttttatcgggaccatc	[137]
		tcattaactacaacgtaatcgta	
<i>S. haemolyticus</i>	<i>gtr</i>	ataccttcacagctaattctt	[155]
		gaagtcattaaaggcattga	
<i>S. haemolyticus</i>	<i>hemH</i>	ctgatcgtcaagctgaagcat	[131]
		gtacctgttgaccctcaga	

<i>S. haemolyticus</i>	<i>leuB</i>	agccatagattcgcgatggtgt	[131]
		cctaataaacctggaatggttag	
<i>S. haemolyticus</i>	<i>mvaK</i>	aatattcttagctgtttgcaa	[155]
		atacaaagtgatgtctatgat	
<i>S. haemolyticus</i>	<i>mutS</i>	gatataagaataagggttgtaa	[138]
		gtaatcgtctcagttatcatggt	
<i>S. haemolyticus</i>	<i>pta</i>	gttaaaatcgtattacctaagg	[137]
		gaccctttgttgaaaagcttaa	
<i>S. haemolyticus</i>	<i>pyrR</i>	gttactaataacttttgctgtgttt	[138]
		gtagaatgtaaagagactaaaatga a	
<i>S. haemolyticus</i>	<i>riboseABCD</i>	gagacgattcagctaagcaa	[131]
		cgcctttcattaggccatta	
<i>S. haemolyticus</i>	<i>rphE</i>	ataattgtgttaccttaccat	[155]
		aagaaaatctaccatcac	
<i>S. haemolyticus</i>	<i>sh1200</i>	cggtaatgtaacacacgcagt	[131]
		tcttctagtagctgaccag	
<i>S. haemolyticus</i>	<i>sh1431</i>	tcagaccaattcccaacc	[131]
		ctttagecgtcacgatggtcg	
<i>S. haemolyticus</i>	<i>tphK</i>	taacattaactttaaatcctt	[155]
		gaaacaataatccattcaat	
<i>S. haemolyticus</i>	<i>tpi</i>	gtgcaccaacaattcaattaga	[155]
		ttaatgatgcgccacctacta	
<i>S. haemolyticus</i>	<i>ygi</i>	cagcatacaggacacctattggc	[137]
		cgttgaggaatcgatactggaac	
Уточнение нуклеотидной последовательности изолята SE36-1, соответствующей последовательности SPβ RP62A			
<i>S. epidermidis</i>	Участок	tccataccatactggttgcg	Настоящая работа

	гена изолята SE36-1 между контигами 1 и 324	tcatttcacatgaagggg	
<i>S. epidermidis</i>	Участок гена изолята SE36-1 между контигами 1 и 297	taatgcgaattggatcggc	Настоящая работа
		atcacctattgtagatggc	
<i>S. epidermidis</i>	Участок гена изолята SE36-1 между контигами 1 и 342	taatgcgaattggatcggc	Настоящая работа
		atgtaaaagtcctcctggg	
<i>S. epidermidis</i>	Участок гена изолята SE36-1 между контигами 297 и 88	cattgttttccatcagtc	Настоящая работа
		cagtcagagcaagcctcac	
<i>S. epidermidis</i>	Участок гена	cgtgtaaaagtcctcctggg	Настоящая работа
		ggtatcagtcagagcaagcc	

	<p>изолята SE36-1 между контигами 342 и 88</p>		
<i>S. epidermidis</i>	<p>Участок генома изолята SE36-1 между контигами 88 и 158</p>	<p>catcaatcaggagcgtgtc gaaagtacatcaagaacaagcc</p>	Настоящая работа
<i>S. epidermidis</i>	<p>Участок генома изолята SE36-1 между контигами 158 и 34</p>	<p>atattggtctagcgtctgag tgaaagtattgaagtagtgc</p>	Настоящая работа
<i>S. epidermidis</i>	<p>Участок генома изолята SE36-1 между контигами 34 и 3</p>	<p>ccgaggctcaagcagaagg ggctcatattcaacaccagc</p>	Настоящая работа
<i>S. epidermidis</i>	<p>Участок генома изолята</p>	<p>actcgtatctcctcagcag gttgtattcagtctcagcag</p>	Настоящая работа

	SE36-1 между контигами 3 и 119		
<i>S. epidermidis</i>	Участок генома изолята SE36-1 между контигами 119 и 183	асасctacttctccaасаас	Настоящая работа
		atcaacatcaatacagccccg	
<i>S. epidermidis</i>	Участок генома изолята SE36-1 между контигами 183 и 1	ttatcagtaacgccaccacc	Настоящая работа
		ttatgtaagacaccagacgg	
Количественное определение копий нуклеотидной последовательности изолята SE36-1, соответствующей последовательности SPβ методом полимеразной цепной реакции в реальном времени			
<i>S. epidermidis</i>	Ген фаговой интегразы	gctttatcacttgaagaggc	Настоящая работа
		tccgtgttactatggctacc	
<i>S. epidermidis</i>	<i>arcC</i>	tgtgatgagcacgctaccgtag	Настоящая работа
		tccaagtaaaccatcggtctg	

Определение нуклеотидной последовательности генов методом Сенгера

Перед постановкой реакции секвенирования ампликоны, полученные в

ходе реакции амплификации, обрабатывали щелочной фосфатазой арктических креветок и экзонуклеазой I *E. coli* (ExoI) для инактивации неизрасходованных нуклеотидов и деградации олигонуклеотидных праймеров. Для этого к полученным ампликонам добавляли по 5 мкл смеси, содержащей 66 мМ Tris-HCl pH 9,0; 16,6 мМ (NH₄)₂SO₄; 2,5 мМ MgCl₂, 5 ед. ExoI (Fermentas, Литва), и 0,5 ед. щелочной фосфатазы арктических креветок (Fermentas, Литва). Инкубировали в течение 20 минут при 37° С с последующей инактивацией ферментов прогреванием в течение 10 минут при 85° С.

Определение нуклеотидных последовательностей амплифицированных фрагментов ДНК проводили модифицированным методом Сенгера с использованием ABI Prism Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit и прибора ABI Prism 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, США) в соответствии с прилагаемыми инструкциями.

Поиск гомологичных последовательностей проводили в GenBank [156], используя алгоритм BLAST [157].

Мультилокусное секвенирование-типирование (MLST)

Типирование изолятов КОС проводилось с помощью метода MLST. MLST для вида *S. epidermidis* было проведено на основании общепринятой схемы [138]. Данная схема включает анализ нуклеотидных последовательностей 7 участков генов «домашнего хозяйства», а именно: *arcC*, *aroE*, *gtr*, *mutS*, *pyrR*, *tpiA*, *ygiL*. Для вида *S. haemolyticus* нет апробированной схемы MLST. Поэтому был проведен анализ кандидатных генов «домашнего хозяйства» (*mvaK*, *rphE*, *tphK*, *gtr*, *arcC*, *tpi*, *aroE*, *pta*, и др.). Амплификация и определение нуклеотидных последовательностей генов «домашнего хозяйства» проводилось с использованием методов, описанных выше.

Филогенетический анализ нуклеотидных последовательностей участков генов «домашнего хозяйства», был проведен с использованием следующего

программного обеспечения: Vector NTI 9.0 (Informax Inc, США) был использован для анализа и сборки последовательностей. Сравнение нуклеотидных последовательностей фрагментов генов было проведено с помощью модуля AlignX программного пакета Vector NTI V.9.0. Филогенетический анализ выполнен в программном обеспечении MEGA4.0 [158]. Данные аллельных профилей были проанализированы с помощью программного обеспечения eBURST3.0 [159]. К одному клональному комплексу были отнесены группы штаммов, нуклеотидные последовательности локусов которых отличались друг от друга одной позицией в одном каком-либо локусе.

Регистрационные номера последовательностей новых аллелей в GenBank - KC525159 - KC525182, KR011736 - KR011742.

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 программного обеспечения Start2 [160]. Если значение коэффициента было менее 1, то считали, что для нуклеотидной последовательности характерен стабилизирующий отбор, если же значение коэффициента было больше 1, то считали, что для нуклеотидной последовательности характерен положительный отбор.

Дискриминационную способность MLST схемы определяли путем расчета дискриминационного коэффициент Хантер - Гастона (D) [161], по следующей формуле:

$$D = 1 - \frac{1}{N(N-1)} \sum_{j=1}^S n_j(n_j - 1)$$

где N есть число неродственных штаммов, S - число различных типов, и n_j - это число штаммов, принадлежащих к типу J . Для типирования штаммов используют методы, имеющие дискриминационный коэффициент Хантер - Гастона более 0,95 [162].

Полногеномное секвенирование нуклеотидных последовательностей

Определение полногеномных нуклеотидных последовательностей трех изолятов *S. epidermidis* (SE36-1, SE41, SE528) и четырех изолятов *S. haemolyticus* (SH527, SH421, SH39, SH864-1), а также ДНК фаговых частиц проводили с помощью метода высокопроизводительного секвенирования на приборе IonTorrent PGM (LifeTechnologies, США). Для приготовления библиотек использовали набор Ion Plus Fragment Library Kit (Lifetechnologies, США) в соответствии с инструкциями производителя, для баркодирования использовали набор IonXpress Barcode Adapters 1-16 Kit. Проверку качества полученных библиотек проводили на приборе Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, США) с использованием набора Agilent DNA 1000 Kit. При подготовке библиотек к секвенированию на приборе IonTorrentPGM использовали системы One-Touch 2 и One-Touch ES (LifeTechnologies, США) и реактивы IonPGM TemplateOT2 Kit 200. При проведении секвенирования на приборе IonTorrent PGM (LifeTechnologies, США) использовали реактивы IonPGM Sequencing Kit 200 и чип 316 (318).

Сборку прочтений с прибора осуществляли de novo с помощью программного обеспечения GS de novo assembler версии 2.5 (Roche, США). Дополнительно для уточнения нуклеотидных последовательностей в составе генома проводили секвенирование по методу Сенгера на основании методики, описанной выше. Праймеры, используемые для уточнения нуклеотидных последовательностей (табл.5), были подобраны в ходе исследований с помощью программы Oligo 6.71 (Molecular Biology Insights, Inc., Cascade, США).

Анализ данных полногеномного секвенирования

Аннотацию полнонуклеотидных последовательностей осуществляли с помощью сервиса "Prokaryotic Genome Annotation Pipeline" (NCBI). Аннотированные полнонуклеотидные последовательности представлены в

базе данных под номерами APHS000000000, APHU000000000, APHT000000000 соответственно для изолятов *S.epidermidis* SE36-1, SE41, SE528; для изолятов SH39, SH527, SH864-1, SH421 *S.haemolyticus* - JRAW000000000, JRAZ000000000, JRAY000000000, JRAX000000000, соответственно; для фагов StB20 и Sp β - JN700521.1 и NC_029119.1, соответственно.

Поиск факторов вирулентности и патогенности в составе полнонуклеотидных последовательностей клинических изолятов осуществлялся с помощью сервиса PATRIC [163] по двум базам данных: VFDB [164] и Victors [165], а также с помощью алгоритма BLAST [157] в базе GenBank [156].

Поиск профагов в составе полнонуклеотидных последовательностей осуществляли с помощью алгоритма BLAST [157] в базе GenBank [156].

Определение генового состава «основного» и «дополнительного» геномов.

Группы онтологии были определены с помощью программного обеспечения OrthoMCL 1,7 с порогом достоверности $10e-5$ (E-value) и с минимальным соответствием -50%. При помощи пользовательских скриптов, написанных на языках программирования Perl и R были определены гены, входящие в состав основного генома (группа генов, присутствующая в геноме всех штаммов, включенных в анализ). Сравнение нуклеотидных последовательностей генов были выполнены с использованием ClustalW для каждого гена основного генома в отдельности. Филогенетический анализ (MaximumLikelihoodtree) конкатенантов, выравненных генов основного генома, проводился с помощью программного обеспечения Emboss, используя опцию dnaml.

Структуру и функции аминокислотных последовательностей предсказывали с помощью on-line сервиса SUPERFAMILY [166].

2.5 Протеомные методы

Прямое масс-спектрометрическое профилирование бактериального лизата

Свежие бактериальные клетки (1–2 колонии) переносили в 300 мкл деионизированной воды, перемешивали и добавляли 900 мкл этанола. Осадок после центрифугирования (15 мин × 16,1g) растворяли в 20 мкл смеси 50 % ацетонитрила и 35 % муравьиной кислоты. Полученный, в результате последующего центрифугирования, супернатант анализировали с помощью времяпролетного МАЛДИ масс-спектрометра (Bruker, Германия). Все использованные реактивы, включая воду, были аналитической чистоты или специальные для масс-спектрометрии. В качестве матрицы использовали насыщенный раствор альфа-циано-4-гидроксикоричной кислоты (α -cyano-4-hydroxycinnamic acid, α -CHCA, Bruker Daltonics, Германия) в 50 % ацетонитриле и 2,5 % трифторуксусной кислоте.

Для сокристаллизации матрицы и образца 1 мкл аналита наносили на ячейку стальной мишени для масс-спектрометрии (MSP 96 target ground steel, Bruker Daltonics, Германия), давали подсохнуть 1–2 мин и сверху наслаивали 2 мкл насыщенного раствора матрицы. Кристаллы оставляли на воздухе в течение 5–10 мин до полного высыхания.

Масс-спектры получали с использованием времяпролетного масс-спектрометра Microflex (Bruker Daltonics, Германия), оснащенного азотным лазером 337 нм. Спектры регистрировали в линейном режиме положительно заряженных ионов (20kV) в диапазоне масс 2000–20000 Да. Для калибровки использовали бактериальный тест стандарт (Bruker Daltonics, Германия). Для увеличения чувствительности детекции избыток матрицы удаляли 6 импульсами лазера при мощности 40 % с последующей аккумуляцией данных при мощности лазера от 30 % до 40 %. Для каждого спектра суммировали результаты 240 лазерных импульсов (по 40 импульсов с различных точек пятна). Суммировали спектры с разрешением более 400.

Для записи, обработки и анализа масс-спектров использовали

программное обеспечение компании Bruker Daltonics (Германия): flexControl 3.0 и flexAnalysis 3.0.

Идентификация проводилась с использованием программного обеспечения Biotyper 3.0 (Bruker Daltonics, Германия), путем сопоставления полученных спектров со спектрами библиотеки Biotyper 3.0 (Bruker Daltonics, Германия) (3746 спектров различных микроорганизмов). Видовую идентификацию считали достоверной, если значение численной оценки наилучшего совпадения, рассчитываемое программным обеспечением, было выше 2,000. Если это значение попадало в интервал от 1,700 до 1,999, то считали достоверной идентификацию микроорганизма до рода.

Анализ МАЛДИ масс-спектрометрических данных

Для сопоставления МАЛДИ масс-спектров была рассчитана матрица корреляционных коэффициентов с помощью программного обеспечения Biotyper 3.0, при построении матрицы использовали следующие настройки: интервал массы: 3000-12000 Да; разрешение: 4; интервалов 8. В главной диагонали представлены значения коэффициента корреляции масс-спектра изолята с самим собой, поэтому значения корреляционных индексов в главной диагонали должно приближаться или быть равно 1. Значения коэффициентов корреляции для элементов вне главной диагонали должны быть ниже. Элементы матрицы с высокими значениями коэффициентов корреляции соответствуют масс-спектрам с небольшими отличиями и указывают на то, что изоляты, для которых были получены эти масс-спектры, являются близкородственными (в матрице эти элементы обозначены красным цветом). Изоляты не являются близкородственными при низком значении корреляционного индекса масс-спектров этих изолятов (элемент в матрице окрашен синим).

Для достоверной оценки отличия изолятов из одной группы от изолятов другой группы рассчитывали среднее значение корреляционного коэффициента для каждой группы, а также среднее значение

корреляционного коэффициента всей матрицы корреляционных коэффициентов, далее эти значения сравнивали.

Масс-спектрометрическая идентификация секретируемых белков *S.haemolyticus*.

Изолят *S.haemolyticus* 527 культивировали в течение 18 часов в триптон-соевом бульоне. Отделяли клетки от культуральной жидкости центрифугированием в течение 20 минут при 4000 оборотов в мин., на центрифуге 5804R (Eppendorf, Inc), супернатант пропускали через фильтр 0,22 мкм (Millipore, Co.Cork). Далее супернатант фракционировали хроматографически (DAE) с последующим измерением гемолитической активности всех фракций. После чего фракции, обладающие гемолитической активностью, смешивали с раствором Лэмбли в соотношении 1:1 и прогревали в течение 5 мин при 95 °С, затем центрифугировали в течение 5 мин на 10 000 x g. и разделяли белки с помощью одномерного электрофореза (7.5% ПААГ, 7-см гели) в денатурирующих условиях по стандартной методике [167]. Окраску гелей проводили с помощью красителя Coomassie brilliant blue (Amresco). Затем осуществляли ферментативное расщепление белков трипсином. Участок геля, содержащего белки, нарезали на кусочки размером 1 x 1 мм и отмывали от Coomassie brilliant blue с помощью 50% раствора ацетонитрила в 50 mM NH₄HCO₃ при 50° С. Потом кусочки геля выдерживали в 10 mM ДТТ в 100 mM NH₄HCO₃ 30 мин при 56 °С. Раствор сливали. Далее заливали гели раствором 55 mM йодацетамида в 100 mM NH₄HCO₃ и инкубировали 20 мин при комнатной температуре в темноте. Раствор сливали, снова добавляли 10 mM ДТТ в 100 mM NH₄HCO₃ и инкубировали 30 мин при комнатной температуре. Раствор сливали. Высушивали отмывые гели, добавляя в них 100% ацетонитрил, инкубировали 20 мин при комнатной температуре, сливали ацетонитрил и оставляли пробирки открытыми до полного высыхания гелей. Непосредственно, для ферментативного расщепления белков добавляли к высушенным гелям

раствор трипсина (20 нг/мкл) в 40 мМ NH_4HCO_3 и 10% ацетонитриле. Инкубировали гели 1 час на льду, а затем не менее 16 часов при 37 °С. Пептиды последовательно экстрагировали растворами 5% муравьиной кислоты (2 объема); 5% муравьиной кислоты в 50% ацетонитриле (2 объема); 5% муравьиной кислоты в 75% ацетонитриле (2 объема). Пептидные экстракты анализировали высокоэффективной жидкостной хроматографией в сочетании с тандемной масс-спектрометрией (LC-MS/MS) на приборе OrbitrapQ Exactive (ThermoScientific) в трех технических повторах. При необходимости пептидные фракции хранили при -75°С.

Для идентификации белков использовали программное обеспечение Mascot v.2.5.1. Поиск белков осуществляли по базе данных, сформированной на основании информации о белках референсного штамма *S. haemolyticus* JCSC1435. База содержит 2707 различных аминокислотных последовательностей. Для идентификации использовались следующие параметры: расщепление- трипсином; варьируемые модификации- Propionamide (C) и Oxidation (M); ошибка по массе фрагментов- 0,05 Да; допускали 1 пропущенный сайт расщепления, допустимые заряды - 1+, 2+, 3+. Количество ложных identifications (false discovery rate) было автоматически посчитано с помощью программного обеспечения Mascot v.2.5.1. Пороговое значение количества ложных identifications составляло менее 5%.

Клеточную локализацию определяли на основании базы данных psort [168]. Функции гипотетических белков предсказывали, основываясь на геномной онтологии [169].

2.6 Благодарности

Отдельные эксперименты были выполнены совместно с сотрудниками Федерального Государственного бюджетного учреждения «Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины Федерального

медико-биологического агентства», 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 культуральной жидкости *S. haemolyticus* 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.

Анализ триптических пептидов секретируемых белков *S. haemolyticus* высокоэффективной жидкостной хроматографией в сочетании с тандемной масс-спектрометрией выполнен в отделе протеомных исследований и масс-спектрометрии «НИИ биомедицинской химии имени В.Н.Ореховича», руководитель - д.б.н. Виктор Гаврилович Згода.

ГЛАВА 3 Результаты

3.1 Характеристика коллекции КОС

В ходе работы была сформирована коллекция КОС, состоящая из 169 изолятов, выделенных в различных стационарах России. Изоляты были идентифицированы до вида, состав коллекции представлен в **таблице 6**. Большинство изолятов были выделены в стационарах Москвы (**рис.1**). Исследовали изоляты, полученные в ходе анализа посевов проб кала и соскобов из зева. В случае клинических признаков инфекции у пациента брали дополнительные биологические образцы (отделяемое конъюнктивы - при конъюнктивите, кровь – при сепсисе, посев с поверхности кожи и мягких тканей-при соответствующей инфекции, например, при ожогах, моча - при инфекциях мочевыводящих путей, а так же бронхоальвеолярный аспират-при инфекциях дыхательных путей). Данные, касающиеся источника выделения исследуемых штаммов, представлены на **рис. 1**.

Таблица 6. Видовая принадлежность клинических изолятов КОС

Вид КОС	Количество изолятов, (%)
<i>S.haemolyticus</i>	71 (42%)
<i>S.epidermidis</i>	64 (37,9%)
<i>S.hominis</i>	15 (8,9%)
<i>S. saprophyticus</i>	11 (6,5%)
<i>S.warneri</i>	8 (4,7%)

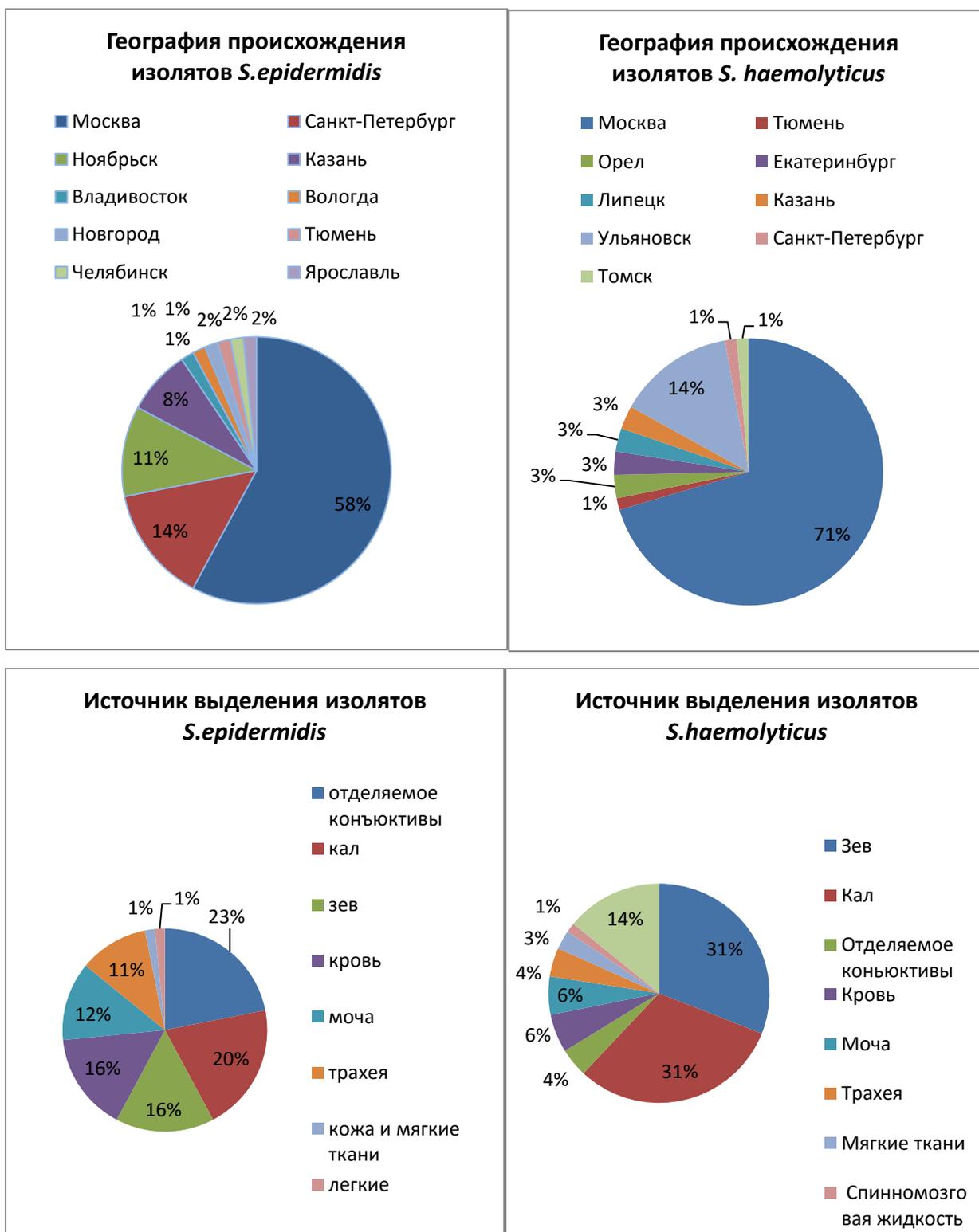


Рисунок 1. Характеристика коллекции изолятов КОС

Для всех изолятов *S. epidermidis* и *S. haemolyticus* определяли профили лекарственной чувствительности (таблица 7).

Таблица 7. Профиль лекарственной чувствительности изолятов *S. epidermidis* и *S. haemolyticus* (S–изолят чувствителен к антибиотику; R–изолят устойчив к антибиотику; I- изолят обладает промежуточной устойчивостью к антибиотику; N/d- о лекарственной чувствительности изолята нет данных)

антибиотик	<i>S.epidermidis</i> (64 изолята)	<i>S.haemolyticus</i> (71 изолят)
оксациллин	S 12 изолятов (19%); R 52 изолята (81%)	S 10 изолятов (14%); R 61 изолят (86%)
гентамицин	S 17 изолятов (26%); R 41 изолят (64%); I 1 изолят (2%); N/d 5 изолятов (8%)	N/d
тетрациклин	S 41 изолят (64%); R 9 изолятов (14%); N/d 14 изолятов (22%)	S 51 изолят (72%); R 20 изолятов (28%)
хлорамфеникол	S 17 изолятов (27%); R 31 изолят (48%); I 1 изолят (2%); N/d 15 изолятов (23%)	N/d
линезолид	S 64 изолята (100%)	S 71 изолят (100%)
линкомицин	S 27 изолятов (42%); R 12 изолятов (19%); N/d 25 изолятов (39%)	S 49 изолятов (69%); R 22 изолята (31%)
эритромицин	S 26 изолятов (41%); R 24 изолята (37%); N/d 14 изолятов (22%)	S 4 изолята (6 %); R 67 изолятов (94%)
ванкомицин	S 64 изолятов (100%)	S 71 изолят (100%)
фузидин	S 18 изолятов (28%); R 20 изолятов (31%); I 1 изолят (2%); N/d 25 изолятов (39%)	N/d

ципрофлоксацин	N/d	S 16 изолятов (23%); R 55 изолятов (77%)
----------------	-----	--

3.2 Выявление госпитальных штаммов КОС

На основании генетического анализа собранных изолятов были сформированы группы типичных госпитальных штаммов.

Выявление госпитальных изолятов *S. epidermidis*. Типирование собранных изолятов *S. epidermidis* (64 изолята) с помощью метода MLST [138], позволило отнести их к 19 сиквенс-типам ((ST) от англ. sequence type) (**рис. 2**). При этом большинство изолятов *S. epidermidis* были отнесены к следующим ST: ST59 (18 изолятов), ST22 (13 изолятов), ST2 (11 изолятов). Из них 62 (96,9%) изолята принадлежали к сиквенс-типам ST2, ST5, ST6, ST22, ST23, ST57, ST59, ST69, ST81, ST83, ST86, ST89, ST152, ST173, ST189, ST198, ST248, ST269, входящим в клональный комплекс CC2, характерный для госпитальных штаммов [170]. На **рисунке 2** представлено филогенетическое дерево для изолятов *S. epidermidis*, построенное на основании различий в нуклеотидных последовательностях семи MLST локусов.

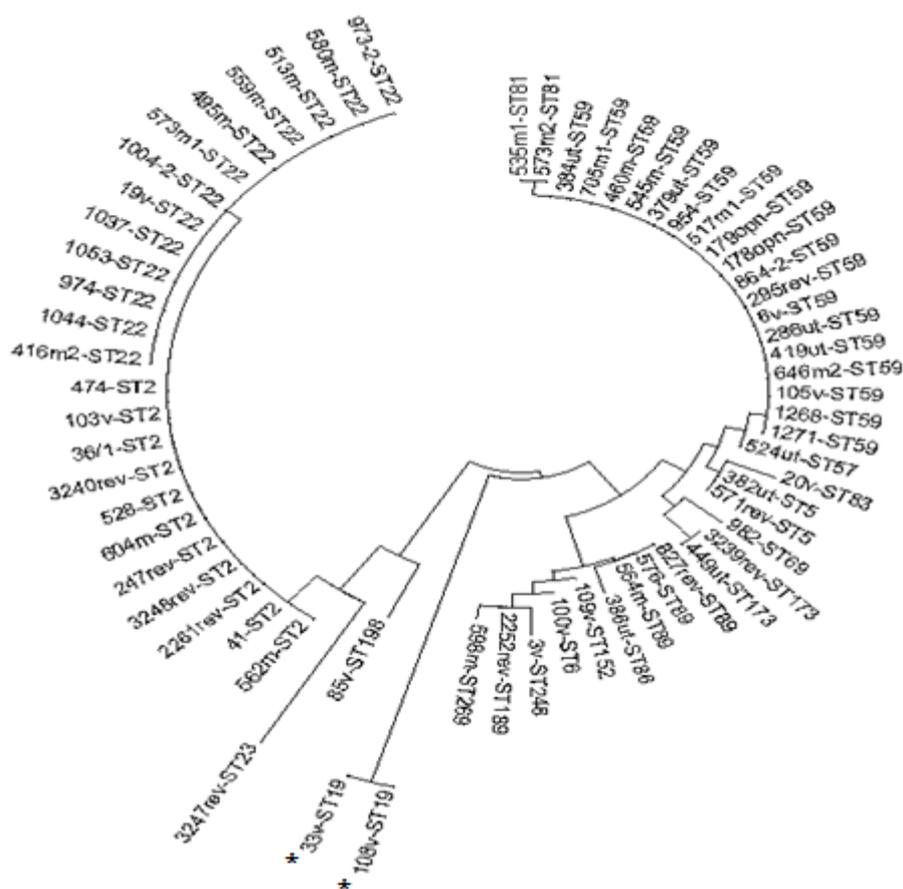


Рисунок 2. Сравнительный филогенетический анализ изолятов *S. epidermidis*, основанный на различиях в нуклеотидных последовательностях семи MLST локусов. (*- не госпитальные изоляты)

Выявление госпитальных изолятов *S. haemolyticus*. На сегодняшний день для *S. haemolyticus* нет апробированной схемы MLST типирования. В связи с этим, исследовали вариабельность некоторых генов «домашнего хозяйства», в результате чего была предложена схема MLST типирования.

Для 71 изолята *S. haemolyticus* была проведена амплификация следующих генов: *arcC*, *aroE*, *cfxE*, *gmk*, *gtr*, *hemH*, *leuB*, *mvaK*, *mutS*, *pta*, *pyrR*, *riboseABCD*, *rphE*, *sh1200*, *sh1431*, *tphK*, *tpi*, *ygi*. Амплификация генов *ygi*, *gmk*, *mutS*, *pyrR*, *sh1431* носила не стабильный характер. Таким образом, нуклеотидные последовательности были определены для генов: *mvaK*, *rphE*, *tphK*, *gtr*, *tpi*, *aroE*, *pta*, *arcC*, *cfxE*, *hemH*, *leuB*, *riboseABCD*, *sh1200*. После

чего в результате выравнивания последовательностей этих генов были установлены соответствующие локусы, для нуклеотидных последовательностей которых были посчитаны дискриминационные коэффициенты (Таблица 8).

Таблица 8. Характеристика variability нуклеотидной последовательности и дискриминационный коэффициент для исследуемых локусов *S. haemolyticus*

Локус	Количество аллелей	Размер	Сайты полиморфизмов	S	ds	N	dn	dn/ds	Дискриминационный коэффициент D
<i>mvaK1</i>	6	561	18	121,2	0,0609	439,8	0,0027	0,0449	0,461
<i>rphE</i>	7	495	17	110,4	0,0442	384,6	0,0070	0,1584	0,490
<i>tphK</i>	7	522	154	116,3	0,8996	405,7	0,0907	0,1008	0,484
<i>gtr</i>	5	471	22	107,8	0,0999	363,2	0,0080	0,0805	0,212
<i>arcC</i>	4	504	8	114,7	0,0391	389,3	0,0000	0	0,256
<i>tpiA</i>	6	468	6	105,9	0,0166	362,1	0,0018	0,1112	0,704
<i>pta</i>	6	486	15	109,5	0,0432	376,5	0,0041	0,0940	0,635
<i>leuB</i>	6	553	15	125,2	0,0376	426,8	0,0066	0,1756	0,163
<i>ribose ABCD</i>	3	533	34	116,2	0,158	414,8	0,0061	0,0382	0,056
<i>sh1200</i>	8	478	18	106,7	0,054	370,3	0,0055	0,1014	0,543

<i>hemH</i>	3	431	10	90,4	0,0547	338,6	0,0059	0,1083	0,109
<i>cfxE</i>	5	437	14	98,0	0,0584	337,0	0,0072	0,1227	0,162

Нуклеотидная последовательность локуса *aroE* была идентична для всех штаммов, что позволило исключить данный локус из последующего анализа. На основании дискриминационных коэффициентов были выбраны 7 локусов с наибольшей дискриминационной способностью (*tpi*, *pta*, *sh1200*, *rphE*, *tphK*, *mvaK*, *arcC*). Кроме того было посчитано соотношение несинонимичных замен к синонимичным заменам (dn/ds) в нуклеотидной последовательности каждого локуса. Данные локусы вошли в состав предлагаемой MLST схемы. Дискриминационный коэффициент Хантер-Гастона D для этой MLST схемы составил 0,874. На основании данных типирования по этой схеме все тестируемые изоляты (71 изолят) были отнесены к 23 различным сиквенс типам (Таблица 9).

Таблица 9. Результаты MLST для исследуемых изолятов *S.haemolyticus*

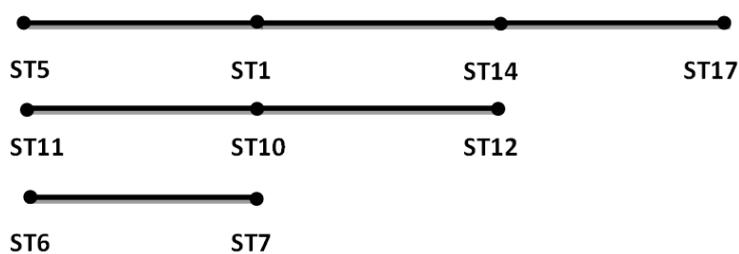
Сиквенс-тип	Количество изолятов	Аллели						
		<i>tpiA</i>	<i>pta</i>	<i>sh1200</i>	<i>rphE</i>	<i>tphK</i>	<i>mvaK1</i>	<i>arcC</i>
ST-1	14	1	1	1	1	1	3	1
ST-2	1	1	1	1	1	2	1	1
ST-3	1	1	1	1	2	1	4	2
ST-4	1	1	1	1	7	1	1	1
ST-5	9	1	1	7	1	1	3	1
ST-6	1	1	3	1	1	2	3	2

ST-7	1	1	3	1	1	5	3	2
ST-8	1	1	4	5	4	4	1	3
ST-9	1	2	1	5	2	2	1	2
ST-10	1	2	2	1	2	2	5	1
ST-11	2	2	2	1	2	2	5	3
ST-12	5	2	2	6	2	2	5	1
ST-13	1	2	3	1	2	2	3	2
ST-14	3	3	1	1	1	1	3	1
ST-15	1	3	1	5	2	3	1	1
ST-16	1	3	2	5	2	2	1	2
ST-17	19	3	3	1	1	1	3	1
ST-18	1	4	1	2	6	7	1	4
ST-19	1	4	5	4	6	6	6	1
ST-20	1	5	3	3	5	5	3	1
ST-21	1	5	6	4	6	6	6	1
ST-22	2	6	1	8	2	1	1	1
ST-23	2	6	1	1	2	2	3	1

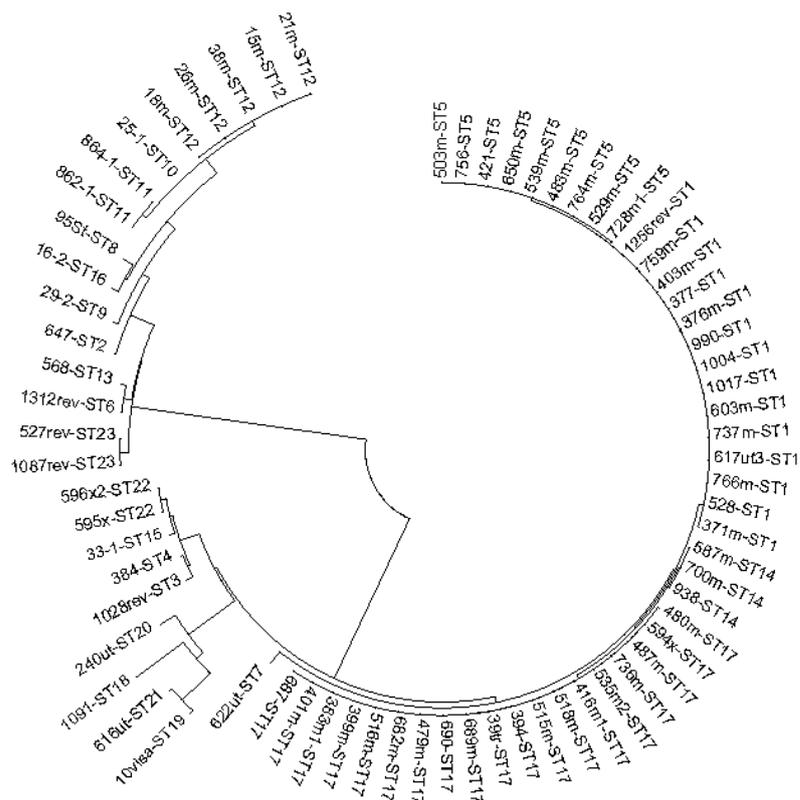
Выявленные сиквенс-типы формируют три клональных комплекса и 14 сингл-тонов-единичных множеств (singletons) (рис. 3а). Филогенетическое дерево, построенное на основании различий в нуклеотидных

последовательностях локусов, входящих в предлагаемую схему MLST представлено на **рисунке 3б**.

Как видно из анализа филогенетического дерева, а также из данных, полученных на основе алгоритма eBURST, изоляты формирующие клональный комплекс и принадлежащие к сиквенс-типам ST1, ST5, ST14, ST17 относятся к близкородственным изолятам и формируют единый кластер. Все изоляты (n = 45 изолятов), входящие в этот кластер, устойчивы к оксациллину, эритромицину и гентамицину, а также чувствительны к ванкомицину и линезолиду, часть изолятов частично устойчивы к клиндамицину (51,2%; 23/45), ципрофлоксацину (75,5%; 34/45), тетрациклину (26,6%; 12/45). На основании сопоставления данных об устойчивости к антибиотикам изолятов из рассматриваемого кластера, диагнозов пациентов, от которых были получены изоляты, а так же кластерного анализа данных MLST, можно предположить, что входящие в этот кластер штаммы относятся к госпитальным.



a



б

Рисунок 3. Анализ данных MLST изолятов *S. haemolyticus*:

(а) Клональные комплексы изолятов *S. haemolyticus* на основе данных, полученных с помощью алгоритма eBURST;

(б) Филогенетическое дерево для исследуемых изолятов *S. haemolyticus*, построенное на основании различий в нуклеотидных последовательностях семи MLST локусов

Поскольку, первичная идентификация всех клинических изолятов *S. haemolyticus* была проведена с помощью метода прямого масс-спектрометрического профилирования, было решено провести типирование

исследуемых клинических изолятов (71 изолят) на основании отличий в их масс-спектрах. Для масс-спектров были рассчитаны корреляционные коэффициенты (КК) и построена матрица корреляционных коэффициентов (рис. 4). Значение КК в корреляционной матрице варьировалось от 0,002 до 1,000; среднее значение КК в матрице составило $0,593 \pm 0,232$.

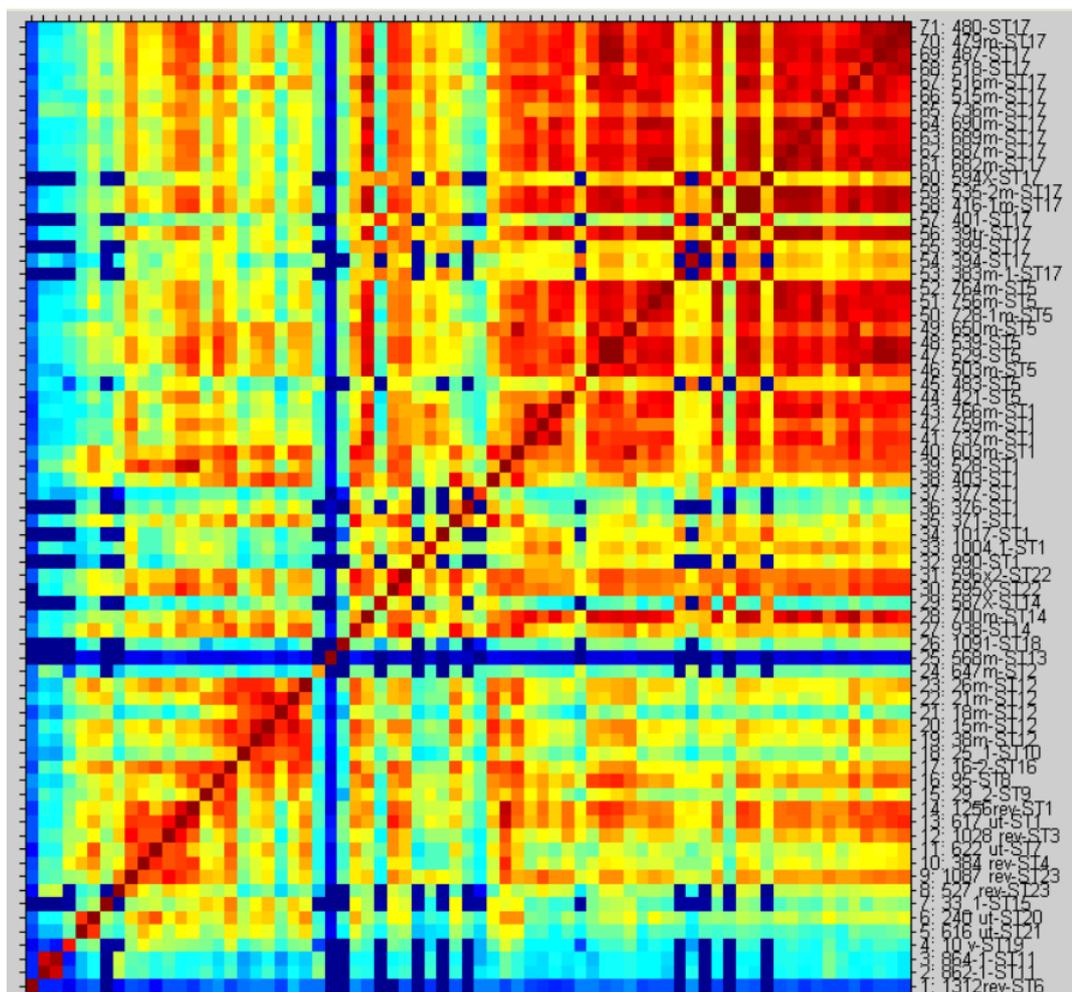


Рисунок 4. Матрица корреляционных коэффициентов исследуемых изолятов *S.haemolyticus*.

Были рассмотрены клинические изоляты, полученные из «Научного центра акушерства, гинекологии и перинатологии имени академика В.И. Кулакова», КК для таких штаммов составил $0,666 \pm 0,241$, в то время как КК для клинических изолятов, полученных из различных стационаров, составил $0,577 \pm 0,223$. При более тщательном анализе выборки были выявлены изоляты, выделенные у двух близнецов с поздним неонатальным сепсисом,

приведшем к их смерти: 479 и 480, 515 и 518, 487и 516, соответственно из крови, кала, и зева. Среднее значение КК масс-спектров, полученных для этих изолятов, составил $0,935 \pm 0,04$, причем для изолятов, выделенных из крови, КК составил 0,976. Кроме того, на основании КК был выделен большой кластер близкородственных изолятов (50%; 24/48), среднее значение КК этого кластера составило $0,904 \pm 0,005$. В данных кластер вошли изоляты, полученные от 17 новорожденных детей, в том числе и изоляты от новорожденных детей с поздним неонатальным сепсисом (479 и 480, 515 и 518, 487и 516) и конъюнктивитом 728-1. Скорее всего, изоляты, входящие в этот кластер относятся к госпитальным штаммам, циркулирующим на территории России.

3.3 Системный анализ индивидуальных штаммов КОС

3.3.1 Полногеномное секвенирование клинических изолятов *S.epidermidis*

В группу для полногеномного секвенирования были отобраны три госпитальных изолята *S. epidermidis* (SE36-1, SE41, SE528). Исследуемые изоляты SE41 и SE36-1 характеризуются ST2, сиквенс тип изолята SE528 отличается от ST2 на одну букву аллели *gtr*. Было проведено полногеномное секвенирование данных изолятов. Полногеномное секвенирование изолята 36-1 было выполнено дважды. Данные о нуклеотидных последовательностях изолятов SE36-1, SE41, SE528 получены в лаборатории постгеномных методов исследования ФГБУ ФНКЦ ФХМ ФМБА России совместно с Карповой И.Ю. Результаты секвенирования и аннотации представлены в **таблице 10**.

Таблица 10. Характеристика качества полногеномного секвенирования госпитальных изолятов *S. epidermidis*

Изолят	N50	Количество контигов	Средний размер контига	Покрывание	Номера в базе NCBI	Длина, Mb	GC-состав, %	Белки
SE36-1	3340	1077	2399	8,0				
SE36-1	10924	410	6591	9,0	APHS000000	2,71	31,80	2611
SE41	63976	111	29805	21,0	ARHU000000	2,69	31,7	2494
SE528	45618	124	26049	18,0	ARHT000000	2,69	31,7	2493

Анализ полногеномных нуклеотидных последовательностей был выполнен совместно с сотрудниками лаборатории биоинформатики ФГБУ ФНКЦ ФХМ ФМБА России Маноловым А.И. и Каныгиной А.В.

На основании данных полногеномных последовательностей, отобранных изолятов, а также геномных данных штаммов *S. epidermidis*, представленных в базе данных NCBI (92 штамма) был проанализирован состав «основного» (от англ. core-genome) и «дополнительного» (от англ. accessory-genome) генома. Кривая накопления генов (Gene accumulation curves), представленная на **рисунке 5**, демонстрирует, что размер «основного» генома нарастает экспоненциально при увеличении количества штаммов и выходит на плато на уровне 943 генов, при этом накопление генов «дополнительного» генома (pan-genome) соответствует степенной кривой. Размер «дополнительного» генома составляет 7413 генов. На основании данных «основного» генома, был проведен филогенетический анализ

полнонуклеотидных последовательностей изучаемых клинических изолятов и последовательностей, представленных в базе NCBI (рис. 6).

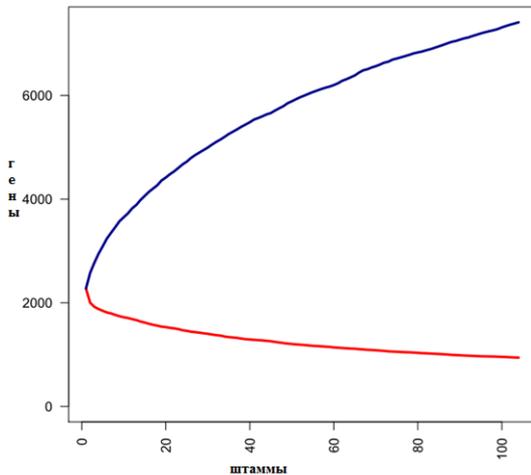


Рисунок 5. Зависимость размера «основного» и «дополнительного» генома от количества штаммов (Кривая накопления генов)

Кривая, соответствующая «основному» геному, обозначена красным цветом и соответствует функции: $y = a \cdot \exp^{-N/b} + c$; кривая, характеризующая «дополнительный» геном, обозначена синим цветом, и описывается функцией: $y = a \cdot N^b + c$

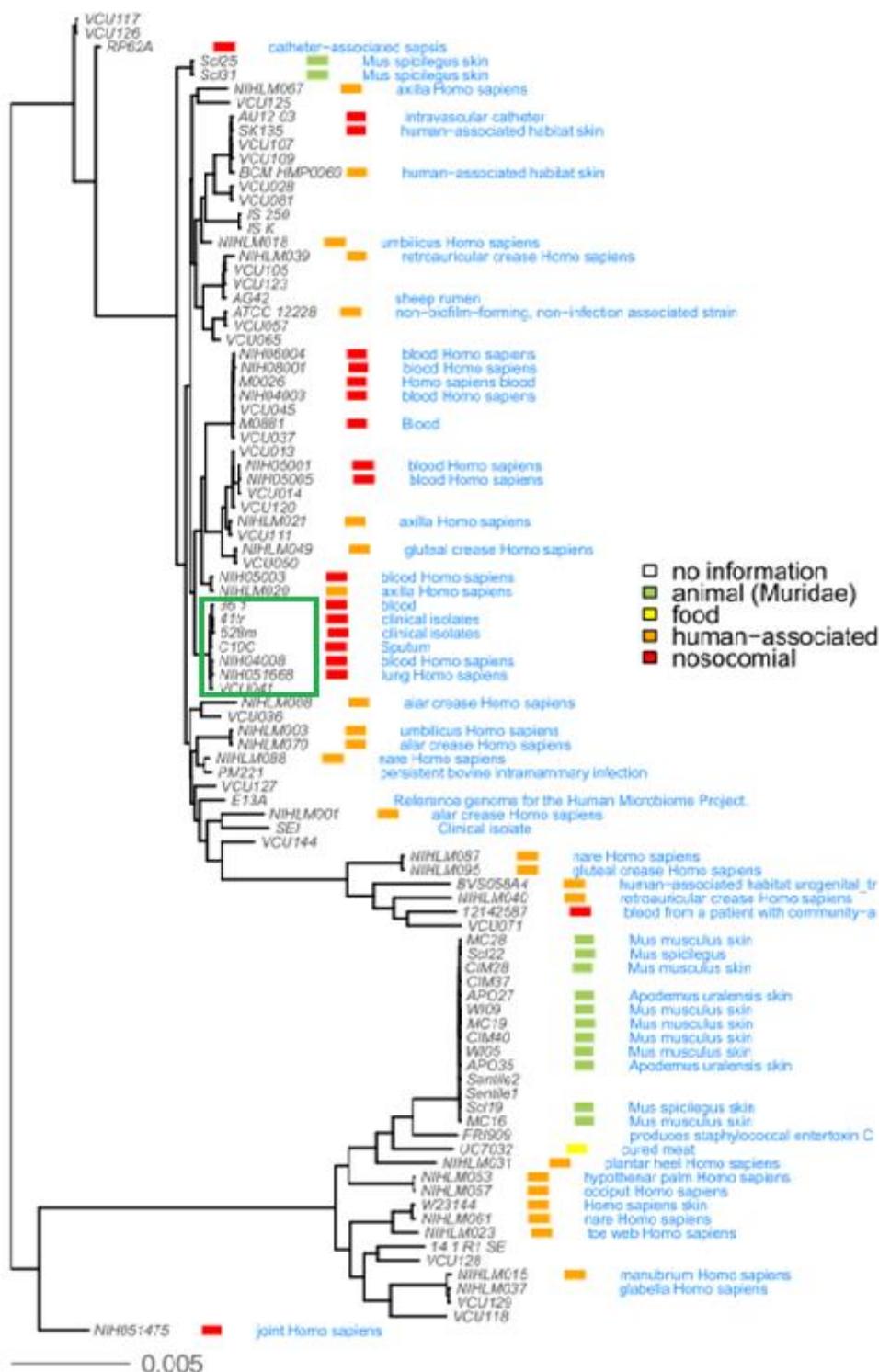


Рисунок 6. Сравнительный филогенетический анализ изолятов *S. epidermidis*, основанный на данных об однонуклеотидных заменах в генах «основного» генома (зеленой рамкой отмечен кластер близкородственных штаммов, включающий SE36-1, SE41 и SE528)

На основании данных филогенетического анализа для исследуемых изолятов (SE36-1, SE41 и SE528) близкородственными штаммами *S. epidermidis* являются C10C, NIH04008, NIH051668, выделенные, соответственно, из мокроты, крови и легких *Homo sapiens*, а также штамм VCU041, о происхождении которого данных нет. Штаммы C10C, NIH04008, VCU041, SE36-1 и SE41 относятся к ST2, NIH051668 - к ST 185. Сиквенс тип изолята SE528 отличается от ST2 на одну букву в аллели *gtr* и также является производным от ST2. Сиквенс-типы ST2 и ST185 характерны для госпитальных штаммов [170].

Таким образом, на основании филогенетического анализа полногеномных последовательностей, а также MLST было подтверждено госпитальное происхождение исследуемых изолятов (SE36-1, SE41 и SE528), другими словами, данные изоляты ассоциированы со случаями инфекционных процессов, а не со случаями контаминации и колонизации.

В ходе детального анализа качества сборки нуклеотидной последовательности генома изолята SE36-1, было выявлено, что низкое значение среднего покрытия по геному связано с наличием контигов (продолжительных участков ДНК, полученных в процессе сборки) с покрытием сильно превышающем среднее покрытие по геному (таблица 11), что было подтверждено результатами повторного полногеномного секвенирования этого изолята. Разница по покрытию для некоторых контигов отличалась более чем в 30 раз. Для проверки этих данных были получены результаты полимеразной цепной реакцией в реальном времени для генов, входящих в контиги со средним покрытием по геному и генов, входящих в контиги с повышенным покрытием. Так количество гена, кодирующего фаговую интегразу (COG0582), входящую в состав контига 158 (покрытие 261) превышало количество гена домашнего хозяйства-Carbamate Kinase (*arcC*) (покрытие 9) в 32 раза (2^5). В большинстве случаев в составе

бактериальных геномов повышенной копийностью обладают различные повторы и мобильные элементы. На основании полученных данных секвенирования генома изолята SE36-1 был осуществлен поиск мобильных элементов в составе полнонуклеотидных последовательностей. Было установлено, что контиги изолята SE36-1, обладающие повышенным покрытием, соответствуют нуклеотидной последовательности профага SP β длиной 127kb, ранее обнаруженного в составе генома штамма *S.epidermidis* RP62A.

Таблица 11. Покрытие некоторые контигов в геноме клинического изолята *S.epidermidis* SE36-1 (среднее покрытие генома - 9x)

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
контиг00158	6331	261,0	контиг00049	15080	10,0
контиг00183	5243	252,6	контиг00059	12691	11,3

Контиги, соответствующие последовательности профага SP β так же были найдены и в геномах двух других изолятов *S. epidermidis* SE41 и SE528 (рис. 7), но их покрытие не превышало среднее покрытие по геному (таблица 12).

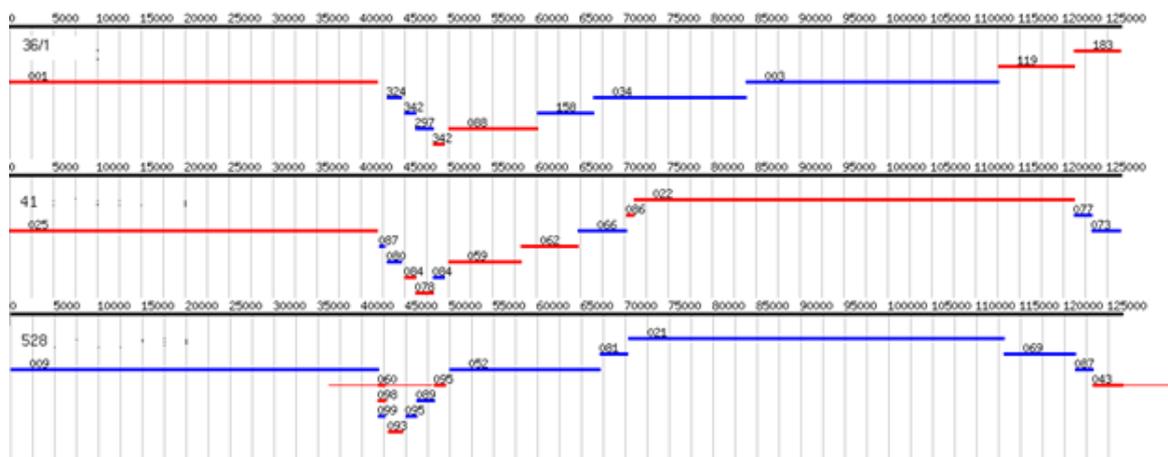


Рисунок 7. Выравнивание контигов, соответствующих профагу SPβ, для клинических изолятов *S. epidermidis* SE36-1, SE41, SE528

Таблица 12. Покрытие контигов, соответствующих профагу SPβ, в составе геномов клинических изолятов *S.epidermidis* SE41 и SE528 (Среднее покрытие по геному для этих изолятов- 21х и 18х, соответственно)

изолят SE41			изолят SE528		
№ контига	длина	покрытие	№ контига	длина	покрытие
контиг00022	50079	25,4	контиг00009	71410	18,3
контиг00025	41869	20,7	контиг00021	42788	21,1
контиг00059	8335	19,3	контиг00052	17209	18,0
контиг00062	6426	20,6	контиг00069	8145	20,0
контиг00066	5539	16,8	контиг00081	3131	16,7

Для установления локализации нуклеотидной последовательности изолята SE36-1, соответствующей профагу SPβ, были проанализированы короткие прочтения с прибора. В результате анализа, было показано, что все короткие прочтения с прибора, соответствующие профагу SPβ клинического изолята SE36-1, не имеют общих участков прочтениями, содержащими

последовательность хромосомной ДНК этого изолята. Кроме того методом Сенгера была уточнена нуклеотидная последовательность изолята SE36-1, соответствующая профагу SP β , в результате чего было показано, что данная последовательность замыкается в кольцо.

Для двух других изолятов (SE41 и SE528) были обнаружены короткие прочтения с прибора, одновременно содержащие часть последовательности, соответствующей профагу SP β , и часть хромосомной последовательности этих изолятов, что указывает на интеграцию профага SP β в хромосомную ДНК.

Кроме последовательности, гомологичной профагу SP β , в геноме изолята SE36-1 (контиг 00008) была обнаружена последовательность гомологичная фагу стафилококков StB20 (номер в базе данных NCBI-JN700521.1). Поиск осуществлялся в базе данных NCBI гомология составила 96%. Покрытие данного участка генома (x15,2) превышало среднее покрытие генома (x9) не значительно. Кроме того короткие прочтения с прибора, соответствующие фагу StB20, содержали также и участки хромосомной последовательности изолята SE36-1, что подтверждает нахождение StB20 в геноме изолята SE36-1 в виде профага.

На основании этих данных был поставлен эксперимент, целью которого являлось получение фаговых частиц из бактериальной культуры *S.epidermidis* SE36-1 под действием митомицина С. Результаты электронной микроскопии фагового препарата представлены на **рисунке 8**.

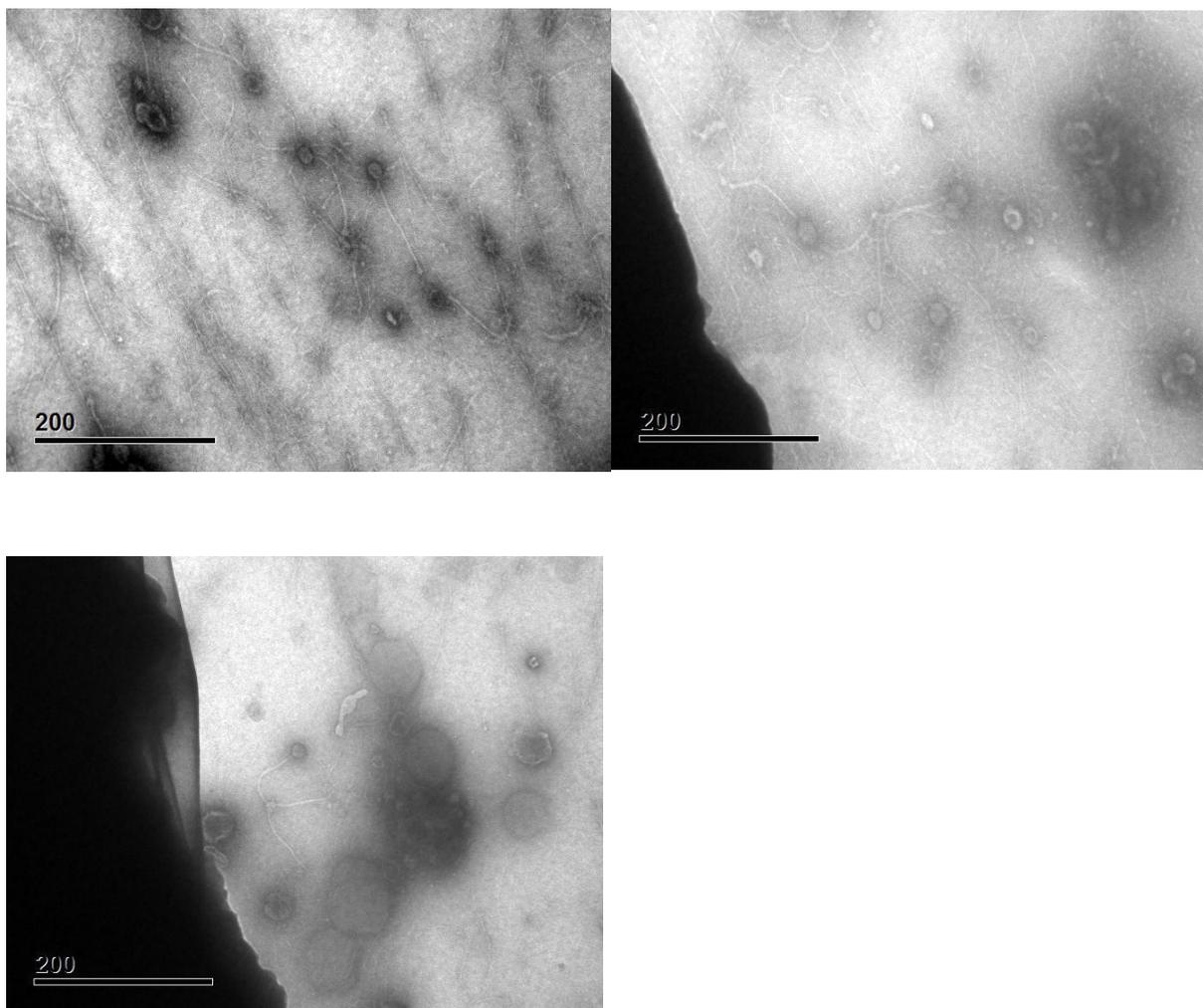


Рисунок 8. Электронная микроскопия фагового образца (увеличение 200 нм)

В последствие, из фагового образца был выделен препарат тотальной ДНК, и определена его полногеномная нуклеотидная последовательность, затем проведено ее аннотирование. По данным аннотации в фаговом образце выявлено два различных фага: Sp β like и StB20like. Однонуклеотидных замен для фаговых последовательностей, полученных в ходе полногеномного секвенирования изолята SE36-1 (Sp β и StB20), и для последовательностей, полученных из фагового образца, выявлено не было. При этом были выявлены три несинонимичных однонуклеотидных замены (**таблица 13**), в последовательности Sp β изолятов SE528 и SE41 относительно кольцевой последовательности Sp β like изолята SE36-1.

Таблица 13. Несинонимичные однонуклеотидные замены в последовательности Sp β изолятов SE528 и SE41 относительно кольцевой последовательности Sp β like изолята SE36-1

Позиция (нуклеотид) в кольцевой последователь ности Sp β like изолята SE36- 1	Нуклеотид		Аминокисл отная замена	Аннотация
	SE528 изолят	SE41 изолят		
41636 (T)	A	A	p.His138Gln	Гипотетический белок
71200 (C)	T	T	p.Pro791Ser	белок «рулетка» (tape measure protein)
110447 (T)	C	C	p.Lys88Arg	Гипотетический белок

Нуклеотидные последовательности Sp β like и StB20like, полученные в результате секвенирования фагового образца, были проаннотированы. В этих последовательностях было выявлено соответственно 156 и 59 открытых рамок считывания (ОРС). В ходе аннотации в последовательностях Sp β like и StB20like были выявлены основные фаговые белки: белки, ответственные за сборку фаговых частиц (белок капсида, структурные белки хвоста фага, белок «рулетка» (tape measure protein)), белки, связанные с репликацией фаговой ДНК (ДНК праймаза, белок, связывающийся с одноцепочечной ДНК (single strand DNA binding protein), ДНК полимеразы III α и β - субъединицы), белки лизогении (инеграза), и белки литического пути (холин, липаза/ ацилгидролаза) (рис. 9, 10).

Кроме того, на основании данных анализа полногеномных последовательностей изолятов *S. epidermidis* (SE36-1, SE41, SE528) был произведен поиск известных ФВП (таблица 14). Для выявления ФВП *S. epidermidis* использовали три различных базы данных: VFDB [164], Victors

Таблица 14. Факторы вирулентности и патогенности изолятов *S. epidermidis* (SE528, SE36-1, SE41) по данным анализа полногеномного секвенирования (В скобках указано количество аминокислотных замен, относительно изолята SE 36-1; ПСРС-потенциальный сдвиг рамки считывания)

Аннотированные по данным полногеномного секвенирования аминокислотные последовательности	Длина сопоставления, %	SE36-1, % гомологии	SE41, % гомологии	SE528, % гомологии	RP6 2A, % гомологии	ATCC 12228, % гомологии
Фенол-растворимые модулины						
Фенол-растворимые модулины β 1						
MKLFNAFKDILEAAITN DGTQLGASIVNPIESSVD MVNRFLGN	100	100	100	100	100	-
MSKLAEAIANTVKAQ DQDWTKLGTSIVDIVES GVSVLGKIFGF	100	100	100	100	100	-
MEHVSKLAEAIANTVSA AQAEDGAELAKSIVNIV ANAGGIIQDIAHAFGY	100	100	100	100	100	100
MEHVSKLGEAIVDTVTA AQAEDGAELAKSIVNIV ANAGGIIQDIAHAFGY	100	100	100	100	100	100
Фенол- растворимый модулин α	100	100	100	100	100	-
Токсины						
δ -гемолизин	100	100	100	100	100	100
Гемолизин III	100	100	100	100	80	80
Гемолизин или родственный белок, содержащий CBS домен	100	100	100	100	-	-

Гемолизин	100	100	100	100	-	100
Секретируемые ферменты						
Эстераза	100	100	100	100	100	100
Эстераза	100	100	100	100	99(1)	100 (2)
Липаза (Geh)	100	100	100	100	100	100
Липаза (Geh1)	100	100	100	ПСПС	100	99 (1)
Липаза (LipA)	100	100	ПСП С	100	100	100
Предшественник триацилглицерол липазы	100	100	100	100	99 (2)	100
Сериновые протеазы						
V8 протеаза	100	100	100	100	-	100
HtrA	100	100	100	100	99 (2)	-
Цистеиновые протеиназы						
SspB	100	100	100	100	99 (1)	99 (1)
SspC	100	100	99 (1)	99 (1)	99 (1)	99 (1)
Clp протеазы						
ClpB	100	100	99 (1)	99 (1)	99 (2)	-
ClpP	100	100	100	100	-	-
ClpYQ (HslVU)	100	100	100	100	-	-
ClpX	100	100	100	100	100	100
Капсула (Белки, ответственные за синтез поли γ-DL-кислоты)						
CapA	100	100	100	100	100	99 (1)
CapB	100	100	100	100	100	100
CapC	100	100	100	100	100	100
CapD	100	100	100	100	100	100
CapA родственный белок	100	100	100	100	100	100
Cap5B	100	100	100	100	-	99 (7)
Факторы, ответственные за адгезию и образование биопленок, белки семейства MSCRAMM						
Полисахаридный внеклеточный адгезин						
IcaA	100	ПСПС	ПСП С	100	100	-
IcaB	100	100	100	96 (9)	96 (9)	-
IcaC	100	100	100	100	100	-
IcaD	100	100	100	100	100	-
Аутолизин	100	100	100	-	-	100
Бифункциональный аутолизин	100	100	100	100	100	-

Фибронектин связывающий белок	100	100	ПСР С	ПСРС	99 (2)	-
Фибриноген связывающий белок	100	100	100	100	99 (1)	99 (1)
Эластин связывающий белок (Etb)	100	100	100	100	99 (1)	99 (1)
Тейхоевые кислоты						
TagA	100	100	100	100	100	10 0
TagB	*	100	100	100	28	28
TagG	100	100	100	100	100	10 0
TagX	100	100	100	100	100	10 0
TagF	100	100	100	100	-	-
TagH	100	100	+ (2)	ПСРС	100	10 0

*Аминокислотные последовательности белков TagB изолятов SE36-1, SE41, SE528 гомологичны на 100% по всей длине, но при этом они гомологичны только на 28% аминокислотной последовательности белков TagB штаммов ATCC12228 и RP62A при длине сопоставления 51%.

Таблица 15. Аминокислотные замены в белковых последовательностях изолятов SE41, SE528 и штаммов ATCC12228 и RP62A относительно изолята SE36-1

Название белка	АК позиция в последовательности SE36-1	АК в SE36- 1	АК в SE52 8	АК в SE4 1	АК в RP62A	АК в ATCC 12228
CapA	209	A	A	A	A	D
Cap5B	15	I	I	I	Нет белковой последов ательност и	V
	90	V	V	V		A
	113	S	S	S		A
	218	T	T	T		S
	286	N	N	N		K
	353	T	T	T		V
	440	D	D	D		E
Etb	1	V	V	V	M	V
	34	H	H	H	H	Q

Фибронектин связывающий белок	1	M			L	
	107	Q			K	
Фибриноген связывающий белок	225	A	A	A	A	S
	226	P	P	P	S	P
IcaB	244	E	E	G	G	Нет белковой последов ательнос ти
	245	F	F	I	I	
	246	N	N	Q	Q	
	247	M	M	Y	Y	
	249	L	L	F	F	
	250	H	H	T	T	
	251	F	F	L	L	
	252	R	R	Q	Q	
	253	K	K	E	E	
Эстераза	9	I	I	I	I	L
	64	S	S	S	A	A
HtrA	58	G	G	G	S	Нет белковой последов ательнос ти
	131	D	D	D	E	
SspB	218	P	P	P	T	T
SspC	94	A	G	G	G	G
ClpB	24	Y	F	F	F	Нет белковой последов ательнос ти
	435	A	A	A	P	
	514	E	E	E	K	
Предшествен ник триацилглице рол липазы	51	A	A	A	V	A
	67	T	T	T	P	T
Липаза (Geh1)	181	D		D	D	E
TagH	200	C	V		C	C
	199	T	Q		T	T

3.3.2 Полногеномное секвенирование клинических изолятов

S. haemolyticus

Для полногеномного секвенирования также были отобраны четыре изолята *S. haemolyticus* (SH39, SH527, SH864-1, SH421), относящиеся, по предложенной в данной работе схеме MLST, к сиквенс типам ST17, ST23, ST11, ST5, соответственно. Как показано выше сиквенс типы ST5 и ST17 характеризуют госпитальные штаммы, скорее всего ST23 также характеризует госпитальные штаммы (на основании данных диагнозов пациентов и профилей лекарственной чувствительности изолятов этого сиквенс-типа). Что касается сиквенс-типа ST11, то предположительно этот сиквенс-тип характеризует негоспитальные штаммы. Таким образом, для полногеномного секвенирования были отобраны три госпитальных изолята (SH39, SH527, SH421) и один негоспитальный изолят SH864-1. Данные о полногеномных нуклеотидных последовательностях изолятов SH39, SH527, SH864-1, SH421 были получены в лаборатории постгеномных методов исследования ФГБУ ФНКЦ ФХМ ФМБА России совместно с Карповой И. Ю. Результаты секвенирования и аннотации представлены в **таблице 16**.

Таблица 16. Характеристика качества полногеномного секвенирования клинических изолятов *S. haemolyticus*

изолят	Номера в базе NCBI	Длина, Мб	GC-состав, %	Белки
39	SUB666138	2,8	32,1	2223
527	SUB666304	2,7	31,8	2258
864-1	SUB666308	2,8	32,1	2250
421	SUB666309	2,6	32,0	2210

изолят	N50	Количество контигов	Средний размер	Покрытие

			контига	
39	30903	230	14318	19
527	38578	160	19771	25
864-1	30567	209	15695	22
421	34861	204	16932	21

Анализ полногеномных нуклеотидных последовательностей был выполнен совместно с сотрудниками лаборатории биоинформатики ФГБУ ФНКЦ ФХМ ФМБА России Маноловым А.И. и Каныгиной А.В.

Для сравнения данных полногеномного секвенирования исследуемых изолятов с ранее полученными мировым сообществом геномами изолятов *S. haemolyticus*, а так же для выявления «основного» и «дополнительного» генома, из базы NCBI были загружены полногеномные последовательности штаммов *S. haemolyticus* (2 кольцевые последовательности и 166-последовательностей в виде контигов). В результате анализа была получена кривая накопления генов (Gene accumulation curves), представленная на **рисунке 11**, которая демонстрирует, экспоненциальное нарастание размера «основного» генома при увеличении количества штаммов. Размер «основного» генома составил 1439 гена. Накопление генов «дополнительного» генома характеризуется степенной кривой. На **рисунке 12** представлено филогенетическое дерево, отражающее родство исследуемых изолятов и изолятов, геномные последовательности, которых представлены в базе данных NCBI.

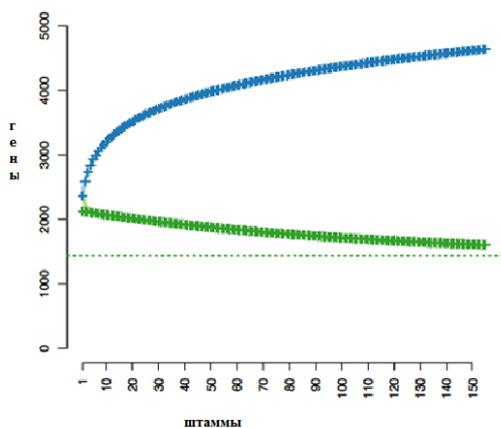


Рисунок 11. Зависимость размера «основного» и «дополнительного» генома *S. haemolyticus* от количества штаммов (Кривая накопления генов) Кривая, соответствующая основному геному, обозначена зеленым цветом и соответствует функции: $y = a \cdot \exp^{-N/b} + c$; кривая, характеризующая дополнительный геном, обозначена синим цветом и описывается функцией: $y = a \cdot N^b + c$



Рисунок 12. 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)

На основании филогенетического анализа полногеномных последовательностей штаммов *S. haemolyticus* наиболее близкородственными штаммами для изолятов SH39, SH421 являются штаммы Sh29/312/L2, 1HT3, выделенные соответственно из крови человека и из кишечника человека. Изолят SH527 занимает на филогенетическом дереве отдельную позицию. Для изолята SH864-1 наиболее близкими являются штаммы 1292_SHAE, 51-

72. Информации об источнике выделения 1292_SHAE в базе NCBI не содержится, 51-72 получен со слизистой носа человека.

В ходе анализа полученных полногеномных последовательностей был произведен поиск фаговых последовательностей, результаты представлены в **таблице 17**. Покрытие участков нуклеотидной последовательности, содержащие фаговые гены, соответствует среднему покрытию по геному. При поиске аналогичных последовательностей в базе данных NSBI было обнаружено, что последовательности контигов 47, 48 изолята SH527 и контига 8 изолята SH39 гомологичны на 96%, 95% и 54%, соответственно последовательности фага стафилококков IME-SA4, который содержится в геномах данных изолятов как профаг.

Таблица 17 Участки, содержащие фаговые гены в составе геномов исследуемых изолятов *S. haemolyticus*

Изолят <i>S. haemolyticus</i> (среднее покрытие по геному)	SH527 (x25,0)	SH39 (x19,0)	SH421 (x21,0)	SH864-1 (x22,0)
Контиги, содержащие фаговые гены (x покрытие)	Контиг 4 (x25,9)	Контиг 8(x24,4)	Контиг 1 (123483; x22,3)	Не обнаружено
	Контиг 10 (x22,3)			
	Контиг 47(x30,0)	Контиг 12(x17,3)	Контиг 9 (x22,9)	
	Контиг 48(x31,2)			

На основании полногеномных данных, полученных для исследуемых изолятов *S. haemolyticus* (SH527, SH39, SH421, SH 864-1), осуществляли поиск ФВП. Для этого использовали базы данных: VFDB [164], Victors [165]

и GenBank [156]. В таблице 18 перечислены найденные ФВП.

Таблица 18. Факторы вирулентности и патогенности, исследуемых изолятов *S.haemolyticus*.

Аннотированные по данным полногеномного секвенирования АК последовательности	Длина сопоставления, %	SH 527, % гомологии	SH 39, % гомологии	SH 421, % гомологии	SH 864-1, % гомологии	JCSC14 35, % гомологии
Токсины						
Токсин <i>S.haemolyticus</i>		+				
Токсин <i>S.haemolyticus</i>				+		
Энтеротоксин					+	
Гемолизин III	100	100	100	100	Последовательность нарушена	100
Гемолизин	100	43	43	43	43	100
Секретируемые ферменты						
Лизофосфолипаза	100	100	100	100	100	100
Эстераза/Липаза	100	100	100	100	100	100
Липаза (LipA)	100	99 (5)	99 (1)	100	100	100
Липаза (Lip) (SH0168)	100	100	95 (37)	95 (37)	96 (27)	100
Сериновая протеаза 1	100	100	100	96 (26)	99 (1)	100
Сериновая протеаза 2	100	99 (1)	98 (5)	98 (5)	98 (7)	100
СААХ протеаза	100	99 (1)	100	100	99 (1)	100
ClpP	100	99 (1)	99 (1)	99 (1)	99 (1)	100
ClpX	100	99 (1)	99 (1)	99 (1)	99 (1)	100

Капсула (Белки, ответственные за синтез поли γ –DL-глутаминовой кислоты)						
CapA	100			100	65 (32)	100
CapB	100			100		100
CapC	100			100		100
CapA родственный белок	100	90 (37)	91 (33)	93 (27)	90 (37)	100
PgsA	100	98 (6)	98 (6)	98 (6)	99 (4)	100
PgsB	100	100	100	100	100	100
PgsC	100	99 (1)	99 (1)	99 (1)	100	100
Факторы, ответственные за адгезию и образование биопленок, белки семейства MSCRAMM						
IcaC	100	99 (1)	99 (1)	99 (1)	98 (8)	100
Аутолизин	100	100	100	100	99 (2)	100
	79	42	42	42	42	100
Фибронектин связывающий белок	100	99 (1)	100	100	99 (1)	100

В скобках указано количество АК замен, относительно изолята JCSC1435

У изолятов SH 527 и SH 421 помимо прочих ФВП (гемолизин, различных ферментов, белков, ответственных за синтез капсулы и др.) на основании геномных данных были аннотированы АК последовательности токсинов. Сходство между АК последовательностями токсинов изолятов SH 527 и SH 421 составило 85% при длине сопоставления 96%. У изолята SH864-1 в составе генома была обнаружена последовательность, аннотированная как энтеротоксин.

Кроме того были определены АК замены в найденных ФВП (таблица 19). АК замены определяли относительно белковых последовательностей штамма *S. haemolyticus* JCSC1435 (AP006716.1), который использовали в качестве референсного штамма госпитальной природы.

Таблица 19. Аминокислотные замены в белковых последовательностях изолятов SH 527, SH 39, SH 421, SH 864-1 относительно штамма JCSC1435 (% гомологии более 95)

Название белка	АК позиция в последовательности JCSC1435	АК в SH 527	АК в SH39	АК в SH421	АК в SH864-1
LipA	16 (V)	L	V	V	V
	33 (S)	I	S	S	S
	64 (G)	E	G	G	G
	281 (V)	A	V	V	V
Lip (SH0168)	31 (S)	S	G	G	G
	108 (S)	S	T	T	T
	111 (D)	D	N	N	N
	125 (T)	T	A	A	A
	128 (S)	S	S	S	N
	133 (N)	N	T	T	T
	140 (Q)	Q	-	-	K
	141 (Q)	Q	-	-	Q
	142 (S)	S	-	-	S
	143 (L)	L	-	-	L
	144 (S)	S	-	-	S
	145 (T)	T	-	-	T
	146 (D)	D	-	-	D
	147 (T)	T	-	-	T
	148 (Q)	Q	-	-	Q
	149 (T)	T	-	-	T
	150 (S)	S	-	-	S
	160 (T)	T	K	K	K
	170 (K)	K	E	E	E
	186 (T)	T	I	I	I
	190 (T)	T	I	I	T
	198(D)	D	D	D	N
	211 (P)	P	L	L	L
	228 (I)	I	T	T	T
	234 (S)	S	S	S	L
	242 (T)	T	I	I	I
	246 (T)	T	T	T	M
257 (A)	A	A	A	G	
278 (A)	A	S	S	P	
293 (T)	T	S	S	T	
296 (L)	L	I	I	L	

	301 (N)	N	S	S	N
	306 (L)	L	I	I	L
	314 (P)	P	P	P	S
	319 (S)	S	G	G	S
	399 (D)	D	D	D	G
	465 (K)	K	E	E	K
	490 (A)	A	S	S	S
	504 (H)	H	R	R	R
	554 (A)	A	V	V	A
	646 (I)	I	N	N	N
	663 (A)	A	S	S	A
	718 (S)	S	T	T	T
	733 (D)	D	G	G	G
Сериновая протеаза 1	126 (M)	M	M	V	M
	136 (S)	S	S	F	S
	137 (A)	A	A	T	A
	138 (S)	S	S	P	S
	142 (D)	D	D	A	D
	159 (K)	K	K	-	K
	161 (D)	D	D	A	D
	180 (H)	H	H	Q	H
	185 (E)	E	E	A	E
	186 (S)	S	S	L	S
	188 (E)	E	E	D	E
	195 (K)	K	K	E	K
	219 (Y)	Y	Y	H	Y
	224 (N)	N	N	S	N
	226 (K)	K	K	E	K
	233 (L)	L	L	I	L
	247 (L)	L	L	S	L
	251 (E)	E	E	G	E
	253 (L)	L	L	S	L
	255 (N)	N	N	D	N
	256 (E)	E	E	K	E
	259 (N)	N	N	S	N
	292(A)	A	A	A	E
	297 (M)	M	M	I	M
	348 (I)	I	I	T	I
	417 (M)	M	M	V	M
	418 (Q)	Q	Q	L	Q
Сериновая протеаза 2	14 (I)	I	V	V	V
	16(I)	I	I	I	M

	20 (I)	I	M	M	M
	29 (E)	E	D	D	D
	43 (T)	A	A	A	A
	67 (N)	N	K	K	K
	278 (V)	V	V	V	A
ClpP	194 (D)	E	E	E	E
ClpX	48 (K)	E	E	E	E
СААХ протеаза	222 (T)	A	T	T	A
PgsA	79 (D)	E	E	E	D
	82 (D)	E	E	E	D
	242 (D)	N	N	N	N
	275 (S)	T	T	T	T
	282 (I)	N	N	N	N
	307 (H)	N	N	N	N
PgsC	71 (T)	S	S	S	T
аутолизин	8 (C)	C	C	C	R
	191 (L)	L	L	L	F
IcaC	168(I)	I	I	I	V
	220 (V)	V	V	V	L
	223 (M)	M	M	M	T
	250 (L)	L	L	L	P
	255 (M)	M	M	M	L
	308 (F)	F	F	F	делеция
	309 (T)	T	T	T	делеция
352 (N)	S	S	S	N	
Фибронектин связывающий белок	315 (F)	Y	F	F	Y

Интересно, что гены токсинов изолятов SH527 и SH421 входят в состав контигах, содержащих профаги и представляют собой мобильный элемент (рис. 13).

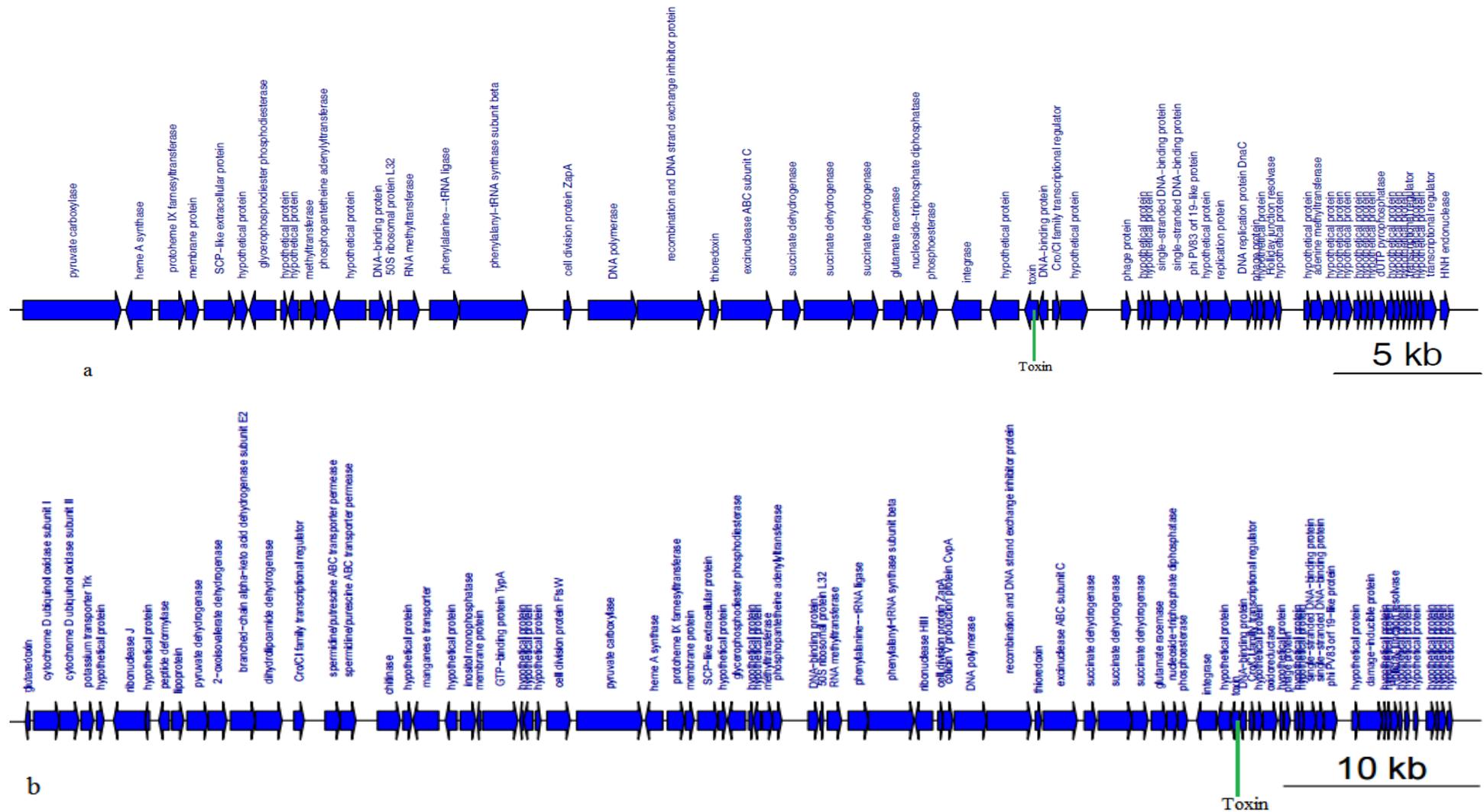


Рисунок 13. Аннотация контигов изолятов *S. haemolyticus*, содержащих гены токсинов и гены профагов: а – контиг 9 изолята SH421; б – контиг 4 изолята SH527

3.3.3 Оценка вирулентности исследуемых изолятов КОС

Особенности формирования биопленок стафилококками различных видов. Одним из основных факторов вирулентности стафилококков является способность формировать биопленки. Как видно из результатов анализа данных полногеномного секвенирования все исследуемые изоляты КОС обладали различным набором генов, принимающих участие в процессе образования биопленки. Так в геномах изолятов *S.epidermidis* SE36-1, SE41, SE528 обнаружены гены *icaABCD* оперона, фибронектин и фибриноген связывающих белков, тейхоевых кислот и аутолизинов. Для геномов изолятов *S.haemolyticus* SH39, SH 527, SH421 и SH864-1 были характерны гены аутолизинов, фибронектин связывающего белка, а также гена *icaC*. В связи с этим было проведено исследование способности изолятов КОС формировать биопленки на поверхности пластика. Способность к формированию биопленок КОС оценивалась стандартным методом окраски клеток КОС, прикрепившихся к пластику красителем кристаллическим фиолетовым, с последующим измерением оптической плотности при длине волны 540нм (рис. 14).

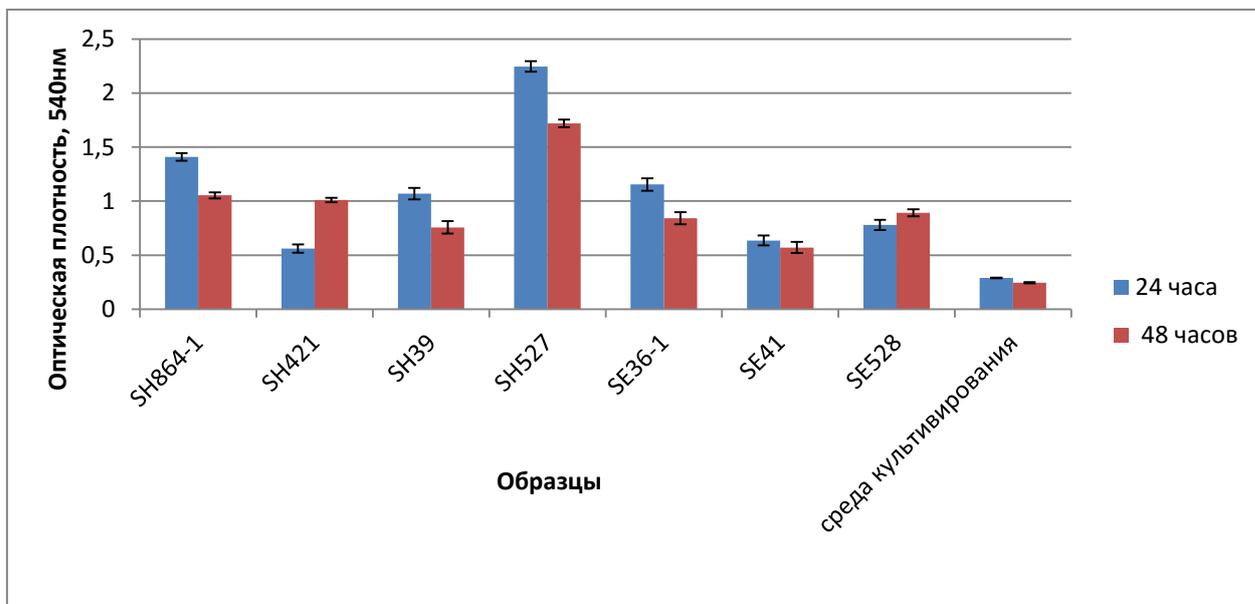


Рисунок 14. Сравнительная оценка способности формирования биопленок изолятами КОС на поверхности пластика (через 24 часа и 48 часов)

Наиболее активно образовывал биопленки изолят *S. haemolyticus* SH527. Оптическая плотность образца, покрашенной кристаллическим фиолетовым, биопленки изолята SH527 превышала оптическую плотность среды культивирования, используемой в качестве отрицательного контроля в 7,8 раза через сутки и в 7 раз через двое суток. Что касается изолятов *S. epidermidis* (SE36-1, SE41, SE528), то значение оптической плотности для соответствующих им образцов было ниже, чем для изолята *S. haemolyticus* SH527, но сопоставимо со значениями для других изолятов *S. haemolyticus* (SH39, SH421 и SH864-1). Наибольшее значение оптической плотности было характерно для изолята SE36-1 и составило 1,154 через сутки и 0,842 через 24 часа, что превышает оптическую плотность отрицательного контроля в 4 раза через сутки и в 3,4 раза через 24 часа.

Таким образом, на основании данных, полученных методом оценки способности формирования биопленок с помощью окраски раствором кристаллического фиолетового были отобраны изоляты *S. epidermidis* SE36-1 и *S. haemolyticus* SH527 с целью дальнейшего изучения особенностей формирования биопленок на основании данных сканирующей электронной микроскопии (СЭМ). Кроме того для сравнения был взят лабораторный штамм коагулазоположительного вида *S. aureus* ATCC 29213. Способность к формированию биопленок штаммом *S. aureus* ATCC 29213 была обусловлена детекцией генов *ica* оперона, ответственных за продукцию полисахаридов биопленки.

Результаты СЭМ показали, что после первых 24 часов культивирования в триптон- соевом бульоне бактерии *S. aureus* ATCC 29213 не образовывали биопленок (рис. 15 А). Участки образования ЭПС матрикса, покрывающего часть бактерий, зарегистрированы только после 48 часов культивирования (рис. 15 В). Бактерии *S. epidermidis* SE36-1 уже через 24 часа параллельно с процессом адгезии начинали формирование биопленки (рис. 15 С). Через 48 часов инкубации было отмечено формирование бактериями микроколоний, а

также наблюдались обширные участки, покрытые ЭПС матриксом (**рис. 15 D**). В случае *S. haemolyticus* SH 527 через 24 часа культивирования биопленки детектировано не было, к 48 часам инкубации большинство клеток было покрыто ЭПС матриксом (**рис. 15 E, F**).

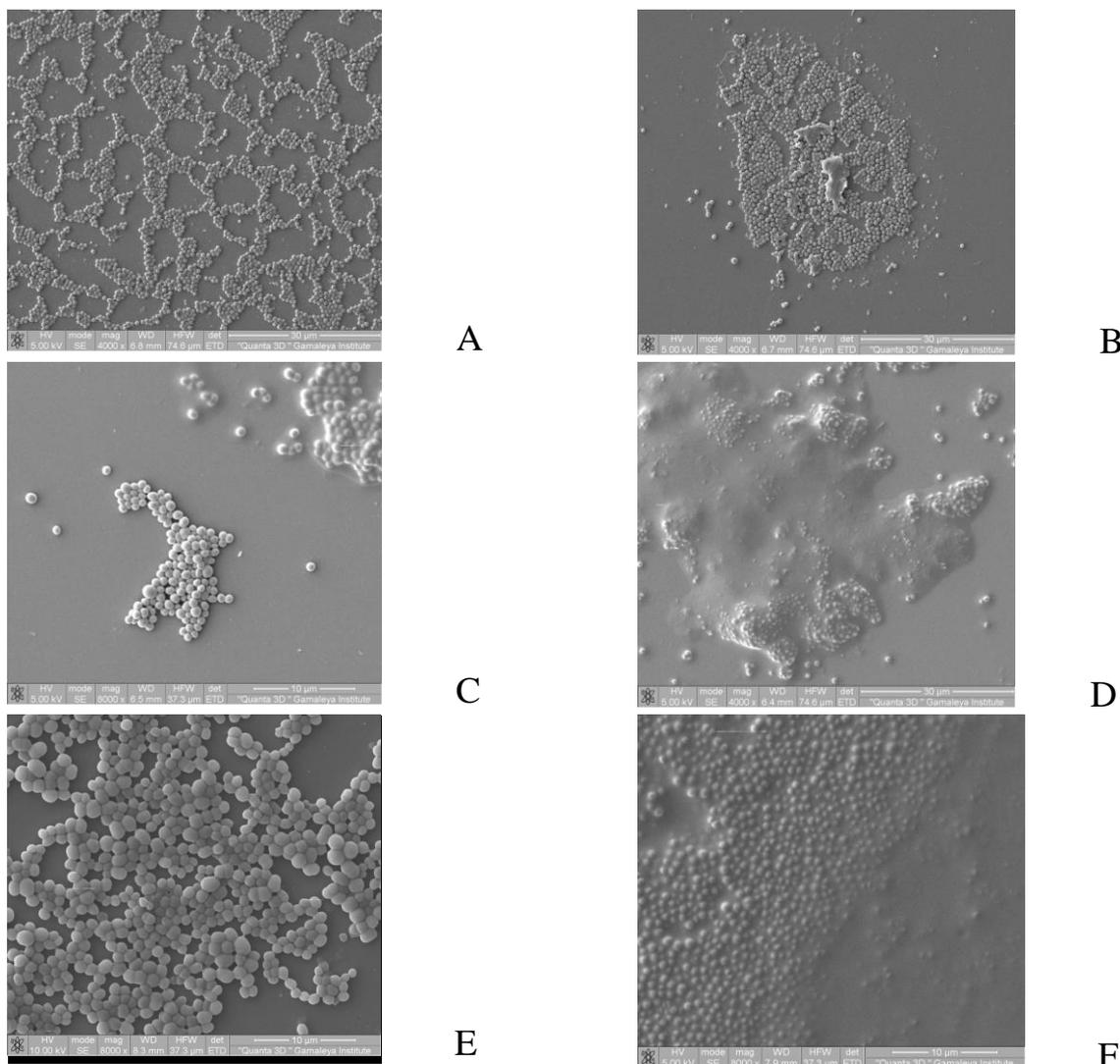


Рисунок 15. А, В Сканограммы бактериальной культуры *S. aureus* ATCC 29213 увеличение X 4000 (срок инкубации: 24, 48 часов, соответственно); **С, D** Сканограммы бактериальной культуры *S. epidermidis* SE36-1 увеличение X 8000 и X 4000, соответственно (срок инкубации: 24, 48 часов, соответственно); **Е, F** Сканограммы бактериальной культуры *S. haemolyticus* SE527 увеличение X 8000 (срок инкубации: 24 часа, 48 часов, соответственно)

Для визуализации взаимодействия стафилококков с культурой клеток человека, бактериальные клетки инкубировали совместно с монослоем клеток НТ-29, после чего были подготовлены препараты для СЭМ. В контрольном препарате к клеткам НТ-29 добавлена среда для культивирования стафилококков. По результатам СЭМ в контрольном препарате клеточная культура НТ-29 была представлена монослоем клеток с бугристой поверхностью, отростками и выступающими округлыми ядрами. Пространство между клетками было заполнено гомогенным веществом (межклеточным матриксом), с глобулярными и фибриллярными включениями. Клетки контактировали между собой посредством отростков (рис. 16).

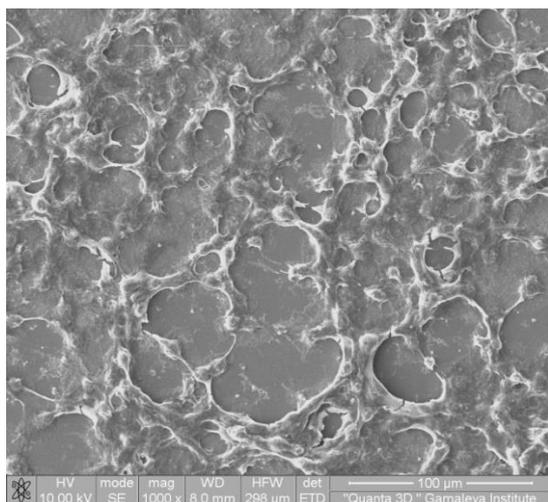
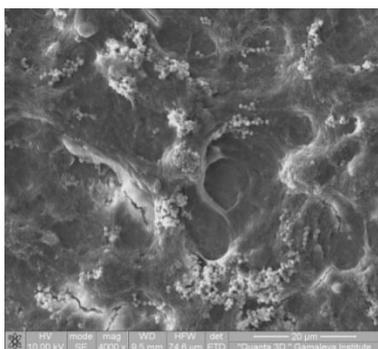


Рисунок 16. Сканограмма препарата клеточной культуры НТ-29 после 24 часов инкубации со средой культивирования стафилококков (контроль), увеличение X 1000.

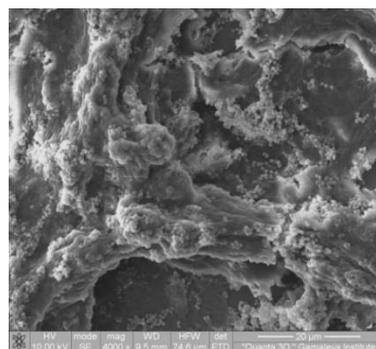
При инкубации клеток человека с клетками *S. aureus* ATCC29213 в первые часы инкубации (1 и 2 часа) наблюдалась адгезия бактерий на поверхности клеток НТ-29, при этом большинство бактерий располагались в межклеточном пространстве (рис. 17 А, В). Через 3 часа наблюдали колонизацию бактериальными клетками поверхности НТ-29, а также была

зарегистрирована начальная стадия деформации клеточного пласта (**рис. 17 С**). Через 24 часа инкубации происходила полная дезорганизация клеточного пласта и деструкция клеток. Остатки клеточного пласта были колонизированы бактериями (**рис.17 D**). Через 48 часов инкубации выявляли единичные участки, где можно было видеть остатки клеточного пласта, сплошь покрытого бактериями (**рис.17 E**).

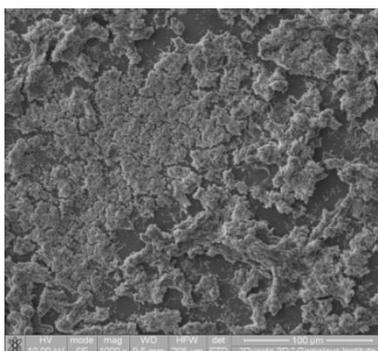
A



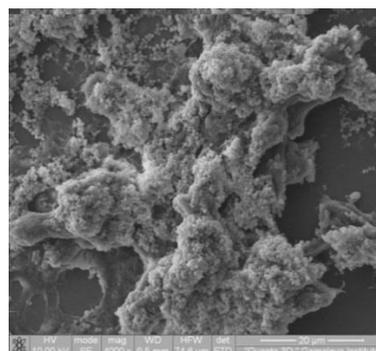
B



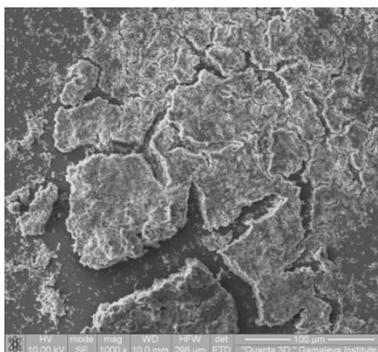
C



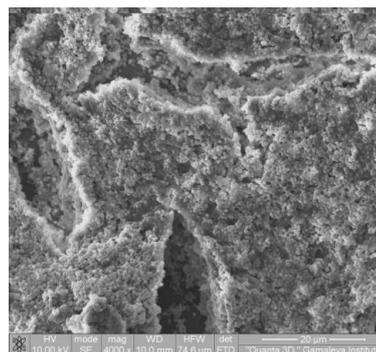
D



E



F



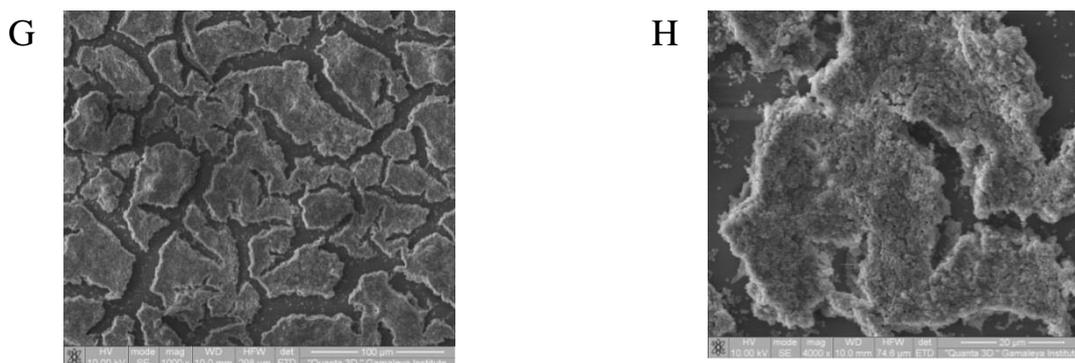


Рисунок 17. Сканограмма препаратов, отражающих взаимодействие *S. aureus* ATCC29213 с культурой клеток человека НТ-29: А - срок инкубации 1 час, увеличение X 4000, В - срок инкубации 2 часа, увеличение X 4000 , С - срок инкубации 3 часа, увеличение X 1000 , Д - срок инкубации 3 часа, увеличение X 4000, Е - срок инкубации 24 часа, увеличение X 1000 , Ф - срок инкубации 24 часа, увеличение X 4000, G - срок инкубации 48 часов, увеличение X 1000 , Н - срок инкубации 48 часов, увеличение X 4000

Взаимодействие *S. epidermidis* SE36-1 с клетками НТ-29 на ранних этапах инкубации (1 и 2 часа) не отличалось по своему характеру от взаимодействия *S. aureus* ATCC29213 с клетками НТ-29 (рис. 18 А, В). Через 3 часа совместной инкубации с клетками *S. epidermidis* SE36-1 происходила деформация клеточного пласта, но, в отличие от взаимодействия с клетками НТ-29 *S. aureus* ATCC29213, изменения в архитектонике клеточного пласта носили ограниченный характер (рис. 18 С, Д). Через 24 часа инкубации количество бактерий резко увеличивалось. Деформация клеточного пласта была более отчетливой, чем на сроке инкубации 3 часа (рис. 18 Е, Ф). Через 48 часов инкубации деформация клеточного пласта была максимальна, наблюдалась массовая деструкция клеток НТ-29, были выявлены остатки клеточного скелета («остов» клеток) (рис. 18 G, H, I).

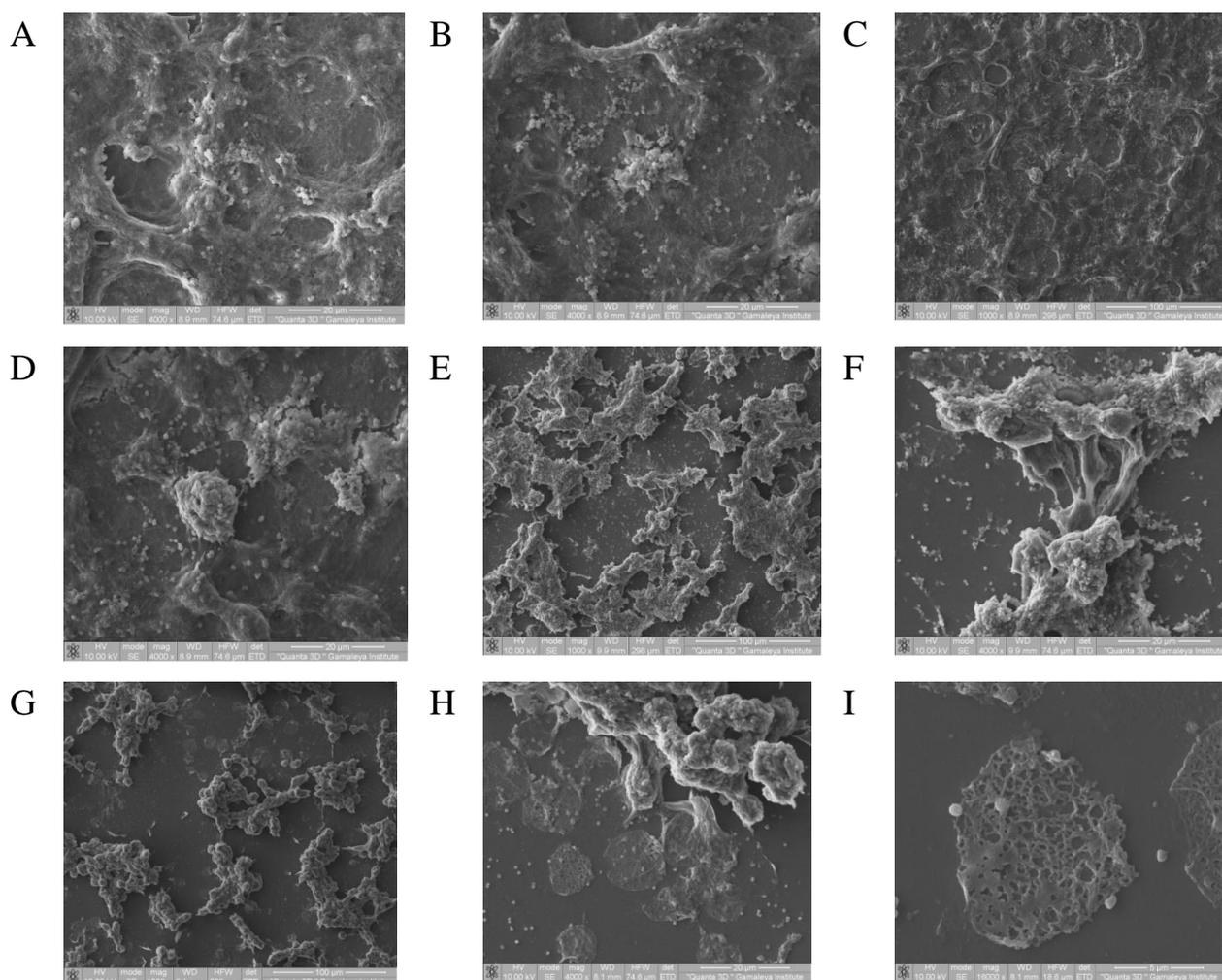


Рисунок 18 Сканограмма взаимодействия культуры клеток человека HT-29 с *S. epidermidis* SE36-1: А- срок инкубации 1 час, увеличение X 4000, В - срок инкубации 2 часа, увеличение X 4000, С - срок инкубации 3 часа, увеличение X 1000, D - срок инкубации 3 часа, увеличение X 4000, Е - срок инкубации 24 часа, увеличение X 1000, F - срок инкубации 24 часа, увеличение X 4000 , G- срок инкубации 48 часов, увеличение X 1000, H- срок инкубации 48 часов, увеличение X 4000, I - срок инкубации 48 часов, увеличение X 16000

На начальных сроках инкубации (1 - 3 часа) взаимодействие *S. haemolyticus* SH527 с клетками клеток HT-29 протекало аналогично описанному для штаммов *S. aureus* ATCC29213 и *S. epidermidis* SE36-1. Отличия касались интенсивности колонизации поверхности клеток: бактерии

S. haemolyticus SH527 были выявлены в большем количестве по сравнению с количеством бактерий штамма *S. epidermidis* SE36-1 и в меньшем количестве по сравнению с количеством клеток *S. aureus* ATCC29213. В отличие от взаимодействия клеток НТ-29 с *S. epidermidis* SE36-1 деструкции клеток НТ-29, характеризующейся детекцией остатков клеточного скелета, под действием SH527 на этих сроках инкубации выявлено не было (рис. 19 А, В, С). Через 24 часа инкубации происходила дезорганизация клеточного пласта с образованием конгломератов клеток. На поверхности конгломератов наблюдали прикрепленные клетки стафилококков, практически полностью покрывавших поверхность клеток НТ-29. В некоторых участках стафилококки были покрыты ЭПС (рис. 19 D). Через 48 часов инкубации процесс дезорганизации клеточного пласта, инфицированного стафилококками, продолжался. Количество клеток НТ-29 существенно уменьшилось. Также можно было видеть скопления стафилококков, с фрагментарным покрытием ЭПС (рис. 19 Е, F).

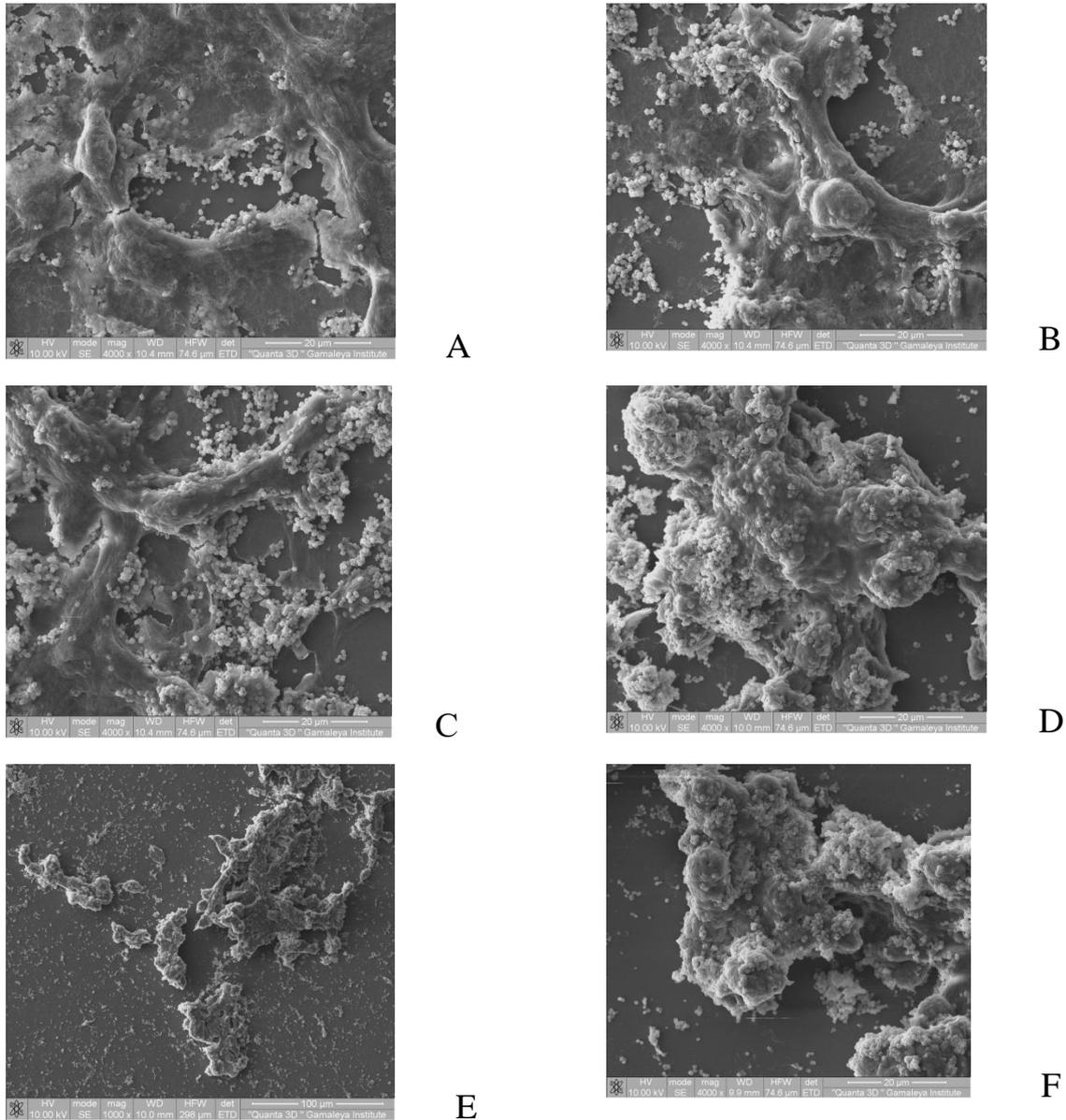


Рисунок 19. Сканограмма взаимодействия культуры клеток человека HT-29 с *S.haemolyticus* SH527: А - срок инкубации 1 час, увеличение X 4000, В - срок инкубации 2 часа, увеличение X 4000, С - срок инкубации 3 часа, увеличение X 4000, D - срок инкубации 24 часа, увеличение X 4000, Е - срок инкубации 48 часов, увеличение X 1000, F - срок инкубации 48 часов, увеличение X 4000

Общее токсическое воздействие стафилококков на культуру клеток человека НТ-29

Общее токсическое воздействие бактерий изучаемых штаммов (*S. aureus* ATCC29213, *S. haemolyticus* SH527, *S. epidermidis* SE36-1) на культуру клеток человека НТ-29 оценивали посредством измерения активности ЛДГ, вырабатываемой клетками культуры человека. Кинетика изменения активности ЛДГ клеток НТ-29 при добавлении суспензии бактерий, а также при добавлении культуральной жидкости представлена на **рисунке 20 А и В**, соответственно. В качестве контроля на этих же рисунках представлена кинетика изменения ЛДГ под действием триптон-соевого бульона и при добавлении эквивалентного количества среды DMEM. Для сопоставления кинетики изменения активности ЛДГ клеток НТ-29 под действием изучаемых стафилококков и стадии роста бактерий были получены кривые роста изучаемых штаммов стафилококков (**рис. 21**). Наиболее быстро достигает стационарной фазы роста *S. aureus* ATCC29213 (7 часов), для *S. haemolyticus* SH527 и *S. epidermidis* SE36-1 стационарная фаза роста наступает через 9 и 10 часов соответственно.

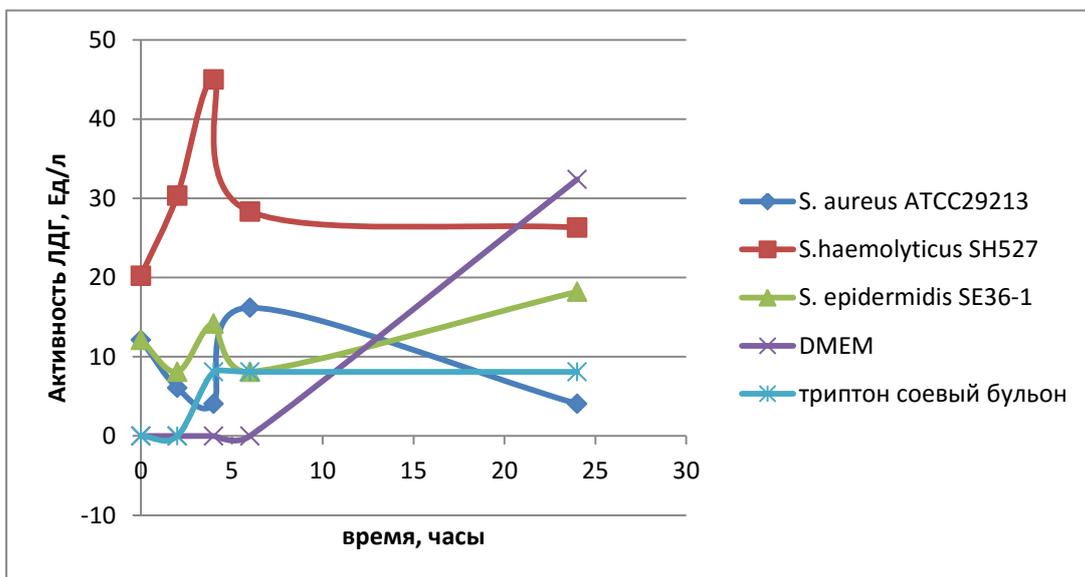
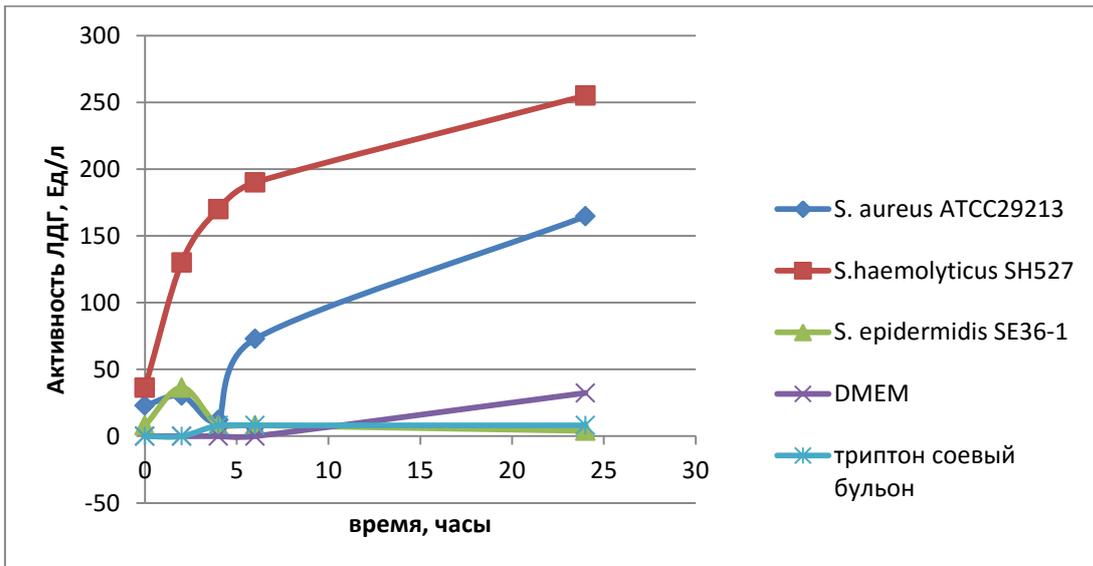


Рисунок 20. Кинетика изменения активности ЛДГ культуры клеток HT-29. А - при добавлении суспензии клеток различных видов стафилококков, В - при добавлении культуральной жидкости различных стафилококков. Графики построены по усредненным данным, полученным в ходе трех экспериментов. Образцы, содержащие DMEM и триптон соевый бульон, использовали в качестве отрицательного контроля.

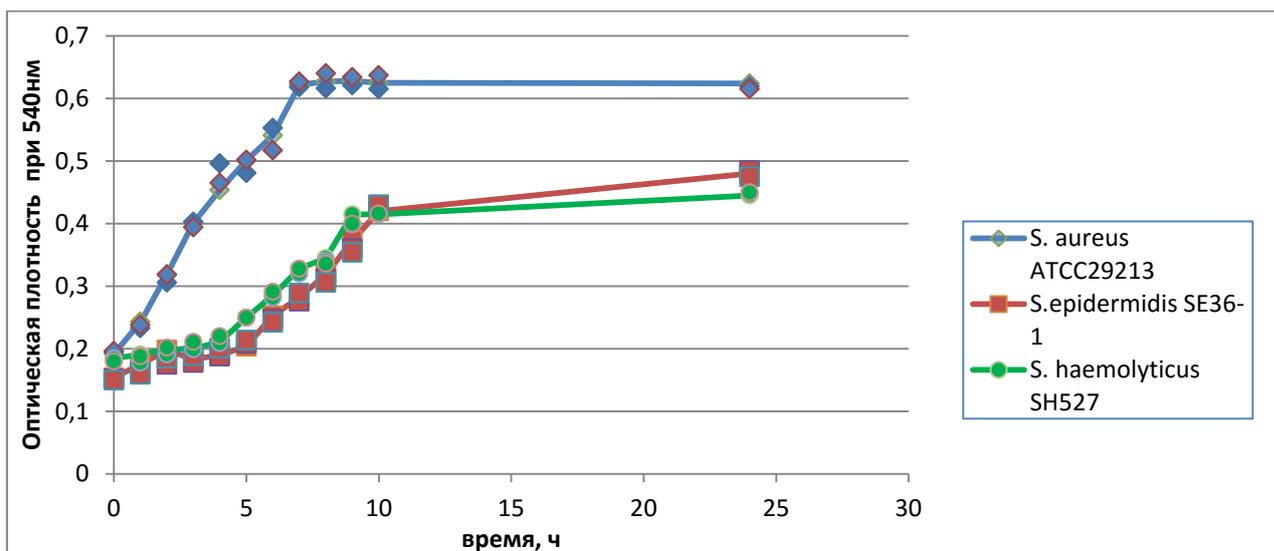


Рисунок 21. Кривая роста изучаемых штаммов стафилококков на основании данных экспериментов трех независимых повторов.

Гемолитическая активность изолятов КОС. В результате анализа полногеномных последовательностей изолятов исследуемых изолятов *S. epidermidis* SE 36-1, SE 41, SE 528, а также изолятов *S. haemolyticus* SH527, SH39, SH421, SH864-1 были обнаружены гены, гемолизинов и фенол-растворимых модулинов. Гемолитическая активность, исследуемых изолятов *S. haemolyticus*, была подтверждена на фенотипическом уровне в экспериментах по воздействию культуральной жидкости этих изолятов на эритроциты человека. Кроме данных о гемолитической активности культуральной жидкости исследуемых изолятов для сравнения приводятся данные о гемолитической активности культуральной жидкости референсного негоспитального изолята *S. epidermidis* ATCC12228 (рис. 22).

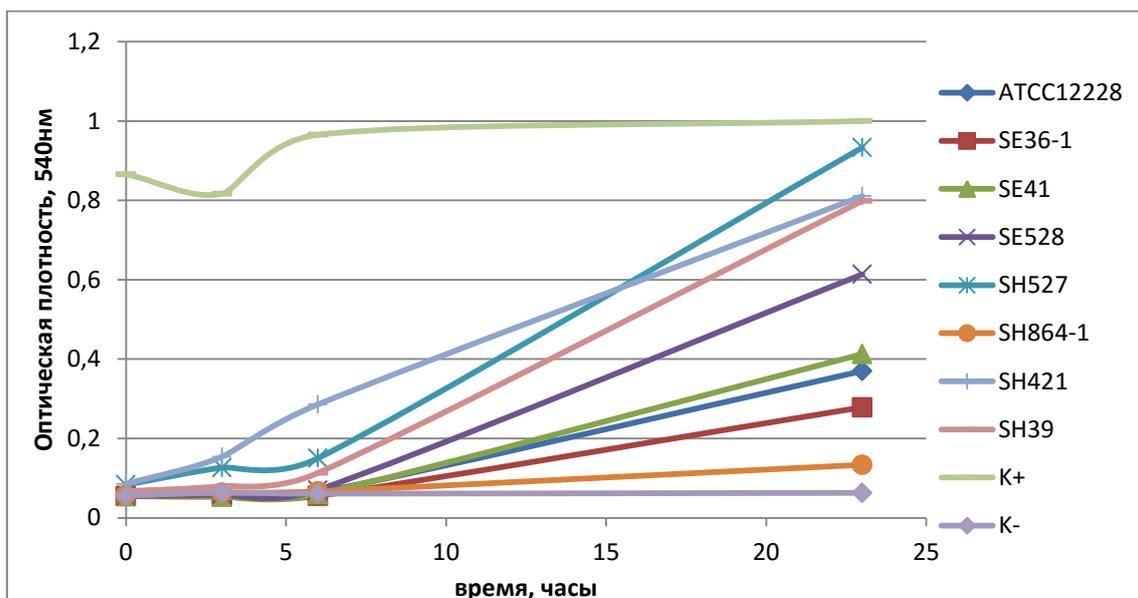


Рисунок 22. Гемолитическая активность культуральной жидкости изолятов КОС. Графики построены по усредненным данным, полученным в ходе трех экспериментов. («K+» - положительный контроль, свидетельствующий о прохождении полного гемолиза эритроцитов; «K-»-отрицательный контроль, свидетельствующий об отсутствии гемолиза эритроцитов)

Изоляты *S. epidermidis* обладали сниженной гемолитической активностью по сравнению с исследуемыми изолятами *S. haemolyticus*. Наибольшей гемолитической активностью обладал изолят *S. haemolyticus* SH527. Для выявления фактора, обуславливающего гемолитическую активность изолята SH527, исследовали его культуральную жидкость с помощью протеомных методов. Культуральная жидкость изолята SH527 была разделена на хроматографической колонке на несколько фракций. Гемолитической активностью обладали фракции под номерами 4 и 5. В результате ферментативного расщепления трипсином в геле и последующего высокопроизводительного протеомного секвенирования были идентифицированы белки, содержащиеся в культуральной жидкости изолята SH527. Статистика идентификации представлена в **таблице 20**.

Идентификация белков проводилась на основании базы данных, содержащей предсказанные по полногеномным данным белки референсного штамма *S. haemolyticus* JCSC1435. В исходном образце культуральной жидкости максимальное количество белков, идентифицированных по одному и более пептиду, составило 184, максимальное количество белков, идентифицированных более чем по одному пептиду – 90. Хроматографические фракции 4 и 5 содержали 141 и 115 белков, идентифицированных по одному и более пептиду, соответственно. При условии, что идентификация белков проводилась более чем по одному пептиду, для фракций 4 и 5 максимальное количество белков составило 54 и 68, соответственно. Для выявления среди найденных белков секретлируемых, была определена клеточная локализация идентифицированных белков культуральной жидкости и ее хроматографических фракций (4 и 5) (**таблица 21**). Было показано, что большая часть найденных белков, является цитоплазматическими (148 белков для исходной культуральной жидкости и 113 и 97 – для фракций 4 и 5, соответственно). Кроме того, были найдены белки клеточной стенки и цитоплазматической мембраны как для исходной культуральной жидкости, так и для изучаемых фракций. Наибольший интерес представляют, выявленные в культуральной жидкости и хроматографических фракциях, секретлируемые белки (10 белков - для культуральной жидкости, 5 белков - для 4 фракции и 7 – для 5 фракции). Фактор, ответственный за гемолитическую активность изолята SH527 *S. haemolyticus*, должен быть идентифицирован во всех трех образцах, обладающих гемолитической активностью (образец культуральной жидкости и образцы ее хроматографических фракций 4 и 5). В ходе анализа таких белков было отобрано 5 секретлируемых и 45 цитоплазматических (**таблица 22** и **таблица 23**). Функции гипотетических белков были определены на основании генной онтологии. Таким образом, было отобрано пять секретлируемых белков и 45

цитоплазматических белков, присутствующих во всех трех образцах и возможно вызывающих лизис эритроцитов.

Таблица 20. Результаты масс-спектрометрического анализа культуральной жидкости и ее хроматографических фракции (4 и 5) для изолята SH527 (измерения проводились в трех повторах)

Проба	Повтор	Количество спектров MS/MS	Количество белков идентифицированных по 1 и более пептиду	Количество белков идентифицированных более чем по 1 пептиду
Исходный образец до хроматографического разделения	1	53556	184	90
	2	53849	162	81
	3	52860	155	69
Фракция №5	1	54502	141	68
	2	53692	129	58
	3	55852	119	60
Фракция №4	1	43802	98	44
	2	48441	115	54
	3	46345	113	49

Таблица 21. Клеточная локализация идентифицированных белков культуральной жидкости и ее хроматографических фракций (4 и 5)

Образец	Белки клеточной стенки	Цитоплазматические белки	Белки цитоплазматической мембраны	Секретируемые белки	Белки с неизвестной локализацией
Исходная культуральная жидкость	5	148	29	10	26
Фракция №4	4	113	17	5	16
Фракция №5	5	97	21	7	10

Таблица 22. Перечень секретируемых белков, обнаруживаемых в исходной культуральной жидкости и хроматографических фракциях 4 и 5, обладающих гемолитической активностью

Идентифицируемые белки (функции гипотетических белков основываясь на генной онтологии), класс фермента
гипотетический белок SH0168 (предшественник триацилглицерол-липазы), EC: 3.1.1.3
N-ацетилмурамоил-L-аланин-амидаза, EC: 3.5.1.28
гипотетический белок SH0362 (гипотетический белок схожий с антигеном B)
гипотетический белок SH0762 (гомолог предшественника SsaA, секреторный антиген)

Аутолизин, ЕС:3.2.1.96

Таблица 23. Перечень цитоплазматических белков, обнаруживаемых в исходной культуральной жидкости и хроматографических фракциях 4 и 5, обладающих гемолитической активностью

Идентифицируемые белки (Функции гипотетических белков основываясь на геной онтологии)
1-Пирролин-5-карбоксилатдегидрогеназа, ЕС:1.2.1.88
30S рибосомальный белок S3
50S рибосомальный белок L25
6-фосфоглюконатдегидрогеназа, ЕС:1.1.1.44
аконитатгидратаза, ЕС:4.2.1.3
алкил-гидропероксидредуктаза, ЕС:1.11.1.15
аспартаткиназа, ЕС:2.7.2.4
аспартил-тРНК-синтетаза, ЕС:6.1.1.12
АТФ-синтаза F0F1 субъединицы альфа, ЕС:3.6.3.14
АТФ-зависимая протеаза АТФ-связывающая субъединица HslU
субъединица E2 дегидрогеназы альфа-кетокислот с разветвленной цепью, ЕС: 1.2.4.4
дигидролипоамид дегидрогеназа, ЕС: 2.3.1.12
дигидролипоамид-сукцинилтрансфераза, ЕС: 2.3.1.61
D-лактат дегидрогеназа, ЕС:1.1.1.28
субъединица A ДНК топоизомеразы IV, ЕС:5.99.1.-
ДНК –зависимая РНК полимеразы субъединица бета (DNA-directed RNA polymerase subunit beta), ЕС:2.7.7.6
фактор элонгации G
фактор элонгации Tu
формиат - тетрагидрофолат лигаза, ЕС:6.3.4.3

фруктоза дифосфат альдолаза, ЕС:4.1.2.13
глюкозамин - фруктозо-6-фосфат-аминотрансфераза, ЕС:2.6.1.16
глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы GMP-синтаза, ЕС:1.2.1.12
гипотетический белок SH0304 (схож с регулятором транскрипции tetR-семейства)
гипотетический белок SH0547 (гомолог альдегиддегидрогеназы (aldA))
гипотетический белок SH0580 (фермент рестрикции тип II гомолог Sau3AI)
гипотетический белок SH0784 (гомолог mobA, участвующего в биосинтезе молибдоптерин-гуанин динуклеотида)
гипотетический белок SH0895 (индуцируемый голоданием ДНК-связывающий белок)
гипотетический белок SH1180 (схож с фенилаланил-тРНК-синтетазой)
гипотетический белок SH1456 (схож с репрессором бифункционального оперона similar to bifunctional biotin ligase/biotin operon repressor), ЕС:6.3.4.15
гипотетический белок SH1975 (гомолог ClpV шаперона)
Изоцитрат дегидрогеназа, ЕС:1.1.1.42
изолейцил-тРНК-синтаза, ЕС:6.1.1.5
липоил синтаза, ЕС:2.8.1.8
орнитин карбамоилтрансфераза, ЕС:2.1.3.3
фосфоенолпируват-протеин фосфатаза
фосфоглицераткиназа, ЕС:2.7.2.3
фосфоглицеромутаза, ЕС:2.7.1.40
фосфопируват гидратаза, ЕС:4.2.1.11
пируват карбоксилаза, ЕС:6.4.1.1
одноцепочечный ДНК-связывающий белок фага phi PVL
сукцинил-КоА-синтаза субъединица альфа, ЕС:6.2.1.5

сукцинил-КоА-синтетаза субъединица бета, EC:6.2.1.5
транспозаза ISSha1
тРНК модифицированная ГТФ аза (tRNA modification GTPase), EC:3.6.-.-

При анализе перечней белков, обнаруживаемых в исходной культуральной жидкости изолята SH 527 и хроматографических фракциях 4 и 5, обладающих гемолитической активностью особо обращает на себя внимание гипотетический белок (SH0168) -предшественник триацилглицерол-липазы (EC: 3.1.1.3). По данным полногеномного секвенирования этот белок аннотирован у всех исследуемых изолятов *S.haemolyticus* (SH527, SH39, SH421, SH864-1) (Табл. 18). Причем только АК последовательность триацилглицерол-липазы изолята SH527 на 100% гомологична липазе SH0168 референсного штамма JCSC1435 (Табл. 19, рис. 22). Был проведен сравнительный анализ АК последовательностей триацилглицерол-липаз исследуемых изолятов, в результате чего, у исследуемых изолятов *S.haemolyticus* было обнаружено три различных варианта АК последовательностей, гомологичных триацилглицерол-липазе референсного штамма JCSC1435. Кроме того были проанализированы АК последовательности триацилглицерол-липазы штаммов *S.haemolyticus*, полногеномные последовательности которых доступны в базе данных NCBI (n=129). Было показано, что для вида *S.haemolyticus* характерно наличие 18 различных типов триацилглицерол-липазы. Наиболее широко представленные два типа триацилглицерол-липазы: к первому типу относятся белки идентичные триацилглицерол-липазе референсного штамма JCSC1435 SH0168 (65/129, 50,4%), в том числе и триацилглицерол-липаза изолята SH527.

	1	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100	110	120	130	140																																																																																																																	
lip_JCSC1435	1	MKTRENRF	SIRKLSV	GASSVVV	ATLLFM	GGSSAQ	AAEKQ	QVEVGT	PETASA	QSIGD	KDTHA	TQKGV	QSTEQ	DKSQAS	QTE	NNNNS	QTL	SLHNE	HNQT	DDAST	TNETT	TS	DE	THQ	ST	IVK	SEK	FT	SN	DN	QQ	NEA	KQ	T	S	Q	Q	S	L	S																																																																																								
lip_SH527	1	MKTRENRF	SIRKLSV	GASSVVV	ATLLFM	GGSSAQ	AAEKQ	QVEVGT	PETASA	QSIGD	KDTHA	TQKGV	QSTEQ	DKSQAS	QTE	NNNNS	QTL	SLHNE	HNQT	DDAST	TNETT	TS	DE	THQ	ST	IVK	SEK	FT	SN	DN	QQ	NEA	KQ	T	S	Q	Q	S	L	S																																																																																								
lip_SH39	1	MKTRENRF	SIRKLSV	GASSVVV	ATLLFM	GGSSAQ	AAEKQ	QVEVGT	PETASA	QSIGD	KDTHA	TQKGV	QSTEQ	DKSQAS	QTE	NNNNS	QTL	SLHNE	HNQT	DDAST	TNETT	TS	DE	THQ	ST	IVK	SEK	FT	SN	DN	QQ	NEA	KQ	T	S	Q	Q	S	L	S																																																																																								
lip_SH421	1	MKTRENRF	SIRKLSV	GASSVVV	ATLLFM	GGSSAQ	AAEKQ	QVEVGT	PETASA	QSIGD	KDTHA	TQKGV	QSTEQ	DKSQAS	QTE	NNNNS	QTL	SLHNE	HNQT	DDAST	TNETT	TS	DE	THQ	ST	IVK	SEK	FT	SN	DN	QQ	NEA	KQ	T	S	Q	Q	S	L	S																																																																																								
lip_SH864-1	1	MKTRENRF	SIRKLSV	GASSVVV	ATLLFM	GGSSAQ	AAEKQ	QVEVGT	PETASA	QSIGD	KDTHA	TQKGV	QSTEQ	DKSQAS	QTE	NNNNS	QTL	SLHNE	HNQT	DDAST	TNETT	TS	DE	THQ	ST	IVK	SEK	FT	SN	DN	QQ	NEA	KQ	T	S	Q	Q	S	L	S																																																																																								
	146	150	160	170	180	190	200	210	220	230	240	250	260	270	280																																																																																																																	
lip_JCSC1435	146	DTQTS	KPTTND	GIT	QQSE	SSKQ	EPST	QSTDT	ASKEDD	TKK	TAHT	QSQ	DET	SDNK	KEAL	NQ	PHSN	VVK	SED	ANT	SSNE	IN	PN	TI	K	TE	QQ	Q	TES	NT	SD	KP	K	V	D	N	Q	Q	A	S	Q	P	K	D	N	D	N	Q	G	D	A	L	K	T	A	T	Q	S	Q	Q	T	L	T	K	K	E	A	T																																																												
lip_SH527	146	DTQTS	KPTTND	GIT	QQSE	SSKQ	EPST	QSTDT	ASKEDD	TKK	TAHT	QSQ	DET	SDNK	KEAL	NQ	PHSN	VVK	SED	ANT	SSNE	IN	PN	TI	K	TE	QQ	Q	TES	NT	SD	KP	K	V	D	N	Q	Q	A	S	Q	P	K	D	N	D	N	Q	G	D	A	L	K	T	A	T	Q	S	Q	Q	T	L	T	K	K	E	A	T																																																												
lip_SH39	140	-----	KPTTND	GIT	QQSE	SSKQ	EPST	QSTDT	ASKEDD	TKK	TAHT	QSQ	DET	SDNK	KEAL	NQ	PHSN	VVK	SED	ANT	SSNE	IN	PN	TI	K	TE	QQ	Q	TES	NT	SD	KP	K	V	D	N	Q	Q	A	S	Q	P	K	D	N	D	N	Q	G	D	A	L	K	T	A	T	Q	S	Q	Q	T	L	T	K	K	E	A	T																																																												
lip_SH421	140	-----	KPTTND	GIT	QQSE	SSKQ	EPST	QSTDT	ASKEDD	TKK	TAHT	QSQ	DET	SDNK	KEAL	NQ	PHSN	VVK	SED	ANT	SSNE	IN	PN	TI	K	TE	QQ	Q	TES	NT	SD	KP	K	V	D	N	Q	Q	A	S	Q	P	K	D	N	D	N	Q	G	D	A	L	K	T	A	T	Q	S	Q	Q	T	L	T	K	K	E	A	T																																																												
lip_SH864-1	146	DTQTS	KPTTND	GIT	QQSE	SSKQ	EPST	QSTDT	ASKEDD	TKK	TAHT	QSQ	DET	SDNK	KEAL	NQ	PHSN	VVK	SED	ANT	SSNE	IN	PN	TI	K	TE	QQ	Q	TES	NT	SD	KP	K	V	D	N	Q	Q	A	S	Q	P	K	D	N	D	N	Q	G	D	A	L	K	T	A	T	Q	S	Q	Q	T	L	T	K	K	E	A	T																																																												
	290	290	300	310	320	330	340	350	360	370	380	390	400	410	420	431																																																																																																																
lip_JCSC1435	290	TSEV	NRLN	TQ	SDNN	-IS	IDG	QTN	FLD	DK	SSK	QNK	DA	Q	SG	LNT	L	K	N	N	A	V	A	T	T	N	T	Q	S	K	S	Q	A	A	T	G	T	K	D	Q	T	N	K	V	A	Q	A	Q	Y	K	N	Q	D	P	I	I	L	V	H	G	F	N	G	F	T	D	D	I	N	P	S	V	L	A	H	Y	W	G	D	K	L	N	I	R	Q	D	L	E	E	N	G	Y	S	E	A	S	I	S	A	F	G	S	N	Y	D	R	A	V																				
lip_SH527	290	TSEV	NRLN	TQ	SDNN	-IS	IDG	QTN	FLD	DK	SSK	QNK	DA	Q	SG	LNT	L	K	N	N	A	V	A	T	T	N	T	Q	S	K	S	Q	A	A	T	G	T	K	D	Q	T	N	K	V	A	Q	A	Q	Y	K	N	Q	D	P	I	I	L	V	H	G	F	N	G	F	T	D	D	I	N	P	S	V	L	A	H	Y	W	G	D	K	L	N	I	R	Q	D	L	E	E	N	G	Y	S	E	A	S	I	S	A	F	G	S	N	Y	D	R	A	V																				
lip_SH39	279	TSEV	NRLN	TQ	SDNN	-IS	IDG	QTN	FLD	DK	SSK	QNK	DA	Q	SG	LNT	L	K	N	N	A	V	A	T	T	N	T	Q	S	K	S	Q	A	A	T	G	T	K	D	Q	T	N	K	V	A	Q	A	Q	Y	K	N	Q	D	P	I	I	L	V	H	G	F	N	G	F	T	D	D	I	N	P	S	V	L	A	H	Y	W	G	D	K	L	N	I	R	Q	D	L	E	E	N	G	Y	S	E	A	S	I	S	A	F	G	S	N	Y	D	R	A	V																				
lip_SH421	279	TSEV	NRLN	TQ	SDNN	-IS	IDG	QTN	FLD	DK	SSK	QNK	DA	Q	SG	LNT	L	K	N	N	A	V	A	T	T	N	T	Q	S	K	S	Q	A	A	T	G	T	K	D	Q	T	N	K	V	A	Q	A	Q	Y	K	N	Q	D	P	I	I	L	V	H	G	F	N	G	F	T	D	D	I	N	P	S	V	L	A	H	Y	W	G	D	K	L	N	I	R	Q	D	L	E	E	N	G	Y	S	E	A	S	I	S	A	F	G	S	N	Y	D	R	A	V																				
lip_SH864-1	290	TSEV	NRLN	TQ	SDNN	-IS	IDG	QTN	FLD	DK	SSK	QNK	DA	Q	SG	LNT	L	K	N	N	A	V	A	T	T	N	T	Q	S	K	S	Q	A	A	T	G	T	K	D	Q	T	N	K	V	A	Q	A	Q	Y	K	N	Q	D	P	I	I	L	V	H	G	F	N	G	F	T	D	D	I	N	P	S	V	L	A	H	Y	W	G	D	K	L	N	I	R	Q	D	L	E	E	N	G	Y	S	E	A	S	I	S	A	F	G	S	N	Y	D	R	A	V																				
	432	440	450	460	470	480	490	500	510	520	530	540	550	560	570																																																																																																																	
lip_JCSC1435	431	ELY	YIK	GGT	V	D	Y	G	A	A	A	K	Y	G	H	E	R	Y	G	K	T	Y	E	G	V	Y	D	W	Q	F	G	Q	V	H	L	V	G	H	S	M	G	G	Q	T	I	R	Q	L	E	L	L	R	N	G	N	F	E	E	Q	E	Y	Q	R	V	H	G	G	D	I	S	P	L	Y	Q	Q	N	D	N	M	I	S	S	I	T	L	G	T	P	H	N	G	T	H	A	S	D	L	L	G	N	E	A	L	I	R	Q	V	V	F	D	A	G	K	V	L	G	N	K	D	S	R	V	D	F	G	L	S	Q
lip_SH527	431	ELY	YIK	GGT	V	D	Y	G	A	A	A	K	Y	G	H	E	R	Y	G	K	T	Y	E	G	V	Y	D	W	Q	F	G	Q	V	H	L	V	G	H	S	M	G	G	Q	T	I	R	Q	L	E	L	L	R	N	G	N	F	E	E	Q	E	Y	Q	R	V	H	G	G	D	I	S	P	L	Y	Q	Q	N	D	N	M	I	S	S	I	T	L	G	T	P	H	N	G	T	H	A	S	D	L	L	G	N	E	A	L	I	R	Q	V	V	F	D	A	G	K	V	L	G	N	K	D	S	R	V	D	F	G	L	S	Q
lip_SH39	421	ELY	YIK	GGT	V	D	Y	G	A	A	A	K	Y	G	H	E	R	Y	G	K	T	Y	E	G	V	Y	D	W	Q	F	G	Q	V	H	L	V	G	H	S	M	G	G	Q	T	I	R	Q	L	E	L	L	R	N	G	N	F	E	E	Q	E	Y	Q	R	V	H	G	G	D	I	S	P	L	Y	Q	Q	N	D	N	M	I	S	S	I	T	L	G	T	P	H	N	G	T	H	A	S	D	L	L	G	N	E	A	L	I	R	Q	V	V	F	D	A	G	K	V	L	G	N	K	D	S	R	V	D	F	G	L	S	Q
lip_SH421	421	ELY	YIK	GGT	V	D	Y	G	A	A	A	K	Y	G	H	E	R	Y	G	K	T	Y	E	G	V	Y	D	W	Q	F	G	Q	V	H	L	V	G	H	S	M	G	G	Q	T	I	R	Q	L	E	L	L	R	N	G	N	F	E	E	Q	E	Y	Q	R	V	H	G	G	D	I	S	P	L	Y	Q	Q	N	D	N	M	I	S	S	I	T	L	G	T	P	H	N	G	T	H	A	S	D	L	L	G	N	E	A	L	I	R	Q	V	V	F	D	A	G	K	V	L	G	N	K	D	S	R	V	D	F	G	L	S	Q
lip_SH864-1	432	ELY	YIK	GGT	V	D	Y	G	A	A	A	K	Y	G	H	E	R	Y	G	K	T	Y	E	G	V	Y	D	W	Q	F	G	Q	V	H	L	V	G	H	S	M	G	G	Q	T	I	R	Q	L	E	L	L	R	N	G	N	F	E	E	Q	E	Y	Q	R	V	H	G	G	D	I	S	P	L	Y	Q	Q	N	D	N	M	I	S	S	I	T	L	G	T	P	H	N	G	T	H	A	S	D	L	L	G	N	E	A	L	I	R	Q	V	V	F	D	A	G	K	V	L	G	N	K	D	S	R	V	D	F	G	L	S	Q
	574	580	590	600	610	620	630	640	650</																																																																																																																							

Ко второму наиболее распространенному типу триацилглицерол-липаз (49/129, 38%) относятся триацилглицерол-липазы изолятов SH39, SH421. У четырех штаммов из 129 штаммов (3%), полнонуклеотидные последовательности которых представлены в базе данных NCBI, были выявлены АК последовательности идентичные триацилглицерол-липазе изолята SH864-1.

На основании АК последовательностей гипотетических триацилглицерол-липаз исследуемых изолятов *S.haemolyticus* (SH527, SH39, SH421, SH864-1) были получены математические модели, предсказывающие структуру и функции соответствующих гипотетических белков. За основу моделей была взята структура липазы L1 *Bacillus stearotherophilus* (1j13), которая является ближайшим структурным доменом в базе данных SUPERFAMILY для гипотетических триацилглицерол-липаз исследуемых изолятов. Характеристика полученных моделей представлена в таблице 24. Так на основании построенных моделей АК последовательности гипотетических триацилглицерол-липаз исследуемых изолятов образовывали структуру, представляющую собой смешанный альфа / бета/ альфа-лист, содержащий 8 нитей, соединенных альфа спиралями. Такая структура белка соответствует альфа/бета-гидролазному домену.

Таблица 24. Характеристика моделей структур АК последовательностей изолятов *S.haemolyticus* (SH527, SH39, SH421, SH864-1), гомологичных белку SH0168 референсного штамма JCSC1435 (чем ниже значение E-value, тем более надежна модель [166])

Изолят	Регион	Домен	E-value
JCSC1435	370-740	альфа/бета-гидролаза	1,41e-46
SH527	370-740	альфа/бета-гидролаз	1,41e-46

SH39	360-730	альфа/бета-гидролаз	1,73e-46
SH421	360-730	альфа/бета-гидролаз	1,73e-46
SH864-1	371-741	альфа/бета-гидролаз	1,75e-46

Глава 4 Обсуждение

4.1 Особенности проявления патогенных свойств госпитальными штаммами *S. epidermidis*

На сегодняшний день КОС являются основными возбудителями госпитальных инфекций, в результате которых увеличивается время пребывания пациента в стационаре и стоимость его лечения. В наиболее тяжелых случаях наличие госпитальной инфекции у пациента может привести к летальному исходу. Наибольшее число случаев, ассоциированных с КОС инфекциями, вызвано штаммами *S. epidermidis*. В ходе настоящей работы собрана коллекция изолятов КОС из стационаров, расположенных в различных регионах России, значительная часть которых представлена изолятами *S. epidermidis* (64 изолятов, 37,9%), что подтверждает клиническую значимость представителей этого вида. Большинство изолятов *S. epidermidis* были выделены при конъюнктивите (23%), а также из кала (20%). Из зева и крови было выделено по 16% изолятов собранной коллекции. Надо отметить, что в коллекции присутствуют изоляты, выделенные у пациентов с летальным исходом (*S. epidermidis* SE41 и *S. epidermidis* SE36-1).

В рамках диссертационной работы показано, что подавляющее большинство изолятов *S. epidermidis*, выявленных в различных стационарах России являются устойчивыми к метициллину, что согласуется с данными зарубежных исследователей [4, 171, 172]. При этом многие изоляты обладали множественной лекарственной устойчивостью к антибиотикам нескольких различных групп. В составе коллекции не было выявлено изолятов *S. epidermidis*, устойчивых к ванкомицину и линезолиду. Полученные данные говорят о высоком уровне устойчивости изолятов КОС к антимикробным препаратам, кроме того эти данные могут помочь скорректировать схему лечения КОС-ассоциированных инфекций, наиболее вероятным препаратом выбора в этом случае является ванкомицин.

Для исследования особенностей физиологии и механизмов патогенности *S.epidermidis*, на первом этапе было необходимо выявить госпитальные изоляты *S.epidermidis* методами типирования. Изучение физиологии госпитальных штаммов КОС представляет наибольший интерес, так как подавляющее большинство инфекций, вызванных КОС, ассоциировано с пребыванием пациента в стационаре либо с посещением лечебного учреждения с целью лечения. Типирование проводили с помощью метода MLST, который основывается на определении различий на генетическом уровне между госпитальными изолятами и остальной популяцией *S.epidermidis*. При типировании этим методом исследуется нуклеотидная последовательность нескольких генов (обычно 5-7 генов) необходимых для жизнедеятельности микроорганизма, так называемых генов «домашнего хозяйства». В дальнейшем проводится анализ полиморфизмов, выявленных в этих генах. MLST стандартный метод типирования, используемый мировым сообществом в рамках эпидемиологических исследований различных видов микроорганизмов, в частности и *S.epidermidis*. На основании данных типирования были выявлены основные сиквенс типы, характеризующие большинство изолятов в собранной коллекции: ST 59 (18 изолятов, 28%), ST 22 (13 изолятов, 20%), ST 2 (11 изолятов, 17,2%). 62 изолята, что составляет 96,9% изолятов, собранной коллекции характеризуются родственными сиквенс типами, принадлежащими к единому клональному комплексу CC2 [170]. Из литературных данных известно, что CC2 объединяет сиквенс-типы госпитальных штаммов, распространенных в стационарах различных стран мира, при этом ST2 является комплексообразующим сиквенс-типом [139, 140, 170].

Таким образом, по данным анализа результатов MLST изолятов *S.epidermidis* было выявлено, что большинство изолятов коллекции (62 изолята, 96,9%), представленных в коллекции относится к госпитальным.

Большую часть коллекции составили изоляты, полученные из ФГБУ «Научный центр акушерства, гинекологии и перинатологии имени академика В.И. Кулакова» (32 изолята, 50%). В случае ФГБУ «Научный центр акушерства, гинекологии и перинатологии имени академика В.И. Кулакова» популяция *S.epidermidis* представлена тремя близкородственными штаммами, относящимися к сиквенс типам ST 59, ST 22, ST 2. На основании этих данных можно сделать вывод о циркуляции на территории стационара, в частности ФГБУ «Научный центр акушерства, гинекологии и перинатологии имени академика В.И. Кулакова» одной популяции клонов.

Основываясь на результатах типирования, а также данных о происхождении изолятов коллекции, были отобраны три госпитальных изолята (SE36-1, SE41, SE528) на примере, которых исследовали особенности 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 SE36-1 был выделен из крови умершего новорожденного ребенка с ЭНМТ, и диагнозом врожденный сепсис. Изолят SE41 выделен из аутопсийного материала (ткань легких) новорожденного ребенка с ЭНМТ и диагнозом врожденный сепсис, осложненный пневмонией, вызванной данным изолятом стафилококка. Что касается изолята SE528, то он был получен при посеве из зева новорожденного ребенка и отобран как штамм, возможно, ассоциированный с колонизацией. По данным типирования все три изолята относятся к большому клональному комплексу CC2, характеризующему госпитальные штаммы [170], при этом SE36-1 и SE41 характеризуются комплексобразующим сиквенс-типом ST2, а SE528 является, так называемым вариантом с единичной заменой в локусе (single locus variant) сиквенс-типа ST2 и, соответственно, также относится к клональному комплексу CC2. В ходе секвенирования для этих изолятов были определены полногеномные нуклеотидные последовательности. Полногеномное

секвенирование изолята SE36-1 было выполнено дважды, так как характеристики качества сиквенса и сборки, такие как N50, количество и средний размер контигов, а также покрытие, были невысокими. Для облегчения задачи по поиску возможных ФВП изучаемых изолятов был проведен анализ полногеномных нуклеотидных последовательностей с целью выявления «основного» и «дополнительного» геномов этих изолятов. Для этого помимо данных о полногеномных последовательностях исследуемых изолятов в анализ были включены данные о полногеномных последовательностях штаммов вида *S. epidermidis*, содержащихся в базе NCBI (92 полнонуклеотидные последовательности). Зависимость размера «основного» и «дополнительного» генома от количества полнонуклеотидных последовательностей различных штаммов отражена с помощью кривой накопления генов. Накопление генов «основного» генома соответствует экспоненциальной кривой, которая выходит на плато на уровне 943 генов, что говорит о достаточном количестве полнонуклеотидных последовательностей различных штаммов для такого типа анализа. Таким образом, «основной» геном для вида *S. epidermidis* составил приблизительно 40% от предсказанного по данным полногеномного секвенирования количества генов (в различных геномных проектах варьируется от 2802 до 2036 генов). «Дополнительный» геном представлен 7413 различными генами и с ростом количества полнонуклеотидных последовательностей, количество генов в «дополнительном» геноме увеличивается в соответствии со степенной кривой. Основываясь на анализе данных «основного» генома, были получены данные о положении исследуемых изолятов на филогенетическом древе относительно других штаммов, информация о которых содержится в базе данных NCBI. Исследуемые изоляты, как и ожидалось, кластеризовались совместно с другими госпитальными изолятами (C10C, NIN04008, NIN051668), выделенными при инфекционных процессах из мокроты, крови и легких пациентов.

Для установления механизмов патогенности исследуемых изолятов на основании анализа данных «дополнительного» генома были выявлены ФВП этих изолятов. Надо заметить, что исследуемые изоляты (SE41, SE528 и SE36-1) обладают очень схожими профилями ФВП. Наиболее сильно изменена АК последовательность белка IcaB, участвующего в образовании полисахаридного матрикса биопленки, у изолята SE528. IcaB изолята SE528 содержит 9 АК замен, по сравнению с АК последовательностями этого белка в изолятах SE41 и SE36-1. Кроме того, у изолятов SE41 и SE528 в отличие от изолята SE36-1 нарушена рамка считывания АК последовательности гомологичной последовательности фибронектин связывающего белка, также рамка считывания сдвинута для липазы Geh1 изолята SE528. По одной АК замене найдены для протеиназ SspC и ClpB у изолята SE36-1 по сравнению с остальными изолятами (SE41, SE528, RP62A, ATCC12228).

Не смотря на изменения в генах изолята SE528, ответственных за формирование биопленок (ген фибронектин связывающего белка и *icaB*), в экспериментах, изучающих образование биопленок на пластике, было показано, что изолят SE528 способен к формированию биопленки. Значения оптической плотности образца, соответствующего окрашенной кристаллическим фиолетовым биопленки, изолята SE528 сопоставимы со значениями аналогичных образцов изолятов SE36-1 и SE41. Видимо АК замены последовательности белка IcaB изолята SE528 не нарушают структуру этого белка, необходимого для формирования биопленок.

Наиболее интересным является сопоставление профилей ФВП исследуемых изолятов с референсными штаммами (RP62A, ATCC12228). Лабораторный штамм ATCC12228 был выбран как референсный негоспитальный штамм, не образующий биопленок, штамм RP62A, напротив, был взят в качестве примера штамма, связанного с инфекционными процессами. Данный штамм обладает широким спектром ФВП *S.epidermidis*, в частности ФВП, обуславливающими способность

формирования биопленок (*ica* ABCD оперон, аутолизины, фибриноген и фибронектин связывающие белки и др.). При сопоставлении профилей ФВП было выявлено, что также как и для референсного штамма госпитального происхождения RP62A, для исследуемых изолятов (SE41, SE528 и SE36-1) характерно наличие различных фенол-растворимых модулинов, в том числе и фенол-растворимого модулина α . На сегодняшний день принято связывать наличие фенол-растворимого модулина α у штаммов *S.epidermidis* с их госпитальным происхождением и способностью вызывать инфекционные процессы. При этом в геноме лабораторного штамма ATCC12228 не содержится последовательности, кодирующей фенол-растворимый модулин α . Таким образом, полученные данные подтверждают наличие в геноме госпитальных штаммов последовательностей, кодирующих фенол-растворимый модулин α . Возможно в дальнейшем на основании наличия последовательности, кодирующей фенол-растворимый модулин α , можно создать метод типирования, позволяющий быстро выявлять госпитальные изоляты *S.epidermidis*.

Кроме наличия последовательности, кодирующей фенол-растворимый модулин α , исследуемые изоляты *S.epidermidis* в составе своего генома несут гены четырех различных гемолизин, для лабораторного штамма ATCC12228 показано наличие трех генов гемолизин, а для RP62A- двух. Что касается секретируемых ферментов, то изоляты SE41, SE528 и SE36-1 обладают более широким спектром различных протеаз, чем референсные штаммы. Как и референсные штаммы исследуемые изоляты имеют гены, кодирующие белки капсулы (CapA, CapB, Cap C, CapD, Cap5B, CapA родственный белок).

Из литературных данных известно, что наиболее важным ФВП в механизмах патогенности *S. epidermidis* является способность образовывать биопленки [40]. Бактерии в составе биопленки часто имеют характеристики отличные от таковых у бактерий в планктонном состоянии. Данные отличия

обычно касаются устойчивости к эффекторам иммунной системы и устойчивости к различным антибактериальным препаратам. При анализе данных «дополнительного» генома исследуемых изолятов *S. epidermidis* SE36-1, SE41, SE528 были обнаружены гены, продукты которых участвуют в процессе формирования биопленок. Так гены *icaABCD* оперона (*icaA*, *icaB*, *icaC*, *icaD*, *icaR*), ответственные за образование основного компонента матрикса биопленок *S. epidermidis*- полисахарида β -1,6-N ацетилглюкозамина, найденные у всех исследуемых изолятов. Помимо этого найдены гены других белков, принимающих участие в формировании биопленок: ген аутолизина (*atlE*), ген фибронектин связывающего белка, 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 исследуемые изоляты *S. epidermidis* способны к формированию биопленок, что было подтверждено в ходе экспериментов, оценивающих способность формирования биопленок на поверхности пластика с помощью окраски прикрепившихся к пластику клеток *S. epidermidis* красителем кристаллическим фиолетовым. Для изолята SE36-1 характерно наибольшее число клеток, прикрепившихся к пластику. Для более подробного изучения процесса образования биопленок *S. epidermidis* и визуализации этого процесса были получены данные о взаимодействии изолята SE36-1 с эукариотическими клетками. SE36-1 был выбран на основании данных, полученных при окраске кристаллическим фиолетовым клеток, исследуемых изолятов, прикрепившихся к пластику. В качестве метода регистрации биопленок использовали СЭМ, поскольку этот метод наиболее достоверно и наглядно отражает стадии формирования ЭПС матрикса. Образование биопленок клетками SE36-1 исследовали в триптон-соевом бульоне непосредственно в планшете на стекле.

Возвращаясь к качеству полногеномного секвенирования, нужно отметить, что в результате повторного секвенирования нуклеотидной

последовательности изолята SE36-1 параметры качества секвенирования улучшились не значительно. В ходе детального анализа сборки нуклеотидной последовательности генома изолята SE36-1 были выявлены контиги покрытие, которых значительно превышало (в 30 раз) среднее покрытие по геному. Данные контиги соответствовали нуклеотидной последовательности профага SP β , впервые обнаруженного в составе генома штамма *S.epidermidis* RP62 [11]. Необходимо добавить, что штамм *S.epidermidis* RP62 является госпитальным, способным к формированию биопленок, штаммом.

На основании данных кольцевой сборки последовательности генома изолята SE36-1, соответствующей профагу SP β , данных об увеличенном покрытии этого участка относительного среднего покрытия по геному, а также данных об отсутствии ридов, соответствующих этой последовательности и имеющих общие участки с бактериальной хромосомой изолята SE36-1, можно предположить, что эта последовательность не является частью хромосомы изолята SE36-1, а представляет собой внехромосомный элемент. Для подтверждения этой гипотезы был проведен ряд экспериментов. Были предприняты попытки выделения фаговых частиц из культуральной жидкости изолята SE36-1. Фаговые частицы обнаружены не были, но в некоторых пробах наблюдался спонтанный лизис. Кроме того был поставлен эксперимент по индукции фаговых частиц под действием митомицина С, в результате которого были получены фаговые частицы двух различных фагов, относящиеся к отряду *Caudovirales*; семейству *Siphoviridae*. Надо отметить, что в исследовании Gill S.R., 2005 производился поиск и сравнение последовательности профага SP β изолята *S.epidermidis* RP62 с известными вирусными геномами и было выявлено, что данная последовательность гомологична последовательности фага *Bacillus subtilis* SP β c2 [11]. Фаг *B.subtilis* SP β c2 также относится к отряду *Caudovirales*; семейству *Siphoviridae* [173]. Вторым обнаруженным фагом является последовательность гомологичная стафилококковому фагу StB20, которая,

вероятно, находится в геноме изолята SE36-1 в виде профага, но под действием митомицина С происходит индукция этого фага и он, вызвав лизис части популяции изолята SE36-1, формирует фаговые частицы. Фаг StB20 также как и фаг SPβс2 относится к отряду *Caudovirales*; семейству *Siphoviridae* [174]. Для подтверждения полученных данных из фагового препарата был выделен образец ДНК, и в результате его полногеномного секвенирования получены нуклеотидные последовательности фагов. По данным аннотации эти нуклеотидные последовательности были аналогичны нуклеотидным последовательностям: профага Spβ *S.epidermidis* RP62 и стафилококкового фага StB20. Фаги, выявленные под действием митомицина на изолят SE36-1, были названы, соответственно, Spβlike и StB20like. Причем не было обнаружено однонуклеотидных замен для последовательностей фагов, полученных в результате секвенирования фагового препарата, и соответствующих последовательностей в геноме изолята SE36-1. На основании аннотации фаговых последовательностей изолята SE36-1 были выявлены основные фаговые белки, ответственные за способность формировать фаговые частицы, например белки капсида, белки хвоста фага, белки связанные с репликацией фаговой ДНК, белки литического пути и белки, обуславливающие лизогению. Наличие найденных белков (рис. 9 и 10) показывает принципиальную возможность сборки обнаруженных фагов в фаговые частицы и переход этих фагов от состояния лизогении к литическому пути развития.

Что касается изолятов SE41 и SE528, то в составе их геномов, то же обнаружены последовательности Spβ в виде профагов, на что указывают данные о наличии коротких прочтений с прибора, соответствующих этим последовательностям и имеющих общие участки с бактериальной хромосомой этих изолятов. Кроме того, покрытие контигов, соответствующих этой последовательности, в изолятах SE41 и SE528 имеет ту же величину, что и среднее покрытие по геному этих изолятов. В

результате сравнения профаговых последовательностей Sp β изолятов SE41, SE528 и внехромосомной последовательностью Sp β like изолята SE 36-1 были найдены аминокислотные замены в следующих белках: белок «рулетка» (tape measure protein), а также два белка с неизвестной функцией (hypothetical protein). Белок «рулетка» - основной белок, определяющий длину хвостового отростка фага. Наличие АК замен в этом белке у штаммов SE41, SE528 может привести к неправильной сборки фага. Также надо отметить, что по данным аннотации этой ОРС следующим по гомологии белком является глицил-глицинэндопептидаза ALE-1 (EC: 2.3.1.-). Это фермент, первичная структура которого очень похожа на первичную структуру лизостафина [175]. И ALE-1 и лизостафин обладают стафилолитической активностью, вызывая гидролиз внутренних глицил-глицин сайтов пептидогликана. Возможно, нарушение работы этого белка связано с нарушением литического пути развития фага. В любом из этих случаев, нарушение структуры и соответственно функции этой ОРФ может приводить к тому, что в изолятах SE41 и SE528 нуклеотидная последовательность Sp β like находится не в виде внехромосомного элемента, а в виде профага.

Наблюдаемая картина для нуклеотидной последовательности изолята SE36-1 гомологичной фагу StB20 описывает стандартное поведение профага в составе бактериального генома в отличие от нуклеотидной последовательности SP β like, представленной в геноме изолята SE36-1 как внехромосомный элемент.

Фактически единственным отличием, обнаруженным исходя из анализа данных полногеномного секвенирования изолята SE36-1 по сравнению с изолятами SE41, SE528 является наличие в его геноме внехромосомной последовательности фага Sp β like, а также его способность к спонтанной лизогении. Взаимодействие фага Sp β like с изолятом SE36-1 можно охарактеризовать как случай псевдолизогении. Псевдолизогения - это «промежуточная» стадия между лизогенной и литической стадиями развития

бактериофага в клетке-хозяина, 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 [176]. Такая ситуация возможна в случае, когда геном фага не интегрирован в бактериальную хромосому, а сохраняется в цитоплазме бактерии в виде плазмиды. Такое состояние фага принято называть препрофагом. Надо отметить, что стадия псевдолизогении, как упоминалось выше промежуточная и бактериофаг может перейти как в состояние лизогении, так и на литический путь развития.

Случаи псевдолизогении описаны достаточно давно для различных видов бактерий. Классическим примером бактериофагов способных к псевдолизогении является фаг T4 *E. coli*. Этот, как правило, вирулентный фаг может находиться в стадии псевдолизогении, в условиях голодания клеток-хозяев [177], а также в условиях хемостата, поддерживающего медленные темпы роста при температуре 25°C [178]. Кроме того есть данные о препрофагах *Pseudomonas aeruginosa*, *Borrelia burgdorferi* и представителей родов *Clostridium* и *Vibrio* [176]. Не смотря на то, что случаи псевдолизогении описаны давно, это явление остается мало изученным, так как псевдолизогения не является стабильным состоянием бактериофагов, и часто выявляется в условиях не благоприятных для роста клеток-хозяев.

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 окружающей среды бактериальных клеток, т.е., например, возникновении иммунного ответа организма хозяина (человека), препрофаг может перейти в литическую стадию жизненного цикла и вызвать лизис

бактериальных клеток, при этом все литические ферменты и другие составляющие бактериальных клеток, попадут во внешнее пространство, оказывая воздействие на клетки организма хозяина. В результате этого воздействия клетки хозяина (человека) могут частично разрушиться, а также начать вырабатывать большое количество цитокинов.

Для визуализации взаимодействия изолятов *S. epidermidis* с клетками организма-хозяина, на примере изолята SE36-1, были поставлены модельные эксперименты. В данной работе в качестве модели для изучения процесса взаимодействия *S. epidermidis* с клетками организма хозяина была выбрана клеточная линия рака толстой кишки человека HT-29. Выбор данной клеточной линии связан с тем, что HT-29 представляют собой эпителиальные клетки, которые следует рассматривать как первый барьер для бактериальных клеток [179]. Кроме того, стоит отметить, что стафилококки часто являются причиной инфекционных поражений кишечника. Примером такой инфекции может служить формирование колоректальных свищей [180], что свидетельствует о тропности стафилококков к слизистой кишечника.

В триптон-соевом бульоне через 24 часа *S. epidermidis* SE36-1 параллельно с процессом адгезии начинает формирование биопленки, через 48 часов инкубации наблюдались обширные участки, покрытые ЭПС матриксом. В то же время, при взаимодействии *S. epidermidis* 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 максимальной, наблюдалась массовая деструкция клеток HT-29. Причем была выявлена очень интересная особенность взаимодействия *S. epidermidis* SE36-1 с культурой клеток человека HT-29, в результате цитолитического действия *S. epidermidis* SE36-1 на клетки HT-29 в течение 48 часов на поверхности стекла наблюдались структуры - «остов» клеток. Эти структуры, очевидно,

представляют собой неразрушенный цитоскелет клеток НТ-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.

Если проводить сравнение особенностей характера взаимодействия клеток организма-хозяина и стафилококков трех наиболее клинически значимых видов: *S. aureus*, *S. haemolyticus*, *S. epidermidis*, представленных лабораторным штаммом ATCC29213 и изолятами SH 527 и SE 36-1, соответственно, то для *S. epidermidis* SE 36-1 характерно также как и для двух других видов на первом этапе(1-2 часа) инфицирование клеточного пласта и адгезия бактерий к межклеточному матриксу культуры клеток НТ29. Способность к адгезии по сравнению с двумя другими видами у эпидермального стафилококка (*S. epidermidis* SE36-1) была наиболее слабо выражена. В процессе взаимодействия с культурой клеток у стафилококков всех изученных штаммов происходило изменение архитектоники клеточного пласта с последующим его разрушением. Не смотря на различную способность к адгезии, у изучаемых штаммов, отчетливые признаки деструкции клеточного пласта НТ-29 наблюдали через 24 часа инкубации под действием любого из них. Наиболее интересной и характерной особенностью взаимодействия клеток организма-хозяина и *S. epidermidis* SE36-1 является образование таких структур, как «остов» клеток организма-хозяина. Эти структуры, вероятно, представляют собой неразрушенный цитоскелет клеток НТ-29.

Таким образом, данные об адгезии, колонизации и деструкции пласта клеток НТ-29 под воздействием *S. epidermidis* SE36-1, свидетельствуют о

токсическом эффекте этого изолята на культуру клеток НТ-29. Для количественной характеристики токсического эффекта исследуемых изолятов КОС на культуру клеток человека НТ-29 было проведено измерение активности ЛДГ. ЛДГ – фермент, участвующий в реакции превращения лактозы в пируват с образованием NADH^+ в ходе гликолиза. Тест на измерение активности этого фермента широко используется в клинических лабораториях как показатель стресса или гибели клеток [181, 182]. Рост активности ЛДГ при стрессе связан с потребностью клеток в быстром получении энергии, при этом происходит активация ферментов гликолиза. В данной работе изменение активности ЛДГ культуры клеток НТ-29 оценивали под действием культуральной жидкости или отмытых от среды бактериальных клеток. Максимальная активность ЛДГ культуры клеток НТ-29 под воздействием отмытых бактерий *S. epidermidis* SE36-1 наблюдалась через 2 часа после совместной инкубации НТ-29 и отмытых клеток SE36-1 и достигала значения 36,4 ед/л, что было сопоставимо со значением, полученным для штамма *S. aureus* ATCC29213 (30,4 ед/л), и было, значительно меньше, чем значение, полученное для *S. haemolyticus* SH527 (131,5 ед/л), хотя исходя из данных кривых роста скорость роста для *S. aureus* ATCC29213, выше, чем для *S. epidermidis* SE36-1 и *S. haemolyticus* SH527. При дальнейшей совместной инкубации НТ-29 и отмытых клеток SE36-1 наблюдали спад в активности ЛДГ, который к 4 часам инкубации достиг значений, полученных для контрольных проб.

Изменение активности ЛДГ под действием культуральной жидкости позволяет охарактеризовать токсическое воздействие секретируемых штаммами стафилококков веществ. Характер токсического воздействия супернатанта *S. epidermidis* SE36-1 аналогичен *S. haemolyticus* SH527, но выражен слабо. Рост активности ЛДГ культуры клеток НТ-29 под действием супернатанта зафиксирован через 4 часа инкубации и составила 14,2 ед/л,

затем происходил спад активности и снова рост. Максимальное значение активности ЛДГ клеток НТ-29 под воздействием культуральной жидкости и следовательно максимальный токсический эффект *S. epidermidis* SE36-1 наблюдалось через 24 часа и составило 18,2 ед/л, что было сопоставимо с максимальным значением активности ЛДГ клеток НТ-29 под воздействием культуральной жидкости *S. aureus* ATCC29213 (16,2 ед/л), но значительно меньше, чем аналогичное значение, полученное для *S. haemolyticus* 527 (44,7 ед/л).

Пониженный уровень токсического воздействия *S. epidermidis* SE36-1 подтверждают и эксперименты, описывающие гемолитическую активность *S. epidermidis*, исследуемые изоляты *S. epidermidis* SE36-1 и SE41, обладали низкой гемолитической активностью сопоставимой с гемолитической активностью непатогенного лабораторного штамма *S. epidermidis* ATCC 12228.

Полученные данные характеризуют стиль жизни *S. epidermidis*, который тесно связан с формированием биопленок, способствующей адгезии и дальнейшей колонизации *S. epidermidis* поверхности, а также с отсутствием ярко выраженной токсигенной активности, обусловленной секрецией токсинов. При этом штаммы *S. epidermidis* способны вызывать инфекционные процессы, приводящие к летальным исходам, переходя от колонизации к инвазивному образу жизни, примером такого поведения может случить изолят *S. epidermidis* 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, его токсигенная активность слабо выражена, по данным СЭМ при взаимодействии с культурой клеток человека этого изолята образуются структуры «остов клеток», что, возможно, также связано с пониженной токсигенностью. С другой стороны данный изолят приспособлен к условиям

окружающей среды за счет формирования биопленок на поверхности катетеров, а также, при определенных условиях, к частичному спонтанному лизису, вызывающему выброс литических ферменты и других составляющих бактериальной клетки, которые могут привести к повреждениям клеток организма хозяина и к повышенному выбросу цитокинов. Этот процесс можно рассматривать как один из вероятных механизмов патогенности.

4.2 Особенности проявления патогенных свойств госпитальными штаммами *S.haemolyticus*

Помимо вида *S.epidermidis*, клинически значимым видом КОС является *S.haemolyticus*, также ассоциированный с госпитальными инфекциями. 71 изолят *S.haemolyticus* представлен в собранной в результате настоящей работы коллекции, что составляет 42% всех изолятов коллекции. Полученные данные подчеркивают необходимость исследований особенностей механизмов патогенности госпитальных изолятов *S.haemolyticus*. Основными источниками выделения изолятов вида *S.haemolyticus* являлись зев и кал (по 31%), один из изолятов (*S.haemolyticus* SE39) был получен из аутопсийного материала. Как и в случае с изолятами *S.epidermidis*, большинство изолятов *S.haemolyticus* являлись устойчивыми к метициллину и обладали множественной лекарственной устойчивостью к антибиотикам нескольких различных групп, что подтверждает данные других исследователей [4, 171, 172]. Как и в случае с изолятами *S.epidermidis*, не было выявлено изолятов *S.haemolyticus* устойчивых к таким антибиотикам как ванкомицин и линезолид, что делает эти антибиотики вероятными препаратом выбора при лечении КОС ассоциированных инфекций.

Как упоминалось выше, наиболее интересными для исследования механизмов патогенности КОС являются госпитальные изоляты, в частности и *S.haemolyticus*, что связано с госпитальным характером инфекций, вызываемых ими. С целью выявления госпитальных изолятов проводилось

типирование двумя различными методами (MLST и типирование на основании данных прямого бактериального профилирования).

На сегодняшний день нет апробированной схемы MLST типирования для изолятов вида *S. haemolyticus*. Опубликовано несколько работ, посвященных разработке MLST схемы типирования, но все предложенные схемы требуют доработки с целью повышения дискриминационного коэффициента, предложенных схем [131, 155]. В рамках диссертационной работы были протестированы 18 различных генов на коллекции, состоящей из 71 изолята *S. haemolyticus*. Выбор кандидатных генов осуществлялся по аналогии со схемами MLST для других видов стафилококков (*S. epidermidis* [138]) и *S. aureus* [137]), также были протестированы гены, предложенные в работах Ворониной О.Л., 2011 [155]; Cavanagh J.P., 2012 [131]. На основании анализа, результатов амплификации и дискриминационной способности амплифицированных участков кандидатных генов, были выбраны семь MLST локусов (*tpi*, *pta*, *sh1200*, *rphE*, *tphK*, *mvaK*, *arcC*), обладающие максимальной дискриминационной способностью. Наибольший вклад в дискриминационную способность предложенной схемы внесли локусы в *tpiA* и *pta* (дискриминационные индексы этих локусов - 0,704 и 0,635, соответственно). Для каждого кандидатного участка генов были рассчитаны значения отношения несинонимичных замен к синонимичным заменам (dn/ds). Этот коэффициент позволяет определить вид отбора, влияющий на сохранение или изменение аминокислотной последовательности белка в популяции, если $dn/ds = 1$, то коэффициент указывает на нейтральный тип мутаций, $dn/ds < 1$ свидетельствует о стабилизирующем отборе, $dn/ds > 1$ характеризует положительный отбор [183]. Рассчитанные значения, dn/ds для всех локусов, включенных в схему MLST, не превышали 1, что говорит о наличии в популяции стабилизирующего отбора последовательности данных локусов и свидетельствует о том, что эти локусы являются консервативными областями

генома *S. haemolyticus*.

На основании данных типирования по этой схеме все тестируемые изоляты (71 изолят) были отнесены к 23 различным сиквенс типам. Большинство изолятов принадлежало к ST17 (19 изолятов), ST1 (12 изолятов), и ST5 (9 изолятов). Данные филогенетического анализа показали наличие большого количества близкородственных изолятов ($N = 46$), относящихся к следующим сиквенс типам: ST1, ST5, ST7, ST14, а также ST17. С помощью программного обеспечения eBURST было показано, что сиквенс типы ST1, ST5, ST14, ST17 образуют единый клональный комплекс. Изоляты, относящиеся к этим сиквенс типам и располагающиеся на филогенетическом дереве отдельным кластером, характеризуются широким спектром устойчивости к антибиотикам, кроме того большинство из них, выделены от недоношенных новорожденных детей с различными клиническими диагнозами, например сепсис, конъюнктивит. Приведенные данные позволяют предположить, что изоляты, характеризующиеся сиквенс типами ST1, ST5, ST14, ST17 относятся к госпитальными изолятами *S. haemolyticus*.

Дискриминирующая способность предложенной MLST схемы (*tpiA-pta-sh1200-rphE-tpiK-mvaK1-arcC*) оценивалась с помощью дискриминационного коэффициента Хантер-Гастона, который составил 0,874. Следует отметить, что коллекция исследуемых изолятов не является однородной, а именно, большинство изолятов получены из ФГБУ «Научный центр акушерства, гинекологии и перинатологии имени академика В.И. Кулакова» (48 изолятов, 67,6%). Таким образом, для того, чтобы исключить неоднородность выборки, коэффициент Хантер-Гастона был вычислен для выборки, из которой были исключены изоляты, полученные из ФГБУ «Научный центр акушерства, гинекологии и перинатологии имени академика В.И. Кулакова». В этом случае, дискриминационный коэффициент составил

0,95, что говорит о высокой дискриминирующей способности этой схемы MLST.

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 в последние годы стал одним из наиболее востребованных, точных и быстрых методов идентификации микроорганизмов, в том числе и КОС. Этот метод идентификации основан на сопоставлении спектров идентифицируемого микроорганизма со спектрами, содержащимися в базе данных. На сегодняшний день накоплен большой массив масс-спектрометрических данных о различных микроорганизмах. Детальный анализ этих данных может быть использован как новый инструмент типирования микроорганизмов, в том числе КОС. В качестве примера использования спектров, полученных с помощью метода прямого масс-спектрометрического профилирования бактериального лизата, можно рассматривать данные представленные в публикации, посвященной типированию *S. aureus* [184]. *S. aureus* – наиболее вирулентный вид стафилококков, обладающий большим штаммовым разнообразием, в первую очередь связанным с вариабельностью факторов вирулентности и патогенности. С целью типирования изолятов был произведен математический анализ совокупности МАЛДИ масс-спектров, накопленных для 53 изолятов *S. aureus*, с применением генетического алгоритма

кластеризации, что позволило построить две независимые классификационные модели, способные дифференцировать штаммы по способности к продукции β -лактамазы, обусловленной наличием гена *blaZ*, и по наличию гена α -гемолизина. Построенные диагностические модели характеризовались коэффициентами чувствительности и специфичности, которые составили 97,5% и 82,5% для модели разделения штаммов по признаку способности к продукции β -лактамазы и 90,0% и 88,7% для модели разделения штаммов по признаку наличия α -гемолизина. Кроме того на основании статистического вклада в модель каждого масс-пика были выявлены наиболее значимые пики (массы), которые можно рассматривать как маркеры штаммовых различий стафилококков по данным признакам. Эта работа показала принципиальную возможность штаммового типирования на основании МАЛДИ масс-спектров для стафилококков. В рамках диссертационной работы был предложен метод типирования, основанный на расчете КК МАЛДИ масс-спектров, полученных в ходе идентификации методом прямого масс-спектрометрического профилирования бактериального лизата и дальнейшем построении матрицы корреляционных коэффициентов. Расчет КК является одним из методов представляющим собой статистический метод оценки сходства масс-спектров [185]. Так для всех изолятов *S.haemolyticus*, собранной коллекции, идентификация проводилась методом прямого масс-спектрометрического профилирования бактериального лизата, в результате чего была получена коллекция МАЛДИ масс-спектров изолятов *S.haemolyticus* (для 71 изолята по 4 спектра по 240 лазерных импульсов).

Известно, что в пределах одного стационара циркулирует, как правило, ограниченное количество штаммов, приспособившихся к жизни в стационаре и в некоторых случаях вызывающих инфекции. Таким образом, вся коллекция была разделена на две группы: коллекция изолятов из ФГБУ «Научный центр акушерства, гинекологии и перинатологии имени академика

В.И. Кулакова» (48 изолятов), а также коллекция изолятов 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. Несмотря на это, нужно отметить, что группа, образованная изолятами из коллекции ФГБУ «Научный центр акушерства, гинекологии и перинатологии имени академика В.И. Кулакова» не является однородной. В составе этой группы можно выделить кластер близкородственных изолятов, включающий в себя половину изолятов этой коллекции и доминирующий в данном стационаре, а также единичные изоляты, не обладающие тесным родством с остальными изолятами стационара. По данным MLST близкородственные изоляты, относятся к сиквенс-типам: ST1, ST5, ST17 и носят госпитальный характер. В эту группу также вошли изоляты, выделенные у двух близнецов с поздним неонатальным сепсисом (479 и 480, 515 и 518, 487 и 516), соответственно из крови, кала, и зева. На примере масс-спектров изолятов, полученных от близнецов, можно отметить, что среднее значение КК масс-спектров, полученных для этих изолятов, очень высоко ($0,935 \pm 0,04$), причем для изолятов, выделенных из крови, КК составил 0,976. Видимо штамм, вызвавший сепсис и колонизирующий зев и кал у этих близнецов, один и тот же.

Среди изолятов, полученных из ФГБУ «Научный центр акушерства, гинекологии и перинатологии имени академика В.И. Кулакова» наиболее сильно отличаются КК масс-спектров изолятов 568, 647m и 1091, что также подтверждается данными MLST типирования. Изоляты относятся к сиквенс-типам: ST2, ST13, ST18, и выделены из зева, кала, и отделяемого глаза при

конъюнктивите, соответственно. Возможно данные изоляты (возможно и соответствующие сиквенс-типы) не являются госпитальными, и характеризуют случаи контаминации.

Метод типирования посредством анализа МАЛДИ масс-спектров, полученных при идентификации с помощью прямого бактериального профилирования, может быть использован при наличии некоторого пула масс-спектров, охарактеризованных госпитальных изолятов, что позволит проводить сравнение с этим пулом вновь полученных изолятов. В результате его применения можно сильно сократить время проведения анализа и трудозатраты по сравнению с другими методами типирования (MLST, гель-электрофорез в пульсирующем электрическом поле).

На основании клинических данных и данных типирования, отобрано четыре изолята *S.haemolyticus* для изучения особенностей механизмов реализации патогенности этого вида (SH39, SH527, SH421 и SH864-1). Наиболее интересны с клинической точки зрения изоляты SH39 и SH527. Первый изолят выделен из аутопсийного материала (кишечника) новорожденного ребенка, второй выделен из крови взрослого пациента с диагнозом сепсис. Изоляты SH421 и SH864-1 получены, соответственно, при посевах из зева и кала новорожденных детей. По данным MLST выбранные изоляты относятся к различным сиквенс типам. Изоляты SH39 и SH421 относятся к сиквенс типам ST17 и ST5 соответственно, эти сиквенс типы по приведенным выше данным, характеризую госпитальные изоляты. Изолят SH527 относится к ST23. Данный сиквенс тип не относится к кластеру, в который входят сиквенс типы ST17 и ST 5, но учитывая данные лекарственной чувствительности (изолят устойчив к оксациллину, хлорамфениколу, ципрофлоксацину, клиндамицину, эритромицину, гентамицину и линкомицину) и диагноз пациента (сепсис), из крови которого получен этот изолят, вероятнее всего, он также является госпитальным. Для подтверждения госпитального происхождения штаммов, характеризующихся

ST23 необходимо получить больше изолятов этого сиквенс типа и данных об их происхождении. Все изоляты, выделенные в ходе диссертационной работы и относящиеся к кластеру на филогенетическом дереве (рис. 3), образованному к сиквенс-типами ST 11, ST 10 и ST 12, были выделены с кожи здоровых детей или из кала новорожденных детей. Кроме того, изоляты ST 11 были чувствительны к метициллину, ванкомицину, линкомицину, эритромицину, ципрофлоксацину и тетрациклину. Исходя из этих данных изолят SH864-1, вероятнее всего, не относится к госпитальным изолятам. Таким образом, для дальнейшего исследования механизмов патогенности КОС вида *S. haemolyticus* было отобрано три госпитальных изолята (SH39, SH421, SH527), и один негоспитальный изолят (SH864-1). Для этих изолятов были определены полногеномные последовательности. Так же, как и в случае анализа полногеномных нуклеотидных последовательностей *S. epidermidis* для более корректного поиска возможных ФВП изучаемых изолятов, а также для установления родственных связей между исследуемыми изолятами и изолятами, описанными в базах данных, был проведен анализ полногеномных нуклеотидных последовательностей с целью выявления «основного» и «дополнительного» генома этих изолятов. Кроме полногеномных последовательностей исследуемых изолятов в анализ были включены данные о полногеномных последовательностях вида *S. haemolyticus*, содержащихся в базе NCBI (168 последовательностей). В результате чего построена кривая накопления генов. На основании полученной кривой видно, что «основной» геном для вида *S. haemolyticus* составляет 1439 гена. Причем экспоненциальная кривая, характеризующая накопления генов «основного» генома, при увеличении количества включенных в анализ штаммов выходит на плато, что свидетельствует о достаточном количестве штаммов для проведения данного вида анализа. На основании данных «основного» генома было построено филогенетическое дерево, позволяющее установить происхождение исследуемых изолятов. На

основании данных филогенетического анализа можно утверждать, что из исследуемых изолятов (SH39, SH421, SH527, SH864-1) близкородственными являются только SH39, SH421. Полученные на основании полногеномных последовательностей филогенетические данные хорошо согласуются с филогенетическими данными, полученными в результате типирования изолятов. Что касается госпитальной природы исследуемых изолятов, то госпитальное происхождение SH39, SH421 было подтверждено филогенетическими данными, полученными при анализе полногеномных последовательностей *S. haemolyticus*, так как для них наиболее близкородственными штаммами являлись штаммы, выделенные из крови человека и из кишечника человека. О происхождении изолята SH527 по полученным данным сделать вывод о его госпитальном происхождении невозможно, так как он занимает отдельную позицию на филогенетическом дереве. Для изолята SH864-1 наиболее близкими являются штаммы 1292_SNAE и 51-72. Данных об источнике выделения штамма 1292_SNAE в базе данных NCBI не представлено. Штамм 51-72 получен со слизистых человека, что свидетельствует о колонизации. Таким образом, SH864-1 является близкородственным с негоспитальным штаммом 51-72, что также подтверждает его негоспитальную природу.

Для нахождения особенностей механизмов патогенности *S. haemolyticus* был проведен прицельный анализ полученных полногеномных данных, направленный на нахождение, во-первых, известных ФВП стафилококков, а, во-вторых, различных мобильных элементов, в том числе и профагов. В качестве референсного штамма использовали штамм *S. haemolyticus* JCSC1435 ([AP006716.1](#)), полученный из клинического материала.

Так в составе геномных последовательностей исследуемых изолятов (SH528, SH39, SH421, SH864-1) был выявлен ряд генов известных ФВП стафилококков: ФВП, участвующих в формировании капсулы и биопленки,

различных секретируемых ферментов, и гемолизинов. Наибольший интерес представляют гены токсинов, найденные 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, один из которых гемолизин III, идентичен гемолизину III референсного штамма JCSC1435. У изолята SH864-1 АК последовательность этого белка нарушена.

У исследуемых изолятов найдены различные секретируемые ферменты, по сравнению с референсным штаммом многие из них имеют АК замены (табл. 19). Так триацилглицерол-липаза, кодируемая геном *lip*, идентична липазе JCSC1435, только у изолята SH 527. У других изолятов (SH421, SH39 и SH864-1) в АК последовательности этого белка найдены многочисленные замены, так для липазы изолятов SH421, SH39 найдено 37 АК замен, для изолята SH864-1- 27 замен. Возможно, структура этого белка претерпела изменения, что могло отразиться также и на функциональности этого белка. Также много АК замен (26 замен) по сравнению с референсным штаммом найдено в АК последовательности одной из найденных сериновых протеаз изолята SH 421.

Белки, ответственные за синтез капсулы у исследуемых изолятов по сравнению с аналогичными белками JCSC1435 также имеют значительное количество АК замен.

Другим важным аспектом механизмов патогенности стафилококков является способность стафилококков формировать биопленки. На сегодняшний день довольно 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 ФВП, ответственных за формирование биопленок: ген фибронектин связывающего белка, ген эластин связывающего белка, ген аутолизина. Кроме того, у исследуемых изолятов обнаружен один из генов *icaABCD* оперона, ответственного за формирование полисахаридного матрикса биопленки, (*icaC*). Возможно, другие гены, входящие в *icaABCD* оперон (*icaA*, *icaB*, *icaD*) у изолятов, не были найдены вследствие того, что имеют сильно отличающуюся нуклеотидную последовательность от нуклеотидной последовательности генов *ica* оперона *S.epidermidis*, на основании которой проводилась аннотация.

Часто гены токсинов и другие 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 исследуемых 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 генома исследуемых изолятов *S. haemolyticus*. 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 тех же контигах, где также обнаружены и фаговые гены. Сочетание генов

токсинов с фаговыми генами может являться мобильным элементом. 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, возможно, являются потенциальными ФВП. Для подтверждения и уточнения полученных данных были проведены дополнительные 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 и цитолитической активности исследуемых изолятов.

Способность к формированию биопленок на пластике изолятами *S.haemolyticus* SH39, SH421, SH527 и SH864-1 оценивалась также как и для изолятов *S.epidermidis* стандартным методом окраски клеток стафилококков, прикрепившихся к пластику красителем кристаллическим фиолетовым через 24 и 48 часов. Изолят SH527 обладал наибольшей способностью к адгезии и формированию биопленки на пластике, причем через 24 часа, прикрепившихся к пластику клеток было больше, чем через 48 часов. Наличие способности изолята SH527 к адгезии и формированию биопленки на пластике хорошо согласуется с информацией об источнике выделения данного изолята. Он был получен из крови пациента с диагнозом сепсис, данный тип КОС инфекции часто ассоциирован с использованием катетеров,

на поверхности которых стафилококки формируют биопленки.

В связи с повышенной способностью к пленкообразованию изолят SH527 был выбран для дальнейшего изучения процессов пленкообразования и взаимодействия с клетками человека с помощью СЭМ. Образование биопленок изучали непосредственно в планшете на стекле, а также в планшете на стекле, покрытым монослоем клеток человека. Как и в случае изучения взаимодействия клеток человека с изолятами *S. epidermidis*, исследование взаимодействия клеток человека с изолятами *S. haemolyticus* проводили с использованием культуры эпителиальных клеток HT-29.

При изучении образования биопленок непосредственно на стекле изолят *S. haemolyticus* SH527 образовывал биопленку более активно (уже через 24 часа), чем изоляты *S. aureus* ATCC29213 и *S. epidermidis* SE36-1 (только к 48 часам начинают продуцировать ЭПС). В тоже время при культивировании на монослое клеток HT-29 за 24 часа изучаемые штаммы стафилококков не образовывали биопленки. Начало образования биопленок на монослое клеток HT-29 зарегистрировано только через 48 часов инкубации с изолятом *S. haemolyticus* SH527. Эти данные свидетельствуют о том, что различия в условиях культивирования могут повлиять на факт формирование биопленки, образуемой стафилококками. Кроме того данные СЭМ позволили выявить характерные особенности взаимодействия *S. haemolyticus* (на примере изолята SH527) с культурой клеток человека HT-29. Инфицирование клеточного пласта изолятом SH527 на первом этапе (1-2 часа) характеризуется адгезией бактерий к межклеточному матриксу культуры клеток HT29. По сравнению с изолятами *S. aureus* ATCC29213 и *S. epidermidis* SE36-1 изолят *S. haemolyticus* SH527 обладал наиболее ярко выраженной способностью к адгезии. 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 НТ-29 с *S. epidermidis* SE36-1, выявлено не было.

Наблюдаемая при взаимодействии с изолятом *S. haemolyticus* SH527, деструкция пласта клеток НТ-29, свидетельствуют о токсическом воздействии этого изолята на культуру клеток НТ-29. Оценку токсического эффекта *S. haemolyticus* SH527, также как и для *S. epidermidis* SE36-1, проводили посредством измерения активности ЛДГ клеток НТ-29 при воздействии на них культуральной жидкости и клеток исследуемого изолята. Максимальная активность ЛДГ под действием с культуральной жидкости наблюдалась через 4 часа инкубации (45 ед/л), что касается отмытых бактерий SH527, то их токсическое воздействие на культуру клеток НТ-29 возрастало по мере роста количества бактерий в среде культивирования и накопления в среде токсических агентов, и к 24 часам инкубации активность ЛДГ достигла значения 255 ед/л. По сравнению с токсическими эффектами, вызываемыми штаммом *S. aureus* ATCC29213 (при воздействии культуральной жидкости - 16,2 ед/л, при воздействии бактерий - 165 ед/л) и изолятом *S. epidermidis* SE36-1 (при воздействии культуральной жидкости - 18,2 ед/л, при воздействии бактерий - 36,4 ед/л), токсический эффект изолята *S. haemolyticus* SH5273 (при воздействии культуральной жидкости - 44,7 ед/л, при воздействии бактерий - 255 ед/л) характеризовался наибольшим изменением активности ЛДГ клеток НТ-29 как при изучении токсичности культуральной жидкости, так и при изучении токсического воздействия отмытых бактерий. Обнаруженные с помощью анализа полногеномной последовательности, токсины могут обуславливать повышенный токсический эффект, вызываемый изолятом *S. haemolyticus* SH527.

В аспекте изучения общего токсического эффекта на эукариотические клетки была проведена оценка гемолитической активности изолятов *S. haemolyticus*. Гемолитическую активность определяли на основании степени гемолиза эритроцитов человека под воздействием культуральной жидкости

изолятов *S.haemolyticus* (SH39, SH421, SH527 и SH864-1). 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. На примере этого изолята была поставлена серия экспериментов с использованием протеомных методов с целью уточнения ФВП, обуславливающих гемолитическую активность. Были получены белковые профили исходной культуральной жидкости изолята SH527, а также хроматографических фракций 4 и 5, для которых предварительно была выявлена гемолитическая активность.

При анализе полученных белковых профилей исходили из того, что ферменты, вызывающие лизис эритроцитов, вероятно, секретируются бактериальной клеткой. Надо отметить, что изначально культуральную жидкость пропускали через фильтр для получения фракции более 10 кДа, так что фракция секретируемых *S.haemolyticus* пептидов не рассматривалась. На основании данных протеомных экспериментов, было выявлено 5 кандидатных секретируемых белков, возможно, участвующих в процессе лизиса эритроцитов. Эти белки были идентифицированы во всех трех анализируемых пробах, вызывающих гемолиз (культуральной жидкости и ее хроматографических фракциях 4 и 5). Два из них обладают антигенной природой (гипотетический белок SH0362, гипотетический белок SH0762), и вероятно, не участвуют в лизисе эритроцитов. Два других- аутолизин и N-ацетилмурамоил-L-аланинамидаза, фактически ответственны за разрушение клеточной стенки бактерий и лизис бактериальной клетки, что может приводить к лизису эритроцитов за счет воздействия на них белков цитоплазмы бактериальной клетки.

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 всех исследуемых изолятов (SH527, SH39, SH421, SH864-1) были найдены нуклеотидные последовательности, кодирующие ген белка SH0168 *lip*. На основании нуклеотидных последовательностей гена *lip* были установлены АК последовательности гипотетических белков триацилглицерол-липаз исследуемых изолятов. При анализе АК последовательностей триацилглицерол-липаз, гомологичных белку SH0168 референсного изолята JCSC 1435, штаммов *S.haemolyticus* (n=129), информация о которых содержится в NCBI, было выявлено 18 различных типов данной последовательности. Большинство АК последовательностей триацилглицерол-липаз *S.haemolyticus* (триацилглицерол-липазы первого типа) были идентичны липазе SH0168 изолята JCSC 1435, к этой группе относилась и АК последовательность триацилглицерол-липазы изолята SH527. Вторая по представленности АК последовательность триацилглицерол-липаз у *S.haemolyticus* характерна для изолятов SH39 и SH421 (триацилглицерол-липазы второго типа). Что касается негоспитального изолята SH864-1, то его АК последовательность триацилглицерол-липазы относится к слабо представленному типу (3% изолятов) (триацилглицерол-липазы третьего типа). Это связано с тем, что в базе NCBI представлены в основном госпитальные штаммы, вызывавшие инфекционные процессы.

Интересно, что наблюдается корреляция между гемолитической активностью исследуемых изолятов и типом триацилглицерол-липазы. Так госпитальный изолят SH527, выделенный из крови у пациента с диагнозом сепсис, имеющий триацилглицерол-липазу первого типа, 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. У SH864-1 триацилглицерол-липаза третьего типа. Для выяснения влияния АК замен в последовательностях липаз трех типов на ферментативную функцию этого белка, были построены соответствующие структурные модели. На основании данных моделирования было выявлено, что основным структурным элементом исследуемых гипотетических белков является альфа/бета-гидролазный домен. Из литературных данных известно, что первые 37 АК последовательности белка SH0168 изолята JCSC 1435 представляют собой сигнальный пептид (YSIRK) [186]. Далее, начиная с 373 АК и до 740 АК, следует последовательность альфа/бета-гидролазного домена [186]. Таким образом, литературные данные подтверждают структуру гипотетических липаз исследуемых изолятов, полученных путем моделирования. Наличие АК замен в области альфа/бета-гидролазного домена может повлиять на структуру и вызвать нарушение функционирования гипотетических липаз исследуемых изолятов. Наиболее близким структурным гомологом для гипотетических триацилглицерол-липаз исследуемых изолятов является липаза L1 *Bacillus stearothermophilus*. Этот фермент был выделен, его кристаллическая структура получена и каталитические функции подтверждены [187]. АК замены в последовательностях триацилглицерол-липаз изолятов SH39, SH421, и SH864-1 снижают гомологию соответствующих моделей с трехмерной структурой липазы *Bacillus stearothermophilus* (таблица 24). Наиболее низка эта гомология для модели липазы изолята SH864-1. На основании этих данных можно предположить, что АК замены в последовательностях липаз снижают или нарушают каталитическую активность данных белков, что согласуется со сниженной

гемолитической активностью изолятов SH39 и SH421, а также отсутствием 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 с помощью системного анализа данные о механизмах патогенности *S. haemolyticus* 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, что показано на примере роли триацилглицерол-липазы в процессах гемолиза эритроцитов.

Кроме того, нужно отметить, что среди исследуемых изолятов *S. haemolyticus* выделяется изолят 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. Вышепречисленные 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. При этом наиболее ярким примером госпитальных изолятов *S. haemolyticus* может служить изолят SH527, выделенный из крови пациента с диагнозом сепсис, активно образующий биопленки и вызывающий гемолиз. Таким образом, изоляты SH864-1 и SH527 являются характерными примерами, проявления различной физиологии *S. haemolyticus*, возможно ассоциированной со способностью вызывать инфекционные процессы у человека.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Еще недавно КОС рассматривались исключительно как микроорганизмы, колонизирующие кожу и слизистые оболочки человека и некоторых других видов животных, но в процессе накопления клинических данных, а также данных о физиологии КОС, например, способности образовывать биопленку, на сегодняшний день не вызывает сомнений клиническая значимость КОС. КОС относят к возбудителям оппортунистических инфекций, возникающих на фоне иммунодефицитного состояния пациента. В медицинском контексте слово «оппортунистический» указывает на готовность действовать, как только складываются определенные условия [1]. Подобная ситуация возникает при перинатальной и неонатальной патологии, внутрибольничных инфекциях, послеоперационных осложнениях, ВИЧ-инфекциях. При этом возбудителей оппортунистических инфекций характеризуют как микроорганизмы со слабовыраженной патогенностью, другими словами у них отсутствует «главный фактор патогенности»- токсин и другие биологически активные молекулы, определяющие патогенез инфекции [1]. Отсутствие основного агента, определяющего ход инфекционного процесса, сильно затрудняет объяснение механизмов КОС. Как показали различные эпидемиологические исследования наибольший клинический интерес представляет изучение механизмов патогенности видов *S.epidermidis* и *S.haemolyticus*, так как эти виды наиболее часто вызывают КОС ассоциированные инфекции. Госпитальные изоляты КОС характеризуются множественной лекарственной устойчивостью, а основные ФВП, определяющие протекание инфекции не определены. В такой ситуации крайне необходим строгий эпидемиологический контроль за циркулирующими в стационарах штаммами КОС, в связи с этим необходимо улучшать старые и разрабатывать новые методы типирования КОС, что было продемонстрировано в этой 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*,и а также роль белков, обладающих триацилглицерол-липазной активностью в механизмах патогенности изолятов *S.haemolyticus*.

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 Sp β 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 ЛИТЕРАТУРЫ:

1. Руководство по медицинской микробиологии. Под редакцией А. С. Лабинской и Н. Н. Костюковой. Оппортунистические инфекции возбудители и этиологическая диагностика // Издательство БИНОМ. 2012. 752с
2. Lepelletier, D., Bourigault, C., Roussel, J. C., Lasserre, C., Leclère, B., Corvec, S., et al. Epidemiology and prevention of surgical site infections after cardiac surgery // *Med Mal Infect.* 2013. Vol. 43. № 10. P. 403-409.
3. Rahman, A., Hosaain, M. A., Mahmud, C., Paul, S. K., Sultana, S., Haque, N., Kabir, M. R., Kubayashi, N. Species distribution of coagulase negative staphylococci isolated from different clinical specimens // *Mymensingh Med J.* 2012. Vol. 21. № 2. P. 195-199.
4. Venkatesh, M. P., Placencia, F., Weisman, L. E. Coagulase-Negative Staphylococcal Infections in the Neonate and Child: An Update // *SeminPediatr Infect Dis.* 2006. Vol. 17. № 3. P. 120-127.
5. Maldini, B., Antolić, S., Sakić-Zdravcević, K., Karaman-Ilić, M., Janković, S. Evaluation of bacteremia in a pediatric intensive care unit: epidemiology, microbiology, sources sites and risk factors // *CollAntropol.* 2007. Vol. 31. № 4. P. 1083-1088.
6. 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.
7. Otto, M. Molecular basis of *Staphylococcus epidermidis* infections // *SeminImmunopathol.* 2012. Vol. 34. № 2. P. 201-214.
8. Fey, P. D., Olson, M. E. Current concepts in biofilm formation of *Staphylococcus epidermidis* // *Future Microbiol.* 2010. Vol. 5. № 6. P. 917-933.

9. Patel, J. D., Colton, E., Ebert, M., Anderson, J. M. Gene expression during *S. epidermidis* biofilm formation on biomaterials // J Biomed Mater Res A. 2012. Vol. 100. № 11. P. 2863-2869.
10. Madhusoodanan, J., Seo, K. S., Remortel, B., Park, J. Y., Hwang, S. Y., Fox, L. K., Park, Y. H., Deobald, C. F., Wang, D., Liu, S., Daugherty, S. C., Gill, A. L., Bohach, G. A., Gill, S. R. An enterotoxin bearing pathogenicity island in *Staphylococcus epidermidis* // J Bacteriol. 2011. Vol. 193. № 8. P. 1854-1862.
11. Gill, S. R., Fouts, D. E., Archer, G. L., Mongodin, E. F., Deboy, R. T., Ravel, J., Paulsen, I. T., Kolonay, J. F., Brinkac, L., Beanan, M., Dodson, R. J., Daugherty, S. C., Madupu, R., Angiuoli, S. V., Durkin, A. S., Haft, D. H., Vamathevan, J., Khouri, H., Utterback, T., Lee, C., Dimitrov, G., Jiang, L., Qin, H., Weidman, J., Tran, K., Kang, K., Hance, I. R., Nelson, K. E., Fraser, C. M. Insights on evolution of virulence and resistance from the complete genome analysis of an early methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strain and a biofilm-producing methicillin-resistant *Staphylococcus epidermidis* strain // J Bacteriol. 2005. Vol. 187. № 7. P. 2426-2438.
12. Schubert, O. T., Mouritsen, J., Ludwig, C., Röst, H. L., Rosenberger, G., Arthur, P. K., Claassen, M., Campbell, D. S., Sun, Z., Farrah, T., Gengenbacher, M., Maiolica, A., Kaufmann, S. H., Moritz, R. L., Aebbersold, R. The Mtb proteome library: a resource of assays to quantify the complete proteome of *Mycobacterium tuberculosis* // Cell Host Microbe. 2013. Vol. 13. № 5. P. 602-612.
13. Otto, A., van Dijk, J. M., Hecker, M., Becher, D. The *Staphylococcus aureus* proteome // Int J Med Microbiol. 2014. Vol. 304. № 2. P. 110-120.
14. Wiśniewski, J. R., Rakus, D. Multi-enzyme digestion FASP and the 'Total Protein Approach'-based absolute quantification of the *Escherichia coli* proteome // J Proteomics. 2014. Vol. 109. P. 322-331.
15. Reddy, P. J., Sinha, S., Ray, S., Sathe, G. J., Chatterjee, A., Prasad, T. S.,

- Dhali, S., Srikanth, R., Panda, D., Srivastava, S. Comprehensive analysis of temporal alterations in cellular proteome of *Bacillus subtilis* under curcumin treatment // PLoS One. 2015. Vol. 10. № 4. P. e0120620.
16. Pottinger, P. S. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections // The Medical Clinics of North America. 2013. Vol. 97. № 4. P. 601-619.
17. Power Coombs, M. R., Kronforst, K., Levy, O. Neonatal Host Defense against Staphylococcal Infections // ClinDevImmunol. 2013. Vol. 2013. P. 826303.
18. Lowy, F. D. *Staphylococcus aureus* infections // NEnglJMed. 1998. Vol. 339. № 8. P. 520-532.
19. Plata, K., Rosato, A. E., Wegrzyn, G. *Staphylococcus aureus* as an infectious agent: over view of biochemisrtry and molecular genetics of its pathogenicity // ActaBiochimPol. 2009. Vol. 56. № 4. P. 597-612.
20. Gurusamy, K. S., Koti, R., Toon, C. D., Wilson, P., Davidson, B. R. Antibiotic therapy for the treatment of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) infections in surgical wounds // Cochrane Database Syst Rev. 2013. Vol. 8. P. CD009726.
21. Rogers, K. L., Fey, P. D., Rupp, M. E. Coagulase-negative staphylococcal infections // InfectDisClinNorthAm. 2009. Vol. 23. № 1. P. 73-98.
22. Rupp, M. E., Archer, G. L. Coagulasenegative staphylococci: pathogens associated with medical progress // Clin Infect Dis. 1994. Vol. 19. P. 231–243.
23. Otto, M. *Staphylococcus epidermidis* — the ‘accidental’ pathogen // NatRevMicrobiol. 2009. Vol. 7. P. 555–567.
24. McFee, R.B. Nosocomial or hospital-acquired infections: an overview // Dis Mon. 2009. Vol. 55. № 7. P. 422-438.
25. Rahman, A., Hosaain, M. A., Mahmud, C., Paul, S. K., Sultana, S., Haque, N., Kabir M. R., Kubayashi, N. Species distribution of coagulase negative

- staphylococci isolated from different clinical specimens // *Mymensingh Med J.* 2012. Vol. 21. № 2. P. 195-199.
26. Sievert, D. M., Ricks, P., Edwards, J. R. Antimicrobial-resistant pathogens associated with healthcare-associated infections: summary of data reported to the National Healthcare Safety Network at the Centers for Disease Control and Prevention, 2009–2010 // *Infect Control HospEpidemiol.* 2013. Vol. 34. P. 1–14.
27. Römling, U., Kjelleberg, S., Normark, S., Nyman, L., Uhlin, B. E., Åkerlund, B. Microbial biofilm formation: a need to act // *J Intern Med.* 2014. Vol. 276. № 2. P. 98-110.
28. Costerton, J. W., Stewart, P. S., Greenberg, E. P. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections // *Science.* 1999. Vol. 284. № 5418. P. 1318-1322.
29. Flemming, H. C., Wingender, J. The biofilm matrix // *Nat Rev Microbiol.* 2010. Vol. 8. № 9. P. 623-633.
30. Patti, J. M., Allen, B. L., McGavin, M. J., Höök, M. MSCRAMM-mediated adherence of microorganisms to host tissues // *Annu Rev Microbiol.* 1994. Vol. 48. P. 585–617.
31. Foster, T. J., Geoghegan, J. A., Ganesh, V. K., Höök, M. Adhesion, invasion and evasion: the many functions of the surface proteins of *Staphylococcus aureus* // *Nat Rev Microbiol.* 2014. Vol. 12. № 1. 49-62.
32. Davis, S. L., Gurusiddappa, S., McCrea, K. W. Perkins, S., Höök, M. SdrG, afibrinogen-binding bacterial adhesion of the microbial surface components recognizing adhesive matrix molecules subfamily from *Staphylococcus epidermidis*, targets the thrombin cleavage site in the B betachain // *JBiolChem.* 2001. Vol. 276. P. 27799–27805.
33. Ponnuraj, K., Bowden, M. G., Davis, S., Gurusiddappa, S., Moore, D., Choe, D., Xu, Y., Hook, M., Narayana, S. V. A “dock, lock, and latch” structural model for a staphylococcal adhesin binding to fibrinogen // *Cell.* 2003. Vol.

115. P. 217–228.
34. Nilsson, M., Frykberg, L., Flock, J. I., Pei, L., Lindberg, M., Guss, B. A fibrinogen-binding protein of *Staphylococcus epidermidis* // *Infect Immun.* 1998. Vol. 66. P. 2666-2673.
35. Hussain, M., Herrmann, M., von Eiff, C., Perdreau-Remington, F., Peters, G. A 140-kilodalton extracellular protein is essential for the accumulation of *Staphylococcus epidermidis* strains on surfaces // *Infect Immun.* 1997. Vol. 65. P. 519–524.
36. Banner, M. A., Cunniffe, J. G., Macintosh, R. L. et al. Localized tufts of fibrils on *Staphylococcus epidermidis* NCTC 11047 are comprised of the accumulation-associated protein // *J Bacteriol.* 2007. Vol. 189. P. 2793–2804.
37. Conrady, D. G., Brescia, C. C., Horii, K., Weiss, A. A., Hassett, D. J., Herr, A. B. Azincdependent adhesion module is responsible for *Staphylococcus epidermidis* Pathogenesis 28 intercellular adhesion in staphylococcal biofilms // *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008. Vol. 105. P. 19456–19461.
38. Williams, R. J., Henderson, B., Sharp, L. J., Nair, S. P. Identification of a Fibronectin-Binding Protein from *Staphylococcus epidermidis* // *Infect Immun.* 2002. Vol. 70. P. 6805-6810.
39. Arrecubieta, C., Lee, M. H., Macey, A. et al. SdrF, a *Staphylococcus epidermidis* surface protein, binds type I collagen // *J Biol Chem.* 2007. Vol. 282. P. 18767–18776.
40. Fey P. D. (ed). *Staphylococcus epidermidis* Methods and Protocols // Springer Science+Business Media. 2014. Vol. 1106.
41. Gerke, C., Kraft, A., Süssmuth, R., Schweitzer, O., Götz, F. Characterization of the N-acetylglucosaminyl transferase activity involved in the biosynthesis of the *Staphylococcus epidermidis* polysaccharide intercellular adhesion // *J Biol Chem.* 1998. Vol. 273. № 29. P. 18586-93.
42. Vuong, C., Kocianova, S., Voyich, J. M., Yao, Y., Fischer, E. R., DeLeo, F. R., Otto, M. A crucial role for exopolysaccharide modification in bacterial

- biofilm formation, immune evasion, and virulence // *JBiolChem*. 2004. Vol. 279. P. 54881–54886.
- 43.Kogan, G., Sadovskaya, I., Chaignon, P., Chokr, A., Jabbouri, S. Biofilms of clinical strains of *Staphylococcus* that do not contain polysaccharide intercellular adhesion // *FEMS Microbiol Lett*. 2006. Vol. 255. P.11–16.
- 44.Kogan, G., Sadovskaya, I., Conrady, D. G., Brescia, C. C., Horii, K., Weiss, A. A., Hassett, D. J, Herr, A. B. A zinc- intercellular adhesionin staphylococcal biofilms // *ProcNatlAcadSci U S A*. 2008. Vol. 105. P. 19456–19461.
- 45.Novick, R. P., Geisinger, E. Quorum sensing in staphylococci // *Annu Rev Genet*. 2008. Vol. 42. P. 541-564.
- 46.Vuong, C., Götz, F., Otto, M. Construction and characterization of an agr deletion mutant of *Staphylococcus epidermidis* // *Infect Immun*. 2000. Vol. 68. № 3. P. 1048-1053.
- 47.Cook, L. C., Federle, M. J. Peptide pheromone signaling in *Streptococcus* and *Enterococcus* // *FEMS Microbiol Rev*. 2014. Vol. 38. № 3. P.473-492.
- 48.Crass, B. A., Bergdoll, M. S. Involvement of coagulase-negative staphylococci in toxic shock syndrome // *J ClinMicrobiol*. 1986. Vol. 23. № 1. P. 43-45.
- 49.Valle, J., Vadillo, S., Piriz, S., Gomez-Lucia, E. Detection of antibodies to staphylococcal enterotoxins in the serum and milk of healthy goats // *FEMS Microbiol. Immunol*. 1991. Vol. 3. P. 53–58.
- 50.da Cunha, M. de L., Calsolari, R. A., Júnior, J. P. Detection of enterotoxin and toxic shock syndrome toxin 1 genes in *Staphylococcus*, with emphasis on coagulase-negative staphylococci // *Microbiol.Immunol*. 2007. Vol. 51. P. 381–390.
- 51.Nemati, M., Hermans, K., Vancraeynest, D., De Vliegheer, S., Sampimon, O. C., Baele, M., De Graef, E. M., Pasmans, F., Haesebrouck, F. Screening of bovine coagulase-negative staphylococci from milk for superantigen-

- encoding genes // *Vet. Rec.* 2008. Vol. 163. P.740–743.
- 52.Park, J. Y., Fox, L. K., Seo, K. S., McGuire, M. A., Park, Y. H., Rurangirwa, F. R., Sicho, W. M., Bohach, G. A. Detection of classical and newly described staphylococcal superantigen genes in coagulase-negative staphylococci isolated from bovine intrammary infections // *Vet Microbiol.* 2011. Vol. 147. P.149-154.
- 53.Hammes, W. P, Hertel, C. New developments in meat starters cultures // *MeatScience.* 1998. Vol. 49. P. 5125–5138.
- 54.Zell, C., Resch, M., Rosenstein, R., Albrecht, T., Hertel, C., Götz, F. Characterization of toxin production of coagulase-negative staphylococci isolated from food and starter cultures // *International Journal of Food Microbiology.* 2008. Vol. 127. P. 246–251.
- 55.Balaban, N., Rasooly, A. Staphylococcal Enterotoxins // *Int. J. FoodMicrobiol.* 2000. Vol. 61. P. 1–10.
- 56.Schlievert, P. M., Bohach, G. A., Ohlendorf, D. H., Stauffacher, C. V., Leung, D. Y., Murray, D. L., Prasad, G. S., Earhart, C. A., Jablonski, L. M., Hoffmann, M. L., Chi, Y. I. Molecular Structure of Staphylococcus and Streptococcus Superantigens // *J. Clin. Immunol.* 1995. Vol. 15. P. 4S–10S.
- 57.Singh, B. R., Fu, F. N., Ledoux, D. N. Crystal and Solution Structures of Superantigenic Staphylococcal Enterotoxins Compared // *Nat. Struct. Biol.* 1994. Vol. 1. P. 358–360.
- 58.Le Loir, Y., Baron, F., Gautier, M. *Staphylococcus aureus* and Food Poisoning // *Genet. Mol. Res.* 2003. Vol. 2. P. 63–76.
- 59.Zhang, S., Iandolo, J. J., Stewart, G. C. The Enterotoxin D Plasmid of *Staphylococcus aureus* Encodes a Second Enterotoxin Determinant (Sej) // *FEMS Microbiol. Lett.* 1998. Vol. 168. P. 227–233.
- 60.Lindsay, J. A., Ruzin, A., Ross, H. F., Kurepina, N., Novick, R. P. The Gene for Toxic Shock Toxin Is Carried by a Family of Mobile Pathogenicity Islands in *Staphylococcus aureus* // *Mol. Microbiol.* 1998. Vol. 29. P. 527–

- 543.
61. Otto, M. Virulence factors of the coagulase- negative staphylococci // *FrontBiosci.* 2004. Vol. 9. P. 841–886.
62. Longshaw, C. M., Farrell, A. M., Wright, J. D., Holland, K. T. Identification of a second lipase gene, *gehD*, in *Staphylococcus epidermidis*: comparison of sequence with those of other staphylococcal lipases // *Microbiology.* 2000. Vol. 146. P. 1419-1427.
63. Simons, J. W., van Kampen, M. D., Riel, S., Götz, F., Egmond, M. R., Verheij, H. M. Cloning, purification and characterisation of the lipase from *Staphylococcus epidermidis*--comparison of the substrate selectivity with those of other microbial lipases // *Eur J Biochem.* 1998. Vol. 253. P. 675-683.
64. Rosenstein, R., Götz, F. Staphylococcal lipases: biochemical and molecular characterization // *Biochimie.* 2000. Vol. 82. P. 1005-1014.
65. Teufel, P., Götz, F. Characterization of an extracellular metalloprotease with elastase activity from *Staphylococcus epidermidis* // *J Bacteriol.* 1993. Vol. 175. P. 4218-4224.
66. Dubin, G., Chmiel, D., Mak, P., Rakwalska, M., Rzychon, M., Dubin, A. Molecular cloning and biochemical characterisation of proteases from *Staphylococcus epidermidis* // *BiolChem.* 2001. Vol. 382. 1575-1582.
67. Moon, J. L., Banbula, A., Oleksy, A., Mayo, J. A., Travis, J. Isolation and characterization of a highly specific serine endopeptidase from an oral strain of *Staphylococcus epidermidis* // *BiolChem.* 2001. Vol. 382. 1095-1099.
68. Ohara-Nemoto, Y., Ikeda, Y., Kobayashi, M., Sasaki, M., Tajika, S., Kimura, S. Characterization and molecular cloning of a glutamylendopeptidase from *Staphylococcus epidermidis* // *MicrobPathog.* 2002. Vol. 33. P. 33-41.
69. Iwase, T., Uehara, Y., Shinji, H., Seo, H., Takada, K., Agata, T., Mizunoe, Y. *Staphylococcus epidermidis* Esp inhibits *Staphylococcus aureus* biofilm formation and nasal colonization // *Nature.* 2010. Vol. 465. P. 346–349.

70. Sugimoto, S., Iwamoto, T., Takada, K., Okuda, K. I., Tajima, A., Iwase, T., Mizunoe, Y. *Staphylococcus epidermidis* Esp degrades specific proteins associated with *Staphylococcus aureus* biofilm formation and host-pathogen interaction // J Bacteriol. 2013. Vol. 195. P. 1645–1655.
71. Caiazza, N. C., O'Toole, G. A. Alpha-toxin is required for biofilm formation by *Staphylococcus aureus* // J Bacteriol. 2003. Vol. 185. № 10. P. 3214-3217.
72. Coelho, S. M. O., Reinoso, E., Pereira, I. A., Soares, L. C., Demo, M., Bogni, C., Souza, M. M. S. Virulence factors and antimicrobial resistance of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis in Rio de Janeiro // Pesq. Vet. Bras. 2009. Vol. 29. P. 369–374.
73. Otto, M. Phenol-soluble modulins // Int J Med Microbiol. 2014. Vol. 304. № 2. P. 164-169.
74. Pinheiro, L., Brito, C. I., de Oliveira, A., Martins, P. Y., Pereira, V. C., da Cunha, M. de L. *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus haemolyticus*: Molecular Detection of Cytotoxin and Enterotoxin Genes // Toxins (Basel). 2015. Vol. 7. № 9. P. 3688-3699.
75. Mehlin, C., Headley, C. M., Klebanoff, S. J. An inflammatory polypeptide complex from *Staphylococcus epidermidis*: isolation and characterization // J. Exp. Med. 1999. Vol. 189. P. 907–918.
76. McKeivitt, A. I., Bjornson, G. L., Mauracher, C. A., Scheifele, D. W. Amino acid sequence of a deltalike toxin from *Staphylococcus epidermidis* // Infect. Immun. 1990. Vol. 58. P. 1473–1475.
77. Yao, Y., Sturdevant, D. E., Otto, M. Genome wide analysis of gene expression in *Staphylococcus epidermidis* biofilms: insights into the pathophysiology of *S. epidermidis* biofilms and the role of phenol-soluble modulins in formation of biofilms // J. Infect. Dis. 2005. Vol. 191. P. 289–298.
78. Tsompanidou, E., Denham, E.L., Becher, D., de Jong, A., Buist, G., van

- Oosten, M., Manson, W.L., Back, J.W., van Dijk, J.M., Dreisbach, A. Distinct roles of phenol-soluble modulins in spreading of *Staphylococcus aureus* on wet surfaces // *Appl. Environ. Microbiol.* 2013. Vol. 79. P. 886–895.
79. Periasamy, S., Joo, H.S., Duong, A.C., Bach, T.H., Tan, V.Y., Chatterjee, S.S., Cheung, G.Y., Otto, M. How *Staphylococcus aureus* biofilms develop their characteristic structure // *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 2012. Vol. 109. P. 1281–1286.
80. Wang, R., Khan, B. A., Cheung, G. Y., Bach, T. H., Jameson-Lee, M., Kong, K. F., Queck, S. Y., Otto, M. *Staphylococcus epidermidis* surfactant peptides promote biofilm maturation and dissemination of biofilm-associated infection in mice // *J. Clin. Invest.* 2011. Vol. 121. P. 238–248.
81. Frenette, M., Beaudet, R., Bisailon, J. G., Sylvestre, M., Portelance, V. Chemical and biological characterization of a gonococcal growth inhibitor produced by *Staphylococcus haemolyticus* isolated from urogenital flora // *Infect Immun.* 1984. Vol. 46. № 2. P. 340-345.
82. Liles, W. C., Thomsen, A. R., O'Mahony, D. S., Klebanoff, S. J. Stimulation of human neutrophils and monocytes by staphylococcal phenol-soluble modulin // *J Leukoc Biol.* 2001. Vol. 70. № 1. P. 96-102.
83. Cheung, G. Y., Duong, A. C., Otto, M. Direct and synergistic hemolysis caused by *Staphylococcus* phenol-soluble modulins: implications for diagnosis and pathogenesis // *Microbes Infect.* 2012. Vol. 14 № 4. P. 380-386.
84. Cheung, G. Y., Rigby, K., Wang, R., Queck, S. Y., Braughton, K. R., Whitney, A. R., Teintze, M., DeLeo, F. R., Otto, M. *Staphylococcus epidermidis* strategies to avoid killing by human neutrophils // *PLoS Pathog.* 2010. Vol. 6. № 10. P. e1001133.
85. Peschel, A., Otto, M. Phenol-soluble modulins and staphylococcal infection // *Nat Rev Microbiol.* 2013. Vol. 11. № 10. P. 667-673.

86. O'Toole, G., Kaplan, H. B., Kolter, R. Biofilm formation as microbial development // *Annu Rev Microbiol.* 2000. Vol. 54. P. 49-79.
87. Queck, S. Y., Jameson-Lee, M., Villaruz, A. E., Bach, T. H., Khan, B. A., Sturdevant, D. E., Ricklefs, S. M., Li, M., Otto, M. Regulated expression of pathogen-associated molecular pattern molecules in *Staphylococcus epidermidis*: quorum-sensing determines pro-inflammatory capacity and production of phenol-soluble modulins // *Mol Cell.* 2008. Vol. 32. № 1. P. 150-158.
88. Vuong, C. Impact of the *agr* quorum-sensing system on adherence to polystyrene in *Staphylococcus aureus* // 2000. Vol. 182. № 6. P. 1688-1693.
89. Vuong, C., Gerke, C., Somerville, G. A., Fischer, E. R., Otto, M. Quorum-sensing control of biofilm factors in *Staphylococcus epidermidis* // *J Infect Dis.* 2003. Vol. 188. № 5. P. 706-718.
90. May, L., Klein, E. Y., Rothman, R. E., Laxminarayan, R. Trends in antibiotic resistance in coagulase-negative staphylococci in the United States, 1999 to 2012 // *Antimicrob Agents Chemother.* 2014. Vol. 58. № 3. P. 1404-1409.
91. Malhas, A. M., Lawton, R., Reidy, M., Nathwani, D., Clift, B. A. Causative organisms in revision total hip & knee arthroplasty for infection: Increasing multi-antibiotic resistance in coagulase-negative *Staphylococcus* and the implications for antibiotic prophylaxis // *Surgeon.* 2015. Vol. 13. № 5. P. 250-255.
92. Giormezis, N., Kolonitsiou, F., Foka, A., Drougka, E., Liakopoulos, A., Makri, A., Papanastasiou, A. D., Vogiatzi, A., Dimitriou, G., Marangos, M., Christofidou, M., Anastassiou, E. D., Petinaki, E., Spiliopoulou, I. Coagulase-negative staphylococcal bloodstream and prosthetic-device-associated infections: the role of biofilm formation and distribution of adhesin and toxin genes // *J Med Microbiol.* 2014. Vol. 63. № 11. P. 1500-1508.
93. Brzywczy-Wloch, M., Borszewska-Kornacka, M., Gulczynska, E.,

- Wojkowska-Mach, J., Sulik, M., Grzebyk, M., Luchter, M., Heczko, P. B., Bulanda, M. Prevalence of antibiotic resistance in multi-drug resistant coagulase-negative staphylococci isolated from invasive infection in very low birth weight neonates in two Polish NICUs // *Ann ClinMicrobiolAntimicrob.* 2013. Vol. 12. P. 41.
94. Diekema, D. J., Pfaller, M. A., Schmitz, F. J., Smayevsky, J., Bell, J., Jones, R. N., Beach, M., SENTRY Participants Group. Survey of infections due to *Staphylococcus* species: frequency of occurrence and antimicrobial susceptibility of isolates collected in the United States, Canada, Latin America, Europe, and the Western Pacific region for the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program, 1997–1999 // *Clinical Infectious Diseases.* 2001. Vol. 32. Suppl. 2. P. 114–132.
95. Del' Alamo, L., Cereda, R. F., Tosin, I., Miranda, E. A., Sader, H. S. Antimicrobial susceptibility of coagulase-negative staphylococci and characterization of isolates with reduced susceptibility to glycopeptides // *Diagn Microbiol Infect Dis.* 1999. Vol. 34. № 3. P. 185-191.
96. Machado, A. B., Reiter, K. C., Paiva, R. M., Barth, A. L. Distribution of staphylococcal cassette chromosome mec (SCCmec) types I, II, III and IV in coagulase-negative staphylococci from patients attending a tertiary hospital in southern Brazil // *Journal of Medical Microbiology.* 2007. Vol. 56. P. 1328–1333.
97. Jamaluddin, T. Z., Kuwahara-Arai, K., Hisata, K., Terasawa, M., Cui, L., Baba, T., Sotozono, C., Kinoshita, S., Ito, T., Hiramatsu, K. Extreme genetic diversity of methicillin-resistant *Staphylococcus epidermidis* strains disseminated among healthy Japanese children // *Journal of Clinical Microbiology.* 2008. Vol. 46. P. 3778–3783.
98. Ruppe', E., Barbier, F., Mesli, Y., Maiga, A., Cojocar, R., Benkhalfat, M., Benchouk, S., Hassaine, H., Maiga, I., Diallo, A., Koumaré, A.K., Ouattara, K., Soumaré, S., Dufourcq, J.B., Nareth, C., Sarthou, J. L., Andremont, A.,

- Ruimy, R. Diversity of staphylococcal cassette chromosome mec structures in methicillin-resistant *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus haemolyticus* strains among outpatients from four countries // *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2009. Vol. 53. P. 442–449.
99. Ibrahem, S., Salmenlinna, S., Virolainen, A., Kerttula, A. M., Lyytikäinen, O., Jägerroos, H., Broas, M., Vuopio-Varkila, J. Carriage of methicillin-resistant staphylococci and their SCCmec types in a long-term-care facility // *Journal of Clinical Microbiology*. 2009. Vol. 47. P. 32–37.
100. Katayama, Y., Ito, T., Hiramatsu, K. A new class of genetic element, staphylococcus cassette chromosome mec, encodes methicillin resistance in *Staphylococcus aureus* // *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2000. Vol. 44. P. 1549–1555.
101. International Working Group on the Classification of Staphylococcal Cassette Chromosome Elements (IWG-SCC). Classification of staphylococcal cassette chromosome mec (SCCmec): guidelines for reporting novel SCCmec elements // *Antimicrob. Agents Chemother.* 2009. Vol. 53. P. 4961–4967.
102. Garza-González, E., Morfín-Otero, R., Llaca-Díaz, J. M., Rodríguez-Noriega, E. Staphylococcal cassette chromosome mec (SCC mec) in methicillin-resistant coagulase-negative staphylococci. A review and the experience in a tertiary-care setting // *Epidemiol Infect.* 2010. Vol. 138. № 5. P. 645-654.
103. Li, S., Skov, R. L., Han, X., Larsen, A. R., Larsen, J., Sørum, M., Wulf, M., Voss, A., Hiramatsu, K., Ito, T. Novel types of staphylococcal cassette chromosome mec elements identified in clonal complex 398 methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains // *Antimicrob. Agents Chemother.* 2011. Vol. 55. № 6. P. 3046–3050.
104. Shore, A. C, Deasy, E. C., Slickers, P., Brennan, G., O’Connell, B., Monecke, S., Ehricht, R., Coleman, D. C. Detection of staphylococcal

- cassette chromosome mec type XI carrying highly divergent *mecA*, *mecI*, *mecR1*, *blaZ*, and *ccr* genes in human clinical isolates of clonal complex 130 methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* // *Antimicrob. Agents Chemother.* 2011. Vol. 55. № 8. P. 3765–3773.
105. The International Working Group on the Classification of Staphylococcal Cassette Chromosome Elements (IWG-SCC). [Электронный ресурс]. URL: <http://www.sccmec.org/>
106. Tewhey, R., Gu, B., Kelesidis, T., Charlton, C., Bobenchik, A., Hindler, J., Schork, N. J., Humphries, R. M. Mechanisms of linezolid resistance among coagulase-negative staphylococci determined by whole-genome sequencing // *MBio.* 2014. Vol. 5. № 3. P. e00894-14.
107. Bender, J., Strommenger, B., Steglich, M., Zimmermann, O., Fenner, I., Lensing, C., Dagwadordsch, U., Kekulé, A. S., Werner, G., Layer, F. J. Linezolid resistance in clinical isolates of *Staphylococcus epidermidis* from German hospitals and characterization of two *cfr*-carrying plasmids // *J Antimicrob Chemother.* 2015. Vol. 70. № 6. P. 1630-1638.
108. Karavasilis, V., Zarkotou, O., Panopoulou, M., Kachrimanidou, M., Themeli-Digalaki, K., Stylianakis, A., Gennimata, V., Ntokou, E., Stathopoulos, C., Tsakris, A., Pournaras, S., Greek Study Group on Staphylococcal Linezolid Resistance. Wide dissemination of linezolid-resistant *Staphylococcus epidermidis* in Greece is associated with a linezolid-dependent ST22 clone // *J Antimicrob Chemother.* 2015. Vol. 70. № 6. P. 1625-1629.
109. O'Connor, C., Powell, J., Finnegan, C., O'Gorman, A., Barrett, S., Hopkins, K.L., Pichon, B., Hill, R., Power, L., Woodford, N., Coffey, J. C., Kearns, A., O'Connell, N. H., Dunne, C. P. Incidence, management and outcomes of the first *cfr*-mediated linezolid-resistant *Staphylococcus epidermidis* outbreak in a tertiary referral centre in the Republic of Ireland // *J Hosp Infect.* 2015. Vol. 90. № 4. P. 316-321.

110. Mah, T. F., O'Toole, G. A. Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents // *Trends Microbiol.* 2001. Vol. 9. P. 34-39.
111. Baird-Parker, A. C. Staphylococci and their classification. // *Ann N Y Acad Sci.* 1965. Vol. 128. № 1. P. 4–25.
112. Kloos, W. E., Schleifer, K. H. Simplified scheme for routine identification of human Staphylococcus species // *J Clin Microbiol.* 1975. Vol. 1. № 1. P. 82–88.
113. Хоулт, Дж. Определитель Берджи//Мир. 1997
114. Zadoks, R. N., Watts, J. L. Species identification of coagulase-negative staphylococci: genotyping is superior to phenotyping // *Vet Microbiol.* 2009. Vol. 134. P. 20–28.
115. Patteet, L, Goossens, H, Ieven, M. Validation of the MicroScan-96 for the species identification and methicillin susceptibility testing of clinical significant coagulase-negative staphylococci // *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2012. Vol. 31. P. 747–751.
116. Becker, K., Harmsen, D., Mellmann, A., Meier, C., Schumann, P., Peters, G., von Eiff, C. Development and Evaluation of a Quality-Controlled Ribosomal Sequence Database for 16S Ribosomal DNA-Based Identification of Staphylococcus Species // *J Clin Microbiol.* 2004. Vol. 42. № 11. P. 4988–4995.
117. Böttger, E. C. Rapid determination of bacterial ribosomal RNA sequences by direct sequencing of enzymatically amplified DNA // *FEMS Microbiol Lett.* 1989. Vol. 53. № 1-2. P. 171-176.
118. Kolbert, C. P., Persing, D. H. Ribosomal DNA sequencing as a tool for identification of bacterial pathogens // *Curr Opin Microbiol.* 1999. Vol. 2. № 3. P. 299-305.
119. Woese, C. R., Stackebrandt, E., Macke, T. J., Fox, G. E. A phylogenetic definition of the major eubacterial taxa // *Syst Appl Microbiol.* 1985. Vol. 6. P. 143-151.

120. Clarridge, J. E. Impact of 16S Rna Gene Sequence Analysis for Identification of Bacteria on Clinical Microbiology and Infectious Diseases // *Clin Microbiol Rev.* 2004. Vol. 17. № 4. P. 840–862.
121. Petrás, P. *Staphylococcus pulvereri* = *Staphylococcus vitulus*? // *Int J SystBacteriol.* 1998. Vol. 48. № 2. P. 617-618.
122. Ghebremedhin, B., Layer, F., König, W., König, B. Genetic classification and distinguishing of *Staphylococcus* species based on different partial gap, 16S rRNA, hsp60, rpoB, sodA, and tuf gene sequences // *J ClinMicrobiol.* 2008. Vol. 46. № 3. P. 1019-1025.
123. Martineau, F., Picard, F. J., Ke, D., Paradis, S., Roy, P. H., Ouellette, M., Bergeron, M. G. Development of a PCR assay for identification of staphylococci at genus and species levels // *J ClinMicrobiol.* 2001. Vol. 39. № 7. P. 2541-2547.
124. Carbonnelle, E., Beretti, J. L., Cottyn, S., Quesne, G., Berche, P., Nassif, X., Ferroni, A. Rapid Identification of *Staphylococci* Isolated in Clinical Microbiology Laboratories by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry // *J ClinMicrobiol.* 2007. Vol. 45. № 7. P. 2156–2161.
125. Dubois, D., Leysse, D., Chacornac, J. P, Kostrzewa, M., Schmit, P. O., Talon, R., Bonnet, R., Delmas, J. Identification of a variety of *Staphylococcus* species by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry // *J ClinMicrobiol.* 2010. Vol. 48. № 3. P. 941-945.
126. Dupont, C., Sivadon-Tardy, V., Bille, E., Dauphin, B., Beretti, J. L., Alvarez, A. S., Degand, N., Ferroni, A., Rottman, M., Herrmann, J. L., Nassif, X., Ronco E., Carbonnelle, E. Identification of clinical coagulase-negative staphylococci, isolated in microbiology laboratories, by matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight mass spectrometry and two automated systems // *ClinMicrobiol Infect.* 2010. Vol. 16. № 7. P. 998-1004.

127. Loonen, A. J., Jansz, A. R., Bergland, J. N., Valkenburg, M., Wolffs, P. F., van den Brule, A. J. Comparative study using phenotypic, genotypic, and proteomics methods for identification of coagulase-negative staphylococci // *J Clin Microbiol.* 2012. Vol. 50. № 4. P. 1437-1439.
128. Argemi, X., Riegel, P., Lavigne, T., Lefebvre, N., Grandpré, N., Hansmann, Y., Jaulhac, B., Prévost, G., Schramm, F. Implementation of MALDI-TOF MS in routine clinical laboratories improves identification of coagulase negative staphylococci and reveals the pathogenic role of *Staphylococcus lugdunensis* // *J Clin Microbiol.* 2015. Vol. 53. № 7. P. 2030-2036.
129. Anhalt, J. P., Fenselau, C. Identification of bacteria using mass-spectrometry // *Anal Chem.* 1975. Vol. 47. P. 219-225.
130. Ryzhov, V., Fenselau, C. Characterization of the protein subset desorbed by MALDI from whole bacterial cells // *Anal Chem.* 2001. Vol. 73. № 4. P. 746-750.
131. Cavanagh, J. P., Klingenberg, C., Hanssen, A. M., Fredheim, E. A., Francois, P., Schrenzel, J., Flægstad, T., Sollid, J. E. Core genome conservation of *Staphylococcus haemolyticus* limits sequence based population structure analysis // *J Microbiol Methods.* 2012. Vol. 89. № 3. P. 159-166.
132. Pate, M., Zdovc, I., Avberšek, J., Očepek, M., Pengov, A., Podpečan, O. Coagulase-negative staphylococci from non-mastitic bovine mammary gland: characterization of *Staphylococcus chromogenes* and *Staphylococcus haemolyticus* by antibiotic susceptibility testing and pulsed-field gel electrophoresis // *J Dairy Res.* 2012. Vol. 79. № 2. P. 129-134.
133. Raimundo, O., Heussler, H., Bruhn, J. B., Suntrarachun, S., Kelly, N., Deighton, M. A., Garland, S. M. Molecular epidemiology of coagulase-negative staphylococcal bacteraemia in a newborn intensive care unit // *J Hosp Infect.* 2002. Vol. 51. № 1. P. 33-42.

134. Thomas, J. C., Vargas, M. R., Miragaia, M., Peacock, S. J., Archer, G. L., Enright, M. C. Improved Multilocus Sequence Typing Scheme for *Staphylococcus epidermidis* // J Clin Microbiol. 2007. Vol. 45. № 2. P. 616-619.
135. Wang, X. M., Noble, L., Kreiswirth, B. N., Eisner, W., McClements, W., Jansen, K. U., Anderson, A. S. Evaluation of a multilocus sequence typing system for *Staphylococcus epidermidis* // J Med Microbiol. 2003. Vol. 52. № 11. P. 989-998.
136. Wisplinghoff, H., Rosato, A. E., Enright, M. C., Noto, M., Craig Wand Archer, G. L. Related clones containing SCCmec type IV predominate among clinically significant *Staphylococcus epidermidis* isolates // Antimicrob Agents Chemother. 2003. Vol. 47. № 11. P. 3574-3579.
137. Multilocus sequence typing of *Staphylococcus aureus*. [Электронный ресурс]. URL: <http://saureus.mlst.net/>
138. Multilocus sequence typing of *Staphylococcus epidermidis*. [Электронный ресурс]. URL: <http://sepidermidis.mlst.net/>
139. Mendes, R. E., Deshpande, L. M., Costello, A. J., Farrell, D. J. Molecular Epidemiology of *Staphylococcus epidermidis* Clinical Isolates from U.S Hospitals // Antimicrob Agents Chemother. 2012. Vol. 56. № 9. P. 4656–4661.
140. Li, M., Wang, X., Gao, Q., Lu, Y. Molecular characterization of *Staphylococcus epidermidis* strains isolated from a teaching hospital in Shanghai, China // J Med Microbiol. 2009. Vol. 58. № 4. P. 456-461.
141. Bryant, J., Chewapreecha, C., Bentley, S. D. Developing insights into the mechanisms of evolution of bacterial pathogens from whole-genome sequences // Future Microbiol. 2012. Vol. 7. № 11. P. 1283-1296.
142. Chua, K. Y., Howden, B. P., Jiang, J. H., Stinear, T., Peleg, A. Y. Population genetics and the evolution of virulence in *Staphylococcus aureus* // Nat Rev Genet. 2014. Vol. 15. № 5. P. 307-320.

143. Gilchrist, C. A., Turner, S. D., Riley, M. F., Petri, W. A. Jr, Hewlett, E. L. Whole-Genome Sequencing in Outbreak Analysis // *ClinMicrobiol Rev.* 2015. Vol. 28 № 3. P. 541-563.
144. Carvalhais, V., França, A., Cerca, F., Vitorino, R., Pier, G. B., Vilanova, M., Cerca, N. Dormancy within *Staphylococcus epidermidis* biofilms: a transcriptomic analysis by RNA-seq // *ApplMicrobiolBiotechnol.* 2014. Vol. 98. № 6. P. 2585-2596.
145. França, A., Carvalhais, V., Maira-Litrán, T., Vilanova, M., Cerca, N., Pier, G. Alterations in the *Staphylococcus epidermidis* biofilm transcriptome following interaction with whole human blood // *PathogDis.* 2014. Vol. 70. № 3. P. 444-448.
146. Carvalhais, V., França, A., Pier, G. B., Vilanova, M., Cerca, N., Vitorino, R. Comparative proteomic and transcriptomic profile of *Staphylococcus epidermidis* biofilms grown in glucose-enriched medium // *Talanta.* 2015. Vol. 132. P.705-712.
147. Cordwell, S. J., Larsen, M. R., Cole, R. T., Walsh, B. J. Comparative proteomics of *Staphylococcus aureus* and the response of methicillin-resistant and methicillin-sensitive strains to Triton X-100 // *Microbiology.* 2002. Vol. 148. № 9. P. 2765-2781.
148. Nandakumar, R., Nandakumar, M. P., Marten, M. R., Ross, J. M. Proteome analysis of membrane and cell wall associated proteins from *Staphylococcus aureus* // *J Proteome Res.* 2005. Vol. 4 № 2. P. 250-257.
149. Resch, A., Leicht, S., Saric, M., Pásztor, L., Jakob, A., Götz, F., Nordheim, A. Comparative proteome analysis of *Staphylococcus aureus* biofilm and planktonic cells and correlation with transcriptome profiling // *Proteomics.* 2006. Vol. 6. № 6. P. 1867-1877.
150. Picotti, P., Bodenmiller, B., Mueller, L. N., Domon, B., Aebersold, R. Full dynamic range proteome analysis of *S. cerevisiae* by targeted proteomics // *Cell.* 2009. Vol. 138. № 4. P. 795-806.

151. Solis, N., Parker, B. L., Kwong, S. M., Robinson, G., Firth, N., Cordwell, S. J. *Staphylococcus aureus* surface proteins involved in adaptation to oxacillin identified using a novel cell shaving approach // *J Proteome Res.* 2014. Vol. 13. № 6. P. 2954-2972.
152. Islam, N., Kim, Y., Ross, J. M., Marten, M. R. Proteomic analysis of *Staphylococcus aureus* biofilm cells grown under physiologically relevant fluid shear stress conditions // *Proteome Sci.* 2014. Vol. 12. P. 21.
153. McFarland, J. Nephelometer; an instrument for estimating the number of bacteria in suspensions used for calculating the opsonic index and for vaccines // *Journal of American Medical Association.* 1907. Vol. 14. P. 1176-1178.
154. Sambrook, J., Fritsch, E. F., Maniatis, T. *Molecular cloning: a laboratory manual*, 2nd ed. // Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989.
155. Воронина, О. Л., Кунда, М. С., Дмитренко, О. А., Лунин, В. Г., Гинцбург, А. Л. Разработка схемы мультилокусного секвенирования // *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии.* 2011. Т. 5. С. 62-67.
156. GenBank® [Электронный ресурс]. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank>
157. Basic Local Alignment Search Tool. [Электронный ресурс]. URL: <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>
158. Molecular Evolutionary Genetics Analysis. [Электронный ресурс]. URL: <http://www.megasoftware.net>
159. eBURST: inferring patterns of evolutionary descent among clusters of related bacterial genotypes from multilocus sequence typing data. [Электронный ресурс]. URL: http://eburst.mlst.net/v3/enter_data/single/
160. Sequence Type Analysis and Recombinational Tests Version 2. [Электронный ресурс]. URL: <http://pubmlst.org/software/analysis/start2/>

161. Hunter, P. R., Gaston, M. A. Numerical index of the discriminatory ability of typing systems: an application of Simpson's index of diversity // *J Clin Microbiol*. 1988. Vol. 26. № 11. P. 2465-2466.
162. van Belkum, A., Tassios, P. T., Dijkshoorn, L., Haeggman, S., Cookson, B., Fry, N. K., Fussing, V., Green, J., Feil, E., Gerner-Smidt, P., Brisse, S., Struelens, M. Guidelines for the validation and application of typing methods for use in bacterial epidemiology // *Clin Microbiol Infect*. 2007. Vol. 13. P. 1-46.
163. Pathosystems Resource Integration Center. [Электронный ресурс]. URL: <https://www.patricbrc.org/portal/portal/patric/Home>
164. The virulence factor database. [Электронный ресурс]. URL: www.mgc.ac.cn/VFs/
165. Virulence factor. [Электронный ресурс]. URL: www.phidias.us/victors/
166. SUPERFAMILY. [Электронный ресурс]. URL: <http://supfam.org/SUPERFAMILY/index.html>
167. Остерман, Л.А. Методы исследования белков и нуклеиновых кислот: Электрофорез и ультрацентрифугирование (практическое пособие) // Наука. 1981. С. 288.
168. PSORTdbt. [Электронный ресурс]. URL: <http://db.psort.org/>
169. DOGAN [Электронный ресурс]. URL: <http://www.bio.nite.go.jp/dogan/ortholog/view/>
170. Miragaia, M., Thomas, J. C., Couto, I., Enright, M. C., de Lencastre, H. Inferring a Population Structure for *Staphylococcus epidermidis* from Multilocus Sequence Typing Data // *Journal of Bacteriology*. 2007. Vol. 189. № 6. P. 2540–2552.
171. Craft, A., Finer, N. Nosocomial coagulase negative staphylococcal (CoNS) catheter-related sepsis in preterm infants: definition, diagnosis, prophylaxis, and prevention // *J. Perinatol*. 2001. Vol. 26. P. 186-192.

172. Bansal, S., Jain, A., Agarwal, J., Malik, G. K. Significance of coagulase negative staphylococci in neonates with late onset septicemia // *Indian J Pathol Microbiol.* 2004. Vol. 47. P. 586-588.
173. Lazarevic, V., Soldo, B., Düsterhöft, A., Hilbert, H., Mauël, C., Karamata, D. Introns and intein coding sequence in the ribonucleotide reductase genes of *Bacillus subtilis* temperate bacteriophage SPbeta // *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998. Vol. 95. № 4. P. 1692-1697.
174. Deghorain, M., Bobay, L. M., Smeesters, P. R., Bousbata, S., Vermeersch, M., Perez-Morga, D., Dreze, P. A., Rocha, E. P., Touchon, M., Van Melderen, L. Characterization of novel phages isolated in coagulase-negative staphylococci reveals evolutionary relationships with *Staphylococcus aureus* phages // *J. Bacteriol.* 2012. Vol. 194. P. 5829–5839.
175. Sugai, M., Fujiwara, T., Akiyama, T., Ohara, M., Komatsuzawa, H., Inoue, S, Suginaka, H. Purification and molecular characterization of glycylglycine endopeptidase produced by *Staphylococcus capitis* EPK1 // *J Bacteriol.* 1997. Vol. 179. № 4. P. 1193-1202.
176. Łoś, M., Węgrzyn, G. Pseudolysogeny // *Adv Virus Res.* 2012. Vol. 82 P. 339-349.
177. Kutter, E., Kellenberger, E., Carlson, K., Eddy, S., Neitzel, J., Messinger, L., North, J., Guttman, B. Effects of bacterial growth condition and physiology on T4 infection / In “Molecular Biology of Bacteriophage T4” (J. D. Karam, ed.) // *American Society for Microbiology.* 1994. P. 406–418.
178. Los, M., Węgrzyn, G., Neubauer, P. A role for bacteriophage T4 rI gene function in the control of phage development during pseudolysogeny and in slowly growing host cells // *Res Microbiol.* 2003. Vol.154. № 8. P. 547-552.
179. Grice, E. A., Kong, H. H., Conlan, S., Deming, C. B., Davis, J.,

- Young, A. C., NISC Comparative Sequencing Program, Bouffard, G. G., Blakesley R. W., Murray P. R., Green, E. D., Turner, M. L., Segre, J.A. Topographical and temporal diversity of the human skin microbiome // Science. 2009. Vol. 324. P. 1190-1192.
180. al-Salem, A.H., Qaisaruddin, S., Qureshi, S.S. Perianal abscess and fistulain ano in infancy and childhood: a clinicopathological study // Pediatr Pathol Lab Med. 1996. Vol. 16. № 5. P. 755-764.
181. Koukourakis, M. I., Giatromanolaki, A., Sivridis, E., Gatter, K.C., Trarbach, T., Folprecht, G., et al. Prognostic and predictive role of lactate dehydrogenase 5 expression in colorectal cancer patients treated with PTK787/ZK 222584 (vatalanib) antiangiogenic therapy // Clin Cancer Res. 2011. Vol. 17. № 14. P. 4892-4900.
182. Chan, F. K., Moriwaki, K., De Rosa, M. J. Detection of necrosis by release of lactate dehydrogenase activity // Methods Mol Biol. 2013. Vol. 979. P. 65-70.
183. Yang, Z., Bielawski, J. P. Statistical methods for detecting molecular adaptation // Trends Ecol Evol. 2000. Vol. 15. P. 496–503.
184. Корниенко, М. А., Ильина, Е. Н., Боровская, А. Д., Эдельштейн, М. В., Сухорукова, М. В., Кострцева, М., Говорун, В. М. Штаммовая классификация *Staphylococcus aureus* посредством прямого масс-спектрометрического профилирования // Биомедицинская химия. 2012. Т. 58. № 5. С. 501-513.
185. Arnold, R. J., Reilly, J. P. Fingerprint matching of *E. coli* strains with matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry of whole cells using a modified correlation approach // Rapid Commun Mass Spectrom. 1998. Vol. 12. № 10. P. 630-636.
186. The Universal Protein Resource. [Электронный ресурс]. URL: <http://www.uniprot.org/>
187. Jeong, S.T., Kim, H.K., Kim, S.J., Pan, J.G., Oh, T.K., Ryu, S.E.

Crystallization and preliminary X-ray analysis of a thermoalkalophilic lipase from *Bacillus stearothermophilus* L1 // Acta Crystallogr D Biol Crystallogr. 2001. V. 57. № 9. P. 1300-1302.