

# Вариабельность генов рекомбиназ и *mecA* стафилококковой хромосомной кассеты *Staphylococcus haemolyticus*

А. В. ПОЛОНСКАЯ<sup>1</sup>, \*М. А. КОРНИЕНКО<sup>1</sup>, А. И. МАНОЛОВ<sup>1</sup>, Н. С. КУПЦОВ<sup>1</sup>, Г. Б. СМИРНОВ<sup>1</sup>,  
Л. А. ЛЮБАСОВСКАЯ<sup>2</sup>, Т. В. ПРИПУТНЕВИЧ<sup>2</sup>, Е. А. ШИТИКОВ<sup>1</sup>, Е. Н. ИЛЬИНА<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины ФМБА, Москва

<sup>2</sup> Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии им. академика В. И. Кулакова, Москва

## Variability of Recombinase Genes and Staphylococcal Cassette Chromosome *mecA* of *Staphylococcus Haemolyticus*

A. V. POLONSKAYA<sup>1</sup>, \*M. A. KORNIENKO<sup>1</sup>, A. I. MANOLOV<sup>1</sup>, N. S. KUPTSOV<sup>1</sup>, G. B. SMIRNOV<sup>1</sup>,  
L. A. LYUBASOVSKAYA<sup>2</sup>, T. V. PRIPUTNEVICH<sup>2</sup>, E. A. SHITIKOV<sup>1</sup>, E. N. ILINA<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Federal Research & Clinical Center of Physical-Chemical Medicine of Federal Medical Biological Agency, Moscow

<sup>2</sup> National Medical Research Center for Obstetrics, Gynecology and Perinatology named after Academician V. I. Kulakova, Moscow

Коагулазо-отрицательные стафилококки (КОС), в частности *Staphylococcus haemolyticus*, играют важнейшую роль в этиологии внутрибольничных инфекций. Большинство КОС обладают устойчивостью к бета-лактамным антибиотикам, которая реализуется за счёт продукции второго пенициллин-связывающего белка. Этот белок кодируется геном *mecA* и, совместно с генами рекомбиназ (*ccr*), входит в состав мобильного элемента стафилококков — стафилококковой хромосомной кассеты. В ходе исследования на коллекции из 142 геномов *S. haemolyticus* проведён анализ генов *mecA* и *ccr*. Ген *mecA* был выявлен в 117 геномах (82,4%) и обладал выраженной консервативностью. На основании анализа последовательностей генов рекомбиназ установлено, что 118 образцов (83%) содержат *ccr*, причём описано 22 различных сочетания наличия гена *mecA* и генов рекомбиназ. Наиболее распространённым вариантом для *S. haemolyticus* явилось сочетание *ccrA4B4* (25%). Для оценки вариабельности генов рекомбиназ предложены типо-специфические праймеры, работа которых была validated на 54 клинических изолятах.

**Ключевые слова:** коагулазо-отрицательные стафилококки, *S. haemolyticus*, SCCmec, устойчивость к β-лактамным антибиотикам

Coagulase-negative staphylococci (CNS), in particular *Staphylococcus haemolyticus*, play an important role in the etiology of nosocomial infections. Most CNS are resistant to beta-lactam antibiotics, which is realized through the production of the second penicillin-binding protein. This protein is encoded by the *mecA* gene and, together with the genes of recombinases (*ccr*), is part of the mobile element of staphylococci — the staphylococcal cassette chromosome. During the study, the *mecA* and *ccr* genes were analyzed using a collection of 142 genomes of *S. haemolyticus*. The *mecA* gene was detected in 117 genomes (82.4%) and had a pronounced conservation. Based on the analysis of recombinase gene sequences, it was established that 118 samples (83%) contain *ccr*, and 22 different combinations of the *mecA* and recombinase genes presence are described. The combination of *ccrA4B4* was the most common for *S. haemolyticus* (25%). Type-specific primers were proposed, to assess the variability of recombinase genes, their performance was validated on 54 clinical isolates.

**Keywords:** coagulase-negative staphylococci, *S. haemolyticus*, SCCmec, resistance to β-lactam antibiotics

## Введение

Стафилококковая инфекция занимает одну из лидирующих позиций по частоте встречаемости в медицинской практике. При этом в последнее время наблюдается тенденция к возрастанию роли условно-патогенных коагулазо-отрицательных стафилококков (КОС), а именно *S. haemolyticus*, *S. epidermidis*, *S. warneri*, в развитии внутрибольничных инфекций. КОС являются возбуди-

телями около 30% случаев внутрибольничных инфекций кровотока, ассоциированных с использованием катетеров [1], их выявляют у 30% пациентов хирургических стационаров [2] и неонатальных отделений [3].

Препаратами выбора при лечении стафилококковых инфекций являются β-лактамные антибиотики (БЛА) [4, 5]. Мишень их действия — участвующие в синтезе пептидогликана карбокси- и транспептидазы, известные также как пенициллин-связывающие белки (ПСБ). Связывание БЛА с ПСБ ведёт к инактивации ферментативной активности последних, прекращению роста и после-

© Коллектив авторов, 2018

Адрес для корреспонденции: 119435, Москва, ул. Малая Пироговская, д. 1а. ФНКЦ ФМБА

дующей гибели микробной клетки. Уровень активности конкретных БЛА в отношении отдельных микроорганизмов в первую очередь определяется аффинностью этих антибиотиков к ПСБ [6].

Повсеместное использование БЛА привело к увеличению числа микроорганизмов, устойчивых к действию этих антибиотиков. Большинство изолятов КОС (70–90%) устойчивы к метициллину и всем  $\beta$ -лактамным антибиотикам, тогда как у *S.aureus* таковыми являются только 20–30% изолятов [7]. Устойчивость стафилококков к этим антибиотикам обусловлена продукцией второго пенициллин-связывающего белка (PBP2a/ПСБ2а или PBP2'/ПСБ2')[8]. Белок ПСБ2а, так же как и ПСБ, относится к классу транспептидаз и участвует в синтезе пептидогликана клеточной стенки стафилококков, при этом он имеет низкую аффинность к большинству полусинтетических пенициллинов и цефалоспоринов, продолжая функционировать в присутствии  $\beta$ -лактамных антибиотиков, нивелируя их действие.

ПСБ2а кодируется геном *mecA*, входящим в состав мобильного элемента — стафилококковой хромосомной кассеты (от англ. *Staphylococcal cassette chromosome elements*) (*SCCmec*). Основными компонентами *SCCmec* являются *mec*-комплекс и *ccr*-комплекс, а также дополнительный регион, так называемый J-участок. *Mec*-комплекс включает ген *mecA*, интактные или поврежденные регуляторные гены *mecR1* и *mecI*, а также инсерционные последовательности IS431 и/или IS1272. *Ccr*-комплекс кодирует рекомбиназы, которые обеспечивают мобильность кассеты. Остальная часть кассеты представлена J-участками (J1, J2, J3), которые расположены по бокам и между комплексами *mec* и *ccr*, могут содержать различные гены устойчивости к тяжёлым металлам и бета-лактамным антибиотикам и псевдогены, которые не несут каких-либо значимых функций для клеток [10].

На данный момент описано три типа генов *ccr*: А, В и С. Каждый из трёх типов имеет несколько аллотипов. Считается, что если *ccr* гены обнаруживают менее 50% гомологии между собой, то они будут относиться к разным типам, а если их идентичность находится в пределах 50–85%, то к одному типу, но разным аллотипам [9].

Существуют *SCCmec*, не включающие ген *mecA* (псевдо *SCCmec*), но обладающие общими характеристиками *SCCmec*: наличием *ccr* генов (*ccrAB* или *ccrC*) и присутствием фланкирующих повторов, содержащих инсерционные последовательности [10].

Стафилококковые хромосомные кассеты активно используются для типирования стафилококков [11, 12], так как показано, что именно эта разновидность типирования наиболее подходит для исследования локальной эпидемиологии (для

оценки эпидемиологической ситуации по проблемным микроорганизмам в конкретном стационаре: определение родства микроорганизмов, установление источника инфекции, путей распространения микроорганизмов, исследования локальных вспышек).

Схема типирования *SCCmec S.aureus* заключается в определении типов *mec*-комплекса, типов и аллотипов *ccr*-комплекса при помощи амплификации со специфическими к каждому из элементов этих комплексов праймерами. На сегодняшний день описано 12 типов *SCCmec*, при этом новые типы выявляют ежегодно [13, 14].

После того, как *SCCmec* были обнаружены у других видов стафилококков, например, у гемолитического и эпидермального, ранее разработанную схему стали применять и для типирования этих видов. Проблема такого подхода заключается в том, что, как показали исследования последних лет, у КОС *SCCmec* имеет более вариабельное строение [14]. В связи с этим схема типирования, разработанная для *S.aureus*, не отражает в полной мере особенности *SCCmec* коагулазо-отрицательных стафилококков, в том числе *S.haemolyticus*.

В рамках данной работы проведён анализ генов *SCCmec S.haemolyticus*: установлена вариабельность гена *mecA*, выявлены основные типы рекомбиназ, а также предложена схема типирования рекомбиназ *S.haemolyticus*.

## Материал и методы

**Бактериальные изоляты.** В исследование была включена коллекция из 54 клинических изолятов *S.haemolyticus*. Образцы получены из ФГБУ «Научный центр акушерства, гинекологии и перинатологии им. академика В. И. Кулакова» (38 изолятов), Смоленского государственного медицинского университета (НИИ Антимикробной химиотерапии) (7 изолятов) и Ульяновского государственного технического университета (9 изолятов). Чистые бактериальные культуры были выделены из клинического материала (кала, крови, мочи, ликвора, склеров из зева, бронхоальвеолярного аспираата, отделяемого конъюнктивы, с повреждённой кожей, асцитической и плевральной жидкости, аутопсийного материала) путём пересева бактериальных клеток на питательную среду (5% кровяной агар, Oxoid). Для всех последующих манипуляций культивирование стафилококков проводили в триpton-соевом бульоне (Tryptic Soy Broth, Oxoid) при 37°C в аэробных условиях. Для видовой идентификации микроорганизмов использовали метод прямого масс-спектрометрического профилирования бактериального лизата [15].

**Геномные последовательности.** В работе использовали данные полногеномного секвенирования 168 образцов *S.haemolyticus*, представленных в базе данных NCBI (BioProjects: PRJEB2655 и PRJNA267549). Изоляты выделены из образцов крови человека, с раневых поверхностей, центральных венозных катетеров и др.

Кроме того, в рамках данной работы получены полногеномные последовательности трёх изолятов *S.haemolyticus* (SH527, SH39 и SH864-1) методом 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. Аннотированные последовательности изолятов представлены в базе данных NCBI под номерами JRAW00000000, JRAY00000000 и JRAX00000000.

Для подтверждения видовой принадлежности бактериальных геномов из базы NCBI использовали модуль таксономической классификации на основании уникальных видоспецифичных маркеров MetaPhlAn [16].

**Биоинформационные методы анализа полногеномных данных.** Сборка коротких геномных прочтений в контиги проведена при помощи алгоритма runAssembly (лаборатория биоинформатики, ФГБУ ФНКЦ физико-химической медицины ФМБА).

Множественное выравнивание нуклеотидных последовательностей и построение филогенетических деревьев проводили с использованием методов Parsimony и Distance программного обеспечения Seaview, version 4.6.1 [17] и Vector NTI 9.0 (Informax Inc, США).

Тип рекомбиназы определяли, сопоставляя нуклеотидные последовательности анализируемых рекомбиназ и нуклеотидные последовательности референсных рекомбиназ каждого типа (A1, A2, A3, A4, B1, B2, B3, B4, C), представленные на информационном ресурсе <http://www.staphylococcus.net/>.

Поиск определённых генов и белков осуществляли консольными алгоритмами Prokka [18] и BLAST [blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi].

Поиск однонуклеотидных полиморфизмов в гене *mecA* проводили алгоритмом VarScan [19]. В качестве референса использовался ген *mecA* *S.haemolyticus* штамма JCSC1435 (AP006716.1).

**Молекулярно-генетические методы.** Для выделения ДНК из бактериальных культур использовали набор «ДНК-экспресс» (ООО НПФ Литех, Россия) в соответствии с прилагаемыми инструкциями. Пробы ДНК хранились при -20°C.

Детекцию гена *mecA*, а также генов рекомбиназ стафилококковой кассеты осуществляли методом амплификации соответствующих генов. Для детекции *mecA* *S.haemolyticus* использовали стандартные праймеры [<http://www.staphylococcus.net/>]. Подбор праймеров для типирования рекомбиназ SCCmec *S.haemolyticus* осуществляли с помощью программного обеспечения Oligo MFC Application (Molecular Biology Insights, Inc., 6.3.1.1) (табл. 1). Подобранные праймеры были протестированы с помощью виртуальной ПЦР, реализованной сервисом ipcross (<http://www.ebi.ac.uk/about/vertebrate-genomics/software/ipcross-manual>) на созданной базе полногеномных последовательностей. 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 3730 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, США) в соответствии с прилагаемыми инструкциями.

## Результаты и обсуждение

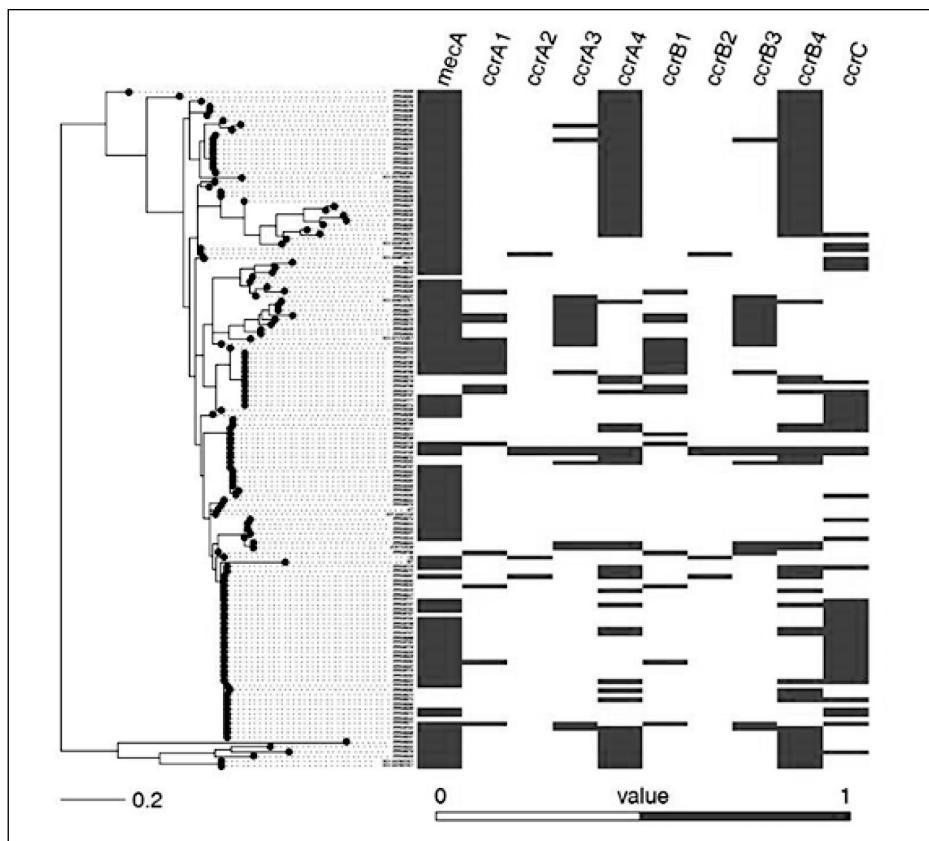
При помощи модуля MetaPhlAn проведена видовая идентификация коллекции полногеномных данных, приписанных к гемолитическому стафилококку (*n*=168), в результате которой 29 геномов были исключены из дальнейшего анализа по причине видового несоответствия и плохого качества сборки. Таким образом, была сформирована коллекция геномных последовательностей (*n*=142) *S.haemolyticus*, 3 из которых были получены в лаборатории молекулярной генетики микроорганизмов ФНКЦ ФХМ в ходе данной работы.

На основе одноклеточных замен в «общих» («коровых» от англ. «core» — ядро) генах для всех образцов коллекции построено филогенетическое дерево (рис. 1), иллюстрирующее высокое генетическое разнообразие среди исследуемых геномов коллекции.

Среди 142 образцов коллекции выявлено 117, содержащих ген *mecA* (рис. 1). Относительно референсного гена *mecA* штамма *S.haemolyticus* JCSC1435 было найдено 4 одноклеточных полиморфизма (SNP, от англ. «single nucleotide polymorphism»): a1830t (Thr610Thr), c737t (Gly246Glu), a675t (Arg225Ser), a667g (Tyr223His). Аналогичную референсному штамму аминокислотную последовательность имели 33 образца (28,2%). Восемь образцов имели 2 SNPs относительно *mecA* *S.haemolyticus* JCSC1435: c737t и a675t. По одному образцу (0,85%) имели соответственно один (c737t) и два SNPs (a667g и c737t). Последовательность *mecA* наибольшего количества образцов (73/142, 62,4%) характеризовалась одним SNP (a675t) и была гомологична последовательности штамма *S.aureus* N315 (NG\_047938.1), которая является ре-

**Таблица 1. Праймеры для идентификации генов рекомбиназ SCCmec *S.haemolyticus***

Ген	Последовательность праймеров (5'-3') (прямой/обратный)	Длина ампликона, п. о.	Температура отжига, °C
<i>ccrA1</i>	GTCAGTACAACGATATAACGA GAAAGAAGTCCTGACAAGT	240	54
<i>ccrA2</i>	TCAAAATGAGTCACCAACGG TGGTTTCAATATAGGGGTA	750	54
<i>ccrA3</i>	TAAGCAATCAGGCAGAACGG GTACTTGGTAGGGTTACG	400	56
<i>ccrA4</i>	AGCGACGAATCAAATGTCC GTTCAACGATATTGAGTGG	540	54
<i>ccrB1</i>	CACCTGTTACTTATATTCTCTC AATGGTTGGTTGAGTCAG	620	60
<i>ccrB2</i>	GTACAATCACATACATCTTAGC TTCATATTTGAATACTTGGTC	632	60
<i>ccrB3</i>	ATAGTTGAAGACCTACATCGTC TTTATGATTAAGTGCCTAGCC	336	60
<i>ccrB4</i>	GAAGTATAGACACTGGAG TTGATTCAATTCTCATCTTG	614	48
<i>ccrC</i>	ATTGTAATAATCCAGTC GAAATCTCCACCAATAGG	200	50



**Рис. 1. Филогенетическое дерево, построенное на основании анализа однонуклеотидных замен всех «общих» генов для образцов коллекции и характеристика генов SCCmec для них.**

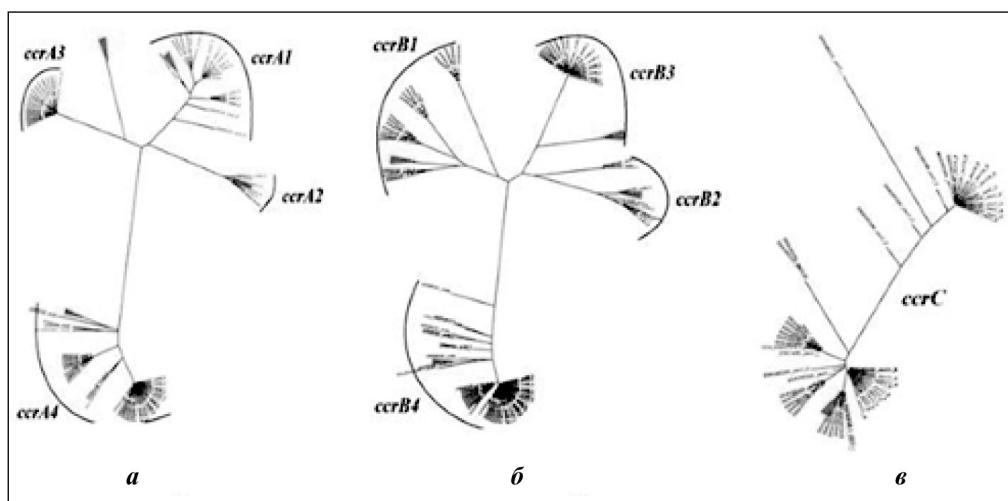
ференсной при анализе генетического разнообразия гена *mesA* золотистого стафилококка.

В ходе анализа генов рекомбиназ было выявлено, что 118 образцов из 142 содержат в составе геномов гены кассетных рекомбиназ. Причём в

последовательности стафилококка (показаны на рис. 2 треугольниками) довольно сильно отличаются от соответствующих аллотипов рекомбиназ гемолитического стафилококка (81–85% идентичности, что ниже заявленной границы в 85%).

Что касается рекомбиназ типа С, то все нуклеотидные последовательности показали идентичность более 90% (см. рис. 2).

На рис. 1 показан результат объединения филогенетического дерева, построенного на основе генов «коровых» белков, с наличием генов *mesA* и рекомбиназ трёх типов. В совокупности было вы-



**Рис. 2. Филогенетический анализ генов рекомбиназ *S. haemolyticus*.**

Филогенетические деревья построены на основании множественного выравнивания кассетных рекомбиназ.

а – рекомбиназы типа А; б – рекомбиназы типа В; в – рекомбиназы типа С.

19 полногеномных последовательностях ген *mesA* был найден, а рекомбиназы известных типов выявлены не были. В случае 5 последовательностей в геномах *S. haemolyticus* не были выявлены ни ген *mesA*, ни гены рекомбиназ.

На основании множественного выравнивания нуклеотидных последовательностей и построенного филогенетического дерева обнаруженные у 118 образцов рекомбиназы были разделены на три типа А, В и С. Типы А и В в свою очередь были подразделены на четыре аллотипа каждый (рис. 2).

Анализ филогенетических деревьев, построенных в пределах каждого из типов кассетных рекомбиназ (см. рис. 2), показал, что степень сходства между аллотипами лежит в пределах 67–80%, а внутри каждого аллотипа идентичность выше 85%.

При этом нуклеотидные рекомбиназы золотистого стафилококка (показаны на рис. 2 треугольниками) довольно сильно отличаются от соответствующих аллотипов рекомбиназ гемолитического стафилококка (81–85% идентичности, что ниже заявленной границы в 85%).

**Таблица 2. Распределение генов рекомбиназ и гена *mecA* в исследуемых выборках**

Сочетание рекомбиназ и наличие гена <i>mecA</i>	Геномная коллекция (n=142)	По данным анализа результатов амплификации соответствующих генов у штаммов собранной коллекции (n=54)
<i>mecA-ccr-</i>	5	9
<i>mecA-ccrA1B1+</i>	2	
<i>mecA-ccrA1B1+ccrB3+</i>	1	
<i>mecA-ccrA1B1+ccrA4B4+ccrC+</i>	1	
<i>mecA-ccrA3B3+ccrA4B4+</i>	3	
<i>mecA-ccrA4B4</i>	5	
<i>mecA-ccrA4B4+ccrC+</i>	4	
<i>mecA-ccrB1+</i>	1	
<i>mecA-ccrB4+</i>	1	
<i>mecA-ccrC+</i>	2	4
<i>mecA+ccr-</i>	19	5
<i>mecA+ccrA1+</i>		1
<i>mecA+ccrA1B1+</i>	7	
<i>mecA+ccrA1B1+ccrA3B3+</i>	5	
<i>mecA+ccrA1B1+ccrC+</i>	1	
<i>mecA+ccrA1+ccrA4B4+</i>		4
<i>mecA+ccrA1B1+ccrA3B3+ccrC+</i>	1	
<i>mecA+ccrA2+</i>		2
<i>mecA+ccrA2B2+</i>	2	
<i>mecA+ccrA2+ccrB4+</i>		1
<i>mecA+ccrA2B2+ccrA4B4+</i>	1	
<i>mecA+ccrA2+ccrA4B4+</i>		4
<i>mecA+ccrA2B2+ccrA3B3+ccrA4B4+ccrC+</i>	2	
<i>mecA+ccrA3B3+</i>	6	
<i>mecA+ccrA3+ccrA4B4+</i>	1	
<i>mecA+ccrA3B3+ccrA4B4+</i>	3	
<i>mecA+ccrA4B4+</i>	35	16
<i>mecA+ccrA4B4+ccrA2+ccrC+</i>		1
<i>mecA+ccrA4B4+ccrC+</i>	7	5
<i>mecA+ccrB4+</i>		1
<i>mecA+ccrC+</i>	27	1

явлено 22 сочетания различных типов рекомбиназ и наличия или отсутствия гена *mecA* в исследуемых геномах (табл. 2). Наиболее представленной группой являлась группа геномов, характеризующаяся наличием гена *mecA* и генов рекомбиназ *ccrA4* и *ccrB4* (25%, 35/142 образцов). Второй по представленности была группа геномов, в состав которых входили ген *mecA*, а также ген рекомбиназы типа С (*ccrC*) (19%, 27/142 образцов). Рекомбиназы типа А и В одинаковых аллотипов обычно присутствовали в tandemе (непосредственно рядом друг с другом). Из исключений следует отметить образец ERR085183 (одновременно присутствовали рекомбиназы *ccrA3*, *ccrA4B4*), ERR085226 (*ccrA1B1*, *ccrB3*), ERR085222 (*ccrB4*) и ERR085207 (*ccrB1*).

На данный момент для типирования SCC<sub>mec</sub> гемолитических стафилококков используется схема, разработанная для золотистого стафилококка [<http://www.staphylococcus.net/>]. Праймеры, с помощью которых определяется наличие генов *mecA* и *ccr* у *S.aureus*, были протестиированы с помощью виртуальной ПЦР на базе полногеномных последовательностей *S.haemolyticus*. Проверка показала, что соответствующие праймеры с высокой точностью могут детектировать наличие гена *mecA*. При этом праймеры на гены рекомбиназ показали низкую степень идентичности.

В связи с этим была разработана собственная система типирования SCC-кассеты, включающая праймеры для детекции генов рекомбиназ стафилококковой хромосомной кассеты *S.haemolyticus* (см. табл. 1).

Разработанная система типирования апробирована на коллекции клинических изолятов *S.haemolyticus* (54 изолята) (см. табл. 2). Наиболее представленным вариантом генов рекомбиназ было сочетание *ccrA4* и *ccrB4* (30%, 16/54 изолята). Одиночная рекомбиназа *ccrC* была детектирована в псевдокассетах, т. е. при отсутствии гена *mecA* (8%, 4/54) и в одном случае совместно с геном *mecA* (2%, 1/54). Рекомбиназы аллотипов *ccrA3*, *ccrB1*, *ccrB2*, *ccrB3* у штаммов коллекции обнаружены не были. Для выборочных штаммов результаты амплификации генов рекомбиназ были подтверждены методом секвенирования по Сэнгеру, в том числе для трёх штаммов SH527, SH39 и SH864-1, подвергнутых полногеномному секвенированию. Типы рекомбиназ, определённых для этих штаммов методом амплификации с использованием предложенных праймеров, полностью совпадали с типом рекомбиназ, полученным на основании анализа геномных последовательностей этих штаммов. Кроме того, обнаружены штаммы, несущие ген *mecA* при отсутствии генов рекомбиназ (9,2%, 5/54) (см. табл. 2).

С развитием таких направлений медицины, как хирургия, неонатология, реаниматология, а также инвазивных технологий (гемодиализ, различные катетеры, импланты), значительно возросла роль внутрибольничных инфекций, возбудителями которых часто выступают КОС. Среди КОС превалируют штаммы, устойчивые к широкому спектру антибиотиков, в том числе и метициллиноустойчивые штаммы [20]. При этом КОС отличаются широким разнообразием *SCCmec* и по всей вероятности являются резервуаром *SCCmec* для более патогенного вида стафилококков — *S.aureus* [21]. В настоящем исследовании были изучены особенности *SCCmec* *S.haemolyticus*, являющегося вторым по клинической значимости КОС. Кроме того, показано, что *S.haemolyticus* по сравнению с другими КОС обладают повышенной тенденцией к развитию устойчивости к антибиотикам [22, 23].

Для оценки разнообразия кассеты *S.haemolyticus* была сформирована коллекция геномных последовательностей, в которую вошли как образцы из NCBI, так и секвенированные в ходе исследования. Штаммы *S.haemolyticus*, геномы которых вошли в коллекцию, были получены из 11 различных стран, а также выделены из разных источников (крови, кала, поверхность центральных венозных катетеров), что обеспечивало представленность выборки. Кроме того, на основании филогенетического анализа «основных» генов изучаемых образцов *S.haemolyticus* (см. рис. 1) можно сделать вывод о генетическом разнообразии штаммов, вошедших в коллекцию.

В большинстве анализируемых полногеномных последовательностях был обнаружен ген *mecA* (82,4%), что подтверждает данные о высокой доле устойчивых к метициллину штаммов. При этом нуклеотидная последовательность *mecA* *S.haemolyticus* характеризовалась высокой консервативностью, а наибольшее количество образцов несло последовательность, идентичную последовательности аналогичного гена штамма *S.aureus* N315. Стоит отметить, что ранее описаны несколько вариантов последовательности *mecA*, обладающих гомологией на уровне 70%: *mecA1 S.sciuri* K11, *mecA2 S.vitulinus* CSBO8, *mecB Macrococcus caselyticus*, *mecC S.aureus* LGA251 [24]. В рамках данного исследования в геномах *S.haemolyticus* представленных генов выявлено не было.

Вопросу типирования рекомбиназ *SCCmec* КОС, и в частности *S.haemolyticus*, посвящён ряд работ, что связано с высокой степенью генетического разнообразия *SCCmec* КОС. Описаны случаи, когда КОС содержат в составе своего генома более одного типа *ccr SCCmec* [25]. Было показано, что для штаммов *S.haemolyticus* наиболее часто характерны *ccrC* [26, 27, 28, 29]. Анализ коллекции

геномов показал что, наличие рекомбиназы С и гена *mecA* является часто встречающейся комбинацией (19%, 27/142 образцов), но в наибольшей части геномов при наличии гена *mecA* в состав *SCCmec* входят гены рекомбиназ типа А и В, относящиеся к 4 аллотипу (25%, 35/142 образцов).

Нужно отметить, что в данном исследовании были найдены штаммы *S.haemolyticus*, содержащие в своем геноме ген *mecA*, при отсутствии генов рекомбиназ *SCCmec* (13,4%, 19/142). Вероятно, это связано с наличием новых типов рекомбиназ с низкой гомологией с известными рекомбиназами. Эти данные подтверждают литературные источники, которые описывают случаи нетипируемых *SCCmec*. В некоторых исследованиях процент нетипируемых штаммов *S.haemolyticus* достигает 63,6% [26, 27, 28]. Также были установлены штаммы, в геноме которых при наличии генов рекомбиназ *SCCmec* отсутствовал ген *mecA*, т.е. штаммы с неполной (псевдо) *SCCmec* кассеты.

Полученные данные свидетельствуют о высокой вариабельности комбинации рекомбиназ, входящих в состав *SCCmec* кассеты *S.haemolyticus*, и соответственно о наличии различных типов этой кассеты. В совокупности с данными о наличии неполных (псевдо) *SCCmec*, описанный феномен косвенно свидетельствует о высокой частоте горизонтального переноса среди КОС и частности среди *S.haemolyticus*. Кроме того, явление горизонтального переноса между штаммами *S.haemolyticus* подтверждает рис. 1. Из рис. 1 видно, что определённые типы рекомбиназ не связаны с какими-то определёнными кластерами филогенетического дерева, сформировавшихся в процессе эволюции «общих» генов.

Анализ филогенетических деревьев, построенных в пределах каждого из типов кассетных рекомбиназ (см. рис. 2) показал отличие рекомбиназ гемолитического стафилококка от рекомбиназ *S.aureus* соответствующего аллотипа (81–85% идентичности, что ниже заявленной границы в 85%). В связи с чем, для штаммов *S.haemolyticus* было осуществлено тестирование праймеров, используемых для типирования *SCCmec*. Так, праймеры на ген *mecA* с высокой точностью определяют наличие этого гена у *S.haemolyticus*, ввиду его высокой консервативности в пределах рода *Staphylococcus*. Однако праймеры на различные типы рекомбиназ не обладали достаточной гомологией с нуклеотидными последовательностями рекомбиназ *S.haemolyticus* для прохождения реакции амплификации. В связи с этим был предложен набор праймеров, подобранный непосредственно на основании сравнения нуклеотидных последовательностей рекомбиназ *S.haemolyticus*. Ещё одной причиной для создания альтернативной схемы типирования рекомбиназ *S.haemolyticus* является описание случаев нахождения штам-

МОВ *S.haemolyticus*, содержащих в своем геноме гены рекомбиназы А и В различных аллотипов. Таким образом, праймеры были подобраны на каждый аллотип рекомбиназ отдельно (см. табл. 1) и апробированы на коллекции штаммов (54 штамма *S.haemolyticus*) (см. табл. 2). Как и в случае анализа геномных последовательностей, наиболее распространённым сочетанием генов рекомбиназ являлось *ccrA4B4*. Что касается гена рекомбиназы *ccrC*, то он был детектирован в редких случаях, в основном в составе псевдокассет (8%, 4/54). Нуклеотидные последовательности генов рекомбиназ *ccrA1*, *ccrA2*, *ccrA4*, *ccrB4*, *ccrC*, установленные на основании результатов амплификации, проведённой с использованием тестируемых

праймеров, были определены и соответствовали референсным.

### Выражение признательности.

Работа финансировалась грантами Российского Научного Фонда 15-15-00158 и Российским фондом фундаментальных исследований 15-04-08158. За счёт финансирования гранта 15-15-00158 была собрана коллекция *S.haemolyticus*, проведены видовая идентификация и тестирование праймеров на рекомбиназы *SCCMec*. Работа по анализу геномных последовательностей, а также полногеномное секвенирование трёх изолятов *S.haemolyticus* проведены за счёт финансирования гранта 15-04-08158.

## ЛИТЕРАТУРА

- Rogers K. L., Fey P. D., Rupp M. E. Coagulase-negative staphylococcal infections. *Infect Dis Clin North Am* 2009; 23 (1): 73–98.
- Rahman A., Hossain M.A., Mahmud C., Paul S.K., Sultana S., Haque N. et al. Species distribution of coagulase negative staphylococci isolated from different clinical specimens. *Mymensingh Med J* 2012; 21 (2): 195–199.
- Venkatesh M. P., Placencia F., Weisman L. E. Coagulase-Negative Staphylococcal Infections in the Neonate and Child: An Update. *Semin Pediatr Infect Dis* 2006; 17 (3): 120–127.
- Coleman K. Diazabicyclooctanes (DBOs): a potent new class of non- $\beta$ -lactam  $\beta$ -lactamase inhibitors. *Curr Opin Microbiol* 2011; 14 (5): 550–555.
- Poole K. Resistance to beta-lactam antibiotics. *Cell Mol Life Sci* 2004; 61 (17): 2200–2223.
- Сидоренко С.В., Яковлев С.В. Бета-лактамные антибиотики. РМЖ 1997; 21: 2.
- 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; 13 (5): 250–255.
- Laverdiere M. Trends in antibiotic resistance of staphylococci over an eight-year period: differences in the emergence of resistance between coagulase positive and coagulase-negative staphylococci. *Microb Drug Resist* 1998; 4 (2): 119–122.
- Rolo J., Worning P., Nielsen J.B., Bowden R., Bouchami O., Damborg P. et al. Evolutionary origin of the staphylococcal cassette chromosome *mec* (*SCCMec*). *Antimicrob Agents Chemother* 2017; 61 (6) pii: e02302-16.
- Shore A.C., Coleman D.C. Staphylococcal cassette chromosome *mec*: Recent advances and new insight. *Int J Med Microbiol*. 2013; 303 (6–7): 350–359.
- Романов А.В., Дехнич А.В. Типирование MRSA: какие методы являются оптимальными для решения различных задач? Клиническая Микробиология и антимикробная химиотерапия. — 2011. — Т. 13. — № 2. — С. 168–176. / Romanov A.V., Dekhnich A.V. Tipirovaniye MRSA: kakie metody yavlyayutsya optimal'nymi dlya resheniya razlichnykh zadach? Klinicheskaya Mikrobiologiya i antimikrobnaya khimioterapiya 2011; 13 (2): 168–176. [in Russian]
- Shore A.C., Deasy E.C., Slickers P. et al. Detection of Staphylococcal Cassette Chromosome *mec* Type XI Carrying Highly Divergent *mecA*, *mecI*, *mecR1*, *blaZ*, and *crr* Genes in Human Clinical Isolates of Clonal Complex 130 Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2011; 55 (8): 3765–3773.
- Zhang Y., Agidi S., LeJeune J.T. Diversity of staphylococcal cassette chromosome in coagulase-negative staphylococci from animal sources. *J Appl Microbiol* 2009; 107 (4): 1375–1383.
- Wu Z., Li F., Liu D., Xue H., Zhao X. Novel Type XII Staphylococcal Cassette Chromosome *mec* Harboring a New Cassette Chromosome Recombinase, *CcrC2*. *Antimicrob Agents Chemother* 2015; 59 (12): 7597–7601.
- 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. — № 5. — С. 501–513. / Kornienko M. A., P'ina E. N., Borovskaya A. D., Edel'shtein M. V., Sukhorukova M. V., Kostrzeva M., Govorun V. M. Pryamoe bakterial'noe profilirovaniye posredstvom MALDI mass-spektrometrii kak metod bystroj klassifikatsii shtammov *Staphylococcus aureus*. Biomeditsinskaya khimiya 2012; 5: 501–513. [in Russian]
- Nicola S., Levi W., Ballarini A. Metagenomic microbial community profiling using unique clade-specific marker genes. *Nature Methods* 2012; 9: 811–814.
- Galtier N., Gouy M., Gautier C. SeaView and Phylo\_win, two graphic tools for sequence alignment and molecular phylogeny. *Comput Applic Biosci* 1996; 12: 543–548.
- Seemann T. Prokka: rapid prokaryotic genome annotation. *Bioinformatics* 2014; 30 (14): 2068–2069.
- Koboldt D.C., Chen K., Wylie T., Larson D.E., McLellan M.D., Mardis E.R. et al. VarScan: variant detection in massively parallel sequencing of individual and pooled samples. *Bioinformatics* 2009; 25 (17): 2283–2285.
- Diekema D.J., Pfaller M.A., Schmitz F.J., Smayevsky J., Bell J., 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. *Clin Infect Dis* 2001; 32 Suppl 2: S114–132.
- Hanssen A.M., Ericson Solid J.U. *SCCMec* in staphylococci: genes on the move. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2006; 46: 8–20.
- Hope R., Livermore D.M., Brick G., et al. Non-susceptibility trends among staphylococci from bacteraemias in the UK and Ireland, 2001–06. *J Antimicrob Chemother* 2008; 62: ii65–74.
- Krediet T.G., Mascini E.M., van Rooij E., Vlooswijk J., Paauw A., Gerards L.J. et al. Molecular epidemiology of coagulase-negative staphylococci causing sepsis in a neonatal intensive care unit over an 11-year period. *J Clin Microbiol* 2004; 42 (3): 992–995.
- Hiramatsu K., Tomasz A., de Lencastre H., Perreten V., Holden M.T., Coleman D.C. Guidelines for reporting novel *mecA* gene homologues. Ito T, International Working Group on the Classification of Staphylococcal Cassette Chromosome Elements (IWG-SCC). *Antimicrob Agents Chemother* 2012; 56 (10): 4997–4999.
- Zong Z., Peng C., Lü X. Diversity of *SCCMec* Elements in Methicillin-Resistant Coagulase-Negative Staphylococci Clinical Isolates. *PLoS One*. 2011; 6 (5): e20191.
- Irvani Mohammad Abadi M., Moniri R., Khorshidi A., Piroozmand A., Mousavi S.G., Dastehgoli K., Mirzaei Ghazikalayeh H. Molecular Characteristics of Nasal Carriage Methicillin-Resistant Coagulase Negative Staphylococci in School Students. *Jundishapur J Microbiol* 2015 Jun 27; 8 (6): e18591.
- Salgueiro V.C., Azevedo M.B., Iorio N.L., Amorim Ede L., dos Santos K.R. Staphylococcal cassette chromosome *mec* elements in methicillin-resistant coagulase-negative staphylococci from a Brazilian neonatal care unit. *Pediatr Infect Dis J* 2014; 33 (10): 1089–1090.
- Szczuka E., Krajewska M., Lijewska D., Bosacka K., Kaznowski A. Diversity of staphylococcal cassette chromosome *mec* elements in nosocomial multiresistant *Staphylococcus haemolyticus* isolates. *J Appl Genet* 2016; 57 (4): 543–547.
- Ito T., Ma X.X., Takeuchi F., Okuma K., Yuzawa H., Hiramatsu K. Novel type V staphylococcal cassette chromosome *mec* driven by a novel cassette chromosome recombinase, *crrC*. *Antimicrob Agents Chemother* 2004; 48 (7): 2637–2651.

#### **СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ:**

*Полонская Алина Вадимовна* — лаборант-исследователь лаборатории молекулярной генетики микроорганизмов ФГБУ ФНКЦ физико-химической медицины ФМБА, Москва

*Мария Андreeвна Корниенко* — к. б. н., научный сотрудник лаборатории молекулярной генетики микроорганизмов ФГБУ ФНКЦ физико-химической медицины ФМБА, Москва

*Манолов Александр Иванович* — к. б. н., младший научный сотрудник лаборатории биоинформатики ФГБУ ФНКЦ физико-химической медицины ФМБА, Москва

*Никита Сергеевич Кутцов* — лаборант-исследователь лаборатории молекулярной генетики микроорганизмов ФГБУ ФНКЦ физико-химической медицины ФМБА, Москва

*Георгий Борисович Смирнов* — д. б. н., профессор, член-корреспондент РАН, главный научный сотрудник лаборатории

молекулярной генетики микроорганизмов ФГБУ ФНКЦ физико-химической медицины ФМБА, Москва

*Егор Александрович Шитиков* — к. б. н., старший научный сотрудник лаборатории молекулярной генетики микроорганизмов ФГБУ ФНКЦ физико-химической медицины ФМБА, Москва

*Елена Николаевна Ильина* — д. б. н., профессор РАН, заместитель директора по научной работе ФГБУ ФНКЦ физико-химической медицины ФМБА, Москва

*Людмила Анатольевна Любасовская* — к. м. н., заведующая отделением клинической фармакологии отдела микробиологии и клинической фармакологии ФГБУ «НМИЦ АГиП им. В. И. Кулакова» Минздрава России, Москва

*Татьяна Валерьевна Припутневич* — д. м. н., заведующая отделом микробиологии и клинической фармакологии ФГБУ «НМИЦ АГиП им. В. И. Кулакова» Минздрава России, Москва