

МИКРОБИОЛОГИЯ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2019

Абаев И. В., Скрябин Ю. П., Коробова О. В., Полосенко О. В., Шепелин А. П.

СРАВНЕНИЕ ГЕМОЛИТИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ И ГЕНОВ ГЕМОЛИТИЧЕСКИХ ТОКСИНОВ КЛИНИЧЕСКИХ ШТАММОВ *STAPHYLOCOCCUS AUREUS*, ИЗОЛИРОВАННЫХ НА ТЕРРИТОРИИ РФ

ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора, 142279, Оболенск, Россия

Проводили тестирование клинических штаммов Staphylococcus aureus на гемолитическую активность на кровяном агаре, в ПЦР тесте и посредством анализа аллелей генов гемолитических токсинов. В работе анализировали информативность фенотипического определения гемолитической активности для оценки патогенных свойств изолятов S. aureus.

Ключевые слова: *Staphylococcus aureus*; гемолитические токсины; бактериальный геном; генотип.

Для цитирования: Абаев И. В., Скрябин Ю. П., Коробова О. В., Полосенко О. В., Шепелин А. П. Сравнение гемолитической активности и генов гемолитических токсинов клинических штаммов *Staphylococcus aureus*, изолированных на территории РФ. Клиническая лабораторная диагностика. 2019; 64 (5): 294-298. DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2019-64-5-294-298>

Abaev I. V., Skryabin Y. P., Korobova O. V., Polosenko O. V., Shepelin A. P.

COMPARISON OF HEMOLYTIC ACTIVITY AND HEMOLYTIC TOXIN GENES OF *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* CLINICAL STRAINS, ISOLATED IN RUSSIA

FBIS «State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology» of the Rosпотребнадзор, 142279, Obolensk, Russia

Clinical strains of Staphylococcus aureus were tested for hemolytic activity on blood agar, in the PCR test and by analyzing the gene alleles of hemolytic toxins. The study analyzed the information content of the phenotypic determination of hemolytic activity to assess the pathogenic properties of S. aureus isolates.

Key words: *Staphylococcus aureus*; Hemolysin Proteins; Bacterial Genome; Genotype.

For citation: *Abaev I. V., Skryabin Y. P., Korobova O. V., Polosenko O. V., Shepelin A. P. Comparison of hemolytic activity and hemolytic toxin genes of Staphylococcus aureus clinical strains, isolated in Russia. Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics). 2019; 64 (5): 294-298 (in Russ.). DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2019-64-5-294-298>*

For correspondence: *Abaev I.V.*, PhD, leading researcher; e-mail: abaev@obolensk.org

Information about authors:

Abaev I.V., <http://orcid.org/0000-0003-2724-557X>
Skryabin Y.P., <http://orcid.org/0000-0001-5748-995X>
Korobova O.V., <http://orcid.org/0000-0002-7068-3236>
Polosenko O.V., <http://orcid.org/0000-0001-5961-9041>
Shepelin A.P., <http://orcid.org/0000-0002-8253-7527>

Conflict of interests. *The authors declare absence of conflict of interests.*

Acknowledgment. *This work was supported by Rosпотребнадзор research projects*

Received 28.03.2019
Accepted 05.04.2019

Введение. *Staphylococcus aureus* относится к наиболее распространённым и актуальным бактериальным патогенам человека и вызывает широкий спектр инфекционных заболеваний: от поверхностных инфекций кожи до такой патологии, как пневмония, бактериемия, остеомиелит, эндокардит, токсический шок и др. [1]. Разнообразие клинических синдромов инфекций *S. aureus* тесно коррелирует с большим числом различных экзопродуктов с выраженными токсиче-

скими свойствами. Среди них выделяют группу гемолитических токсинов: альфа-, бета-, гамма- и дельта-токсины, проявляющих цитолитическое действие в отношении различных типов клеток организма хозяина [2]. Гемолизины стафилококков различаются биохимическими и антигенными свойствами, литической активностью по отношению к эритроцитам различных видов животных.

Наибольшее значение имеет порообразующий альфа-токсин, который известен как один из основных факторов вирулентности *S. aureus*. Альфа-токсин ассоциируется с тяжёлыми стафилококковыми инфекциями: пневмонией, сепсисом, септическим артритом, абсцессом головного мозга и др. Альфа-токсин вызывает лизис эритроцитов и моноцитов,

Для корреспонденции: *Абаев Игорь Валентинович*, канд. мед. наук, вед. науч. сотр. лаб. антимикробных препаратов ФБУН ГНЦ ПМБ; e-mail: abaev@obolensk.org

индуцирует продукцию целой группы цитокинов и хемокинов, демонстрирует высокую гемолитическую активность против бараньих и кроличьих эритроцитов. Токсин с молекулярной массой в 33 кДа кодируется геном *hla*, локализованным в хромосоме *S. aureus* [3]. Несмотря на то что ген *hla* представлен в геномах практически всех штаммов *S. aureus*, более 10% штаммов не продуцируют альфа-токсин [4]. Бета-токсин, сфингомиелиназа С, с молекулярной массой 35 кДа, известен как гемолитический фермент, обладающий токсичностью для пролиферирующих лимфоцитов человека и цитотоксической активностью против основных клеточных компонентов кожи человека, в том числе, против кератиноцитов [5]. Бета-токсин вызывает нарушение проницаемости сосудистой стенки и демонстрирует высокую гемолитическую активность против бараньих, но не кроличьих эритроцитов. Гемолитическая активность бета-токсина усиливается при температуре инкубации ниже 10° С. Продукция бета-токсина ассоциируется с инфекциями лёгких и роговицы глаза человека. Показана способность бета-токсина ингибировать двигательную активность ресничек мерцательного эпителия полости носа [6]. Бета-токсин кодируется хромосомным геном *hlb* [7]. Гамма-токсин, двухкомпонентный цитолизин, имеет молекулярную массу от 32 до 34 кДа, кодируется генами *hlgA*, *hlgC*, *hlgB*, продуцируется более чем 99% штаммов *S. aureus*. Гамма-токсин разрушает нейтрофилы, макрофаги, эритроциты [8]. Дельта-токсин с молекулярной массой 2,9 кДа, кодируется геном *hld*, способен вызывать повреждение мембраны различных типов клеток человека и животных. Этот белок продуцируется более чем 97% штаммов *S. aureus* [9]. Роль гамма- и дельта-токсинов в патогенезе стафилококковых инфекций остается неясной. Связь альфа- и бета-токсинов с вирулентными свойствами *S. aureus* можно считать установленной, в отличие от гамма- и дельта-токсинов.

В противоположность большинству токсинов *S. aureus*, продукция гемолитических токсинов определяется с помощью простого фенотипического теста. Тест гемолитической активности *S. aureus* проводят на 5% кровяном агаре, где выявляют колонии, окружённые зоной гемолиза. При проведении фенотипического теста на кровяном агаре выявляют активность двух гемолизинов: альфа- и бета-токсинов [8]. Действие альфа-гемолизина характеризуется узкой зоной полного лизиса, т. н. бета-гемолиз, причём ширина зоны лизиса варьирует в зависимости от штамма и зависит от регуляторных систем *S. aureus*, контролирующих продукцию токсина. Для бета-гемолизина показана широкая зона неполного лизиса, т. н. альфа-гемолиз. Определение гемолитической активности *S. aureus* включено в классические методы характеристики изолятов *S. aureus*. Согласно ГОСТу, наличие гемолитической активности подтверждает энтеротоксигенные свойства *S. aureus*¹. В публикациях отечественных авторов тест на гемолитическую активность используется для дифференциации штаммов *S. aureus* по признаку вирулентности [10].

Коллекция штаммов *S. aureus* ГНЦ ПМБ состоит из вне- и внутригоспитальных штаммов *S. aureus*, изолированных в РФ, включает референс-штаммы *S. aureus* из Американской коллекции типовых культур. Штаммы коллекции охарактеризованы различными методами, включая клиническую информацию, данные полногеномного исследования, исследования на лабораторных животных. В рамках описания свойств штаммов *S. aureus* проводятся фенотипические тесты, отражающие различную биохимическую активность *S. aureus*.

Результаты фенотипических тестов в дальнейшем анализируются с учётом клинических данных и генетической характеристики штаммов. Все штаммы *S. aureus*, использованные в исследовании, изолированы при инвазивных инфекциях, инфекциях кожи, пищевых токсикоинфекциях.

Целью исследования являлся сравнительный анализ параметров формирования зоны гемолиза на кровяном агаре и генетической структуры штаммов *S. aureus*, выделенных в последние годы при вспышках стафилококковых инфекций в РФ. Изучение гемолитических свойств таких штаммов с помощью фенотипических, генетических, биоинформационных методов направлено на получение новой информации о вирулентных штаммах *S. aureus*, циркулирующих в РФ.

Материал и методы. В работе использовали семь штаммов *S. aureus*, изолированных при расследовании стафилококковых вспышек в РФ, три референсных штамма *S. aureus* из Американской коллекции типовых культур (American Type Culture Collection, ATCC) (табл. 1). Полногеномные последовательности всех штаммов *S. aureus* представлены в базе данных GenBank [<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>].

Определение гемолитической активности проводили на четырёх питательных средах производства ФБУН ГНЦ ПМБ, п. Оболенск: мясо-пептонный агар (МПА), триптон-соевый агар (ТСА), питательный агар для культивирования микроорганизмов (ГРМ-агар), питательная среда для количественного определения микробной загрязнённости (среда № 1 ГРМ), все с добавлением 5% бараньей крови. При фенотипическом анализе на гемолитическую активность результаты учитывали дважды: через 48 ч инкубации при 37° С и после дополнительной инкубации в течение 24 ч при 10° С. Оценку гемолитической активности проводили по диаметру зоны гемолиза и степени просветления в зоне гемолиза. Штамм *S. aureus* ATCC 10832 (Wood 46) [11] использован для контроля кровяного агара в тесте на гемолитическую активность. По паспорту штамм формирует белые эмалевидные колонии диаметром 3 мм с обширной зоной полного просветления среды вокруг каждой колонии. Данный тип гемолиза определяется как результат продукции альфа-токсина.

ПЦР анализ на наличие генов *hla* и *hlb* в геномах исследуемых штаммов проведён с использованием олигонуклеотидных праймеров: *hla*-F, 5'-GAAGTCTGGTGAACCCCTGA-3'; *hla*-R, 5'-TGAATCCTGTCGCTAATGCC-3', и *hlb*-F, 5'-CAATAGTGCCAAAGCCGAAT-3'; *hlb*-R, 5'-TCCAGCACCACAACGAGAAT-3' [12]. Для проведения мультилокусного сиквенс-типирования по генам домашнего хозяйства геномных последовательностей использован онлайн инструмент на сервере Центра геномных исследований [cge.cbs.dtu.dk/services/MLST/]. Определение локализации генов *hla* и *hlb* в полногеномных последовательностях исследуемых штаммов проведено с использованием программы NCBI BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Для сравнения и анализа транслированных последовательностей генов *hla* и *hlb* использована программа MEGA-X (www.megasoftware.net/). В качестве референсных последовательностей для анализа использованы следующие последовательности *S. aureus*: для гена *hla* – геном штамма Mu50 (GenBank BA000017), для гена *hlb* – геном штамма O46 (GenBank CP025395); для оперона *hlg* (гены *hlgA*, *hlgB*, *hlgC*) и гена *hld* – геном штамма MRSA252 (GenBank BX571856).

Результаты. При проведении фенотипического теста на гемолитическую активность для десяти штаммов *S. aureus* (см. табл. 1) определено четыре варианта гемолиза: А – зона гемолиза не определяется; В – узкая зона гемолиза с полным лизисом (бета-гемолиз); С – широкая зона гемолиза с полным лизисом (бета-гемолиз); D – двойная широкая зона гемолиза, которая состоит из зоны полного гемолиза, аналогичного варианту В и дополнительная широкая зона с не-

¹ГОСТ 31746-2012 Продукты пищевые. Методы выявления и определения количества коагулазоположительных стафилококков и *Staphylococcus aureus*.

Штаммы *S. aureus*, использованные в работе

	Название штамма	Инфекция, место и год выделения	Генотип	Ссылки
1	ATCC BAA-1707 MW2	внегоспитальная инфекция, США, 1998	CC1, MRSA	[13]
2	ATCC BAA-1720 MRSA252	внутригоспитальная инфекция, Великобритания, 1997	CC30, MRSA	[14]
3	ATCC 700699 Mu50	внутригоспитальная инфекция, Япония, 1997	CC5, MRSA	[13]
4	ГКПМ-Оболensk В-6838	внутригоспитальная инфекция, РФ, 2007	CC239, MRSA	данная публикация
5	ГКПМ-Оболensk В-7438	острая кишечная инфекция, РФ, 2013	CC30, MSSA	[15, 16]
6	ГКПМ-Оболensk В-7778	острая кишечная инфекция, РФ, 2014	CC30, MSSA	[15, 16]
7	ГКПМ-Оболensk В-7774	эксфолиативный дерматит новорожденных, РФ, 2013	CC15, MSSA	[17]
8	ГКПМ-Оболensk В-7803	эксфолиативный дерматит новорожденных, РФ, 2015	CC121, MSSA	данная публикация
9	ГКПМ-Оболensk В-7904	острая кишечная инфекция, РФ, 2015	CC1, MSSA	[17]
10	ГКПМ-Оболensk В-7905	острая кишечная инфекция, РФ, 2015	CC1, MSSA	[17]

Примечание. CC – клональный комплекс (clonal complex); MRSA – метициллинрезистентные штаммы *S. aureus*; MSSA – метициллинчувствительные штаммы *S. aureus*.

Таблица 2

Гемолитическая активность и анализ генов *hla* и *hnb* штаммов *S. aureus*

Штамм <i>S. aureus</i>	Вариант гемолиза	Определение генов <i>hla</i> и <i>hnb</i> методом ПЦР		Анализ нуклеотидной последовательности генов <i>hla</i> и <i>hnb</i>	
		<i>hla</i>	<i>hnb</i>	<i>hla</i>	<i>hnb</i>
Mu50	(A)	<i>hla</i> (+)	<i>hnb</i> (-)	<i>hla</i> *	phiSa3
MRSA252	(A)	<i>hla</i> (+)	<i>hnb</i> (-)	<i>hla</i> (TAG)	phiSa3
MW2	(B)	<i>hla</i> (+)	<i>hnb</i> (-)	<i>hla</i> *	phiSa3
В-6838	(B)	<i>hla</i> (+)	<i>hnb</i> (-)	<i>hla</i> *	phiSa3
В-7438	(A)	<i>hla</i> (+)	<i>hnb</i> (-)	<i>hla</i> (TAG)	phiSa3
В-7778	(A)	<i>hla</i> (+)	<i>hnb</i> (-)	<i>hla</i> (TAG)	phiSa3
В-7774	(C)	<i>hla</i> (+)	<i>hnb</i> (+)	<i>hla</i> *	<i>hnb</i> *
В-7803	(C)	<i>hla</i> (+)	<i>hnb</i> (-)	<i>hla</i> *	phiSa3
В-7904	(B)	<i>hla</i> (+)	<i>hnb</i> (-)	<i>hla</i> *	phiSa3
В-7905	(D)	<i>hla</i> (+)	<i>hnb</i> (+)	<i>hla</i> *	<i>hnb</i> *

Примечание. (A) – гемолиз отсутствует; (B) – тонкий ареал гемолиза с полным лизисом; (C) – широкий ареал гемолиза с полным лизисом; (D) – двойной широкий ареал гемолиза; *hla* (+)/(-) – ген альфа-гемолизина определяется/не определяется в ПЦР; *hnb* (+)/(-) – ген бета-гемолизина определяется/не определяется в ПЦР; *hla** – интактная последовательность гена *hla*; *hla* (TAG) – последовательность гена *hla* со стоп-кодоном; *hnb** – интактная последовательность гена *hnb*; phiSa3 – инсерция профага phiSa3-типа в последовательность гена *hnb*.

полным гемолизом (двойная зона альфа- и бета-гемолиза) (табл. 2, рис. 1, см. обложку). Указанные варианты гемолиза воспроизводились на всех четырех использованных в работе средах. Визуально гемолиз наиболее выражен на среде МПА (рис. 2, см. обложку). После дополнительной инкубации в течение 24 ч при 10° С на среде МПА у штаммов *S. aureus* с вариантом гемолиза А появились участки со слабым проявлением неполного гемолиза зеленоватого цвета (см. рис. 1, А.). Зона полного гемолиза (варианты гемолиза В и С) формируется вследствие продукции альфа токсина [18]. Контрольный штамм *S. aureus* ATCC 10832 (Wood 46), продуцент альфа токсина, в нашем эксперименте формирует зону гемолиза идентичную варианту С (рис. 3, см. обложку). Широкая зона неполного лизиса (вариант D) характерна для штаммов *S. aureus*, продуцирующих бета-токсин. Инкубация посевов при 10° С не изменила характера дополнительной широкой зоны неполного лизиса в варианте D.

Методом ПЦР определено наличие генов гемолизинов *hla* и *hnb* в геноме штаммов *S. aureus*. Для всех штаммов *S. aureus*

в ПЦР со специфическими олигонуклеотидными праймерами на ген *hla* выявлены ампликоны с ожидаемым размером 704 п.о., что свидетельствует о представленности последовательности гена *hla* в геномах исследуемых штаммов *S. aureus*. ПЦР-тест на наличие гена *hnb* отрицательный для 8 из 10 штаммов *S. aureus* (см. табл. 2). Для сравнения последовательностей генов гемолизинов, гены альфа-, бета-, гамма- и дельта-токсинов, идентифицированы с помощью программы NCBI BLAST в полногеномных последовательностях штаммов *S. aureus*. Последовательности гена *hla* сравнивали с последовательностью гена *hla* из штамма Mu50 (960 п.о., 319 а.о.). Всего выявлено пять вариантов аминокислотной последовательности гена *hla* для десяти исследованных штаммов *S. aureus* (табл. 3). Для семи штаммов *S. aureus*, которые относятся к клональным комплексам 1, 5, 15, 239, 121, последовательность гена *hla* при сравнении с последовательностью гена *hla* из штамма Mu50 имеет более 99% идентичности. Последовательность гена *hla* трёх штаммов *S. aureus*, относящихся к CC30, показала 95% идентичности по отношению к гену *hla* из штамма Mu50, что составляет 50 единичных нуклеотидных замен. Большая часть замен относится к синонимичным. Число несинонимичных замен равно четырём, одна из этих замен ведёт к нонсенс-мутации в позиции 113 транслированной последовательности гена *hla* (см. табл. 3). В регионах геномов восьми штаммов *S. aureus*, показавших отрицательные результаты в ПЦР на наличие гена *hnb*, выявлена инсерция профага phiSa3-типа в ген *hnb* (см. табл. 2). Два штамма *S. aureus* CC1 В-7905 и *S. aureus* CC15 В-7774 несут интактную последовательность гена *hnb*, идентичную последовательности гена *hnb* из генома штамма O46. Последовательности генов гамма- и дельта-токсинов проанализированы для геномов штаммов *S. aureus* с гемолизом типа А: Mu50, MRSA252, В-7438, В-7778. Последовательность гена дельта-токсина (138 п.о., 45 а.о.) обладает высокой консервативностью. Для всех четырех штаммов с гемолизом типа А гены дельта-токсина идентичны. Размер оперона гамма-токсина в геноме штамма *S. aureus* MRSA252 составляет 3405 п.о., включает гены *hlgA*, *hlgB*, *hlgC*. Геномы штаммов *S. aureus* CC30 В-7438 и В-7778 содержат идентичные последовательности оперона *hlg*, которые отличаются от последовательности *S. aureus* CC30 MRSA252 на один нуклеотид (несинонимичная замена). Идентичность нуклеотидной последовательности оперона *hlg* штаммов *S. aureus* CC5 Mu50 и *S. aureus* CC30 MRSA252 составляет 95%, при этом выявлено большое число несинонимичных замен.

Обсуждение. Простая и быстрая оценка вирулентности *S. aureus* при анализе эпидемического потенциала изолятов, выделенных во время расследования вспышек стафилокок-

Таблица 3
Сравнение транслированной последовательности гена *hla* штаммов *S. aureus*

Штамм / Кло-нальный тип	Вариабельные аминокислоты с номером позиции								Тип ге-молиза
	R4	I40	L78	Q113	T155	E234	S265	T301	
Mu50/CC5	A
B-7774/CC15	C
B-7904/CC1	.	F	.	.	.	D	.	.	B
B-7905/CC1	.	F	.	.	.	D	.	.	D
MW2/CC1	D	.	.	B
B-6838/CC239	H	D	.	I	B
B-7803/CC121	D	.	.	C
B-7438/CC30	.	.	I	*	S	.	T	.	A
B-7778/CC30	.	.	I	*	S	.	T	.	A
MRSA252/ CC30	.	.	I	*	S	.	T	.	A

ковой инфекции, является высоко востребованной. Использование фенотипического теста для оценки выглядит привлекательно, тем более, что существует достаточное количество данных, свидетельствующих о гемолизинах А и В, как факторах вирулентности *S. aureus*. Роль альфа-токсина в развитии лёгочной стафилококковой инфекции показана на мышинной модели гнойно-некротической пневмонии [19]. Фенотипический тест с определением активности альфа-токсина *S. aureus* по гемолизу на кровяном агаре предлагается использовать для прогноза развития такого заболевания, как вентилятор-ассоциированная пневмония [18]. Выявлена сложная система регуляции продукции альфа- и бета-токсинов, в которую вовлечены не менее 70 генов, влияющих на повышение или понижение экспрессии генов гемолизинов, вплоть до отсутствия таковой [2].

Различные клональные линии *S. aureus* могут иметь сильно отличающиеся уровни продукции токсинов, что, влияет на выраженность вирулентных свойств штаммов *S. aureus*. Использование в тестах неродственных клональных линий *S. aureus* следует признать необходимым условием для сравнительного исследования гемолитической активности и геномной структуры. В исследование включены клинические штаммы шести эпидемически значимых клональных комплексов *S. aureus*, ответственных за развитие широкого спектра инфекций. Вирулентность использованных в работе штаммов *S. aureus* подтверждается тем, что они являются возбудителями стафилококковых инфекций. Три известных референсных штамма MRSA из коллекции ATCC изолированы в Японии, Великобритании, США при тяжёлых инфекциях *S. aureus*, причём MRSA252 и MW2 выделены при септицемии, закончившейся смертью пациентов. Эти штаммы принадлежат к CC1, CC5, CC30. Семь штаммов *S. aureus* из Государственной коллекции патогенных микроорганизмов и клеточных культур (ГКПМ-Оболенск) ГНЦ ПМБ изолированы при вспышках стафилококковых инфекций в РФ (см. табл. 1). В их число входят штаммы *S. aureus* CC1 и CC30, выделенные во время острых кишечных инфекций, штаммы MSSA CC15 и CC121, изолированные при вспышках эксфолиативного дерматита новорожденных, штамм MRSA CC239, выделенный при госпитальной инфекции.

На первом этапе исследования проведено определение гемолитической активности на кровяном агаре с подтверждением результатов гемолиза в ПЦР-тесте. В гемолитическом тесте у четырех штаммов *S. aureus* CC5 и CC30 отсутствовал гемолиз. Пять штаммов *S. aureus*, принадлежащих к CC1, CC15, CC121, CC239, продемонстрировали бета-гемолиз (зо-

на гемолиза с полным лизисом). Один штамм *S. aureus* CC1 показал двойную зону гемолиза – альфа- и бета-гемолиз (зона бета-гемолиза дополнена широкой зоной неполного лизиса). Результаты ПЦР-теста не совпали с данными гемолитического теста. Для всех десяти штаммов *S. aureus* ПЦР-тест на ген *hla* оказался позитивным, а наличие гена *hnb* методом ПЦР выявлено только для двух штаммов *S. aureus* CC1 B-7905 и *S. aureus* CC15 B-7774 (см. табл. 2).

Сравнение последовательностей генов гемолизин-штаммов *S. aureus* позволило существенно прояснить наблюдаемую картину. Наибольший интерес для дальнейшего исследования представляли штаммы *S. aureus*, гемолиз у которых отсутствовал. Это штаммы *S. aureus* CC5 Mu50 и CC30 MRSA252, выделенные при тяжёлых внутрибольничных инфекциях, штаммы *S. aureus* CC30 B-7438 и CC30 B-7778, выделенные при массовых вспышках пищевой токсикоинфекции. Для штаммов *S. aureus* MRSA252, B-7438 и B-7778, установлено, что отсутствие гемолиза и отсутствие продукции альфа-токсина, связано с нонсенс-мутацией в гене *hla*. Такая мутация не может быть компенсирована каким-либо механизмом регуляции, что свидетельствует о том, что реализация вирулентных свойств этих штаммов не нуждается в альфа-токсине. Ген *hla* штамма *S. aureus* CC5 Mu50 не содержит в структурной части гена мутаций, препятствующих продукции токсина. Можно предположить, что отсутствие продукции альфа-токсина штаммом *S. aureus* CC5 Mu50 связано с негативной регуляцией. Отсутствие продукции бета-токсина в гемолитическом тесте для этих четырёх штаммов *S. aureus* объясняется инактивацией гена *hnb* при inserции бактериофага phiSa3-типа.

Штаммы *S. aureus* с подтверждённой продукцией альфа-токсина и отсутствием продукции бета-токсина, разделились на две группы по ширине зоны бета-гемолиза. Штаммы *S. aureus* с узкой зоной полного лизиса принадлежат к CC1 и CC239, изолированы при внутрибольничных инфекциях и пищевых токсикоинфекциях. Более широкая зона полного лизиса выявлена у штаммов *S. aureus* CC15 и CC121, выделенных при эксфолиативном дерматите новорожденных. В данном случае правомерно предположить, что различие в ширине зоны бета-гемолиза связано с клональным типом, что объясняется различиями в системе регуляции продукции альфа-токсина. В отношении продукции бета-токсина, полученные результаты коррелируют с данными литературы. У большинства клинических изолятов *S. aureus* ген *hnb* содержит вставку профага phiSa3 типа, что ведёт к негативной фаговой конверсии бета-токсина [20]. Inserция в ген *hnb* делает невозможным продукцию бета-токсина. На этой основе сделано предположение, что штаммы *S. aureus* определённых клональных линий не нуждаются в бета-токсине при развитии инвазивных инфекций человека. У девяти исследованных штаммов *S. aureus* активность бета-токсина в гемолитическом тесте отсутствовала. Из них восемь штаммов *S. aureus* содержат вставку профага phiSa3-типа, один штамм *S. aureus* CC15 B-7774 имеет интактный ген *hnb*, что, соответственно, позволяет допустить возможность негативной регуляции продукции токсина. Два штамма *S. aureus* CC1 B-7904 и B-7905, выделенные при вспышке пищевой токсикоинфекции, имеют идентичные геномы, за исключением гена *hnb*. Штамм *S. aureus* CC1 B-7904 имеет inserцию гена *hnb* профагом phiSa3-типа, что является его единственным отличием от штамма *S. aureus* CC1 B-7905 на уровне генома. Единственный из исследованных штаммов *S. aureus* B-7905 продуцирует альфа- и бета-токсины, что выражается в двойной зоне гемолиза – узкая зона полного лизиса и широкая зона неполного лизиса (см. рис. 1, D). Штамм *S. aureus* B-7904 с

негативной фаговой конверсией не продуцирует бета-токсин и демонстрирует узкую зону полного лизиса (см. рис 1, В). В данном случае, постановка гемолитического теста визуализирует акт генетической перестройки генома.

По данным гемолитического теста из 10 клинических штаммов *S. aureus*, девять не продуцируют бета-токсин и, четыре из них, не продуцируют и альфа-токсин. Штаммы *S. aureus* с инсерцией гена *hlyB* имеют более сложную регуляцию продукции бета-токсина в процессе развития инфекции, чем следует из гемолитического теста. Для референсного вирулентного штамма *S. aureus* MW2 продемонстрирована высокая частота точной эксцизии бактериофага phiSa3 из хромосома в условиях *in vivo*, но не *in vitro* [5]. При эксцизии фага phiSa3 продукция бета-токсина восстанавливалась, что позволило штамму *S. aureus* MW2 в эксперименте успешно колонизировать кожу экспериментальных животных. Часть популяции *S. aureus* с инсерцией гена *hlyB* при инфекции может продуцировать токсин. Насколько данный механизм является распространённым среди штаммов *S. aureus* с интеграцией профага в гене *hlyB* неизвестно.

У штаммов *S. aureus* MRSA252, B-7438 и B-7778, показавших отрицательный результат в тесте на гемолиз, после дополнительной инкубации при 10° С появились участки со слабым проявлением неполного гемолиза зеленоватого цвета (см. рис. 1, А). Возможно, в данном случае наблюдается случай спонтанной продукции бета-гемолизина частью популяции, либо частичный гемолиз связан с продукцией гамма- или дельта-токсинов.

Заключение. Сопоставление информации о вирулентности штаммов *S. aureus* и результатов фенотипического определения гемолитической активности не подтверждают возможности оценки вирулентности изолятов *S. aureus* по продукции альфа- и бета-гемолизинов *in vitro*. У части вирулентных штаммов *S. aureus*, использованных в исследовании, отсутствует гемолиз в тесте на гемолитическую активность. Фенотипическое определение гемолиза на поверхности питательной среды может не соответствовать реальной продукции токсина при развитии инфекционного процесса. Исследования продукции гемолизинов *in vitro* недостаточно информативны для определения клинической роли штаммов *S. aureus*.

Финансирование. Исследование выполнено в рамках научно-исследовательской работы Роспотребнадзора.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА (пп. 1–9, 11–14, 16–20 см. REFERENCES)

10. Граничная Н.В., Зайцева Е.А., Бондарь В.Ю. Фенотипическая характеристика биологических свойств коагулазонегативных стафилококков, выделенных в кардиохирургическом стационаре. *Альманах клинической медицины*. 2017; 45 (2): 127-32.
15. Абаев И.В., Скрябин Ю.П., Кисличкина А.А., Коробова О.В., Мицевич И.П., Мухина Т.Н. и др. Геномный анализ штаммов *Staphylococcus aureus* клональной линии 30 — возбудителей пищевой инфекции в Российской Федерации. *Вестник РАМН*. 2017; 72 (5): 346-54.

REFERENCES

1. Lowy F.D. *Staphylococcus aureus* infections. *N. Engl. J. Med.* 1998; 339 (8): 520-32.
2. Burnside K., Lembo A., de Los Reyes M., Pliuk A., Binhtran N.T., Connelly J.E. et al. Regulation of hemolysin expression and virulence of *Staphylococcus aureus* by a serine/threonine kinase and phosphatase. *PLoS One*. 2010; 5 (6): e11071.
3. Bubeck Wardenburg J., Patel R.J., Schneewind O. Surface proteins

- and exotoxins are required for the pathogenesis of *Staphylococcus aureus* pneumonia. *Infect. Immun.* 2007; 75 (2): 1040-4.
4. Sharma-Kuinkel B.K., Wu Y., Tabor D.E., Mok H., Sellman B.R., Jenkins A. et al. Characterization of alpha-toxin hlyA gene variants, alpha-toxin expression levels, and levels of antibody to alpha-toxin in hemodialysis and postsurgical patients with *Staphylococcus aureus* bacteremia. *J. Clin. Microbiol.* 2015; 53 (1): 227-36.
 5. Katayama Y., Baba T., Sekine M., Fukuda M., Hiramatsu K. Beta-hemolysin promotes skin colonization by *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.* 2013; 195 (6): 1194-203.
 6. Hayashida A., Bartlett A.H., Foster T.J., Park P.W. *Staphylococcus aureus* beta-toxin induces lung injury through syndecan-1. *Am. J. Pathol.* 2009; 174 (2): 509-18.
 7. Carroll J.D., Cafferkey M.T., Coleman D.C. Serotype F double- and triple-converting phage insertionally inactivate the *Staphylococcus aureus* beta-toxin determinant by a common molecular mechanism. *FEMS Microbiol. Lett.* 1993; 106 (2): 147-55.
 8. Dinges M.M., Orwin P.M., Schlievert P.M. Exotoxins of *Staphylococcus aureus*. *Clin. Microbiol. Rev.* 2000; 13 (1): 16-34.
 9. Peng H.L., Novick R.P., Kreiswirth B., Kornblum J., Schlievert P. Cloning, characterization, and sequencing of an accessory gene regulator (*agr*) in *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.* 1988; 170 (9): 4365-72.
 10. Granichnaya N.V., Zaitseva E.A., Bondar V.Y. Phenotypic characterization of the biological properties of coagulase-negative staphylococci isolated in a cardiac surgery department. *Al'manakh klinicheskoy meditsiny*. 2017; 45 (2): 127-32. (in Russian)
 11. Vandana S., Raje M., Krishnasastry M.V. The role of the amino terminus in the kinetics and assembly of alpha-hemolysin of *Staphylococcus aureus*. *J. Biol. Chem.* 1973; 272 (40): 24858-63.
 12. Fei Y., Hongjun Y., Hong-Bin H., Changfa W., Yundong G., Qifeng Z. et al. Study on haemolysin phenotype and the genotype distribution of *Staphylococcus aureus* caused bovine mastitis in Shandong dairy farms. *Int. J. Appl. Res. Vet. Med.* 2011; 9 (4): 416-421.
 13. Baba T., Takeuchi F., Kuroda M., Yuzawa H., Aoki K., Oguchi A. et al. Genome and virulence determinants of high virulence community-acquired MRSA. *Lancet*. 2002; 359 (9320): 1819-27.
 14. Holden M.T., Feil E.J., Lindsay J.A. Complete genomes of two clinical *Staphylococcus aureus* strains: evidence for the rapid evolution of virulence and drug resistance. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2004; 101 (26): 9786-91.
 15. Aбаев И.В., Скрябин Ю.П., Кисличкина А.А., Коробова О.В., Мицевич И.П., Мухина Т.Н. et al. Genomic analysis of food-borne *Staphylococcus aureus* CC30 strains in the Russian Federation. *Vestnik Rossiiskoi Akademii Meditsinskikh Nauk*. 2017; 72 (5): 346-54. (in Russian)
 16. Aбаев И., Скрябин Ю., Кисличкина А., Богун А., Коробова О., Dyatlov I. Draft Genome Sequences of Eight *Staphylococcus aureus* Strains Isolated during Foodborne Outbreaks. *Genome Announc.* 2018; 6 (5): e01557-17.
 17. Aбаев И., Скрябин Ю., Кисличкина А., Богун А., Коробова О., Mayskaya N. et al. Draft Genome Sequences of Exfoliative Toxin A-Producing *Staphylococcus aureus* Strains B-7772 and B-7777 (CC8/ST2993) and B-7774 (CC15/ST2126), Isolated in a Maternity Hospital in the Central Federal District of Russia. *Genome Announc.* 2016; 4 (2): e00064-16.
 18. Stulik L., Malafa S., Hudcova J., Rouha H., Henics B.Z., Craven D.E. et al. α -Hemolysin activity of methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* predicts ventilator-associated pneumonia. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 2014; 190 (10): 1139-48.
 19. Keibaer C., Chamberland R.R., Allen I.C., Gao X., Broglie P.M., Hall J.D. et al. *Staphylococcus aureus* α -hemolysin mediates virulence in a murine model of severe pneumonia through activation of the NLRP3 inflammasome. *J. Infect. Dis.* 2012; 205 (5): 807-17.
 20. Lowder B.V., Guinane C.M., Ben Zakour N.L., Weinert L.A., Conway-Morris A., Cartwright R.A. et al. Recent human-to-poultry host jump, adaptation, and pandemic spread of *Staphylococcus aureus*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2009; 106 (46): 19545-50.

Поступила 28.03.19

Принята к печати 05.04.19

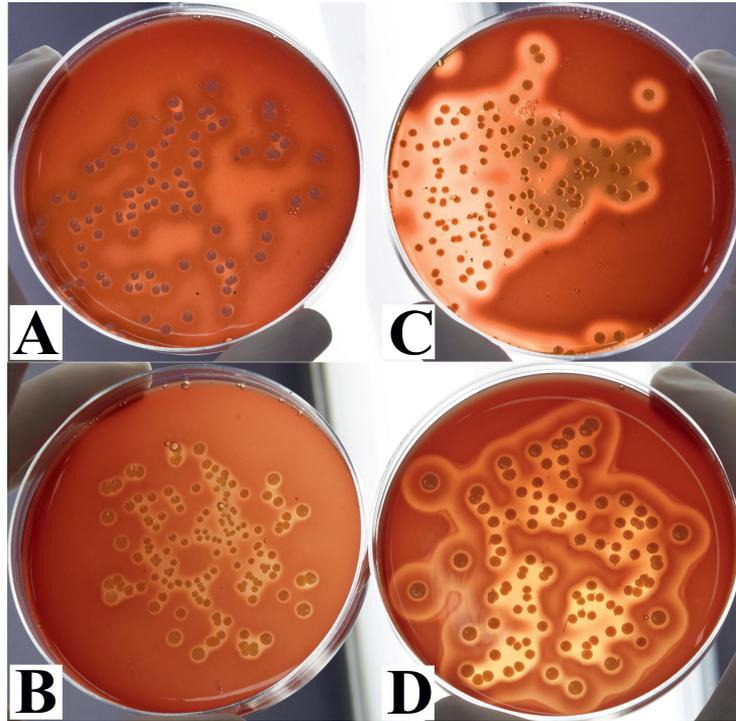


Рис. 1. Результаты теста штаммов *S. aureus* на гемолитическую активность на среде МПА с добавлением 5% бараньей крови при 48 часовой инкубации при 37° С и дополнительной инкубации в течение 24 ч при 10° С: А - *S. aureus* MRSA252; В - *S. aureus* В-7904; С - *S. aureus* В-7803; D - *S. aureus* В-7905.

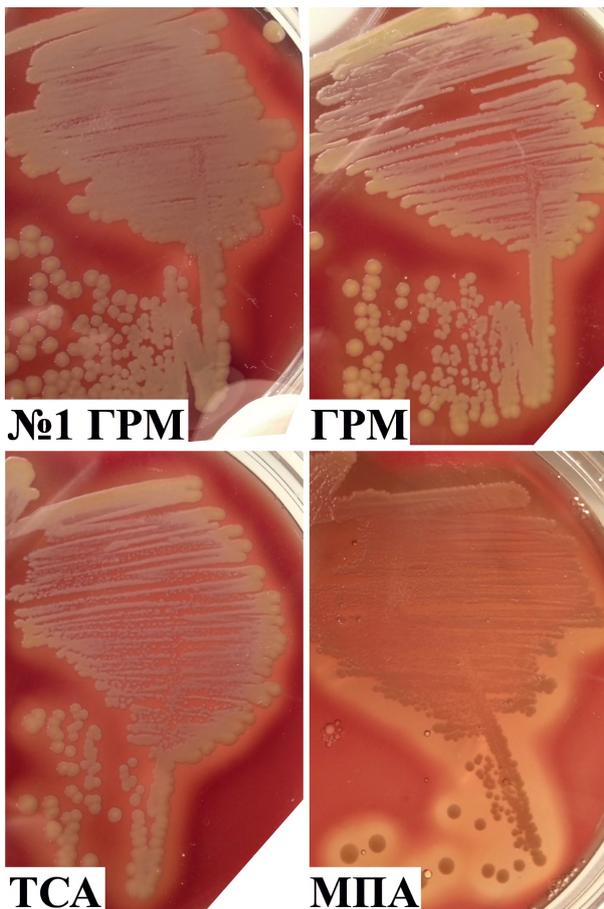


Рис. 2. Тест на гемолитическую активность штамма *S. aureus* В-7803, вариант гемолиза С, на четырех типах среды с добавлением 5% бараньей крови: среда №1, ТСА, ГРМ-агар, МПА.



Рис. 3. Тест на гемолитическую активность контрольного штамма *S. aureus* ATCC 10832 (Wood 46) на МПА с добавлением 5% бараньей крови. Зона гемолиза соответствует варианту С.