

И.В. Абаев, Ю.П. Скрябин, А.А. Кисличкина, О.В. Коробова, И.П. Мицевич,  
Т.Н. Мухина, А.Г. Богун, И.А. Дятлов

Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии,  
Оболенск, Российская Федерация

## Геномный анализ штаммов *Staphylococcus aureus* клональной линии 30 — возбудителей пищевой инфекции в Российской Федерации

Штаммы *Staphylococcus aureus* клонального комплекса 30 (СС30) являются возбудителями нозокомиальных/внебольничных инвазивных инфекций и возбудителями стафилококковых пищевых токсикоинфекций (ПТИ). В последние годы в России выявлены массовые вспышки ПТИ, вызванные штаммами *S. aureus* СС30, с тяжелым течением инфекции у контингента, не ассоциированного с группами риска. **Цель исследования** — сравнительный геномный анализ штаммов *S. aureus* СС30, выделенных при массовых вспышках ПТИ в Российской Федерации: *S. aureus* В-7738/В-7739 (Санкт-Петербург, 2013) и *S. aureus* В-7778/В-7779 (молодежный форум «Селигер», 2014); определение их филогенетической связи с геномами *S. aureus* СС30, депонированными в GenBank. **Методы.** Культуры *S. aureus*, выделенные при вспышке ПТИ на форуме «Селигер-2014», исследовали методами полимеразной цепной реакции и сиквенс-типирования. Штаммы *S. aureus* В-7778 и В-7779 изолировали от заболевших и от сотрудников пищеблока соответственно с последующим полногеномным секвенированием и филогенетическим анализом. Продукцию энтеротоксинов определяли с помощью иммуоферментного анализа. **Результаты.** Штаммы *S. aureus* В-7778 и *S. aureus* В-7779 (Селигер-2014) идентичны по нуклеотидному составу, принадлежат к *sra*-типу t122 и сиквенс-типу 30, несут комплекс генов токсинов, ответственных за развитие пищевой токсикоинфекции. Выделение и идентификация штаммов *S. aureus* В-7738/В-7739 (СС30, ST30, *sra*-t2509) в Санкт-Петербурге в 2013 г. были описаны ранее. Геномы штаммов *S. aureus* В-7738/В-7739 и *S. aureus* В-7778/В-7779 сравнивали методом полногеномного SNP-типирования с 67 геномными последовательностями *S. aureus* СС30, представленными в GenBank. Показано, что штаммы *S. aureus* В-7738/В-7739 и *S. aureus* В-7778/В-7779 принадлежат к различным кластерам третьей «актуальной» клады СС30. Согласно SNP-анализу коровой части генома, штаммы *S. aureus* В-7738/В-7739 близки к типовому штамму *S. aureus* Vtn1260, тогда как для штаммов *S. aureus* В-7778/В-7779 показана филогенетическая обособленность среди геномов третьей клады *S. aureus* СС30. Подтверждена продукция этиологического фактора ПТИ — энтеротоксина А — штаммами *S. aureus* В-7738/В-7739 и В-7778/В-7779. **Заключение.** Проведен первый геномный анализ выделенных на территории Российской Федерации штаммов *S. aureus* — возбудителей пищевой инфекции. Выявлены и охарактеризованы два различных генетических клона *S. aureus* СС30, способных вызывать массовые вспышки ПТИ с тяжелым течением инфекции у контингента, не ассоциированного с группами риска. Геномы штаммов *S. aureus* В-7778/В-7779 (Селигер-2014) при SNP-типировании демонстрируют генетическую специфичность среди штаммов *S. aureus* СС30, депонированных в GenBank. Полногеномные последовательности штаммов *S. aureus* будут использованы в дальнейшем для генетического анализа циркулирующих в России через пищевую цепь клонов золотистого стафилококка.

**Ключевые слова:** *Staphylococcus aureus*, пищевая токсикоинфекция, полногеномный филогенетический анализ, однонуклеотидные полиморфизмы.

(Для цитирования: Абаев И.В., Скрябин Ю.П., Кисличкина А.А., Коробова О.В., Мицевич И.П., Мухина Т.Н., Богун А.Г., Дятлов И.А. Геномный анализ штаммов *Staphylococcus aureus* клональной линии 30 — возбудителей пищевой инфекции в Российской Федерации. *Вестник РАМН*. 2017;72 (5):346–354. doi: 10.15690/vramn889)

### Обоснование

Бактерия *Staphylococcus aureus* является распространенным комменсалом кожи и носоглотки человека, при этом способна вызывать широкий спектр инфекционных заболеваний человека — от неосложненных кожных инфекций до таких тяжелых патологий, как пневмония, остеомиелит, эндокардит, сепсис и др. [1]. Среди наиболее распространенных инфекций *S. aureus* выделяются пищевые токсикоинфекции (ПТИ), связанные с токсигенными штаммами *S. aureus* [2], способными продуцировать один или более стафилококковых энтеротоксинов. Клиническая картина ПТИ развивается в течение нескольких часов после употребления контаминированной термостабильными энтеротоксинами пищи и связана с поражением верхних отделов желудочно-кишечного тракта [3]. Основные симптомы заболевания включают тошноту, сильную рвоту, абдоминальные боли и повы-

шенное слюноотделение, сопровождаемые/не сопровождаемые диареей. При сильной потере жидкости может произойти обезвоживание организма и понижение артериального давления [4]. Как правило, стафилококковые ПТИ без лечения проходят в течение 24–48 ч после первых симптомов, но нередко протекают в тяжелой форме, что особенно характерно для групп риска — детей, людей старшего возраста и иммунокомпрометированных пациентов. По частоте встречаемости стафилококковые ПТИ занимают третье место в мире среди всех пищевых инфекций [5]. Данные по статистике стафилококковых ПТИ в России недоступны. В качестве примера можно привести Европейский союз, где в 2015 г. были зарегистрированы 434 вспышки стафилококковых ПТИ [6]. Считается, что реальная частота стафилококковых ПТИ сильно занижена, поскольку из-за ошибочного диагноза многочисленных спорадических эпизодов и небольшие вспышки не учитываются.

Среди возбудителей ПТИ преобладают метициллин-чувствительные штаммы *S. aureus* (Methicillin-sensitive *Staphylococcus aureus*, MSSA) по сравнению с метициллин-резистентными штаммами *S. aureus* (Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, MRSA), что, по-видимому, связано с отсутствием прямого селективного давления антибиотиков. Эволюционная активность золотистого стафилококка в последние десятилетия отмечена появлением новых клинически важных штаммов *S. aureus*, происхождение которых связано с мясным и молочным производством, что подчеркивает важность мониторинга клонов *S. aureus*, циркулирующих через пищевую цепь. Установлено, что ПТИ ассоциируются с определенными клональными группами *S. aureus* [7], в частности со штаммами клонального комплекса (Clonal complex, CC) 30. *S. aureus* CC30 — одна из наиболее распространенных клональных линий, связанных с вне- и внутрибольничными инфекциями [8]. Показана высокая эволюционная изменчивость генома CC30, что проявляется в способности адаптироваться к новым экологическим нишам. Исследования геномной структуры *S. aureus* CC30 позволили выявить в пределах клонального комплекса три монофилогенетических группы, клады с различной степенью адаптивной изменчивости и, в частности, с различным набором мобильных генетических элементов и генов вирулентности [9]. Первая клада объединяет штаммы клональной линии фагового типа 80/81, связанные с известным с середины 60-х годов пандемическим клоном MRSA. Во вторую кладу входят внутригоспитальные штаммы MRSA, которые характеризуются гипервирулентностью в экспериментах на модельных животных. Третья клада CC30 включает актуальные в современной медицине инвазивные штаммы *S. aureus*, ассоциированные прежде всего с такими инфекциями, как сепсис и персистирующая бактериемия.

Среди многочисленных опубликованных геномных последовательностей штаммов *S. aureus*, выделен-

ных в России, отсутствуют геномы штаммов *S. aureus* CC30 и штаммов *S. aureus* — возбудителей ПТИ. Следует отметить, что среди геномов штаммов *S. aureus* CC30, представленных в GenBank\*, отсутствуют штаммы *S. aureus*, охарактеризованные как этиологические агенты ПТИ.

В данной работе описано выделение штаммов *S. aureus* B-7778 и B-7779 при расследовании массовой вспышки ПТИ на молодежном форуме «Селигер» в Тверской области в июле 2014 г. Методами сиквенс-типирования была установлена принадлежность штаммов *S. aureus* B-7778 и B-7779 к генетической линии CC30. Этой же генетической линии принадлежат штаммы *S. aureus* B-7738 и B-7739, изолированные при расследовании массовой вспышки ПТИ в Санкт-Петербурге в 2013 г. Выделение и идентификация штаммов *S. aureus* B-7738 и B-7739 были опубликованы нами ранее [10]. Характерной особенностью вспышек в Санкт-Петербурге и на молодежном форуме «Селигер» являлась тяжелая форма ПТИ у контингента, не связанного с группами риска при кишечных заболеваниях.

**Цель исследования** — сравнительный геномный анализ штаммов *S. aureus* CC30, выделенных при массовых вспышках ПТИ в Российской Федерации: *S. aureus* B-7738/B-7739 (Санкт-Петербург, 2013) и *S. au-*

\* GenBank — база данных, находящаяся в открытом доступе, содержащая все аннотированные последовательности ДНК и РНК, а также последовательности закодированных в них белков. GenBank поддерживается Национальным центром биотехнологической информации США (NCBI), входящим в состав Национальных институтов здоровья в США, и доступен на бесплатной основе исследователям всего мира. GenBank получает и объединяет полученные в разных лабораториях данные более чем для 100 000 различных организмов.

I.V. Abaev, Yu.P. Skryabin, A.A. Kislichkina, O.V. Korobova, I.P. Mitsevich,  
T.N. Mukhina, A.G. Bogun, I.A. Dyatlov

State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology, Obolensk, Russian Federation

## Genomic Analysis of Food-Borne *Staphylococcus aureus* CC30 Strains in the Russian Federation

*Staphylococcus aureus* clonal complex (CC) 30 are associated with hospital-acquired and community-associated invasive infections and may cause outbreaks of staphylococcal food-borne infections (SFI). In recent years, severe SFI outbreaks caused by *S. aureus* CC30 in cohorts not linked to high-risk groups have been detected in Russia. **Aim:** The aim of the study is to conduct a comparative genomic analysis of *S. aureus* strains B-7778 and B-7779 isolated during widespread SFI outbreak at the International Youth Forum Seliger in 2014, and *S. aureus* strains B-7738 and B-7739 isolated during widespread SFI outbreak among construction personnel in Saint Petersburg in 2013. **Methods:** Seliger-2014 *S. aureus* cultures were screened by PCR and sequence typing. *S. aureus* strains B-7778 and B-7779 were isolated from clinic material and from food handlers, respectively. Draft genome sequencing and phylogenetic analysis of *S. aureus* strains B-7778 and B-7779 were carried out. The production of enterotoxin A was determined by the enzyme immunoassay. **Results:** *S. aureus* strain B-7778 isolated from 38 patients and *S. aureus* strain B-7779 isolated from two food handlers at the Forum Seliger-2014 have identical nucleotide sequences, belong to spa-type t122 and sequence-type 30, and carry a set of toxin genes being responsible for SFI manifestations. The core-genome SNP typing has shown that *S. aureus* B-7738/ B-7739 (St. Petersburg, 2013) and *S. aureus* B-7778/ B-7779 (Seliger, 2014) belong to different clusters of *S. aureus* CC30 clade 3. *S. aureus* B-7778/ B-7779 not closely related with major clusters of *S. aureus* CC30. The production of enterotoxin A, SFI etiological factor, by *S. aureus* strains B-7738, B-7739, B-7778, and B-7779 has been confirmed. **Conclusion:** The genomic analysis of SFI-associated *S. aureus* strains isolated in Russia has been conducted for the first time. Two different genetic clones of *S. aureus* CC30 which are able to cause severe SFI outbreaks in cohorts not linked to high-risk groups have been identified and characterized. SNP typing of Seliger-2014 *S. aureus* genomes has revealed their genetic specificity among known strains of *S. aureus* CC30. Identified genome sequences of SFI-associated strains will be used for further studies *S. aureus* clones circulating through the food chain in Russia.

**Key words:** *Staphylococcus aureus*, Foodborne Diseases, Genome Phylogenetic Analysis, Single Nucleotide Polymorphism.

(For citation: Abaev IV, Skryabin YuP, Kislichkina AA, Korobova OV, Mitsevich IP, Mukhina TN, Bogun AG, Dyatlov IA. Genomic Analysis of Food-Borne *Staphylococcus aureus* CC30 Strains in the Russian Federation. *Annals of the Russian Academy of Medical Sciences*. 2017;72 (5):346–354. doi: 10.15690/vramn889)

*reus* В-7778/В-7779 (молодежный форум «Селигер», 2014); определение их филогенетической связи с геномами *S. aureus* СС30, депонированными в GenBank.

## Методы

### Дизайн исследования

Проведено одномоментное наблюдательное неконтролируемое моноцентровое исследование.

### Критерии соответствия

В исследование были включены все изоляты *S. aureus*, выделенные при вспышке острой кишечной инфекции на молодежном форуме «Селигер» в июле 2014 г., и штаммы *S. aureus* В-7738 и В-7739, выделенные при вспышке ПТИ в Санкт-Петербурге в 2013 г.

### Условия проведения

Исследование проведено в Государственном научном центре прикладной микробиологии и биотехнологии (Оболенск).

### Продолжительность исследования

Включенные в исследование изоляты *S. aureus* были выделены в процессе расследования вспышки ПТИ на молодежном форуме «Селигер» с 20 по 30 июля 2014 г.

### Исходы исследования

Изоляты *S. aureus* генотипировали методом анализа полиморфизма длин рестриционных фрагментов продуктов амплификации переменного региона коагуляционного гена (*coa*-ПЦР-ПДРФ) и методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) со специфическими олигонуклеотидными праймерами. При сиквенс-типировании анализировали последовательность ампликонов. По результатам генотипического анализа идентифицировали штаммы *S. aureus* — возможные возбудители ПТИ, для которых определяли геномную нуклеотидную последовательность и проводили полногеномный филогенетический анализ.

### Методы регистрации исходов

В исследовании использовали изолированные во время вспышки ПТИ в Российской Федерации в 2013 г. штаммы *S. aureus* В-7738 и В-7739 из Государственной коллекции патогенных микроорганизмов и клеточных культур «ГКПМ-Оболенск», а также референсные штаммы *S. aureus* из Американской коллекции типовых культур (ATCC): MRSA252 (ATCC BAA-1720), MSSA476 (ATCC BAA-1721), Mu50 (ATCC 700699), MW2 (ATCC BAA-1707), USA300\_TCH1516 (ATCC BAA-1717).

Видовую идентификацию микроорганизмов выполняли с помощью системы MALDI Biotyper (Bruker, Франция). Для определения чувствительности к антибиотикам использовали систему Vitec-2 (bioMérieux, Франция), включая следующие маркеры: бензилпенициллин, ванкомицин, гентамицин, клиндамицин, линезолид, левофлоксацин, моксифлоксацин, мупироцин, нитрофурантоин, оксациллин, рифампицин, тобрамицин, тейкопланин, тетрациклин, тайгетциклин, триметоприм/сульфаметоксазол, фосфомицин, фузидовая кислота, эритромицин.

Выделение тотальной ДНК штаммов *S. aureus* для ПЦР проводили с использованием набора GeneJET Genomic DNA Purification Kit (Thermo Fisher Scientific, США) согласно инструкции производителя.

Генотипирование исследуемых образцов выполнили методом ПЦР и сиквенс-типирования. При типировании определяли последовательность переменного региона гена белка А согласно инструкциям сервера Ridom SpaServer (<http://spaserver.ridom.de/>). Мультилокусное сиквенс-типирование (Multi-locus sequence typing, MLST) штаммов *S. aureus* провели в соответствии с данными сервера saureus.mlst.net (<http://www.saureus.mlst.net/>). Для определения генов энтеротоксинов А, В, С, D, Е; генов энтеротоксинподобных белков Q, I, M, N, O, U; гена токсина синдрома токсического шока, генов  $\alpha$ - и  $\beta$ -гемолизина, генов лейкоцидина Пантона–Валентайна и лейкоцидина lukED использовали специфические олигонуклеотидные праймеры [11–14].

*Coa*-ПЦР-ПДРФ анализ осуществляли по методике Hooke с использованием рестрикционной эндонуклеазы AluI [15]. *Coa*-ПЦР-ПДРФ паттерны представляли в виде цифрового кода: первое число соответствует размеру ПЦР продукта, затем указаны размеры рестриционных AluI-фрагментов.

Имуноферментный анализ для отдельного определения стафилококковых энтеротоксинов с помощью набора Ridascreen SET A, B, C, D, E (R-Biopharm AG, Германия) (<http://www.r-biopharm.com/products/food-feed-analysis/microbiology-hygiene/staphylococcal-enterotoxin-set/item/ridascreen-set-abcde>) проводили согласно Методическим указаниям 4.2.2429-08 [16]. В качестве положительного контроля использовали продуценты энтеротоксина А штаммы *S. aureus* MRSA252 и MW2, в качестве отрицательного контроля — штаммы *S. aureus* MSSA476 и USA300\_TCH1516.

Геномную ДНК штаммов *S. aureus* выделяли с использованием цетилтриметиламмония бромида [17]. Геномные библиотеки готовили с помощью набора Ion Plus Fragment Library Kit (Life Technologies, США). Секвенирование полученных геномных библиотек осуществляли на платформе Ion Torrent PGM (Life Technologies) с использованием чипа Ion 318™ Chip Kit (Life Technologies) и набора Ion PGM 400 Sequencing Kit (Life Technologies) согласно инструкциям фирмы-производителя (<http://ioncommunity.lifetechnologies.com>). Для сборки и аннотации использовали программу-ассемблер Newbler 2.9 (Roche, Швейцария) (<http://www.454.com/products/analysis-software/>) и сервер NCBI Prokaryotic Genome Annotation Pipeline [18].

Оценку межгеномной дистанции полногеномных последовательностей проводили на сервере Genome-to-Genome Distance Calculator (GGDC) (<http://ggdc.dsmz.de/>) [19]. Филогенетический анализ штаммов *S. aureus* выполняли с помощью полногеномного типирования, основанного на определении однонуклеотидных полиморфизмов (Single Nucleotide Polymorphism, SNP) в коровой части генома. Для этого использовали программы Wombac 2.0 (<https://github.com/tseemann/wombac>) и MEGA 7.0 [20]. Филогенетические связи определяли с использованием метода ближайшего соседа (Neighbor-joining) [21]. При формировании дерева длины ветвей соответствовали эволюционным дистанциям между штаммами. Эволюционные дистанции вычислены с использованием метода максимального правдоподобия (Maximum composite likelihood) [22] и пропорциональны числу SNP.

### Статистический анализ

**Принципы расчета размера выборки:** размер выборки предварительно не рассчитывался.

**Методы статистического анализа данных:** статистический анализ результатов не проводился, за исключением

общей количественной характеристики результатов методами описательной статистики.

## Результаты

### Объекты (участники) исследования

В июле 2014 г. при вспышке острой кишечной инфекции во время проведения молодежного форума «Селигер-2014» за медицинской помощью обратились 145 человек. Из числа обратившихся было госпитализировано 38 пациентов с клиническими симптомами, включавшими многократные рвоту и диарею, головокружение, судороги и головную боль. Из клинических образцов госпитализированных участников (фекальные массы) и сотрудников пищеблока (биоматериал из носоглотки и с поверхности рук) были получены микробные культуры, которые использовали для дальнейшего анализа.

### Основные результаты исследования

#### Идентификация штаммов *S. aureus* В-7778 и В-7779 как этиологических агентов пищевых токсикоинфекций

Всего было изолировано 38 культур *S. aureus*, выделенных от заболевших участников форума «Селигер-2014» и 26 культур *S. aureus*, выделенных от сотрудников пищеблока форума «Селигер-2014». Все изоляты, кроме одного, были определены как MSSA и обладали чувствительностью ко всем исследованным лекарственным препаратам, за исключением бензилпенициллина. Изолят MRSA, полученный от сотрудника пищеблока, обладал устойчивостью к бензилпеницилину и оксациллину.

Для подтверждения стафилококковой природы острой кишечной инфекции была проведена идентификация штамма *S. aureus* — возможного возбудителя вспышки ПТИ. Для этого все полученные изоляты *S. aureus* исследовали методом *coa*-ПЦР-ПДРФ и тестировали на наличие генов суперантигенов и других генов вирулентности. При исследовании методом *coa*-ПЦР-ПДРФ для всех 38 изолятов, выделенных от заболевших участников форума «Селигер-2014», был идентифицирован единственный вариант ПДРФ паттерна — 433/219;214. Среди 26 изолятов, выделенных от сотрудников пищеблока, определено 10 вариантов *coa*-ПЦР-ПДРФ паттернов, причем один из вариантов был идентичен *coa*-ПЦР-ПДРФ паттерну 433/219;214, выделенному от заболевших. Изоляты *S. aureus* с вариантами *coa*-ПЦР-ПДРФ паттернов 433/219;214; 514/291,214,81; 676/243,219,214, выделенные от сотрудников пищеблока, показали наличие генов суперантигенов — энтеротоксина А (*sea*) и токсина синдрома токсического шока (*tst*). Единственный изолят с генотипом MRSA и паттерном 595/381;214 несет ген *tst*, но не *sea*. Остальные 19 изолятов, выделенные от сотрудников пищеблока, не содержали в составе генома генов суперантигенов (табл. 1).

Таблица 1. Генетические варианты изолятов *S. aureus*, выделенные при вспышке пищевой токсикоинфекции на форуме «Селигер-2014»

Изоляты (число)	<i>coa</i> -ПЦР-ПДРФ паттерны	Маркеры	Генотип
От заболевших (38)	433/219;214	<i>sea</i> , <i>tst</i> , MSSA	t122, ST30, CC30
От сотрудников (2)	433/219;214	<i>sea</i> , <i>tst</i> , MSSA	t122, ST30, CC30
От сотрудников (2)	514/291,214,81	<i>sea</i> , <i>tst</i> , MSSA	t012, ST30, CC30
От сотрудников (2)	676/243,219,214	<i>sea</i> , <i>tst</i> , MSSA	t9413, ST60, CC22
От сотрудников (1)	595/381;214	<i>tst</i> , MRSA	t1671, ST28, CC25
От сотрудников (19)	6 вариантов паттернов	MSSA	н/д

Примечание. н/д — нет данных.

Для изолятов *S. aureus* с *coa*-ПЦР-ПДРФ паттернами 433/219;214; 514/291,214,81; 595/381;214; 676/243,219,214 выполнили *spa*-типирование и определили сиквенс-тип (Sequence type, ST). Генотип изолятов от заболевших и сотрудников с ПДРФ паттерном 433/219;214 был установлен как *spa*-тип t122 и ST30. В составе генома изолятов *S. aureus* с паттерном 433/219;214 были выявлены гены энтеротоксинподобных белков Q, I, M, N, O, U и показано отсутствие генов энтеротоксинов В, С, D и Е, генов лейкоцидина Пантона–Валентайна и лейкоцидина lukED. Согласно вышеприведенным данным, все изоляты, выделенные от заболевших, обладают идентичным генотипом и могут быть отнесены к штамму *S. aureus* В-7778 с генотипом CC30, ST30, t122, *sea*, *tst*. Два изолята, выделенные от сотрудников пищеблока, с ПДРФ паттерном 433/219;214 относятся к близкородственному (или идентичному) штамму *S. aureus* В-7779 с генотипом CC30, ST30, t122, *sea*, *tst*. Другие генотипы изолятов *S. aureus*, выделенные от сотрудников пищеблока, с ПДРФ паттернами 514/291,214,81 и 676/243,219,214 соответствовали *spa*-типу t012 и ST30 и *spa*-типу t9413 и ST22 соответственно (см. табл. 1). Для изолята MRSA определены *spa*-тип t1671 и ST28.

#### Определение продукции энтеротоксина А штаммами *S. aureus* В-7778 и В-7779

Штаммы *S. aureus* CC30 В-7778 и В-7779, выделенные при расследовании вспышки ПТИ на молодежном форуме «Селигер-2014», и *S. aureus* В-7738 и В-7739, изолированные во время вспышки ПТИ в Санкт-Петербурге в 2013 г., исследовали на продукцию энтеротоксинов с помощью теста Ridascreen SET A, B, C, D, E (R-Biopharm AG, Германия). Во внклеточной фракции, продуцируемой указанными штаммами, установлено присутствие SEA. Другие «классические» энтеротоксины (В, С, D или Е) не выявлены.

#### Полногеномное секвенирование штаммов *S. aureus* В-7778 и В-7779

Полногеномное секвенирование штаммов *S. aureus* В-7778 и В-7779 проводили на платформе Ion Torrent PGM с использованием чипа Ion 318 Chip Kit и химии Ion PGM Reagents 400 Kit (Life Technologies, США). Всего было получено 705 890 и 1 354 128 ридов с покрытием ×54 и ×112 соответственно. В программе Newbler 2.9 (Roche, Швейцария) для геномов штаммов В-7778 и В-7779 было собрано 80 и 72 контигов соответственно с размерами контигов более 200 пар нуклеотидов. G+C состав геномов составляет 32,7%. Аннотацию провели с использованием программы NCBI Prokaryotic Genome Annotation Pipeline. Полногеномные последовательности штаммов *S. aureus* В-7778 и В-7779, а также ранее полученные полногеномные последовательности штаммов *S. aureus* В-7738 и В-7739 были депонированы в базе данных NCBI GenBank (табл. 2). В табл. 2 приведена информация, свя-

Таблица 2. Аннотированные геномы *S. aureus* В-7738, В-7739, В-7778 и В-7779

Штамм	Источник выделения	Контиги	Гены	ОРС	Рег. номер
В-7738	Пищевой продукт	75	2,859	2,798	LWRA00000000
В-7739	Клинические выделения	94	2,869	2,804	LWRB00000000
В-7778	Клинические выделения	80	2,809	2,744	LWRC00000000
В-7779	Биоматериал сотрудников пищеблока	72	2,809	2,744	LWRD00000000

Примечание. ОРС — открытые рамки считывания.

званная с аннотированными геномами: источник выделения штамма *S. aureus*, общее число контигов с размерами более 200 пар нуклеотидов, общее число генов, число открытых рамок считывания (ОРС), регистрационный номер в базе данных NCBI GenBank (Рег. номер).

**Оценка межгеномной дистанции штаммов В-7738/В-7739 и В-7778/В-7779**

На сервере GGDC (<http://ggdc.dsmz.de/>) определяли степень близости геномов штаммов *S. aureus*, выделенных в рамках расследования одной вспышки. Оценка межгеномной дистанции на сервере GGDC для каждой сравниваемой пары штаммов (В-7738/В-7739 и В-7778/В-7779) дала значение 0,0001, что соответствует дистанции между нуклеотидными последовательностями одного генома, полученными в двух независимых экспериментах. Аналогичные данные об идентичности сравниваемых геномов были получены при использовании программ Wombac 2.0 и MEGA 7.0 при SNP-типировании коровых последовательностей указанных штаммов. Различия между штаммами В-7738 и В-7739 соответствовали 1 SNP, а между штаммами В-7778 и В-7779 — 3 SNP.

**Филогенетический анализ**

Для определения филогенетических связей штаммов *S. aureus* В-7738, В-7739, В-7778 и В-7779 выбирали из представленных в GenBank геномов *S. aureus* последовательности с максимальными показателями геномной близости к геному штамма *S. aureus* В-7778. Для этого с помощью сервиса NCBI Genome Neighbor report определили 67 геномных последовательностей с симметричной идентичностью до 96,5758% и идентичностью при разрывах до 99,9683% по отношению к геному штамма *S. aureus* В-7778. На основе полногеномного SNP-типирования коровой части генома, проведенного в Wombac 2.0, для 71 генома *S. aureus* построили филогенетическое дерево в MEGA 7.0. Все взятые в исследование геномы по результатам филогенетического анализа относятся к СС30 и формируют три монофилетических клады (рис. 1): клада клональной линии фагового типа 80/81 из восьми штаммов, включая референс-штамм 55-2053 (GenBank: CP002388), обозначена как А; клада гипервирулентных для мышей штаммов MRSA из восьми штаммов, включая референс-штамм TCH60 (GenBank: CP002110), обозначена как В; клада «актуальных» штаммов *S. aureus* из 55 штаммов с референс-штаммами MRSA252 (GenBank: BX571856) и MN8 (GenBank: CM000952) обозначена как С.

Выявлено разделение «актуальной» клады СС30 на два больших кластера — кластер С1, в который входят штаммы *S. aureus*, близкие к референс-штамму MRSA252, и кластер С2, включающий штаммы *S. aureus*, близкие к референс-штамму MN8 (см. рис. 1, 2). Согласно полученным данным, штаммы *S. aureus* В-7738 и В-7739 (Санкт-Петербург, 2013) и штаммы *S. aureus* В-7778 и В-7779 (Селигер, 2014) принадлежат к различным кластерам третьей «актуальной» клады СС30 (см.

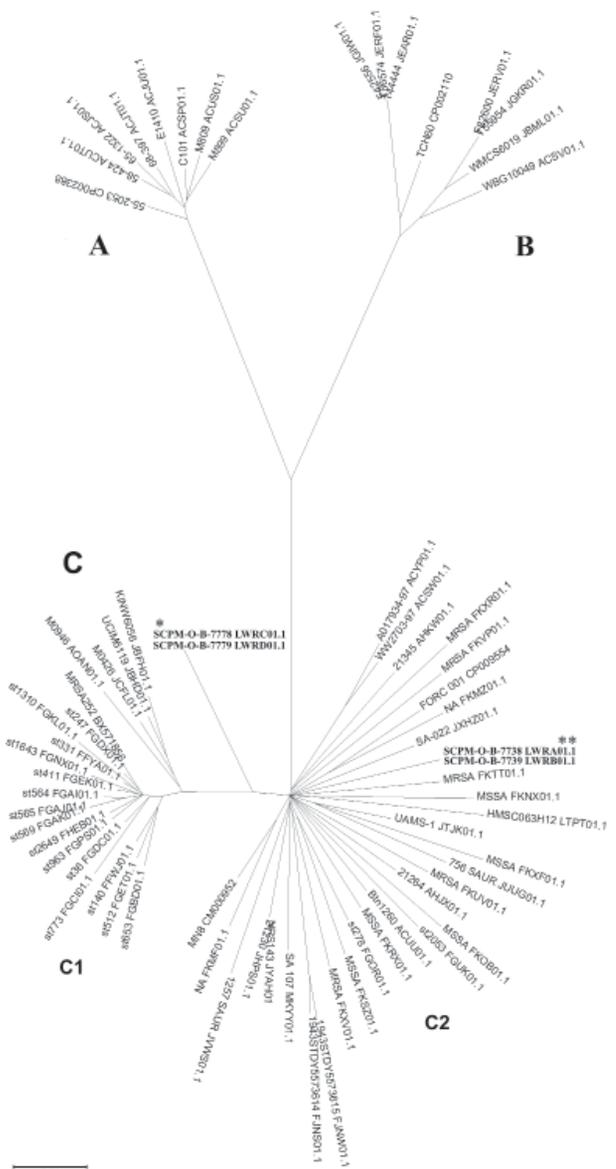
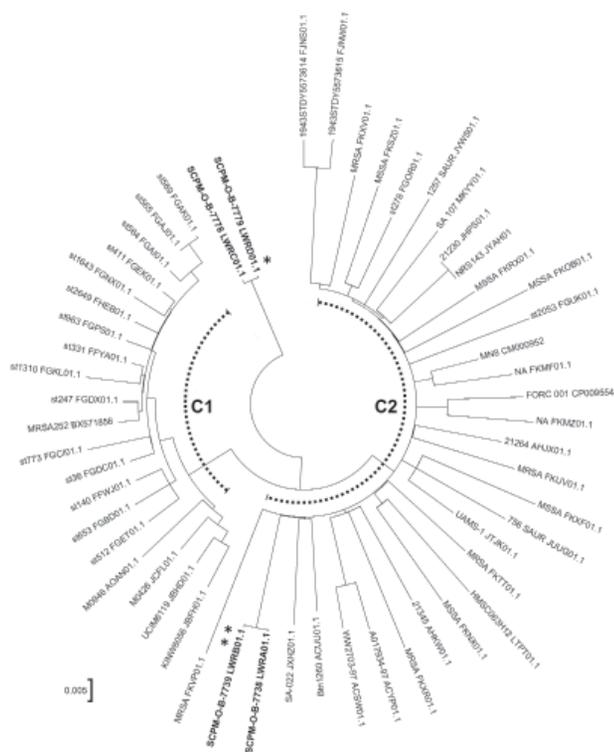


Рис. 1. Дендрограмма, построенная с использованием метода neighbor-joining на основании SNP-анализа 71 генома *S. aureus* СС30, депонированного в GenBank. Общее число выявленных полиморфизмов корового генома СС30 составляет 7729 нуклеотидов

Примечание. \* — позиции штаммов В-7738 и В-7739 (Санкт-Петербург, 2013), \*\* — позиции штаммов В-7778 и В-7779 (Селигер, 2014). Буквенными обозначениями А, В и С указаны клады СС30, С1 и С2 — кластеры клады С.

рис. 1). Штаммы В-7738 и В-7739 относятся к кластеру С2 и показывают наибольшую близость к референс-штамму Btn1260 (GenBank: ACUU01). Штаммы В-7778 и В-7779 (Селигер, 2014) равноудалены от двух основных кластеров «актуальной» клады, что демонстрирует степень их филогенетической обособленности (рис. 2).



**Рис. 2.** Дендрограмма, построенная с использованием метода neighbor-joining на основании SNP-анализа 55 геномов *S. aureus* CC30, принадлежащих штаммам третьей «актуальной» клады CC30. Общее число выявленных полиморфизмов корового генома третьей клады CC30 составляет 6337 нуклеотидов

*Примечание.* \* — позиции штаммов В-7738 и В-7739 (Санкт-Петербург, 2013), \*\* — позиции штаммов В-7778 и В-7779 (Селигер, 2014). Буквенными обозначениями С1 и С2 указаны кластеры клады С.

### Обсуждение

#### Резюме основного результата исследования

Штамм *S. aureus* В-7778, выделенный от заболевших участников форума «Селигер-2014», и штамм *S. aureus* В-7779, выделенный от сотрудников пищеблока форума «Селигер-2014», идентичны по нуклеотидному составу, относятся к *spa*-типу t122 и сиквенс-типу 30 клонального комплекса 30, несут комплекс генов токсинов, ответственных за развитие пищевой инфекции (гены *sea*, *tst*, *seq*, *sei*, *sem*, *sen*, *seo* и *seu*), продуцируют стафилококковый энтеротоксин А. По результатам полногеномного SNP-типирования показано, что штаммы *S. aureus* В-7778 и В-7779 филогенетически обособлены от других штаммов третьей «актуальной» клады CC30 и неродственны штаммам *S. aureus* В-7738 и В-7739, выделенным во время вспышки ПТИ в Санкт-Петербурге в 2013 г.

#### Обсуждение основного результата исследования

В ФБУН «ГНЦ ПМБ» в 2013–2016 гг. расследовали ряд вспышек пищевой инфекции стафилококковой этиологии с целью идентификации штаммов *S. aureus* — возбудителей ПТИ и определения возможных источников инфекции. Как известно, к группам риска при пищевых инфекциях относят детей, людей старшего возраста и иммунокомпрометированных пациентов. В большинстве случаев ПТИ были связаны с учащимися начальных школ. Однако при расследовании двух вспышек ПТИ была выявлена тяжелая форма заболевания у контингента, не ассоциированного с группами риска. При вспышке

ПТИ среди строительных рабочих в Санкт-Петербурге в 2013 г. [10] заболели 363 человека, 223 из них были госпитализированы, 7 — в тяжелом состоянии поступили в отделение реанимации и интенсивной терапии. В результате расследования было идентифицировано два штамма — штамм *S. aureus* В-7738, выделенный из пищевого продукта, и штамм *S. aureus* В-7739, выделенный из клинического материала, полученного от заболевших. Оба штамма имели идентичные генотип (*spa*-тип t2509, ST30, CC30), ген токсина синдрома токсического шока (*tst*), комплекс генов энтеротоксинов и энтеротоксинподобных белков (*sea*, *seq*, *sei*, *sem*, *sen*, *seo* и *seu*). На молодежном форуме «Селигер-2014» при вспышке ПТИ стафилококковой этиологии также наблюдалась картина массового поражения контингента, не принадлежавшего к группам риска. Штаммы *S. aureus* В-7778 и В-7779, выделенные на форуме «Селигер-2014», были отнесены к той же клональной группе (CC30) и сиквенс-типу (ST30), что и штаммы *S. aureus*, выделенные в Санкт-Петербурге в 2013 г.

Следует подчеркнуть, что факт выделения изолятов *S. aureus* при вспышке пищевой инфекции не может служить подтверждением стафилококковой природы вспышки. Это связано с широкой распространенностью и высокой частотой выделения золотистого стафилококка при патологиях человека, вызванных другими инфекционными агентами. Для подтверждения стафилококковой этиологии инфекции необходимо генетическое типирование изолятов *S. aureus*. Нуклеотидная последовательность варибельного региона видоспецифического гена *coa* является надежным маркером генетических линий *S. aureus* и используется для быстрого и экономически эффективного типирования клинических изолятов методом *coa*-ПЦР-ПДРФ. Использованный нами подход при расследовании вспышек ПТИ предусматривает амплификацию варибельного региона гена коагулазы с последующим гидролизом рестриктазой *AluI* и позволяет в течение нескольких часов после выделения чистой культуры определить наличие или отсутствие в полученных на исследование образцах биоматериала изолятов *S. aureus* с идентичными *coa*-ПЦР-ПДРФ паттернами. Идентичные *coa*-ПЦР-ПДРФ паттерны являются необходимым условием признания принадлежности исследуемых изолятов к одной генетической линии *S. aureus*. Отсутствие доминантной линии *S. aureus* с идентичным *coa*-ПЦР-ПДРФ паттерном среди изолятов, выделенных от заболевших, свидетельствует об ошибочности определения стафилококковой природы расследуемой вспышки ПТИ.

При исследовании 38 изолятов *S. aureus*, выделенных от заболевших участников форума «Селигер-2014», был выявлен единственный вариант *coa*-ПЦР-ПДРФ паттерна — 433/219;214. Все изоляты с данным *coa*-ПЦР-ПДРФ паттерном несли комплекс генов токсинов, ответственных за развитие пищевой инфекции: ген энтеротоксина А, ген токсина синдрома токсического шока и генов энтеротоксинподобных белков. Дальнейшее типирование позволило идентифицировать возбудитель вспышки ПТИ на форуме «Селигер-2014» — штамм *S. aureus* В-7778 с генотипом CC30, ST30, t122. Дополнительно стоит отметить высокий титр и клональную чистоту культуры штамма *S. aureus* В-7778 в клинических образцах (фекальных массах), взятых у заболевших участников форума «Селигер-2014», что может служить характерным показателем инфекционного процесса. Штамм *S. aureus* В-7779, изолированный из образцов биоматериала, полученных с поверхности рук двух сотрудников пищеблока форума «Селигер-2014», является идентичным штамму *S. aureus*

В-7778. По результатам исследований, сотрудники пищеблока могут быть определены как наиболее вероятный источник штамма *S. aureus* В-7778 — возбудителя вспышки на форуме «Селигер-2014».

Для оценки общей эпидемиологической обстановки следует отметить, что от сотрудников пищеблока форума «Селигер-2014» было выделено еще два штамма *S. aureus* с генетическими маркерами, которые соответствуют возможным возбудителям ПТИ: это штаммы *S. aureus* с генотипами: СС30, ST30, t012, *sea*, *tst* и СС22, ST60, t9413, *sea*, *tst* (см. табл. 1).

Таким образом, две массовые вспышки пищевой инфекции (в Санкт-Петербурге в 2013 г. и Тверской области в 2014 г.) были вызваны штаммами *S. aureus* клонального комплекса СС30 и характеризовались поражением контингента, не ассоциированного с группами риска. Штаммы *S. aureus*, обладающие сходными эпидемиологическими характеристиками, повышенными вирулентными свойствами, исследовали на геномном уровне методом полногеномного SNP анализа. Филогенетический анализ показал, что штаммы *S. aureus* В-7738, В-7739, В-7778 и В-7779 уверенно позиционируются как члены третьей «актуальной» клады СС30, в которую входят современные клинические штаммы СС30. Клада состоит из внутригоспитальных штаммов MRSA, типичным представителем которых является штамм MRSA252 (ST36), и клинических инвазивных штаммов MRSA или MSSA (ST30), которые часто ассоциируются с бактериемией, инфекционным эндокардитом и остеомиелитом [23]. Известно, что ген токсина синдрома токсического шока преимущественно ассоциируется со штаммами третьей клады СС30. Характерную способность к хронической персистенции в организме человека штаммов третьей клады СС30 связывают с повышенной эффективностью колонизации и биопленкообразования, а также с высоким содержанием псевдогенов [9].

SNP анализ геномов *S. aureus*, выбранных по степени близости к геному штамма *S. aureus* В-7778 с помощью сервиса NCBI Genome Neighbor report, выявил наличие в третьей кладе СС30 двух обособленных кластеров — кластер С1, в который входят штаммы *S. aureus*, близкие к референс-штамму MRSA252, и кластер С2, который включает штаммы MRSA и MSSA, близкие к референс-штамму MN8 (см. рис. 2). Штаммы *S. aureus* В-7738/В-7739 (СС30, ST30, t2509), выделенные в Санкт-Петербурге в 2013 г., входят в состав кластера С2 и наиболее близки к типовому штамму *S. aureus* Btn1260 (ST30, t012). Геномы штаммов *S. aureus* В-7778/В-7779 (СС30, ST30, t122), выделенные при вспышке ПТИ на форуме «Селигер-2014», демонстрируют филогенетическую удаленность от геномов кластера С1 и кластера С2. Таким образом, филогенетический анализ 71 штамма *S. aureus* СС30 выявил наличие SNP, специфичных для геномов штаммов *S. aureus* В-7778/В-7779. Анализ возможной роли таких SNP в повышении вирулентных свойств штаммов *S. aureus* В-7778/В-7779 является задачей дальнейшего исследования. Данные о полногеномных последовательностях штаммов *S. aureus* СС30, изолированных на территории Российской Федерации, в настоящий момент ограничены описанными в статье геномами, что не позволяет оценить распространенность генетической линии, представленной штаммами *S. aureus* В-7778/В-7779, в России.

По данным Ridom SpaServer (spaServer.ridom.de), *spa*-тип t122, которому принадлежат штаммы *S. aureus* В-7778/В-7779 (Селигер-2014), встречается среди депонированных на сервере штаммов с частотой 0,16%,

причем большинство штаммов *S. aureus* с *spa*-типом t122 изолированы в последние годы в Западной Европе. Среди взятых нами для SNP анализа 67 геномов *S. aureus*, депонированных в GenBank, к *spa*-типу t122 относится геном штамма *S. aureus* 21345 (см. рис. 2). По результатам SNP анализа коровой части генома, штамм *S. aureus* 21345 состоит в кластере С2, что подтверждает отсутствие генетической близости к штаммам *S. aureus* В-7778/В-7779. Этот пример демонстрирует принципиальное различие по информативности типирования между методами, основанными на SNP в пределах единичных генов, и методами, включающими сравнение SNP на уровне генома.

SNP анализ коровой части генома выявил генетическую специфичность штаммов *S. aureus* В-7778/В-7779 (Селигер-2014) и близость штаммов *S. aureus* В-7738/В-7739 (Санкт-Петербург, 2013) к типовым представителям кластера С1 третьей клады *S. aureus* СС30. Можно предположить, что особенности указанных штаммов как этиологических агентов стафилококковых ПТИ с повышенными вирулентными свойствами и сходными эпидемиологическими характеристиками будут связаны с мобильной частью генома *S. aureus*. Дальнейшие исследования предусматривают сравнительный анализ мобильных генетических элементов в геномах штаммов *S. aureus* В-7738/В-7739 и В-7778/В-7779 и геномов штаммов *S. aureus* СС30, депонированных в GenBank. Поиск возможной связи между способностью некоторых штаммов *S. aureus* вызывать массовые вспышки ПТИ и определенными мобильными генетическими структурами, способствующими повышению вирулентных свойств данных штаммов, представляет определенный интерес для практического здравоохранения.

## Заключение

Клональный комплекс *S. aureus* 30 характеризуется генетической пластичностью, что выражается эффективной адаптацией к различным экологическим нишам. При анализе вспышек пищевых токсикоинфекций на территории Российской Федерации выявлены два различных генетических клона *S. aureus* СС30, способных вызывать вспышки ПТИ с тяжелым течением инфекции у контингента, не ассоциированного с группами риска, что можно оценить как опасное расширение вирулентных свойств исследуемых штаммов. Проведен первый геномный анализ выделенных на территории Российской Федерации штаммов *S. aureus* — возбудителей пищевой инфекции. Полученные в работе данные будут использованы в дальнейшем для анализа генетической специфики циркулирующих в России через пищевую цепь штаммов *S. aureus*.

## Источник финансирования

Исследование выполнено при финансовой поддержке НИР 049 «Мониторинг и изучение свойств возбудителей пищевых и госпитальных инфекций, разработка средств их диагностики» Роспотребнадзора.

## Конфликт интересов

Авторы данной статьи подтвердили отсутствие конфликта интересов, о котором необходимо сообщить.

ЛИТЕРАТУРА

- Chambers HF, Deleo FR. Waves of resistance: Staphylococcus aureus in the antibiotic era. *Nat Rev Microbiol.* 2009;7(9):629–641. doi: 10.1038/nrmicro2200.
- Kadariya J, Smith TC, Thapaliya D. Staphylococcus aureus and staphylococcal food-borne disease: an ongoing challenge in public health. *Biomed Res Int.* 2014;2014:827965. doi: 10.1155/2014/827965.
- Balaban N, Rasooly A. Staphylococcal enterotoxins. *Int J Food Microbiol.* 2000;61(1):1–10. doi: 10.1016/S0168-1605(00)00377-9.
- Argudín MÁ, Mendoza MC, Rodicio MR. Food poisoning and Staphylococcus aureus enterotoxins. *Toxins (Basel).* 2010;2(7):1751–1773. doi: 10.3390/toxins2071751.
- Murray RJ. Recognition and management of Staphylococcus aureus toxin-mediated disease. *Intern Med J.* 2005;35 Suppl 2:S106–119. doi: 10.1111/j.1444-0903.2005.00984.x.
- The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2015. *EFSA Journal.* 2016;14(12):e04634. doi: 10.2903/j.efsa.2016.4634.
- Sato Y, Omoe K, Naito I, et al. Molecular epidemiology and identification of a Staphylococcus aureus clone causing food poisoning outbreaks in Japan. *J Clin Microbiol.* 2014;52(7):2637–2640. doi: 10.1128/Jcm.00661-14.
- Nienaber JJ, Sharma Kuinkel BK, Clarke-Pearson M, et al. Methicillin-susceptible Staphylococcus aureus endocarditis isolates are associated with clonal complex 30 genotype and a distinct repertoire of enterotoxins and adhesins. *J Infect Dis.* 2011;204(5):704–713. doi: 10.1093/infdis/jir389.
- McGavin MJ, Arsic B, Nickerson NN. Evolutionary blueprint for host- and niche-adaptation in Staphylococcus aureus clonal complex CC30. *Front Cell Infect Microbiol.* 2012;2:48. doi: 10.3389/fcimb.2012.00048.
- Онищенко Г.Г., Абаев И.В., Дятлов И.А., и др. Молекулярно-генетическая идентификация штамма Staphylococcus aureus — возбудителя пищевой токсикоинфекции при вспышке в Санкт-Петербурге в 2013 г. // *Вестник Российской академии наук.* — 2014. — Т. 69. — №9–10 — С. 33–38. [Onishchenko GG, Abaev IV, Dyatlov IA, et al. Molecular genetic identification of Staphylococcus aureus strain, caused a foodborne illness outbreak in St. Petersburg in 2013. *Annals of the Russian academy of medical sciences.* 2014;69(9–10):33–38. (In Russ.)] doi: 10.15690/vramn.v69i9-10.1129.
- Mehrotra M, Wang G, Johnson WM. Multiplex PCR for detection of genes for Staphylococcus aureus enterotoxins, exfoliative toxins, toxic shock syndrome toxin 1, and methicillin resistance. *J Clin Microbiol.* 2000;38(3):1032–1035.
- Xie Y, He Y, Gehring A, et al. Genotypes and toxin gene profiles of Staphylococcus aureus clinical isolates from China. *PLoS One.* 2011;6(12):e28276. doi: 10.1371/journal.pone.0028276.
- Takano T, Higuchi W, Zaraket H, et al. Novel characteristics of community-acquired methicillin-resistant Staphylococcus aureus strains belonging to multilocus sequence type 59 in Taiwan. *Antimicrob Agents Chemother.* 2008;52(3):837–845. doi: 10.1128/AAC.01001-07.
- Tang JN, Chen J, Li HH, et al. Characterization of adhesin genes, staphylococcal nuclease, hemolysis, and biofilm formation among Staphylococcus aureus strains isolated from different sources. *Food-borne Pathog Dis.* 2013;10(9):757–763. doi: 10.1089/fpd.2012.1474.
- Hookey JV, Richardson JF, Cookson BD. Molecular typing of Staphylococcus aureus based on PCR restriction fragment length polymorphism and DNA sequence analysis of the coagulase gene. *J Clin Microbiol.* 1998;36(4):1083–1089.
- Метод определения стафилококковых энтеротоксинов в пищевых продуктах. Методические указания МУК 4.2.2429-08. — М.: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора; 2009. — 18 с. [Metod opredeleniya stafilokokkovykh enterotoksinov v pishchevykh produktakh. Metodicheskie ukazaniya MUK 4.2.2429-08. Moscow: Federal'nyi tsentr gigeny i epidemiologii Rosspotrebнадзора; 2009. 18 p. (In Russ.)]
- Wilson K. Preparation of genomic DNA from bacteria. *Curr Protoc Mol Biol.* 2001;Chapter 2:Unit 2.4. doi: 10.1002/0471142727.mb0204s56.
- Angiuoli SV, Gussman A, Klimke W, et al. Toward an online repository of Standard Operating Procedures (SOPs) for (Meta) genomic annotation. *OMICS.* 2008;12(2):137–141. doi: 10.1089/omi.2008.0017.
- Meier-Kolthoff JP, Auch AF, Klenk HP, Göker M. Genome sequence-based species delimitation with confidence intervals and improved distance functions. *BMC Bioinformatics.* 2013;14:60. doi: 10.1186/1471-2105-14-60.
- Kumar S, Stecher G, Tamura K. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for bigger datasets. *Mol Biol Evol.* 2016;33(7):1870–1874. doi: 10.1093/molbev/msw054.
- Saitou N, Nei M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol.* 1987;4(4):406–425. doi: 10.1093/oxfordjournals.molbev.a040454.
- Tamura K, Nei M, Kumar S. Prospects for inferring very large phylogenies by using the neighbor-joining method. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004;101(30):11030–11035. doi: 10.1073/pnas.0404206101.
- Fowler VG, Nelson CL, McIntyre LM, et al. Potential associations between hematogenous complications and bacterial genotype in Staphylococcus aureus infection. *J Infect Dis.* 2007;196(5):738–747. doi: 10.1086/520088.

КОНТАКТНАЯ ИНФОРМАЦИЯ

**Абаев Игорь Валентинович**, кандидат медицинских наук, ведущий научный сотрудник лаборатории Государственного научного центра прикладной микробиологии и биотехнологии  
**Адрес:** 142279, Московская область, Серпуховский район, поселок Оболенск, **тел.:** +7 (496) 736-01-47,  
**e-mail:** abaev@obolensk.org, **SPIN-код:** 2519-8672, **ORCID:** <http://orcid.org/0000-0003-2724-557X>

**Скрябин Юрий Павлович**, научный сотрудник лаборатории Государственного научного центра прикладной микробиологии и биотехнологии  
**Адрес:** 142279, Московская область, Серпуховский район, поселок Оболенск, **тел.:** +7 (496) 736-00-03,  
**e-mail:** sjurikp@gmail.com, **SPIN-код:** 1170-6671, **ORCID:** <http://orcid.org/0000-0001-5748-995X>

**Кисличкина Ангелина Александровна**, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник отдела Государственного научного центра прикладной микробиологии и биотехнологии  
**Адрес:** 142279, Московская область, Серпуховский район, поселок Оболенск, **тел.:** +7 (496) 736-00-03,  
**e-mail:** angelinakislichkina@yandex.ru, **SPIN-код:** 5889-4331, **ORCID:** <http://orcid.org/0000-0001-8389-2494>

**Коробова Ольга Васильевна**, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории Государственного научного центра прикладной микробиологии и биотехнологии

**Адрес:** 142279, Московская область, Серпуховский район, поселок Оболенск, **тел.:** +7 (496) 736-00-03, **e-mail:** o.v.korobova@yandex.ru, **SPIN-код:** 8360-3567, **ORCID:** <http://orcid.org/0000-0002-7068-3236>

**Мицевич Ирина Петровна**, старший научный сотрудник лаборатории Государственного научного центра прикладной микробиологии и биотехнологии

**Адрес:** 142279, Московская область, Серпуховский район, поселок Оболенск, **тел.:** +7 (496) 736-00-03, **e-mail:** mitzevich\_i\_p@obolensk.org, **SPIN-код:** 4234-0288, **ORCID:** <http://orcid.org/0000-0003-2324-502X>

**Мухина Татьяна Николаевна**, научный сотрудник отдела Государственного научного центра прикладной микробиологии и биотехнологии

**Адрес:** 142279, Московская область, Серпуховский район, поселок Оболенск, **тел.:** +7 (496) 736-00-03, **e-mail:** cecile98@rambler.ru, **SPIN-код:** 6858-5052, **ORCID:** <http://orcid.org/0000-0001-5829-0512>

**Богун Александр Геннадьевич**, кандидат биологических наук, заведующий отделом Государственного научного центра прикладной микробиологии и биотехнологии

**Адрес:** 142279, Московская область, Серпуховский район, поселок Оболенск, **тел.:** +7 (496) 736-00-03, **e-mail:** bogun62@mail.ru, **SPIN-код:** 8676-6644, **ORCID:** <http://orcid.org/0000-0001-5454-2495>

**Дятлов Иван Алексеевич**, академик РАН, доктор медицинских наук, профессор, директор Государственного научного центра прикладной микробиологии и биотехнологии

**Адрес:** 142279, Московская область, Серпуховский район, поселок Оболенск, **тел.:** +7 (496) 736-00-03, **e-mail:** dyatlov@obolensk.org, **SPIN-код:** 6567-8380, **ORCID:** <http://orcid.org/0000-0003-1078-4585>