



Научная статья

ВЫДЕЛЕНИЕ И ОПИСАНИЕ *STAPHYLOCOCCUS AUREUS*, ВЫЗВАВШЕЙ ДВЕ ШИРОКОМАСШТАБНЫЕ ВСПЫШКИ ПИЩЕВЫХ ОТРАВЛЕНИЙ ВО ВЬЕТНАМЕ

Лам Куок Хунг¹, Хуонг Минь Нгуен³, Та Ти Иен², Ли Винь Хоа², Тран Хонг Ба², Фам Ли Куен^{2,4}, До Ти Чу Хуонг⁵, Нгуэн Тан Чанг², Ли Ти Хонг Хао²

¹Министерство питания Вьетнама, Вьетнам, Ханой, Ба Динь, Жанг Во, Нуи Трюк-стрит, 135

²Национальный институт контроля пищевой продукции, Вьетнам, Ханой, Фам Тан Дуат, 65

³Институт биотехнологий Вьетнамской академии науки и технологии, Вьетнам, Ханой, Кау Джай, 18 Хоанг Куок Вьет, 1

⁴Центр контроля и предотвращения заболеваний, США, 3150 Рампарт Род, Форт Коллинз

⁵Национальный отдел контроля качества сельскохозяйственной продукции, продукции лесничества и рыболовства, Вьетнам, Ханой, Бадинь, Нгуен Конг Хоан, 10

Во Вьетнаме, как и во всем мире, бактерия Staphylococcus aureus остается основной угрозой безопасности пищевых продуктов и причиной пищевых отравлений. S. aureus присутствует повсеместно и с легкостью загрязняет пищевые продукты во время процессов их обработки.

В данном исследовании мы успешно выделены штаммы S. aureus из образцов пищи, которые, возможно, послужили причинами вспышек пищевых отравлений в провинциях Хазянг и Виньфук в 2017 и 2018 г. соответственно. Отобранные образцы были исследованы на предмет наличия стафилококковых энтеротоксинов (SEs) с использованием набора 3M™TECRA™ Staph Enterotoxin, в результате чего токсины были обнаружены во всех образцах. Разные штаммы S. aureus выделены, а затем подтверждены с помощью метода MALDI-TOF. Эти штаммы сохранились в растворе Brain heart с 15 % глицерина для дальнейшего анализа.

Результаты исследования показали, что три последовательности STs, ST96, ST88 (spa тип t7558) и ST72 (spa тип t3092) привели к возникновению двух вспышек. В указанных штаммах были обнаружены два вирулентных гена – SEA и SEC. Эти штаммы были протестированы на предмет устойчивости к основным антибиотикам. Обнаружилось, что все три последовательности устойчивы к пенициллину, ST96 и ST88 устойчивы к эритромицину, а ST72 – к гентамицину.

В целом исследование подчеркивает полезность молекулярного описания для изучения и мониторинга бактериальных патогенов, связанных с возникновением вспышек пищевого отравления во Вьетнаме.

Ключевые слова: устойчивость к антибиотикам, пищевое отравление, β-лактамаза, ESBL, атрС-β-лактамазы, Staphylococcus aureus, MLST, Spa-гены, стафилококковые токсины.

© Лам Куок Хунг, Хуонг Минь Нгуен, Та Ти Иен, Ли Винь Хоа, Тран Хонг Ба, Фам Ли Куен, До Ти Чу Хуонг, Нгуэн Тан Чанг, Ли Ти Хонг Хао, 2020

Лам Куок Хунг – кандидат наук, глава отдела мониторинга пищевых отравлений (e-mail: lamquochungmoh@gmail.com; тел.: (+849) 133 19 936; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-0158-8905>).

Хуонг Минь Нгуен – кандидат наук (e-mail: nguyenvhuong.m@gmail.com; тел.: (+849) 155 62 485; ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5302-2973>).

Та Ти Иен – магистр, научный сотрудник лаборатории микробиологии пищевых продуктов (e-mail: yenta@gmail.com; тел.: (+849) 049 59 050; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-3364-4887>).

Ли Винь Хоа – научный сотрудник лаборатории микробиологии пищевых продуктов (e-mail: vinhhoa.lvh@gmail.com; тел.: (+843) 630 59 456; ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5360-4260>).

Тран Хонг Ба – научный сотрудник лаборатории микробиологии пищевых продуктов (e-mail: ba.pt070488@gmail.com; тел.: (+849) 843 16 925; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6393-7197>).

Фам Ли Куен – научный сотрудник лаборатории микробиологии пищевых продуктов (e-mail: seulq311@gmail.com; тел.: (+843) 669 55 241; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9528-5293>).

До Ти Чу Хуонг – магистр, глава биологической лаборатории (e-mail: huongicloud13@gmail.com; тел.: (+849) 120 50 135; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-2786-0065>).

Нгуен Тан Чанг – кандидат наук, глава лаборатории микробиологии пищевых продуктов (e-mail: nguyentanhtung83@gmail.com; trungnt@nifc.gov.vn; тел.: (+843) 493 63 269; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8732-9911>).

Ли Ти Хонг Хао – кандидат наук, директор (e-mail: lethihonghao@yahoo.com; тел.: (+849) 042 48 167; ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3570-8570>).

Согласно отчету ВОЗ, выпущенному в 2014 г., в мире ежегодно происходит 40 млн случаев пищевых отравлений. Из них более 50 % приходится на Азиатско-Тихоокеанский регион [1]. Вслед за *Salmonella* и *Campylobacter*, которые являются наиболее распространенными бактериями, вызывающими пищевые отравления, еще одним широко распространенным пищевым патогеном является *Staphylococcus aureus*. Во всем мире эта бактерия выявляется в 214 тысяч случаев ежегодно. Помимо этого, отчеты по ситуации в Европе показали, что 5 % вспышек пищевых отравлений на континенте были вызваны именно *S. aureus*, что привело к ежегодному росту распространения данной инфекции с 0,6 до 0,7 случая на 100 тысяч человек (данные за 2010 и 2011 г. соответственно) [2, 3]. Во Вьетнаме ситуация не была под контролем, о чем свидетельствуют 677 вспышек с общим количеством пациентов 21 002 за четырехлетний период (с 2011 по 2014 г.) [4]. За первые четыре месяца 2016 г. половина вспышек, обнаруженных в крупнейшем городе Вьетнама Хо Ши Мин, произошла в школьных столовых, и 50 % из них были вызваны *S. aureus* [5].

Staphylococcus aureus является грамотрицательной бактерией из семейства *Staphylococcus*, которое на данный момент насчитывает более 30 особей. Из них именно *S. aureus* чаще всего ассоциируется с пищевыми отравлениями и является самой распространенной причиной заболеваний пищевого происхождения среди людей и животных [6, 7]. Примерно 25–30 % здорового взрослого населения являются бессимптомными носителями *S. aureus*, преимущественно в носоглотке и на коже. *S. aureus* в обычных условиях не может конкурировать с другими типами бактерий, для которых пищевые продукты являются естественной средой обитания. Однако благодаря ее способности переносить экстремальные условия окружающей среды, такие как высокая концентрация соли (до 15 %) и низкая влажность, *S. aureus* может выживать на коже человека и на поверхности одежды и многих других устройств и предметов [8–10]. Поэтому для большинства случаев пищевых отравлений стафилококком маршрутом загрязнения является контакт с загрязненными кухонными или столовыми принадлежностями или зараженная поверхность, на которой готовилась пища [11].

S. aureus вызывает пищевое отравление за счет производства стафилококковых энтеротоксинов, которые провоцируют такие симптомы, как тошнота, боли в животе, рвота и понос. На данный момент описано более 20 типов стафилококковых и им подобных энтеротоксинов, из них наиболее часто пищевые отравления вызывают SEA, SEB и SED [11].

Во Вьетнаме пища до сих пор чаще всего готовится вручную традиционными способами и продается на местных рынках, поставляется в рестораны и школьные столовые. Это увеличивает вероятность того, что *S. aureus* может попасть в пищу во время ее приготовления. Следовательно, необходимо осу-

ществлять мониторинг и описывать выявленные штаммы *S. aureus*, которые вызывают вспышки пищевых отравлений в стране. Типирование на основе мультилокусных последовательностей (MLST) является методом, основанным на использовании вариаций в некоторых генах домашнего хозяйства для последующего сравнения распространенных типов последовательностей. Он был успешно применен для быстрой и точной идентификации и описания патогенных бактериальных и вирусных штаммов во всем мире. Помимо MLST, вариации вирулентного гена *spa* бактерии *S. aureus* успешно применялись для изучения распространенности и разнообразия этих бактерий [12, 13]. В данном исследовании применили как MLST, так и *spa*-типирование, вместе с химическим анализом энтеротоксинов и восприимчивости к антибиотикам для описания и объяснения филогенетических взаимоотношений штаммов *S. aureus*, вызвавших две вспышки пищевых отравлений во Вьетнаме.

Материалы и методы. Образцы пищи. Образцы пищи были отобраны после того, как было получено сообщение о двух вспышках отравлений. Первая вспышка произошла на свадьбе в 2017 г. в провинции Виньфук и привела к госпитализации более ста человек. Образцы пищи были собраны для дальнейшего исследования, источником заражения был признан пирог из клейкого риса. Вторая вспышка зафиксирована в школьной столовой в провинции Хазянг. Источником заражения считался свиной фарш, который, возможно, привел к госпитализации почти 200 учеников. Все образцы пищи были отобраны, тщательно упакованы в контейнеры со льдом и доставлены в Национальный институт контроля над питанием для выделения и описания бактерий.

Обнаружение энтеротоксинов в пищевых образцах. Присутствие пяти основных энтеротоксинов (от SEA до SEE) в образцах пищи было обнаружено с помощью набора 3M™TECRATM Staph Enterotoxin (Novatek, Россия, 16215008) в соответствии с инструкциями производителя (АОАС, 2012). 25 г каждого пищевого образца гомогенизировано с помощью буферного раствора Tris с pH 8,0; супернатант собран с помощью центрифугирования. Во всех образцах подтверждено присутствие пероксидазы, перед тем как 200 мкл образца было смешано с раствором тестовой суспензии (содержащим 2 г Tween 20 и 0,001 г тиомерсала в 6,0 мл H₂O) и инкубировано при температуре 35–37 °С в течение двух часов. После этого образцы промывали и конъюгировали с определенными антителами для каждого типа токсинов. Результаты интерпретировали путем измерения величин спектральной поглощательной способности при 414 ± 10 нм.

Выделение бактерий. Образцы пищи были гомогенизированы в стерильном солевом буфере при соотношении 1:10, разбавлены до 10⁻⁴, а затем 0,1 мл каждого раствора было высеяно на пластины с агаром Bair Packer (BP) (Becton, Dickinson, USA,

276840). Пластины инкубировались при температуре 37 ± 1 °C в течение 24–48 ч; для коагулотестов были отобраны черные колонии.

Далее произведена идентификация коагулазоположительных колоний с помощью Vitek®-MS (bioMérieux Clinical Diagnostics, Франция). Подтвержденные изоляты *S. aureus* хранились при температуре –80 °C в бульоне Brain heart infusion (BHI, Difco, USA, 1104930500) с добавлением 15 % глицерина до дальнейшего анализа.

Тест на восприимчивость к антибиотикам.

Изоляты восстанавливали на кровяном агаре, и одна чистая колония помещалась в бульон BHI (руководство CLSI). Тесты на восприимчивость к антибиотикам выполнялись согласно руководству, выпущенному Институтом клинических и лабораторных стандартов [14]. Диско-диффузионным методом определена восприимчивость к некоторым из семи протестированных антибиотиков: оксациллину (OX; 1 мкг), эритромицину (E; 15 мкг), гентамицину (CN; 10 мкг), тетрациклину (TE; 30 мкг), и пенициллину (P; 10 мкг). Там, где диско-диффузионный метод не применялся, устойчивость к метициллину (MET; 5 мкг) и ванкомицину (VA; 30 мкг) определена методом наименьшей ингибирующей концентрации. Изоляты были классифицированы как чувствительные, промежуточные и устойчивые в соответствии с параметрами CLSI, определенными для каждого из протестированных антибиотиков. Устойчивость к нескольким лекарствам определялась как невосприимчивость к хотя бы одному агенту из трех или более антимикробных категорий [15].

Выделение геномной ДНК. Сохраненные изоляты были восстановлены на кровяном агаре, перед тем как их поместили на ночь в бульон BHI для роста при температуре 37 °C для дальнейшего извлечения ДНК. Из 3 мл культуры *S. aureus* после ночного роста выделена геномная ДНК; это было сделано с помощью набора GeneJET Genomic DNA Purification Kit (ThermoFisher Scientific, USA, K0721) согласно инструкции производителя. Качество выделенной ДНК

оценивалось с помощью инструмента Nanodrop 1000 (Thermo Fisher Scientific, USA, I594).

Идентификация вирулентных генов. Пять классических генов SE – *sea*, *seb*, *sec*, *sed* и *see* – были идентифицированы из геномной ДНК изолятов *S. aureus* с помощью ПЦР и использованием праймерных последовательностей, описанных Johnson et al. [16]. Каждые 25 мкл ПЦР содержали 12,5 мкл 2x DreamTaqMasterMix (Thermo Fisher Scientific, USA, K0171), 10 пмол каждого праймера, 100 нг ДНК и стерильную воду до полного объема. Конечные продукты ПЦР проанализированы с помощью агарозного электрофореза с целью определения наличия или отсутствия определенных ампликонов. Присутствие классических энтеротоксинов было подтверждено с помощью набора 3M™TECRA™ Staph Enterotoxin (Novatek, Russia, 16215008) согласно инструкции производителя, как описано выше. Наличие *mecA* и *femA* было определено с помощью ПЦР с использованием определенных праймеров, описанных в более ранних публикациях (табл. 1).

Молекулярное типирование и филогенетический анализ (MLST). MLST и *sra*-типирование были выполнены по методу, ранее описанному Jolley et al. (2018), а именно последовательности праймеров и условия ПЦР, использованные для амплификации семи генов домашнего хозяйства в схеме MLST, взяты из PubMLST [17]. Полиморфный регион гена *sra* амплифицирован с применением пары праймеров *sra*-1113f (TAA AGA CGA TCC TTC GGT GAG C) и *sra*-1514r (CAG TAG TGC CGT TTG CTT) [18]. Продукты ПЦР были очищены и распложены по порядку по методу Sanger с применением 1st Base DNA Sequencing Services (Singapore). Выделение и распределение типов последовательностей на кластеры произведено с помощью PubMLST и eBURST [1, 19] соответственно. Географическое распределение и филогеографический анализ выполнены с помощью Microreact [20]. Типы *sra* установлены с помощью SpaServer website и распределены по кластерам с помощью Based Upon Repeat Pattern (BURP) [21, 22].

Таблица 1

Праймеры ПЦР для генов стафилококковых энтеротоксинов, гены, устойчивые к метициллину, и *sra*-типирование

Ген	Праймер	Последовательность праймеров (5'-3')	Источник
<i>sea</i>	SEA Fw	GCA GGG AAC AGC TTT AGG C	Veras et al., 2008
	SEA Rv	GTT CTG TAG AAG TAT GAA ACA CG	
<i>seb</i>	SEB Fw	GTA TGG TGG TGT AAC TGA GC	Veras et al., 2008
	SEB Rv	CCA AAT AGT GAC GAG TTA GG	
<i>sec</i>	SEC Fw	CTT GTA TGT ATG GAG GAA TAA CAA	Veras et al., 2008
	SEC Rv	TGC AGG CAT CAT ATC ATA CCA	
<i>sed</i>	SED Fw	GTG GTG AAA TAG ATA GGA CTG C	Veras et al., 2008
	SED Rv	ATA TGA AGG TGC TCT GTG G	
<i>femA</i>	FemAFw	AAA GCA CAT AAC AAG CG	Veras et al., 2008
	FemARv	GAT AAA GAA ACC AGC AG	
<i>mecA</i>	MecAFw	TGCTATCCACCCTCAAACAGG	Yoshida et al., 2003
	MecARv	AACGTTGTAACCAACCCCAAGA	
<i>sra</i>	<i>sra</i> -1113f	TAA AGA CGA TCC TTC GGT GAG C	Strommenger et al., 2006
	<i>sra</i> -1514r	CAG TAG TGC CGT TTG CTT	

Результаты и их обсуждение. Описание случаев и характеристики изолятов. Две вспышки пищевых отравлений стафилококком произошли независимо друг от друга в Северном Вьетнаме в 2017 и 2018 г. (табл. 2). Первая вспышка зафиксирована на свадьбе в провинции Виньфук в 2017 г., она привела к госпитализации 152 гостей. Вторая вспышка возникла в начальной школе в октябре 2018 г. Во время второй вспышки в провинции Хазянг риску отравления подверглись 279 школьников, а 170 были госпитализированы. Для обеих вспышек были характерны такие общие симптомы, как понос, тошнота и рвота, возникающие в период от 2 до 6,5 ч после еды. Все пациенты полностью поправились. Из отобранных образцов пищи были выделены три изолята *S. aureus*, которые сохранены для дальнейших исследований.

Вирулентные гены и модель устойчивости изолятов к антибиотикам. Согласно нашим результатам, два изолята, обозначенные под номерами 388 и 389, были определены при первой вспышке, при второй вспышке определился только один изолят – 24ND (табл. 3). Все изоляты были коагулазоположительными. Далее применена ПЦР для определения присутствия классических генов SE во всех изолятах. Как оказалось, первая вспышка была вызвана двумя разными штаммами *S. aureus*, один из которых являлся носителем генов токсина *sea* и *femA*, а второй – *sec* и *femA*. Единственный штамм *S. aureus*, определенный при второй вспышке, также являлся носителем генов *femA*, помимо *sec*. Присутствие классических токсинов SE во всех изолятах было подтверждено с помощью набора 3MTMTECRATM Staph Enterotoxin.

Для того чтобы изучить степень устойчивости к антибиотикам всех изолятов *S. aureus*, чувствительность к антибиотикам проверялась с помощью диско-диффузионного метода, а там, где это было необходимо, – с помощью метода наименьшей ингиби-

рующей концентрации, согласно инструкциям Института клинических и лабораторных исследований от 2018 г. Испытанные антибиотики относились к часто используемым лекарствам при лечении стафилококковых пищевых отравлений (оксациллин, эритромицин, гентамицин, тетрациклин, пенициллин и ванкомицин) во Вьетнаме. Как оказалось, все изоляты были устойчивы как минимум к двум антибиотикам, одним из которых был пенициллин. Оба изолята из первой вспышки также были устойчивы к эритромицину. 24ND – изолят из второй вспышки – обнаружил устойчивость к пенициллину и гентамицину.

Молекулярное типирование и филогенетический анализ. Генотипирование было выполнено для всех изолятов методом MLST и *sra*-типирования. Составление профилей при MLST выявило наличие трех типов последовательностей (STs) – ST96, ST88 и ST72 – среди изолятов, изученных в данном исследовании. ST96 и ST88 стали причиной первой вспышки, а ST72 – второй. Анализ eBURST показал, что ни одна из обнаруженных последовательностей не образовала клональные комплексы друг с другом или с другой известной последовательностью, даже несмотря на то что все три выявленные последовательности являлись центральными и наиболее распространенными в соответствующих группах, которые были образованы известными однолокусными вариантами в базе данных PubMLST. По данным группового определения PubMLST, ST72 формировала группы с 50 другими известными последовательностями; ST88 и ST96 соответственно формировали группы с 48, 66 и 7 другими последовательностями. ST72 была самой обильной последовательностью со 120 изолятами, занесенными в базу PubMLST, затем следовала ST88 ($n = 108$) и ST96 ($n = 3$) (рис. 1). Изучение внешних узлов, определяемое как разделение последовательностью STs по меньшей

Таблица 2

Эпидемиологические данные по вспышкам пищевых отравлений

Вспышка	Дата, дд/мм/гг	Кол-во людей под риском / кол-во госпитализированных / кол-во смертей	Место вспышки	Инкубационный период, ч	Симптом	Источник заражения
1	20/10/17	152 / 109 / 0	Виньфук / свадьба / дом	5	<i>N, V, S, D</i>	Пирог из клейкого риса
2	03/10/18	279 / 170 / 0	Хазянг / начальная школа	2	<i>N, V, S, D</i>	Свиной фарш

Примечание: *N* – тошнота; *V* – рвота; *S* – боли в животе; *D* – диарея.

Таблица 3

Описание изолятов, обнаруженных при вспышках пищевых отравлений

Вспышка	Изолят	Происхождение (номер изолята)	MLST	<i>Sra</i> -тип		Классические токсины	Гены вирулентности	Фенотипы устойчивости к антибиотикам
				ST's mapped ^a	данное исследование			
1	388	<i>FD</i>	96	NA	NA	+	<i>coa, sea, femA</i>	<i>E, P</i>
	389	<i>FD</i>	88	t186	t7558	+	<i>coa, sec, femA</i>	<i>E, P</i>
2	24ND	<i>FD</i>	72	t126	t3092	+	<i>coa, sec, femA</i>	<i>CN, P</i>

Примечание: *FD* – пища; *E* – эритромицин; *P* – пенициллин; *CN* – гентамицин; ^a – ST (s) известные связанные типы *sra*, по данным Ridom Spa Server [22].

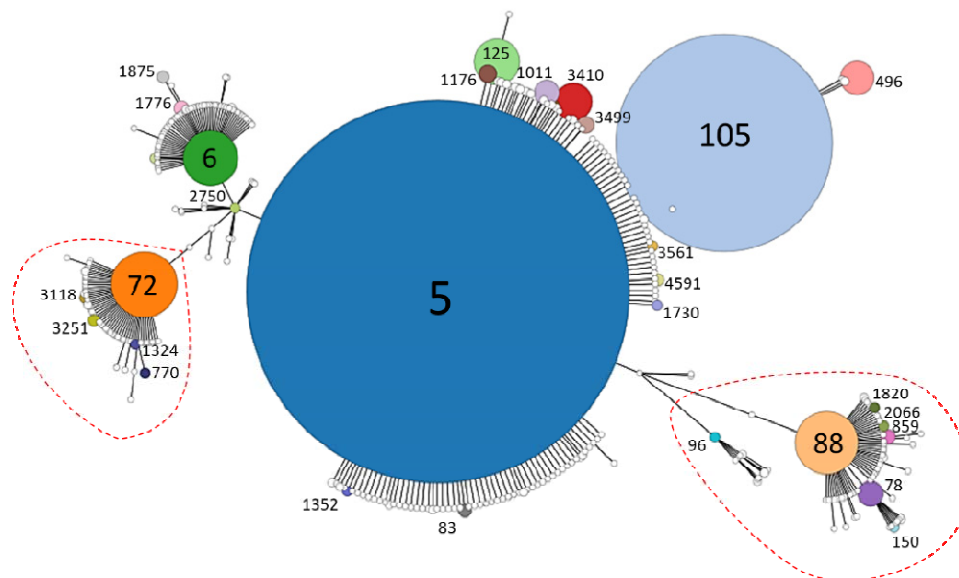


Рис. 1. Группы последовательностей STs, обнаруженные в данном исследовании, и их соответствующие одно- и двухлокусные варианты. Последовательности STs с более чем двумя известными изолятами выделены цветом и обозначены. Размеры узлов численно соотносены с числом изолятов в каждой последовательности ST. Для ST72, ST88 и ST96 не указаны все связанные последовательности STs с количеством известных изолятов менее двух

мере пяти идентичных локусов, не выявило прямых прототипов ST72, ST88 и ST96. ST72 не развилась ни в какую крупную последовательность ST, в то время как ST88 стала прототипом ST78. ST96 показала разветвление на три последовательности STs, которые развились из нее.

Нанесение данных на географические карты показывает распространение ST88 в мире, которая встречается на всех континентах: ST72 была обнаружена на всех континентах, за исключением Океании. ST96 была самой редкой, пока только три ее изолята были обнаружены в США (рис. 2).

Результаты и их обсуждение. В данном исследовании мы описали штаммы *S. aureus*, которые привели к возникновению двух вспышек пищевых отравлений во Вьетнаме в 2017 и 2018 г. и привели к госпитализации более 109 и 170 пациентов соответственно. Источниками заражения в первом случае оказался пирог из клейкого риса, а во втором – свиной фарш, и передача, скорее всего, произошла в процессе приготовления пищи. При помощи методов MLST и *sra*-типирования идентифицированы три последовательности, ставшие причиной данных вспышек, а именно ST77, ST88, и ST96. Все штаммы оказались устойчивыми к пенициллину. Помимо этого, два штамма, вызвавшие вспышку в провинции Виньфук, были устойчивы к эритромицину, в то время как штамм, вызвавший вторую из изученных вспышек в провинции Хазянг, оказался устойчивым к гентамицину. Результаты показали, что классические токсины, SEA и SEC, обнаружались в пироге из клейкого риса и свином фарше. Эти классические энтеротоксины являются основными среди более чем 20 групп токсинов, приводящих к вспышкам заболеваний пищевого происхождения. Чаще всего

во всем мире причинами вспышек является SEA (56,9 % случаев). Однако очень незначительный процент вспышек был вызван SEA совместно с SEC. В нашем исследовании эти токсины, SEA и SEC, были идентифицированы при первой вспышке. Однако в свином фарше, ставшем причиной второй вспышки, был обнаружен только SEC. Это вполне соответствует данным других отчетов о стафилококковых пищевых отравлениях во всем мире [11].

В Великобритании *S. aureus* вызвал 359 вспышек заболеваний пищевого происхождения за период с 1969 по 1990 г. Основными источниками отравления стали мясо и птица [11]. Согласно отчетам Европейского агентства по безопасности пищевых продуктов, *S. aureus* вызвал 5,5 % вспышек в Европейском союзе [23].

В данном исследовании мы применили гены домашнего хозяйства по методу MLST и варианты *sra* для анализа филогенетических отношений штаммов. Схема MLST задействует гены, закодированные для ферментов первичного метаболизма, в то время как *sra* является типичным вирулентным геном, который обычно подвергается более высокому селекционному давлению. Объединив обе схемы, можно аккуратно оценить эволюцию штаммов. Ни база данных MLST, ни база данных типирования *sra* не являются полными.

Выводы. В данном исследовании успешно выделены три последовательности, а именно ST77, ST88 и ST96. Все изолированные штаммы являются носителями гена *sea*, который продуцирует токсин SEA. Согласно результатам теста на устойчивость к антибиотикам, все три штамма являются устойчивыми к пенициллину. Более того, ST88 и ST96 устойчивы к эритромицину, а ST77 устойчив

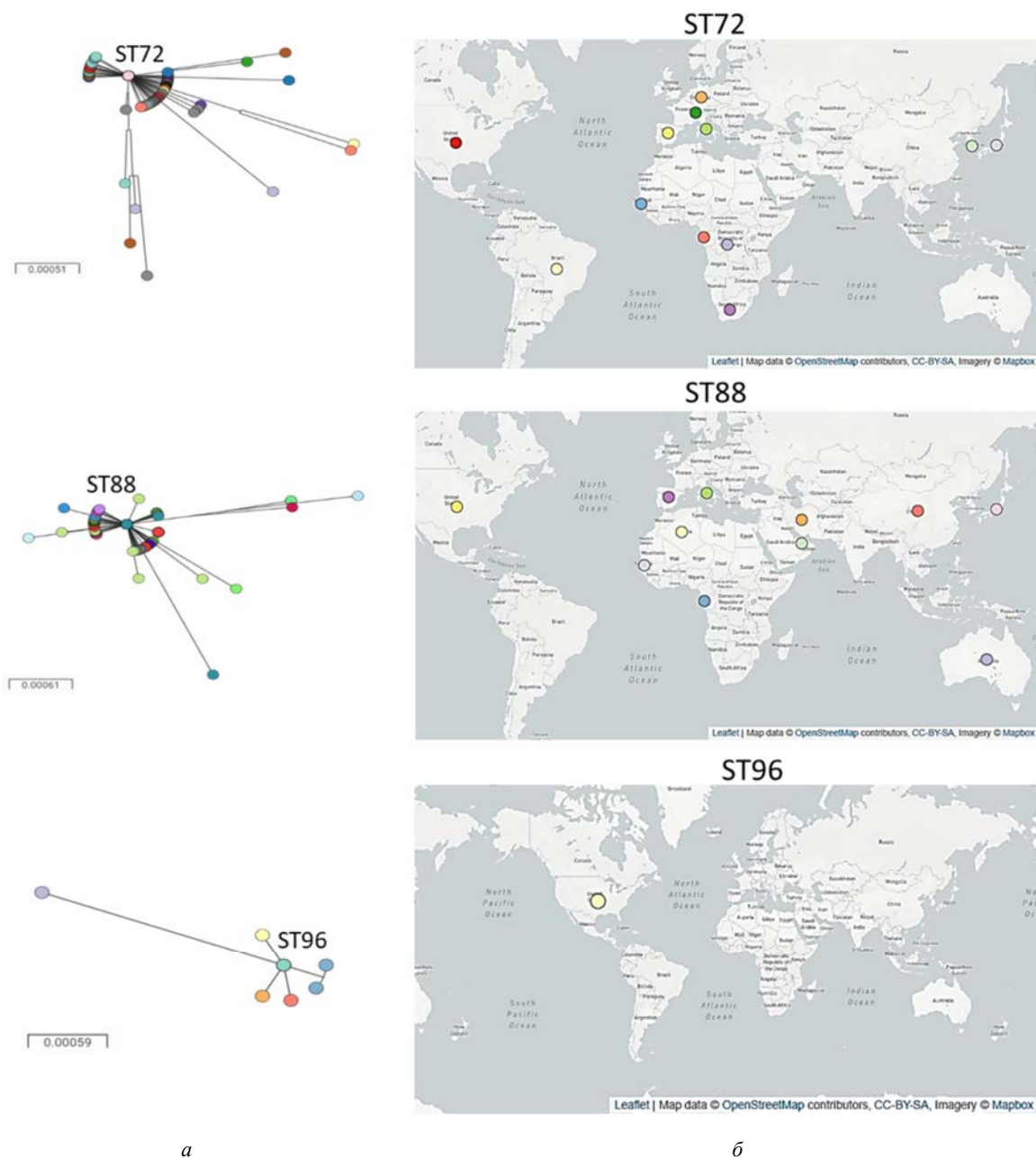


Рис. 2. Визуализация филогенетических деревьев и географическое распределение трех последовательностей, обнаруженных при вспышках пищевых отравлений во Вьетнаме в 2017 и 2018 г.: *а* – филогенетические деревья каждой последовательности ST с изображением эволюционных связей и обозначением цветом согласно стране; *б* – географическое распределение трех обнаруженных последовательностей

к гентамицину. Картографирование показало, что последовательность ST96 является возникающей, так как она была описана только во время вспышек в США, в то время как две другие последовательности были обнаружены почти на всех континентах. *S. aureus* остается основной патологической угрозой, которая быстро развивается и вырабатывает устойчивость к антибиотикам. Следовательно, для предотвращения и реагирования на вспышки отравления необходимо продолжать мониторинг генети-

ческого профиля и устойчивости к антибиотикам штаммов *S. aureus*, циркулирующих во Вьетнаме.

Благодарность. Авторы благодарят за финансовую поддержку Министерство здравоохранения Вьетнама.

Финансирование. Работа выполнена на средства, предоставленные в рамках грантов, выделенных на тестирование безопасности пищевых продуктов.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Список литературы

1. Kadariya J., Smith T.C., Thapaliya D. *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcal* Food-Borne Disease: An Ongoing Challenge in Public Health // BioMed Research International. – 2014. – Vol. 214, № 1. – P. 827965. DOI: 10.1155/2014/82796
2. The European Union Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents and Food-borne Outbreaks in 2010 // EFSA Journal. – 2012. – Vol. 10, № 3. – P. 2597. DOI: 10.2903/j.efsa.2012.2597
3. The European Union Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents and Food-borne Outbreaks in 2011 // EFSA Journal. – 2013. – Vol. 11, № 4. – P. 3129. DOI: 10.2903/j.efsa.2013.3129
4. Joint Annual Health Review 2015. – Hanoi: Vietnam Ministry of health, Medical publishing house, 2016. – 223 p.
5. Sub Department of Food Hygiene and Safety of Ho Chi Minh. – School food safety assurance report, 2016. – 103 p.
6. Bhunia A. Foodborne Microbial Pathogens. – New York: Springer-Verlag, 2019. – 273 p.
7. Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal methods for sampling techniques from surfaces using contact plates and swabs [Электронный ресурс] // Vietnamese Ministry of Science and Technology. – 2009. – URL: <https://vanbanphapluat.co/tcvn-8129-2009-vi-sinh-vat-trong-thuc-pham-va-thuc-an-chan-nuoi> (дата обращения: 10.04.2020).
8. Pinchuk I.V., Beswick E.J., Reyes V.E. *Staphylococcal Enterotoxins* // Toxins. – 2010. – Vol. 2, № 8. – P. 2177–2197. DOI: 10.3390/toxins2082177
9. Bad bug book: handbook of foodborne pathogenic microorganisms and natural toxins. Second Edition. – Hanoi: Food and Drug Administration, 2012. – 292 p.
10. Chaibenjawong P., Foster S.J. Desiccation tolerance in *Staphylococcus aureus* // Archives of Microbiology. – 2010. – Vol. 193, № 2. – P. 125–135. DOI: 10.1007/s00203-010-0653-x
11. Argud n M.B., Mendoza M.C., Rodicio M.R. Food Poisoning and *Staphylococcus aureus* Enterotoxins // Toxins. – 2010. – Vol. 2, № 7. – P. 1751–1773. DOI: 10.3390/toxins2071751
12. Spa Typing Method for Discriminating among *Staphylococcus aureus* Isolates: Implications for Use of a Single Marker To Detect Genetic Micro- and Macrovariation / L. Koreen, S.V. Ramaswamy, E.A. Graviss, S. Naidich, J.M. Musser, B.N. Kreiswirth // Journal of Clinical Microbiology. – 2004. – Vol. 42, № 2. – P. 792–799. DOI: 10.1128/jcm.42.2.792-799.2004
13. Official Methods of Analysis of AOAC International. – 19-th edition. – Gaithersburg: AOAC International, 2012. – 771 p.
14. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. – 29-th edition. – Maryland, US: Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), 2016. – 25 p.
15. Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance / A. Magiorakos, A. Srinivasan, R. Carey, Y. Carmeli, M. Falagas, C. Giske, S. Harbarth, J. Hindler [et al.] // Clinical Microbiology and Infection. – 2012. – Vol. 18, № 3. – P. 268–281. DOI: 10.1111/j.1469-0691.2011.03570.x
16. Detection of genes for enterotoxins, exfoliative toxins, and toxic shock syndrome toxin 1 in *Staphylococcus aureus* by the polymerase chain reaction / W.M. Johnson, S.D. Tyler, E.P. Ewan, F.E. Ashton, D.R. Pollard, K.R. Rozee // Journal of Clinical Microbiology. – 1991. – Vol. 24. – P. 426–430. DOI: 10.1128/JCM.29.3.426-430.1991
17. Jolley K., Bray J. Maiden M. Open-access bacterial population genomics: BIGSdb software, the PubMLST.org website and their applications // Wellcome Open Research. – 2018. – Vol. 3. – P. 124. DOI: 10.12688/wellcomeopenres.14826.1
18. Assignment of *Staphylococcus* Isolates to Groups by spa Typing, SmaI Macrorestriction Analysis, and Multilocus Sequence Typing / B. Strommenger, C. Kettlitz, T. Weniger, D. Harmsen, A.W. Friedrich, W. Witte // Journal of Clinical Microbiology. – 2006. – Vol. 44, № 7. – P. 2533–2540. DOI: 10.1128/jcm.00420-06
19. eBURST: Inferring Patterns of Evolutionary Descent among Clusters of Related Bacterial Genotypes from Multilocus Sequence Typing Data / E.J. Feil, B.C. Li, D.M. Aanensen, W.P. Hanage, B.G. Spratt // Journal of Bacteriology. – 2004. – Vol. 186, № 5. – P. 1518–1530. DOI: 10.1128/jb.186.5.1518-1530.2004
20. Microreact: visualizing and sharing data for genomic epidemiology and phylogeography / S. Argimyn, K. Abudahab, R. Goater, A. Fedosejev, J. Bhai, C. Glasner, E. Feil, M. Holden [et al.] // Microbial Genomics. – 2016. – Vol. 2, № 11. – P. 1–11. DOI: 10.1099/mgen.0.000093
21. Based Upon Repeat Pattern (BURP): an algorithm to characterize the long-term evolution of *Staphylococcus aureus* populations based on spa polymorphisms / A. Mellmann, T. Weniger, C. Berssenbr gge, J. Rothg nger, M. Sammeth, J. Stoye, D. Harmsen // BMC Microbiology. – 2007. – Vol. 7, Article number 98. DOI: 10.1186/1471-2180-7-98
22. Mapping of spa with MLST *S. aureus* database [Электронный ресурс] // Ridom SpaServer. – 2020. – URL: <http://spa.ridom.de/mlst.shtml> (дата обращения: 19.03.2020).
23. The community summary report on trends and sources of zoonoses and zoonotic agents and food-borne outbreaks in the European Union in 2008 // EFSA Journal. – 2010. – Vol. 8, № 1. – P. 1496. DOI: 10.2903/j.efsa.2010.1496

Выделение и описание Staphylococcus aureus, вызвавшей две широкомасштабные вспышки пищевых отравлений во Вьетнаме / Лам Куок Хунг, Хуонг Минь Нгуен, Та Ту Иен, Ли Винь Хоа, Тран Хонг Ба, Фам Ли Куен, До Ту Чу Хуонг, Нгуэн Тан Чанг, Ли Ту Хонг Хао // Анализ риска здоровью. – 2020. – № 3. – С. 139–147. DOI: 10.21668/health.risk/2020.3.17

Research article

ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* FROM TWO LARGE-SCALE FOOD POISONING OUTBREAKS IN VIETNAM**Lam Quoc Hung¹, Huong Minh Nguyen³, Ta Thi Yen², Le Vinh Hoa², Tran Hong Ba², Pham Le Quyen^{2,4}, Do Thi Thu Huong⁵, Nguyen Thanh Trung², Le Thi Hong Hao²**¹Vietnam Food Administration, 135 Pho Nui Truc Str., Giang Vo, Ba Dinh, Hanoi, Vietnam²National Institute for food control, NIFC-Vietnam, 65 Pham Than Duat Str., Hanoi, Vietnam³Institute of Biotechnology, Vietnam Academy of Science and Technology, 18 Hoang Quoc Viet Str., Cau Giay, Hanoi, Vietnam⁴Quang Binh Center for Disease Control and Prevention, 3150 Rampart Road Str., Fort Collins, USA⁵National Agro-Forestry Fisheries Quality Assurance Department, 10 Nguyen Kong Hoan Str., Ba Dinh, Hanoi, Vietnam

In Vietnam and around the world, Staphylococcus aureus remains a major hazard of food safety and food poisoning. S. aureus is present in many places and easily contaminates food production during processing chains.

In this study, we successfully isolated S. aureus strains from suspected samples of two food borne poisoning outbreaks in Ha Giang and Vinh Phuc in 2017 and 2018, respectively. The collected samples were examined for presence of staphylococcal enterotoxins (SEs) by using 3MTMTECRATM Staph Enterotoxin kit, from there all the samples were positive with SEs. Different strains of S. aureus were isolated and then confirmed by MALDI-TOF technique. Those strains then were stored in Brain heart solution with 15% glycerol until further analysis.

Our results identified three STs, ST96, ST88 (spa type t7558), and ST72 (spa type t3092), were responsible for two outbreaks. Two virulence genes detected from the above strains were sea and sec. Furthermore, these strains are test for antibiotic resistance susceptibility with commonly antibiotics. Penicillin are found to be resisted by all three STs, in particular, ST96 and ST88 are both resistant to erythromycin while ST72 is resistant to gentamicin.

Taken together, our study highlights the usefulness of molecular characterization to study and monitor bacterial pathogens associated with food poisoning outbreaks in Vietnam.

Key word: antibiotic-resistant, food poisoning, β -lactamase, ESBL, ampC β -lactamases, *Staphylococcus aureus*, MLST, Spa genes, staphylococcal toxins.

References

1. Kadariya J., Smith T.C., Thapaliya D. *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcal* Food-Borne Disease: An Ongoing Challenge in Public Health. *BioMed Research International*, 2014, vol. 214, no. 1, pp. 827965. DOI: 10.1155/2014/82796
2. The European Union Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents and Food-borne Outbreaks in 2010. *EFSA Journal*, 2012, vol. 10, no. 3, pp. 2597. DOI: 10.2903/j.efsa.2012.2597

© Lam Quoc Hung, Huong Minh Nguyen, Ta Thi Yen, Le Vinh Hoa, Tran Hong Ba, Pham Le Quyen, Do Thi Thu Huong, Nguyen Thanh Trung, Le Thi Hong Hao, 2020

Lam Quoc Hung – PhD, Head of Department of Food poisoning monitoring (e-mail: lamquochungmoh@gmail.com; tel.: (+849) 133-19-936; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-0158-8905>).

Huong Minh Nguyen – PhD, Institute of Biotechnology (e-mail: nguyen.huong.m@gmail.com; tel.: (+849) 155-62-485; ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5302-2973>).

Ta Thi Yen – Msc., Researcher (e-mail: yenta@gmail.com; tel.: (+849) 049-59-050; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-3364-4887>).

Le Vinh Hoa – Researcher (e-mail: vinhhoa.lvh@gmail.com; tel.: (+843) 630-59-456; ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5360-4260>).

Tran Hong Ba – Researcher (e-mail: ba.pt070488@gmail.com; tel: (+849) 843-16-925; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6393-7197>).

Pham Le Quyen – Researcher, Laboratory of Food microbiology (e-mail: seulq311@gmail.com; tel.: (+843) 669-55-241; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9528-5293>).

Do Thi Thu Huong – Master of science, Head of Biological Laboratory (e-mail: huongicloud13@gmail.com; tel.: (+849) 120-50-135; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-2786-0065>).

Nguyen Thanh Trung – Master of science, PhD., Candidate, Head of Laboratory of Food microbiology (e-mail: nguyen-thanhtrung83@gmail.com; trungnt@nifc.gov.vn; tel.: (+843) 493-63-269; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8732-9911>).

Le Thi Hong Hao – PhD., General director of National Institute for Food Control (e-mail: lethihonghao@yahoo.com; tel.: (+849) 042-48-167; ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3570-8570>).

3. The European Union Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents and Food-borne Outbreaks in 2011. *EFSA Journal*, 2013, vol. 11, no. 4, pp. 3129. DOI: 10.2903/j.efsa.2013.3129
4. Joint Annual Health Review 2015. Hanoi, Vietnam Ministry of health, Medical publishing house Publ., 2016, 223 p.
5. Sub Department of Food Hygiene and Safety of Ho Chi Minh. School food safety assurance report, 2016, 103 p.
6. Bhunia A. *Foodborne Microbial Pathogens*. New York, Springer-Verlag Publ., 2019, 273 p.
7. Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal methods for sampling techniques from surfaces using contact plates and swabs. Vietnamese Ministry of Science and Technology, 2009. Available at: <https://vanbanphapluat.co/tcvn-8129-2009-vi-sinh-vat-trong-thuc-pham-va-thuc-an-chan-nuoi> (10.04.2020).
8. Pinchuk I.V., Beswick E.J., Reyes V.E. *Staphylococcal Enterotoxins*. *Toxins*, 2010, vol. 2, no. 8, pp. 2177–2197. DOI: 10.3390/toxins2082177
9. *Bad bug book: handbook of foodborne pathogenic microorganisms and natural toxins*. Second Edition. Hanoi, Food and Drug Administration Publ., 2012, 292 p.
10. Chaibenjawong P., Foster S.J. Desiccation tolerance in *Staphylococcus aureus*. *Archives of Microbiology*, 2010, vol. 193, no. 2, pp. 125–135. DOI: 10.1007/s00203-010-0653-x
11. Argudín M.Á., Mendoza M.C., Rodicio M.R. Food Poisoning and *Staphylococcus aureus* Enterotoxins. *Toxins*, 2010, vol. 2, no. 7, pp. 1751–1773. DOI: 10.3390/toxins2071751
12. Koreen L., Ramaswamy S.V., Graviss E.A., Naidich S., Musser J.M., Kreiswirth B.N. spa Typing Method for Discriminating among *Staphylococcus aureus* Isolates: Implications for Use of a Single Marker To Detect Genetic Micro- and Macrovariation. *Journal of Clinical Microbiology*, 2004, vol. 42, no. 2, pp. 792–799. DOI: 10.1128/jcm.42.2.792-799.2004
13. Official Methods of Analysis of AOAC International. 19-th edition. Gaithersburg, AOAC International Publ., 2012, 771 p.
14. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. 29-th edition. Maryland, US, Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) Publ., 2016, 25 p.
15. Magiorakos A., Srinivasan A., Carey R., Carmeli Y., Falagas M., Giske C., Harbarth S., Hindler J. [et al.]. Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clinical Microbiology and Infection*, 2012, vol. 18, no. 3, pp. 268–281. DOI: 10.1111/j.1469-0691.2011.03570.x
16. Johnson W.M., Tyler S.D., Ewan E.P., Ashton F.E., Pollard D.R., Rozee K.R. Detection of genes for enterotoxins, exfoliative toxins, and toxic shock syndrome toxin 1 in *Staphylococcus aureus* by the polymerase chain reaction. *Journal of Clinical Microbiology*, 1991, vol. 24, pp. 426–430. DOI: 10.1128/JCM.29.3.426-430.1991
17. Jolley K., Bray J., Maiden M. Open-access bacterial population genomics: BIGSdb software, the PubMLST.org website and their applications. *Wellcome Open Research*, 2018, vol. 3, pp. 124. DOI: 10.12688/wellcomeopenres.14826.1
18. Strommenger B., Kettlitz C., Weniger T., Harmsen D., Friedrich A.W., Witte W. Assignment of *Staphylococcus* Isolates to Groups by spa Typing, SmaI Macrorestriction Analysis, and Multilocus Sequence Typing. *Journal of Clinical Microbiology*, 2006, vol. 44, no. 7, pp. 2533–2540. DOI: 10.1128/jcm.00420-06
19. Feil E.J., Li B.C., Aanensen D.M., Hanage W.P., Spratt B.G. eBURST: Inferring Patterns of Evolutionary Descent among Clusters of Related Bacterial Genotypes from Multilocus Sequence Typing Data. *Journal of Bacteriology*, 2004, vol. 186, no. 5, pp. 1518–1530. DOI: 10.1128/jb.186.5.1518-1530.2004
20. Argimón S., Abudahab K., Goater R., Fedosejev A., Bhai J., Glasner C., Feil E., Holden M. [et al.]. Microreact: visualizing and sharing data for genomic epidemiology and phylogeography. *Microbial Genomics*, 2016, vol. 2, no. 11, pp. 1–11. DOI: 10.1099/mgen.0.000093
21. Mellmann A., Weniger T., Berssenbrügge C., Rothgänger J., Sammeth M., Stoye J., Harmsen D. Based Upon Repeat Pattern (BURP): an algorithm to characterize the long-term evolution of *Staphylococcus aureus* populations based on spa polymorphisms. *BMC Microbiology*, 2007, vol. 7, article number 98. DOI: 10.1186/1471-2180-7-98
22. Mapping of spa with MLST *S. aureus* database. *Ridom SpaServer*, 2020. Available at: <http://spa.ridom.de/mlst.shtml> (19.03.2020).
23. The community summary report on trends and sources of zoonoses and zoonotic agents and food-borne outbreaks in the European Union in 2008. *EFSA Journal*, 2010, vol. 8, no. 1, pp. 1496. DOI: 10.2903/j.efsa.2010.1496

Lam Quoc Hung, Huong Minh Nguyen, Ta Thi Yen, Le Vinh Hoa, Tran Hong Ba, Pham Le Quyen, Do Thi Thu Huong, Nguyen Thanh Trung, Le Thi Hong Hao. Isolation and characterization of *staphylococcus aureus* from two large-scale food poisoning outbreaks in Vietnam. *Health Risk Analysis*, 2020, no. 3, pp. 139–147. DOI: 10.21668/health.risk/2020.3.17.eng

Получена: 14.04.2020

Принята: 17.08.2020

Опубликована: 30.09.2020