

# МОЛЕКУЛЯРНАЯ ЭПИДЕМИОЛОГИЯ ВНУТРИБОЛЬНИЧНЫХ ЗОЛОТИСТЫХ СТАФИЛОКОККОВ В СТАЦИОНАРАХ РАЗЛИЧНЫХ РЕГИОНОВ РОССИИ

А.В. Романов, Е.А. Чернов, М.В. Эйдельштейн

НИИ антимикробной химиотерапии, Смоленск

E-mail: andrew.romanov@antibiotic.ru

Золотистый стафилококк относится к одним из основных патогенов человека. В последние несколько десятилетий инфекции, вызванные метициллинрезистентным золотистым стафилококком (MRSA), стали глобальной проблемой. MRSA устойчивы ко всем  $\beta$ -лактамам антибиотикам (за исключением анти-MRSA-цефемов) и являются одной из основных причин внутрибольничных инфекций во всем мире. Устойчивость MRSA к  $\beta$ -лактамам опосредована наличием *mecA*-гена, который кодирует измененный пенициллинсвязывающий белок 2a (PBP2a, называемый также PBP2') с пониженным сродством к  $\beta$ -лактамам. Исследование эпидемиологии MRSA имеет важное значение для контроля его распространения и разработки терапевтических стратегий против жизнеугрожающих MRSA-инфекций. Нами проведено молекулярное типирование 404 нозокомиальных MRSA-изолятов, собранных от пациентов в рамках многоцентровых микробиологических исследований в России в 1998–2008 гг. Штаммы были отобраны в соответствии с их профилем антибиотикорезистентности, географическим происхождением и датой изоляции. Наличие генов лейкоцидина Пантон-Валентина (PVL) и видов стафилококковой кассеты хромосомы *mec* (SCC*mec*) определяли с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР). Генетическое разнообразие штаммов оценивали с помощью мультилокусного анализа тандемных повторов с переменным числом звеньев (MLVA), секвенирования гена стафилококкового белка A (*spa*) и мультилокусного секвенирования-типирования (MLST). Все MRSA-штаммы были PVL-отрицательными. SCC*mec*-кассеты типов III и IV выявлены у преобладающего большинства исследованных штаммов. Один изолят, по-видимому, имеет 2 SCC*mec*-элемента – IV и V. По данным MLVA, все штаммы были разделены на 115 типов, причем MRSA располагались в пределах обособленных генетических групп. Секвенирование варибельного участка гена *spa* и MLST-типирование выявили соответственно 20 и 6 типов. Эволюционно успешные клоны MRSA с одинаковыми MLVA-профилями и *spa*-типами были обнаружены в географически удаленных регионах России. Популяционная структура внутрибольничных штаммов MRSA в России, следовательно, является клональной и характеризуется присутствием международных клонов, в основном ST8-*spa*-тип t008-SCC*mec* IV и ST239-*spa*-тип t030 и t037-SCC*mec* III.

**Ключевые слова:** MRSA, эпидемиология, типирование

## MOLECULAR EPIDEMIOLOGY OF NOSOCOMIAL STAPHYLOCOCCUS AUREUS IN HOSPITALS IN DIFFERENT REGIONS OF RUSSIA

A. V. Romanov, E. A. Chernov, M. V. Edelstein

Institute of antimicrobial chemotherapy, Smolensk

*Staphylococcus aureus* is a common human pathogen. In the past few decades, infections caused by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) have become a global problem. MRSA is resistant to all  $\beta$ -lactam antibiotics, except anti-MRSA cepheems, and is one of the main causes of hospital-acquired infections worldwide. The resistance to  $\beta$ -lactams in MRSA is mediated by the presence of *mecA* gene encoding penicillin-binding protein 2a (PBP2a; also called PBP2') with reduced affinity to  $\beta$ -lactams. The research on MRSA epidemiology is essential for controlling its spread and for delivering therapeutic strategies against life-threatening MRSA infections. In this research we performed molecular typing of 404 nosocomial MRSA isolates collected from adult patients as part of national surveillance studies in Russia in 1998–2008. The strains were selected according to their antibiotic resistance profile, geographic origin and date of isolation. The presence of Panton-Valentine leukocidin (PVL) genes and types of staphylococcal cassette chromosomemec (SCC*mec*) were determined by means of PCR. Genetic diversity of isolates was assessed with the use of multilocus variable-number tandem repeat analysis (MLVA), staphylococcal protein A (*spa*) gene sequencing and multilocus sequence typing (MLST). All the strains were PVL-negative. SCC*mec* type III and type IV cassettes were most prevalent in studied isolates. One isolate carried two copies of *mecA* gene associated with SCC*mec* IV and V. By MLVA typing, all the isolates were clustered into 115 types, besides MRSA belonged to distinct clusters. *Spa* typing and MLST revealed 20 and 6 types respectively. Successful MRSA clones sharing the same MLVA profiles and *spa* types have been found in geographically distant regions of Russia. The population structure of nosocomial MRSA strains in Russia was therefore clonal and was characterized by expansion of international clones, mainly, ST8-*spa* type t008-SCC*mec* IV and ST239-*spa* type t037-SCC*mec* III.

**Key words:** MRSA, epidemiology, typing

## ВВЕДЕНИЕ

Золотистый стафилококк (*S. aureus*) является факультативно-анаэробным грамположительным микроорганизмом кокковой формы. Может быть представителем нормальной микрофлоры кожи и слизистой оболочки носовых ходов. Золотистый стафилококк является возбудителем инфекций кожи (фолликулит, импетиго, фурункулы, целлюлит, карбункулы, синдром ошпаренной кожи, абсцессы), а также может спровоцировать различные тяжелые и жизнеугрожающие заболевания, такие, как пневмония, менингит, остеомиелит, эндокардит, токсический шок, бактериемия, сепсис, и является одной из основных причин внутрибольничных инфекций [18]. Кроме того, известна способность золотистого стафилококка к развитию устойчивости к большинству классов антибиотиков. В первые десятилетия после введения пенициллина в медицинскую практику устойчивость к этому препарату возникла вследствие приобретения золотистым стафилококком плазмид, несущих гены пенициллиназ. Устойчивость к пенициллину была преодолена внедрением пенициллиназоустойчивых препаратов (метициллин, оксациллин, клоксациллин, флуклоксациллин, диклоксациллин, нафциллин), разработанных в качестве альтернативных для лечения инфекций, вызванных продуцирующими пенициллиназу стафилококками. В 1960-х годах был изолирован первый штамм метициллинрезистентного золотистого стафилококка (MRSA). Вскоре после этого штаммы MRSA начали распространяться по всему миру [22]. MRSA, как и любой из штаммов золотистого стафилококка, может вызвать серьезные заболевания у людей, но отличается тем, что устойчив ко всем  $\beta$ -лактамам (пенициллины, цефалоспорины и карбапенемы), за исключением 5-го поколения цефалоспоринов (так называемых анти-MRSA-цефемов) [41]. На протяжении 3 десятилетий MRSA были известны почти исключительно как нозокомиальные патогены. Больницы, дома для престарелых, учреждения длительного ухода были и остаются основными резервуарами MRSA. Однако с конца 1990-х годов MRSA-инфекции начали появляться во внебольничных условиях. Таким образом, по происхождению инфекции штаммы MRSA можно разделить на внебольничные (CA-MRSA) и нозокомиальные (HA-MRSA). Однако не выяснено, существуют ли генетические различия между этими группами штаммов. CA-MRSA и HA-MRSA существенно различаются по чувствительности к антибиотикам и вирулентности. Некоторые авторы указывают на присутствие лейкоцидина Пантон-Валентина (PVL) генов в качестве возможного маркера CA-MRSA, но в последнее время PVL-позитивные штаммы были обнаружены в стационарах [38].

Устойчивость к  $\beta$ -лактамам антибиотикам у MRSA опосредована геном *mecA*, кодирующим пенициллинсвязывающий белок 2a (PBP2a, или PBP2'), который имеет меньшее сродство к  $\beta$ -лактамам. Ген *mecA*

имеет размер 2,1 Кб и находится на мобильных генетических элементах, известных как стафилококковая хромосомная кассета *mec* (SCC*mec*). Элементы SCC*mec* состоят из *mec*-комплекса, содержащего *mecA*-ген, регуляторные гены и инсерционные последовательности (IS431, IS1182, IS1272); *ccr*-комплекса, состоящего либо из 1 (*ccrA*) или 2 (*ccrA* и *ccrB*) сайтспецифических рекомбиназ и 3 соединительных регионов.

В настоящее время известно 5 классов *mec* комплекса: A, B, C1, C2, D и 5 аллотипов *ccr* комплекса: 1, 2, 3, 4 и 5. Различные комбинации классов *mec*-комплекса и аллотипов *ccr*-комплекса составляют основу классификации SCC*mec* кассет по типам. Регуляторные гены могут быть повреждены посредством встраивания инсерционных элементов, что приводит к стабильной депрессии *mecA* [28]. SCC*mec*-элементы могут нести дополнительные детерминанты устойчивости к антибиотикам нескольких классов, расположенные на интегрированной плазмиде или транспозоне [37]. Например, плазмиды pUB110, присутствующие в SCC*mec* типа II, содержат ген устойчивости к блеомицину (*ble*) и ген резистентности к канамицину и тобрамицину [*ant*(4')]. Плазмиды pI258 и pT181, обнаруженные в SCC*mec* III, могут нести детерминанты устойчивости к эритромицину, тетрациклину, и тяжелым металлам. Транспозон Tn554, который содержит гены устойчивости к эритромицину, линкосамидам, стрептограмину (*ermA*), стрептомицину и спектиномицину (*aad9/spc*), присутствует в SCC*mec* II, III, VIII и SCCNg. SCC*mec* IV может содержать Tn4001c геном *aacA-aphD*, кодирующий бифункциональный аминокликозидмодифицирующий фермент [35].

До недавнего времени существовали 2 противоположные теории, объясняющие эволюцию MRSA. «Моноклональная» теория основана на предположении, что все MRSA-клоны имеют общего предка, и SCC*mec*-элемент приобретался этим предшественником только 1 раз, в то время как «поликлональная» теория утверждает, что SCC*mec*-элементы были приобретены независимо друг от друга различными генетическими линиями золотистого стафилококка. Последняя теория была доказана многочисленными исследованиями и, таким образом, получила более широкое признание [27].

Понимание эпидемиологии и популяционной структуры MRSA имеет важное значение для контроля его распространения и разработки терапевтических стратегий против угрожающих жизни инфекций MRSA [36]. Сегодня разработано много фенотипических и генотипических методов для отнесения штаммов MRSA к определенной группе или кластеру в рамках вида золотистого стафилококка [18].

Фенотипические методы все еще широко используются для описания и классификации штаммов. Некоторые из этих методов (такие, как определение чувствительности к антимикробным препаратам) сохраняют непосредственное практическое значение.

Тем не менее фенотипические методы не имеют необходимой дискриминирующей способности, часто не соответствуют эпидемиологическим данным, более склонны к изменчивости в зависимости от условий окружающей среды. По этим причинам фенотипические методы не столь подходят для типирования штаммов, как молекулярные методы, особенно в крупных эпидемиологических исследованиях [36]. Применение молекулярных методов типирования для анализа международной коллекции штаммов золотистого стафилококка привело к выявлению преимущественно клональной популяционной структуры этого вида.

Было показано, что большинство штаммов MRSA, распространенных по всему миру, принадлежат к определенным клональным линиям, адаптированным к колонизации человека или животных. Представители этих линий обладают специфическим набором последовательностей генов «домашнего хозяйства» и детерминант вирулентности [5]. Продолжительный анализ показывает, что некоторые MRSA-клоны являются эпидемическими [21].

Гель-электрофорез в пульсирующем поле (PFGE) был одним из первых молекулярных методов для изучения генетического родства между штаммами MRSA [4]. PFGE имеет высокую дискриминирующую способность и успешно используется для отслеживания вспышек MRSA-инфекций [4]. Однако этот метод менее пригоден для анализа большого числа штаммов, собранных из различных источников, в силу ряда ограничений: во-первых, различие в PFGE-профилях не обязательно отражает отсутствие филогенетического сходства между штаммами, во-вторых, в силу некоторой субъективности оценки может быть затруднен обмен данными между лабораториями, в-третьих, отнесение штамма к известным клональным линиям при использовании PFGE-профилей проблематично, если не невозможно [4].

Новые методы, основанные на секвенировании ДНК, позволяют преодолеть большинство из этих ограничений и напрямую сравнивать результаты типирования с помощью централизованных баз данных. Один из таких методов, который обладает сопоставимой или более высокой, чем PFGE, разрешающей способностью, — мультилокусный анализ тандемных повторов с переменным числом звеньев (MLVA). MLVA основан на идентификации естественных вариаций числа тандемных повторов ДНК (VNTR) в нескольких локусах генома. Это достигается с помощью ПЦР-амплификации и определения размера ампликонов, соответствующих каждому локусу VNTR. MLVA впервые был применен для типирования штаммов золотистого стафилококка в 2003 г. А. Sabat и соавт. [30], которые оценивали изменчивость варибельных регионов 5 стафилококковых генов. К. Hardy и соавт. [11] предложили использовать альтернативный набор VNTR-локусов, названных стафилококковыми перемежающимися повторяющимися единицами

(SIRU), большинство из которых расположены в межгенных регионах и, следовательно, с большей вероятностью подвержены нейтральной селекции. MLVA-типирование с использованием 6 SIRU-локусов впоследствии было использовано R. Ikawaty и соавт. [14] и продемонстрировало высокую дискриминирующую способность, хорошее соответствие с эпидемиологическими данными и результатами других методов. В последнее время разработаны MLVA-схемы, включающие различные сочетания VNTR-локусов (от 8 до 14 локусов) [29, 40]. Точность определения размеров продукта ПЦР и, следовательно, числа копий VNTR, а также производительность можно улучшить, заменив гель-электрофорез на капиллярный электрофорез с автоматической флуоресцентной детекцией [31].

Поскольку в эволюции золотистого стафилококка мутации происходят чаще, чем рекомбинационные события, секвенирование одного локуса, содержащего повторы, например, коагулазного гена (*coa*) или гена стафилококкового белка А (*spa*), также может быть использовано для надежного и точного типирования MRSA. Внутренняя область повторов гена *spa* (соответствующая SIRU21) более полиморфна, чем повторы в регионе *coa*, поэтому *spa*-типирование обеспечивает более высокое разрешение, чем *coa*-типирование. Кроме того, *spa*-типирование стало международно признанным методом исследования эпидемиологии MRSA благодаря созданию централизованной базы данных (<http://spaServer.ridom.de>), разработке номенклатуры и программного обеспечения для анализа повторяющихся последовательностей *spa* и автоматического назначения *spa*-типа [12].

Мультилокусное секвенирование-типирование (MLST) основано на секвенировании внутренних фрагментов, как правило, 7 основных генов «домашнего хозяйства». MLST не обладает достаточной дискриминирующей способностью для исследования локальных вспышек, так как накопление нуклеотидных замен в генах «домашнего хозяйства» является относительно медленным процессом и MLST-профиль бактериального изолята достаточно стабилен во времени. Однако этот метод идеально подходит для изучения глобальной эпидемиологии и популяционной структуры. MLST для золотистого стафилококка разработали M. Enright и соавт. в 2000 г. [7]. Онлайн-базы данных MLST (<http://saureus.mlst.net/>) в настоящее время содержат около 4500 штаммов золотистого стафилококка более 2300 сиквенс-типов (ST). Данных по молекулярной эпидемиологии MRSA в России довольно мало, и зачастую исследования носят локальный характер либо полученные данные невозможно напрямую сравнить с международными из-за различных методик выполнения.

Целью данного исследования работы было изучение молекулярной эпидемиологии штаммов HA-MRSA, собранных от пациентов в различных регионах России за период 1998–2008 гг.

## МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

**Бактериальные штаммы.** В общей сложности 1495 штаммов MRSA было собрано от пациентов с подтвержденными внутрибольничными инфекциями в ходе 3 многоцентровых микробиологических проектов в 1998–2000; 2002–2004 и 2006–2008 гг. Были отобраны 404 штамма (278 – MRSA и 126 – MSSA) так, чтобы представлять каждый профиль резистентности (эритромицин, клиндамицин, ципрофлоксацин, гентамицин, сульфаметоксазол/триметоприм и оксациллин) в пределах одного отделения, участвовавшего в каждом из 3 временных периодов стационара. Инвазивные штаммы, например, MRSA, выделенные из крови, спинномозговой жидкости или при биопсии и с более ранней датой изоляции были предпочтительнее. Все штаммы были подвергнуты MLVA- и SCC*mec*-типированию, выявлению PLV-генов. MLST и *sra*-типирование проводили выборочно для репрезентативных штаммов, определенных на основании MLVA- и SCC*mec*-типирования.

**Идентификации изолятов до вида.** Все изоляты были определены до вида с помощью матрично-ассоциированной лазерной десорбции-ионизации времяпролетной масс-спектрометрии (MALDI-TOF MS). Масс-спектры были получены на системе Microflex LT (Bruker Daltonics, Германия) и проанализированы с помощью программного обеспечения MALDI Biotyper v.3 (Bruker Daltonics, Германия).

**Определение чувствительности к антибиотикам.** Минимальная ингибирующая концентрация (МИК) для оксациллина, эритромицина, клиндамицина, ципрофлоксацина, гентамицина и триметоприм/сульфаметоксазола определена с помощью метода разведения в агаре. Результаты интерпретированы в соответствии с критериями CLSI [3]. MRSA-фенотип был подтвержден с помощью диск-диффузионного теста с 30 мкг цефокситина. Штаммы золотистого стафилококка ATCC® 25923 (MSSA) и ATCC® 33591 (MRSA) использовали для контроля качества.

**Выделение ДНК.** Геномная ДНК была выделена из бактерий с помощью наборов Omnix (Omnix Co Ltd, Россия). Выделенная ДНК хранилась при -20°C.

**SCC*mec*-типирование.** Тип SCC*mec*-кассеты был определен для каждого MRSA-штамма методом ПЦР, описанным Р. Лу и соавт. [23]. *ccrC*-комплекс, (специфичный для SCC*mec* типа V), – с использованием праймеров и в условиях, описанных С. Milheirigo и соавт. [25]. Амплификация была выполнена на приборе Rotor-Gene 6000 (Corbett Life Science, Австралия). Продукты ПЦР разделяли электрофорезом в 1% агарозном геле, окрашивали бромидом этидия и визуализировали с помощью системы визуализации PhotoDoc-IT (UVP, США).

Смесь фрагментов ДНК Lambda BstEII Digest (117-8454 пар оснований) и pUC18 *Hae*III Digest (11-587 пар оснований) (Sigma Chemical, США) использовалась как маркер молекулярной массы. Штаммы золотистого стафилококка, обладающие кассетами SCC*mec* I, II, III, IV и V типов, были использованы в качестве контроля.

**Определение числа копий *tes*-гена.** Число копий гена *tes* на геном определяли с помощью коммерческого набора ПЦР в реальном времени для количественного определения MRSA – АмплиСенс MRSA-скрин-титр-FL (ИнтерЛаб Сервис, Россия). Гены *tesA* и *nuc* (последний используется в качестве однокопийного гена «домашнего хозяйства») были количественно определены с помощью рекомбинантных калибраторов, входящих в комплект; соотношение этих генов рассчитывали с помощью программного обеспечения Rotor-Gene 6000. Для повышения точности анализировали серию из 4 разведений каждого образца.

**Выявление PLV-генов.** Наличие PVL-генов оценивали методом ПЦР, описанным G. Lina и соавт. [20]. Штамм золотистого стафилококка ATCC® 25923 служил в качестве положительного контроля.

**MLVA-типирование** штаммов золотистого стафилококка было выполнено по 6 локусам SIRU (01, 05, 07, 13, 15, 21) в соответствии с методом K. Hardy и соавт. [11] и R. Ikawaty и соавт. [14], но с рядом изменений:

- Прямой праймер SIRU21\_L (5'-AGCAGTAGTGCCGTTTGCTT-3'), используемый для амплификации области повторов *sra* (SIRU21), был заменен на праймер *sra*-1113f (5'-TAAAGACGATCCTTCGGTGAGC-3'), предложенный B. Strommenger и соавт. для *sra*-типирования [34]. ПЦР-продукты, образованные с последним праймером, на 57 п.о. больше, чем соответствующие фрагменты, полученные с обычным праймером. Данное изменение позволяло предотвратить образование неспецифических ПЦР-продуктов, иногда генерируемых с SIRU21\_L.
- Праймеры, используемые для амплификации локусов SIRU, были 5'-мечеными флуоресцентными красителями: FAM, R6G или ROX. Эти праймеры были объединены с соответствующими парными праймерами в 2 триплексные ПЦР: в одну вошли SIRU01, SIRU07 и SIRU13, в другую – SIRU05, SIRU15 и SIRU21.

Затем продукты каждой ПЦР смешивали с TAMRA-меченым pUC18 внутренним стандартом молекулярной массы [6]. Далее они были проанализированы капиллярным электрофорезом с автоматической флуоресцентной детекцией на приборе ABI PRISM 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, США). Фрагменты ДНК, соответствующие каждо-



му локусу, были определены в соответствии с цветом с помощью программы Peak Scanner v1.0 (Applied Biosystems, США).

*Spa-типирование* проводили в соответствии с методом H. Frenay и соавт. [8] с изменениями, описанными D. Harmsen [12] и B. Kahl и соавт. [17]. Область *spa* была амплифицирована с праймерами *spa*-1113f (5'-TAAAGACGATCCTTCGGTGAGC-3') и *spa*-1514r (5'-CAGCAGTAGTGCCGTTTGCTT-3'). ПЦР-продукты очищали с помощью ферментативной обработки экзонуклеазой I и щелочной фосфатазой креветки (Fermentas, Литва) и секвенировали с обеих сторон с использованием тех же праймеров, что и для амплификации. Для секвенирования использовали набор BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit и прибор ABI PRISM310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems США). Числовые коды *spa*-повторов и *spa*-типы были определены в соответствии с номенклатурой Ridom SpaServer (<http://spa.ridom.de>) с использованием плагина для *spa*-типирования BioNumerics V 6.6 (Applied Maths, Бельгия).

*MLST* проводили путем амплификации и секвенирования общепризнанных хромосомных маркеров: *arcC*, *aroE*, *glpF*, *gmk*, *pta*, *tpi* и *yqiL*, как описано M. Enright и соавт. [7] и на веб-сайте MLST-типирования золотистого стафилококка (<http://saureus.mlst.net/misc/info.asp>). Аллельные профили и сиквенс-типы были автоматически определены MLST-плагином BioNumerics V 6.6 (Applied Maths).

*Обработка и анализ данных типирования.* Все данные экспериментов обработаны с помощью BioNumerics v.6.6 (Applied Maths, Бельгия). Кластерный анализ комбинированных MLVA- и SCCmec-профилей выполнен по алгоритму минимального разветвленного дерева с категориальными значениями из размеров ампликонов SIRU- и SCCmec-типов. Родственность *spa*-типов оценивали с помощью плагина Spa Clustering и метода невзвешенного попарного среднего (UPGMA).

## РЕЗУЛЬТАТЫ

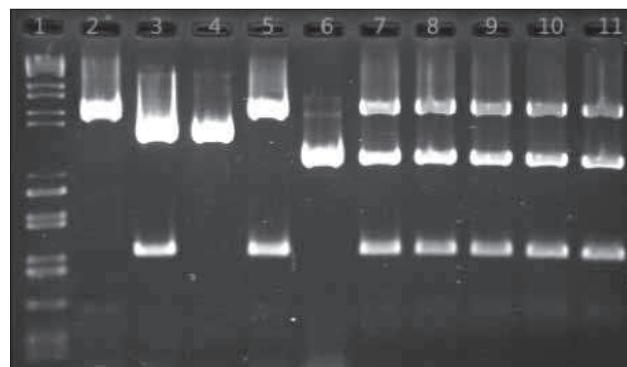
*SCCmec-типирование.* При использовании метода P. Lu и соавт. [23] типичные продукты амплификации *mecA*-IS1272 (1592 п.о.) и *ccrAB2*-комплекса (315 п.о.) одновременно были получены у 178 (63,8%) изученных изолятов. Эта картина характерна для SCCmec типа IV. У 100 (35,8%) изолятов показано наличие ПЦР-продукта *mecA*-*mecRI* (1164 п.о.) при отсутствии *ccrAB2* — картина, характерная для SCCmec типа III. Интересно, что 1 (0,4%) изолят REV-886 дал необычную картину амплификации из 3 продуктов ПЦР: 1592 п.о.; 804 п.о. и 315 п.о., соответствующие *mecA*-IS1272, *mecA*-IS431 и *ccrAB2*. Наличие 2 различных *mec*-комплексов (классов В и С2) в этом изоляте подтверждено моноплексной ПЦР с праймерами для *mecA*-IS1272 и *mecA*-IS431;

в дальнейшем было проведено секвенирование соответствующих ПЦР-продуктов. Чтобы исключить возможность загрязнения ДНК другого штамма, REV-886 был подвергнут нескольким пассажам, и ПЦР была повторена для образцов ДНК, изолированных независимо друг от друга из 5 отдельных колоний, выросших на отдельных чашках. Во всех повторных экспериментах был получен тот же профиль продуктов ПЦР (рис. 1). Поскольку метод P. Lu и соавт. не обнаруживает *ccrC*-комплекс, характерный для SCCmec V, была использована дополнительная ПЦР с праймерами, описанными C. Milheirico и соавт. [25], которая сгенерировала *ccrC*-фрагмент ожидаемого размера (495 п.о.) у золотистого стафилококка REV-886. Таким образом, скорее всего, отмечалось наличие 2 различных SCCmec-элементов — типов IV и V.

Результаты количественной ПЦР в реальном времени показали, что отношение числа копий *mec*/*mec*-генов было в среднем ( $M \pm SD$ )  $2,05 \pm 0,09$  для золотистого стафилококка REV-886 и  $1,17 \pm 0,09$  — для контрольных штаммов золотистого стафилококка с SCCmec IV.

*Обнаружение гена PVL.* Все изоляты MRSA были PVL-отрицательными по данным ПЦР, в то время как этот ген был обнаружен в положительном контроле (золотистом стафилококке ATCC® 25923).

*MLVA-типирование.* По данным MLVA-типирования, все изоляты были разделены на 115 типов (каждый из них характеризуется уникальным профилем аллелей SIRU), причем метициллинчувствительные штаммы ( $n=125$ ) проявили большое генетическое разнообразие, в то время как MRSA ( $n=279$ ), за исключением 6, расположились в пределах 3 обособленных групп. Более наглядная кластеризация комбинированных MLVA- и SCCmec-профилей позволила выявить 5 генетических групп MRSA. Ближайший тип в каждой из этих групп от-



**Рис. 1.** Определение типа SCCmec, электрофорез ПЦР-продуктов. Дорожки: 1 — маркер молекулярной массы; 2–6 — контрольные штаммы с известными типами SCCmec I–V соответственно; 7–11 — 5 пассажей штамма REV-886.



и их однолокусные (tpi) варианты ST685 и ST368, относятся к клональному комплексу 8 (CC8). ST8 и ST685 характеризовались *spa*-типами: t008, t068, t118, t024, t190, t400, t7868 и t3308, и соответствовали MLVA/SCCmec-группе G1, SCCmec IV. ST239 и ST368 включали *spa*-типы: t030, t037, t363, t074, t233, t129, t425, t2270 и t7576 и охватывали изоляты MLVA/SCCmec групп G2 и G3, содержали SCCmec III. Как и ожидалось, редкие штаммы MRSA из не связанных *spa*-типов – t127 (MLVA/SCCmec группы G4) и t667 (MLVA/SCCmec группы G5) – относились по MLST к различным STS: соответственно ST1 и ST154. Были обнаружены 2 штамма, принадлежащие к одному *spa*-типу (t008), но разным ST (ST8 и ST685). Еще 2 штамма имели один и тот же MLVA-профиль, но различные *spa*-типы и даже разные, но близкородственные типы MLST (t425/ST368 и t2270/ST239).

### ОБСУЖДЕНИЕ

Согласно последним опубликованным данным многоцентрового исследования, общая распространенность резистентности к метициллину золотистого стафилококка, изолированного в отделениях реанимации и интенсивной терапии в России, достигла почти 50% [41]. Похожая ситуация отмечается во многих странах – Испании, Ирландии, Великобритании, Венгрии, Румынии, Италии, Греции, Португалии, на Кипре и Мальте [33]. MRSA часто проявляют устойчивость ко многим другим классам антибиотиков, включая аминогликозиды, макролиды, тетрациклины и линкозамиды, хотя устойчивость к этим препаратам может варьировать от штамма к штамму. Для этого исследования клинические изоляты *S. aureus* были выбраны для представления возможно большего количества разнообразных профилей антибиотикорезистентности. Некоторые препараты (ванкомицин, тейкопланин, тигециклин, цефтобипрол, цефтаролин, линезолид, даптомицин, триметоприм/сульфаметоксазол, фузидиевая кислота) обычно сохраняют высокую активность в отношении MRSA. Все изоляты, включенных в наше исследование, были *in vitro* восприимчивы к указанным препаратам (данные не представлены). За последние годы растущая потребность в уточнении эпидемиологии и популяционной структуры MRSA привела к разработке методов молекулярного типирования, способных различать штаммы золотистого стафилококка с различной дискриминирующей способностью. Высокая дискриминирующая способность таких методов, как MLVA и *spa*-типирование, как правило, используется для изучения локальной эпидемиологии MRSA (т.е. расследования вспышек в стационарах), но они генерируют дискретные данные, которые поддаются анализу с использованием централизованных баз данных. Другие

методы – такие, как MLST, больше подходят для отслеживания долгосрочного развития и установления филогенетического родства штаммов на региональном, национальном и международном уровнях. Определение горизонтально приобретаемых генетических маркеров: SCCmec-элементов и детерминант вирулентности (таких, как *PVL*-гены) обеспечивает дополнительные важные характеристики MRSA-клонов [35]. В нашем исследовании все эти методы были объединены, чтобы получить подробную информацию о молекулярной эпидемиологии HA-MRSA в России. Для обозначения генетических линий MRSA мы использовали общепринятую номенклатуру, которая включает MLST-клональный комплекс (CC), сиквенс-тип (ST), *spa*-тип, и тип элемента SCCmec [5]. SCCmec-кассеты типов III и IV были обнаружены в большинстве российских MRSA. Не найдено ни одного изолята, содержащего тип I или II SCCmec-элементов. Этот результат соответствует сообщениям из других стран о том, что заболеваемость, вызванная HA-MRSA штаммами, содержащими SCCmec-типы I и II, сократилась за последние десятилетия [2]. В конце 1990-х годов SCCmec IV часто встречался у золотистых стафилококков, изолированных из внебольничных условий, он, по мнению некоторых авторов, является молекулярным маркером CA-MRSA. Однако современные исследования показали, что во многих странах SCCmec IV присутствует во внутрибольничных штаммах MRSA, и наоборот, SCCmec III (распространенность которого растет во всем мире) может быть обнаружен в CA-MRSA [33]. *PVL* является важным фактором вирулентности, который также рассматривался как маркер внебольничного происхождения штаммов MRSA. Тем не менее последние исследования свидетельствуют об изоляции *PVL*-положительных штаммов MRSA у пациентов с внутрибольничными инфекциями [15, 24, 38]. С другой стороны, *PVL*, как известно, присутствует во всех CA-MRSA штаммов глобально распространенной генетической линии ST8-SCCmec IV, но отсутствует у большинства штаммов MRSA той же генетической линии, изолированных во внутрибольничной среде [2]. В связи с этим важно отметить, что все изученные SCCmec IV изоляты были *PVL*-отрицательными. Интересно, что в данном исследовании мы нашли один изолят REV-886, который показал наличие 2 разных *mec*-комплексов (типов B и C2) и *ccr*-комплексов (типа 2 – A2B2 и типа 5 – C1). Поэтому мы подозреваем наличие у этого изолята 2 SCCmec-элементов: типов IV и V. Этот вывод подтверждается результатами количественной ПЦР в реальном времени, в ходе которой обнаружены 2 копии гена *mec* в геноме золотистого стафилококка REV-886. Хотя в последние годы было несколько сообщений о золотистых стафилококках, содержащих необычные SCCmec-элементы,



и о коагулазонегативных стафилококках с мозаичными и несколькими копиями *SCCmec* [9], по нашим данным, это первый случай одновременного присутствия 2 *SCCmec*-элементов в клиническом штамме *S. aureus*. Детальная структура этих элементов и их расположение в хромосоме еще не определены. В качестве метода «первой линии» в данном исследовании мы использовали MLVA. Этот метод дискриминировал наибольшее количество типов – 115; *spa*-типирование и MLST выявили соответственно 20 и 6 типов. Таким образом, MLVA оказался весьма дискриминирующим методом для типирования MRSA, как ранее сообщали R. Ikawaty и соавт. [14]. Кластеризация комбинированных данных MLVA/*SCCmec* распределила изоляты на 5 групп, которые очень хорошо соответствовали филогенетическим группам, определенным *spa*-типированием и MLST (см. рис. 2). Несмотря на общее соответствие между методами типирования, отмечены некоторые незначительные расхождения. Первое несоответствие обнаружено у пары штаммов, каждый из которых имел различные *spa*-типы, но одинаковый MLVA/*SCCmec*-профиль. В другом случае у каждого штамма из пары были идентичные MLVA/*SCCmec*-профили, но штаммы имели различные типы *spa* и ST. Эти противоречивые результаты можно объяснить тем, что MLVA, *SCCmec* и *spa*-типирование вместе с MLST базируются на различных молекулярных основах типирования. Например, MLVA, который должен иметь дискриминирующую способность, близкую к PFGE, не может обнаружить некоторые типы мутаций, которые не влияют на длину VNTR-локусов (например, одиночные нуклеотидные полиморфизмы).

Дискриминирующая способность MLVA основана на оценке длины определенных локусов, содержащих VNTR, которые изменяются очень быстро. Как *spa*, так и MLST-типирование основаны на оценке нуклеотидной последовательности. Наши исследования показали, что штамм, имеющий ST685, может быть кластеризован со штаммом, имеющим ST8 к тому же MLVA/*SCCmec*-профилю. Аллельный профиль ST8 таков: 3-3-1-1-4-4-3, а аллельный профиль ST685: 3-3-1-1-4-28-3. Таким образом, ST685 является одновариантным ST8 по локусу по *trI*. Такая же ситуация наблюдалась, когда ST368 и ST239 были назначены штаммам с одинаковым MLVA/*SCCmec*-профилем. Аллельные профили для ST239 и ST368 – это соответственно 2-3-1-1-4-4-3 и 2-3-1-1-4-65-3, следовательно, они отличаются лишь на 1 locus. Эти одиночные нуклеотидные замены не могут быть обнаружены с помощью MLVA [13].

Назначение различных *spa*-типов штаммам, относящимся к 1 MLVA/*SCCmec*-профилю, можно объяснить таким же образом. В случае *spa*-типирования секвенирование выполняется только для 1 локуса, содержащего VNTR, которые являются

высокоизменчивыми, поэтому дискриминирующая способность *spa*-типирования занимает промежуточное положение между MLVA и MLST. В случае MLST секвенирование выполняется по 7 локусам, соответствующим генам «домашнего хозяйства», которые не столь изменчивы, так как эти локусы весьма консервативны и развиваются очень медленно. Хотя 2 метода основаны на том же принципе, мы должны также принять во внимание участки генома, которые оцениваем, а именно частоту генетических событий в этих регионах [10]. В настоящее время в России преобладают *spa*-типы t008, t037, t030, t127, t024 и t129; они представляют большую часть международных эпидемических клонов. Наиболее широко представленный t008 может принадлежать к 3 различным ST (например, 8, 247 и 250) и иметь II или IV тип *SCCmec*. В России этот *spa*-тип относится к ST8 и обладает *SCCmec* IV. Аналогичная ситуация наблюдается в Австралии, Бельгии, Финляндии, Франции, Германии, Ирландии, Нидерландах, Норвегии, Тайване, Великобритании и США. ST8-IV принадлежит CC8 и, таким образом, представляет клон UK EMRSA-2/-6 в России [26]; *spa*-тип t024 близок к t008 и может быть частью ST8 и содержать *SCCmec*-типа II или IV. Этот *spa*-тип в России обладает IV типом *SCCmec*, является частью ST8 и также принадлежит CC8. Таким образом, клон UK EMRSA-2/-6 в России представлен следующими *spa*-типами: t008, t024 и t118.

Кроме того, в России, ST8-IV включает в себя такие *spa*-типы, как t068, t400, t068 и t7868, которые встречались однократно; *spa*-типы t030, t037 и t129 принадлежат ST239, который также является частью CC8, им присущи *SCCmec* типа III. Штаммы этих *spa*-типов являются 2-й по величине группой в России. Такие *spa*-типы могут быть обнаружены в Алжире, Аргентине, Австралии, Австрии, Бразилии, Чили, Китае, Чешской Республике, Финляндии, Германии, Греции, Индии, Индонезии, Корее, Монголии, Нидерландах, Польше, Португалии, Сингапуре, Словении, Испании, Шри-Ланке, Швейцарии, Таиланде, Великобритании, Уругвае, США и Вьетнаме. ST239-III является одной из самых распространенных генетических линий в мире, входит в CC8 и представляет собой так называемый бразильско-венгерский клон в России [1]. Генетическая линия CC8-ST239-III-t037 считается одним из самых успешных во всем мире клонов и в некоторых странах (Южная Корея, Гонконг, Тайвань и Вьетнам) даже распространяется во внебольничных условиях и в настоящее время рассматривается в качестве CA-MRSA [32]. ST1 включает в себя в России только *spa*-тип t127 – достаточно редкий в мире, с частотой изоляции 1,8% от общего количества золотистого стафилококка. Тем не менее этот *spa*-тип найден в Австрии, Бельгии, Канаде, Китае, Хорватии, Кипре, Дании, Габоне, Германии,



Греции, Финляндии, Франции, Израиле, Индонезии, Кот-д'Ивуаре, Латвии, Ливане, Нидерландах, Новой Зеландии, Норвегии, Польше, Румынии, Южной Африке, Испании, Швеции, Швейцарии, Тайване, Великобритании, Объединенных Арабских Эмиратах и США. Штаммы этой линии принадлежат к СС1 и похожи на штаммы СС8 только по 2 локусам. Штамм ST154-IV включает в себя только t667; ST154 наиболее близкий к ST1, но они не могут сформировать один СС, потому что похожи только по 3 локусам из 7, в то время как штаммы, связанные СС, должны быть одинаковыми по крайней мере по 5 локусам. Со штаммами СС8 ST154 похож только по 1 локусу – *glpf*.

Популяция MRSA в стационарах России включает в себя небольшое число генетических групп. Это типичная ситуация для клональной популяционной структуры. Данные результаты согласуются с результатами ряда исследований, проведенных в различных регионах России, которые установили распространенность тех же линий [39, 42, 43]. Основными характеристиками клональной популяционной структуры являются: преобладание

нескольких линий в популяции, низкая частота рекомбинаций между различными клонами, незначительные различия между штаммами одной клональной линии. Передача золотистого стафилококка в основном происходит при непосредственном контакте (кожа – кожа), контакте с колонизированной поверхностью [2]. Осведомленность о преобладающих клональных линиях в различных регионах и о движении пациентов между больницами, очевидно, обеспечит основы для адекватных подходов к контролю за распространением MRSA [19]. В настоящее время в российских больницах отмечается гомогенная эпидемиологическая картина, так как те же типы штаммов находятся в разных регионах страны. Наиболее эффективными способами преодоления распространения HA-MRSA являются: скрининг пациентов на носительство MRSA при госпитализации, эрадикация носительства MRSA, соблюдение общегигиенических мер в медицинских учреждениях. Такие подходы способствуют предотвращению колонизации пациентов и горизонтального переноса мобильных генетических элементов [2].

#### ЛИТЕРАТУРА

- Albrecht N., Jatzwauk L., Slickers P. et al. Clonal replacement of epidemic methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains in a German university hospital over a period of eleven years // *PLoS One*. – 2011; 6 (11): 28189.
- Chambers H., Deleo F. Waves of resistance: *Staphylococcus aureus* in the antibiotic era // *Nat. Rev. Microbiol.* – 2009; 7 (9): 629–41.
- CLSI Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Second Informational Supplement. CLSI document M100-S22. Wayne PA. – Clinical and Laboratory Standards Institute. – 2012.
- Cookson B., Robinson D., Monk A. et al. Evaluation of molecular typing methods in characterizing a European collection of epidemic methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains: the HARMONY collection // *J. Clin. Microbiol.* – 2007; 45 (6): 1830–7.
- Deurenberg R., Vink C., Kalenic S. et al. The molecular evolution of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* // *Clin. Microbiol. Infect.* – 2007; 13 (3): 222–35.
- DeWoody J., Schupp J., Kenefic L. et al. Universal method for producing ROX-labeled size standards suitable for automated genotyping // *Biotechniques*. – 2004; 37 (3): 348, 350, 352.
- Enright M., Day N., Davies C. et al. Multilocus sequence typing for characterization of methicillin-resistant and methicillin-susceptible clones of *Staphylococcus aureus* // *J. Clin. Microbiol.* – 2000; 38 (3): 1008–15.
- Frenay H., Bunschoten A., Schouls L. et al. Molecular typing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* on the basis of protein A gene polymorphism // *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* – 1996; 15 (1): 60–4.
- Hanssen A., Sollid J. Multiple staphylococcal cassette chromosomes and allelic variants of cassette chromosome recombinases in *Staphylococcus aureus* and coagulase-negative staphylococci from Norway // *Antimicrob. Agents. Chemother.* – 2007; 51 (5): 1671–7.
- Hardy K., Oppenheim B., Gossain S. et al. Use of variations in staphylococcal interspersed repeat units for molecular typing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains // *J. Clin. Microbiol.* – 2006; 44 (1): 271–3.
- Hardy K., Ussery D., Oppenheim B. et al. Distribution and characterization of staphylococcal interspersed repeat units (SIRUs) and potential use for strain differentiation // *Microbiology*. – 2004; 150 (12): 4045–52.
- Harmsen D., Claus H., Witte W. et al. Typing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in a university hospital setting by using novel software for spa repeat determination and database management // *J. Clin. Microbiol.* – 2003; 41 (12): 5442–8.
- Huijsdens X., Bosch T., van Santen-Verheulvel M. et al. Molecular characterisation of PFGE non-typable methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in The Netherlands, 2007 // *Euro. Surveill.* – 2009; 14 (38).
- Ikawaty R., Willems R., Box A. et al. Novel multiple-locus variable-number tandem-repeat analysis method for rapid molecular typing of human *Staphylococcus aureus* // *J. Clin. Microbiol.* – 2008; 46 (9): 3147–51.
- Isobe H., Takano T., Nishiyama A. et al. Evolution and virulence of Pantone-Valentine leukocidin-positive ST30 methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in the past 30 years in Japan // *Biomed. Res.* – 2012; 33 (2): 97–109.
- IWG-SCC Classification of staphylococcal cassette chromosome mec (SCCmec): guidelines for reporting novel SCCmec elements // *Antimicrob. Agents. Chemother.* – 2009; 53 (12): 4961–7.
- Kahl B., Mellmann A., Deiwick S. et al. Variation of the polymorphic region X of the protein A gene during persistent airway infection of cystic fibrosis patients reflects two independent mechanisms of genetic change in *Staphylococcus aureus* // *J. Clin. Microbiol.* – 2005; 43 (1): 502–5.
- Klein E., Smith D., Laxminarayan R. Hospitalizations and deaths caused by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, United States, 1999–2005 // *Emerg. Infect. Dis.* – 2007; 13 (12): 1840–6.
- Kock R., Mellmann A., Schaumburg F. et al. The epidemiology of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in Germany // *Dtsch. Arztebl. Int.* – 2011; 108 (45): 761–7.
- Lina G., Piemont Y., Godail-Gamot F. et al. Involvement of Pantone-Valentine leukocidin-producing *Staphylococcus aureus* in primary skin infections and pneumonia // *Clin. Infect. Dis.* – 1999; 29 (5): 1128–32.
- Lindsay J. Genomic variation and evolution of *Staphylococcus aureus* // *Int. J. Med. Microbiol.* – 2010; 300 (2–3): 98–103.
- Lowy F. Antimicrobial resistance: the example of *Staphylococcus aureus* // *J. Clin. Invest.* – 2003; 111 (9): 1265–73.
- Lu P., Chang J., Hsu H. et al. One tube multiplex PCR for simple screening of SCCmec I-V types of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* // *J. Chemother.* – 2008; 20 (6): 690–6.
- Mariem B., Ito T., Zhang M. et al. Molecular characterization of methicillin-resistant Pantone-Valentine leukocidin positive *Staphylococcus aureus* clones disseminating in Tunisian hospitals and in the community // *BMC Microbiol.* – 2013; 13: 2.
- Milheirico C., Oliveira D., de Lencastre H. Multiplex PCR strategy for subtyping the staphylococcal cassette chromosome mec type IV in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: 'SCCmec IV multiplex' // *J. Antimicrob. Chemother.* – 2007; 60 (1): 42–8.
- Monecke S., Coombs G., Shore A. et al. A field guide to pandemic, epidemic and sporadic clones of methicillin-resistant Sta-

- phylococcus aureus // PLoS One. – 2011; 6 (4): 17936.
27. Noto M., Kreiswirth B., Monk A. et al. Gene acquisition at the insertion site for SCCmec, the genomic island conferring methicillin resistance in *Staphylococcus aureus* // J. Bacteriol. – 2008; 190 (4): 1276–83.
28. Plata K., Rosato A., Wegryn G. *Staphylococcus aureus* as an infectious agent: overview of biochemistry and molecular genetics of its pathogenicity // Acta. Biochim. Pol. – 2009; 56 (4): 597–612.
29. Pourcel C., Hormigos K., Onteniente L. et al. Improved multiple-locus variable-number tandem-repeat assay for *Staphylococcus aureus* genotyping, providing a highly informative technique together with strong phylogenetic value // J. Clin. Microbiol. – 2009; 47 (10): 3121–8.
30. Sabat A., Krzyszton-Russjan J., Strzalka W. et al. New method for typing *Staphylococcus aureus* strains: multiple-locus variable-number tandem repeat analysis of polymorphism and genetic relationships of clinical isolates // J. Clin. Microbiol. – 2003; 41 (4): 1801–4.
31. Schouls L., Spalburg E., van Luit M. et al. Multiple-locus variable number tandem repeat analysis of *Staphylococcus aureus*: comparison with pulsed-field gel electrophoresis and spa-typing // PLoS One. – 2009; 4 (4): 5082.
32. Song J., Hsueh P., Chung D. et al. Spread of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* between the community and the hospitals in Asian countries: an ANSORP study // J. Antimicrob. Chemother. – 2011; 66 (5): 1061–9.
33. Stefani S., Chung D., Lindsay J. et al. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA): global epidemiology and harmonisation of typing methods // Int. J. Antimicrob. Agents. – 2012; 39 (4): 273–82.
34. Strommenger B., Bräulke C., Heuck D. et al. spa Typing of *Staphylococcus aureus* as a frontline tool in epidemiological typing // J. Clin. Microbiol. – 2008; 46 (2): 574–81.
35. Turlej A., Hryniewicz W., Empel J. Staphylococcal cassette chromosome mec (SCCmec) classification and typing methods: an overview // Pol. J. Microbiol. – 2011; 60 (2): 95–103.
36. van Belkum A., Tassios P., Dijkshoorn L. et al. Guidelines for the validation and application of typing methods for use in bacterial epidemiology // Clin. Microbiol. Infect. – 2007; 13 (Suppl 3): 1–46.
37. van der Zee A., Roorda L., Hendriks W. et al. Detection of novel chromosome-SCCmec variants in Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus* and their inclusion in PCR based screening // BMC Res. Notes. – 2011; 4: 150.
38. Vandenesch F., Lina G., Gillet Y. et al. (The end of the controversy: Pantone Valentine is the culprit) // Med. Sci (Paris). – 2009; 25 (11): 984–6.
39. Vorobieva V., Bazhukova T., Hanssen A. et al. Clinical isolates of *Staphylococcus aureus* from the Arkhangelsk region, Russia: antimicrobial susceptibility, molecular epidemiology, and distribution of Pantone-Valentine leukocidin genes // APMIS. – 2008; 116 (10): 877–87.
40. Wang X., Huang B., Blair B. et al. Selection of optimal combinations of loci by the Optimal Combination Finder computer program from a group of variable number tandem repeat loci for use in *Staphylococcus aureus* food poisoning case investigations // J. Med. Microbiol. – 2012; 61 (5): 631–9.
41. Дехнич А.В., Никулин А.А., Рябкова Е.Л. и др. Эпидемиология резистентности штаммов *S. aureus*, выделенных от пациентов в ОРИТ российских стационаров: результаты многоцентрового исследования // Клини. микробиол. и антимикр. химиотер. – 2008; 10 (4): 333–44.
42. Дмитренко О.А. Молекулярно-генетические аспекты эпидемиологии внутрибольничных инфекций, вызванных представителями вида *Staphylococcus aureus*, устойчивыми к метициллину/оксациллину. Дисс... докт. мед. наук. – 2008.
43. Хохлова О.Е., Вей-Чун Хунг, Хигучи В. и др. Выявление венгерского пандемического клона MRSA в России // Клини. микробиол. и антимикр. химиотер. – 2011; 13 (2): 101–200.