

Типирование MRSA: какие методы являются оптимальными для решения различных задач?

А.В. Романов, А.В. Дехнич

НИИ антимикробной химиотерапии, Смоленск, Россия

В последние десятилетия наблюдается неуклонный рост распространенности метициллинорезистентных золотистых стафилококков (MRSA). Вызванные ими инфекции характеризуются высокой летальностью и стоимостью лечения, в то время как новые антибактериальные препараты (анти-MRSA цефемы, новые гликопептиды, липопептиды, глицилциклины и др.) только начинают внедряться в клиническую практику. В этой ситуации особое значение имеет контроль за распространением MRSA. В настоящее время с этой целью широко применяются молекулярно-генетические методы типирования, которые приходят на смену фенотипическим методам сравнения микроорганизмов. В статье приведены данные о наиболее распространенных методах молекулярного типирования MRSA и областях их применения. Оптимальным,

с нашей точки зрения, для изучения локальной эпидемиологии MRSA является использование комбинации методов анализа множественных тандемных повторов (MLVA) и SCCmec типирования, либо применение пульс-электрофореза макрорестрикционных фрагментов геномной ДНК (PFGE). Для изучения глобальной эпидемиологии и популяционной структуры могут быть рекомендованы такие методы как мультилокусное секвенирование-типирование (MLST) и sra-секвенирование-типирование, которые обеспечивают высокий уровень стандартизации исследования и возможность эффективного обмена данными между лабораториями во всем мире.

Ключевые слова: MRSA, молекулярные методы типирования, SCCmec, MLVA, MLST, sra-типирование.

MRSA Typing: Which Methods are the Most Appropriate for Different Purposes?

A.V. Romanov, A.V. Dekhnic

Institute of Antimicrobial Chemotherapy, Smolensk, Russia

Over the last decades there is an uncontrollable rise of MRSA prevalence. Infections caused by MRSA are associated with high mortality and healthcare costs. New antimicrobial drugs (anti-MRSA cepheems, new glycopeptides, lipopeptides, glycilcyclines and others) are only introducing into clinical practice. Given this, control

of MRSA distribution is of great importance. Currently, molecular typing methods, which replace phenotypic methods of microorganism comparison, are widely used for these purposes. This paper provides the data on the most common typing methods of *S. aureus* and scope of their use. In our point of view, use of pulsed field gel electrophoresis (PFGE) or multilocus VNTR analysis in combination with SCCmec typing is the most appropriate for studying local MRSA epidemiology. In order to investigate global MRSA epidemiology and population structure, methods such as multilocus sequence typing (MLST)

Контактный адрес:

Андрей Вячеславович Романов

Эл. почта: Andrew.Romanov@antibiotic.ru

and spa typing, may be recommended. These methods provide a high level of reproducibility and possibility for exchanging data between different laboratories all over the world.

Золотистый стафилококк с давних пор известен как один из наиболее значимых возбудителей заболеваний человека. В последние десятилетия неуклонно растет доля *метициллинорезистентных золотистых стафилококков* (MRSA). Первые штаммы MRSA были выделены в Великобритании в 1961 г. На протяжении 60-х годов XX века MRSA были выделены в других странах Европы, далее на протяжении 70-х годов они были обнаружены в других частях света (в Австралии, Японии, США). В настоящее время MRSA – одна из важнейших причин нозокомиальных инфекций во всем мире.

Широкое распространение MRSA ассоциировано с высокой летальностью и высокой стоимостью лечения. Программа исследования резистентности SENTRY установила, что распространенность MRSA составила 57,3% в США (в 2006–2008 гг.). В Российской Федерации в 2006–2008 гг. доля MRSA составила 54,4% [1].

Мировое распространение MRSA обусловлено диссеминацией нескольких клональных линий, обладающих различными генетическими особенностями, включая наличие различных факторов патогенности и устойчивости к лекарственным препаратам [2].

Резистентность стафилококков к антистафилококковым β -лактамам обусловлена присутствием *mecA* гена, который кодирует *пенициллинсвязывающий белок* (ПСБ) 2a или ПСБ2¹. В норме β -лактамы антибиотиков связываются с ПСБ в клеточной стенке, прерывая в результате синтез пептидогликанового слоя, что ведет к гибели микробной клетки. К ПСБ2a бета-лактамы антибиотиков имеют низкую аффинность (кроме анти-MRSA цефемов), в результате синтез клеточной стенки продолжается. Ген *mecA* регулируется репрессором *MecI* и с участием трансмембранного белка, рецептора к β -лактамам *MecRI*. В отсутствие β -лактамы антибиотиков *MecI* ингибирует транскрипцию *mecA* и *mecRI-mecI*. В присутствии β -лактамы антибиотиков *MecRI* расщепляется аутокаталитически и металло-протеиновый домен, который локализуется в цитоплазматической части *MecRI*, становясь активным. Металло-протеаза расщепляет *MecI*, который связан с операторным участком гена *mecA*, что позволяет начать транскрипцию *mecA* и синтез ПСБ2a. Структура *mecI* и *mecRI* может быть

Key words: MRSA, molecular typing, SCCmec, MLVA, MLST, spa typing.

нарушена в результате инсерции IS431 или IS1272, что приводит к дерепрессии гена *mecA*.

Ген *mecA* имеет размер 2,1 т.п.н. и расположен на мобильном генетическом элементе, называемом стафилококковой хромосомной кассетой (SCCmec).

До недавнего времени существовали две альтернативные теории, объясняющие распространение SCCmec кассет у *S.aureus*. В то время как одноклональная теория предполагала, что все клоны MRSA имеют одного предка и что SCCmec кассета была приобретена однократно, мультиклональная теория утверждает, что SCCmec кассета была независимо приобретена штаммами, относящимися к разным генетическим линиям золотистого стафилококка. Именно вторая теория в настоящее время подтверждена многочисленными исследованиями.

Фенотипические проявления не всегда точно отражают генотип микроорганизма и поэтому не могут быть надежным и стабильным эпидемиологическим маркером [3]. Необходимость контроля за распространением эпидемических клонов MRSA привела к возрастающей необходимости использования молекулярных методов типирования.

Каждый метод типирования должен соответствовать специально установленным критериям [3].

Метод типирования должен оценивать маркер, который остается *стабильным* на протяжении всего периода исследования и не должен варьировать в степени, нарушающей эпидемиологическую картину, т.е. значения маркера не должны изменяться слишком быстро и должны соотноситься с положением штамма в эпидемиологическом контексте. Маркер, оцениваемый методом типирования, должен оставаться стабильным для каждого изолята после первичного выделения на протяжении хранения и субкультивирования.

Типируемость подразумевает способность метода назначать определенный тип максимальному числу изолятов, тестируемых с его помощью. Она может быть выражена как отношение числа типлируемых изолятов к общему числу протестированных (типлируемых и нетиплируемых изолятов). Большинство современных молекулярных методов имеют 100% типлируемость.

Дискриминирующая способность подразумевает способность метода относить к разным типам два неродственных изолята, взятых случайным образом

из популяции данного вида микроорганизма. Он может быть количественно определен с использованием индекса разнородности Симпсона, который показывает вероятность того, что 2 разных штамма, случайно взятые из популяции, будут отнесены к двум разным типам. В идеале индекс Симпсона должен быть равен единице, но на практике большинством специалистов допускается погрешность в 5%, т.е. «идеальный» индекс Симпсона на практике составляет около 0,95. Нетипируемые штаммы рекомендовано выделять в отдельную группу, а не исключать из анализа, чтобы избежать завышения дискриминирующей способности метода.

Согласованность с эпидемиологическими данными. Результаты метода типирования должны отражать, согласовываться или даже дополнять доступную эпидемиологическую информацию о случаях колонизации или инфекции. Так, эпидемиологически близкие штаммы должны быть отнесены к идентичным или близким типам. Фенотипические методы обычно хуже согласуются с эпидемиологическими данными, поскольку часто признак, кодируемый геном, может проявиться, а может и нет, в зависимости от условий внешней среды.

Наконец, результаты хорошего метода типирования должны быть воспроизводимы независимо от оператора, времени и места. Высокая степень воспроизводимости, в свою очередь, сделает результаты метода пригодными для включения в базы данных и анализа специализированным программным обеспечением.

Области применения методов типирования можно разделить на несколько групп: исследования локальной, глобальной эпидемиологии и изучение популяционной структуры определенных видов микроорганизмов. На локальном уровне типирование применяется для оценки эпидемиологической ситуации по проблемным микроорганизмам в конкретном стационаре (или на ограниченной территории), а именно: определение родственности микроорганизмов, установка источника инфекции, путей распространения микроорганизмов, расследования локальных вспышек. Методы, применяемые на этом уровне, должны иметь высокую дискриминирующую способность и позволять детектировать небольшие генетические различия между штаммами, которые являются следствием относительно недавних эволюционных событий. Здесь могут применять пульс-электрофорез и методы, основанные на анализе тандемных повторов: MLVA и sra типирование. Последние являются предпочтительными, так как имеют высокую воспроизводимость и дискретный характер данных (цифровые и текс-

товые профили), что дает широкие возможности по компьютерной обработке данных. Методы, используемые на глобальном уровне, напротив, должны учитывать значительные эволюционные различия, которые позволяют установить принадлежность исследуемых штаммов к крупным генетическим группам. Воспроизводимость и дискретный характер данных в этом случае являются критическими, так как необходим обмен данными между удаленными лабораториями и создание международных баз данных.

Молекулярно-генетические методы типирования

Фаготипирование оценивает паттерны лизиса, получаемые после воздействия на исследуемые изоляты определенного набора бактериофагов. Этот метод ограничен небольшим числом видов, для которых идентифицированы бактериофаги в количестве, достаточном для значимой дискриминации. При появлении новых клональных групп может понадобиться включение дополнительных бактериофагов в схему типирования. Типы могут изменяться с течением времени, и это также может быть использовано для оценки эпидемиологической ситуации. Таким образом, метод фаготипирования характеризуется вариабельной дискриминирующей способностью и относительно низкой типированностью и воспроизводимостью. Производство и постоянный контроль качества фагов также очень важная составляющая, которая является крайне трудоемкой и времязатратной. Однако с помощью этого метода возможен анализ сразу большого количества изолятов. Интерпретация результатов весьма непростая и требует опыта. В настоящее время приобретение (лизогенное состояние) и потеря фагов могут быть предсказаны с помощью молекулярных методов, представляя своеобразную вторую жизнь метода фаготипирования.

Фаготипирование долгое время было важнейшим инструментом изучения эпидемиологии золотистого стафилококка, но в настоящее время оно однозначно утратило свое значения как референтный метод типирования.

PFGE (Pulsed Field Gel Electrophoresis, электрофорез в пульсирующем поле, пульс-электрофорез) остается референтным методом эпидемиологического типирования штаммов золотистого стафилококка. Этот метод разработали Шварц и Кантор в 1984 г., а для типирования внутрибольничных штаммов золотистого стафилококка он впервые был применен в 1991 году [4]. Метод основывается на расщеплении хромосомной ДНК особыми рестриктазами, которые распознают лишь небольшое

количество сайтов рестрикции на протяжении всего бактериального генома. В результате образуется небольшое число крупных фрагментов ДНК (10–800 кб), которые не могут быть проанализированы с помощью обычного гель-электрофореза. При пульс-электрофорезе направление электрического поля периодически меняется (пульсирует), что позволяет разделять в геле крупные молекулы ДНК до нескольких миллионов пар нуклеотидов. Пульс-электрофорез требует интактной геномной ДНК, т. е. необходимы особые меры предосторожности при выделении ДНК. Чтобы избежать механического повреждения молекул ДНК при выделении, микробные клетки заливаются в блоки из легкоплавкой агарозы (так называемые плаги). Это защищает ДНК и в то же время позволяет проникать компонентам, необходимым для растворения клеточной стенки и ферментативного расщепления клеточных белков. Далее плаги помещаются в буферный раствор, содержащий необходимую рестриктазу, в случае золотистого стафилококка – это *SmaI*. Агарозные блоки, содержащие расщепленную ДНК, вносятся далее в лунки геля. Фрагменты ДНК мигрируют по направлению к аноду, но, прежде чем начать движение, фрагменты меняют свое пространственное расположение в соответствии с направлением электрического тока. Время, затраченное на переориентацию фрагмента, зависит от его размера. Крупным фрагментам необходимо больше времени на переориентацию, чем мелким, которые быстро переориентируются и начинают движение, т. е. при периодическом изменении направления электрического поля получается гораздо более четкое разделение. Интенсивность, угол изменения электрического поля, частота изменения поля, время анализа и температура программируются и могут изменяться в широких пределах.

Пульс-электрофорез в настоящее время включает в себя различные методики, но наибольшее распространение получили FIGE (field-inversion gel electrophoresis) и CHEF (contour-clamped homogenous electric field). FIGE – это более простая и дешевая методика. Она наиболее применима для разделения фрагментов от 0,1 до 200 т.п.н. При этой методике электрическое поле меняется просто в прямом и обратном направлениях, но длительность импульса в прямом направлении больше. Методика CHEF позволяет разделять фрагменты до 3 млн пар нуклеотидов. Electroды при этом расположены в виде шестиугольника, что позволяет получить гомогенное электрическое поле, которое прикладывается под углом 120° к направлению движения, что позволяет избежать полностью, или минимизировать искривления дорожек.

Пульс-электрофорез активно использовался для изучения MRSA и сравнивался в другими методами типирования в многочисленных работах. Были испробованы многие рестриктазы, но оптимальной оказалась *SmaI*. Все изоляты являются типизируемыми этим методом. Результаты на контрольных штаммах воспроизводимы, даже после многочисленных субкультивирований. Дискриминирующая способность превосходит фенотипические методы и одна из самых высоких среди генотипических методов. Основываясь на данных фактах, пульс-электрофорез был предложен в качестве золотого стандарта для типирования MRSA. Среди недостатков метода следует отметить длительность получения конечного результата (48–72 ч с момента выделения в чистой культуре), высокую стоимость реагентов, необходимость специализированного оборудования, результат в виде паттернов в графическом формате (*.tif изображение, изолят характеризуется набором темных и светлых полос). Даже в случае небольшого количества фрагментов интерпретация результатов достаточно сложна, особенно в исследованиях с вовлечением нескольких лабораторий. Малейшие изменения условий электрофореза могут изменить длину пробега фрагмента и создать трудности в сравнении изолятов, помещенных в разные гели. Несмотря на эти ограничения пульс-электрофорез является крайне полезной методикой для изучения локальных вспышек. Этот метод широко используется для изучения эпидемиологии как эндемичных, так и эпидемических штаммов MRSA.

Интерпретация профилей, полученных с помощью пульс-электрофореза, осуществляется в соответствии с опубликованными директивами. F.C. Tenover и соавт. [5] предложили стандартизованную схему интерпретации для определения генетической родственности между штаммами. Согласно этой схеме, изоляты, имеющие одинаковые профили пульс-электрофореза, рассцениваются как идентичные. Изоляты, которые отличаются одним генетическим событием, характеризуются разницей в 1–3 полосы в профиле и рассматриваются как вероятно родственные. Изоляты, которые отличаются на 4–6 полос в профиле, что отражает два независимых генетических события, рассматриваются как возможно родственные. Наконец, изоляты, отличающиеся более чем на 6 полос в профиле, рассматриваются как неродственные [5]. Необходимо подчеркнуть, что такие критерии применимы только для анализа небольшого количества изолятов, собранных в рамках эпидемиологических исследований вспышек в стационарах или других учреждениях в течение относительно короткого периода (1–3 мес), когда генетическая вариабель-

ность небольшая. Эти критерии неприменимы для изучения больших коллекций микроорганизмов, собранных за длительный период (более одного года). В этом случае паттерны пульс-электрофореза анализируются с помощью специального программного обеспечения с использованием Dice коэффициента и алгоритма UPGMA.

Несмотря на то что достигнуто много успехов в оптимизации протокола пульс-электрофореза и стандартизации алгоритма обработки, метод в настоящее время уступает позиции другим методам типирования из-за высокой стоимости, трудоемкости, длительности анализа и зачастую недостаточной воспроизводимости, а также сложности обмена данными между лабораториями.

MLST (MultiLocus Sequence Typing, мультилокусное секвенирование-типирование) – замечательный инструмент для изучения эволюции MRSA, но не подходит для изучения локальных вспышек. MLST разработано Maiden и соавт. в 1998 г. Схема типирования *S. aureus* впервые предложена М.С. Enright и соавт. в 2000 г. [6]. Метод основан на секвенировании (прочтении нуклеотидной последовательности) участков специально отобранных генов. Как правило, это внутренний участок генов «домашнего хозяйства» длиной около 500 п.н. Гены «домашнего хозяйства» выбираются исходя из факта их обязательного присутствия в микроорганизмах данного вида и наличия достаточных вариаций внутри вида для получения множества аллелей. Для типирования золотистого стафилококка отобрано 7 локусов, представляющих внутренние фрагменты генов: карбаматкиназы (*argC*), шикиматдегидрогеназы (*aroE*), глицеролкиназы (*glpF*), гуанилаткиназы (*gmK*), фосфатацетилтрансферазы (*pta*), триозофосфатизомеразы (*tpi*) и ацетилкоэнзим А ацетилтрансферазы (*ycqI*). Каждый локус амплифицируется с помощью ПЦР с праймерами, комплементарными консервативным регионам генов, которые фланкируют изучаемый участок [6]. ПЦР продукт секвенируется, разные последовательности одного гена рассматриваются как разные аллели данного гена и обозначаются номерами либо уже описанного аллеля, либо назначается новый.

Для золотистого стафилококка описано около 30 аллелей для каждого локуса. Учитывая, что анализируется 7 локусов, число возможных вариантов составляет 30^7 . В результате каждый штамм характеризуется набором аллелей этих 7 генов – аллельным профилем или сиквенс-типом (ST). Например, иберийский клон имеет MLST профиль 3-3-1-12-4-4-16, который обозначен как ST 247. Программный продукт BURST (Based Upon Related Sequence Types) группирует сиквенс типы в кло-

нальные комплексы (СС). Штаммы золотистого стафилококка объединяются в клональные комплексы, если 5 из 7 генов «домашнего хозяйства» имеют идентичные последовательности. Предок каждого СС – это ST с наибольшим числом однолокусных вариаций. Основатели субгрупп могут быть определены как однолокусные или двухлокусные варианты основателя СС, которые стали наиболее распространенными в популяции и которые могут впоследствии также дивергировать и давать последующие сетки одно- и двухлокусных вариантов.

Методика MLST, используемая для типирования золотистого стафилококка, валидирована М.С. Enright и соавт. [6] с помощью пульс-электрофореза: штаммы одного сиквенс-типа имели сходные профили пульс-электрофореза, в то время как штаммы, отнесенные MLST к разным сиквенс-типам, имели очень разные PFGE профили.

Важное преимущество MLST – в дискретности данных. Сиквенс участка гена представляет собой последовательность букв в текстовом формате; тип штамма, назначенный MLST, представляет собой строку из 7 номеров (таблица). Эта информация объективна, однозначна и может легко передаваться с помощью электронных носителей по всему миру. Более того, созданы базы данных, содержащие огромное количество описанных последовательностей, к которым можно обратиться через интернет. Одна из таких баз данных доступна по адресу <http://www.mlst.net/>. Сайт содержит также инструкции по выполнению типирования и программное обеспечение для анализа последовательностей. Это позволяет объединить и стандартизировать глобальную эпидемиологическую информацию. Недостаток MLST – это большая трудоемкость и длительность анализа.

Мультилокусный анализ тандемных повторов с переменным числом звеньев (Multilocus variable number tandem repeat (VNTR) analysis – MLVA). Это – основанный на ПЦР метод, который использует варибельность, характерную для участков ДНК, содержащих так называемые тандемные повторы. Участки ДНК, содержащие повторы, часто копируются в бактериальных клетках с ошибками за счет такого явления как slipped-strand mispairing (проскальзывание вилок репликации). В результате регион удлиняется или укорачивается за счет делеций или инсерций отдельных повторов. Эта изменчивость ДНК может быть легко оценена с помощью ПЦР с фланкирующими праймерами и измерения длины ПЦР продукта. В случае больших повторов анализ может быть простым, например агарозный гель-электрофорез, однако в случае небольших повторов необходимы более сложные методы (капиллярный электрофорез высокого разрешения

Характеристика и распространение эпидемических клонов золотистого стафилококка [7]

Клон	MLST-профиль	ST	CC	SCCmec	Spa тип	Географическое распространение
Archaic	3-3-1-1-4-4-16	250	8	I	t008, t009, t194	Авл, Дан, Гер, Шве, Уга, Вел, США
Southern Germany	1-4-1-4-12-24-29	228	5	I	t001, t023, t041, t188, t201	Бел, Дан, Гер, Ита, Сло, Исп, Шве
UK EMRSA-3	1-4-1-4-12-1-10	5	5	I	t001, t002, t003, t010, t045, t053, t062, t105, t178, t179, t187, t214, t311, t319, t389, t443	Арг, Нор, Пол, Сло, Вел
Iberian	3-3-1-12-4-4-16	247	8	I	t008, t051, t052, t054, t200	Бел, Хор, Чех, Дан, Фин, Фра, Гер, Ита, Нид, Пол, Пор, Сло, Исп, Швец, Шве, Вел, США
Irish-1	3-3-1-1-4-4-3	8	8	II	t008, t024, t064, t190, t206, t211	Авл Ирл, Вел, США
New York/Japan	1-4-1-4-12-1-10	5	5	II	t001, t002, t003, t010, t045, t053, t062, t105, t178, t179, t187, t214, t311, t319, t389, t443	Авл, Бел, Кан, Дан, Фин, Фра, Гер, Ирл, Япн, Кор, Мек, Син, Швец, Уру, Вел, США
UK EMRSA-16	2-2-2-2-3-3-2	36	36	II	t018, t253, t418, t419	Авл, Бел, Кан, Дан, Фин, Гре, Ирл, Мек, Нор, Исп, Швец, Шве, Вел, США
Brazilian/Hungarian	2-3-1-1-4-4-3	239	8	III	t030, t037, t234, t387, t388	Алж, Арг, Авл, Авс, Бра, Чил, Кит, Чех, Фин, Гер, Гре, Инд, Идз, Кор, Мон, Нид, Пол, Пор, Син, Сло, Исп, ШрЛ, Швец, Тал, Вел, Уру, США, Втн
Berlin	10-14-8-6-10-3-2	45	45	IV	t004, t015, t026, t031, t038, t050, t065, t204, t230, t390	Арм, Авл, Бел, Фин, Гер, Вен, Нид, Нор, Исп, Швец, Шве, США
Paediatric	1-4-1-4-12-1-10	5	5	IV	t001, t002, t003, t010, t045, t053, t062, t105, t178, t179, t187, t214, t311, t319, t389, t443	Алж, Арг, Авл, Бра, Кол, Дан, Фра, Кор, Хог, Пол, Пор, Исп, Швец, Уру, Вел, США
UK EMRSA-2/-6	3-3-1-1-4-4-3	8	8	IV	t008, t024, t064, t190, t206, t21	Авл, Бел, Фин, Фра, Гер, Ирл, Нид, Нор, Тай, Вел, США
UK EMRSA-15	7-6-1-5-8-8-6	22	22	IV	t005, t022, t032, t223, t309, t310, t417, t420	Авл, Бел, Чех, Дан, Гер, Ирл, Кув, НЗ, Нор, Пор, Син, Исп, Швец, Вел

Примечание. Алж – Алжир, Арг – Аргентина, Арм – Армения, Авл – Австралия, Авс – Австрия, Бел – Бельгия, Бра – Бразилия, Кан – Канада, Чил – Чили, Кит – Китай, Кол – Колумбия, Хор – Хорватия, Чех – Чешская Республика, Дан – Дания, Фин – Финляндия, Фра – Франция, Гер – Германия, Гре – Греция, Вен – Венгрия, Инд – Индия, Идз – Индонезия, Ирл – Ирландия, Ита – Италия, Япн – Япония, Кор – Корея, Кув – Кувейт, Мек – Мексика, Мон – Монголия, Нид – Нидерланды, НЗ – Новая Зеландия, Нор – Норвегия, Пол – Польша, Пор – Португалия, Син – Сингапур, Сло – Словения, ШрЛ – Шри Ланка, Исп – Испания, Швец – Швеция, Шве – Швейцария, Тай – Тайвань, Тал – Тайланд, Уга – Уганда, Уру – Уругвай, Втн – Вьетнам, Вел – Великобритания.

или масс-спектрометрия). Когда проанализировано несколько локусов, несущих tandemные повторы, для конкретного изолята мы получаем цифровой код, обозначающий либо количество повторов для каждого локуса, либо молекулярные массы фрагментов.

MLVA в настоящее время успешно применяется для типирования самых разных микроорганизмов. В качестве недостатков метода следует указать необходимость подбора VNTR локусов для каждого вида микроорганизмов в отдельности и определенную сложность подбора локусов. Они должны соответс-

твовать следующим критериям: вариабельность, но не гипермутабельность; размер от 10 до 100 п.н.; маленькие повторы, локусы с большим количеством повторов и большие повторы нежелательны; также желательно, чтобы они находились в генетически нейтральных областях для избежания искажения картины вследствие эволюционного давления.

В настоящее время наибольшее распространение получили две схемы типирования золотистого стафилококка. Одна из них разработана А. Sabat и соавт. [7] и оценивает тандемные повторы, обнаруженные внутри некоторых генов золотистого стафилококка. Для анализа были отобраны гены *clfA*, *clfB* (клампинг-фактор А и В соответственно), *sdr* (SDR протеин), *sra* (стафилококковый протеин А), *ssp* (стафилококковая сериновая протеаза). Амплификация проводится в виде мультиплексной однопробирочной ПЦР, что позволяет значительно сократить время типирования. Далее фрагменты разделялись в гель-электрофорезе, и характеристикой штамма становился набор полос в геле-паттерне. Метод относительно прост и недорог, но, к сожалению, имеет ряд серьезных недостатков. Во-первых, результат в виде паттернов затрудняет обмен данными между лабораториями, а определение массы или числа повторов с помощью агарозного электрофореза является слишком неточным. Во-вторых, для некоторых локусов возможно появление нескольких ПЦР продуктов, что затрудняет автоматизацию процесса типирования и кластерный анализ. И, наконец, в-третьих, расположение локусов в кодирующих областях делает возможным селекционное давление на их эволюцию, т.е. при создании в разных стационарах одинаковых селекционных условий происходит эволюция в одном направлении, что затрудняет эпидемиологическую оценку.

Вторая схема типирования разработана К. J. Hardy и соавт. [8]. Тандемные повторы идентифицированы в доступных на тот момент полностью секвенированных геномах золотистого стафилококка с помощью компьютерной программы Tandem repeat finder. Предпочтение отдавалось участкам, расположенным межгенно, они получили название SIRU (Staphylococcal interspersed repeat unit). Далее эта схема активно разрабатывалась в работах R. Ikawaty и соавт. [9]. Были отобраны наиболее информативные локусы, показана высокая корреляция с эпидемиологическими данными и результатами MLST, разработаны методики подсчета числа повторов, т.е. результат в виде цифрового профиля. Получение только одного ПЦР продукта для каждого локуса открывает возможности по автоматизации типирования и кластерному анализу дискретных данных.

В финальном варианте R. Ikawaty схема включает 6 VNTR локусов: SIRU 01, SIRU 05, SIRU 07, SIRU 13, SIRU 15, SIRU 21 (регион X *sra*-протеина). К недостаткам данной схемы можно отнести сложность создания мультиплексной однопробирочной ПЦР (в оригинале 1 штамм – 6 ПЦР), так как необходим 6-канальный флуоресцентный детектор, а они пока достаточно дорогостоящи.

Sra-типирование разработано Н.М. Frenay и соавт. [10] и основано на секвенировании участка гена стафилококкового протеина А, несущего в себе тандемные повторы, так называемого региона X. По сути метод является однолокусным вариантом MLST и может быть назван как однолокусное секвенирование-типирование (SLST). Регион X состоит из тандемных повторов, длиной примерно 24 п.н. Его разнообразие определяется изменением числа повторов и, более часто, точечными мутациями. Главное преимущество перед MLST – это простота, так как секвенируется только один участок. Дискриминирующая способность *sra*-типирования является промежуточной между PFGE и MLST. В отличие от них с помощью *sra*-типирования можно исследовать как отдельные локальные вспышки, так и молекулярную эволюцию в целом. Также важным достоинством *sra*-типирования является дискретность данных и как следствие высокая воспроизводимость, простота обмена данными между лабораториями и возможность создания базы данных. В настоящее время для обработки данных наиболее часто используется программный продукт Ridom StaphType software (Ridom GmbH, Wurzburg, Germany). Данные отдельных лабораторий синхронизируются через интернет с центральным *sra*-сервером (<http://www.spaserver.ridom.de>), который курируется европейским сообществом SeqNet.org (<http://www.seqnet.org>) для обеспечения однотипности алгоритма обработки публичного доступа к данным.

В настоящее время база данных *sra*-сервера насчитывает более 6740 *sra*-типов, состоящих из всевозможных комбинаций 391 повтора из 120 071 штамма из 73 стран. Ввиду большей дискриминирующей способности внутри одного сиквенс-типа, определенного MLST, может быть обнаружено несколько *sra*-типов, но все они остаются внутри одного *sra*-клонального комплекса. Для группировки *sra*-типов в *sra*-клональные комплексы разработан кластерный алгоритм BURP (based upon repeat patterns).

SCCmec типирование также является важным инструментом изучения эпидемиологии золотистых стафилококков. SCCmec кассета характеризуется наличием прямых или обратных фланкирующих

повторов. В ней есть 2 неотъемлемых компонента: *mes*-комплекс и *сsg*-комплекс, а также так называемые J-участки. *Mes*-комплекс состоит из IS431 и/или IS1272 *mesA*, интактных или поврежденных регуляторных генов *mesR1* и *mecl*. *Csg*-комплекс кодирует рекомбиназы, которые обеспечивают вырезку и вставку кассеты, т.е. ее мобильность. Остальная часть *SCC mec* представлена J-участками (J1, J2, J3), которые расположены внутри и между генами *mesA* и *сsr*, содержат различные гены и псевдогены, которые не несут каких-либо значимых функций для клеток, за исключением плазмидно или транспозонно передаваемых генов резистентности к тяжелым металлам и бета-лактамам антибиотикам. В настоящее время известно 5 классов *mes*-комплекса: A, B, C1, C2, D и 5 аллотипов *сsg*-комплекса: 1, 2, 3, 4 и 5. Различные комбинации классов *mes*-комплекса и аллотипов *сsg*-комплекса составляют основу классификации *SCC mec* кассет по типам. В зависимости от строения J-участков типы *SCC mec* подразделяются на субтипы [11].

Одними из первых свою схему типирования предложили D.C.Oliveira и de H. Lencastre в 2002 году [12]. Их схема позволяла различать 4 типа кассет – I, II, III и IV. Следует отметить, что дизайн ПЦР выполнен в виде мультиплексной однопробирочной реакции [12]. В 2007 году эта же группа ученых опубликовала статью о разработке улучшенного метода, который позволил также детектировать V и VI типы *SCC mec* кассеты [13]. Другой эффективный метод предложен Y. Kondo и соавт. [14]. Он позволяет определять типы и субтипы 6 типов кассет, а также новые неизвестные типы *SCC mec* кассет. Метод включает в себя две мультиплексные реакции для определения типа кассеты и ряд дополнительных ПЦР для определения субтипов, и в настоящее время, пожалуй, остается основным методом для специалистов в области молекулярной эволюции. На сегодняшний день предложено множество самых разных схем *SCC mec* типирования. Особого внимания, за счет своей простоты, заслуживает методика P.L. Lu и соавт. [15]. В отличие от громоздких и трудоемких схем, содержащих пару праймеров к каждому значимому компоненту кассеты, эта методика оценивает наличие или комбинацию только компонентов, уникальных для того или иного типа. С ее помощью нельзя обнаружить новые типы кассет или оценить субтипы, но определения типов достаточно для рутинных задач большинства лабораторий. Методика содержит только 6 праймеров и позволяет определять 5 типов *SCC mec* кассет. Формат ПЦР – мультиплексная однопробирочная детекция в агарозном геле, интерпретация результатов достаточно проста и объективна [16]. Также

существуют и методы ПЦР в реальном времени для *SCC mec* типирования [16].

В настоящее время описано 8 типов кассет: *SCC mec* тип I, II, III, IV, V, VI, VII и VIII, но наибольшее значение имеют первые 5. *SCC mec* типов I, IV и V кодируют устойчивость исключительно к β -лактамам антибиотикам, а типы II и III обуславливают множественную устойчивость, так как эти кассеты содержат дополнительные детерминанты устойчивости, расположенные на интегрированных плаزمидях pUB110, pI258 и pT181, а также на транспозоне Tn554. Плаزمида pUB110 несет в себе ген *ant(4')*, который обуславливает устойчивость к канамицину и тобрамицину, pI258 – устойчивость к пенициллинам и тяжелым металлам, pT181 – устойчивость в тетрациклину. Транспозон Tn554 несет *ermA*, обуславливающий индуцибельную устойчивость к макролидам, линкозамидам и стрептограмину.

Наряду с MRSA метициллинорезистентные коагулазонегативные стафилококки также несут в себе *SCC mec* кассету. Было установлено, что метициллинорезистентные штаммы *Staphylococcus epidermidis*, выделенные в 1970-е годы, несли *SCC mec* кассеты типов I-IV [17]. Исследования *SCC mec* типов у 106 метициллинорезистентных штаммов *Staphylococcus epidermidis* в конце 1990 г. показали наличие *SCC mec* типов I-V у 85 штаммов, а тип *SCC mec* – у остальных 21 штамма не был определен [18]. В других исследованиях обнаруживаются все более новые типы *SCC mec* кассет, а также *SCC mec* кассеты без *mesA*, которые могут быть резервуаром для островков резистентности у MRSA.

Заключение

Как уже упоминалось, во всем мире распространено небольшое число клональных линий MRSA, внутри которых генетическое разнообразие крайне невелико. В связи с этим обнаружение одной клональной линии в пределах стационара, региона и даже государства еще не говорит о том, что мы имеем дело с эпидемической вспышкой, скорее всего на этой территории просто распространена та или иная клональная линия. Поэтому для золотистого стафилококка крайне сложно разработать метод типирования, который показывал бы различия как между отдельными клональными линиями, там и внутри них. На сегодняшний день единственным выходом является комбинирование различных методов типирования, что позволяет отличить значимые изоляты от незначимых и внести ясность в эпидемиологическую картину. Таким образом, мы считаем оптимальным использовать для изучения локальной эпидемиологии в пределах стациона-

ра или города следующую комбинацию методов: MLVA и SCCmec типирование. При необходимости соотнести свои изоляты с глобальными эпидемическими клонами мы рекомендуем провести спра-типи-

рование и MLST типирование для отдельных репрезентативных MRSA изолятов из каждого MLVA профиля.

Литература

1. Dekhnich A., Nikulin A., Ivanchik N., Kretchikova O., Kozlov R. Susceptibility of *Staphylococcus aureus* nosocomial isolates in Russia: five-year trends. Abstracts of the 19th ECCMID, Helsinki, Finland, 16-19 May 2009, Poster №1076.
2. Feil E.J., and M. C. Enright. Analyses of clonality and the evolution of bacterial pathogens. *Curr Opin Microbiol* 2004; 7:308–13.
3. van Belkum A, Tassios P.T, 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.
4. Prévost G., Pottecher B., Dahlet M., Bientz M., Mantz J.M., Piémont Y. Pulsed field gel electrophoresis as a new epidemiological tool for monitoring methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in an intensive care unit. *J Hosp Infect* 1991; 17(4):255-69.
5. Tenover F.C., Arbeit R.D., Goehring R.V., e.a. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *J Clin Microbiol* 1994; 33:2233–9.
4. Anderson E.S, Williams R.E. Bacteriophage typing of enteric pathogens and staphylococci and its use in epidemiology. *J Clin Pathol* 1956; 9(2):94-127.
5. Trindade P.A., McCulloch J.A., Oliveira G.A., Mamizuka E.M. Molecular techniques for MRSA typing: current issues and perspectives. *Braz J Infect Dis* 2003; 7(1):32-43.
6. Enright M.C., Day N.P., Davies C.E., Peacock S.J., Spratt B.G. Multilocus sequence typing for characterization of methicillin-resistant and methicillin-susceptible clones of *Staphylococcus aureus*. *J Clin Microbiol* 2000; 38(3):1008-15.
7. Sabat A., Krzyszton-Russjan J., Strzalka W., e.a. 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.
8. Hardy K.J., Ussery D.W., Oppenheim B.A., Hawkey P.M. Distribution and characterization of staphylococcal interspersed repeat units (SIRUs) and potential use for strain differentiation. *Microbiol* 2004; 150:4045-52.
9. Ikawaty R., Willems R.J., Box A.T., Verhoef J., Fluit A.C. 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.
10. Frénay H.M., Bunschoten A.E., Schouls L.M., e.a. 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.
11. Chen L., Mediavilla J.R., Oliveira D.C., Willey B.M., de Lencastre H., Kreiswirth B.N. Multiplex real-time PCR for rapid Staphylococcal cassette chromosome *mec* typing. *J Clin Microbiol* 2009; 47(11):3692-706.
12. Oliveira D.C., de Lencastre H. Multiplex PCR strategy for rapid identification of structural types and variants of the *mec* element in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* 2002; 46(7):2155-61.
13. Milheiro C., Oliveira D.C., de Lencastre H. Update to the multiplex PCR strategy for assignment of *mec* element types in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* 2007; 51(9):3374-7.
14. Kondo Y., Ito T., Ma X.X., e.a. Combination of multiplex PCRs for staphylococcal cassette chromosome *mec* type assignment: rapid identification system for *mec*, *ccr*, and major differences in junkyard regions. *Antimicrob Agents Chemother* 2007; 51:264–74.
15. Lu P.L., Chang J.C., Hsu H.T., e.a. One tube multiplex PCR for simple screening of SCCmec I-V types of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J Chemother* 2008; 20(6):690-6.
16. Valvatne H., Rijnders M.I., Budimir A., e.a. A rapid, 2-well, multiplex real-time polymerase chain reaction assay for the detection of SCCmec types I to V in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2009; 65(4):384-91.
17. Wisplinghoff H., Rosato A.E., Enright M.C., et al. Related clones containing SCCmec type IV predominate among clinically significant *Staphylococcus epidermidis* isolates. *Antimicrob Agent Chemother* 2003; 47:3574–79.
18. Miragaia M., Couto I., de Lencastre H. Genetic diversity among methicillin-resistant *Staphylococcus epidermidis* (MRSE). *Microb Drug Resist* 2005; 11:83–93.