

# Полиморфизм генов, участвующих в сборке клеточной стенки у метициллинорезистентных *Staphylococcus aureus* со сниженной чувствительностью к ванкомицину

В. В. ГОСТЕВ<sup>1,2</sup>, О. С. КАЛИНОГОРСКАЯ<sup>1</sup>, С. М. ЮДИН<sup>3</sup>, О. А. ДМИТRENКО<sup>4</sup>,  
А. В. КУДРЯВЦЕВА<sup>5</sup>, С. В. СИДОРЕНКО<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Детский научно-клинический центр инфекционных болезней, Санкт-Петербург

<sup>2</sup> Северо-Западный государственный медицинский университет им. И. И. Мечникова, Санкт-Петербург

<sup>3</sup> Центр стратегического планирования и управления медико-биологическими рисками здоровью, Москва

<sup>4</sup> Федеральный научно-исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии им. почетного академика Н. Ф. Гамалеи, Москва

<sup>5</sup> Институт молекулярной биологии им. В. А. Энгельгардта РАН, Москва

## Cell Wall Biosynthesis Genes Variability in Methicillin-Resistant *Staphylococcus Aureus* with Reduced Vancomycin Susceptibility

V. V. GOSTEV<sup>1</sup>, O. S. KALINOGORSKAYA<sup>1</sup>, S. M. YUDIN<sup>2</sup>, O. A. DMITRENKO<sup>3</sup>, A. V. KUDRYAVTSEVA, S. V. SYDORENKO<sup>1,4</sup>

<sup>1</sup> Pediatric Research and Clinical Center for Infectious Diseases, St. Petersburg

<sup>2</sup> North-West State Medical University named after I. I. Mechnikov, St. Petersburg

<sup>3</sup> Center for Strategic Planning and Management of Biomedical Health Risks, Moscow

<sup>4</sup> N. F. Gamaleya Federal Research Center for Epidemiology & Microbiology, Moscow

<sup>5</sup> Engelhardt Institute of Molecular Biology, Moscow

Проблема формирования и распространения изолятов *S. aureus* со сниженной чувствительностью к ванкомицину (Vancomycin intermediate *S. aureus*, VISA) ограничивает использование этого антибиотика для терапии инфекций, вызванных MRSA. Процесс формирования такого фенотипа сложный и связан с накоплением мутаций в генах, участвующих в биосинтезе клеточной стенки. В работе было проведено геномное секвенирование семи изолятов, имеющих разную чувствительность к ванкомицину и относящихся к одной генетической линии: ST8 — t008 — SCCmec IVc. Проведённый популяционный анализ для изолятов со сниженной чувствительностью к ванкомицину не выявил hVISA/VISA фенотипов, при этом PAP/AUC составил 0,53—0,7. Сравнение 83% core — частей геномов изолятов с МПК 1 мкг/мл и МПК 2 мкг/мл, а также контрольных геномов (NCBI GenBank) с известной чувствительностью, выявило разную кластеризацию, при этом изоляты с МПК 2 мкг/мл локализовались в одном кластере. Сравнение нуклеотидного конкатената, составленного из 44 генов, участвующих в сборке клеточной стенки, также показало, что изоляты кластеризуются в один кластер. Были выявлены уникальные мутации для изолятов с МПК 2 мкг/мл в *murZ* (T353A), *rpoB* (Y946C) и *fdh2* (G446S). Таким образом, изоляты со сниженной чувствительностью к ванкомицину не обладали фенотипом hVISA или VISA. Однако, выявленные мутации в «ключевых» генах биосинтеза пептидогликана могут свидетельствовать о начальном этапе селекции устойчивости к ванкомицину с формированием pre — hVISA.

**Ключевые слова:** MRSA, ванкомицин, VISA, hVISA, геномное секвенирование, клеточная стенка.

The problem of formation and spread of *S. aureus* isolates with reduced sensitivity to vancomycin (Vancomycin intermediate *S. aureus*, VISA) limits the use of this antibiotic for the treatment of infections caused by MRSA. The formation of such a phenotype is complex and is associated with the accumulation of mutations in the genes involved in the biosynthesis of the cell wall. Genomic sequencing of seven isolates with different sensitivity to vancomycin and belonging to the same genetic line was carried out in the study: ST8 — t008 — SCCmec IVc. PAP analysis of isolates with reduced sensitivity to vancomycin did not reveal hVISA/VISA phenotypes, while PAP/AUC was 0.53—0.7. Comparison of 83% of the core parts of isolates' genomes with MIC = 1 mg/ml and 2 mg/ml, as well as control genomes (NCBI GenBank) with known sensitivity, revealed different clustering, the isolates with MIC=2 mg/ml were localized in one cluster. Comparison of the nucleotide concatenate composed of 44 genes involved in the assembly of the cell wall also showed that the isolates were assembled into one cluster. Unique mutations were identified for isolates with MIC=2 mg/ml in *murZ* (T353A), *rpoB* (Y946C), and *fdh2* (G446S). Thus, isolates with reduced sensitivity to vancomycin did not have the hVISA or VISA phenotype. However, the identified mutations in the «key» genes of peptidoglycan biosynthesis may indicate the initial stage of selection of resistance to vancomycin with the formation of pre-hVISA.

**Keywords:** MRSA, vancomycin, VISA, hVISA, genomic sequencing, cell wall.

## Введение

Ванкомицин — антибиотик, введённый в клиническую практику ещё в конце 1950 гг., остаётся основным препаратом и в настоящее время для

лечения многих форм инфекций, вызванных MRSA (Methicillin — resistant *Staphylococcus aureus*). В 2002 г. был впервые описан ванкомициноустойчивый клинический изолят *S. aureus* (Vancomycin-resistant *S. aureus*, VRSA), этот факт послужил тревогой во всем мире, вследствие возможного глобального распространения этого фенотипа [1]. Однако за прошедшие 16 лет в мире

© Коллектив авторов, 2018

Адрес для корреспонденции: 197022, Санкт-Петербург, ул. Профессора Попова, д. 9. Детский научно-клинический центр инфекционных болезней

описано только несколько десятков таких стафилококков. Механизм устойчивости VRSA хорошо изучен и связан с изменением мишени действия ванкомицина благодаря горизонтальному переносу генов *vanAB* в составе мобильных векторов от энтерококков [2]. Основной проблемой является формирование и распространение изолятов *S.aureus* со сниженной чувствительностью к ванкомицину (Vancomycin intermediate *S.aureus*, VISA). Процесс формирования такого фенотипа сложный и связан с накоплением мутаций в генах, участвующих в биосинтезе клеточной стенки, что фенотипически проявляется в её утолщении, увеличении свободных терминальных концов D-Ala-D-Ala и увеличении МПК ванкомицина от 2–32 мкг/мл [3]. Важно отметить, что изоляты MRSA с МПК 2 мкг/мл (по всем существующим критериям, это значение МПК является пока «чувствительностью») ассоциированы с высоким риском неудовлетворительной антибиотикотерапией [4–5]. В популяции MRSA с МПК 2 мкг/мл могут формироваться субпопуляции клеток с более высокими значениями МПК — 3–4 мкг/мл (Heteroresistant VISA, hVISA). Процесс формирования VISA включает многоступенчатое накопление мутаций, изменение транскриптомного профиля и связан с выраженной гетерогенностью [6]. По результатам работы группы К. Hiramatsu [3], было предложено выделить ещё два фенотипа: это: pre-hVISA, предшественник hVISA и sVISA (slow VISA). Нестабильный фенотип pre — hVISA характеризуется наличием субпопуляции, имеющей некоторые ключевые мутации, легко реверсирует либо в hVISA, либо в чувствительный вариант. sVISA — это фенотип, проявляющий высокий уровень устойчивости (МПК 8 мкг/мл и выше), но с очень низкой скоростью роста [7–8]. Обнаружение hVISA или VISA стандартными микробиологическими методами остаётся весьма проблематичным. По данным многоцентровых исследований, проведённых в России за последние 5 лет, доля изолятов MRSA с МПК ванкомицина 2 мкг/мл составляет 4–30% [9–11]. Остаётся не изученным, сколько среди таких изолятов потенциально могут быть охарактеризованы как pre-hVISA или hVISA фенотипы.

Цель работы — геномное секвенирование представителей доминирующей в России генетической линии MRSA с разной чувствительностью к ванкомицину для оценки полиморфизмов в генах, участвующих в сборке клеточной стенки.

## Материал и методы

**Бактериальные изоляты.** Семь изолятов были восстановлены из бактериального музея ДНКЦИБ (хранение при  $-80^{\circ}\text{C}$  в среде с 30% глицерином) на кровяном агаре с последующей реидентификацией на масс-спектрометре Microflex LT (Bruker Daltonics, Germany). Чувствительность к ванкомицину оценивали методом серийных разведений с использованием реко-

мендаций EUCAST. Все изоляты, включённые в работу, относились к одному генотипу: сиквенс — тип (ST8), spa — тип t008 и стафилококковая mec — кассета (SCCmec) IVc типа.

**Популяционный анализ с ванкомицином (PAP).** Популяционный анализ (Population analysis profile, PAP) проводили по методике, описанной в [12]. Для этого из суточных культур, полученных на кровяном агаре, готовили инокулом с концентрацией клеток  $\sim 9 \times 10^8$  КОЕ/мл. Далее делали разведения инокулома с шагом в один логарифм. Готовили чашки с разной концентрацией ванкомицина 0–16 мкг/мл. Засевали все разведения инокулома на чашки с антибиотиком. Подсчёт КОЕ проводили через 24 и 48 ч. После этого строили график зависимости количества КОЕ от концентрации антибиотика. Параметр AUC (Area under curve) рассчитывали методом трапеций. Для предсказания фенотипа hetero — VISA или VISA рассчитывали соотношение PAP/AUC относительно референсного штамма Mu50 по формуле: AUC (тестируемый штамм) / AUC (референсный штамм). Интерпретацию результатов осуществляли исходя из следующих критериев: при получении PAP/AUC < 0,9 — оценивали как VSSA фенотип, PAP/AUC > 0,9 — hVISA/VISA.

**Полногеномное секвенирование.** Для выделения геномной ДНК проводили предварительный лизис клеток в присутствии 5 мг/мл лизоцифина (Sigma Aldrich, USA) и 100 мг/мл лизоцима (Amresco, USA) в трис — ЭДТА буфере в течение 60 мин при  $37^{\circ}\text{C}$ . Далее выделение и очистку ДНК проводили с использованием набора GeneJET Genomic DNA Purification Kit (Thermo Fisher Scientific, Lithuania) по протоколу производителя. Полногеномное секвенирование изолятов SA0274 и SA0422 проводили на платформе Miseq (Illumina, USA). Использовали пул библиотек ДНК, приготовленных с помощью набора Nextera XT с последующим получением парноконцевых ридов размером  $2 \times 300$  п. н. (ver. 3 Illumina kit). Все этапы секвенирования проводили в соответствии с протоколами производителя. Полногеномное секвенирование изолятов SA0077, SA0518 — SA0521 проводили на приборе «GS Junior» («Roche», Швейцария) с приготовлением Shotgun библиотек со стандартными наборами «GS Junior Titanium Kit» («Roche»). Среднее покрытие геномов составило  $\times 30$ – $\times 70$ .

**Анализ результатов (биоинформационный анализ).** Сборку геномов осуществляли с помощью SPAdes 3.5.0 [13] после предварительного анализа и редакции ридов в программах FastQC и Trimmomatic [14]. Геномное выравнивание и определение SNP (Single Nucleotide Polymorphism) проводили с использованием Parsnp — harvest [15]. Подготовка нуклеотидных конкатенатов (concatenate nucleotide sequences), а также проведение выравнивания и построение филогенетических деревьев проводили на платформе Unipro Ugene [16]. Полученные сиквенсы доступны в NCBI GenBank, изоляты SA0518 — SA0521: JFAY, JFAR, JHBP, JFAU, изоляты SA0077, SA0274 и SA0422 доступны в BioProject: PRJNA325350.

## Результаты и обсуждения

Из семи изолятов, включённых в исследование, три изолята (SA0077, SA0274 и SA0422) имели МПК ванкомицина 2 мкг/мл. Для детекции hVISA, VISA фенотипов был проведён PAP для этих изолятов, кривые зависимостей роста от различной концентрации антибиотика представлены на рис. 1. Исходя из полученных результатов видно, что изоляты с МПК 2 мкг/мл не обладают hVISA или VISA-фенотипами, и соотношение PAP/AUC не превышало 0,7 (таблица). При этом контрольный штамм ATCC29213 с МПК 1 мкг/мл имел PAP/AUC = 0,63. Стоит отметить, что в работе [17] было отмечено, что наибольшей долей MRSA со сниженной чувствительностью к

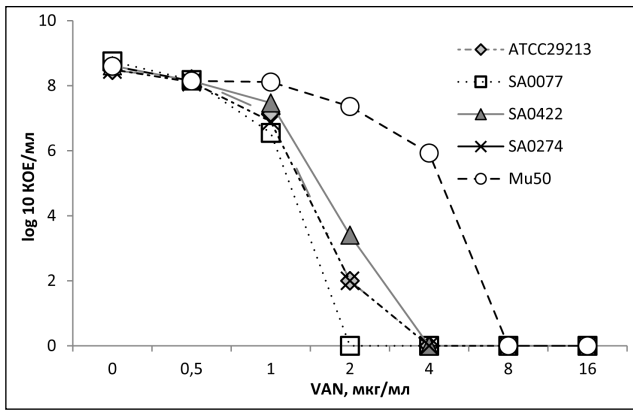


Рис. 1. PАР — анализ для изолятов, имеющих МПК ванкомицина 2 мкг/мл.

ванкомицину характеризуется клональный комплекс 8 (СС8), к числу которых, относятся и изучаемые в настоящей работе изоляты.

С целью выявления возможных механизмов, обуславливающих сниженную чувствительность к ванкомицину, было проведено геномное секвенирование. Для этого в качестве сравнительной группы были отобраны изоляты с МПК ванкомицина 1 мкг/мл. В анализ были добавлены сиквенсы референсных изолятов с хорошо описанными фенотипическими и генотипическими особенностями — это VISA и hVISA штаммы (Mu50, Mu3, JKD6008, Z172, JH9), имеющие МПК 4–8 мкг/мл. Были включены также изоляты N315 и 16K (МПК < 2 мкг/мл). В качестве референсного штамма для сравнения всех сиквенсов был выбран штамм COL. Выбор этого штамма как референсного продиктован тем, что он был выделен ещё в 1960 годах, до периода массового применения ванкомицина в клинической практике, и таким образом возможные генетические изменения

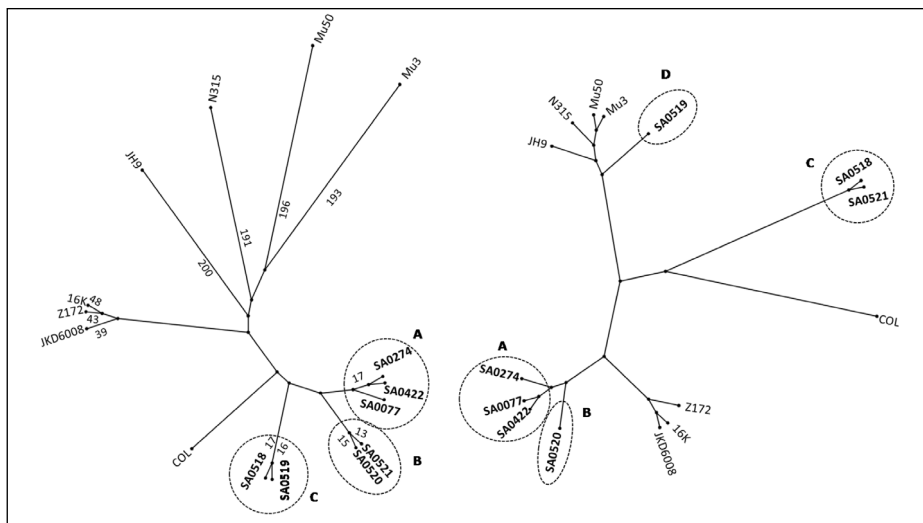
у этого штамма под влиянием ванкомицина сведены к минимуму.

Исходя из опубликованных данных, а также анализируя биосинтетический путь сборки клеточной стенки *S. aureus*, при использовании базы данных KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes), были отобраны 44 гена, ассоциированные со снижением чувствительности к ванкомицину. Перечень генов включал: функциональные гены: *ddl*, *murA*, *murB*, *murZ*, *murC*, *murD*, *murE*, *murF*, *murI*, *murG*, *pbp2*, *mecA*, *pbp4*, *mprF*, *mraY*, *femAB*, *femX*, *FtsI12*, *msrR*, *sgtA*; регуляторные гены: *yvqF*, *vraSR*, *vraFG*, *vraT*, *walkR*, *graSR*, *sigB*, *rpoBC*, *sle1*, *stpI*; гены общего метаболизма: *clpP*, *glnA*, *mgt*, *cmk*, *fdh2*, *glmU*, SACOL2161. Перечисленные гены для каждого анализируемого изолята, включая контрольные, были объединены в единый конкатенат размером 59478 тыс. п.н. (около 1,5% от стафилококкового генома). Далее последовательности были выровнены с последующим кластерным анализом. Результаты геномного выравнивания и выравнивания конкатената представлены на рис. 2. Так, при геномном сравнении изучаемые изоляты были сгруппированы в несколько кластеров — А, В, С и D, при этом максимально удалёнными оказались изоляты SA0518, SA0519, SA0521. Core — часть всех сравниваемых геномов — составила 83%. Группа изолятов с МПК 2 мкг/мл была сформирована одним кластером (А), однако также здесь локализовался изолят SA0520 с МПК 1 мкг/мл. Изоляты кластера А отличались между собой на 71–132 SNP, и имели 170–213 SNP по сравнению с изолятом SA0520 (кластер В). Максимальное эволюционное расстояние наблюдалось при сравнении с изолятами кластеров D и С, соответственно количество SNP составляло 147–202 и 140–200. При анализе конкатената, топология кластеров

#### Сравнительная характеристика изолятов MRSA генетической линии ST8-t008-SCCmec IVc с разной чувствительностью к ванкомицину

Изоляты	Год	МПК VAN, мкг/мл	AUC/PAP**	Миссенс-мутации в генах БПГ*									
				<i>murA</i>	<i>murZ</i>	<i>murB</i>	<i>murF</i>	<i>mecA</i>	<i>sgtA</i>	<i>femX</i>	<i>rpoB</i>	<i>vraS</i>	<i>fdh2</i>
SA0077	2011	2	0,56	G257D	T353A	L115R	T301I	E246G	K200R	T102A	V798A L875S Y946C	V91I	—
SA0422	2011	2	0,7	G257D	T353A	L115R	T301I	E246G	K200R	T102A	V798A L875S Y946C	V91I	—
SA0274	2012	2	0,63	G257D	T353A	L115R	T301I	E246G	K200R	T102A	V798A L875S Y946C	V91I	G446S
SA0518	1998	1	—	G257D	—	L115R	T301I	E246G	K200R	T102A	V798A M220W L875S	—	—
SA0519	2005	1	—	G257D	V258A	L115R	T301I	E246G	K200R	T102A	—	V91I	—
SA0520	1998	1	—	G257D	—	L115R	T301I	E246G	K200R	T102A	V798A L875S	V91I	—
SA0521	1998	1	—	G257D	—	L115R	T301I	E246G	K200R	T102A	V798A L875S	V91I	—

Примечание. \* — БПГ — биосинтез пептидогликана; \*\* — AUC/PAP был сделан только для изолятов с МПК ванкомицина 2 мкг/мл.



**Рис. 2. Результаты выравнивания конкатената, включающего нуклеотидные последовательности 44 генов (слева) и полных геномов (справа), вид — радиальное дерево, кладограмма (пропорциональный масштаб).**

Для построения дерева конкатената был использован алгоритм максимального правдоподобия PHuML. Жирным шрифтом выделены Российские изоляты; пунктиром отмечены отдельные кластеры для двух выравниваний. Для конкатената над ветвями указаны количества SNP по сравнению с референсным геномом COL.

на дереве немного менялась. В целом, вся группа анализируемых Российских изолятов была локализована достаточно близко относительно друг друга, но, тем не менее, кластер А оставался в таком же составе. Изоляты с МПК 1 мкг/мл группировались в кластеры В (SA0520, SA0521) и С (SA0518, SA0519).

При детальной оценке распределения мутаций было выявлено, в которых выявлялись миссенс-мутации, в частности *murA*, *murZ*, *murB*, *murF*, *mecA*, *sgtA*, *femX*, *rpoB*, *vraS*, *fdh2* (см. табл. 1). Уникальные мутации, характерные только для изолятов с МПК 2 мкг/мл были обнаружены в нескольких генах — *murZ* (T353A), *rpoB* (Y946C) и *fdh2* (G446S). Ген *murZ* кодирует UDP-N-acetylglucosamine 1-carboxyvinyltransferase, фермент участвующий на ранней стадии сборки пептидогликана. В недавних экспериментах было установлено, что фенотипы sVISA, полученные при селекции *in vitro* характеризовались наличием мутаций в этом гене в позициях G10V, T240R, T306I, авторы рассматривают эти мутации как компенсаторные при формировании высокой степени устойчивости у sVISA фенотипов [18]. Мутация в позиции T353A, обнаруженная у Российских изолятов, ранее не описывалась, и возможно является одним из факторов снижения чувствительности к ванкомицину. Также у изолята SA0519 выявлена замена в позиции V258A. Ген *rpoB*, кодирующий  $\beta$ - субъединицу РНК-полимеразы, является глобальным регулятором и важнейшим переключателем фенотипов VSSA  $\rightarrow$  hVISA  $\rightarrow$  VISA. Описано около 50 вариантов мутаций в *rpoB* у

клинических изолятов, проявляющих сниженную чувствительность к ванкомицину, роль многих из них доказана в экспериментах по мутагенезу [6, 19]. Почти у всех изолятов были обнаружены миссенс-мутации в *rpoB* в позициях V798A и L875S. Отмечается, что такие мутации могут опосредовать формирование гоморезистентности к бета-лактамам, в частности к оксацилину. Высокий уровень гоморезистентности к оксацилину является триггерным механизмом для формирования снижения чувствительности к ванкомицину [3, 20]. Другая мутация Y946C была характерна только для изолятов с МПК 2 мкг/мл.

Ранее такой вариант замены не был описан, однако данная позиция находится в локусе, где обнаруживаются мутации характерные для sVISA (H929T G977V) и VISA (L887F, Q1069E, A1085V) [3, 6]. У изолята SA0274 была обнаружена мутация (G446S) в гене *fdh2*, предположительно кодирующий формиатдегидрагеназу. Мутации в этом гене опосредуют утолщение клеточной стенки и обнаруживаются среди VISA изолятов [6, 21].

Проведённое исследование имеет ряд ограничений: во-первых, в работу были включены изоляты только одной генетической линии, во-вторых количество анализируемых геномов не достаточно для того, что бы сделать выводы о популяционном накоплении изменений в генах биосинтеза пептидогликана, потенциально опосредующих феномен «MIC creep» (феномен сползания МПК), и в-третьих, не была проведена оценка полиморфизмов анализируемых генов в глобальной популяции *S. aureus*. Для подтверждения роли обнаруженных мутаций необходимо дополнительное проведение опытов по сайт-направленному мутагенезу.

Таким образом, проведённый анализ показал, что изоляты со сниженной чувствительностью к ванкомицину (МПК 2 мкг/мл) не обладают фенотипом hVISA или VISA. Однако выявленные мутации в «ключевых» генах биосинтеза пептидогликана (*murZ*, *rpoB* и *fdh2*) могут свидетельствовать о начальном этапе селекции устойчивости к ванкомицину с формированием pre-hVISA. Также возможным вариантом является формирование одной генетической линии со

сниженной чувствительностью к ванкомицину, которая имеет большее распространение по сравнению с другими генетическими линиями в Российской Федерации. Ранее нами отмечалось, что среди ST8 — t008-SCCmec IVc, доля изолятов с МПК 2 мкг/мл выше по сравнению с другими генетическими линиями [22]. Не смотря на большое количество альтернатив для лечения MRSA-инфекций, в нашей стране ванкомицин остаётся препаратом выбора, а также используется в эмпирической терапии. Полученные данные могут

свидетельствовать о начальном этапе селекции устойчивости к ванкомицину. В этой связи, неадекватное и продолжительное использование гликопептидов будет способствовать росту «MIC creep» и увеличению неблагоприятных исходов терапии ванкомицином.

**Уведомление: исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда (проект № 15-15-00185).**

## ЛИТЕРАТУРА

- Chang S., Sievert D.M., Hageman J.C., Boulton M.L., Tenover F.C., Downes F.P., Shah S., Rudrik J.T., Pupp G.R., Brown W.J. et al. Infection with vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* containing the *vana* resistance gene. *N Engl J Med* 2003; 348 (14): 1342–1347.
- Courvalin P. Vancomycin resistance in gram-positive cocci. *Clin Infect Dis* 2006; 42: Suppl 1: S25–34.
- Hiramatsu K., Kayayama Y., Matsuo M., Aiba Y., Saito M., Hishinuma T., Iwamoto A. Vancomycin-intermediate resistance in *Staphylococcus aureus*. *J Glob Antimicrob Resist* 2014; 2 (4): 213–224.
- Casapao A.M., Davis S.L., McRoberts J.P., Lagnf A.M., Patel S., Kullar R., Levine D.P., Rybak M.J. Evaluation of vancomycin population susceptibility analysis profile as a predictor of outcomes for patients with infective endocarditis due to methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* 2014; 58 (8): 4636–4641.
- van Hal S.J., Lodise T.P., Paterson D.L. The clinical significance of vancomycin minimum inhibitory concentration in *Staphylococcus aureus* infections: a systematic review and meta-analysis. *Clin Infect Dis* 2012; 54 (6): 755–771.
- Hu Q., Peng H., Rao X. Molecular Events for Promotion of Vancomycin Resistance in Vancomycin Intermediate *Staphylococcus aureus*. *Front Microbiol* 2016; 7: 1601.
- Katayama Y., Azechi T., Miyazaki M., Takata T., Sekine M., Matsui H., Hanaki H., Yahara K., Sasano H., Asakura K. et al. Prevalence of Slow-Growth Vancomycin Nonsusceptibility in Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* 2017; 61 (11).
- Saito M., Katayama Y., Hishinuma T., Iwamoto A., Aiba Y., Kuwahara-Arai K., Cui L., Matsuo M., Aritaka N., Hiramatsu K. «Slow VISA», a novel phenotype of vancomycin resistance, found *in vitro* in heterogeneous vancomycin-intermediate *Staphylococcus aureus* strain Mu3. *Antimicrob Agents Chemother* 2014; 58 (9): 5024–5035.
- Сухорукова М.В., Скленева Е.Ю., Иванчик Н.В., Тимохова А.В., Эйдельштейн М.В., Дехнич А.В., Козлов Р.С., Попов Д.А., Астанина М.А., Жданова О.А. и др. Антибиотикорезистентность нозокомиальных штаммов *Staphylococcus aureus* в стационарах России: результаты многоцентрового эпидемиологического исследования Марафон в 2011–2012 гг. КМАХ. — 2014. — Т. 16. — № 4. — С. 280–286. / Sukhorukova M.V., Skleenova E.YU., Ivanchik N.V., Timokhova A.V., Eydel'shteyn M.V., Dekhnichev A.V., Kozlov R.S., Popov D.A., Astanina M.A., Zhdanova O.A. et al. Antibiotikorezistentnost' nozokomial'nykh shtamov *Staphylococcus aureus* v stacionarakh Rossii: rezul'taty mnogotsentrovogo epidemiologicheskogo issledovaniya Marafon v 2011–2012 gg. KMAKH. — 2014. — Т. 16. — № 4. — С. 280–286. [in Russian]
- Гостев В.В., Калиногорская О.С., Попенко Л.Н., Черненко Т.В., Науменко З.С., Ворошилова Т.М., Захарова Ю.А., Хохлова О.Е., Круглов А.Н., Ершова М.Г., Молчанова И.В., Сидоренко С.В. Антибиотикорезистентность метициллинорезистентных штаммов *Staphylococcus aureus*, циркулирующих в Российской Федерации. Антибиотики и химиотер. — 2015. — 60. — № 1–2. — С. 3–9 / Gostev V.V., Kalinogorskaya O.S., Popenko L.N., Chernenkaya T.V., Naumenko Z.S., Voroshilova T.M., Zakharova Y.A., Khokhlova O.E., Kruglov A.N., Ershova M.G., Molchanova I.V., Sidorenko I.V. et al. Antibiotic Resistance of MRSA in the Russian Federation. *Antibiot i Khimioter* 2015; 60 (1–2): 3–9. [in Russian]
- Романов А.В., Дехнич А.В., Сухорукова М.В., Скленева Е.Ю., Иванчик Н.В., Эйдельштейн М.В., Козлов Р.С., Попов Д.А. Антибиотикорезистентность нозокомиальных штаммов *Staphylococcus aureus* в стационарах России: результаты многоцентрового эпидемиологического исследования Марафон в 2013–2014 гг. КМАХ. — 2017. — Т. 19. — № 1. — С. 57–62. / Romanov A.V., Dekhnichev A.V., Sukhorukova M.V., Skleenova E.Yu., Ivanchik N.V., Eydel'shteyn M.V., Kozlov R.S., Popov D.A. Antibiotikorezistentnost' nozokomial'nykh shtamov *Staphylococcus aureus* v stacionarakh Rossii: rezul'taty mnogotsentrovogo epidemiologicheskogo issledovaniya Marafon v 2013–2014 gg. KMAKH 2017; 19 (1): 57–62. [in Russian]
- Wootton M., Howe R.A., Hillman R., Walsh T.R., Bennett P.M., MacGowan A.P. A modified population analysis profile (PAP) method to detect hetero-resistance to vancomycin in *Staphylococcus aureus* in a UK hospital. *J Antimicrob Chemother* 2001; 47 (4): 399–403.
- Bankevich A., Nurk S., Antipov D., Gurevich A.A., Dvorkin M., Kulikov A.S., Lesin V.M., Nikolenko S.I., Pham S., Pribelski A.D. et al. SPAdes: a new genome assembly algorithm and its applications to single-cell sequencing. *J Comput Biol* 2012; 19 (5): 455–477.
- Bolger A.M., Lohse M., Usadel B. Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics* 2014; 30 (15): 2114–2120.
- Treangen T.J., Ondov B.D., Koren S., Phillippy A.M. The Harvest suite for rapid core-genome alignment and visualization of thousands of intraspecific microbial genomes. *Genome Biol* 2014; 15 (11): 524.
- Okonechnikov K., Golosova O., Fursov M. Unipro UGENE: a unified bioinformatics toolkit. *Bioinformatics* 2012; 28 (8): 1166–1167.
- Holmes N.E., Turnidge J.D., Munckhof W.J., Robinson J.O., Korman T.M., O'Sullivan M.V., Anderson T.L., Roberts S.A., Warren S.J., Coombs G.W. et al. Genetic and molecular predictors of high vancomycin MIC in *Staphylococcus aureus* bacteremia isolates. *J Clin Microbiol* 2014; 52 (9): 3384–3393.
- Matsuo M., Hishinuma T., Katayama Y., Hiramatsu K. A mutation of RNA polymerase beta' subunit (RpoC) converts heterogeneous vancomycin-intermediate *Staphylococcus aureus* (hVISA) into «slow VISA». *Antimicrob Agents Chemother* 2015; 59 (7): 4215–4225.
- Katayama Y., Sekine M., Hishinuma T., Aiba Y., Hiramatsu K. Complete Reconstitution-Intermediate *Staphylococcus aureus* Phenotype of Strain Mu50 in Vancomycin-Susceptible *S.aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* 2016; 60 (6): 3730–3742.
- Aiba Y., Katayama Y., Hishinuma T., Murakami-Kuroda H., Cui L., Hiramatsu K. Mutation of RNA polymerase beta-subunit gene promotes heterogeneous-to-homogeneous conversion of beta-lactam resistance in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* 2013; 57 (10): 4861–4871.
- Matsuo M., Cui L., Kim J., Hiramatsu K. Comprehensive identification of mutations responsible for heterogeneous vancomycin-intermediate *Staphylococcus aureus* (hVISA)-to-VISA conversion in laboratory-generated VISA strains derived from hVISA clinical strain Mu3. *Antimicrob Agents Chemother* 2013; 57 (12): 5843–5853.
- Gostev V., Kruglov A., Kalinogorskaya O., Dmitrenko O., Khokhlova O., Yamanova T., Lobzin Y., Ryabchenko I., Sidorenko S. Molecular epidemiology and antibiotic resistance of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* circulating in the Russian Federation. *Infect Genet Evol* 2017; 53: 189–194.

## СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ:

Гостев Владимир Валерьевич — к. б. н., научный сотрудник отдела медицинской микробиологии и молекулярной эпидемиологии Федерального государственного бюджетного учреждения «Детский научно-клинический центр инфекционных болезней Федерального медико-биологического агентства», Санкт-Петербург; ассистент кафедры медицинской микробиологии Федерального государственного бюджетного образовательного учрежде-

ния высшего образования «Северо-Западный государственный медицинский университет им. И.И. Мечникова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Санкт-Петербург

Калиногорская Ольга Серафимовна — к. м. н., научный сотрудник отдела медицинской микробиологии и молекулярной эпидемиологии Федерального государственного бюджетного учреждения «Детский научно-клинический центр инфекционных болезней Федерального медико-биологического агентства», Санкт-Петербург

*Юдин Сергей Михайлович* — д. м. н., профессор, директор Федерального государственного бюджетного учреждения Центр стратегического планирования и управления медико-биологическими рисками здоровью, Москва

*Дмитренко Ольга Александровна* — д. б. н., ведущий научный сотрудник, лаборатории молекулярных основ патогенности (с группой стафилококковых инфекций) отдела бактериальных инфекций Федерального государственного бюджетного учреждения «Федеральный научно-исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии им. почетного академика Н. Ф. Гамалеи», Москва

*Кудрявцева Анна Викторовна* — к. м. н., ведущий научный сотрудник Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Институт молекулярной биологии им. В. А. Энгельгардта» РАН (ИМБ РАН), Москва

*Сидоренко Сергей Владимирович* — профессор, д. м. н., ведущий научный сотрудник отдела медицинской микробиологии и молекулярной эпидемиологии Федерального государственного бюджетного учреждения «Детский научно-клинический центр инфекционных болезней Федерального медико-биологического агентства», Санкт-Петербург; профессор кафедры медицинской микробиологии Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Северо-Западный государственный медицинский университет им. И. И. Мечникова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Санкт-Петербург