

Федеральное государственное автономное учреждение
«Национальный медицинский исследовательский центр здоровья детей»
Министерства здравоохранения Российской Федерации

На правах рукописи

Лазарева Анна Валерьевна

Микробиологическая характеристика, механизмы устойчивости
к антибиотикам и молекулярная эпидемиология резистентных форм
респираторных патогенов и госпитальных грамотрицательных бактерий

03.02.03 – Микробиология

Диссертация на соискание ученой степени доктора медицинских наук

Научный консультант:
профессор РАН,
доктор медицинских наук
Маянский Н.А.

Москва 2018

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	5
ОСНОВНАЯ ЧАСТЬ.....	22
Глава 1. Обзор литературы.....	22
1.1. Возбудители инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи.....	22
1.1.1. <i>Acinetobacter baumannii</i>	24
1.1.2. <i>Klebsiella pneumoniae</i>	29
1.1.3. <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	33
1.2. Возбудители респираторных инфекций.....	46
1.2.1. <i>Streptococcus pneumoniae</i>	46
1.2.2. <i>Streptococcus pyogenes</i>	55
Глава 2. Материалы и методы исследования.....	57
2.1. Выделение, идентификация и анализ госпитальных бактерий.....	57
2.1.1. Определение чувствительности к антибиотикам.....	58
2.1.2. Молекулярно-генетические методы исследования.....	60
2.1.3. Исследование биопленкообразования у штаммов <i>A. baumannii</i>	65
2.2. Выделение, идентификация и анализ респираторных патогенов....	66
Глава 3. Госпитальные грамотрицательные бактерии.....	71
3.1. Динамика микробиоты, колонизирующей слизистые оболочки во время пребывания в ОРИТ, при анализе трахеального аспирата.....	71
3.2. Результаты микробиологического исследования крови.....	78
3.3. Результаты микробиологического исследования ликвора	83
Глава 4. Клональное разнообразие, молекулярные механизмы устойчивости к карбапенемам и биопленкообразование у карбапенемрезистентных штаммов <i>A. baumannii</i> , выделенных в г. Москве.....	87

4.1. Распределение клональных комплексов и сиквенс-типов согласно схемам Oxford и Pasteur.....	87
4.2. Определение чувствительности к антибиотикам и идентификация генов β -лактамаз.....	92
4.3. Образование биопленок.....	93
Глава 5. Клональное разнообразие, молекулярные механизмы устойчивости к карбапенемам у карбапенемрезистентных штаммов <i>K. pneumoniae</i>	97
5.1. Профиль чувствительности к антибиотикам изолятов <i>K. pneumoniae</i>	97
5.2. Молекулярные механизмы устойчивости изолятов <i>K. pneumoniae</i> к β -лактамным антибиотикам.....	99
5.3. Клональная структура популяции <i>K. pneumoniae</i>	100
Глава 6. Популяционная структура карбапенемрезистентных штаммов <i>P. aeruginosa</i> и носительство металло- β -лактамаз.....	105
6.1. Характеристика популяционной структуры карба-Р <i>P. aeruginosa</i>	106
6.2. Носительство МБЛ-карбапенемаз.....	109
Глава 7. Респираторные патогены.....	111
7.1. Динамика распространенности серотипов и антибиотикорезистентности носоглоточных пневмококков, в выделенных в 2010-2016 гг.....	111
7.2. Динамика резистентности и клональная эволюция пневмококков серотипа 14 в 2010-2015 гг.	127
7.3. Клональная эволюция пневмококков серотипа 19А в 2002-2013 гг.	136
7.4. Распространенность и механизмы устойчивости к макролидам <i>S. pyogenes</i>	152
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	158
ВЫВОДЫ.....	179

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ.....	181
ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШЕЙ РАЗРАБОТКИ ТЕМЫ.....	182
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	183
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	185

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы диссертационного исследования

Проблемы возникновения, распространения и эволюции резистентности микробов к антибиотикам находятся в центре внимания клинической микробиологии. Антибиотикорезистентность расценивают как одну из значимых угроз для человечества в XXI веке [276, 191]. Это связано с тем, что на фоне замедления разработки новых антимикробных препаратов наблюдается повсеместный рост резистентности к ним и появление панрезистентных штаммов микробов [265, 162]. Серьезность сложившейся ситуации побудила Всемирную организацию здравоохранения (ВОЗ) составить перечень антибиотикорезистентных возбудителей, распространение которых вызывает наибольшую угрозу [384]. В этот список, опубликованный в феврале 2017 г., вошли 12 видов бактерий, в том числе устойчивые к карбапенемам представители семейства *Enterobacteriaceae*, карбапенемрезистентные *Acinetobacter spp.* и *Pseudomonas spp.*, а также нечувствительные к пенициллину *Streptococcus pneumoniae*. Указанная инициатива ВОЗ имела целью привлечь внимание всех заинтересованных сторон, включая исследовательские организации, фармацевтические компании и правительственные структуры, к решению проблемы нарастающей резистентности микробов к антибиотикам, стимулировать разработку новых антибиотиков и развитие национальных программ по борьбе с антибиотикорезистентностью.

Российские данные свидетельствуют о том, что приведенный ВОЗ список патогенов актуален и для нашей страны. В этиологической структуре инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи (ИСМП), ведущая роль принадлежит грамотрицательным условно-патогенным бактериям, включая *Enterobacteriaceae* (в том числе *Klebsiella pneumoniae*), *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* и ряд других [81, 82, 90, 96]. Госпитальные штаммы указанных микроорганизмов, как правило, обладают множественной лекарственной устойчивостью (МЛУ). Так, по данным многоцентрового

исследования об устойчивости грамотрицательных патогенов МАРАФОН (2013-2014 гг.), МЛУ-фенотипом обладали 82,2% госпитальных изолятов *Enterobacteriaceae*, 64,4% – *A. baumannii* и 51,4% – *P. aeruginosa* [81, 82, 90].

Особую обеспокоенность вызывает неуклонно возрастающая устойчивость грамотрицательных бактерий к антибиотикам из группы карбапенемов. В течение длительного времени карбапенемы считались антибиотиками резерва, и большинство патогенов сохраняли к ним чувствительность [65, 163]. Однако в последние годы их эффективность начала снижаться из-за распространения устойчивых штаммов, нередко обладающих целым набором детерминант резистентности. Одним из движущих факторов нарастания резистентности стало увеличение объема потребления карбапенемов, в первую очередь в отделениях реанимации и интенсивной терапии (ОРИТ) [3, 4]. Главным механизмом резистентности к β -лактамам в целом и к карбапенемам в частности является продукция ферментов, гидролизующих антибиотики, таких как β -лактамазы расширенного спектра (БЛРС) и карбапенемазы [297]. Важную роль в формировании резистентности могут играть: эффлюкс антибиотика из бактериальной клетки, модификация мишени, а также нарушение проницаемости за счет изменения структуры пориновых каналов [3, 75, 123, 254].

В распространении устойчивости к карбапенемам важную роль играют неферментирующие глюкозу грамотрицательные бактерии (НГОб) *A. baumannii* и *P. aeruginosa*. Как было указано выше, наряду с представителями семейства *Enterobacteriaceae* они приобрели заметный вес в структуре ИСМП. Природная устойчивость данных микроорганизмов ко многим классам антибиотиков объясняет трудности лечения инфекций, ассоциированных с ними, и обуславливает необходимость использования карбапенемов и их комбинаций с другими антибиотиками широкого спектра действия. Обладая пластичным геномом, *A. baumannii* и *P. aeruginosa* способны приобретать и интегрировать новые детерминанты резистентности, в частности, карбапенемазы, приобретая МЛУ-фенотип и становясь векторами диссеминации устойчивости к карбапенемам не только на уровне вида, но и между видами [306]. Это объясняет

пристальное внимание к представителям *Acinetobacter* spp. и *Pseudomonas* spp. как микробиологов, так и специалистов в области эпидемиологии.

В педиатрической практике недостаточно изучена структура микробиоты детей в ОРИТ, ее чувствительность к антибиотикам, распространенность и механизмы резистентности [218, 228, 254, 303]. По данным S.C. Kehl, Dowzicky M.J., среди грамотрицательных патогенов, выделенных у детей с 2004 по 2012 годы, большинство бактерий семейства *Enterobacteriaceae* показали высокую чувствительность (>95%) к амикацину, тигециклину и карбапенемам (имипенем и меропенем). *A. baumannii* в 90% случаях проявлял чувствительность к миноциклину. Амикацин был наиболее активным против *P. aeruginosa* (90%). Штаммы *K. pneumoniae*, продуцирующие БЛРС, составили 24%. Статистически значимые различия в уровнях чувствительности отмечались между возрастными группами (1-5 лет, 6-12 лет или 13-17 лет). Значительные различия были зарегистрированы для всех патогенов при сравнении чувствительности в детской и взрослой популяциях. Так, амикацин, тигециклин и карбапенемы были активны *in vitro* против большинства грамположительных патогенов, выделенных у детей, а *A. baumannii* и *P. aeruginosa* были восприимчивы к меньшему количеству противомикробных препаратов [228]. Следует отметить, что спектр применяемых антимикробных препаратов в педиатрической практике имеет возрастные ограничения. Так, препаратами выбора при лечении инфекций, вызванных устойчивыми к карбапенемам бактериями, являются колистин, полимиксин В, фосфомицин, тигециклин, которые разрешены у детей только старшего возраста [4, 228].

Развитие и совершенствование молекулярно-генетических технологий внесло существенный вклад в формирование базы знаний, касающихся механизмов устойчивости к антибиотикам, их эволюции и распространения. Применение секвенирования нуклеотидных последовательностей консервативных участков нескольких генов «домашнего хозяйства» (метод получил название мультилокусное сиквенс-типирование – МЛСТ) позволяет оценивать генетическую структуру бактериальной популяции. Базы данных МЛСТ,

содержащие сведения о генотипах (сиквенс-типах – ST) бактерий, дают возможность выявлять местные особенности в контексте мировой информации [93, 233, 278, 310]. С появлением МЛСТ стало очевидно, что многие виды бактерий имеют клональную структуру, а некоторые клоны распространены повсеместно [383]. Наибольшую опасность представляют международные клоны высокого эпидемического риска, обладающие МЛУ, которые способны быстро распространяться. В связи с этим мониторинг молекулярной эпидемиологии приоритетных патогенов является важным инструментом для контроля за распространением антибиотикорезистентности и разработки мер по ее профилактике.

Респираторные инфекции занимают ведущее место в структуре детской заболеваемости и являются наиболее частой причиной обращения за медицинской помощью, а также назначения антибиотиков [12]. Большинство инфекций бактериальной этиологии связано с несколькими видами микроорганизмов и прежде всего со стрептококками, среди которых лидирующие позиции занимают *Streptococcus pneumoniae* (пневмококк) и *Streptococcus pyogenes* (пиогенный стрептококк, β -гемолитический стрептококк серогруппы А – БГСА) [15, 16, 29, 42, 51, 75]. С пневмококками ассоциирован широкий спектр заболеваний, в первую очередь у детей, начиная от острого среднего отита и синусита, мукозальной пневмонии и заканчивая тяжелыми жизнеугрожающими инвазивными пневмококковыми инфекциями (ИПИ), включая бактериемию и менингит [49, 168, 363]. По данным ВОЗ, пневмококковые инфекции являются наиболее распространенной причиной детской заболеваемости и смертности в мире, вызывая около 0,7-1 млн смертей ежегодно у детей младше 5 лет [11]. Пиогенный стрептококк является возбудителем инфекционных поражений верхних дыхательных путей (тонзиллофарингиты, отиты), кожи и мягких тканей (пиодермия, импетиго, рожа, рожистое воспаление, некротический фасциит) и служит причиной скарлатины, эндокардита, гнойного артрита, остеомиелита, омфалита и тяжелых генерализованных процессов с синдромом токсического шока [14, 53,

117]. Наблюдения последних лет показали возрастание (до 22%) роли *S. pyogenes* в этиологии острого отита у детей и особенно его тяжелых форм (до 47%) [30, 57].

Для лечения стрептококковых инфекций в течение долгого времени с успехом применялись препараты пенициллинового ряда. Однако за последние 30 лет во всем мире наблюдается неблагоприятная тенденция возрастания устойчивости пневмококков к β -лактамам (антибиотикам) (*S. pyogenes* сохраняет полную чувствительность к пенициллину). В зависимости от региона, доля нечувствительных к пенициллину изолятов колеблется от 5 до 50%, а появление пневмококков, обладающих МЛУ, вызывает большую обеспокоенность [7, 26, 36, 38, 58, 246, 316, 352]. В качестве альтернативы β -лактамам при респираторных инфекциях широкую популярность, в том числе в педиатрической практике, приобрели препараты из группы макролидных антибиотиков. Массовое использование макролидов, зачастую неадекватное и/или необоснованное, быстро привело к появлению устойчивых форм пневмококков и *S. pyogenes*. В настоящее время резистентность к макролидам у стрептококков в различных регионах мира варьирует от 5-10% до 100%, как это наблюдается в ряде стран Юго-Восточной Азии [352]. Российские данные по стрептококковой резистентности имеют существенные региональные различия, что требует проведения регулярной оценки местных особенностей профиля антибиотикочувствительности и определения механизмов устойчивости.

Внедрение в практику вакцинации пневмококковыми конъюгированными вакцинами (ПКВ), охватывающими от 7 до 13 серотипов пневмококков, ожидаемо вывело из циркуляции бактерии, обладающие вакцинными серотипами [56, 321, 377]. Вместе с этим резко снизилась заболеваемость ИПИ, которые были ассоциированы преимущественно с этими серотипами. В то же время, ПКВ оказали выраженное влияние на структуру пневмококковой популяции, в которой появились невакцинные серотипы и выросла доля ранее редких генетических линий (клонов). В первую очередь это относилось к не-ПКВ7 серотипу 19А и его клону ST320 [103, 194]. Сложившуюся ситуацию объясняли ПКВ-опосредованным феноменом замещения серотипов, то есть экспансией ранее

существовавших минорных популяций пневмококка с не-ПКВ7 серотипами под давлением вакцины. Однако ПКВ7-независимое увеличение частоты 19А-пневмококков, наблюдавшееся в ряде стран, указывает на то, что на клональную эволюцию пневмококков может влиять не только тип капсульного полисахарида, но и другие бактериальные факторы, в частности, устойчивость к антибиотикам. Вакцинация ПКВ была введена в Российский национальный календарь профилактических прививок в 2014 году [62]. В связи с этим мониторинг серотипового состава пневмококковой популяции и отслеживание ее клональной структуры является актуальной задачей.

Актуальные данные о частоте и механизмах резистентности конкретного вида возбудителя инфекционного процесса лежат в основе эффективности антибактериальной терапии. В связи с этим изучение приоритетных патогенов с использованием микробиологических и молекулярно-генетических методов, нацеленное на определение распространенности и механизмов устойчивости к антибиотикам, характеристику генетической структуры бактериальных популяций, будет способствовать рациональному выбору антимикробных препаратов и разработке мер по преодолению устойчивости.

Степень разработанности темы исследования

В отечественной и мировой литературе проблемам антибиотикорезистентности уделяется серьезное внимание. Так, недавно были опубликованы результаты многоцентрового исследования МАРАФОН, в котором представлены данные о динамике устойчивости грамотрицательных патогенов в 2013-2014 гг. в более чем 20 городах России [90, 83, 82]. Отдельные публикации дополнительно описывают частоту антибиотикорезистентности в Санкт-Петербурге [2, 48] и Москве [19, 44]. Кроме того, исследуется эпидемиология механизмов резистентности, в первую очередь характеристики бета-лактамаз [90, 83, 82, 2, 48, 44, 65, 179].

Изучение серотипового пейзажа пневмококков в России проводилось с конца 1980-х гг. [32] и получило новый импульс накануне включения вакцинации ПКВ в Национальный календарь иммунизации. Был проведен ряд многоцентровых исследований, которые показали серологические особенности инвазивных изолятов пневмококков и штаммов, выделенных от носителей [11, 17, 35, 50].

Анализ резистентности стрептококков, в первую очередь пневмококков и *S. pyogenes*, стал темой ряда публикаций последнего десятилетия. Полученные данные свидетельствуют о выраженной региональной вариабельности уровня резистентности пневмококков к основным группам антибиотиков, используемых в педиатрической практике, но в целом отмечают неблагоприятную тенденцию нарастания устойчивости и расширения ее географии [7, 26, 33]. Несмотря на то, что *S. pyogenes* сохраняет абсолютную чувствительность к β -лактамам антибиотикам, актуальной проблемой является появление у этого патогена устойчивости к макролидам, которая в некоторых регионах мира превышает 30%. Исследования, проведенные в нашей стране, свидетельствуют об умеренной резистентности *S. pyogenes* к этой группе антибиотиков, однако регистрируется постепенное возрастание доли устойчивых к макролидам изолятов [5, 76, 22].

Методы молекулярной эпидемиологии приобретают все большую значимость для изучения бактериальных популяций. При помощи МЛСТ было показано, что многие из них построены по клональному принципу, и лишь в отдельных, немногочисленных клонах сосредоточивается основное число резистентных изолятов. Это оказалось справедливо для приоритетных патогенов, включая *Enterobacteriaceae spp.*, *A. baumannii*, *P. aeruginosa* и *S. pneumoniae*, а распространение некоторых успешных клонов с МЛУ-фенотипом носит глобальный характер [383, 246]. В отечественной литературе эта тема получила освещение лишь в редких исследованиях [7, 2, 72, 162].

Цель исследования

Цель исследования – дать микробиологическую и молекулярно-генетическую характеристику внебольничных и госпитальных штаммов условно-патогенных бактерий, выделенных у детей, определить механизмы устойчивости к антибиотикам в этой группе микробов для обеспечения рационального применения антимикробных препаратов в педиатрической практике.

Задачи исследования:

1. Охарактеризовать микробиоту клинически значимых локусов у детей, находящихся в реанимационных отделениях, и оценить ее динамику.
2. Дать характеристику антибиотикочувствительности госпитальных изолятов *A. baumannii*, *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa*.
3. Описать клональное разнообразие и молекулярно-генетические механизмы устойчивости к карбапенемам у карбапенемрезистентных изолятов *A. baumannii*, *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa*.
4. Определить спектр серотипов носоглоточных изолятов *S. pneumoniae*, выделенных у детей, и описать его динамику.
5. Оценить профиль чувствительности к антибиотикам и его динамику у изолятов *S. pneumoniae* и *S. pyogenes*.
6. Описать клональную эволюцию *S. pneumoniae* серотипов 14 и 19А в призме их чувствительности к антибиотикам.

Научная новизна

Определена динамика колонизации слизистых оболочек респираторного тракта у детей, находящихся на искусственной вентиляции легких. Впервые показано, что грамотрицательная госпитальная микробиота быстро колонизирует

поступающих в ОРИТ пациентов и отличается высокой резистентностью к основным антибактериальным препаратам, в том числе карбапенемам. Доминирующими представителями микробиоты, выделенными из трахеального аспирата, были *A. baumannii*, *K. pneumoniae* и *P. aeruginosa*.

Впервые установлены доминантные клоны карбапенемрезистентных (карба-Р) *A. baumannii*, включавшие распространенный по всему миру CC92^{Oxf}/CC2^{Pas} и CC944^{Oxf}/ST78^{Pas}, который может оказаться эндемичным не только для московского региона, но и для России в целом.

Впервые исследован биопленочный рост карба-Р *A. baumannii*. Было показано, что биопленочный потенциал выше у изолятов CC92^{Oxf} по сравнению с CC944^{Oxf} и другими клонами: высокой способностью к образованию биопленок обладало 95% исследованных представителей CC92^{Oxf}.

Получены новые данные о распространенности β-лактамаз у карба-Р изолятов *A. baumannii*. Установлено, что 82% изолятов являлись носителями карбапенемазы OXA-72, а 15% изолятов – карбапенемазы OXA-23. В популяции *A. baumannii* клона CC944^{Oxf} наряду с OXA-23-позитивными изолятами показано наличие носителей OXA-72. Выявлено, что все CC944^{Oxf}-изоляты *A. baumannii*, за исключением одного, обладали геном БЛРС *bla*_{CTX-M-115}.

Впервые проанализировано клональное разнообразие карба-Р изолятов *K. pneumoniae*. Установлено, что среди них доминировали два сиквенс-типа – ST395 (37%) и ST307 (24%), а основным механизмом устойчивости к карбапенемам была продукция карбапенемазы OXA-48, которая в большинстве случаев сочеталась с наличием БЛРС.

Дополнены данные о популяционной структуре карба-Р *P. aeruginosa*. Выявлено преобладание трех генотипов из числа международных клонов высокого риска – ST654 (30%), ST235 (23%) и ST111 (13%). Более 50% карба-Р *P. aeruginosa* продуцировали VIM-подобную МБЛ.

На основе ретроспективного когортного исследования впервые была описана динамика серотипового состава и профиля чувствительности к антибиотикам носоглоточных изолятов *S. pneumoniae*. Впервые в России была

полностью расшифрована композиция серотипов серогруппы 6; было показано, что наряду с распространенными серотипами 6А и 6В в циркуляции присутствовали серотипы 6С (1,3%) и 6D (0,9%), не входящие в состав ПКВ13.

Получены новые сведения о молекулярных механизмах, определяющих рост резистентности *S. pneumoniae* и *S. pyogenes* к макролидам. Показано увеличение распространенности *ermB*-механизма устойчивости, придающего бактериям MLS_B-фенотип, т.е. перекрестную устойчивость к макролидам, линкозамидам и стрептограмину В.

Впервые получены данные о составе и эволюции клонального спектра изолятов *S. pneumoniae* серотипов 14 и 19А. Установлена связь между ростом резистентности пневмококков серотипа 14 к пенициллину и макролидам с клональными перестановками в циркулирующей популяции этих бактерий.

В международных базах данных МЛСТ *A. baumannii*, *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa* и *S. pneumoniae* аннотированы 43 новых сиквенс-типа и 14 новых аллелей генов «домашнего хозяйства» (Таблица 1).

Таблица 1

Новые сиквенс-типы и аллели в международных базах данных МЛСТ для штаммов *A. baumannii*, *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa*, *S. pneumoniae*

Патоген	ST	Ген (аллель)	№ аллели	Ссылка
<i>P. aeruginosa</i>	2592	<i>aroE</i>	219	[310]
	2757	<i>aroE</i>	226	
<i>A. baumannii</i>	1127	<i>gdhB</i>	118	[93]
	1128	<i>gpi</i>	260	
	1130	<i>rec</i>	103	
	1131	<i>rpoD</i>	107	
	1132		108	
	1129		106	

Патоген	ST	Ген (аллель)	№ аллели	Ссылка
<i>K. pneumoniae</i>	3024	<i>rpoB</i>	159	[233]
<i>S. pneumoniae</i>	12624	<i>spi</i>	519	[278]
	13665		574	
	12635	<i>aro</i>	376	
	12636		377	
	12631	<i>xpt</i>	684	
	13662		822	
	12621	<i>rec</i>	334	
	12618	<i>gki</i>	516	
	12621		519	
	12634		523	
	12622		528	
	12630	<i>gdh</i>	512	
	12632	<i>ddl</i>	741	
	12630		742	
	12931		809	
	12930		810	
	13663		850	
	13664		851	
	12619	Новые комбинации известных аллелей		
	12620			
12623				
12625				
12626				
12627				
12629				
12633				
12637				
12638				
13658				
13659				
13660				
13661				
13687				
13688				

Теоретическая и практическая значимость работы

Выявленные особенности микробиоты и знания о распространенности устойчивых к антибиотикам госпитальных изолятов грамотрицательных бактерий в педиатрических стационарах позволяют уточнить спектр препаратов, используемых для эмпирической антимикробной терапии, и будут способствовать повышению ее эффективности. Данные о динамике колонизации обосновывают внедрение мер инфекционного контроля при госпитализации пациентов в ОРИТ.

Полученные данные о генетических механизмах устойчивости к антибиотикам у ведущих госпитальных оппортунистических патогенов в педиатрических стационарах вносят фундаментальный вклад в понимание природы резистентности грамотрицательных бактерий, а также обосновывают значимость использования молекулярных методов для ее детекции.

Исследование популяционной структуры генотипов карба-Р изолятов основных возбудителей ИСМП при помощи метода МЛСТ позволило установить их взаимосвязь с международными клонами высокого эпидемического риска, а также выявить эндемичные клоны.

Сведения о современном спектре серотипов *S. pneumoniae* свидетельствуют о его высоком охвате существующими ПКВ, что позволяет прогнозировать эффективность серотипспецифической вакцинации.

Полученные данные о разнообразии генотипов *S. pneumoniae* и его динамике вскрывают закономерности эволюции генетической структуры пневмококковой популяции и указывают на то, что одним из важных факторов этой эволюции является устойчивость к антибиотикам.

Наращение устойчивости *S. pneumoniae* к пенициллину и макролидам обосновывает необходимость динамического наблюдения за их популяцией. Доминирующий механизм резистентности *S. pneumoniae* и *S. pyogenes* к макролидам, а именно *ermB*-опосредованное метилирование мишени антибиотика, предопределяет перекрестную устойчивость ко всем макролидам, в том числе 16-членным, линкозамидам и стрептограмину В, что не позволяет

рекомендовать указанные группы антибиотиков для эмпирической терапии инфекций в детской популяции. Сохранение на высоком уровне активности амоксициллина в отношении *S. pneumoniae* подтверждает обоснованность выбора данного препарата и его модификаций в качестве основы эмпирической терапии острых респираторных инфекций бактериальной этиологии в педиатрии.

По результатам исследования в международные базы данных внесены сведения о новых вариантах генотипов бактерий *A. baumannii*, *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa* и *S. pneumoniae*, которые будут способствовать осуществлению мониторинга за циркуляцией актуальных бактериальных возбудителей.

Результаты исследований и разработок внедрены в научно-исследовательскую работу лаборатории молекулярной генетики и клеточной биологии и лаборатории микробиологии ФГАУ «НМИЦ здоровья детей» Минздрава России, а также в материалы лекций по рациональной антибактериальной терапии у детей, и используются в учебной программе на кафедре педиатрии в ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет).

Методология и методы исследования

Методология настоящего исследования спланирована согласно поставленной цели. Предметом исследования стали проблемы, связанные с увеличением антибиотикоустойчивости клинических штаммов *A. baumannii*, *P. aeruginosa* и *K. pneumoniae*, выделенных у детей. Кроме того, были проанализированы серотипы и профиль чувствительности к антибиотикам штаммов *S. pneumoniae* и *S. pyogenes*, выделенных у детей в г. Москве.

Анализ научной литературы, посвященной проблеме, проведен на основе формально-логических методов исследования. Планирование и проведение исследований, направленных на решение поставленных задач, осуществлялось на основе общенаучных и специфических методов.

Положения, выносимые на защиту

1. В педиатрических ОРИТ выявлено преобладание грамотрицательных возбудителей *A. baumannii*, *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae*.
2. Устойчивость к карбапенемам грамотрицательных бактерий преимущественно обусловлена выработкой карбапенемаз: *A. baumannii* – продукция OXA-72, OXA-23, *P. aeruginosa* – VIM, *K. pneumoniae* – OXA-48.
3. Подавляющее большинство изолятов *A. baumannii* принадлежит к двум клональным линиям, CC92^{Oxf}/CC2^{Pas} и CC944^{Oxf}/ST78^{Pas}, представленным 14 различными Oxford-сиквенс-типами.
4. В популяционной структуре карба-Р изолятов *P. aeruginosa* лидировали представители пяти сиквенс-типов: ST111, ST235, ST446, ST654 и ST2592, которые суммарно составляли 78%.
5. Шесть ведущих педиатрических серотипов *S. pneumoniae*, включая серотипы 3, 6А, 6В, 14, 19F и 23F, суммарно составили 63%. Множественной устойчивостью к антибиотикам обладают 23% циркулирующих в Москве штаммов *S. pneumoniae*. Основная доля резистентных изолятов приходилась на пневмококки пяти наиболее распространенных серотипов (6А, 6В, 14, 19F и 23F) и серотипа 19А.
6. В последние годы произошло нарастание устойчивости стрептококков к макролидам: *S. pneumoniae* до 35-45%, *S. pyogenes* до 15%.

Личное участие автора в получении результатов

Личное участие соискателя в получении результатов, изложенных в диссертации, заключалось в проведении микробиологической части исследования (культуральный посев, идентификация микроорганизмов, определение резистентности к антибиотикам диско-диффузионным методом и методом Е-тестов, определение минимальных подавляющих концентраций меропенема и имипенема, фенотипические методы определения МБЛ у грамотрицательных

бактерий и MLSв-фенотип у стрептококков) в лаборатории микробиологии ФГАУ «НМИЦ здоровья детей» Минздрава России.

Молекулярно-генетическая часть исследования (выделение ДНК, постановка ПЦР, учет и интерпретация результатов ПЦР) осуществлялось автором совместно со старшим научным сотрудником к.м.н. Алябьевой Н.М. в лаборатории экспериментальной иммунологии и вирусологии ФГАУ «НМИЦ здоровья детей» Минздрава России. Секвенирование культур *A. baumannii*, *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae*, *S. pneumoniae* проводилось совместно с к.б.н. Пушковым А.А. в лаборатории молекулярной генетики и клеточной биологии ФГАУ «НМИЦ здоровья детей» Минздрава России. Выявление генов карбапенемаз проводилось совместно с к.б.н. Савиновой Т.А. (лаборатория молекулярной микробиологии ФГАУ «НМИЦ здоровья детей» Минздрава России). Биоинформатическая обработка результатов (генетических исследований) проводилась совместно с Маянским Н.А. (ФГАУ «НМИЦ здоровья детей» Минздрава России), Карасевой О.В. («НИИ неотложной детской хирургии и травматологии» Департамента здравоохранения города Москвы).

Внедрение результатов в практику

Результаты исследований в качестве диагностических технологий внедрены в практическую работу подразделений ФГАУ «НМИЦ здоровья детей» Минздрава России, «НИИ неотложной детской хирургии и травматологии» Департамента здравоохранения города Москвы, ГБУЗ «Городская клиническая больница № 15 им. О.М. Филатова» Департамента здравоохранения города Москвы.

Степень достоверности и апробация результатов исследования

О достоверности результатов работы свидетельствует использование сертифицированных микробиологических методов, которые характеризуются высокой чувствительностью и специфичностью. Проведен достаточный объем исследований, что позволило корректно осуществить статистическую обработку полученных данных. Комплексное молекулярно-генетическое определение генов β -лактамаз позволило получить сопоставимые результаты с традиционными микробиологическими методами оценки чувствительности, что свидетельствует о достоверности полученных результатов.

Диссертация апробирована на заседании лабораторного отдела НИИ педиатрии ФГАУ «НМИЦ здоровья детей» Минздрава России (протокол № 4 от 22.12.2017г.).

Материалы диссертации были доложены и обсуждены на XVII, XVIII, XIX Конгрессе педиатров России, Москва, 2014, 2015, 2016; на XVI, XVII, XVIII, XIX, XX Международных конгрессах по антимикробной терапии МАКМАХ/ESCMID, Москва, 2014, 2015, 2016, 2017; на 26 (Амстердам, 2016), 27 (Вена, 2017), 28 (Мадрид, 2018) Европейском конгрессе по клинической микробиологии и инфекционным заболеваниям (ECCMID); на XIX, XX Кашкинских чтениях, Санкт-Петербург, 2016, 2017.

Соответствие диссертации паспорту научной специальности

Научные положения диссертации соответствуют формуле специальности 03.02.03 – «микробиология», области исследований «Морфология, физиология, биохимия и генетика микроорганизмов».

Публикации

Результаты проведенного диссертационного исследования в полном объеме изложены в 22 научных работах, из которых 18 оригинальные статьи и четыре обзора литературы. В журналах из перечня рецензируемых научных изданий ВАК опубликовано 16 работ. В журналах реферируемых РИНЦ опубликовано 15 работ (11 оригинальные статьи и четыре обзора литературы). В журналах реферируемых базой данных Scopus и/или Web of Science 14 работ (12 оригинальных статей и два обзора литературы).

Объем и структура диссертации

Диссертация изложена на 233 страницах машинописного текста и состоит из введения, основной части (обзора литературы, описания материалов и методов исследования и 7 глав, отражающих результаты собственных исследований), заключения, выводов, практических рекомендаций, описания перспектив дальнейшей разработки темы, списка сокращений и условных обозначений, списка литературы. Диссертация иллюстрирована 40 таблицами и 12 рисунками. Библиографический указатель включает 391 источник литературы, в том числе 91 ссылка на отечественных авторов и 300 ссылок на зарубежных авторов.

ОСНОВНАЯ ЧАСТЬ

Глава 1. Обзор литературы

1.1. Возбудители инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи

ИСМП и проблема рациональной антимикробной терапии инфекционных осложнений приобрели особую значимость и актуальность в современной медицине. Около 20% всех ИСМП приходится на пациентов, находящихся в ОРИТ, они могут быть как основной причиной госпитализации пациентов, так и осложнять течение других заболеваний. Обычно развитие ИСМП сопровождается ухудшением состояния пациента, появлением признаков воспаления и интоксикации. Генерализационная ИСМП может не иметь яркой клинической картины, поэтому крайне важным является установление очага и выделение из него возбудителя [13]. Американское общество по инфекционным заболеваниям объединило бактерии, занимающие лидирующие позиции по частоте встречаемости и устойчивости к антибиотикам, в группу ESKAPE. К данной группе относятся такие микроорганизмы, как *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* и *Enterobacter spp* [296]. В России, согласно данным многоцентрового исследования МАРАФОН в 2011-2012 гг., доля изолятов *A. baumannii* в структуре возбудителей нозокомиальных инфекций составила 13,9%, *P. aeruginosa* – 20%, *K. pneumoniae* – 17% [81]. В другом российском исследовании, проведенном в 2004 – 2006 гг., среди возбудителей вентилятор-ассоциированной пневмонии в ОРИТ доминировали *K. pneumoniae* (19%), *P. aeruginosa* (15%) и *Acinetobacter spp* (12%) [83]. Учитывая литературные данные о распространенности микроорганизмов в ОРИТ и устойчивости к АМП, в нашей работе для более глубокого исследования мы остановились на грамотрицательных бактериях: *A. baumannii*, *P. aeruginosa* и *K. pneumoniae*.

Пациенты с черепно-мозговой травмой (ЧМТ), находящиеся на искусственной вентиляции легких (ИВЛ), являются группой повышенного риска по развитию ИСМП. Наиболее часто этиологическими агентами внутрибольничных пневмоний у детей с ЧМТ в ОРИТ является микробиота, колонизирующая слизистые оболочки верхних дыхательных путей.

Заболеваемость септическими состояниями: сепсисом, тяжелым сепсисом и септическим шоком – в последние годы, в развитых странах колеблется в диапазоне от 240 до 300 случаев на 100 000 населения в год [336]. Даже в условиях лечения в ОРИТ летальность при сепсисе составляет 17,9%, при тяжелом сепсисе – от 28,6 до 50% [336, 263, 382]. Количество зарегистрированных случаев сепсиса ежегодно увеличивается – в начале XXI века прирост в США составлял 1,5% в год [101, 195]. Эффективность лечения септических состояний во многом обусловлена быстрой и правильной диагностикой. Важнейшей составляющей в постановке диагноза является микробиологическое подтверждение, которое заключается в обнаружении и идентификации жизнеспособных микробов в крови [105, 131, 224]. Однако бактериемия и сепсис – это разные понятия. Бактериемия – микробиологический термин, т.е. обнаружение микроорганизма в образце крови при посеве. Сепсис – клиническое понятие (системная воспалительная реакция в ответ на инфекцию) [272].

Рост микроорганизмов из гемокультур не всегда свидетельствует о сепсисе, системной или локальной инфекции. Наличие микроорганизмов может быть связано с контаминацией материала при заборе крови [109]. При постоянном эпидемиологическом контроле доля ложноположительных образцов гемокультур не должна превышать 3% [286]. Контаминация образцов крови является следствием неправильной обработки рук персонала, кожи пациента, а также может быть связана с загрязнением воздуха в помещении, в котором проводится забор крови. Образцы крови, полученные из сосудистых катетеров, контаминированы гораздо чаще, чем образцы, полученные из вены. Необходимо,

чтобы бактериологический результат совпадал с клиническими данными конкретного пациента [10].

Инфекции, связанные с постановкой центральных катетеров в США составляют 11% всех нозокомиальных инфекций [92] и стоят на третьем месте после пневмонии и инфекций брюшной полости [368]. Летальность от катетер-ассоциированных инфекций составляет до 25% всех летальных случаев при внутрибольничной инфекции. Финансовые затраты на один случай катетер-ассоциированной инфекции в детском ОРИТ составляет около 49 000 долларов [214].

Наиболее частыми микроорганизмами при контаминации гемокультур являются кожные стафилококки. Нередко их рост из образцов крови считают истиной бактериемией, что приводит к необоснованному лечению антибиотиками.

Таким образом, бактериологическое подтверждение истиной bacteriemia следует считать достоверным при соблюдении следующих условий: 1) из положительной гемокультуры выделен микроорганизм, который имеет высокую степень приоритета (НГОб, золотистый стафилококк и другие); 2) если позволяет возраст и состояние пациента, сделать дополнительный посев крови в течение 24 часов, если при первичном высеве были выделены сапрофиты кожных покровов, окружающей среды [269].

1.1.1. *Acinetobacter baumannii*

Представители рода *Acinetobacter* входят в число наиболее актуальных возбудителей в клинике оппортунистических инфекций. Группа бактерий, к которой относится ацинетобактер, была впервые изолирована из образцов почвы в 1911 г. Мартином Бейеринком, который полагал, что работает с конкретным видом и дал выделенному изоляту название *Micrococcus calcoaceticus*. Родовой термин «ацинетобактер» был предложен в 1954 г., когда Брисо и Прево отделили «вид» *M. calcoaceticus* от рода *Achromobacter*. В 1968 г. более 100 штаммов,

принадлежащих к *Alcaligenes hemolysans*, *Mima polymorpha*, *Moraxella lwoffii*, *Herellea vaginicola*, *Bacterium anitratum*, были объединены в 2 вида рода *Acinetobacter*: *A. lwoffii* и *A. hemolysans*. Позднее *Bacterium anitratum* была переименована в *A. calcoaceticus*, еще позднее были идентифицированы актуальный для медицины *A. baumannii*, а также *A. jhonsonii*, *A. junii* и другие виды. Следует отметить, что изучение видов ацинетобактерий долгое время происходило вне связи с их клиническим значением, потому что они вызывали нечастые случаи заболеваний у тяжелобольных пациентов и характеризовались приемлемой чувствительностью к антибиотикам. Первые обзорные публикации о них как о серьезных патогенах появились лишь в 60–70-х гг. XX в. Однако и после этого патогенность ацинетобактерий некоторое время игнорировалась медицинским сообществом, хотя уже в 90-х годах появились сведения о том, что ацинетобактер в некоторых регионах входит в пятерку лидирующих оппортунистов [100].

Естественным резервуаром и источником инфекции являются почва и природные водоемы, с которыми чаще сопряжено инфицирование раневой поверхности. В госпитальных условиях ацинетобактерии могут быть обнаружены на кухонных принадлежностях, в системах вентиляции и увлажнения, на различном медицинском оборудовании, включая контуры аппаратов искусственной вентиляции легких, в канализационных конструкциях, на инструментах для уборки помещений (швабры и т.д.), в земле комнатных растений. Ацинетобактерии были обнаружены на коже рук персонала, клавиатурах компьютеров и медицинской аппаратуры, дверных ручках, шторах и подушках [115, 379, 376]. Следовательно, в медицинских учреждениях резервуаром и источником инфекции являются инфицированные и/или колонизированные пациенты и медицинский персонал, а также бытовое и специальное оборудование.

В первое десятилетие 2000-х гг. ацинетобактерии стали причиной от 1 до 3% госпитальных инфекций [325]. Данные российских исследователей (РНЦХ им. Б.В. Петровского) говорят о том, что в 2012 г. Доля *Acinetobacter spp.* среди всех

возбудителей, послуживших причиной постоперационных инфекционно-воспалительных осложнений, составила 3,4% [20]. Статистика отделений реанимации и интенсивной терапии более негативна: только *A. baumannii* вызывает от 2 до 10% инфекций в отделениях реанимации и интенсивной терапии [325]. Данные детского ожогового отделения (ОДКБ г. Екатеринбурга) свидетельствуют о том, что 23% гнойных осложнений ожоговых ран, 58% случаев поствентиляционного трахеобронхита и 30,5% сепсиса обусловлены представителями рода *Acinetobacter* [6].

Наиболее часто развитие ацинетобактериальных инфекций человека связано с видом *A. baumannii*. Клинически актуальными являются также виды *A. calcoaceticus*, *A. lwoffii*, *A. baylyi*, *A. haemolyticus*, *A. junii*, *A. nosocomialis*.

К 2005 г. благодаря успехам мультилокусного сиквенстипирования было доказано, что главными эпидемическими линиями *A. baumannii* (они получили название всемирных эпидемических клонов) являются 3 клональные комплекса (международные клоны IC1, IC2 и IC3), которые отвечают за большинство госпитальных случаев ацинетобактериальных инфекций [283, 359].

Анализ, основанный на современных данных мультилокусного сиквенстипирования и проведенный при помощи программы eBURST, позволил идентифицировать 21 клональный комплекс [391]. Современные клональные линии отличаются антибиотикорезистентностью к клинически важным антимикробным препаратам, способностью колонизировать кожу, слизистые оболочки, размножаться в организме человека, а также выживать на поверхности бытовых и специальных устройств в госпитальных условиях. Число локальных клональных комплексов увеличивается ежегодно.

Особое значение для стойкого выживания в организме (даже в условиях антибиотикотерапии) имеет способность клинических штаммов ацинетобактерий формировать биопленки [324]. Биопленкообразование находится под контролем внешних и внутренних управляющих параметров. Ионы кальция и железа усиливают его. Продукция сериновых протеиназ негативно коррелирует с биопленкообразованием [230]. Пили являются основным адгезином,

участвующим в закреплении клеток ацинетобактерий в процессе образования биопленки [350]. Именно поэтому для успешного биопленочного процесса на абиотической поверхности (показано на модели *A. baumannii*) необходима активность элементов генетического комплекса CsuA/BAABCDE, контролирующих шаперон-ашерный механизм сборки пилей [268].

Другими адгезивными молекулами, обеспечивающими закрепление ацинетобактерий в биопленках, являются белок OmpA и гомологи стафилококковых белков Bap (от англ. biofilm-associated proteins – белки, ассоциированные с биопленками) [129].

Однако следует учитывать, что не все клинические изоляты ацинетобактерий способны к формированию биопленок. Так, в работе J. Rodriguez-Vasco и соавт. было установлено, что лишь около 60% штаммов, выделенных от пациентов госпиталя в Барселоне (Испания), могли формировать биопленки [324]. Гены, контролирующие вирулентность, объединены в геноме в т.н. островки патогенности. Статистически доказана возможность существования 6 таких островков, предсказана возможность существования еще 21 кластера, объединяющих гены вирулентности в разных сочетаниях [339].

В последнее десятилетие нозокомиальные инфекции, связанные с *A. baumannii*, стали серьезной проблемой для здравоохранения во многих странах. Этот оппортунистический патоген может вызывать бактериемию, поражать мочевой тракт и дыхательные пути, становясь причиной серьезных осложнений и повышая уровень заболеваемости и смертности [146, 368, 128, 159, 279, 308, 365]. Кроме того, *A. baumannii* может вызывать вспышки госпитальных инфекций с тяжелыми последствиями [177, 251]. Способность возбудителя приобретать устойчивость к различным группам антимикробных препаратов подчеркивает его клиническое значение [147, 305]. Распространение карбапенемнечувствительных (карба-Р) *A. baumannii* с МЛУ, значительно ограничивает выбор эффективной антимикробной терапии, особенно среди пациентов, находящихся в ОРИТ [279, 177].

Как указывалось выше ценным методом изучения молекулярной эпидемиологии *A. baumannii* служит МЛСТ. Большинство карба-Р изолятов *A. baumannii* относятся к нескольким международным клонам (ICs), которые распространены по всему миру [227, 391]. Две существующие схемы МЛСТ *A. baumannii*, Oxford (Oxf) и Pasteur (Pas), дают сходные результаты типирования [93], хотя есть сообщения о более высокой разрешающей способности схемы Oxford [351]. Кроме того, для определения принадлежности *A. baumannii* к ICs был разработан удобный метод на основе ПЦР [227, 391].

Литературные данные указывают на взаимосвязь между генотипом и клинически значимыми свойствами возбудителя, включая колонизационный и инвазивный потенциал, а также формирование биопленок [189, 252]. Способность образовывать биопленки считают одним из главных факторов вирулентности *A. baumannii*, который способствует распространению и персистенции этого патогена во внутрибольничной среде [252]. Таким образом, мониторинг циркулирующих генотипов *A. baumannii* играет важную роль в изучении локальной эпидемиологии, а также позволяет сопоставлять местные данные с глобальными трендами.

По данным многоцентрового эпидемиологического исследования МАРАФОН, в России частота встречаемости *A. baumannii* среди возбудителей нозокомиальных инфекций возросла с 10,2% в 2002-2004 до 13,9% в 2011-2012 [81]. Однако особую тревогу вызывает более чем двукратный рост доли изолятов резистентных к карбапенемам за этот период времени, которая достигла 67,5%. Молекулярная эпидемиология *A. baumannii* в России остается недостаточно изученной; небольшое число имеющихся работ описывает единичные изоляты [280, 340, 298].

1.1.2. *Klebsiella pneumoniae*

Одним из самых известных представителей семейства *Enterobacteriaceae* является *K. pneumoniae*, которая находится в числе наиболее актуальных возбудителей ИСМП [296]. По частоте встречаемости в российских стационарах клебсиеллы занимают третье место – 17,8% - 43,6% [70, 82].

K. pneumoniae была описана в 1875 г. Э. Клебсом. Относится к семейству *Enterobacteriaceae*, в которое входит более 20 родов. Клебсиеллы представляют собой короткие толстые грамотрицательные палочки, неподвижные, не образуют спор, имеют полисахаридную капсулу. Являются факультативными анаэробами, растут на простых питательных средах [25, 47]. *K. pneumoniae* является условно-патогенным микроорганизмом, колонизируя кишечник, может стать причиной различных воспалительных процессов, таких как пневмония, гнойно-септические заболевания, септицемия, менингит и др., преимущественно на фоне снижения иммунитета [47, 303].

Клебсиеллы имеют несколько факторов патогенности: продукция термостабильного и термолабильного энтеротоксина, способность к адгезии (обладают пиллями 3 типов), выработка ферментов (нейраминидаза, ДНКаза, фосфатаза). *K. pneumoniae* обладает О-липополисахаридом и К- антигенами (капсульные полисахариды) [25, 303]. Капсула клебсиелл обладает антифагоцитарными свойствами, сформирована двумя слоями полисахаридных волокон и образует во внутреннем слое плотные толстые пучки перпендикулярные наружной мембране [296].

Одним из наиболее распространенных механизмов приобретения устойчивости *K. pneumoniae* к цефалоспорином является продукция БЛРС. Наиболее часто встречающимся, эпидемически распространившимся по всему миру, стал СТХ-М-тип БЛРС [65]. В России штаммы энтеробактерий, продуцирующие БЛРС, впервые были описаны в 1997 – 1998 гг. Эйдельштейном М.В. и соавт. [163]. Ген СТХ-М был обнаружен в 34,9% случаев, среди 60,8% БЛРС-положительных штаммов *K. pneumoniae*. В 2004 г., Сидоренко С.В. с соавт.

опубликовали данные о продуцентах БЛРС семейства *Enterobacteriaceae*, выделенных в 2002 – 2003 гг., в работе было показано, что в одном штамме могут сочетаться одновременно β -лактамазы разных типов (СТХ-М, TEM и SHV) и что их число выросло до 51,2%. [75]. В работе Прячук С.Д. в 2010 году был показан рост числа штаммов, продуцирующих СТХ-М, до 90%, и показано увеличение доли штаммов, несущих несколько генов БЛРС [65]. По данным исследования SMART (2008-2010), в Северной Америке при интраабдоминальной инфекции у детей 25% *K. pneumoniae* были БЛРС-позитивными, а ген СТХ-М обнаружен в 74% случаев, также встречались комбинации разных генов БЛРС [254]. Описаны случаи распространения БЛРС-носительства в семьях. [102].

Нахождение в ОРИТ является основным фактором колонизации БЛРС-позитивными *K. pneumoniae* у детей [288]. По результатам исследований, проводившихся в Германии, было показано, что если мамы являлись носителями микроорганизмов с БЛРС, то риск колонизации их детей возрастал в шесть раз [254]. Многоцентровое исследование французских ученых, проведенное в 1999 – 2003 гг., впервые показало появление БЛРС-продуцирующих энтеробактерий у детей. У штаммов *K. pneumoniae* тест на БЛРС был положительный в 23,2%. В 2004 году результаты исследования SENTRY показали рост числа БЛРС-продуцентов среди штаммов клебсиелл до 24,7%. Имеются данные о молекулярной эпидемиологии БЛРС в Венгрии, где в начале 2000-х годов самой распространенной БЛРС у *K. pneumoniae* был SHV-5-тип, а в Польше в 2009 г 90% продуцентов БЛРС были носителями гена *bla*_{СТХ-М}.

Наиболее значимыми карбапенемазами у *K. pneumoniae* в стационарах считают ферменты молекулярных классов А – КРС-группу, В (МБЛ) – VIM, IMP, NDM и D – OXA-48. КРС β -лактамаза подавляет активность АМП широкого спектра: пенициллины, цефалоспорины, азтреонам и карбапенемы. Первая вспышка КРС-продуцентов *K. pneumoniae* произошла в США в начале 21 века в штате Нью-Йорк [358]. Позднее продуценты КРС появились в других штатах, а так же в Латинской Америке, Израиле, Китае, Греции [187]. Определение генотипа штаммов-носителей КРС показало, что, большинство изолятов

принадлежало к ST258. VIM-продуцирующая *K. pneumoniae* впервые была описана в начале 2000-х годов в Северной Европе [95, 184]. Такой тип карбапенемазы среди *K. pneumoniae* встречается редко, отдельными вспышками и в определенном стационаре. IMP-продуцирующие изоляты *K. pneumoniae* впервые были выявлены в Японии в 1990-х годах, где они встречаются часто и сегодня. В других странах такие штаммы встречаются крайне редко. Очагом появления и распространения NDM-продуцирующих изолятов является Индия, где колонизация этими штаммами происходит у человека и в окружающей среде. В Северной Америке, Австралии и Европе и также были зарегистрированы случаи выявления NDM-продуцентов *K. pneumoniae*, но они достаточно редки [107].

Наиболее распространены OXA-48-продуцирующие *K. pneumoniae*. Изначально β -лактамазы семейства OXA (OXA-23, OXA-24/40, OXA-58) встречались у ацинетобактерий и обладали слабой карбапенемазной активностью. Штамм *K. pneumoniae* с β -лактамазой OXA-48 был выявлен впервые в 2001 году. Этот штамм характеризовался высоким уровнем карбапенемазной активности. Гидролитическая активность OXA-48 в отношении имипенема у клебсиелл примерно в 10 раз выше по сравнению с таковыми у ацинетобактерий [358]. Оказалось, что механизм гидролиза OXA-48 отличается от других групп семейства OXA. Карбапенемаза OXA-48 осуществляет гидролиз АМП за счет вращения карбапенем-альфа-гидрокси группы вокруг активного центра, что позволяет вращать деацилированную воду по отношению к ациллированному остатку серина. Таким образом, продуцирующие OXA-48 штаммы *K. pneumoniae* показывают высокие значения МПК в отношении карбапенемов [218, 228, 358]. В Европе OXA48-позитивный мультирезистентный штамм *K. pneumoniae* впервые был выделен во Франции. У данного штамма кроме карбапенемаз, обнаружен ген БЛРС (*bla_{CTX-M-15}*), это свидетельствует о комбинированном механизме резистентности [274].

В 2013 году в России были описаны высокорезистентные штаммы *K. pneumoniae*, которые характеризовались высокими значения МПК для большинства АМП: цефалоспоринов, карбапенемов, аминогликозидов,

азтреонама, и только для для тигециклина и полимиксина В сохранялась чувствительность [4]. У данных изолятов были обнаружены карбапенемазы типа KPC-2 и NDM-1.

Данные многоцентрового эпидемиологического исследования МАРАФОН в 2013-2014 гг. показали, что в России доля нечувствительных штаммов *K. pneumoniae* к меропенему, дорипенему, имипенему и эртапенему составила 12,4%, 14,1%, 12,6% и 31,1%, соответственно. Продукция карбапенемаз групп OXA-48, NDM, VIM и KPC выявлена у 14,5% изолятов *K. pneumoniae*, а у 4,6% карбапенемазопродуцирующих штаммов выявлена сочетанная продукция карбапенемаз групп OXA-48 и NDM. По сравнению более ранними исследованиями МАРАФОН отмечено существенное увеличение частоты устойчивых к карбапенемам и продукции карбапенемаз [82].

В 2005 году произошло первое обнаружение фермента KPC-типа во Франции, а первая вспышка произошла в Израиле [328]. На сегодняшний день, KPC-ферменты эндемичны для Израиля и Греции, и широко распространены по всему миру [96]. Kitchel et al. в 2009, проанализировали изоляты музея CDC (<http://www.cdc.gov/>), за период 1996 – 2008 год показал, что около 70% изолятов относятся к сиквенс-типу 258 (ST258) [232]. Большинство изолятов ST258 продуцируют ферменты KPC-3, а другие сиквенс-типы чаще имеют альтернативные варианты гена.

Штаммы *K. pneumoniae* ST258, относящиеся к генетической линии с глобальным распространением карбапенемаз типа KPC, а также родственные сиквенс-типы (ST11, ST340, ST512) сыграли ключевую роль в распространении KPC сначала в США, а затем и во многих других странах: Греция, Польша, Израиль, Италия, Великобритания, Испания [232, 187, 188, 184].

МЛСТ-анализ позволяет определить основные клональные группы *K. pneumoniae*, связанные с множественной антибактериальной резистентностью. Клональная группа 258 включает в себя два субкластера: ST11-ST340 и ST258-ST512 [116].

В 2011-2013 гг появились первые сообщения о NDM в России. Так, в Санкт-Петербурге были выявлены множественные случаи инфекций, вызванных *K. pneumoniae* NDM-1, большинство изолятов относилось к ST340 (CC258), но связь с пребыванием пациентов за границей не установлена. В Краснодаре, Смоленске и Москве в 2014-2015 гг были выделены штаммы *K. pneumoniae* резистентные к карбапенемам, но принадлежность данных изолятов к сиквенстипам не была изучена [107, 96].

Таким образом, *K. pneumoniae* является одними из наиболее опасных возбудителей ИСМП и способна быстро формировать устойчивость к АМП. Проблема рациональной антибактериальной терапии ставит вопрос выделения изолятов, обладающих МЛУ, а также определения механизмов резистентности к АМП. Циркуляция подобных штаммов сужает спектр применяемых АМП и несет в себе угрозу повсеместного распространения. Поэтому одним из путей преодоления антибиотикорезистентности и предотвращения распространения подобных изолятов является мониторинг, изучение фенотипических и генотипических свойств микроорганизмов.

1.1.3. *Pseudomonas aeruginosa*

Синегнойная палочка - *Pseudomonas aeruginosa* – входит в группу лидирующих бактерий-оппортунистов, объединенных термином ESKAPE. Начав свое «восхождение» в качестве социально-опасного нозокомиального патогена в 60-80-х годах двадцатого века, синегнойная палочка не теряет своей роли и продолжает прогрессировать в госпитальной патологии двадцать первого века.

Синегнойная палочка поражает разнообразием вызываемой патологии, являясь причиной широкого круга заболеваний - от интоксикаций до обширных гнойно-воспалительных процессов и септического шока. Логично, что внимание, уделяемое синегнойной инфекции научно-медицинским сообществом, в течение многих лет остается высоким: согласно статистике ресурса PubMed в 2017 году проблемам, связанным с *P. aeruginosa*, в мире было посвящено более 3000

научных публикаций. Объем информации о молекулярных механизмах патогенности и антибиотикорезистентности синегнойной палочки расширяется стремительными темпами. На основе этой информации создаются новые способы диагностики синегнойной патологии, разрабатываются методы оценки чувствительности *P. aeruginosa* к антибиотикам.

P. aeruginosa - это аэробные неферментирующие каталазо- и оксидазопозитивные грамотрицательные подвижные психрофильно-мезофильные бактерии-прототрофы, имеющие прямую или слегка изогнутую палочковидную форму с содержанием G + C в ДНК примерно 66,2 - 66,5%. Нуклеоид представлен единичной циркулярной хромосомой. Геном типовых клинических штаммов имеет объем 6,3 - 6,9 МБ и 5500 - 6200 открытых рамок считывания, что примерно соответствует аналогичному количеству генов [237]. *P. aeruginosa* обладает необычно большим количеством регуляторных генов (по сравнению с другими прокариотами) – они составляют примерно 8,4% от общего объема хромосомы генов. Клеточная стенка и липополисахарид (ЛПС) наружной мембраны имеют типовое для грамотрицательных бактерий строение [205]. *P. aeruginosa* не образует спор, формирует полисахаридную капсулу, подвижна, имеет один или два полярно расположенных жгутика. Многие штаммы синегнойной палочки могут образовывать слизь, основой которой является альгинат – гелеобразующий полимер, собранный из β -1,4-связанных мономеров D-маннуроновой и L-гулууроновой кислоты [260]. В состав слизи могут входить рамнолипиды, Pls- и Pel-полисахариды, дериваты клеточной ДНК, протеины [55, 176].

инегнойная палочка продуцирует богатый спектр окрашенных веществ, которые расцениваются как пигменты [357, 374]. Их можно отнести к трем основным химическим группам – производным феназинов (группа пиоцианина), дериватам хинолина, связанным с пептидной и ацильной цепями, (группа пиовердина) и производным гомогентизиновой кислоты (группа пиомеланина). Штаммы, продуцирующие сразу две или три пигмента немногочисленны, большинство изолятов продуцируют лишь одну «любимую» группу пигментов.

Многие штаммы обладают гемолитической активностью, она воспроизводится на 5%-ном кровяном агаре (с эритроцитами барана). Рост синегнойной палочки часто сопровождается специфичным ароматом, который авторы описывали по-разному, сравнивая с запахом винограда, цветущей липы, жасмина и даже гниющей картошки. Вероятно, что различия в оценке ароматов связаны не только с субъективным восприятием исследователей, но и с индивидуальными особенностями штаммов, продуцирующими разные спектры летучих соединений, главными из которых являются 2-аминоацетофенон, 2,4-диметилхиназолин и 4-метилхиназолин [141]. Встречаются штаммы, не синтезирующие пахучие вещества.

Синегнойная палочка характеризуется универсальностью метаболической активности, используя в качестве источников питания широкий спектр веществ - от простых углеводов и тканевых субстанций организма человека до антимикробных препаратов (этакридина лактата, детергентов, фурацилина и даже формальдегида), что обеспечивает ее широкую экологическую пластичность. Парадоксально, что *P. aeruginosa*, являясь строгим аэробом, может расти и размножаться в бескислородных условиях, где конечным акцептором электронов могут служить нитраты. Именно дыхательный метаболизм, ключевую роль в котором играет Fe-содержащая цитохромоксидаза, детерминирует жизненно-важную потребность синегнойной палочки в железе. Поэтому *P. aeruginosa* обладает несколькими системами захвата железа из окружающей среды (сидерофорами), к которым относятся пиовердин, псевдобактин, пиохелин, салициловая кислота [370, 371, 313]. Реализует пептидазную и протеазную активность (в том числе - желатиназную), проявляют липолитическую активность за счет набора ферментов-липаз.

Синегнойная палочка обладает способностью продуцировать необычный для патогенов человека токсин - синильную кислоту (гидроген-цианид), которая синтезируется при окислительном декарбоксилировании глицина при участии фермента *P. aeruginosa* гидрогенцианидсинтазы [380]. Считается, что синильная кислота за счет местной и общей интоксикации усугубляет течение болезни при

хронических пневмониях у больных муковисцидозом, ассоциированных с синегнойной палочкой.

Самой совершенной и сложной стратегией ухода бактерий от иммунной атаки является образование биопленок [46, 87, 88]. Биопленка содержит два обязательных атрибута – скопления клеток и связывающий их внеклеточный (экстрацеллюлярный) матрикс, локализованный на каком-либо разделе сред с разными физико-химическими свойствами. В зависимости от штаммовых особенностей и параметров внешней среды, синегнойная палочка может формировать плоскую (недифференцированную) или структурированную (дифференцированную) биопленку [5].

Однако, не все клинические изоляты *P. aeruginosa* являются биопленочными. В работе Gurung J. et al. (2013) было установлено, что лишь 33% изолятов из отделений интенсивной терапии могли формировать биопленки на сердечно-мозговом бульоне [201]. В другой работе авторы говорят о более высоких цифрах: 83 % клинических штаммов могли формировать биопленки со средней биомассой на среде Лурия-Бертани [327].

Клинические изоляты демонстрирует разные фенотипы, характеристики которых зависят от многих параметров, включая клональную принадлежность штамма, локализацию патологического процесса, проводимую антибактериальную терапию. Например, при муковисцидозных пневмониях преобладают мукоидные штаммы с гиперпродукцией альгината, при девайс-ассоциированных инфекциях чаще регистрируются биопленкообразующие изоляты, слизеобразование для которых не является обязательным признаком. Подобные различия связаны как с селекцией клонов, так и с регуляцией экспрессии тех или иных генов, определяемой местными условиями обитания.

Многие из генов, контролирующих вирулентность, объединены в «генетические островки патогенности». Это означает, что чаще проявление агрессивности происходит по принципу «все или ничего». Либо не экспрессируется ни один из генов, входящих в состав «островка патогенности», и в этом случае синегнойная палочка остается относительно безвредной для

человека, либо экспрессируются все гены «островка». В последнем случае наблюдается одновременная активация многих механизмов, направленных на повреждение тканей человека. Такая организация направлена на экономию «материальных» и «управленческих» ресурсов синегнойной палочки. Дикие штаммы *синегнойной палочки* отличаются от более вирулентных клинических изолятов не только по количеству «островков патогенности», но и по качественному составу «островков» [244].

В развитии синегнойной патологии играют роль четыре группы механизмов: 1) деструкция тканей, осуществляемая за счет субстанций, продуцируемых синегнойной палочкой; 2) аутоповреждение тканей эффекторами организма хозяина при развитии гипервоспаления; 3) интоксикация; 4) механизмы персистенции, поддерживающие существование резервуара инфекции в организме и направленные на пролонгацию инфекционного процесса. В зависимости от штаммовых особенностей синегнойной палочки и индивидуального статуса резистентности человека, реализуются различные сочетания перечисленных механизмов.

Однако, организм человека не беззащитен перед синегнойной патологией. Главное свидетельство этого - благополучное существование всех иммунокомпетентных людей, постоянно контактирующих с дикими и симбионтными штаммами *P. aeruginosa*. Защита выстраивается по нескольким направлениям: 1) барьерные функции кожи и слизистых; 2) киллинг бактерий; 3) антиадгезивные механизмы; 4) антиинвазивные реакции; 5) антитоксический иммунитет; 6) антивирулентные воздействия на *P. aeruginosa*.

Барьерные свойства слизистых и кожи вносят наиболее весомый вклад в резистентность против синегнойной палочки. Наиболее ярко защитная роль слизистой иллюстрируется на примере муковисцидоза. Показано, что нормальная слизистая оболочка респираторного тракта защищена от адгезии *P. aeruginosa* двумя важнейшими факторами – механическим барьером и мукоцилиарным транспортом, который обеспечивает смыв и механическое удаление бактерий, попавших в дыхательные пути. Именно нарушение этих функций при

муковисцидозе инициирует первую фазу инфекционного процесса – адгезию *P.aeruginosa* на эпителиоцитах – с последующим образованием биопленки и селекцией клонов, приспособленных к выживанию в легких пациента [126].

Синегнойная палочка является типичными условно-патогенным микроорганизмом, который вызывает инфекционный процесс только на фоне иммуносупрессии [161]. Факторами риска являются первичные заболевания, связанные с генетическими дефектами, тяжелые травмы, обширные ожоги, злокачественные новообразования, большие хирургические вмешательства, лучевая, гормональная и цитостатическая терапия, патология новорожденных, СПИД, старческий возраст [245, 372]. Искусственная вентиляция легких, диализ, наличие имплантированных медицинских устройств (катетеры, дренажные трубки и т.д.) в значительной степени усиливают риск возникновения синегнойной инфекции [97]. Поэтому естественно, что синегнойная палочка чаще встречается в отделениях, где сконцентрированы тяжелые больные. Распространенность синегнойной инфекции лидирует в ОРИТ: *P. aeruginosa* является возбудителем примерно от 10 до 20% всех бактериальных инфекций в этих отделениях [69, 143].

Синегнойная палочка может вызывать поражение бронхо-легочного аппарата. Воспаление часто реализуется в виде трахеобронхита и пневмонии, которая может приобретать лобарную или некротизирующую форму. Наиболее часто с проблемой синегнойных инфекций бронхо-легочной системы сталкиваются сотрудники ОРИТ: у находящихся на искусственной вентиляции легких (ИВЛ) пациентов синегнойную этиологию имеют 30% трахеобронхитов и 24% пневмоний [284, 130]. Вероятность синегнойной ИВЛ-ассоциированной пневмонии возрастает с увеличением продолжительности искусственной вентиляции. Пневмонии могут быть результатом диссеминации имеющейся в организме синегнойной инфекции и могут возникать как первичные процессы. Штамм, вызывающий поражение бронхо-легочной системы, примерно с равной вероятностью может иметь эндогенное (первичный инфекционный локус, кишечник) либо экзогенное происхождение.

Особое место следует отвести роли синегнойной палочки в развитии пневмоний при легочных формах муковисцидоза [335]. В этом случае мукоидные клоны *P. aeruginosa* при содействии интенсивной антибактериальной терапии вытесняют штаммы-конкуренты и становятся ведущими этиологическими агентами хронической бронхопневмонии. Впрочем, при муковисцидозе достаточно часто встречаются случаи полимикробной пневмонии, когда синегнойная палочка существует в ассоциации с золотистым стафилококком, буркхолдериями, ахромобактериями и др. Интересно то, что при развитии такой патологии процесс не переходит в сепсис, что, по-видимому, связано с высоким титром антител к синегнойной палочке. Больной в итоге погибает от прогрессирующего фиброза и развития дыхательной недостаточности.

Хроническая обструктивная болезнь легких в 34,7% случаев сопровождается присоединением синегнойной инфекции [181].

Среди синегнойных инфекций ЛОР-органов превалируют отиты (до 40% случаев хронического среднего отита у взрослых), реже встречаются синуситы [258].

Синегнойные поражения роговицы, характеризующиеся неблагоприятным прогрессированием вплоть до паноптальмита, обычно инициированы использованием контактных линз и контаминированных глазных капель [208].

Синегнойные поражения мочевыводящей системы чаще развиваются в виде катетер-ассоциированных инфекций, патогенез которых во всех случаях определяется развитием биопленок [271]. Описаны случаи возникновения циститов (с последующей диссеминацией) вследствие бальнеологического лечения и СПА-процедур (вихревые ванны и д т.п.) [326]. Острые нефриты и пиелонефриты довольно часто сопровождается синегнойной инфекцией и могут приобретать крайне тяжелое течение. Их патогенез и тяжесть определяются концентрацией экзотоксина А [332]. Крайне интересными являются случаи рецидивирующего геморрагического васкулита (пурпура Шонлейна-Геноха), которые протекали на фоне синегнойного нефрита и полностью излечивались после полной эрадикации *P. aeruginosa* [164]. Синегнойная палочка является

частым возбудителем острых и хронических простатитов (13% всех случаев острого простатита), острых гнойных орхитов и эпидидимидов [373, 225].

Синегнойные менингиты, венитрикулиты и абсцессы мозга являются, как правило, результатами искусственных вмешательств (травмы, хирургические операции, пункции, дренирование и т.д.) либо следствием диссеминации возбудителя из имеющегося инфекционного локуса (синегнойные отиты, конъюнктивиты, бактериемия и др.). Случаи первичных синегнойных поражений мозга и мозговых оболочек встречаются крайне редко.

Синегнойная палочка нередко участвует в развитии острого перитонита (16% случаев всех послеоперационных перитонитов), часто - в составе разнообразных микробных ассоциаций [102].

P. aeruginosa входит в пятерку бактерий (вместе с *S. epidermidis*, *S. aureus*, *Serratia marcescens* и *Escherichia coli*), наиболее часто вызывающих остеомиелиты [127].

Весьма значимыми являются синегнойные осложнения раневых процессов. В общей структуре раневых инфекций синегнойная палочка занимает 9-10% [84]. *P. aeruginosa* является причиной гнойных осложнений ожоговых ран в 11,8–30,0% случаев [9, 200]. Опыт боевых действий XXI века показал, что синегнойная палочка наряду с *S. aureus*, *K. pneumoniae* и *Acinetobacter spp.* входит в четверку лидеров – бактерий, осложняющих течение боевой травмы [125].

Синегнойная инфекция кожи, известная как «Hot tub rash» (сыпь, связанная с горячим водоснабжением), является следствием инфицирования кожи при купании в воде (бассейны, бальнеологические процедуры), которая вследствие тепловой инактивации утратила бактерицидность растворенного в ней хлора [388]. Это делает возможным формирование синегнойных биопленок на внутренних поверхностях гидроконструкций, и сброса в воду синегнойной палочки в достаточных концентрациях для того, чтобы контаминировать кожу и слизистые купающихся. Клиническая картина развивается через один-четыре дня после инфицирования кожи. Инфекция проявляется в виде фолликулита, макулопапулярной и/или пустулярной сыпи. Вариантом этого типа инфекции

является «Hot hand-foot syndrome», названный по аналогии с предыдущим синдромом, но поражающий ладони и стопы пациентов. Сыпь может сопровождаться увеличением лимфоузлов, симптомами общей интоксикации. Обсеменение слизистых (часто процесс локализуется в носоглотке) может приводить к развитию субклинической инфекции с симптомами хронической интоксикации, главной жалобой при этом являются головные боли. Синдром, получивший название «головная боль пловцов», трудно диагностируется, пациентам ставятся ложные диагнозы, и назначается неэффективное лечение.

Синегнойное воспаление подкожной клетчатки, реализующееся в виде гнойного целлюлита, является осложнением раневого процесса или первичной синегнойной инфекции [385]. Синегнойные фасцииты, развивающиеся по типу вторичной инфекции, протекают крайне тяжело, могут приобретать некротизирующую форму и часто заканчиваются фатально [253].

Интересным проявлением синегнойного поражения придатков кожи – ногтей – и близлежащих мягких тканей является «синдром зеленого ногтя». Клинически он проявляется симптомами местного воспаления, а также характерным темно-зеленым окрасом пораженного ногтя за счет пигмента пиоцианина. Поражается один, реже два ногтя на соседних пальцах, предрасполагающей причиной являются онихомикозы [277].

Современные данные говорят о том, что синегнойная палочка может поддерживать патогенез трофических язв. По крайней мере, почти в половине случаев с поверхности хронических трофических язв нижних конечностей высеивается *P. aeruginosa* в патогенетически-значимых концентрациях, часто сочетаясь с другими микробами и практически во всех случаях – в ассоциации с золотистым стафилококком [348].

Синегнойное поражение кишечника клинически проявляется в виде диареи [94]. Особый и крайне тяжелый случай диареи, сопровождающей синегнойный сепсис у детей первого года жизни, получил название «шанхайская лихорадка» [135]. В случае отсутствия или нерациональности антимикробной терапии дети с «шанхайской лихорадкой» погибают от последствий некроза кишечника.

Важнейшей группой заболеваний, которые часто вызываются *P. aeruginosa*, являются инфекции кровотока. Согласно данным Astra Vitkauskien et al. (2010), синегнойные бактериемии составляют 2,7% от всех клинических случаев бактериемии [372]. 58,8% из них диагностировались в ОРИТ, остальные в иных отделениях. Первичная бактериемия диагностировалась у 62,5% больных. По локализации источники инфекции при вторичной бактериемии заняли следующие позиции: 52% - первичный очаг располагался в легких, 26% - первичный очаг представлял собой рану, 18% - первичная инфекция поражала мочевыводящие пути, 4% - первичный очаг находился в желчном пузыре. Более половины пациентов с диагностированной бактериемией имели 2 или более положительных критерия SIRS. Это говорит о возможности применения термина «сепсис» для подавляющего большинства пациентов с синегнойной бактериемией. Септикопиемия, - самое частое проявление синегнойного сепсиса – может сопровождаться вторичными, метастатическими поражениями кожи эритематозно-некротического характера (*ectyma gangrenosa*).

Синегнойные эндокардиты и медиастениты являются осложнениями стойких бактериемий, ранений или медицинских манипуляций; в качестве первичных процессов эти типы патологии встречаются казуистически редко.

В зависимости от локализации патологического процесса и адекватности проводимой антимикробной терапии летальность при синегнойной инфекции с поражением внутренних органов колеблется от 18 до 61% [110]. Согласно данным 2014 года, смертность от состояний, сопряженных с синегнойной бактериемией составляет 38% [381]. 30% пациентов умирают в 30-дневный срок, 53% из них умирают в первые 5 дней с момента регистрации инфекции кровотока. Смертность за 30-дневный период при инфекции кровотока, вызванной внебольничными штаммами синегнойной палочки значительно ниже (26%), чем при аналогичной нозокомиальной инфекции (36%) [206]. Считается, что наиболее верным показателем, коррелирующим со смертностью при синегнойных инфекциях кровотока, является способность изолированного из крови штамма к продукции контактных токсинов. Наибольшая степень корреляции между

летальностью и токсинообразованием прослеживается у штаммов, продуцирующих ExoU [295].

Другим предиктором высокой смертности является множественная антибиотикорезистентность (панрезистентность, мультирезистентность и расширенный спектр резистентности) штамма-возбудителя [152]. Непосредственным терминальным состоянием, приводящим к смерти пациента при псевдомониальной инфекции кровотока, чаще является септический шок.

Нужно признать, что значительное количество случаев синегнойной инфекции являются следствием медицинских манипуляций. Описаны случаи, когда причиной развития синегнойной инфекции было инфицирование во время катетеризаций, пункций, миело- и вентрикулографии, бронхоскопии, урологических эндоскопических процедур, общехирургических операций, перевязок, из-за использования контаминированных растворов антисептиков. Некоторые случаи поразительны. Зафиксировано инфицирование значительного числа пациентов одним клоном *P.aeruginosa* при их обследовании контаминированным бронхоскопом, который имел незначительный скрытый дефект, внутри которого синегнойная палочка (в ассоциации с *Serratia marcescens*) сохраняла жизнеспособность в процессе правильно проводимой дезинфекции [231].

Синегнойная палочка может быть участником полимикробного инфекционного процесса. Долгое время существование *P. aeruginosa* в стойких ассоциациях с другими микробами не рассматривалось в качестве патогенетически-значимой проблемы, что было связано с многочисленными сведениями о межмикробной конкуренции, которую проявляет синегнойная палочка. Если следовать этой теории, то известные факты подавления синегнойной палочкой грибов рода *Candida* за счет фосфолипазы и феназинов должны были бы исключить возможность присоединения к локальным очагам синегнойной инфекции кандидоза [229, 190]. Практическая медицина показывает обратную реальность – синегнойно-кандидозные ассоциации являются распространенной этиологической причиной полимикробных инфекций [239,

134]. В настоящее время молекулярные механизмы возникновения синегнойно-кандидозных ассоциаций изучены до такой степени, что могут служить моделью общих принципов кооперации *P. aeruginosa* с другими возбудителями. Одной из причин сожителства кандид и синегнойной палочки являются мутации генов *plcS* (структурный ген фосфолипазы C), *plcR* (ген, отвечающий за секрецию фосфолипазы C), *phnAB* (ген, мутация которого снижает синтез феназинов) [213]. Вследствие этого синегнойная палочка лишается своих главных инструментов в конкуренции с кандидами и начинает использовать тактику симбиоза с ними. Более того, низкие дозы феназинов (в 25-200 раз ниже токсических для кандид концентраций) модулируют вирулентность кандид и стимулируют формирование кандидозных биопленок [275, 355]. Из приведенной информации вытекает важное клинически-значимое следствие. Мутанты *P. aeruginosa* по феназинам формируют беспигментные колонии. Следовательно, неокрашенность колоний на питательной среде, а применительно к раневой инфекции отсутствие характерной синегнойной окраски экссудата и перевязочных материалов, являются прогностическими признаками возможного присоединения кандидозной инфекции. Справедливость требует отметить, что причина симбиоза с *P. aeruginosa* может быть связана с кандидами, точнее – с их мутированными клонами [247].

В качестве патогенетически-значимых ассоциатов синегнойной палочки могут выступать практически все оппортунистические микроорганизмы, включая *Staphylococcus spp.*, *Enterococcus spp.*, *Klebsiella pneumoniae*, *Serratia marcescens*, *Escherichia coli*, *Enterobacter spp.*, *Aspergillus fumigatus*, *Shigella flexneri* и др. [54, 99, 292, 212, 311, 122, 235]. Встречаются и более сложные ассоциации. Интересен случай тяжелого посттравматического гнойного целлюлита, вызванного ассоциацией «*P. aeruginosa* - *Streptococcus pyogenes* – *Klebsiella oxytoca* – *S. aureus*» и осложнившегося септицемией, вызванной *P. aeruginosa* and *S. pyogenes* [234].

Безусловно, единственным реальным способом эрадикации синегнойной палочки является антимикробная химиотерапия. Эмпирическая

антибиотикотерапия исключает применение препаратов, для которых у *P. aeruginosa* доказано наличие природной резистентности, – ампициллина, амоксициллина-клавуланата, цефазолина, цефотаксима, цефтриаксона, эртапенема, канамицина, неомицина, тетрациклинов, тигециклина, триметоприма, триметоприма-сульфаметоксазола (рекомендации «Европейского комитета по тестированию чувствительности к антибиотикам (EUCAST)», режим доступа: <http://www.eucast.org>"). Катастрофическое распространение среди клинически-значимых клонов *P. aeruginosa* приобретенной резистентности требует назначения антибиотиков с учетом знания спектров чувствительности к антибиотикам у конкретного изолята. К сожалению, количественно оценить чувствительность *in vitro* возможно лишь для ограниченного числа антибиотиков. Европейский комитет по тестированию чувствительности к антибиотикам позволяет проводить такую оценку для 17 препаратов: пиперациллина, пиперациллина-тазобактама, тикарциллина, тикарциллина-клавуланата, цефепима, цефтазидима, дорипенема, имипенема, меропенема, азтреонама, ципрофлоксацина, левофлоксацина, амикацина, гентамицина, нетилмицина, тобрамицина, колистина (для колистина оценивается только минимальная подавляющая концентрация, но не зона задержки роста при использовании диско-диффузионного способа).

Антивирулентная терапия синегнойных инфекций, о которой много и оптимистично говорят в последние годы, до сих пор не нашла эффективного применения в клинике. Лечебное и профилактическое применение вакцинных препаратов и препаратов на основе специфических антител также пока не нашло практического применения, хотя их доклинические и даже клинические испытания проводятся более 20 лет. Неспецифическая профилактика сводится к проведению общих противоэпидемических мероприятий, направленных на ликвидацию путей передачи и санацию/дезинфекцию/изоляцию источников инфекции.

1.2. Возбудители респираторных инфекций

1.2.1. *Streptococcus pneumoniae*

По данным ВОЗ, пневмококковая инфекция является наиболее распространенной причиной детской заболеваемости и смертности в мире, вызывая около 0,7-1 млн смертей ежегодно у детей моложе 5 лет.

История обнаружения и выделения пневмококка от больных крупозной пневмонией в 1881 г Карлом Фриндлендером и одновременно Луи Пастером связана также и с именем G.M. Stenbenrg, выделившего пневмококк из слюны здорового человека в 1880 г (цит. по Austrian, 1986) и установившего факт присутствия данного микроба как компонента нормальной микрофлоры человека. *S. pneumoniae* распространенный комменсал верхних дыхательных путей. Как правило, колонизация носоглотки пневмококком протекает бессимптомно, длительность ее обычно не превышает 1- 6 мес [28, 250]. При многократных обследованиях детей в течение 2-х лет доля периодического носительства микроорганизма значительно возрастает (до 82,7%), причем число различных капсульных типов, колонизирующих одного и того же ребенка за период наблюдения от 2-х до 4-х лет, может достигать 6-12 вариантов [194, 198]. Чаще всего ведущую роль *S. pneumoniae* играет при респираторных инфекциях (пневмония, острый средний отит, острый синусит) [86, 50]. Среди этиологических факторов гнойного менингита пневмококки занимают третье место после менингококка и гемофильной палочки. Участие *S. pneumoniae* в этиологической структуре этого жизнеугрожающего заболевания составляет 15,2% [43]. Также этот патоген является одним из этиологических агентов тяжелых инвазивных инфекций, в том числе пневмонии с бактериемией, сепсиса [49, 168, 363].

Пневмококки по составу капсульных полисахаридов неоднородны, и в настоящее время их серотиповой состав включает 92 капсульных варианта, объединенных в 21 серогруппу, состоящую из 65 серотипов и 27 индивидуальных

серотипов. Однако чаще всего заболевания вызывает ограниченное число серотипов (это первые 30 серотипов), среди них наиболее широко распространены серогруппы/серотипы: 1, 3, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 14, 18, 19, 23. Среди разнообразия серотиповых вариантов *S. pneumoniae* выделяются вирулентные серотипы, чаще других приводящих к тяжелым инфекционным процессам. Так, серотипы 1, 3, 14 и 5 часто ассоциированы с осложненными пневмониями: плевритами, деструктивными и некротизирующими процессами в легких [32, 168, 238, 318, 169]. К преобладающим серотипам *S. pneumoniae*, вызывающим у детей гнойные менингиты, относятся 19F, 14, 18C, 5 и серогруппа 6 [50, 77, 363].

Знания о распространенности отдельных серотипов легли в основу создания первой конъюгированной полисахаридной пневмококковой вакцины (ПКВ7). В нее вошли антигены семи серотипов пневмококка: 4, 6В, 9V, 14, 18С, 19F и 23F, которые охватывали 86% всех инвазивных инфекций у детей первых лет жизни в США и 74% в Европе. В 2000 г. началась массовая вакцинация ПКВ7, что привело к исчезновению серотипов пневмококков, входящих в ее состав [377, 56, 321] и в течение нескольких лет резко снизилась частота ИПИ, вызванных вакцинными серотипами пневмококка. Сократилась и доля ПКВ7-серотипов в циркулирующем пуле пневмококков. Так, в США в 2010-2011 было отмечено практически полное исчезновение инвазивных и неинвазивных изолятов ПКВ7-серотипов (снижение до 3,8% и 4,2 % соответственно) [321]. Сходная закономерность наблюдалась и в других странах, где ввели вакцинацию ПКВ7 в национальный календарь прививок [202]. Выход из циркуляции вакцинных серотипов пневмококка повысил значение невакцинных серотипов. Особую тревогу вызвал рост штаммов в популяции пневмококка серотипа 19А, который отличается множественной устойчивостью к антибиотикам.

Таким образом, ПКВ оказывает выраженный эффект на эпидемиологию серогрупп пневмококка в тех странах, где эта вакцина включена в национальные календари прививок. В РФ лицензированы три ПКВ: 7-валентная, содержащая серотипы: 4, 6В, 9V, 14, 18С, 19F и 23F; 10-валентная (ПКВ7 + серотипы 1, 5, 7F) и 13-валентная (ПКВ10 + серотипы 3, 6А, 19А).

Изучение серотипового пейзажа пневмококков в РФ проводилось с конца 1980-х гг. В работах В.К. Таточенко и Л.К. Катосовой, относящихся к 1990-м гг., было показано, что в зависимости от региона страны серотипы, входящие в ПКВ7, составляли 51-68% инвазивных штаммов и 70-89% штаммов, выделенных от носителей. Умеренное покрытие инвазивных штаммов ПКВ7 объяснялось высокой долей серотипов 1, 3 и 5, которые не входят в ПКВ7, в то время как их суммарное доленое участие в отдельных регионах превышало 40% [32]. Исследования Р.С. Козлова (1999-2004 гг.) показали, что серотипы ПКВ7 охватывали 62% резистентных штаммов пневмококка в европейской части России и только 50% - в азиатской [39]. В последние годы было выполнено несколько проектов по уточнению современного серотипового пейзажа пневмококков [85, 38, 40, 57, 12]. Результаты этих исследований показывают преобладание в современном спектре серотипа 14 и серогрупп 6, 19, 23. Число инвазивных изолятов пневмококка, полученных и типированных в отечественных исследованиях невелико, всего несколько десятков. Однако даже небольшое число изолятов показывает главенство серотипов 19F (25%) и 14 (19%) при инвазивных инфекциях в России, как и в других странах до введения вакцинации [38, 41].

Серьезной проблемой лечения пневмококковых инфекций является неуклонный рост и распространение резистентности микроорганизма к антибактериальным препаратам, в первую очередь к пенициллинам и макролидам. Распространение резистентных штаммов носит глобальный характер с большими колебаниями по странам: варьирование уровня устойчивых к пенициллину штаммов *S. pneumoniae* в странах Европы находится в пределах от 1-5% до 25-50%, а глобальная доля нечувствительных к пенициллину пневмококков достигает 33% [316, 246, 202].

Нерациональное использование антибиотиков привело к появлению и распространению антибиотикорезистентных штаммов пневмококков. Обычно уровень резистентности пневмококка к пенициллину пропорционален уровню потребления антибиотиков. Так, во Франции наблюдался самый высокий уровень

назначения и приема антибиотиков и, как следствие, наибольшее распространение нечувствительных штаммов пневмококков (более 40%). В Нидерландах, напротив, самый низкий уровень употребления антибиотиков в Европе сочетается с невысокой резистентностью пневмококка (менее 5%) [193, 140]. Распространение резистентных штаммов пневмококка происходит в основном среди детской популяции, так как здесь имеет место высокая частота носительства и частое назначение антибактериальной терапии, что создает благоприятную среду для селекции и закрепления резистентных форм бактерий [140, 202, 246, 207].

В Австралии в 1967 году был описан первый штамм пневмококка со сниженной чувствительностью к пеницилину, МПК которого составляла 0,6 мкг/мл, и резистентностью к тетрациклину. В 1974 г. появились сообщения об изолятах, резистентных к пеницилину, из Новой Гвинеи. Эти высокорезистентные штаммы относились к серотипам 6А и 19А и характеризовались полирезистентностью. В 1979 г. в Испании у взрослого пациента с пневмонией из крови впервые был выделен штамм пневмококка с МПК пеницилина 0,5 мкг/мл. В 1980-х гг. из разных стран стали поступать сообщения о росте антибиотикорезистентности пневмококка. Появилось понятие «полирезистентность» или МЛУ [202, 246, 378, 137].

Серотипы 19А, 19F, 23F, 14 и серогруппа 6 обладают наибольшей антибиотикорезистентностью и нередко обладают МЛУ [26]. После внедрения в национальные календари ПКВ7 во многих странах наблюдалось значимое снижение резистентности за счет выхода из циркуляции устойчивых вакцинных серотипов и серотипа 6А. Так, во Франции в период с 2001 по 2006 гг. отмечено снижение устойчивости пневмококка к бета-лактамам с 52% до 38% [242]. Сходные данные получены и в США, где в 2010 г. только 11% всех изолятов были устойчивы или умеренно резистентны к пеницилину по сравнению с 25% в 2008 г [321]. Однако благодаря явлению замещения в поствакцинальном периоде постепенно начала увеличиваться доля резистентных серотипов пневмококка, не входящих в вакцину. Серьезную проблему и

обеспокоенность вызывает распространение серотипа 19А, не входящего в ПКВ7. Кроме высокой инвазивности, серотип 19А может приобретать МЛУ. Интересно, что этот серотип появился в некоторых странах до введения ПКВ7. Например, в Южной Корее в период с 1991-2006 гг его доля выросла с 3 до 18%, и до начала вакцинации серотип 19А стал самым распространенным инвазивным серотипом у детей младше 5 лет [341]. Следует также отметить, что и в других странах после внедрения ПКВ7 в календарь прививок увеличилось число осложненных пневмоний, вызванных такими серотипами, как 1 и 3, которые не входят в ПКВ7 [157]. Исследования, проведенные в РФ в 2000-е гг, показали меньшую распространенность резистентных к антибиотикам штаммов пневмококка: доля нечувствительных к пенициллину носоглоточных изолятов не превышала 10%, а доля резистентных изолятов к макролидам составила 5% [343, 38]. По другим данным, уровень устойчивых к пенициллину *S. pneumoniae* менялся от 3 до 24% в зависимости от региона и периода выделения. Частота встречаемости пневмококков, имеющих сниженную чувствительность к пенициллину (МПК от 0,120 до 1 мг/л), среди инвазивных штаммов, выделенных от пациентов с менингитом, достигала 24% [72, 23, 17]. Недавно завершённое в РФ исследование показало тревожную тенденцию нарастания антибиотикорезистентности пневмококка [261]. Было проанализировано более 800 клинических неинвазивных штаммов *S. pneumoniae*, собранных за период 2009-2013 гг., распространенность устойчивых к пенициллину изолятов составила 28%, а резистентностью к макролидам обладали 26% пневмококков. Эти данные свидетельствуют о быстром росте резистентности *S. pneumoniae* в РФ в последние годы и совпадают с глобальной тенденцией быстрого распространения резистентности, когда устойчивость к пенициллину и макролидам во многих регионах выросла практически с нуля до 25-50% и более [202, 316].

Резистентность к бета-лактамам появляется при развитии мозаицизма генов пенициллинсвязывающих белков (ПСБ), которые снижают способность молекул антибиотика связываться с ПСБ. Всего у пневмококка описано шесть ПСБ, но основная доля резистентности связана с мутациями в трех

из них – ПСБ1а, ПСБ2b и ПСБ2х. Нуклеотидные последовательности мозаичных ПСБ-генов более чем на 20% могут отличаться от немозаичных аллелей, что свидетельствует о непневмококковом происхождении данных последовательностей. Предполагают, что мозаичные блоки генетического материала в генах РВР возникают у других стрептококков-комменсалов вследствие точечных мутаций, а затем интегрируются пневмококками за счет горизонтального переноса [140, 390].

Резистентность к макролидам определяется двумя главными механизмами: изменением мишени связывания и эффлюксом антибиотика из бактериальной клетки. Изменение мишени обусловлено модификацией сайта связывания макролидов с 23S рРНК вследствие ее метилирования, что приводит к нарушению взаимодействия антибиотика с мишенью. Метилирование осуществляется ферментом метилазой, который кодируется геном *erm* (англ. erythromycin ribosome methylation), и обуславливает высокий уровень устойчивости к макролидам. Этот ген ассоциирован с транспозонами и может локализоваться и на плазмидах, и на хромосомах. В настоящее время описано около 20 разновидностей *erm*, но наибольшее значение для формирования резистентности у пневмококка к макролидам играет вариант *ermB*. У большинства пневмококков, имеющих *ermB*, проявляется перекрестная резистентность, распространяющаяся на все макролиды, а также линкозамиды и стрептограмин В, так как их мишени частично перекрываются. Это MLS_B-фенотип (название получено по первым буквам наименования групп антибиотиков) [319, 316, 140, 79]. Существует два варианта экспрессии MLS_B-фенотипа: конститутивный и индуцибельный. При конститутивном фенотипе сMLS_B синтез метилазы не зависит от внешних условий, и устойчивость микроорганизма распространяется на все группы макролидов и линкозамиды. Индуцибельный фенотип iMLS_B фенотипически проявляется устойчивостью к 14- и 15-членным макролидам при чувствительности или резистентности к 16-членным макролидам и линкозамидам, формируемой лишь после индукции.

Второй механизм резистентности к макролидам - эффлюкс антибиотика – связан с активным выведением антибиотика из бактериальной клетки с помощью особой помпы, встроенной в клеточную стенку. Эффлюксная помпа кодируется несколькими вариантами гена *mef* (англ. macrolide efflux). Пневмококки, обладающие геном *mef* имеют М-фенотип, который характеризуется резистентностью к 14- и 15-членным макролидам, но при этом сохраняет чувствительность к 16-членным макролидам, линкозамидам и стрептограмину В. Ген *mef* локализован на хромосомах в составе конъюгативных элементов, что обеспечивает его эффективное внутри- и межвидовое распространение [316, 140, 79].

По уровням резистентности пневмококка к макролидам также имеется большой разброс: от 1% в северной Европе до 50% в Греции, что совпадает с колебаниями устойчивости к пенициллину. В странах Азии и Китае резистентные к макролидам пневмококки распространены с частотой 50-100% [291, 246, 202, 183]. В среднем к макролидам устойчивы 23% пневмококков. Распространенность *ermB* и *mef*-пневмококков имеет выраженные региональные особенности. Так, *ermB* является преобладающим механизмом резистентности в большинстве стран Европы, включая Испанию, Италию, Польшу и Францию [246, 174], и доминирует в странах Азии и Китае, в то время как изоляты с М-фенотипом, т.е. несущие *mef*, чаще выявляются в Великобритании, Германии, Канаде, Норвегии и США. В РФ до 50-85% макролидрезистентных штаммов пневмококка имеют ген *ermB* [72, 317, 261].

При широком разнообразии капсульных типов пневмококка антибиотикорезистентность распределяется неравномерно среди всех серотипов. Резистентные пневмококки принадлежат к ограниченному числу клонов, которые включают лишь несколько серотипов. С другой стороны, отдельный серотип может быть представлен в составе разных клонов, не являющихся родственными и отличающихся по степени резистентности. Для стандартизации подходов к изучению генетической структуры пневмококковой популяции было предложено использовать МЛСТ, который основан на определении нуклеотидной

последовательности (секвенировании) консервативных фрагментов семи генов «домашнего хозяйства», отвечающих за метаболизм бактерий и не кодирующих факторы вирулентности и патогенности [246, 386, 255, 267, 165]. Данные о последовательностях накапливаются в единой базе данных PMEN (Pneumococcal Molecular Epidemiology Network), доступной в сети Интернет. Собранная глобальная информация о результатах МЛСТ со всех регионах мира с помощью биоинформационных методов позволяет определять генетически линии и кластеры пневмококков, что дает возможность выявлять эволюционные связи в бактериальных популяциях, группировать отдельные последовательности в сиквенс-типы и клональные комплексы, объединенные общими предшественниками [222, 224, 285].

Распространенность большинства клонов, имевших вакцинную капсулу, после начала вакцинации ПКВ7 стала снижаться. Однако влияние вакцинации с особой яркостью подчеркнуло высокую способность пневмококка к генетической рекомбинации. Так, полирезистентный серотип 19А, который относится к СС320 и получил глобальное распространение в пост-ПКВ7 периоде, является двухлокусным вариантом пневмококка Taiwan19F-ST236, имевшего капсулу ПКВ7-серотипа 19F. Анализ эволюционного ответа пневмококковой популяции на вакцинацию показал, что использование ПКВ7 привело к отбору предсуществовавших невакцинных капсульных вариантов пневмококка, среди которых оказались клоны с резистентным генотипом, подобные 19А-изолятам СС320 [274, 142, 386].

Немногочисленные исследования, проводившиеся на территории РФ, показали генетическое разнообразие резистентных пневмококков и присутствие глобальных клональных комплексов, включавших СС81, СС156, СС315 и СС320. Обнаружение представителей СС320 с серотипом 19А до начала вакцинации ПКВ в РФ свидетельствует о необходимости постоянного мониторинга популяционного состава пневмококков для прогнозирования эффективности используемых вакцин [72, 317, 73, 74].

Внедрение в практику ПКВ7 привело к резкому снижению частоты ИПИ, вызываемых ПКВ7-серотипами [300, 345, 360]. Вместе с тем, в пост-ПКВ7 периоде был зарегистрирован подъем заболеваемости ИПИ, связанный с серотипами пневмококка, не входящими в состав ПКВ7, в первую очередь, с серотипом 19А [321, 202]. Так, в США в период с 1999 по 2008 год частота 19А-ИПИ увеличилась с 0,7 до 2,5-2,6 случаев на 100000 населения. Согласно данным, полученным в Германии, доля изолятов серотипа 19А среди ИПИ-пневмококков возросла до 15% в 2010-2011 гг. по сравнению с исходным уровнем 1,7-4,2% в 1997-2006 гг. После введения универсальной вакцинации ПКВ7 аналогичная тенденция наблюдалась и в других европейских странах [362, 98, 315, 153]. Сложившуюся ситуацию объясняли ПКВ-опосредованным феноменом замещения серотипов, то есть экспансией ранее существовавших минорных популяций пневмококка с не-ПКВ7 серотипами под давлением вакцины. Однако в ряде стран, например, в Израиле и Южной Корее, сообщалось об увеличении частоты серотипа 19А в период, предшествующий введению ПКВ7. Это позволило предположить значение и других бактериальных факторов помимо серотипа для распространения 19А-пневмококков. Экспансия пневмококков серотипа 19А демонстрирует клональный характер. Имеющиеся данные указывают на то, что распространение 19А-пневмококков связано с ограниченным набором клонов, который включает СС199, СС230, СС320, СС695, СС994 [112, 362, 98, 153, 274, 220, 182, 331, 192, 270]. У большинства из этих клонов снижена чувствительность к антибиотикам и регистрируется МЛУ. Она обычно сочетается с высоким уровнем нечувствительности к пенициллину, что связано с нарушением структуры РВР [203]. Кроме того, пневмококки СС320 – доминирующего и глобально распространенного клона серотипа 19А – и СС199 с сиквенс-типом ST416 несут пили (фимбрии), которые могут обеспечивать им дополнительные конкурентные преимущества [153, 270, 389].

Данные о молекулярной эпидемиологии пневмококков в России ограничены. Ранее мы сообщали о выявлении пневмококков СС320 серотипа 19А

в России еще до введения вакцинации ПКВ в Национальный календарь профилактических прививок в 2014 году [262].

Таким образом, возрастающая устойчивость пневмококков к антибиотикам обуславливает необходимость профилактики пневмококковых инфекций с помощью вакцин, в которых охват входящих в нее серотипов будет соответствовать серотиповому составу пневмококков, циркулирующих на данной территории.

1.2.2. *Streptococcus pyogenes*

Стрептококковые инфекции, вызванные *Streptococcus pyogenes* (β -гемолитический стрептококк серогруппы А – БГСА), имеют широкое распространение во всем мире, значительную нишу они занимают в детском возрасте, вызывая различные патологические состояния, включающие в себя инвазивные и неинвазивные формы воспалительных заболеваний. Пиогенный стрептококк является возбудителем инфекционных поражений верхних дыхательных путей (тонзиллофарингиты, отиты), кожи и мягких тканей (пиодермия, импетиго, рожа, ожоговое воспаление, некротический фасциит) и служит причиной скарлатины, эндокардита, гнойного артрита, остеомиелита, омфалита и тяжелых генерализованных процессов с синдромом токсического шока [53, 14, 117]. Наблюдения последних лет показали возрастание (до 22%) роли *S. pyogenes* в этиологии острого отита у детей и особенно его тяжелых форм, при которых до 50% микробиоты, выделенной из полости среднего уха, занимал этот патоген [57, 30]. По последним данным в этиологии вульвовагинитов у детей одним из ведущих возбудителей был *S. pyogenes*, занявший второе место по частоте выделения [61]. Наибольшее значение в детской патологии имеет стрептококковый тонзиллит, составляющий до трети всех острых тонзиллитов [117, 307].

Учитывая сохраняющуюся до настоящего времени высокую чувствительность пиогенного стрептококка к бета-лактамам, антибиотикам,

пенициллины остаются универсальными препаратами выбора для лечения стрептококковых инфекций. В то же время при антибактериальной терапии стрептококкового тонзиллита пенициллинами известны случаи (24-30%) клинической и бактериологической неэффективности [14]. Неудачи лечения пенициллинами могут быть связаны с несколькими причинами: (1) разрушением незащищенных природных пенициллинов и аминопенициллинов (последние в значительной степени вытеснили природные пенициллины из повседневной практики) бета-лактамазами ко-патогенов, колонизирующих носоглотку, (2) низкой комплаентностью пациентов при назначении 10-дневных курсов антибиотикотерапии, (3) внутриклеточной локализацией микроорганизмов и др. [14, 138, 226].

До недавнего времени *S. pyogenes* характеризовался высоким уровнем чувствительности к макролидам. Однако их широкое использование, в первую очередь азалидов, особенно в педиатрической практике, привело к возникновению устойчивости микроорганизма к этим препаратам и линкозамидам. Распространенность макролид-резистентных *S. pyogenes* и преобладающие механизмы резистентности широко варьируют в различных странах, и во многом определяются уровнем потребления макролидных антибиотиков. Первое большое наблюдение об устойчивости *S. pyogenes* к эритромицину было сделано в Японии в 1974 – 1975 гг, где указывались колебания частоты устойчивости микроорганизма от 15% до 62% [178].

Бактериологическую и клиническую эффективность препаратов, входящих в группу макролидных антибиотиков, определяет механизм формирования резистентности. Выявление фенотипа резистентности *S. pyogenes* к эритромицину и связанного с ним гена имеет клиническое значение для выбора стартового макролида, поскольку по преобладающему в конкретном регионе механизму резистентности возможно предсказать преимущество того или иного антибиотика.

Глава 2. Материалы и методы исследования

2.1. Выделение, идентификация и анализ грамотрицательных бактерий

Образцы крови и ликвора были получены от детей из стационаров ФГАУ «Национальный медицинский исследовательский центр здоровья детей» Минздрава России (С-1) и НИИ неотложной детской хирургии и травматологии Департамента здравоохранения г. Москвы (С-2). Критерием включения в исследование было подозрение на развитие септического состояния. Все образцы крови, инокулированные во флаконы для гемокультивирования, инкубировали в анализаторе гемокультур ВАСТЕС 9050 (Becton Dickinson, США) до момента регистрации микробного роста. После регистрации микробного роста из гемокультуры немедленно производили забор материала (4,0 мл), который разделяли на две части (по 2,0 мл). Из первой части делали высев на плотные питательные среды для выделения чистой культуры возбудителя по классическим микробиологическим методикам. В качестве методов идентификации изолятов применяли микроскопическое исследование, посев на селективные и хромогенные питательные среды, иммунохимические и биохимические методы, включая использование автоматического бактериологического анализатора Vitek 2 (BioMerieux, Франция).

Вторую часть гемокультуры использовали для масс-спектрометрического определения таксономической принадлежности возбудителя, которое выполняли согласно отработанному ранее протоколу [45]. Процедуру выделения микробных белков завершали нанесением их (по 0,001 мл) на мишень для MALDI-TOF-масс-спектрометрии. В качестве матрицы использовали α -циано-4-гидроксикоричную кислоту. Для повышения достоверности каждый образец тестировали в триплетах. Снятие спектров проводили в ручном режиме, диапазон спектра — 2–20 кДа. Для каждого образца получали не менее 1000 спектров. Статистическую обработку масс-спектров проводили с помощью программы Biotyper 3.0 RTC. Степень достоверности идентификации оценивали по полученным значениям

Score, сравнивая с данными спектров референсной библиотеки Biotyper 3.0. Случаи со Score <1,7 рассматривали как недостоверные и не учитывали в качестве случаев успешного определения таксономической принадлежности изолята [263].

Посевы биологического материала производили на питательные среды: кровяной агар и Uri-select агар (BioRad, США), затем инкубировали в термостате при температуре 37°C в течение 24 - 48 ч. Видовую идентификацию проводили на масс-спектрометре MALDI-TOF-MS (Bruker Daltonics, Германия) и в баканализаторе Vitek 2.

2.1.1. Определение чувствительности к антибиотикам

Для определения чувствительности к антимикробным препаратам (АМП) использовали три метода: диско-диффузионный (диски Bio-Rad, США), метод E-тестов (BioMerieux, Франция) на среде Мюллера-Хинтона (Biorad, США) и автоматизированный метод на баканализаторе VITEK 2 Compact (BioMerieux, Франция). Метод E-тестов использовали для определения МПК имипенема, меропенема и тигециклина. Результаты интерпретировали, руководствуясь оценочными критериями (breakpoint) EUCAST [170] и клинические рекомендации [33] (Таблица 2.1).

Таблица 2.1

Критерии оценки чувствительности к антибиотикам EUCAST 2015

Антибиотик	МПК (мг/л) EUCAST					
	<i>Acinetobacter spp</i>		<i>Enterobacteriaceae spp</i>		<i>P. aeruginosa</i>	
	S ≤	R >	S ≤	R >	S ≤	R >
SAM ^{1,2}	8/4	16/8 ⁴	н/т	н/т	н/т	н/т
COX ²	н/т	н/т	1	2	н/т	н/т
FEP ²	8 ⁴	16 ⁴	1	4	8	8
CZD ²	н/т	н/т	1	4	8	8
SXT ²	2	4	н/т	н/т	н/т	н/т

Антибиотик	МПК (мг/л) EUCAST					
	<i>Acinetobacter spp</i>		<i>Enterobacteriaceae spp</i>		<i>P. aeruginosa</i>	
	S ≤	R >	S ≤	R >	S ≤	R >
IMP ²	2	8	2	8	4	8
MEM ²	2	8	2	8	2	8
CIP ²	1	1	0,5	1	0,5	1
AKN ²	8	16	8	16	8	16
GMN ²	4	4	2	4	4	4
NTM ²	4	4	2	4	4	4
TMN ²	4	4	н/т	н/т	4	4
TGC ²	н/т	н/т	1	2	н/т	н/т
FOS ²	н/т	н/т	32	32	н/т	н/т

Примечание:

¹ Пограничные значения, рекомендуемые CLSI

²SAM - Ампициллин/Сульбактам, COX – Цефотаксим, FEP – Цефепим, CZD - Цефтазидим
SXT - Ко-тримоксазол, IMP – Имипенем, MEM – Меропенем, CIP – Ципрофлоксацин, AKN –
Амикацин, GMN – Гентамицин, NTM – Нетилмицин, TMN - Тобрамицин, TGC –
Тигециклин, FOS – Фосфомицин

н/т – не тестировали

Чувствительность к антибиотикам диско-диффузионным методом определяли, используя диски с меропенемом, имипенемом, эртапенемом, амикацином, гентамицином, нетилмицином, цефтазидимом, цефепимом, ципрофлоксацином (БиоРад, Франция). В качестве контрольных штаммов использовали *E. coli* ATCC 25922, *E. coli* ATCC 35218, *P. aeruginosa* ATCC 27653, *A. baumannii* ATCC 19606.

Для описания результатов тестирования антибиотикорезистентности использовали терминологию «нечувствительные» и «чувствительные» бактерии. Нечувствительными считали штаммы слабочувствительных и резистентных категорий; остальные штаммы относили к чувствительным. В отношении устойчивости к карбапенемам штаммы делили на 2 группы: карбапенемчувствительные (карба-Ч) и карбапенемрезистентные (карба-Р). К группе карба-Ч относили изоляты, имеющие значения МПК меропенема и

имипенема в диапазоне чувствительных. К карба-Р относили штаммы с резистентностью к меропенему и/или имипенему.

2.1.2. Молекулярно-генетические методы исследования

Выделение ДНК

Для выделения ДНК использовали суточную культуру, полученную при посеве на плотные питательные среды, указанные выше. Бактериальную ДНК выделяли с помощью коммерческих наборов «ГК-экспресс» (ЦНИИЭ Роспотребнадзора) согласно инструкции производителя. Полученные образцы хранили до использования при $t - 20^{\circ}\text{C}$.

Определение генетических маркеров резистентности

Для выявления генов БЛРС и карбапенемаз использовали метод ПЦР. Для выявления генов БЛРС *bla*_{CTX-M} и *bla*_{TEM} были использованы праймеры, предложенные Edelstein M., 2003 (Таблица 2.2). Общий объем реакционной смеси составил 20 мкл, содержал 4 мкл ПЦР-микс с полимеразой горячего старта (5xScreenMix-HS, Евроген), по 2 мкл каждого из праймеров, 10 мкл деионизированной воды и пробы 2 мкл ДНК. Компоненты реакционной смеси смешивали непосредственно перед проведением эксперимента.

Результаты реакции оценивали путем проведения горизонтального электрофореза в 2% агарозном геле.

Праймеры для идентификации генов *bla*_{CTX-M} и *bla*_{TEM}

№	Праймер	Последовательность 5' – 3'	Продукт (bp)
<i>bla</i> _{CTX-M}			
1	CTX-M/F	5'-tttgcgatgtgcagtaccag-3'	544
2	CTX-M/R	5'-gatatcgttggtggtgccat-3'	
<i>bla</i> _{TEM}			
3	TEM/F	5'-ataaaattcctgaagacgaaa-3'	1080
4	TEM/R	5'-gacagttaccaatgcttaatca-3'	

Реакцию амплификации проводили по схеме:

1. Начальная денатурация - 94°C – 1,5'

2. Денатурация 94°C – 10"

Отжиг праймеров 54°C – 10".

Элонгация 72°C – 45"

ПЦР в режиме реального времени (ПЦР-РВ)

Выявление генов, кодирующих продукцию карбапенемаз, проводили с использованием наборов с гибридационно-флуоресцентной детекцией «АмплиСенс® MDR MBL-FL» (IMP, NDM, VIM), «АмплиСенс® MDR KPC/OXA-48-FL» (KPC, OXA-48), «АмплиСенс MDR Ab-OXA-FL» (OXA-23, OXA-40, OXA-58), производства ЦНИИЭ Роспотребнадзора.

Проведение ПЦР-РВ включало в себя следующие этапы:

1. Выделение ДНК (см. выше)

2. Амплификация с гибридационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени»

3. Анализ и интерпретация результатов

Общий объём реакционной смеси составил 25 мкл, включая 10 мкл пробы ДНК. Компоненты реакционной смеси смешивали непосредственно перед проведением амплификации. В качестве положительного и отрицательного контролей использовали соответствующие образцы, входящие в состав набора. Реакцию амплификации проводили по схеме, указанной в Таблице 2.3.

Таблица 2.3

Программа амплификации ПЦР-РВ для выявления генов

Цикл	Температура, °С	Время	Количество циклов
1	95	15 мин	1
2	95	5с	35
	60	30 с детекция флуор. сигнала	
	72	15 с	

Результаты оценивали согласно инструкции производителя. Образец считали положительным при значении $Ct \leq 32$. Отрицательными считали результаты с циклом порогового значения $Ct > 32$.

Мультилокусное сиквенс-типирование

Для генотипирования штаммов *A. baumannii*, *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae* использовали метод МЛСТ [93, 233, 310]. Использовали ДНК, экстрагированную из чистых культур. Подготовка матриц для секвенирования включала амплификацию внутренних фрагментов генов «домашнего хозяйства», праймеры для амплификации приведены в Таблице 2.4.

Праймеры для выявления «генов домашнего хозяйства» штаммов

A. baumannii*, *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae

Локус	Праймеры	Нуклеотидная последовательность	Продукт (bp)
<i>A. baumannii</i>			
<i>gltA</i>	Citrato F1	AAT TTA CAG TGG CAC ATT AGG TCC C	722
	Citrato R12	GCA GAG ATA CCA GCA GAG ATA CAC G	
<i>gyrB</i>	<i>gyrB</i> _F	TGA AGG CGG CTT ATC TGA GT	594
	<i>gyrB</i> _R	GCT GGG TCT TTT TCC TGA CA	
<i>gdhB</i>	GDHB 1F	GCT ACT TTT ATG CAA CAG AGC C	774
	GDH SEC F	ACC ACA TGC TTT GTT ATG	
	GDHB 775R	GTT GAG TTG GCG TAT GTT GTG C	
	GDH SEC R	GTT GGC GTA TGT TGT GC	
<i>recA</i>	RA1	CCT GAA TCT TCY GGT AAA AC	425
	RA2	GTT TCT GGG CTG CCA AAC ATT AC	
<i>cpn60</i>	<i>cpn60</i> _F	GGT GCT CAA CTT GTT CGT GA	640
	<i>cpn60</i> _R	CAC CGA AAC CAG GAG CTT TA	
<i>gpi</i>	<i>gpi</i> _F	GAA ATT TCC GGA GCT CAC AA	456
	<i>gpi</i> _R	TCA GGA GCA ATA CCC CAC TC	
<i>rpoD</i>	<i>rpoD</i> -F	ACC CGT GAA GGT GAA ATC AG	672
	<i>rpoD</i> -R	TTC AGC TGG AGC TTT AGC AAT	
<i>P. aeruginosa</i>			
<i>acsA</i>		ACCTGGTGTACGCCTCGCTGAC	842
<i>aroE</i>		TGGGGCTATGACTGGAAACC	825
<i>guaA</i>		CGGCCTCGACGTGTGGATGA	940
<i>mutL</i>		CCAGATCGCCGCCGGTGAGGTG	940
<i>nuoD</i>		ACCGCCACCCGTA CTG	1,042
<i>ppsA</i>		GGTCGCTCGGTCAAGGTAGTGG	989
<i>trpE</i>		GCGGCCCAAGGTCGTGAG	811

Локус	Праймеры	Нуклеотидная последовательность	Продукт (bp)
<i>K. pneumoniae</i>			
<i>gap</i>	gap_F	AGACGAACGGTCAGGTCAACA	662
	gap_R	AAAATCCGTGTTACCGCTGAA	
<i>rpoB (vic)</i>	rpoB_F	TGA AGG CGG CTT ATC TGA GT	1075
	rpoB_R	GCT GGG TCT TTT TCC TGA CA	
<i>mdh</i>	mdh -F	GTTTTCCAGTCACGACGTTGTACCCA ACTCGCTTCAGGTTTCAG	756
	mdh -R	TTGTGAGCGGATAACAATTTCCCGTTT TTCCCAGCAGCAG	
<i>pgi</i>	pgi_F	GTTTTCCAGTCACGACGTTGTAGAGA AAAACCTGCCTGTACTGCTGGC	566
	pgi_R	TTGTGAGCGGATAACAATTTCCGCGCC ACGCTTTATAGCGGTTAAT	
<i>phoE</i>	phoE_F	GTTTTCCAGTCACGACGTTGTAACCT ACCGCAACACCGACTTCTTCGG	602
	phoE_R	TTGTGAGCGGATAACAATTTCTGATCA GAACTGGTAGGTGAT	
<i>infB</i>	infB_F	GTTTTCCAGTCACGACGTTGTACTCG CTGCTGGACTATATTCG	462
	infB_R	TTGTGAGCGGATAACAATTTCCGCTTT CAGCTCAAGAACTTC	
<i>tonB</i>	tonB -F	GTTTTCCAGTCACGACGTTGTACTTT ATACCTCGGTACATCAGGTT	539
	tonB -R	TTGTGAGCGGATAACAATTTTCATTCGC CGGCTGRGCRGAGAG	
<i>Seq</i>	Seq -F	GTTTTCCAGTCACGACGTTGTA	
	Seq -R	TTGTGAGCGGATAACAATTTTC	

Очистку ПЦР-продуктов от избытка праймеров, димеров праймеров и дНТФ проводили ферментативным разрушением с помощью экзонуклеазы I и щелочной фосфатазы (SAP, Affymetrix, США) при 37⁰С в течение 30 мин. с последующей инактивацией при 85⁰ С.

Секвенирование проводили с использованием наборов реагентов и оборудования фирмы Applied Biosystems (США) по методике, описанной производителем. Полученные в результате секвенирования нуклеотидные последовательности генов «домашнего хозяйства» обрабатывали с помощью

программы SeqMan, затем сравнивали с базой аллелей, используя специализированную программу для обработки результатов типирования, исследуемой аллели присваивался соответствующий номер.

2.1.3. Исследование биопленкообразования у штаммов *A. baumannii*

Формирование биопленок на абиотической твердой поверхности оценивали с использованием сердечно-мозгового бульона (ВНВ; Becton Dickinson, США) по описанной ранее методике с модификациями [287]. Аликвоту (200 мкл) суточной бактериальной культуры с мутностью 0,5 по Мак Фарланду вносили в стерильные круглодонные пробирки объемом 5 мл (Falcon, Becton Dickinson, США), содержавшие 1,8 мл ВНВ с добавлением 1% раствора глюкозы. После инкубации 24 ч при температуре 37⁰С без перемешивания бульон тщательно отбирали, пробирки дважды промывали 4 мл раствора Хэнкса. Для фиксации добавляли 5 мл 4% раствора формальдегида и инкубировали 5 минут при комнатной температуре. Далее пробирки промывали дистиллированной водой, добавляли 5 мл раствора кристалл-виолета (1% раствор в 20% этаноле), (Sigma-Aldrich, США) и оставляли при комнатной температуре на 4 минуты. После удаления красителя каждую пробирку промывали 4 мл дистиллированной воды 5 раз и высушивали. Связанный краситель растворяли и элюировали в 4 мл 95% этанола в течение часа. Раствор красителя (200 мкл) переносили в прозрачный 96-луночный планшет (TPP, Швейцария) с последующим измерением оптической плотности (ОП) при длине волны 590 нм с использованием планшетного ридера Infinite 200M (Tecan, Австрия). Все изоляты тестировали в двух повторах в трех независимых экспериментах; диапазон значений ОП использовали как меру роста биопленок. Изоляты со значениями ОП $\geq 0,6$ и $< 0,6$ учитывали, как изоляты с высокой и низкой способностью к образованию биопленок соответственно.

2.2. Выделение, идентификация и анализ респираторных патогенов

Streptococcus pneumoniae

Данное проспективное исследование включило носоглоточные изоляты пневмококков, выделенные от детей, получавших стационарную или амбулаторную помощь в ФГАУ «Национальный научно-практический центр здоровья детей» Минздрава России в период с 2010 по 2016 гг. Пневмококки выделяли из посева биоматериала носоглотки на колумбийском кровяном агаре с добавлением 3% лошадиной сыворотки. Идентификацию проводили на основании морфологических и культуральных свойств, а также с помощью теста с оптохином и реакции латекс-агглютинации (Slidex Pneumo-Kit, BioMerieux, Франция). В 2010-2013 гг. капсульный тип определяли путем серологического типирования в реакции латексной агглютинации и/или реакции набухания капсулы по Нейфельду с использованием сывороток Statens Serum Institut (Дания), а начиная с 2014 г. проводили молекулярное типирование методом мультиплексной ПЦР с последующим серологическим типированием редких серотипов [8]. Нетипируемыми считали пневмококки, которые не агглютинировались ни одной из пуловых сывороток (пулы А-I и Р-T).

Чувствительность пневмококков к оксациллину (ОХА), эритромицину (ERY), клиндамицину (CLI), триметоприму/сульфаметоксазолу (SXT), хлорамфениколу (CHL) и тетрациклину (TET) определяли при помощи диско-диффузионного метода (диски Bio-Rad, США). Результаты интерпретировали согласно рекомендациям [33, 347]. В 2014-2016 гг. ОХА-, ERY- и CLI-резистентные пневмококки дополнительно исследовали с использованием E-тестов (BioMerieux, Франция). МЛУ определяли у изолятов, резистентных к трем или четырем АМП из числа PEN, ERY, CLI и SXT. У изолятов, устойчивых к оксациллину, определяли минимальную подавляющую концентрацию (МПК) пенициллина (PEN) и амоксициллина (AMX). Пограничные значения МПК для

PEN, ERY и CLI определяли в соответствии с критериями EUCAST (Таблица 2.5), а для AMX использовали критерии CLSI [136].

Таблица 2.5

Критерии оценки чувствительности к антибиотикам EUCAST 2015

Антибиотик	МПК (мг/л) EUCAST			
	<i>S.pneumoniae</i>		<i>S. pyogenes</i>	
	S ≤	R >	S ≤	R >
PEN ⁴	0,06	2	0,25	0,25
AMX ^{1,4}			н/т	н/т
API ⁴	0,5	2	н/т	н/т
COX	0,5	2	н/т	н/т
ERY ^{2,4}	0,25	0,5	0,25	0,25
CLI	0,5	0,5	0,5	0,5
SXT	1	2	1	2
CHL	8	8	8	8
TET	1	2	1	2
VNC ⁴	2	2	2	2
ETP ⁴	0,5	0,5	н/т	н/т
CLR ⁴	н/т	н/т	0,25	0,25
AZM ⁴	н/т	н/т	0,25	0,25
SPN ^{3,4} d, мм	н/т	н/т	24	19

Примечание:

¹ Чувствительность оценивается по МПК ампициллина

² Эритромицин может быть использован для определения чувствительности к азитромицину и кларитромицину

³ Интерпретация результатов определения чувствительности изолятов к спирамицину проводилась согласно стандартам комитета по антибиотикограммам Французского общества микробиологов (CASFM-2012)

н/т – не тестировали

⁴PEN – Бензилпенициллин, AMX – Амоксициллин, API – Ампициллин, ERY – Эритромицин, VNC – Ванкомицин, ETP – Эртрапенем, CLR – Кларитромицин, AZM – Азитромицин, SPN - Спирамицин

МПК антибиотика для 50% и 90% исследованных изолятов представляли в виде МПК₅₀ и МПК₉₀ соответственно. Наличие индуцибельной устойчивости к CLI у ERY-резистентных/CLI-чувствительных пневмококков регистрировали в случае уплощения зоны подавления роста (D-феномен) вокруг диска с CLI, расположенного рядом с ERY-диск (расстояние между краями дисков 12-16 мм).

Детекцию генов резистентности *ermB* и *mef* у ERY-резистентных пневмококков проводили при помощи ПЦР описанными ранее методами [7].

Выявление генов, кодирующих пили типа 1 и 2 (PI1 и PI2) у пневмококков серотипа 19A

Присутствие островков, кодирующих пили (pilus islet, PI), типа 1 (PI1) определяли с помощью амплификации внутреннего фрагмента геномного региона PI1 (также называемого островком патогенности *rlrA*) с использованием ранее описанных праймеров RLRA-F (5'-TCTGATAGATGAGACGCTGTTG-3') и RLRA-R (5'-CTCCGCTTCTTTCTACTACAAG-3')³⁰. Для детекции PI2 модифицировали праймеры, описанные Bagnoli³¹ (PI2-F: 5'-CGTGGGTATCAGGTGTCSTATG-3' и PI2-R: 5'-TGCAGTGAATAGCTTTTAAAGAA-3').

Амплификация, секвенирование и генетический анализ генов *pbp1a*, *pbp2b* и *pbp2x*

Фрагменты генов *pbp1a*, *pbp2b* и *pbp2x*, кодирующих транспептидазные домены ПСБ, амплифицировали методом ПЦР и секвенировали с использованием метода Сэнгера [203]. На основании результатов секвенирования определяли аминокислотную структуру фрагментов *pbp1a* (позиции 341-582), *pbp2b* (позиции 375-652) и *pbp2x* (позиции 337-661). Полученные аминокислотные последовательности сравнивали со структурой ПСБ эталонного штамма *S. pneumoniae* – R6, а также клонов Taiwan19F-14/ST236, Spain9V-3/ST156 и

MDR19A/ST320, используя описанные ранее учетные номера последовательностей в базе данных GenBank [240]. Анализ аминокислотной структуры ПСБ и построение филогенетического дерева методом ближайших соседей проводили с помощью программного обеспечения [219].

Streptococcus pyogenes

Для посева использовали 5% кровяной агар. Идентификацию *S. pyogenes* проводили общепринятыми в микробиологии методами, используя диски с бацитрацином, реакцию латекс-агглютинации (Slidex strepto-kit, bioMerieux) и на анализаторе MALDI-TOF MS (Microflex, Bruker Daltonics). Чувствительность к ERY и CLI определяли диско-диффузионным методом (диски BioRad) на среде Мюллера-Хинтон с добавлением 5% крови. У ERY-резистентных изолятов *S. pyogenes*, выделенных в 2014 - 2016 гг, МПК ERY и CLI определяли с помощью Е-теста, (bioMerieux, Франция). Интерпретацию результатов чувствительности штаммов *S. pyogenes* к антибиотикам проводили по критериям EUCAST, 2015 [347] (Таблица 2.5). Результаты чувствительности *S. pyogenes* к азитромицину и кларитромицину, полученные диско-диффузионным методом, интерпретировали по МУК 4.2. 1890-04 [59] в связи с отсутствием соответствующих критериев в стандартах EUCAST. Результаты определения чувствительности к спирамицину диско-диффузионным методом трактовались согласно стандартам комитета по антибиотикограммам Французского общества микробиологов (CASFM-2012) [139]. К категории «нечувствительный» мы относили изоляты, обладавшие умеренным и высоким уровнем резистентности.

Статистические методы

Статистический анализ проводили с применением пакета IBM SPSS Statistics for Windows, версия 20.0 (IBM Corp.). Для анализа таблиц сопряженности при сравнении долей использовали χ^2 или z-критерий, где это

необходимо. Различия в биопленкообразовании между клональными комплексами и сиквенс-типами оценивали с помощью U-критерия Краскелла-Уоллиса с последующим попарным сравнением методом Манна-Уитни (U-тест) с поправкой Бонферрони для множественных попарных сравнений. Различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

Глава 3. Госпитальные грамотрицательные бактерии

3.1. Динамика микробиоты, колонизирующей слизистые оболочки во время пребывания в ОРИТ, при анализе трахеального аспирата

Состав микробиоты, выделенной из трахеального аспирата во все рассматриваемые периоды, включал 235 изолятов на 136 проб. С наибольшей частотой от пациентов, находящихся на ИВЛ, выделялись: *K. pneumoniae* (24,6%), *A. baumannii* (23,8%), *P. aeruginosa* (11,9%), *Ralstonia pickettii* (7,7%) и *Staphylococcus aureus* (7,2%). Долевое участие в микробиоте трахеального аспирата *E. faecium* и *E. coli* составило 3,8% и 4,2% соответственно. На остальные виды микроорганизмов, выделенных из трахеального аспирата с частотой от 0,5% до 2,5%, пришлось 14,8%.

Анализ динамики колонизации слизистых респираторного тракта при исследовании трахеального аспирата проведенного по трем периодам пребывания в ОРИТ, показал, что при поступлении в ОРИТ (I период) в совокупности было выделено всего 37 изолятов, включавших *K. pneumoniae* (27%), *A. baumannii* (29,7%), *S. aureus* (18,9%) и *E. coli* (13,5%). Во II периоде (3-5 сутки пребывания в ОРИТ) в микробный спектр трахеального аспирата добавились и другие представители внутрибольничной микробиоты, такие как *R. pickettii* (10,5%) и *P. aeruginosa* (9,2%). В этот же период уменьшилась в 2 раза (до 9,2%) частота выделения *S. aureus*. В III периоде (>5 суток) практически исчез *S. aureus* (до 2,4%, $p < 0,001$), но увеличилось долевое участие в микробиоте *P. aeruginosa* (до 16,4%, $p < 0,05$). В то же время *K. pneumoniae* (28,7%) и *A. baumannii* (22,1%) и в этот период сохранили свое доминирующее положение внутри микробиоты трахеального аспирата (Таблица 3.1).

Спектр условно-патогенных микроорганизмов, выделенных из трахеального аспирата (2014 - 2016 гг)

Период и число исследований	<i>K. pneumoniae</i>	<i>A. baumannii</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>R. pickettii</i>	<i>S. aureus</i>	<i>E. Coli</i>	<i>E. faecium</i>	<i>S. maltophilia</i>	<i>Candida spp</i>	Другие виды	Всего изолятов	Роста нет
I n=37	10 (27%)	11 (29%)	1 (2%)	0	7 (18%)	5 (13%)	0	2 (5%)	1 (2%)	0	37	18 (48%)
II n=41	17 (22%)	18 (23%)	7 (9%)	8 (10%)	7 (9%)	1 (1%)	3 (3%)	1 (1%)	2 (2%)	12 (15%)	76	1 (1%)
III n=58	35 (28%)	27 (22%)	20 (16%)	10 (8%)	3 (2%)	4 (3%)	6 (4%)	3 (2%)	2 (1%)	12 (9%)	122	9 (7%)
Всего n=136	62 (26%)	56 (23%)	28 (11%)	18 (7%)	217 (7%)	10 (4%)	9 (3%)	6 (2%)	5 (2%)	24 (10%)	235	28 (11%)

P. aeruginosa: $p_{I-II} = 0,20$; $p_{I-III} = 0,03$;

R. pickettii: $p_{I-II} = 0,04$; $p_{I-III} = 0,07$;

S. aureus: $p_{I-III} < 0,001$;

E. coli: $p_{I-II} < 0,01$; $p_{I-III} < 0,02$

Профиль антибиотикорезистентности условно-патогенной микрофлоры,
выделенной из исследованных локусов

Мониторинг антибиотикорезистентности проводился у представителей ведущей группы патогенов, учитывая высокую частоту их циркуляции в ОРИТ.

Результаты определения резистентности к антибиотикам у выделенных штаммов грамотрицательной флоры (Таблица 3.2) выявили, что среди изолятов *K. pneumoniae*, *A. baumannii* и *P. aeruginosa* резистентностью к меропенему обладали 20,5%, 69,6% и 61,5% штаммов соответствующих микроорганизмов. К эртапенему было резистентных 22,2% штаммов *K. pneumoniae*. На высоком уровне определялась резистентность к аминогликозидам у *A. baumannii* (96,4% - 56%), *P. aeruginosa* (80,6% - 69,2%) и *K. pneumoniae* (67,7% - 41,1%).

Таблица 3.2

**Резистентность (в %) к антибиотикам грамотрицательных бактерий,
выделенных от детей в ОРИТ в период 2014 -2016 гг**

Антибиотики	<i>K. pneumoniae</i>		<i>A. baumannii</i>		<i>P. aeruginosa</i>	
	n	%	n	%	n	%
AMC¹	44	93,2	-	-	-	-
MEM	73	20,5	56	69,6	39	61,5
IPM	73	20,5	56	66,1	39	64,1
ETP	9	22,2	-	-	-	-
CZD¹	73	79,4	15	93,3	38	71,0
FEP	69	91,3	45	95,6	39	66,7

Продолжение таблицы 3.2

Антибиотики	<i>K. pneumoniae</i>		<i>A. baumannii</i>		<i>P. aeruginosa</i>	
	n	%	n	%	n	%
GMN	73	56,2	56	96,4	36	80,6
AKN	73	64,4	55	96,4	39	69,2
NTM	73	41,1	56	76,8	36	75,0
TMN	31	67,7	50	56,0	39	69,2
CIP	71	70,4	55	98,2	38	68,4

Примечание: АМС - Амоксициллин/клавуланат, CZD - Цефтазидим

K. pneumoniae

Сравнительный анализ антибиотикоустойчивости штаммов *K. pneumoniae*, выделенных в 3 периода исследования (2014, 2015 и 2016 гг.), выявил рост резистентности к тестируемым препаратам в последний период. Наиболее значимым было увеличение доли изолятов, нечувствительных к карбапенемам (меропенему и имипенему), которая поднялась с 16% до 47% $p < 0,05$ в 2016, г. За этот же период отмечено возрастание уровня резистентности и к таким антибиотикам, как нетилмицин (с 20% до 82%, $p < 0,001$), ципрофлоксацин (с 60% до 94%, $p < 0,01$), ко-тримоксазол (с 60% в 2015 г до 82% в 2016 г, $p = 0,189$).

**Сравнительная частота (абс и %) нечувствительных к антибиотикам
штаммов *K. pneumoniae*, выделенных от детей в ОРПТ
в периоды 2014 -2016 гг**

Антибиотики	2014		2015		2016		2014-2016	
	n	%	n	%	n	%	n	%
MEM	4/25	16,0	3/31	9,7	8/17	47,0 P I-III = 0,03	15/73	20,5
IPM	4/25	16,0	3/31	9,7	8/17	47,0	15/73	20,5
ETP	1/6	16,7	1/3	-	-	-	2/9	22,2
AMC	-	-	26/29	89,6	15/15	100,0	41/44	93,2
GMN	16/25	64,0	13/31	41,9	12/17	70,6	41/73	56,2
AKN	20/25	80,0	14/31	45,2	13/17	76,5	47/73	64,4
NTM	5/25	20,0	11/31	35,5	14/17	82,3 P I-III=0,0001	30/73	41,1
TMN	17/25	68,0	4/6	66,7	-	-	21/31	67,7
CIP	15/25	60,0	19/29	65,5	16/17	94,1 P I-III=0,014	50/71	70,4
ATM ¹	1/1	-	22/23	95,6	16/17-	94,1	39/41	95,1
NFE ¹	-	-	22/23	95,6	-	-	22/23	95,6
FOS	-	-	-	-	13/17	76,4	13/17	76,4
SXT	-	-	12/20	60,0	14/17	82,3	26/37	70,3

Примечание: ¹ATM – Азтреонам, NFE - Нитрофурантоин

A. baumannii

Относительно *A. baumannii* отмечено, что резистентность к меропенему и имипенему за сравниваемые периоды наблюдения возросла с 27,3% до 87,5% и 83,3% соответственно (p<0,001). Также отмечено возрастание частоты выявления

нечувствительных штаммов к нетилмицину (с 45,4% до 83,3%, $p < 0,05$). Однако в период 2015 г среди изолятов *A. baumannii* отмечено уменьшение частоты штаммов, устойчивых к сульперазону (с 63,6% до 38,1%, $p = 0,161$) (Таблица 3.4).

Таблица 3.4

Частота (абс, %) выделения нечувствительных к антибиотикам штаммов *A. baumannii* от детей в ОРИТ в периоды 2014 -2015 гг

Антибиотики	2014 г		2015 г		2016 г		2014-2016 гг	
	I		II		III			
	n	%	n	%	n	%	n	%
MEM	3/11	27,3	15/21	71,4 $P_{I-II} = 0,17$	21/24	87,5 $P_{I-III} = 0,004$	39/56	69,6
IPM	3/11	27,3	14/21	66,7 $P_{I-II} = 0,031$	20/24	83,3 $P_{I-III} = 0,0012$	37/56	66,1
FEP	10/11	90,9	11/11	100	23/24	95,8	44/46	95,6
GMN	10/11	90,9	21/21	100	23/24	95,8	54/56	96,4
AKN	10/11	90,9	21/21	100	22/23	95,6	53/55	96,4
NTM	5/11	45,4	18/21	85,7 $P_{I-II} = 0,014$	20/24	83,3 $P_{I-III} = 0,021$	43/56	76,8
TMN	5/11	45,4	11/15	73,3 $P_{I-II} = 0,147$	12/24	50,0	28/50	56,0
CIP	10/11	90,9	20/20	100	24/24	100	54/55	98,2
SXT	-	-	-	-	16/24	66,7	16/24	66,7

P. aeruginosa

Результаты динамического наблюдения за изолятами *P. aeruginosa* показали цикличность изменений уровня устойчивости микроорганизма к карбапенемам и цефалоспорином. После снижения уровня нечувствительности к карбапенемам в 2015 г (с 60,0% до 35,7%) в 2016 г вновь происходит увеличение частоты циркуляции нечувствительных изолятов до 86,7% ($p < 0,01$). Сходная динамика проявлялась и в отношении цефтазидима, цефепима, тобрамицина и ципрофлоксацина (Таблица 3.5).

Таблица 3.5

Динамика частоты (абс, %) выделения нечувствительных к антибиотикам штаммов *P. aeruginosa* от детей в ОРИТ в периоды 2014 -2016 гг

Антибиотики	2014 г I		2015 г II		2016 г III		2014-2016 гг	
	n	%	n	%	n	%	n	%
MEM	6/10	60,0	5/14	35,7 $P_{II-III} = 0,046$	13/15	86,7 $P_{I-III} = 0,12$	24/39	61,5
IPM	6/10	60,0	6/14	42,8 $P_{II-III} = 0,0126$	13/15	86,7 $P_{I-III} = 0,12$	25/39	64,1
FEF	7/10	70,0	6/14	42,8 $P_{II-III} = 0,0126$	13/15	86,7 $P_{I-III} = 0,296$	26/39	66,7
CZD	8/10	80,0	6/13	46,1	13/15	86,7 $P_{II-III} = 0,021$	27/38	71,0
TCC¹	-	-	4/9	44,4	13/15	86,7 $P_{II-III} = 0,025$	17/24	70,8
PIP¹	-	--	8/14	57,1	13/15	86,7 $P_{II-III} = 0,071$	21/29	72,4
PZT¹	-	-	-	-	8/12	66,7	8/12	66,7

Антибиотики	2014 г I		2015 г II		2016 г III		2014-2016 гг	
	n	%	n	%	n	%	n	%
GMN	9/10	90,0	10/14	71,4	10/12	83,3	29/36	80,6
AKN	7/10	70,0	9/14	64,3	11/15	73,3	27/39	69,2
NTM	7/10	70,0	10/14	71,4	10/12	83,3	27/36	75,0
TMN	7/10	70,0	7/14	50,0	13/15	86,7 Р п-ш = 0,031	27/39	69,2
COL	0/10	0	0/13	0	0/14	0	0/37	0
CIP	7/10	70,0	6/13	46,1	13/15	86,7 Р п-ш = 0,021	26/38	68,4

Примечание: TCC - Тикарциллин/клавуланат, PIP – Пиперациллин, PZT - Пиперациллин/тазобактам, COL – Колистин

3.2. Результаты микробиологического исследования крови

Спектр микроорганизмов, выделенных из гемокультур

В период 2013 – 2016 гг. было проанализировано 3232 гемокультур, полученных от детей, находившихся в ОРИТ С-1, с симптомами бактериальной инфекции и с диагностической целью (мониторинг). Для мониторинга забор крови осуществлялся дважды в неделю.

Кроме того, был исследован 341 образец гемокультуры от пациентов с тяжелой черепно-мозговой травмой, находившихся в ОРИТ С-2.

Спектр микроорганизмов, выделенных из положительных образцов крови двух стационаров представлен в Таблице 3.6.

Спектр микроорганизмов, выделенных из гемокультур

Микроорганизмы	Доля в микробном спектре, С-1		Доля в микробном спектре, С-2	
	абс	%	абс	%
<i>K. pneumoniae</i>	43	19,9	12	36,3
<i>Candida spp.</i>	62	28,7	4	12,1
<i>Acinetobacter spp.</i>	15	6,9	4	12,1
<i>S. marsescens</i>	11	5,0	2	6,0
<i>S. maltophilia</i>	6	2,7	2	6,0
<i>P. aeruginosa</i>	11	5,0	2	6,0
<i>E. faecium</i>	12	5,5	2	6,0
<i>E. faecalis</i>	17	7,8	2	6,0
<i>S. aureus</i>	5	2,3	1	3,0
<i>S. viridans</i>	6	2,7	-	0
Другие ¹	28	12,9	2	6,0
Всего	216	100	33	100

Примечание:

¹ *Corynebacterium spp*, *Enterobacter spp*, *Streptococcus salivarius*, *Escherichia coli*, *Micrococcus luteus*, *Streptococcus parasanguinis*, *Bacillus thuringiensis*, *Brevundimonas aurantiaca*, *Burkholderia cenocepacia*, *Klebsiella oxytoca*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Leuconostoc mesentoides*, *Paenibacillus pasadenensis*, *Pseudomonas spp*, *Rhodotorula mucilaginosa*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus sanguinis*

В С-1 в монокультуре микроорганизмы высевали в 91,4% случаях, в ассоциациях – 8,6%. Лидирующее место по частоте изоляции занимают грибы рода *Candida* – 62 (28,7%). *K. pneumoniae* составила 19,9% микробного спектра, энтерококки были представлены: *E. faecalis* – 17 (7,8%), *E. faecium* – 12 (5,5%).

P. aeruginosa и *S. marcescens* выделяли из положительных образцов крови с одинаковой частотой – 11 (5%). *A. baumannii* выделели в 9 (6,9%) случаях. На долю *S. aureus* пришлось всего 5 (2,3%) случаев. Доля других микроорганизмов суммарно составила 12,9% (28).

Как было сказано выше, лидирующее место в микробном спектре положительных гемокультур занимали грибы рода *Candida*. Обращает на себя внимание тот факт, что 82% состава грибов рода *Candida* занимает *C. parapsilosis*, и только этот вид грибов встречался как в монокультуре 46 (92%), так и в ассоциациях 5 (9,8%). На долю грибов *C. albicans*, *C. glabrata* и *C. guilliermondii* пришлось 7 (11,3%), 3 (4,8%) и 1 (1,6%) случаев, соответственно. Видовой состав грибов рода *Candida* представлен в таблице 3.7.

Таблица 3.7

Спектр грибов рода *Candida* из положительных образцов крови

Вид грибов рода <i>Candida</i>	n	%
<i>C. parapsilosis</i>	51	82,3
<i>C. albicans</i>	7	11,3
<i>C. glabrata</i>	3	4,8
<i>C. guilliermondii</i>	1	1,6

В положительных образцах крови, полученных из С-2, в монокультуре микроорганизмы высевали в 89% случаях, а в ассоциациях – 11%. Лидирующее место в микробном спектре положительных гемокультур занимала *K. pneumoniae*, составлявшая 36,3% (12/33) всех изолятов. Второе место в равной доле (по 4 штамма, 12,1%) принадлежало *A. baumannii* и грибам *C. albicans*. На долю *S.*

marsescens, *S. maltophilia*, *P. aeruginosa*, *E. faecium*, *E. faecalis* пришлось по 6%. На долю других представителей микробного спектра: *S. mitis*, *S. aureus*, *B. gladiolii* пришлось по 3%.

**Чувствительность к антибиотикам микроорганизмов,
выделенных из положительных гемокультур**

С практических позиций для проведения адекватной антибиотикотерапии инфекционного процесса необходимо знание чувствительности возбудителя к антибактериальным препаратам. Для этой цели был проведен анализ чувствительности к антибиотикам основных микроорганизмов, выделенных из положительных гемокультур и ликвора в период 2013 - 2016 гг (Таблица 3.8).

Таблица 3.8

**Частота резистентных штаммов,
выделенных из положительных гемокультур**

Антибиотик	<i>A. baumannii</i> (n=13)		<i>K. pneumoniae</i> (n=55)	
	n	%	n	%
AKN	9	69	23	41,8
GMN	7	53	40	72,7
NTM	7	53	26	47,3
TMN	7	53	н/г*	н/г
MEM	8	61	13	23,6
IPM	8	61	13	23,6
COL	0	0	-	-
FEP	7	53	-	-
CIP	9	69	44	80
API	-	-	37	67,2
AMC	-	-	38	69,1
SXT	н/г	н/г	27	49,1

Примечание: * - не тестировали, «-» - не определяется чувствительность

Результаты изучения резистентности к антибиотикам изолятов *A. baumannii* показали, что эти штаммы обладали высокой резистентностью ко всем группам антибиотиков. Так, к аминогликозидам гентамицину, нетилмицину и тобрамицину резистентность составила по 53%, а для амикацина - 69%. К карбапенемам резистентными были 61% гемоизолятов *A. baumannii*.

EUCAST не рекомендует определять чувствительность *Acinetobacter spp* к цефалоспорином ввиду их низкой активности в отношении этих бактерий. Однако мы оценили уровень резистентности *A. baumannii* к цефепиму диско-диффузионным методом по критериям CLSI. Результаты нашего исследования показали, что резистентность *A. baumannii* к цефепиму составила 53%. Резистентность к ципрофлоксацину составила 69%.

Результаты изучения резистентности к антибиотикам *K. pneumoniae* показали, (Таблица 3.8) устойчивость к ампициллину и амоксициллину/клавуланату у 67% и 69% изолятов соответственно. Среди аминогликозидов наибольшая устойчивость была выявлена для гентамицина (72%), к амикацину и нетилмицину нечувствительные штаммы встречались в 41% и 47% соответственно. Большинство гемоизолятов *K. pneumoniae* сохраняло чувствительность к карбапенемам, доля резистентных штаммов составила 23%. К бисептолу резистентность составила 49%, к ципрофлоксацину 80%.

Для штаммов *P. aeruginosa* была определена чувствительность к аминогликозидам, карбапенемам, антисинегнойным пенициллинам, цефалоспорином, ципрофлоксацину. К аминогликозидным антибиотикам устойчивость варьировала от 38% (нетилмицин) до 53% (амикацин, гентамицин). На долю нечувствительных к карбапенемам (меропенему и имипенему) изолятов *P. aeruginosa* пришлось по 46%. К антисинегнойным пенициллинам пиперациллин/тазобактаму и тикарциллин/клавуланату резистентность была низкая – 15% и 38% соответственно. Активность антисинегнойных цефалоспоринов (цефтазидим, цефепим) была невысока: устойчивых штаммов к цефтазидиму было 40%, а к цефепиму 53%. На уровне 30% была выявлена резистентность штаммов к ципрофлоксацину.

Все штаммы энтерококков были чувствительны к линезолиду и тигециклину. Нечувствительных штаммов к ампициллину среди *E. faecalis* найдено не было, а среди *E. faecium* резистентность к данному антибиотику составила 86%. К ванкомицину был резистентен только один штамм *E. faecium*. К левофлоксацину и ципрофлоксацину доля нечувствительных штаммов для *E. faecalis* составила 31% и 26%, а для *E. faecium* была значительно выше – 71% и 81% соответственно. К нитрофурантоину резистентных штаммов *E. faecalis* выявлено не было, а доля *E. faecium* составила 40%.

Результаты нашего исследования показали, что все штаммы *S. aureus*, выделенные из положительных гемокультур, были чувствительны к ванкомицину, линезолиду, тигециклину и фузидину. Доля MRSA составила 33%. По одному штамму были нечувствительны к амикацину, и рифампицину.

3.3. Результаты микробиологического исследования ликвора

За период 2013-2016 гг. из С-1 была получена 31 проба ликвора и из С-2 446 образцов ликвора. Рост микрофлоры С-1 был получен лишь в трех образцах. Микроорганизмы были представлены тремя видами, выделенными только в монокультуре.

H. influenzae была выделена у пациента 11 месяцев, с диагнозом: Острый бактериальный менингит. Острый средний катаральный отит. При бактериологическом исследовании носоглотки и крови *H. influenzae* не обнаружена.

S. pneumoniae был выявлен у ребенка 5 лет 3 месяцев с диагнозом: Острый гнойный мастоидит. Острый менингит. В бактериологических посевах из носоглотки, зева и крови данный возбудитель не обнаружен.

S. warneri был выделен из ликвора у больного 6 лет 5 месяцев с диагнозом: Посттравматическая отоликворея. В мазке из зева и крови этот микроорганизм не обнаружен.

Рост микрофлоры из образцов ликвора С-2 был зафиксирован в 27 (6,1%) пробах. Видовой состав выделенных микроорганизмов из положительных образцов ликвора С-2 представлен в таблице 3.9.

Таблица 3.9

Микробный спектр положительных посевов ликвора

Микроорганизмы	n	%
<i>A. baumannii</i>	4	16,7
<i>K. pneumoniae</i>	4	16,7
<i>E. faecalis</i>	3	12,5
<i>P. aeruginosa</i>	2	8,3
<i>Streptococcus spp.</i> (<i>salivarius, infantis</i>)	2	8,3
Другие*	9	37,5
Всего	24	100,0

* *S. aureus*, *A. lwoffii*, *A. junii*, *B. gladiolii*, *Bacillus flexus*, *E. coli*, *E. faecium*, *S. marsescens*, *S. pneumoniae* (по 1 изоляту)

Микроорганизмы высевались как в монокультуре 22 (81%), так и в ассоциациях – 5 (18%). С одинаковой частотой выявлялись *A. baumannii* и *K. pneumoniae* - 4 (16,7%). На долю *E. faecalis* пришлось 12,5%. Другие представители микробного спектра - *P. aeruginosa*, *Streptococcus spp. (salivarius, infantis)* составили по 8,3%.

Микробные ассоциации, составившие 18%, в основном были двухкомпонентными, в которых одним из представителей была грамотрицательная бактерия рода *Acinetobacter*: *A. baumannii*+*K. pneumoniae*, *A. baumannii*+*E.coli*, *A. junii*+*B. flexus*, *A. lwoffii*+*E. faecalis*. Одна ассоциация состояла из трех микроорганизмов *P. aeruginosa*+*K. pneumoniae*+*E. faecalis*.

Чувствительность к антибиотикам микроорганизмов, Выделенных из ликвора

Из четырех изолятов *A. baumannii* один штамм был нечувствителен к нетилмицину, три штамма были резистентны к тобрамицину, а к амикацину и генамицину проявили резистентность все четыре штамма. К карбапенемам устойчивых штаммов было два. К цефепиму и ципрофлоксацину были резистентны все исследуемые штаммы.

Все четыре изолята *K. pneumoniae* были не чувствительны к ампициллину, амоксициллину/клавуланат, бисептолу, нитрофуронтоину и амикацину. К ципрофлоксацину было нечувствительно три штамма. К имипенему резистентных было два штамма, а к меропенему – один.

Все протестированные штаммы *E. faecalis* (n=3) были чувствительными к ванкомицину, имипенему, линезолиду, нитрофурантоину, тигециклину. К ампициллину, ципрофлоксацину и левофлоксацину было нечувствительных по одному изоляту.

Из двух штаммов *P. aeruginosa*, выделенных из ликвора, один штамм обладал МЛУ и был чувствителен только к колистину. Другой штамм имел чувствительность к амикацину и нетилмицину, карбапенемам, ципрофлоксацину и колистину.

Выделенные микроорганизмы из ликвора у детей с острым менингитом были чувствительны ко всем тестируемым группам антибиотиков.

Таким образом, возбудители, выделенные из положительных проб ликвора у детей С-2, отличались от такового полученных от детей С-1, которые были типичными возбудителями острого менингеального воспаления и обладали чувствительностью к антибактериальным препаратам, которые используются для лечения этих инфекций. У детей С-2 в микробном пейзаже преобладали

оппортунистические возбудители, что говорит о вероятном инфицировании в стационаре.

Микроорганизмы, выделенные из положительных образцов крови в монокультуре, скорее всего, указывают на истинную бактериемию, но выделение СКН вызывает сомнение в их истинной роли в развитии инфекций кровотока. Возбудители, выделенные в ассоциациях, скорее всего, являются следствием контаминации при взятии материала. Чаще всего, из положительных гемокультур у детей С-2 выделялись оппортунистические микроорганизмы, а от пациентов С-1 СКН. Возможно, это связано с неправильным забором материала (например, кровь забирали из ЦВК), что значительно увеличивает риск контаминации.

Результаты изучения резистентности к антибиотикам изолятов, выделенных из положительных гемокультур и проб ликвора, показали высокую долю резистентных штаммов оппортунистических микроорганизмов. Однако возбудители острых менингитов были чувствительны ко всем антибиотикам, которые обычно применяют при данном виде инфекции.

Глава 4. Клональное разнообразие, молекулярные механизмы устойчивости к карбапенемам и биопленкообразование у карбапенемрезистентных штаммов *Acinetobacter baumannii*, выделенных в г. Москве

В настоящей главе были охарактеризованы 88 карбапенемрезистентных (карба-Р) изолятов *A. baumannii*, выделенных у пациентов из трех стационаров города Москвы в 2012-2015 гг. Исследованные изоляты были подвергнуты МЛСТ, исследованию спектра антибиотикорезистентности и носительства генов карбапенемаз, а также способности к биопленкообразованию.

4.1. Распределение клональных комплексов и сиквенс-типов согласно схемам Oxford и Pasteur

Всего было исследовано 88 карба-Р изолятов *A. baumannii*, выделенных из крови (14%), трахеального аспирата (48%), отделяемого раны (9%) и скрининговых мазков из зева/ануса (29%). Исходно для всех изолятов мы провели МЛСТ по схеме Oxford, выявив 15 сиквенс-типов, которые принадлежали к трем клональным комплексам: CC92^{Oxf} (n=61), CC109^{Oxf} (n=1) и CC944^{Oxf} (n=26).

CC92^{Oxf} (69%) был представлен тремя однолокусными вариантами (single locus variant, SLV) и восемью двухлокусными вариантами (double locus variant, DLV) ST92^{Oxf}. Доминирующим генотипом был ST348^{Oxf} (n=30), который составил 34% всей коллекции. CC944^{Oxf} состоял из 26 изолятов (30% всей коллекции), относившихся к трем сиквенс-типам, включая ST944^{Oxf} (n=16) и два его SLV: ST1103^{Oxf} (n=3) и ST1104^{Oxf} (n=7). Один изолят ST441^{Oxf} принадлежал к CC109^{Oxf} (Таблица 4.1). Взаимосвязи между сиквенс-типом и типом образца – источником изолята выявлено не было (данные не представлены).

Таблица 4.1

Распределение 88 карбапенемрезистентных изолятов *A. baumannii* в соответствии с генотипом по схемам МЛСТ Oxford и Pasteur, распространенностью в стационарах, носительством *bla*_{OXA}-подобных генов и гена *bla*_{CTX-M-115}

МЛСТ Oxford		Комментарий	n (% от всех изолятов) (n=88)	Стационар (число изолятов)			тип <i>bla</i> _{OXA} ^а	<i>bla</i> _{CTX-M-115} ^б	МЛСТ Pasteur ^в	
СС	ST ^г			С-1 n=27	С-2 n=41	С-3 n=20			СС	ST
СС92			61 (69%)	16	30	15			СС2	
	348	DLV ST92	30	3	27	0	72	отр.		2
	450	DLV ST92	9	9	0	0	72 ^д	отр.		2
	493 <i>ΔrpoD</i> е	DLV ST92	8	0	0	8	23	отр.		570
	493	DLV ST92	3	0	1	2	ж	отр.		45; 570 ^з
	1128	SLV ST92	3	0	0	3	72	отр.		2
	208	SLV ST92	2	2	0	0	72	отр.		2
	281	DLV ST92	2	1	1	0	72	отр.		2
	436	SLV ST92	1	0	0	1	23	отр.		2
	558	DLV ST92	1	1	0	0	72	пол.		45
	1097	DLV ST92	1	0	1	0	23	отр.		570
	1102	DLV ST92	1	0	0	1	72	отр.		2

Продолжение таблицы 4.1

МЛСТ Oxford			n (% от всех изолятов) (n=88)	Стационар (число изолятов)			тип <i>bla</i> _{OXA} ^a	<i>bla</i> _{CTX-M-115} ^б	МЛСТ Pasteur ^в	
СС	ST ^г	Комментарий		С-1 n=27	С-2 n=41	С-3 n=20			СС	ST
СС944			26 (30%)	10	11	5			Синг.	
	944		16	3	10	3	72	пол.		78
	1104	SLV ST944	7	7	0	0	72	пол.		78
	1103	SLV ST944	3	0	1	2	72 ^и	и		78
СС109									СС1	
	441	SLV ST109	1 (1%)	1	0	0	72	отр.		826

Примечание. DLV – двухлокусный вариант; SLV – однолокусный вариант; пол. – положительный; отр. – отрицательный; Синг. – синглетон.

^a Все изоляты конкретного сиквенс-типа имели соответствующий тип *bla*_{OXA}, если не указано иное.

^б Наличие гена *bla*_{CTX-M-115} определяли у всех изолятов, относившихся к СС944^{Oxf}, и как минимум у одного изолята каждого сиквенс-типа не-СС944^{Oxf}, выделенного в каждом из стационаров.

^в МЛСТ по схеме Pasteur было выполнено как минимум у одного изолята каждого Oxford-сиквенс-типа из каждого стационара.

^г Сиквенс-типы расположены в порядке убывания частоты встречаемости. Жирным шрифтом выделены номера впервые описанных сиквенс-типов.

^д Один изолят имел также *bla*_{OXA-23}.

^е Вариант ST493 с делецией 18 п.о. Δ229-246 в алелли *rpoD*.

^ж *bla*_{OXA-72} – два изолята (С-3), *bla*_{OXA-23} – один изолят (С-2).

^з ST45, два изолята (С-3); ST570, один изолят (С-2).

^и Из трех изолятов один был носителем *bla*_{OXA-72} и *bla*_{CTX-M-115} (С-2), один – *bla*_{OXA-72}, *bla*_{OXA-23} и *bla*_{CTX-M-115} (С-3), один – только *bla*_{OXA-72} (С-3).

Шесть из 15 Oxford-сиквенс-типов ранее не были представлены в базе данных МЛСТ *A. baumannii* [93]. Новые комбинации аллелей встречались у пяти из шести впервые описанных сиквенс-типов; ST1128^{Oxf} содержал новую *gpi*-аллель. Восемь из 11 изолятов ST493^{Oxf} несли делецию размером 18 п.о. в аллели *rpoD* (позиции 229-246). Этот вариант ST493, который мы обозначили как ST493 Δ *rpoD*^{Oxf}, встречался только в одном изучаемом стационаре, С-3 (см. ниже). Впервые описанные ST1103^{Oxf} и ST1104^{Oxf} составили 38% (10/26) изолятов из числа представителей СС944^{Oxf}.

Для выявления взаимосвязи между изолятами СС944^{Oxf} и известными международными клонами мы провели дополнительное генотипирование *A. baumannii* по схеме Pasteur. Все три сиквенс-типа СС944^{Oxf} соответствовали ST78^{Pas} (Таблица 4.1), который был ранее описан в литературе [128, 308, 287].

Мы провели дальнейшее сравнение схем МЛСТ Oxford и Pasteur, выполнив Pasteur-МЛСТ как минимум одного изолята каждого Oxford-сиквенс-типа из каждого стационара (Таблица 4.1.). Обе схемы МЛСТ распределили исследованные изоляты между тремя клональными группами [227, 391]: СС92^{Oxf}/СС2^{Pas} (относится к IC2), СС109^{Oxf}/СС1^{Pas} (относится к IC1) и СС944^{Oxf}/ST78^{Pas}.

В то же время, схема Oxford позволила идентифицировать 15 сиквенс-типов, тогда как схема Pasteur выделила только пять сиквенс-типов. Единственный Pasteur-сиквенс-тип ST2^{Pas} охватывал семь из одиннадцати Oxford-сиквенс-типов, принадлежавших к СС92^{Oxf}; ST78^{Pas} соответствовал трем сиквенс-типам схемы Oxford. ST493^{Oxf} был эквивалентен двум сиквенс-типам схемы Pasteur: ST45^{Pas} и ST570^{Pas}; последний был идентичен ST493 Δ *rpoD*^{Oxf} (Таблица 4.1.).

В связи с тем, что схема Oxford показала более высокую разрешающую способность, мы использовали ее для анализа разнообразия генотипов карба-Р *A. baumannii* на уровне стационара (Рис. 4.1, Таблица 4.1). Распространенность клонов в трех исследуемых стационарах отличалась незначимо ($\chi^2=7,3$; $p=0,294$), однако распределение сиквенс-типов было разным ($\chi^2=123$; $p<0,001$). Десять из 15

выявленных Oxford-сиквенс-типов встречались в единственном стационаре, пять сиквенс-типов были обнаружены в двух стационарах, и только ST944^{Oxf} присутствовал во всех трех стационарах (Рис. 4.1, Таблица 4.1).

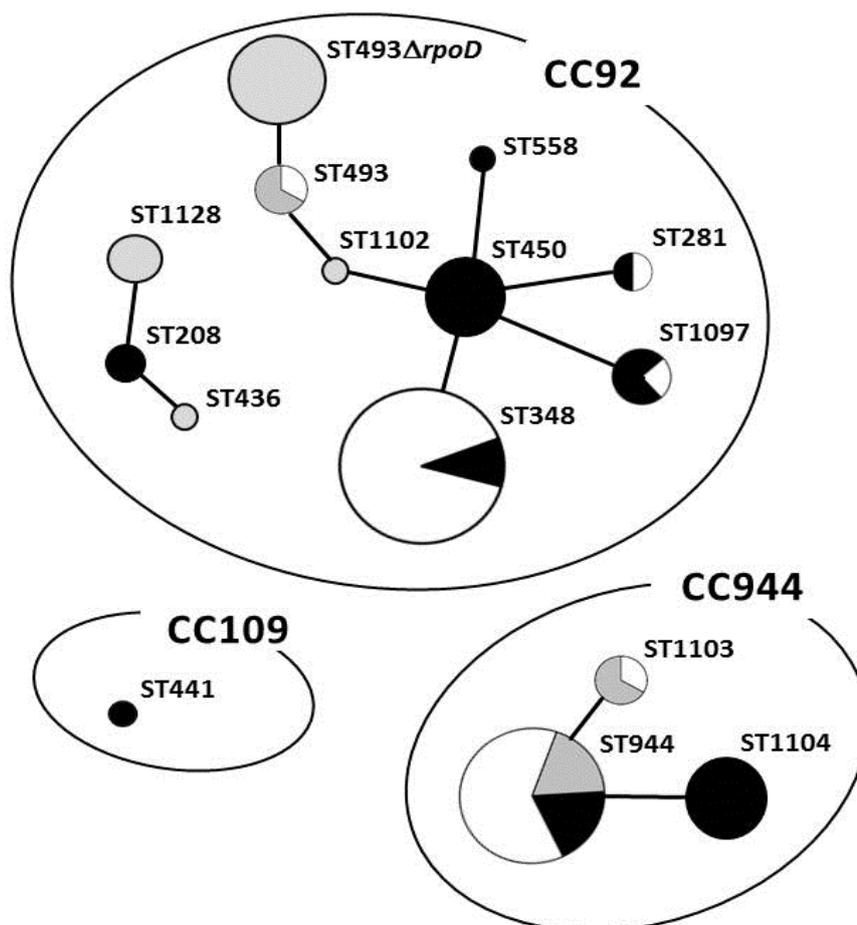


Рисунок 4.1. Популяционная структура 88 карбапенемрезистентных изолятов *A. baumannii*, выделенных в трех стационарах г. Москвы

Примечание. Цвет кружков обозначает стационар: черный – С-1, белый – С-2, серый – С-3. Размер кружков пропорционален числу изолятов с соответствующим сиквенс-типом. Линии обозначают однолокусные варианты (SLV).

Например, все изоляты ST450^{Oxf} (n=9) и ST1104^{Oxf} (n=7) были выявлены в С-1; ST493^{ΔrpoD}^{Oxf} (n=8) и ST1128^{Oxf} (n=3) встречались только в С-3. Интересно, что все изоляты ST1104^{Oxf} (n=7) были выявлены в ОРИТ С-1 в течение пяти недель в ноябре-декабре 2014 г., что указывало на вспышку, а девять изолятов ST450^{Oxf} присутствовали здесь в течение почти всего периода исследования, с сентября 2012 по декабрь 2014 гг. В С-2 было получено 27 из 30 изолятов ST348^{Oxf}, что сделало этот генотип доминирующим в данном стационаре; выделение изолятов было равномерно распределено во времени исследования.

4.2. Определение чувствительности к антибиотикам и идентификация генов β-лактамаз

МПК карбапенемов у всех исследованных изолятов *A. baumannii* составила ≥ 32 мг/л. Все штаммы были резистентны к ципрофлоксацину (МПК > 1 мг/л); 88% и 82% изолятов проявляли устойчивость к гентамицину и нетилмицину соответственно. Все карба-Р изоляты были чувствительны к колистину с МПК в пределах 0,125-0,5 мг/л.

У всех карба-Р изолятов *A. baumannii* были выявлены гены карбапенемазы из группы ОХА (Таблица 4.1). Большинство изолятов (73/88; 82%) несли ОХА-40-подобную карбапенемазу, у 15% (13/88) была обнаружена ОХА-23-подобная карбапенемаза, еще два изолята имели обе карбапенемазы. Ни один изолят не обладал ОХА-58-подобной карбапенемазой. Секвенирование амплифицированных фрагментов *bla*_{ОХА-23} и *bla*_{ОХА-40}-подобных генов показало, что они были идентичны *bla*_{ОХА-23} и *bla*_{ОХА-72} соответственно.

Таким образом, наличие ОХА-40-подобной карбапенемазы типа ОХА-72 было наиболее распространенным механизмом устойчивости к карбапенемам у исследованных нами изолятов *A. baumannii*.

Среди представителей СС944^{Oxf} встречались носители как ОХА-72 (75%; 46/61), так и ОХА-23 (23%; 14/61), однако изоляты СС944^{Oxf} обладали исключительно ОХА-72 (у одного изолята она сочеталась с ОХА-23).

Примечательно, что каждый сиквенс-тип отличался наличием гена определенной карбапенемазы, за некоторыми исключениями, описанными выше (Таблица 4.1). Например, все изоляты ST348^{Oxf} (n=30) и ST944^{Oxf} (n=16) несли ген *bla*_{OXA-72}, в то время как все изоляты ST493^{Oxf} (n=8) и ST1128^{Oxf} (n=3) обладали геном *bla*_{OXA-23}. Исключение составили изоляты ST493^{Oxf}, которые имели карбапенемазу OXA-72 (2 из 3) или OXA-23 (1 из 3), а также два изолята, которые продуцировали обе карбапенемазы (по одному изоляту ST450^{Oxf} и ST1103^{Oxf}).

В 2016 г. было опубликовано короткое сообщение Pfeifer и соавт. [298], которые описали два карба-Р изолята *A. baumannii* ST78^{Pas}, выделенных у двух пациентов из России, проходивших лечение в двух разных стационарах в Германии. Эти изоляты оказались носителями комбинации *bla*_{OXA-72} и гена β-лактамазы расширенного спектра *bla*_{CTX-M-115}, что послужило стимулом проверить наличие CTX-M-115 у карба-РА. *baumannii*, исследованных нами. Все изоляты CC944^{Oxf}/ST78^{Pas}, за исключением одного, несли ген *bla*_{CTX-M-115} (Таблица 4.1 и ее примечание). Ни один из оставшихся карба-Р изолятов *A. baumannii* не был носителем *bla*_{CTX-M-115}, за исключением единственного изолята ST558.

4.3. Образование биопленок

Биопленкообразование было изучено у 70 (80%) карба-Р изолятов *A. baumannii* (Рис. 4.2, Таблица 4.2). Значение медианы биопленочного роста было значимо выше у изолятов CC92^{Oxf} по сравнению с CC944^{Oxf} и другими изолятами (Таблица 4.2). Высокой способностью к образованию биопленок (ОП≥0,6) обладали 19 из 20 (95%) исследованных представителей CC92^{Oxf}. *H*-критерий Краскела-Уоллиса показал значимые различия в способности к формированию биопленок между сиквенс-типами (*H*=30,8, *p*=0,006). Сравнение различных сиквенс-типов выявило, что изоляты ST493^{Oxf} (CC92^{Oxf}) продуцировали значимо больше биопленочной массы, чем три сиквенс-типа CC944^{Oxf} (Таблица 4.2, Рис.4.2).

Дополнительно мы исследовали способность к биопленкообразованию у 12 карбапенемчувствительных изолятов *A. baumannii* без определенной клональной принадлежности (синглетоны), включая сиквенс-типы 1107-1110^{Oxf}, 1127^{Oxf}, 1129^{Oxf}, 1098^{Oxf}, 1099^{Oxf}, 1132^{Oxf}. Различия в способности к формированию биопленок между группой карба-Ч изолятов и карба-Р изолятами СС92^{Oxf} и СС944^{Oxf} были статистически незначимы ($p=0,470$ и $p=0,177$ соответственно) (Таблица 4.2, Рис. 4.2).

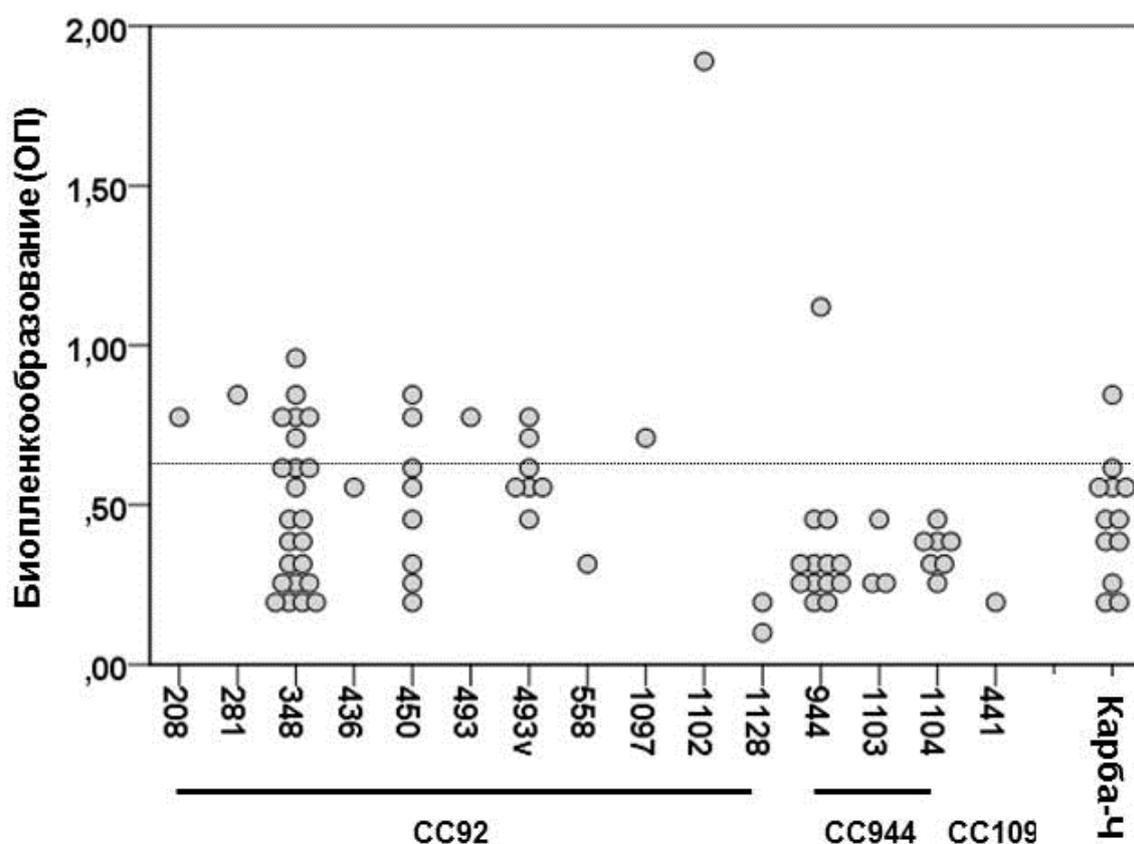


Рисунок 4.2. Биопленкообразование отдельных изолятов *A. baumannii*

Примечание. Каждый кружок соответствует одному изоляту. Сиквенс-типы и клональные комплексы (СС) представлены на оси X. Пунктирной линией обозначен уровень ОП=0,6, который разделяет изоляты с высокой (выше линии) и низкой (ниже линии) способностью к образованию биопленок. ОП – оптическая плотность; 493v – ST493Δ*rpoD*^{Oxf}; Карба-Ч – карбапенемчувствительные.

**Способность к биопленкообразованию у изолятов *A. baumannii*
в соответствии с генотипом по схеме МЛСТ Oxford**

СС	ST	n ^a	Способность к образованию биопленок		
			Me ОП (P25; P75)	n (%) изолятов	
				Высокая ^б	Низкая
Карба-Р изоляты					
СС92		46	0,57 (0,29; 0,75) ^в	19 (41%)	27 (59%)
	ST348	23	0,43 (0,26; 0,69)		
	ST450	8	0,53 (0,27; 0,7)		
	ST493 <i>ArpoD</i>	7	0,57 (0,53; 0,73) ^г		
СС944		23	0,30 (0,25; 0,39)	1 (4%)	22 (96%)
	ST944	13	0,29 (0,24; 0,33)		
	ST1103	3	0,28 (0,23; 0,44)		
	ST1104	7	0,36 (0,3; 0,39)		
Карба-Ч изоляты					
Синглетоны	ST1107- 1110, 1127, 1129, 1098, 1099, 1132	12	0,44 (0,32; 0,56)	1 (8%)	11 (92%)

Примечание. СС – клональный комплекс; ST – сиквенс-тип; Me – медиана; ОП – оптическая плотность; P – перцентиль.

^a Диапазон средних значений среди карба-Р изолятов представлен только для сиквенс-типов с $n \geq 3$.

^б Изоляты с высокой способностью к образованию биопленок имели ОП $\geq 0,6$.

^в $p=0,024$ по сравнению с СС944 (*U*-критерий Манна-Уитни).

^г $p=0,003$ по сравнению с ST944 и ST1104; $p=0,022$ по сравнению с ST1103 (*U*-критерий Манна-Уитни).

Таким образом, наши данные показали доминирование двух клонов среди карба-Р изолятов *A. baumannii* в г. Москве. Один из них, CC92^{Oxf}/CC2^{Pas}, распространен по всему миру. Второй клон, CC944^{Oxf}/ST78^{Pas}, несущий гены *bla*_{OXA-72} и *bla*_{CTX-M-115}, может оказаться эндемичным для московского региона и, возможно, для России в целом.

Глава 5. Клональное разнообразие, молекулярные механизмы устойчивости к карбапенемам у карбапенемрезистентных штаммов *K. pneumoniae*

В настоящей главе был охарактеризован 101 штамм *K. pneumoniae*. Резистентных к карбапенемам (карба-Р) изолятов 84. Все изоляты выделены у детей их двух стационаров города Москвы в 2012-2016 гг. Исследованные изоляты были подвергнуты МЛСТ, исследованию спектра антибиотикорезистентности и носительства генов карбапенемаз.

5.1. Профиль чувствительности к антибиотикам изолятов *K. pneumoniae*

Для анализа были отобраны 84 штамма карба-Р и 17 карба-Ч *K. pneumoniae*, выделенных из крови/ликвора (25%), трахеального аспирата (17%), отделяемого раны/дренажи/стомы (11%), мочи (6%) и локусов мониторинга зева/ануса (37%).

Спектр устойчивости и диапазоны МПК антибиотиков в отношении исследованных штаммов представлены в таблице 5.1.

Все исследованные карба-Ч и карба-Р изоляты были резистентны к цефалоспорином III-IV поколений. К аминогликозидам доля нечувствительных штаммов у карба-Ч варьировала от 59% до 100%, а у карба-Р от 71% до 86%. К ципрофлоксацину и фосфомицину резистентность карба-Ч изолятов составила 94% и 31%, соответственно, а карба-Р штаммы в 94% случаев были резистентны и к ципрофлоксацину и фосфомицину.

Наибольшую чувствительность исследованные изоляты проявляли в отношении тигециклина. Нечувствительных штаммов к тигециклину было 18% как среди карба-Ч, так и для карба-Р изолятов.

Устойчивость к антибиотикам и диапазон МПК к тигециклину, имипенему, меропенему у штаммов *K. pneumoniae*

АМП	Карба-Ч n=17		Карба-Р n=84	
	Доля НЧ (%)	Диапазон МПК, мкг/мл	Доля НЧ (%)	Диапазон МПК, мкг/мл
COX	100	н/т	100	> 64 (n=53)
CZD	100	н/т	100	4-> 64 (n=53)
FEP	100	н/т	100	8-> 64 (n=53)
AKN	59	н/т	76	2-> 64 (n=53)
GMN	100	н/т	86	1-> 64 (n=53)
NTM	88	н/т	71	1-> 32 (n=53)
CIP	94 (15/16)	н/т	94	0.25-4 (n=53)
FOS	31 (5/16)	н/т	94 (75/80)	16-> 156 (n=53)
TGC	18	0,125-1,5	18	0.125-6
MEM	0	0,064-1,5	100	> 32
IPM	0	0,125-4**	99	> 32

5.2. Молекулярные механизмы устойчивости изолятов *K. pneumoniae* к β -лактамным антибиотикам

Все изоляты были протестированы на наличие генов БЛРС (СТХ-М, TEM) и карбапенемаз IMP, KPC, OXA-48, NDM, VIM (Таблица 5.2).

Среди карба-Ч штаммов ген БЛРС *bla*_{СТХ-М} был найден только у одного изолята (6%), а восемь штаммов (47%) обладали комбинацией, состоящей из двух генов *bla*_{СТХ-М} и *bla*_{ТЕМ}. Нами были выявлены также комбинации генов БЛРС и карбапенемаз. Так, пять (35%) штаммов обладали комбинацией, состоящей из трех генов: *bla*_{СТХ-М}+*bla*_{ТЕМ}+*bla*_{ОХА-48}. Ген карбапенемаз *bla*_{ОХА-48} в двух случаях сочетался с геном *bla*_{ТЕМ} и в одном случае с *bla*_{СТХ-М}.

Среди карба-Р штаммов гены карбапенемаз *bla*_{ОХА-48} в качестве единственной детерминанты резистентности присутствовали в пяти (6%) изолятах, ген *bla*_{NDM} только у одного штамма. Используемый нами ПЦР-метод не выявил ни одного штамма *K. pneumoniae*, обладающего генами IMP, KPC, VIM. Наиболее распространенной комбинацией детерминант резистентности стало сочетание гена карбапенемазы *bla*_{ОХА-48} с двумя генами БЛРС *bla*_{СТХ-М}+*bla*_{ТЕМ} выявленное у 53 (63%) изолятов, при этом у 17 (20%) карба-Р изолятов был выявлена комбинация *bla*_{ОХА-48}+*bla*_{СТХ-М} и только у одного изолята *bla*_{ОХА-48}+*bla*_{ТЕМ}. Сочетание гена карбапенемаз *bla*_{ТЕМ} и гена БЛРС *bla*_{СТХ-М} было найдено в 5 (6%) случаях. У одного штамма были обнаружены комбинации двух генов карбапенемаз *bla*_{ТЕМ} + *bla*_{NDM} с геном БЛРС *bla*_{СТХ-М}. Один штамм имел четыре детерминанты резистентности: два гена карбапенемаз и два гена БЛРС (Таблица 5.2).

Распространенность генов резистентности и их комбинаций у штаммов *K. pneumoniae* (n=101)

Гены	Карба-Р, n=84	Карба-Ч, n=17
CTX-M	0	1 (6%)
CTX-M +OXA-48	17 (20%)	1 (6%)
CTX-M +TEM	5 (6%)	8 (47%)
CTX-M +TEM +OXA-48	53 (63%)	5 (35%)
CTX-M + TEM +NDM	1 (1%)	0
CTX-M +TEM +OXA-48+NDM	1 (1%)	0
OXA-48	5 (6%)	0
TEM+ OXA-48	1 (1%)	2 (3%)
NDM	1 (1%)	0

5.3. Клональная структура популяции *K. pneumoniae*

Всего 84 карба-Р и 13 карба-Ч штаммов *K. pneumoniae* были исследованы методом МЛСТ. Разнообразие сиквенс-типов представлено на рисунке 5.1. Проанализированные изоляты относились к 15 сиквенс-типам, в том числе был обнаружен один новый сиквенс-тип, зарегистрированный в базе данных МЛСТ под номером ST3024.

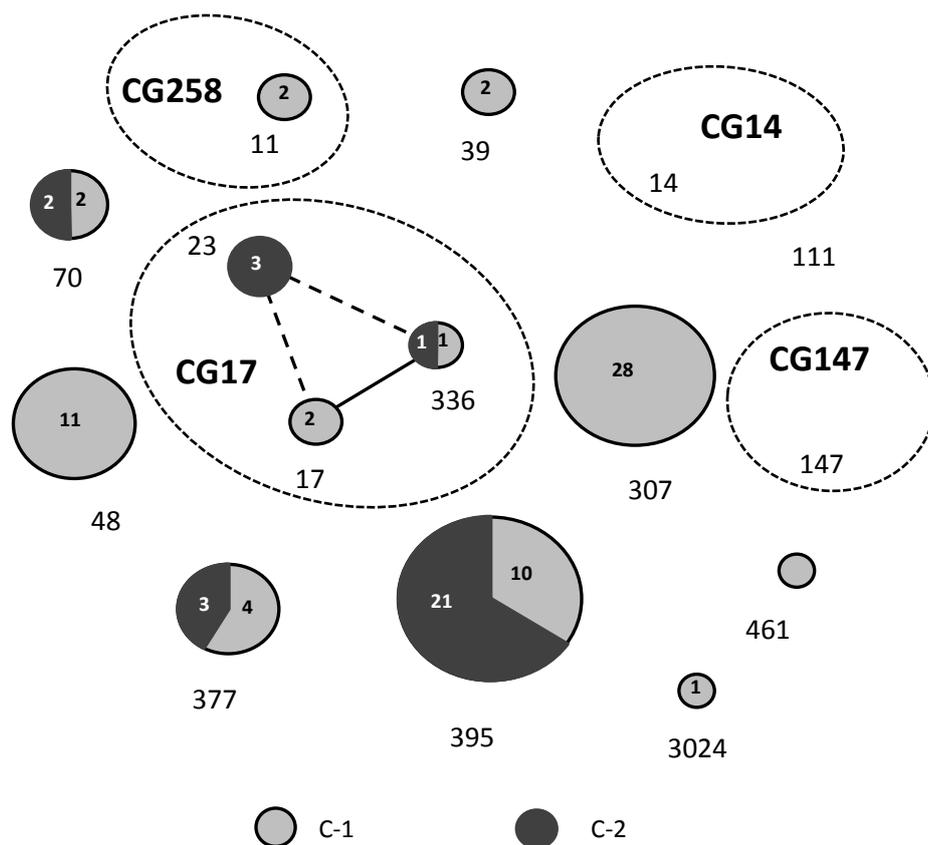


Рис. 5.1. Распределение сиквенс-типов штаммов *K. pneumoniae*

Примечание: числа в кругах обозначают количество изолятов, относящихся к соответствующему ST. Прямой линией показаны SLV (single locus variant, однолокусный вариант), прерывистой – DLV (double locus variant, двухлокусный вариант); CG (clonal group) – клональная группа.

В целом, в исследованной популяции преобладали четыре сиквенс-типа: ST395 (n=31; 32%), ST307 (n=28; 29%), ST48 (n=11; 11%) и ST377 (n=7; 7%), в совокупности, составлявшие 79% всей выборки. Большинство карба-Р штаммов относилось к ST395 (n=31; 37% этой части коллекции) (Таблица 5.3).

**Распределение карбапенемрезистентных изолятов *K. pneumoniae*
в зависимости от сиквенс-типа и носительства детерминант резистентности
(n=84)**

Гепнотип (n, %)	n	OXA-48	NDM	CTX-M	TEM
ST395 31 (37%)	20	+	-	+	+
	7	+	-	+	-
	3	+	-	-	-
	1	-	-	+	+
ST307 20 (24%)	18	+	-	+	+
	1	+	-	+	-
	1	+	+	+	+
ST48 10 (12%)	8	+	-	+	+
	2	+	-	+	-
ST377 7 (8%)	4	+	-	+	-
	2	+	-	-	-
	1	+	-	+	+
ST70 3 (4%)	2	-	-	+	+
	1	+	-	+	+
ST23 3 (4%)	2	+	-	+	-
	1	+	-	+	+
ST17 2 (2%)	2	-	-	+	+
ST336 2 (2%)	1	+	-	-	+
	1	+	-	+	-
ST39 2 (2%)	2	+	-	+	+
ST14 1 (1%)	1	+	-	+	+
ST147 1 (1%)	1	-	+	+	+
ST461 1 (1%)	1	-	+	-	-
ST3024 1 (1%)	1	-	-	+	+
Итого:		76 (90,5%)	3 (3,6%)	77 (91,7%)	61 (72,6%)

Не было обнаружено ни одного карба-Ч изолята, относившегося к данному сиквенс-типу. Вторым по частоте среди карба-Р изолятов был ST307 (n=10; 24%), данный сиквенс-тип доминировал среди карба-Ч изолятов (8/13; 62% этой части коллекции). В популяции карба-Р *K. pneumoniae* были выявлены 10 (12%) и 7 (8%) изолятов, относившихся к ST48 и ST377 соответственно. К четырем вышеописанным генотипам суммарно относились 68 (81%) карба-Р изолятов *K. pneumoniae*. Остальные девять сиквенс-типов этой части коллекции были представлены 1-3 штаммами.

Карба-Ч изоляты отличались меньшим клональным разнообразием: три из пяти выявленных сиквенс-типов (ST48, ST70, ST111) были представлены единичными изолятами. ST11 и ST111 не встречались в карба-Р части коллекции.

Далее, мы проанализировали распределение сиквенс-типов штаммов *K. pneumoniae*, выделенных в период с 2012 по 2016 гг. в двух педиатрических стационарах.

Из 15 выявленных сиквенс-типов 10 встречались только в С1, а один сиквенс-тип (ST23) был обнаружен только в С2. Изоляты, принадлежавшие к четырем сиквенс-типам (ST395, 337, 70 и 336), были обнаружены в обоих стационарах.

Составлявшие значительную часть коллекции штаммы ST307 (n=28) и ST48 (n=11) были выделены только у пациентов в С1. Интересно, что клон ST307 доминировал в данном стационаре в течение всего периода исследования. ST395 также встречался в С1 (10/31) и С2 (21/31) на протяжении всего проанализированного периода. Изоляты ST48 (n=11) выделяли в С1 в период с января 2014 по сентябрь 2015 гг., а ST377 (n=7) выявляли в С2 с апреля по июнь 2015 г (n=3), а в С1 с апреля 2015 по март 2016 гг. (n=4), (рис.5.1, таблица 5.4).

Распределение сиквенс-типов штаммов *K. pneumoniae* по стационарам

ST	Всего	%	C1		C2	
			n	%	n	%
395	31	32	10	15	21	72
307	28	29	28	41	0	0
48	11	11	11	16	0	0
377	7	7	4	6	3	10
70	4	4	3	4	1	4
23	3	3	0	0	3	10
17	2	2	2	3	0	0
336	2	2	1	1,5	1	4
39	2	2	2	3	0	0
11	2	2	2	3	0	0
14	1	1	1	1,5	0	0
147	1	1	1	1,5	0	0
461	1	1	1	1,5	0	0
111	1	1	1	1,5	0	0
3024	1	1	1	1,5	0	0
Итого	97	100%	68	100%	29	100%

В данной главе мы представили молекулярно-генетический анализ карба-Ч и карба-Р изолятов *K. pneumoniae*, выделенных у пациентов двух педиатрических стационаров г. Москвы. Более половины проанализированных изолятов (61%) принадлежало к двум сиквенс-типам: ST395 и ST307.

Среди карба-Р изолятов *K. pneumoniae* доминирующим был ST395 (n=31), который встречался в обоих исследованных стационарах. Семь штаммов данного сиквенс-типа были носителями генов БЛРС и карбапенемаз *bla_{CTX-M}* + *bla_{OXA-48}*, 20 изолятов дополнительно несли ген БЛРС *bla_{TEM}*. Три штамма имели только ген *bla_{OXA-48}*, а один изолят обладал комбинацией двух генов БЛРС.

Глава 6. Популяционная структура карбапенемрезистентных *P. aeruginosa* и носительство металло- β -лактамаз

В данной главе были проанализированы карба-Р-изоляты *P. aeruginosa*, выделенные в период 2012-2016 гг. в двух стационарах г. Москвы. Была исследована их чувствительность к некарбапенемным антибиотикам, проведено МЛСТ и протестировано носительство генов трех типов металло- β -лактамаз (МБЛ): *bla_{VIM}*, *bla_{IMP}* и *bla_{NDM}*.

Всего было отобрано 87 изолятов *P. aeruginosa*, которые были резистентны (МПК >8 мг/л) к меропенему и/или имипенему (карба-Р изоляты). Из них 78 (90%) изолятов были резистентны к обоим карбапенемам, еще восемь (9%) изолятов обладали умеренной устойчивостью к меропенему (МПК 4-8 мг/л) и один (1%) изолят был умеренно устойчив к имипенему (МПК 8 мг/л). Максимальную МПК ≥ 32 мг/л меропенема и имипенема имели 85 (98%) и 78 (90%) изолятов соответственно. Большинство изолятов было получено из респираторных образцов (54%), меньшую долю имели изоляты, выделенные из стомы/раны (22%), мочи (16%), крови (6%) и ликвора (2%). Медиана возраста пациентов-источников изолятов составила 4,4 года (P25 11 мес, P75 14,7 лет).

Анализ чувствительности карба-Р *P. aeruginosa* к некарбапенемным антибиотикам показал их высокую устойчивость ко всем группам исследованных препаратов, включая цефалоспорины, аминогликозиды и фторхинолоны. Наиболее высокая резистентность наблюдалась к амикацину, гентамицину и цефепиму (>80% устойчивых изолятов). Таким образом, все исследованные изоляты обладали МЛУ (Таблица 6.1).

**Устойчивость Карба-Р изолятов *P. aeruginosa*
к некарбапенемным антибиотикам**

Антибиотик	МПК₅₀ (мг/л)	МПК₉₀ (мг/л)	Доля резистентных изолятов
CZD	16	≥256	67%
FEP	48	≥256	85%
AKN	≥256	≥256	89%
GMN	≥256	≥256	82%
NTM^a	–	–	76%
TMN^a	–	–	77%
CIP	≥32	≥32	77%

Примечание: ^a Чувствительность определяли с помощью диско-диффузионного метода

6.1. Характеристика популяционной структуры Карба-Р *P. aeruginosa*

Все выделенные изоляты были подвергнуты генотипированию с помощью МЛСТ. Всего был выявлен 21 уникальный сиквенс-тип. В структуре с большим отрывом лидировали представители пяти сиквенс-типов, включая ST111, ST235, ST446, ST654 и ST2592, которые суммарно составляли 78% выборки карба-Р *P. aeruginosa*; из них самыми распространенными стали ST654 (30%), ST235 (23%) и ST111 (13%). Оставшиеся 16 сиквенс-типов формировали 22% выборки (Таблица 6.2).

Распределение генотипов карбапенемрезистентных изолятов *P. aeruginosa*

ST	Число изолятов	Доля	Накопленный %%
654	26	30%	30%
235	20	23%	53%
111	11	13%	66%
2592^a	6	7%	72%
446	5	6%	78%
244	2	2%	80%
1211	2	2%	83%
1567	2	2%	85%
233	1	1%	86%
234	1	1%	87%
245	1	1%	89%
260	1	1%	90%
399	1	1%	91%
562	1	1%	92%
612	1	1%	93%
644	1	1%	94%
1031	1	1%	95%
1033	1	1%	97%
1930	1	1%	98%
2049	1	1%	99%
2757^b	1	1%	100%
Итого:	87	100%	

Примечание. Изоляты расположены в порядке убывания частоты встречаемости

^a Впервые описанный сиквенс-тип, однолокусный вариант ST357 (новая аллель *aro*).

^b Впервые описанный сиквенс-тип (новая аллель *aro*).

Популяционная структура карба-Р *P. aeruginosa* в двух исследованных стационарах значительно различалась ($\chi^2=46$, $p=0,001$). В стационаре С2 было обнаружено семь, а в стационаре С1 – 16 различных сиквенс-типов. Два наиболее распространенных генотипа ST235 и ST654 были представлены в обоих стационарах, тогда как ST111 присутствовал только в С2, а уникальным для С1 стал ST446; для С2 был эндемичным также ST2592. Одиннадцать из 16 сиквенс-типов, обнаруженных в стационаре С1, были представлены единичными изолятами, доля которых в общем числе изолятов из С2 составила 25% (Рисунок 6.1).

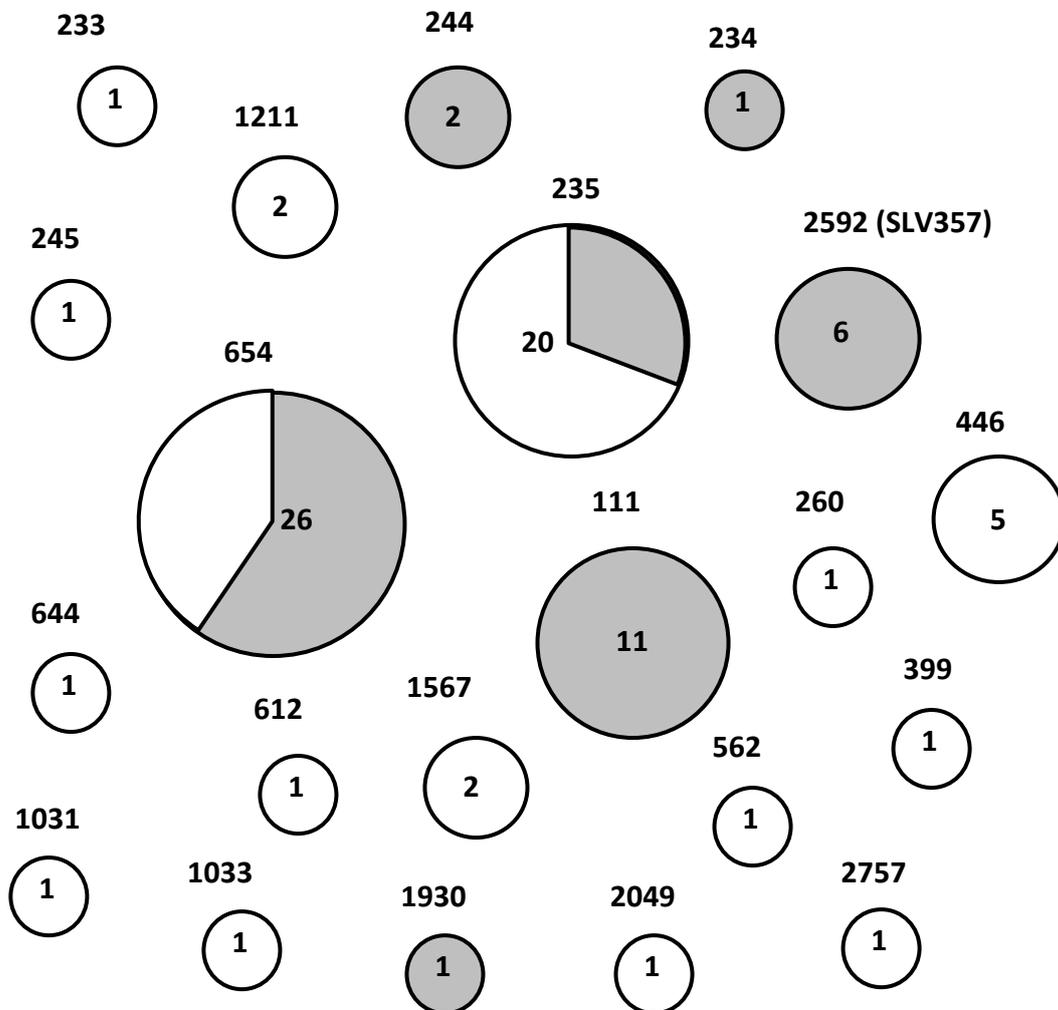


Рисунок 6.1. Популяционная структура *P. aeruginosa*

○ C-1 ● C-2

6.2. Носительство МБЛ-карбапенемаз

У 50 (57%) исследованных изолятов карба-Р *P. aeruginosa* был выявлен ген МБЛ *bla_{VIM}*; носительство других карбапенемаз, включая *bla_{NDM}* и *bla_{IMP}*, обнаружено не было. Продуцентами VIM-подобных карбапенемаз были представители трех сиквенс-типов: ST111, ST235 и ST654. Носителями *bla_{VIM}* были все изоляты ST111 и ST654, а также 13 (65%) ST235-изолятов. В структуре в структуре VIM-позитивных изолятов лидировал ST654 (52%, 26/50), ST111 и ST235 занимали долю 23% (11/50) и 26% (13/50) соответственно (Таблица 6.3).

Таблица 6.3

Распределение карбапенемрезистентных изолятов *P. aeruginosa* в соответствии с генотипом, распространенностью в стационарах, носительством *bla_{VIM}*

ST	n (%)	Носители <i>bla_{VIM}</i> ^a	C1	C2	<i>p</i> ^б
654	26 (30%)	26 (100%)	10 (23%)	16 (37%)	>0,05
235	20 (23%)	13 (65%)	14 (32%)	6 (14%)	0,048
111	11 (13%)	11 (100%)	0	11 (26%)	<0,001
2592	6 (7%)	0	0	6 (14%)	0,01
446	5 (6%)	0	5 (11%)	0	0,023
244	2 (2%)	0	0	2 (5%)	>0,05
1211	2 (2%)	0	2 (5%)	0	>0,05
1567	2 (2%)	0	2 (5%)	0	>0,05
Другие	13 (15%)	0	11 (25%) ^г	2 (5%) ^б	0,008
Всего	87 (100%)	50 (57%)	44 (100%)	43 (100%)	

Примечание.

Представлены сиквенс-типы с частотой ≥ 2 . Сиквенс-типы расположены в порядке убывания частоты встречаемости. ST – сиквенс-тип, C1 – стационар 1, C2 – стационар 2.

^a В скобках указана доля *bla_{VIM}*-положительных изолятов от общего числа изолятов соответствующего сиквенс-типа.

^б Значение *p* указывает на значимость различий (критерий χ^2) между частотой встречаемости соответствующего сиквенс-типа в двух стационарах; значимые различия выделены жирным шрифтом.

^в ST234, ST1930.

^г Всего 11 сиквенс-типов: 233, 245, 260, 399, 562, 612, 644, 1031, 1033, 2049, 2757; каждый представлен одним изолятом.

Таким образом, наше исследование показало широкое распространение (>50%) носительства VIM-подобных карбапенемаз среди Карба-Р *P. aeruginosa*, что делает их наличие ведущим механизмом устойчивости к карбапенемам у госпитальных штаммов этих возбудителей. В то же время, у значительной доли Карба-Р изолятов механизмы резистентности остаются нерасшифрованными. Все это свидетельствует о необходимости дальнейших исследований, направленных на мониторинг устойчивости к антибиотикам и популяционной эволюции госпитальных штаммов *P. aeruginosa* на территории России.

Глава 7. Респираторные патогены

7.1 Динамика распространенности серотипов и антибиотикорезистентности носоглоточных пневмококков, выделенных в 2010-2016 гг.

В главе 7 проанализирована динамика структуры серотипов носоглоточных пневмококков и их устойчивости к антибиотикам. Были исследованы носоглоточные изоляты пневмококков, выделенные в 2010-2016 гг. у детей, получавших стационарную и амбулаторную помощь в ФГАУ «Национальный медицинский исследовательский центр здоровья детей» Минздрава России. Исследование включало определение серотипа, чувствительности к шести АМП, а также определение фенотипа и генотипа устойчивости к макролидам и линкозамидам.

Описание коллекции пневмококков

В исследование вошло 1111 изолятов пневмококков, выделенных в течение 2010-2016 гг. из носоглотки у детей. Для динамического анализа коллекция была разделена на пять частей в соответствии с периодом выделения изолята: 2010/11 (n=195), 2012 (n=282), 2013 (n=197), 2014/15 (n=142), 2016 (n=295). Медиана возраста детей, у которых выделяли пневмококк, между пятью периодами исследования отличалась статистически незначимо (тест Краскела-Уоллиса, $H=3,113$; $p=0,539$) и составила по выборке в целом 4 года (25-ый перцентиль-75-ый перцентиль 2,4-6,5 года). Возрастная структура, т.е. соотношение детей в возрасте младше или старше 5 лет, по периодам времени менялась незначимо ($\chi^2=6,523$; $p=0,163$), долю 64,1% (95% ДИ 61,3%-66,9%) в ней занимали дети ≤ 5 лет.

Структура серотипов и ее динамика в 2010-2016 гг.

Всего было идентифицировано 48 различных серотипов пневмококков, 25 (2,3%) изолятов относились к категории нетипируемых. Шесть ведущих педиатрических серотипов, включая серотипы 3, 6А, 6В, 14, 19F и 23F, суммарно составили 63,2% в общем распределении; лидировал серотип 19F (18,8%) (Таблица 7.1). Помимо перечисленных серотипов заметную долю ($\geq 2\%$) имели серотипы 11А, 15В/С, 23А. Распространенность остальных серотипов составила $< 2\%$ (Таблица 7.1 и примечание к ней).

Таблица 7.1

**Распределение серотипов носоглоточных изолятов пневмококков,
полученных в 2010-2016 гг.**

Серотип	Всего, (n)	%	Накопленный %
19F	209	18,8	18,8
23F	127	11,4	30,2
6В	125	11,3	41,5
14	109	9,8	51,3
6А	69	6,2	57,5
3	63	5,7	63,2
15В/С	53	4,8	68,0
11А	42	3,8	71,7
Нетипируемые	25	2,3	74,0
23А	23	2,1	76,1
19А	20	1,8	77,9
18С	20	1,8	79,7
35С	18	1,6	81,3
9V	17	1,5	82,8
33F	17	1,5	84,3

Продолжение таблицы 7.1

Серотип	Всего, (n)	%	Накопленный %
7F	16	1,4	85,8
9N	15	1,4	87,1
35F	14	1,3	88,4
10A	14	1,3	89,6
6C	14	1,3	90,9
37	10	0,9	91,8
6D	10	0,9	92,7
22F	9	0,8	93,5
34	8	0,7	94,2
15A	8	0,7	95,0
8	7	0,6	95,6
17F	6	0,5	96,1
16F	6	0,5	96,7
Другие	37	3,3	100
Итого:	1111	100	

Примечание.

Серотипы расположены в порядке убывания частот. Показаны 27 серотипов с частотой ≥ 5 изолятов и нетипируемые изоляты. Остальные серотипы вошли в категорию «Другие» (всего 21 серотип, в порядке убывания частоты): 35B – n=4; 23B – n=3; 31 – n=3; серотипы 1, 4, 12F, 13, 20, 21, 28A, 38, 39 – n=2 каждый; серотипы 7C, 9A, 10B, 11D, 15F, 24A, 24F, 28F, 42 – n=1 каждый.

Распределение серотипов зависело от возраста ($\chi^2=103$, $p<0,001$). У детей младше 5 лет было выявлено 39 серотипов, у детей старше 5 лет был обнаружен 41 серотип. Серотипы 6A, 6B, 15B/C и 19F чаще встречались в младшей возрастной группе, а серотипы 3, 33F и 37 были больше распространены у детей

старше 5 лет, причем серотип 37 встречался исключительно у старших детей (Рисунок 7.1). У младших детей также чаще встречался серотип 14 ($z=1,7$; $p=0,087$).

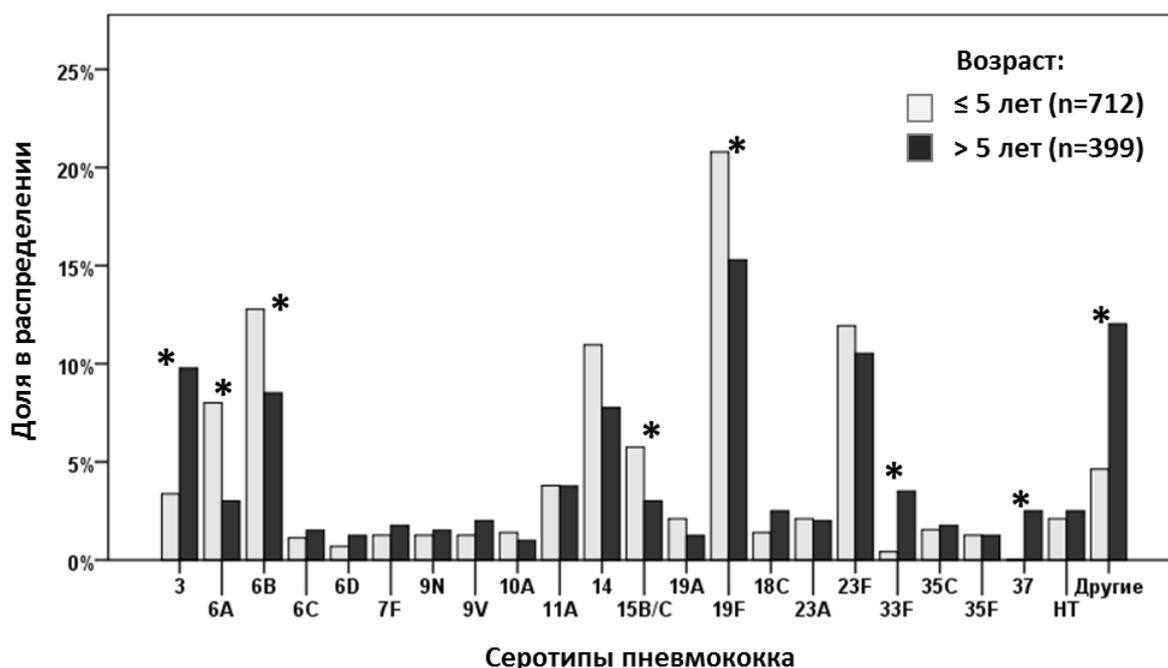


Рисунок 7.1. Распределение серотипов носоглоточных изолятов пневмококка в зависимости от возраста

Примечание:

Серотипы расположены в порядке их номенклатуры. Приведен 21 серотип, представленный ≥ 10 изолятами каждый.

* - значимые отличия долей между двумя возрастными группами ($p < 0,05$).
НТ – нетипируемые.

За шестилетний период наблюдения структура серотипов в целом не претерпела заметных изменений. Так, доля серотипов, входящих в 13-валентную ПКВ, менялась незначимо и колебалась около 70% ($\chi^2=3,9$; $p=0,423$; Рис.7.2А); по всей выборке она составила 70,2% (95% ДИ 67,5%-72,9%). Отметим, что доля вакцинных серотипов была значимо выше у детей до 5 лет, достигнув 74% (95% ДИ 70,8% -77,2%) против 63,3% (95% ДИ 58,6%-68%) у старших детей ($z=3,7$; $p < 0,001$).

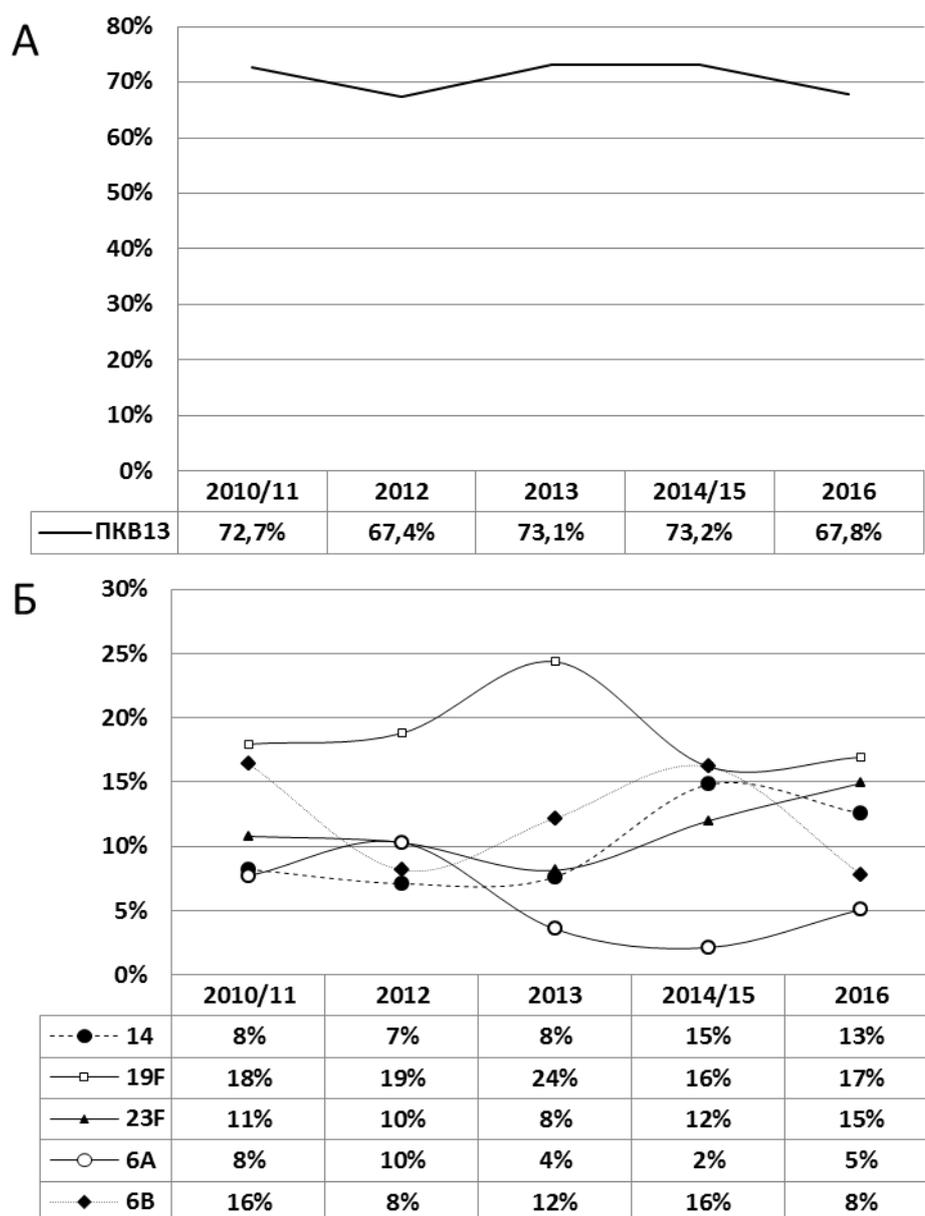


Рисунок 7.2. Динамика распространенности отдельных серотипов носоглоточных изолятов пневмококка в 2010-2016 гг.

Примечание : ПКВ13 – 13-тивалентная пневмококковая конъюгированная вакцина. А – суммарная доля серотипов, входящих в состав ПКВ13 (1, 3, 4, 5 [обнаружено не было], 6А, 6В, 7F, 9V, 14, 18С, 19А, 19F, and 23F); Б – доля пяти наиболее распространенных серотипов. Цифры указывают долю серотипов в соответствующий период времени. Число изолятов по периодам: 2010/11 – n=195; 2012 – n=282; 2013 – n=197; 2014/15 – n=142; 2016 – n=295.

Динамика распространенности отдельных серотипов показала разнонаправленные тренды (Рис. 7.2Б). Доля серотипа 14 повысилась с 8% в 2010/2011 гг. до 13-15% в 2014-2016 гг. ($\chi^2=10,5$, $p=0,033$), а в группе младших детей этот рост был еще заметнее (с 7,3% до 16,6% в 2016 г.). Напротив, частота серотипов 6А и 6В демонстрировала значимый тренд к снижению ($\chi^2=15,9$, $p=0,003$ и $\chi^2=15,1$, $p=0,003$ соответственно). Частота выявления серотипов 19F и 23F в период наблюдения носила осциллирующий характер, без явно направленных трендов ($\chi^2=5,4$, $p=0,251$ и $\chi^2=6,2$, $p=0,188$ соответственно) (Рис. 7.2Б). Из числа редких серотипов интересна динамика серотипа 37: все десять его изолятов были получены в первые годы наблюдения (2010-2012 гг.) и не встречались в дальнейшем.

Устойчивость к АМП и ее динамика

Для оценки спектра устойчивости пневмококков использовали АМП шести групп, включая β -лактамы (ОХА, АМХ), макролид (ЕРУ), линкозамид (СЛИ), сульфаниламид (SXT), тетрациклин (ТЕТ), хлорамфеникол (СНЛ). Результаты анализировали по выборке в целом, по наиболее распространенным и/или резистентным серотипам (Таблица 7.2), а также по отдельным периодам наблюдения для выявления динамики (Таблица 7.3).

Устойчивость к различным группам АМП по выборке в целом варьировала от <5% для СНЛ до 47,8% для SXT, при этом доля изолятов с МЛЮ составила 23,5% (Таблица 7.2, строка «Все серотипы»). Частота изолятов, устойчивых к PEN и ЕРУ, составила 30,7% и 29,9% соответственно.

Таблица 7.2

Устойчивость носоглоточных изолятов пневмококков, выделенных в 2010-2016 гг. в зависимости от серотипа

Серотип	Доля резистентных изолятов в структуре серотипа и их абсолютное число													
	ОХА (n=1098)		ERY (n=1097)		CLI (n=1092) ^a		SXT (n=1094)		CHL (n=669)		TET (n=359)		МЛУ ^b	
Все серотипы	30,7%	336	29,9%	328	20,8%	227	47,8%	523	4,3%	29	34,5%	124	23,5%	257
6А	26,9%	18	31,3%	21	9,1%	6	65,7%	44	9,1%	2	23,5%	4	10,4%	7
6В	28,8%	36	53,6%	67	44,4%	55	56,8%	71	5,2%	4	63,5%	21	41,6%	52
14	67,9%	74	54,1%	59	22,9%	25	74,3%	81	2,8%	3	34,8%	16	49,5%	54
19А	65%	13	40%	8	25%	5	60%	12	0		50%	5	35%	7
19F	54,6%	113	54,1%	112	48,8%	101	67,3%	138	8%	11	67,6%	50	47,3%	98
23F	35,7%	45	15,9%	20	6,4%	8	50,8%	64	6,4%	5	14%	7	11,9%	15
Другие	8,4%	37	9,3%	41	6,2%	27	25,3%	111	1,8%	4	16,3%	21	5,5%	24 ^Б

Примечание.

ОХА – оксациллин, ERY – эритромицин, CLI – клиндамицин, SXT – триметоприм/сульфаметоксазол, CHL – хлорамфеникол, TET – тетрациклин, МЛУ – множественная лекарственная устойчивость. Общее число тестируемых изолятов для каждого антимикробного препарата (АМП) указано в скобках рядом с его названием.

^a Представлены результаты определения чувствительности к CLI без оценки индуцибельной CLI-резистентности у ERY-резистентных изолятов в присутствии макролида (см. Материалы и методы).

^b МЛУ определяли по чувствительности к четырем АМП: PEN, ERY, CLI и SXT.

^Б Другие МЛУ-серотипы (число нечувствительных изолятов/всего изолятов, в порядке номенклатуры серотипов): 6С (1/13), 9N (1/15), 9V (5/17), 11А (3/42), 13 (1/2), 15А (1/8), 20 (1/2), 23А (3/23), 24F (1/1), 31 (1/3), 35С (2/18), нетипизируемые (4/22).

Динамика устойчивости носоглоточных изолятов пневмококков в 2010-2016 гг.

АМП ^а	Число резистентных/число тестированных изолятов и доля (%) резистентных изолятов ^б					Значимость и направление тренда ^в	
	2010/11	2012	2013	2014/15	2016		
ОХА	40/189	69/274	63/197	58/142	106/295	<0,001 ($\chi^2=22,8$)	↑
	21,3%	25,4%	32,0%	40,8%	35,9%		
ERY	46/189	58/274	55/197	60/142	109/295	<0,001 ($\chi^2=30,5$)	↑
	24,5%	21,2%	27,9%	42,3%	36,9%		
CLI^г	37/186	47/272	43/192	31/142	69/295	0,482 ($\chi^2=3,5$)	=
	19,9%	17,3%	21,8%	21,8%	23,4%		
SXT	110/186	135/274	103/197	64/142	111/295	<0,001 ($\chi^2=24,1$)	↓
	59,1%	49,3%	52,3%	45,1%	37,6%		
CHL	6/41	3/40	1/151	5/142	14/295	0,002 ($\chi^2=16,7$)	↓
	14,6%	7,5%	0,7%	3,5%	4,7%		
TET	15/25	17/28	7/14	НТ ^д	85/293	<0,001 ($\chi^2=21,8$)	↓
	60,0%	60,7%	53,8%		29,0%		

Примечание.

^а АМП – антимикробный препарат, ОХА – оксациллин, ERY – эритромицин, CLI – клиндамицин, SXT – триметоприм/сульфаметоксазол, CHL – хлорамфеникол, TET – тетрациклин.

^б Общее число изолятов по периодам: 2010/11 – 195, 2012 – 282, 2013 – 197, 2014/15 – 142, 2016 – 295.

^в Жирным шрифтом приведено значение p , указывающее на статистическую значимость тренда (критерий χ^2 , значение в скобках) изменения частоты резистентных изолятов в течение 2010-2016 гг. ↑ – нарастание устойчивости; ↓ – снижение устойчивости; = – незначимая динамика.

^г Представлены результаты определения чувствительности к CLI без проведения оценки индуцибельной CLI-резистентности у ERY-резистентных изолятов в присутствии макролида (см. Материалы и методы).

^д НТ – не тестировали.

Устойчивость к АМП была свойственна ограниченному числу пневмококковых серотипов. Основная доля резистентных изолятов, в том числе изолятов с МЛУ, приходилась на пневмококки пяти наиболее распространенных серотипов (6А, 6В, 14, 19F и 23F) и серотипа 19А (Таблица 7.2). Частота SXT-резистентных пневмококков среди них варьировала от 50,8% до 74,4%, более 50% пневмококков серотипов 14, 19А и 19F обладали устойчивостью к ОХА. Эти же серотипы и серотип 6В отличались высокой резистентностью к ERY и TET. Более 40% 6В- и 19F-изолятов были CLI-резистентны. Наибольшая доля пневмококков с МЛУ была у серотипов 6В (41,6%), 14 (49,5%), 19А (35%), 19F (47,3%) (Таблица 7.2). Резистентность была менее выражена у пневмококков серотипов 6А и 23F (10,4% и 11,9% изолятов с МЛУ соответственно).

Доля резистентных изолятов среди пневмококков других серотипов не превышала 10% для ОХА, ERY, CLI и CHL; к SXT и TET были устойчивы соответственно 25,3% и 16,3% изолятов (Таблица 7.2, строка «Другие»). МЛУ обладала минимальная часть (5,5%) из этих пневмококков. В их числе выделялся серотип 9V, 5 из 17 (29%) изолятов которого имели МЛУ (все МЛУ-серотипы перечислены в примечании к Таблице 7.2).

Частота устойчивости пневмококков в отношении всех исследованных АМП, за исключением CLI, в течение 2010-2016 гг. значительно изменилась (Таблица 7.3). По сравнению с начальным периодом наблюдения, в 2014-2016 гг. возросла распространенность ОХА- и ERY-резистентных пневмококков, которая в 2016 г. достигла 35,9% до 36,9% соответственно. Вместе с тем, для SXT, CHL и TET просматривался противоположный тренд, т.е. доля резистентных изолятов за время наблюдения значительно снизилась (Таблица 7.3). Примечательно, что устойчивость к ОХА и ERY преимущественно нарастала в популяции наиболее распространенных серотипов, в то время как доля устойчивых изолятов среди других серотипов за период наблюдения изменилась незначительно (Рис. 7.3А, Б). Наиболее значимый индивидуальный тренд на повышение резистентности к ОХА и ERY ($\chi^2=14,7$, $p=0,005$ и $\chi^2=14,1$, $p=0,007$ соответственно) показал серотип 14: к

2016 г. доля нечувствительных пневмококков этого серотипа достигла 68% для ОХА и 60% для ERY.

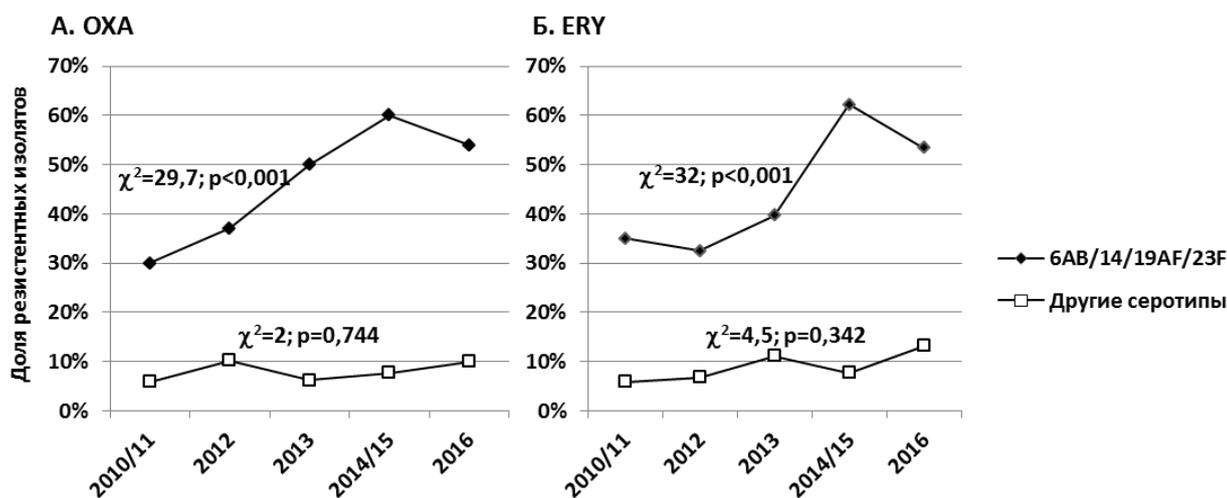


Рисунок 7.3. Динамика устойчивости носоглоточных изолятов пневмококка к оксациллину (А) и эритромицину (Б) в зависимости от серотипа

ОХА – оксациллин, ERY – эритромицин. Над кривыми указаны значения критерия χ^2 и p для трендов изменения частоты резистентных изолятов в течение 2010-2016 гг.

Распределение МПК PEN, AMX, ERY и CLI

Начиная с 2013 г., мы ввели определение МПК PEN, AMX, ERY и CLI у пневмококков, которые показали резистентность по результатам тестирования диско-диффузионным методом. Различия частоты изолятов в категориях МПК по периодам исследования оказались незначимы (данные не представлены), поэтому результаты были проанализированы в целом по выборке 2013-2016 гг.

Скрининг чувствительности к β -лактамам, проведенный с помощью диска с ОХА, показал наличие резистентности у 226 из 633 (35,7%) изолятов пневмококка, исследованных в 2013-2016 гг. Из числа ОХА-резистентных

пневмококков 96,9% (219/226) относились к категории нечувствительных к PEN (МПК >0,06 мг/л) по результатам E-теста, т.е. доля PEN-нечувствительных изолятов по выборке в целом составила 34,6% (219/633) (Таблица 7.4). Подавляющее большинство изолятов (96,5%) имели МПК АМХ ≤ 2 мг/л, т.е. были чувствительны к этому АМП.

Резистентностью к ERY и CLI (CLI – без учета индуцибельной резистентности; см. ниже) в 2013-2016 гг. обладали 35,4% (224/633) и 21,9% (138/631) изолятов пневмококка соответственно. Тестирование МПК у ERY- и CLI-резистентных пневмококков показало, что более 90% из них имело МПК ≥ 256 мг/л (Таблица 7.4).

Из 219 PEN-нечувствительных пневмококков 164 (74,9%) имели ассоциированную резистентность к ERY. По выборке в целом доля PEN-нечувствительных/ERY-резистентных изолятов составила 25,9% (164/633).

**Структура значений МПК пенициллина, амоксициллина, эритромицина и клиндамицина
у носоглоточных изолятов пневмококков, выделенных в 2013-2016 гг.**

АМП	Доля (%) изолятов с соответствующим значением МПК (мг/л)													Пограничные значения МПК (мг/л) ^a и доля (%) изолятов в соответствующей категории						МПК ₅₀	МПК ₉₀
	≤ 0,06	0,12	0,25	0,5	1	2	4	8	16	32	64	128	≥256	Ч		УР		Р			
	МПК		%		МПК		%		МПК		%		(мг/л)								
PEN n=633	65,4	6,5	4,4	6,3	11,1	4,1	1,3	0,6	0,3					≤ 0,06	65,4	0,12-2	32,4	>2	2,2	≤ 0,06	1
AMX n=631	68,8	6,5	2,4	4,8	9,0	5,1	2,9	0,6						≤ 2	96,5	4	2,9	>4	0,6	≤ 0,06	1
ERY n=633			64,8		0,5	0,9	1,4	2,2	1,9	1,1	0,2		27	≤ 0,25	64,8	0,5	0	>0,5	35,2	≤ 0,25	≥256
CLI n=631				78,1	0,3	0,3			0,2				21,1	≤ 0,5	78,1			>0,5	21,9	≤ 0,5	≥256

Примечание.

АМП – антимикробный препарат, PEN – пенициллин, AMX – амоксициллин, ERY – эритромицин, CLI – клиндамицин, МПК – минимальная подавляющая концентрация, Ч – чувствительные, УР – умеренно-резистентные, Р – резистентные.

^a Пограничные значения МПК PEN, ERY и CLI указаны согласно критериям EUCAST [347], AMX – CLSI [136].

Распределение МПК PEN и АМХ у пневмококков
ведущих серотипов 6В, 14, 19F и 23F

Распределение МПК PEN и АМХ различалось в зависимости от серотипа. Наибольшей устойчивостью к PEN обладали пневмококки серотипа 14. МПК PEN $>0,06$ мг/л (категория нечувствительных, т.е. умеренно-резистентных и резистентных) была зарегистрирована у 69,7% (108/155) изолятов этого серотипа, из них два (1,3%) были полностью резистентны к PEN (МПК >2 мг/л). Из числа 19F-пневмококков 60,3% (114/121) были PEN-нечувствительными, при этом семь (5,8%) из них относились к категории резистентных (Таблица 7.5, Рисунок 7.4).

МПК₅₀ и МПК₉₀ для серотипов 14 и 19F совпадали, их значения составили 0,5 и 2 мг/л соответственно. Среди изолятов двух других наиболее распространенных серотипов 6В и 23F устойчивость к PEN была менее распространена, ей обладали 20,1% (32/159) и 29,6% (48/162) изолятов соответственно. Пять (3,1%) 23F-пневмококков было PEN-резистентными, а среди изолятов с серотипом 6В резистентных пневмококков выявлено не было. Большинство PEN-нечувствительных 6В-пневмококков (22 из 32, 69%) имело низкое значение МПК (0,125 мг/л). МПК₅₀ и МПК₉₀ для серотипа 6В составила $\leq 0,06$ и 0,12 мг/л, а для серотипа 23F – $\leq 0,06$ и 0,5 мг/л PEN соответственно (Таблица 7.5).

Таблица 7.5

**МПК₅₀ и МПК₉₀ (мг/л) пенициллина и амоксициллина
у пневмококков серотипов 6В, 14, 19F и 23F**

Серотип	Пенициллин		Амоксициллин	
	МПК ₅₀	МПК ₉₀	МПК ₅₀	МПК ₉₀
6В	$\leq 0,06$	0,12	$\leq 0,06$	0,12
14	0,5	2	1	2
19F	0,5	2	0,12	4
23F	$\leq 0,06$	0,5	$\leq 0,06$	0,25

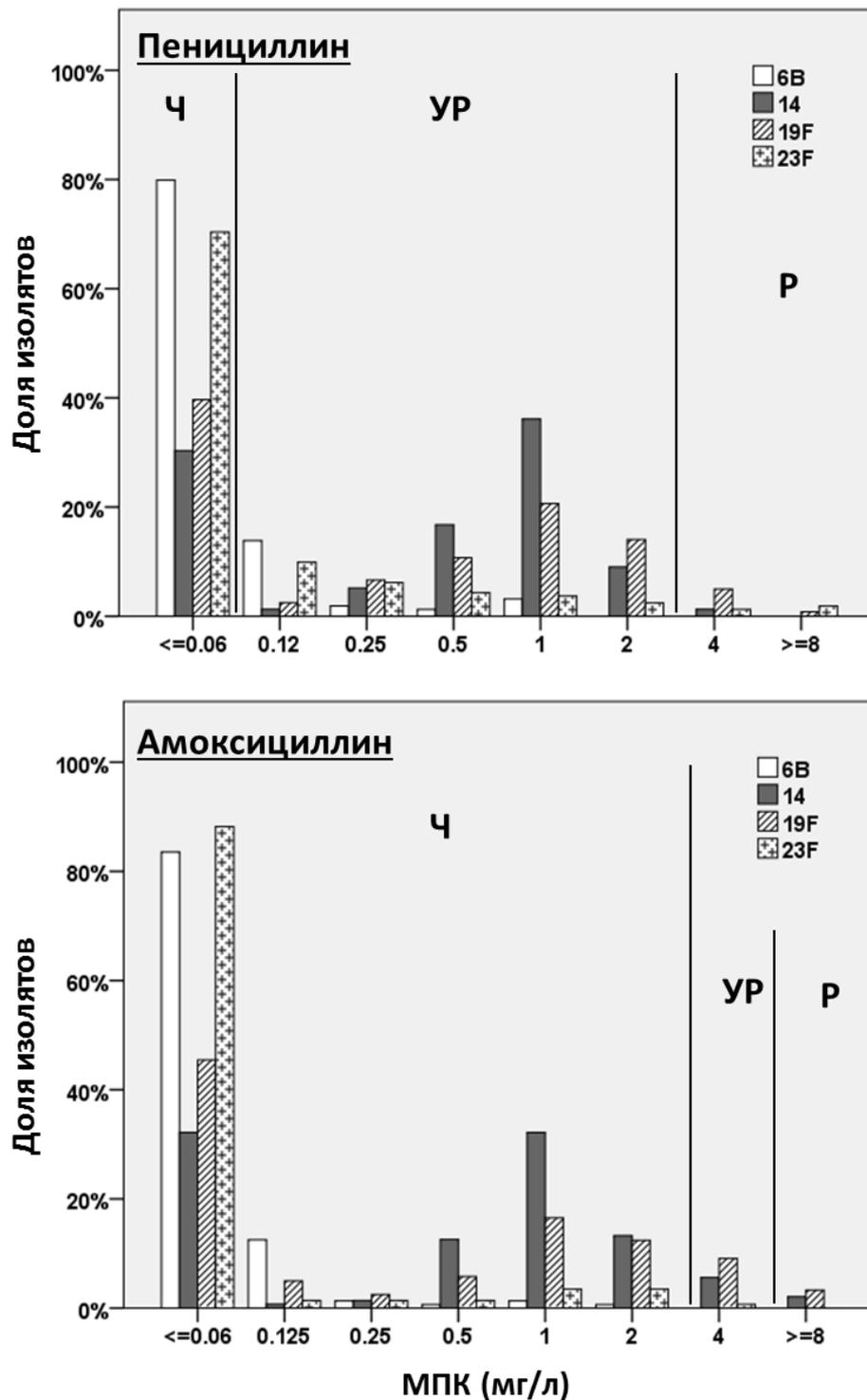


Рис. 7.4. Распределение пневмококков серотипов 6В, 14, 19F и 23F в зависимости от МПК пенициллина и амоксициллина

Примечание.

Ч – чувствительный; УР – умеренно-резистентный; Р – резистентный (критерии категорий указаны в Таблице 2.2). Число исследованных изолятов для пенициллина и амоксициллина соответственно: 6В – 159 и 152; 14 – 155 и 143; 19F – 121 и 121; 23F – 162 и 144.

Анализ серотиповых особенностей распределения МПК АМХ показал следующую картину (Рис. 7.4, Таблица 7.5). Большинство исследованных пневмококков соответствовало категории чувствительных (МПК АМХ \leq 2мг/л). АМХ-резистентностью с МПК $>$ 4 мг/л обладали три (2,1%) пневмококка серотипа 14 и четыре (3,3%) 19F-пневмококков, а среди 6В- и 23F-пневмококков таких изолятов не было (Рис. 7.4). При этом значения МПК₉₀ АМХ для серотипов 6В и 23F были невысоки (\leq 0,25 мг/л, Таблица 7.5). Наибольшая МПК₅₀ АМХ, составившая 1 мг/л, была обнаружена у пневмококков 14 серотипа, а самая высокая МПК₉₀ была у 19F-пневмококков – 4 мг/л (Таблица 7.5).

Фенотип и механизмы устойчивости к макролидам и линкозамидам

Данный анализ, как и оценка МПК, был проведен на выборке 2013-2016 гг. Из 224 ERY-резистентных пневмококков 37,9% изолятов были носителями гена *ermB*, еще у 41,1% изолятов было выявлено сочетание *ermB* и *mef*. Ген *mef* имели 17,9% ERY-резистентных изолятов, еще у 3,1% изолятов ни один из генов не определялся. Таким образом, ведущим механизмом резистентности к ERY стало метилирование мишени, опосредуемое через ген *ermB* [241], который был обнаружен у 79% (177/224) ERY-резистентных пневмококков. *ermB*-механизм предполагает устойчивость ко всем макролидам, линкозамидам и стрептограмину В, определяя так называемый MLS_B-фенотип (акроним по первым буквам названий АМП) [241]. Тестирование чувствительности к линкозамиду CLI показало наличие резистентности к нему у 142 из 224 (63,4%) ERY-резистентных пневмококков, что соответствовало конститутивному MLS_B-фенотипу (сMLS_B). Ген *ermB* был обнаружен у 138 из 142 сMLS_B-изолятов; оставшиеся четыре изолята оказались *ermB/mef*-негативными (Таблица 7.6).

**Носительство генов *ermB* и *mef* у эритромицинрезистентных пневмококков
и их чувствительность к клиндамицину**

Фенотип	n (%)	Генотип, % (n)			
		<i>ermB</i> + <i>/mef</i> -	<i>ermB</i> + <i>/mef</i> +	<i>ermB</i> - <i>/mef</i> +	<i>ermB</i> - <i>/mef</i> -
Всего ERY-резистентных	224 (100%)	37,9% (85)	41,1% (92)	17,9% (40)	3,1% (7)
Из них ^a:					
cMLS_B-фенотип (CLI-резистентность)	142 (63,4%)	40% (57)	57% (81)	0	3% (4)
iMLS_B-фенотип (CLI-резистентность)	40 (17,9%)	70% (28)	25% (10)	2,5% (1)	2,5% (1)
M-фенотип (CLI-чувствительность)	42 (18,7%)	0	0	95% (40)	5% (2)

Примечание.

ERY – эритромицин, CLI – клиндамицин.

^a cMLS_B-фенотип – конститутивная устойчивость ко всем макролидам, линкозамидам, стрептограмину В; iMLS_B-фенотип – индуцибельная устойчивость ко всем макролидам, линкозамидам, стрептограмину В (наличие индуцибельной устойчивости регистрировали в случае уплощения зоны подавления роста вокруг диска с CLI, расположенного рядом с ERY-диском); M-фенотип – устойчивость к 14- и 15-членным макролидам.

При рутинном тестировании диско-диффузионным методом чувствительность к CLI показали 82 из 224 (36,6%) ERY-резистентных пневмококков. В соответствии с существующими рекомендациями [28, 266], эти изоляты были исследованы на наличие индуцибельной резистентности к CLI (фенотип iMLS_B) путем определения активности CLI в присутствии макролида (диска с ERY; более подробно см. Материалы и методы). Подавление активности CLI было выявлено у 40 из 82 (49%) изолятов, что позволило отнести их к CLI-

резистентным пневмококкам с iMLS_B-фенотипом. Все iMLS_B-пневмококки (за исключением двух) были носителями *ermB*, как и изоляты с конститутивной устойчивостью к CLI (Таблица 7.6). В отношении остальных 42 изолятов (51%) CLI сохранял активность в присутствии ERY, т.е. эти изоляты были CLI-чувствительными, обладая M-фенотипом (устойчивость только к макролидам). Среди пневмококков с M-фенотипом доминировали носители *mef* (40 из 42, 95%) (Таблица 7.6).

В целом, с учетом индуцибельной резистентности, в выборке 2013-2016 гг. доля CLI-резистентных пневмококков составила 28,8% (182/631), а среди ERY-резистентных изолятов этого периода – 81,3% (182/224).

Таким образом, за семь лет наблюдения крупных сдвигов в структуре серотипов носоглоточных пневмококков не произошло. Они сохраняют высокую чувствительность к АМХ, однако значимо возросла их устойчивость к макролидам, что, с учетом преобладающего механизма резистентности, затрудняет использование любых макролидов и линкозамидов для эмпирической терапии пневмококковых инфекций у детей.

7.2. Динамика резистентности и клональная эволюция пневмококков серотипа 14 в 2010-2015 гг.

В этом разделе было проанализировано 78 изолятов пневмококка серотипа 14, собранных в 2010-2015 гг. Была описана динамика устойчивости к АМП и проведено генотипирование пневмококков путем МЛСТ, в результате чего была дана характеристика клонов, циркулировавших в течение исследования.

Динамика резистентности пневмококков серотипа 14

Как показал анализ динамики отдельных серотипов, приведенный выше (рис.7.2 Б), в течение 2010-2016 гг. произошло повышение доли серотипа 14 в общей структуре пневмококковых серотипов с 8% в 2010-2011 гг. до 13-15% в

2014-2016 гг. ($\chi^2=10,5$, $p=0,033$). Кроме того, был зафиксирован рост устойчивости пневмококков серотипа 14 к различным классам АМП, включая PEN, ERY и CLI. В 2013-2015 гг. по сравнению с 2010-2012 гг. доля PEN-устойчивых изолятов возросла до 92%, а устойчивыми к ERY и CLI стали 80% и 74% соответственно, при этом доля изолятов с МЛУ увеличилась до 74%. Устойчивость к SXT была на высоком уровне в оба периода исследования (77-80%). AMX и CHL сохраняли активность в отношении большинства исследованных изолятов. Доля пневмококков, устойчивых к этим АМП, составила 7% и 4% соответственно (Таблица 7.7).

Таблица 7.7

**Устойчивость пневмококков серотипа 14,
выделенных в 2010-2015 гг., к антимикробным препаратам**

АМП ^а	Число (%) резистентных ^б изолятов и изолятов с МЛУ			<i>p</i> (χ^2) ^в
	2010-2012 (n=39)	2013-2015 (n=39)	Всего (n=78)	
PEN	18 (46%)	36 (92%)	54 (69%)	<0,001 ($\chi^2=19,5$)
AMX	3 (8%)	2 (5%)	5 (7%)	0,305 ($\chi^2=2,4$)
ERY	13 (33%)	31 (80%)	44 (56%)	<0,001 ($\chi^2=16,9$)
CLI	12 (31%)	29 (74%)	41 (53%)	<0,001 ($\chi^2=15,3$)
SXT	30 (77%)	31 (80%)	61 (78%)	0,784 ($\chi^2=0,08$)
CHL	3 (8%)	0	3 (4%)	0,077 ($\chi^2=3,1$)
МЛУ	12 (31%)	29 (74%)	41 (53%)	<0,001 ($\chi^2=14,9$)

Примечание.

^а АМП – антимикробный препарат, PEN – пенициллин, AMX – амоксициллин, ERY – эритромицин, CLI – клиндамицин, SXT – триметоприм/сульфаметоксазол, CHL – хлорамфеникол, МЛУ – множественная лекарственная устойчивость.

^б Для PEN и AMX указано число (%) нечувствительных изолятов.

^в Приведено значение *p*, указывающее на статистическую значимость (критерий χ^2 , значение в скобках) различий частоты изолятов между 2010-2012 и 2013-2015 гг. Значимые изменения выделены жирным шрифтом.

Клональная эволюция пневмококков серотипа 14

Для того чтобы определить возможную взаимосвязь изменений спектра антибиотикочувствительности со сдвигами в клональной структуре, мы провели МЛСТ пневмококков серотипа 14, полученных в 2010-2015 гг., разделив выборку по времени выделения изолятов на два периода: 2010-2012 и 2013-2015 гг. (в каждую группу вошло по 39 изолятов). Всего было выявлено 26 сиквенс-типов (в том числе 13 новых сиквенс-типов), 19 (70%) из которых принадлежали трем клонам, включая СС15 (семь сиквенс-типов), СС143 (семь сиквенс-типов) и СС156 (пять сиквенс-типов) (Таблица 7.8, Рис. 7.5).

Таблица 7.8

**Сиквенс-типы и клональные комплексы пневмококков серотипа 14,
выделенных в 2010-2015 гг.**

СС	ST	n (% от всех изолятов)	n (% от изолятов в соответствующий период)		Комментарий ^a
			2010-2012	2013-2015	
143		30 (39%)	7 (18%)	23 (59%)^б	
	143		4	18	DLV Spain^{9v}-3 (ST156)
	9781		1	1	
	12618		0	1	SLV ST143 (новая <i>gki</i>)
	12619		0	1	SLV ST143 (новая комбинация аллелей)
	12620		0	1	SLV ST143 (новая комбинация аллелей)
	12629		1	0	SLV ST143 (новая комбинация аллелей)
	12931		1	1	SLV ST143 (новая <i>dll</i>)
15		21 (27%)	16 (41%)	5 (13%)^б	England¹⁴-9 (ST9)
	9		1	2	
	15		8	2	
	1881		1	0	
	9587		0	1	
	12623		4	0	DLV ST15 (новая комбинация аллелей)
	12626		1	0	SLV ST12623 (новая комбинация аллелей)
	12627		1	0	SLV ST15 (новая комбинация аллелей)

СС	ST	n (% от всех изолятов)	n (% от изолятов в соответствующий период)		Комментарий ^a
			2010-2012	2013-2015	
156		16 (21%)	7 (18%)	9 (23%)	Spain^{9V}-3 (ST156)
	156		5	3	
	1227		0	2	
	1569		0	1	
	2944		1	3	
	12930		1	0	SLV ST156 (новая <i>dll</i>)
Другие		11 (14%)	9 (23%)	2 (5%)^б	
	124		3	1	Netherlands¹⁴-35 (ST124)
	782		1	0	Sweden^{15A}-25 (ST63)
	1500		1	0	CC30 (ST30)
	12621		0	1	Синглетон (новые <i>gki</i> и <i>recP</i>)
	12622		2	0	SLV ST12625 (новая <i>gki</i>)
	12624		1	0	Синглетон (новая <i>spi</i>)
	12625		1	0	Группа из двух (ST12622, ST12625)
Всего		78 (100%)	39 (100%)	39 (100%)	

Примечание.

^a PMEN-клоны и их сиквенс-типы-родоначальники (в скобках), относящиеся к соответствующему клональному комплексу, обозначены жирным шрифтом. Для впервые описанных сиквенс-типов показано родство с соответствующим сиквенс-типом-родоначальником клона. SLV и DLV (single-, double-locus variant) — аллельные профили, отличающиеся по одному и двум локусам соответственно от указанного сиквенс-типа.

^б Значимые различия между долями в 2010-2012 и 2013-2015 гг. ($p < 0,05$; фактические значения p указаны в тексте).

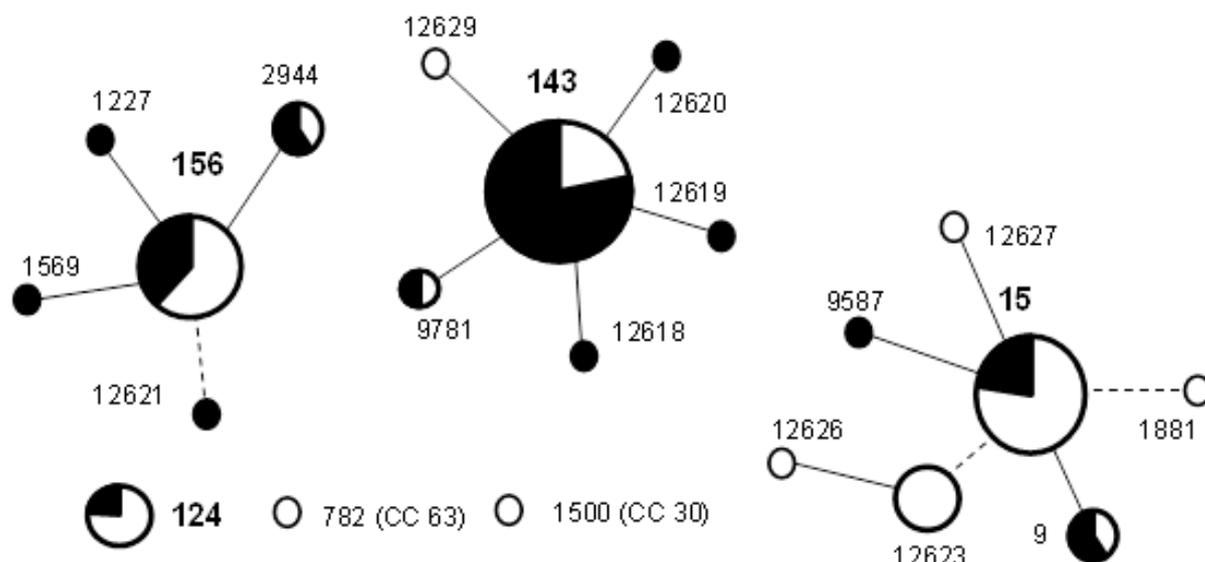


Рисунок 7.5 Популяционная структура пневмококков серотипа 14, выделенных в 2010-2015 гг., eBURST-анализ

Примечание. Однолокусные варианты (SLV) обозначены сплошными линиями, двухлокусные варианты (DLV) - пунктирными линиями. Размер круга пропорционален числу изолятов. Белым цветом представлены изоляты, выделенные в 2010-2012 гг., черным – в 2013-2015 гг.

Несмотря на то, что ST143 является DLV ST156 (по локусам *gdh* и *recP*), для целей настоящего исследования мы выделили ST143 и родственные сиквенс-типы, которые отличались от ST156 по динамке распространенности и профилю устойчивости к АМП (см. ниже), в отдельный клональный комплекс.

СС15, СС143 и СС156 содержали большинство исследованных изолятов (67/78, 86%), а самым представительным по их числу стал СС143 (39%, 30/78). В СС143 доминировали пневмококки ST143 (73%, 22/30), которые также лидировали по выборке в целом на уровне сиквенс-типа (28%, 22/78). Доли двух других ведущих сиквенс-типов ST15 и ST156 составили 13% (10/78) и 10% (8/78) соответственно (Таблица 7.12). Распространенность как клональных комплексов,

так и отдельных сиквенс-типов значительно отличалась в зависимости от периода ($\chi^2=19$, $p<0,001$ и $\chi^2=38$, $p=0,043$ соответственно). Так, в 2010-2012 гг. в популяции преобладал СС15 (41%, 16/39), а СС143 и СС156 были менее представительны (18%, 7/39 каждый) (Таблица 7.8, Рис. 7.5). При этом 23% (9/39) выборки этого периода составляли сиквенс-типы из других клональных групп (Таблица 7.8, строка «Другие»). Напротив, в 2013-2015 гг. лидирующим клоном стал СС143, который составил долю в 59% (23/39) в числе изолятов этого периода ($z=3,72$, $p<0,001$), а доля СС15 снизилась до 13% (5/39) ($z=-2,81$, $p=0,005$). Доля СС156 изменилась незначительно, составив 23% (9/39) ($z=0,56$, $p=0,575$), а распространенность сиквенс-типов из группы «Другие» значительно уменьшилась до 5% (2/39; $z=-2,26$, $p=0,023$) (Таблица 7.8, Рис. 7.5). Возрастание доли СС143 произошло преимущественно за счет пневмококков ST143, которые увеличили свое представительство с 10% (4/39) в 2010-2012 гг. до 46% (18/39) в 2013-2015 гг. ($z=3,52$, $p<0,001$). Сокращение СС15 было обусловлено значимым снижением доли ST15 с 21% (8/39) до 5% (2/39) ($z=-2,03$, $p=0,042$) и прекращением циркуляции пневмококков ST12623 (4/39 против 0/39 в 2010-2012 и 2013-2015 гг. соответственно; $z=-2,05$, $p=0,04$).

Таким образом, число сиквенс-типов пневмококков серотипа 14 сократилось с 19 в 2010-2012 гг. до 15 в 2013-2015 гг. Экспансия СС143 привела к снижению разнообразия циркулирующих генотипов (т.е. к повышению клональности в популяции пневмококков серотипа 14). Это выразилось в статистически значимом уменьшении индекса биоразнообразия Шеннона за время исследования с 2,63 (95% ДИ 2,93-2,33) до 2,05 (95% ДИ 2,47-1,64) (t-тест Хатчисона, $t=2,22$, $p=0,03$).

Устойчивость к АМП пневмококков серотипа 14
в зависимости от клональной принадлежности

Пневмококковые клоны серотипа 14 обладали разным профилем чувствительности к АМП. Изоляты СС143 отличались МЛУ-фенотипом (29/30, 97%), 100% были нечувствительны к PEN с высокой МПК₅₀ и МПК₉₀ (1 мг/л); 97% обладали резистентностью к ERY (МПК₅₀, МПК₉₀ ERY \geq 256 мг/л), причем у 97% (28/29) ERY-резистентных изолятов присутствовал ген *ermB*, что делало их CLI-резистентными и придавало MLS_B-фенотип. Большинство СС143-изолятов сохраняли чувствительность к AMX (2/30 нечувствительных, в т.ч. один AMX-резистентный). Устойчивость к SXT проявляли 87% (26/30) СС143-изолятов. Все изоляты СС143, выделенные с 2010 по 2015 гг., были чувствительны к CNL. Фенотип изолятов СС143 за время исследования качественно не изменился, а их вклад в уровень резистентности вырос за счет увеличения доли в популяции циркулирующих пневмококков (Таблица 7.8, Рис. 7.5). Отметим, что в 2013-2015 гг. СС143 был представлен ST143, к которому принадлежало 46% (18/39) из общего числа изолятов в данном периоде исследования, и пятью SLV этого сиквенс-типа, четыре из которых были впервые описаны (Таблица 7.8, Рис. 7.5). Кроме того, в 2013-2015 гг. пневмококки ST143, ST9781 и ST12620 приобрели дополнительную детерминанту устойчивости к макролидам, став носителями гена *mef*, который наряду с *ermB* присутствовал у семи из 23 ERY-резистентных изолятов этого периода. У других клонов одновременного носительства *ermB* и *mef* выявлено не было (Таблица 7.9).

**Устойчивость к антимикробным препаратам и генотип резистентности к макролидам
у пневмококков серотипа 14 в зависимости от клонального комплекса**

АМП	Категория	СС143 (n=30)	СС15 (n=21)	СС156 (n=16)	Другие (n=11)	Всего (n=78)
PEN	НЧ (%)	30 (100%)	4 (19%)	16 (100%)	4 (36%)	54 (69%)
	В т.ч. Р (%) (МПК>2 мг/л)	0	0	1 (6%)	0	1 (1%)
	МПК ₅₀ ; МПК ₉₀ (мг/л)	1; 1	≤0,06; 0,5	1; 2	≤0,06; 0,5	0,5; 2
AMX	НЧ (%)	2 (7%)	0	3 (19%)	0	5 (6%)
	В т.ч. Р (%) (МПК>4 мг/л)	1 (3%)	0	1 (6%)	0	2 (3%)
	МПК ₅₀ ; МПК ₉₀ (мг/л)	1; 2	≤0,06; 0,5	1; 4	≤0,06; 0,5	1; 2
ERY	Р (%)	29 (97%)	8 (38%)	4 (25%)	3 (27%)	44 (56%)
	МПК ₅₀ ; МПК ₉₀ (мг/л)	≥256; ≥256	≤0,25; ≥256	≤0,25; ≥256	≤0,25; ≥256	≥256; ≥256
	Генотип ERY-Р изолятов	<i>ermB/ermB+mef</i> 28/29; нет <i>ermB/mef</i> 1/29	<i>ermB</i> 5/8; <i>mef</i> 3/8	<i>ermB</i> 4/4	<i>ermB</i> 3/3	<i>ermB/ermB+mef</i> 40/44 (91%); <i>mef</i> 3/44 (7%); нет <i>ermB/mef</i> 1/44 (2%)
CLI	Р (%)	29 (97%)	5 (27%)	4 (25%)	3 (27%)	41 (53%)
SXT	Р (%)	26 (87%)	16 (76%)	14 (88%)	5 (46%)	61 (78%)
CHL	Р (%)	0	2 (10%)	1 (6%)	0	3 (4%)
МЛУ	n (%)	29 (97%)	5 (24%)	4 (25%)	3 (27%)	41 (53%)

АМП – антимикробный препарат, PEN - пенициллин, AMX – амоксициллин, ERY – эритромицин, CLI – клиндамицин, SXT – триметоприм/сульфаметоксазол, CHL – хлорамфеникол, МЛУ – множественная лекарственная устойчивость, СС – клональный комплекс, НЧ – нечувствительный, Р – резистентный, МПК – минимальная подавляющая концентрация.

Большинство из 21 СС15-изолята сохраняло чувствительность к бета-лактамам, лишь четыре изолята (19%) ST15 (n=3) и ST9587 (n=1) обладали умеренной резистентностью к PEN с МПК 0,12-1 мг/л (МПК₉₀ 0,5 мг/л). Устойчивость к ERY и CLI была выявлена соответственно у 8 (38%) и 5 (27%) изолятов СС15. Три из восьми ERY-резистентных изолятов (все – ST9) были носителями гена *mef* с M-фенотипом, т.е. они сохраняли чувствительность к CLI. Два из трех CHL-резистентных изолятов всей исследованной выборки относились к данному клональному комплексу (Таблица 7.9).

Большинство СС15-изолятов (16/21, 76%) были устойчивы к SXT. В 2010-2012 гг. клон СС15 был представлен 16 изолятами, относившимися к шести сиквенс-типами, среди которых преобладали ST15 (n=8) и его DLV, впервые описанный ST12623 (n=4) (Таблица 7.8, Рис. 7.5). Все ST12623-изоляты были чувствительны к PEN, ERY и CLI, четверть из них к CHL. В 2013-2015 гг. СС15 составляло пять изолятов трех сиквенс-типов, все были резистентны к ERY, 3/5 – нечувствительны к PEN. МЛЮ была выявлена у 24% (5/21) СС15-изолятов.

СС156 в рассматриваемые периоды был представлен ST156 и четырьмя его SLV. Фенотипический профиль СС156-изолятов в целом за время наблюдения не претерпел заметных изменений. Все они были нечувствительны к PEN с МПК₉₀ 2 мг/л, 19% (3/16) обладали сниженной чувствительностью к AMX (МПК₉₀ 4 мг/л), 88% (14/16) были резистентны к SXT. В то же время, большинство СС156-пневмококков сохраняли чувствительность к ERY и CLI, в том числе все пневмококки ST156. Резистентностью к этим АМП обладали пневмококки ST1227 (n=2), ST1569 (n=1) и ST2944 (n=1). Доля изолятов с МЛЮ-фенотипом в СС156 была невысока – 25% (4/16) (Таблица 7.9).

Изоляты ST124 (СС124, n=4), ST782 (n=1, СС63), ST1500 (n=1, СС30) (Таблица 7.8, строка «Другие») были чувствительны ко всем тестируемым АМП (ST782 был устойчив к SXT). Изоляты синглтонов ST12621 и ST12624, а также группы из двух сиквенс-типов ST12622 (1 из 2 изолятов) и ST12625 были устойчивы к PEN с МПК 0,25-1 мг/л. Группа ST12622/12625 обладала резистентностью к ERY и CLI с MLS_B-фенотипом, связанной с носительством

ermB. Эта группа из трех изолятов, единственная из числа внеклональных изолятов, обладала МЛУ-фенотипом.

7.3 Клональная эволюция пневмококков серотипа 19А в 2002-2013 гг.

В настоящем разделе описаны изменения клонального разнообразия пневмококков серотипа 19А в период 2002-2013 гг. в призме устойчивости к антибиотикам, изменения структуры пенициллинсвязывающих белков (ПСБ) и носительства пилей. В исследование были включены клинические изоляты пневмококков, выделенные в разных регионах России от педиатрических пациентов с респираторными инфекциями различной локализации. У 19А-пневмококков определяли: (1) клональную принадлежность с помощью метода мультилокусного сиквенс-типирования (МЛСТ), (2) чувствительность к широкому спектру антибиотиков, (3) гены, кодирующие пили типа 1 и 2, (4) структуру ПСБ путем секвенирования фрагментов генов *PCB1a*, *PCB2b* и *PCB2x*.

Описание коллекции пневмококков серотипа 19А

В исследование были включены 49 неинвазивных изолятов пневмококков серотипа 19А, выделенных у детей (медиана возраста 2,76 года, межквартильный размах 2,59 года). Восемнадцать изолятов (изоляты были любезно предоставлены НИИ антимикробной химиотерапии ГОУ ВПО «Смоленская государственная медицинская академия Минздравсоцразвития», директор член-корр. РАН, профессор, доктор медицинских наук, Козлов Р.С.), были выделены в 2003 году в городах европейской части России (Москва, Санкт-Петербург и Смоленск) были выделены девять изолятов были выделены в городах азиатской части России в 2002-2008 гг. (Анадырь, Екатеринбург, Иркутск и Новокузнецк); 22 изолята были получены в Москве в 2010-2013 гг. Бактерии выделяли из носоглоточных мазков

(67%), жидкости среднего уха (18%), а также образцов из нижних дыхательных путей (мокроты и бронхоальвеолярного лаважа; 15%).

Клональная эволюция и устойчивость к антимикробным препаратам

Разнообразие клональных линий и сиквенс-типов 19А-пневмококков в зависимости от времени выделения и его географии представлено в Таблице 7.10 и на Рисунке 7.6.

Таблица 7.10

Клональные комплексы (СС) и сиквенс-типы (ST) пневмококков серотипа 19А, выделенных в России в 2002-2013 гг.

СС	ST	n (% от всех изолятов)	n (% от изолятов в соответствующей колонке)			Комментарий ^a
			Европейская часть		Азиатская часть	
			2003	2010- 2013	2002-2008	
663		14 (28%)	12 (67%)	2 (9%) ^b	0	Colombia ^{23F} -26 (ST338)
	663		5	1		
	10434		4	1		DLV ST663
	10435		2	0		DLV ST663
	10515		1	0		SLV ST663
230		12 (25%)	0	9 (41%) ^b	3 (33%)	Denmark ¹⁴ -32 (ST230)
	230			2	1	
	276			1	0	
	1611			1	0	
	2013			1	0	
	5369			0	1	
	5539			1	0	
	10431			2	1	DLV ST230
	10432			1	0	SLV ST10432

СС	ST	n (% от всех изолятов)	n (% от изолятов в соответствующей колонке)			Комментарий ^a
			Европейская часть		Азиатская часть	
			2003	2010- 2013	2002-2008	
156		7 (14%)	6 (33%)	1 (5%) ^b	0	Spain ^{9V} -3 (ST156)
	143		0	1		
	10437		4	0		DLV of ST156
	10438		1	0		SLV of ST10437
	10514		1	0		SLV of ST10437
320		7 (14%)	0	7 (32%) ^b	0	Taiwan ^{19F} -14 (ST236)
	320			3		
	9656			4		SLV ST320
Синглетоны		5 (10%)	0	0	5 (56%) ^B	
	10433			0	1	Новая комбинация аллелей
	10436			0	1	Новая аллель <i>dll</i>
	10512			0	3	Новая комбинация аллелей
Разные		4 (10%)	0	3 (13%)	1 (11%)	
	63			1	0	Sweden ^{15A} -25 (ST63)
	5954			0	1	Группа из двух (ST5954, ST10430)
	10430			1	0	SLV of ST5954
	10511			1	0	Netherlands ³ -31 (ST180)
Итого		49 (100%)	18 (100%)	22 (100%)	9 (100%)	

Примечание

^a PMEN-клоны и их сиквенс-типы-родоначальники (в скобках), относящиеся к соответствующему клональному комплексу, обозначены жирным шрифтом. Для впервые описанных сиквенс-типов показано родство с соответствующим сиквенс-типом-родоначальником клона. SLV и DLV (single- or double-locus variant) — аллельные профили, отличающиеся по одному и двум локусам соответственно от указанного сиквенс-типа.

^b Значимые различия между долями в 2003 и 2010-2013 гг. (p<0,05).

^B Значимые различия между долями в 2002-2008 и 2003, 2010-2013 гг. (p<0,05).

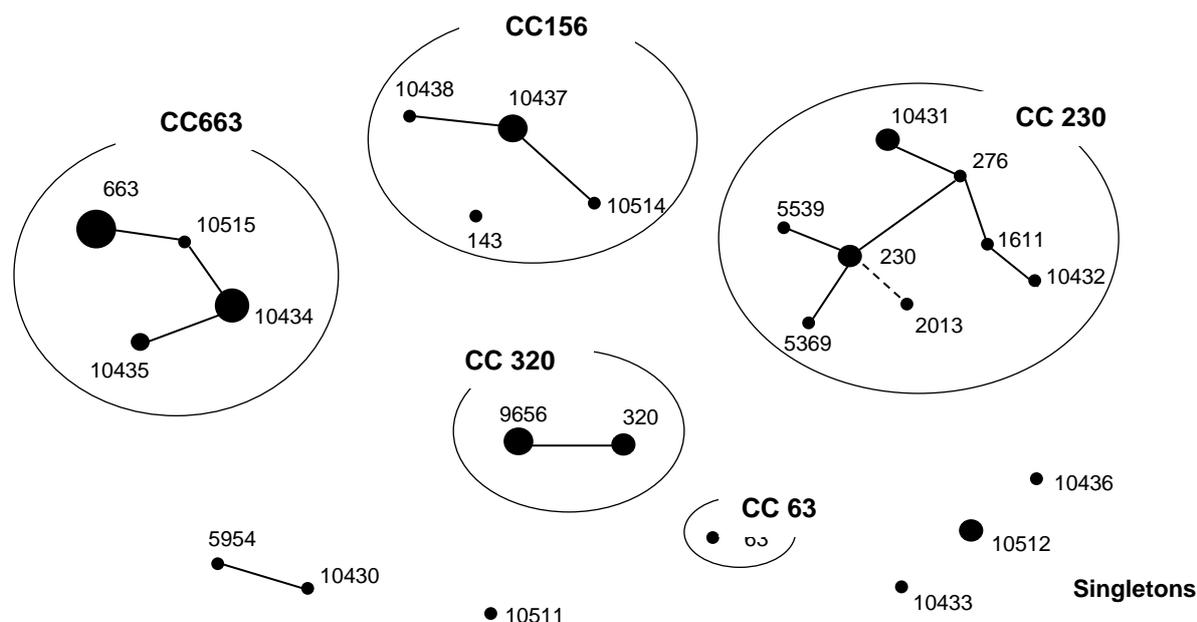


Рисунок 7.6 Популяционная структура пневмококков серотипа 19А, выделенных в России в 2002-2013 гг., eBURST анализ

Примечание. SLV обозначены сплошными линиями; DLV - пунктирными линиями. Размер круга пропорционален числу изолятов.

Всего было выявлено 25 сиквенс-типов (14 из них были описаны впервые), принадлежавших к шести основным клонам; три сиквенс-типа не имели определенной клональной принадлежности, т.е. были синглтонами. Распределение клональных комплексов в течение периода исследования существенно различалось ($\chi^2 = 29,60$, $p < 0,001$). Европейские изоляты 2003 г. были представлены двумя клонами, CC663 ($n=12$) и CC156 ($n=6$). В период 2010-2013 гг. распространенность этих клонов снизилась, и они были в значительной степени замещены клонами CC230 и CC320, которые составили 73% (16/22) от всех изолятов, выделенных в 2010-2013 гг. Пять из девяти изолятов из азиатской части России были представлены синглтонами; три изолята принадлежали к CC230 (Рисунок 7.6).

Наиболее распространенный клон СС663 (n=14, 28% от всей коллекции) был представлен четырьмя родственными сиквенс-типами (Таблица 7.10). СС663 преобладал в европейской части России в 2003 году (67%); в 2010-2013 гг. были выделены только два изолята СС663. Большинство изолятов СС663 (79%) имели МЛУ-фенотип с высокими значениями МПК β -лактамов (Таблица 7.11, 7.12).

Все резистентные к цефтриаксону изоляты (n=4; МПК > 2 мг/л) принадлежали к этому клональному комплексу (Таблица 7.12). Более того, изоляты ST10434 (n=5), входящего в СС663, обладали экстремальной резистентностью, т.к. были нечувствительны к пяти из шести тестируемых групп антибиотиков, включая пенициллин, эритромицин, клиндамицин, тетрациклин и хлорамфеникол; они сохраняли чувствительность только к ко-тримоксазолу.

Вторым по распространенности клоном был СС230 (n=12, 25% от всей коллекции), который включал восемь сиквенс-типов (Таблица 7.10). Большинство изолятов СС230 было выделено в Москве в 2010-2013 гг., составляя 41% от этой части коллекции; три изолята было получено в азиатской части России. СС230 характеризовался умеренными и низкими значениями МПК β -лактамов, в большинстве случаев сохранял чувствительность к клиндамицину, тетрациклину и хлорамфениколу, но обладал резистентностью к ко-тримоксазолу (Таблица 7.11, 7.12). МЛУ обладали пять (42%) изолятов СС230, которые были резистентны к эритромицину.

**Резистентность к антимикробным препаратам, генотип резистентности к макролидам и наличие генов пилей
в клональных группах пневмококков серотипа 19А**

СС (n изолятов)	n и доля (%) изолятов											
	Нечувствительны к соответствующему препарату ^a								МЛУ	Генотип резистентности к макролидам ^b	PII ^c	PI2
	PEN	AMX	CTX	ERY	CLI	SXT	CHL	TET				
СС663 (14)	14 (100%)	13 (93%)	11 (79%)	14 (100%)	9 (64%)	3 (21%)	7 (50%)	6 (43%)	11 (79%)	<i>erm(B)/mef</i> , 3 (21%); <i>erm(B)</i> , 6 (43%); <i>mef</i> , 3 (21%); нет <i>erm(B)/mef</i> , 2 (14%)	14 (100%)	0
СС230 (12)	12 (100%)	0	0	5 (42%)	2 (17%)	12 (100%)	1 (8%)	2 (17%)	5 (42%)	<i>erm(B)/mef</i> , 2 (40%); <i>mef</i> , 3 (60%)	0	0
СС320 (7)	7 (100%)	7 (100%)	7 (100%)	7 (100%)	6 (6%)	7 (100%)	0	4 (57%)	7 (100%)	<i>erm(B)/mef</i> , 6 (86%); <i>mef</i> , 1 (14%)	7 (100%)	7 (100%)
СС156 (7)	7 (100%)	7 (100%)	4 (57%)	1 (14%)	1 (14%)	6 (86%)	0	1 (14%)	1 (14%)	<i>erm(B)</i> , 1/1	7 (100%)	0
СС63 (1)	0	0	0	1	1	0	0	1	1	<i>erm(B)</i> , 1/1	0	0
Синглетон, 10433 (1)	1	0	0	1	1	0	0	0	1	<i>erm(B)</i> , 1/1	0	0
Синглетон, 10436 (1)	1	1	1	0	0	1	0	0	0	Нет ERY- резистентных	1	0

СС (n изолятов)	n и доля (%) изолятов											
	Нечувствительны к соответствующему препарату ^a								МЛУ	Генотип резистентности к макролидам ^b	PI ^c	PI2
	PEN	AMX	CTX	ERY	CLI	SXT	CHL	TET				
PEN-S^d (6): CC180, ST10511 (1); Синглетон, ST10512 (3); Группа двух сиквенс- типов, ST5954 (1), ST10430 (1)	0	0	0	0	0	4 (67%)	0	1 (17%)	0	Нет ERY- резистентных	0	0
Итого (49)	43 (88%)	28 (57%)	23 (47%)	29 (59%)	20 (41%)	33 (67%)	8 (16%)	13 (27%)	25 (51%)	<i>erm(B)/mef</i> , 11 (38%); <i>erm(B)</i> , 9 (31%); <i>mef</i> , 7 (24%); нет <i>erm(B)/mef</i> , 2 (7%)	29 (59%)	7 (14%)

Примечание.

^a AMX — амоксициллин; CHL — хлорамфеникол; CLI — клиндамицин; CTX — цефтриаксон; ERY — эритромицин; PEN — пенициллин; SXT — ко-тримоксазол; TET — тетрациклин; МЛУ — множественная лекарственная устойчивость.

^b Процент показывает долю среди эритромицин-резистентных изолятов, несущих соответствующую детерминанту резистентности.

^c PI (*pilus islet*) — островок, кодирующий пили.

^d PEN-S (*penicillin-susceptible*) — группа из шести пенициллин-чувствительных изолятов, описанных в Таблице 7.11

СС156 был представлен семью 19А-пневмококками (14% от всей коллекции), относящимися к четырем сиквенс-типам. Шесть из семи изолятов были выделены в городах европейской части России в 2003 году, сформировав субклон в составе трех новых близкородственных сиквенс-типов: ST10437, ST10438 и ST10514 (Таблица 7.10). Эти пневмококки обладали примечательным фенотипом, будучи полностью резистентными к амоксициллину с МПК 4-8 мг/л, которые превышали МПК пенициллина (Таблица 7.12). Кроме того, эти изоляты были устойчивы к ко-тримоксазолу, но сохраняли чувствительность к эритромицину, клиндамицину, тетрациклину и хлорамфениколу.

СС320-пневмококки (n=7, 14% от всей коллекции) были выделены исключительно в 2010-2013 гг., их доля в этот период составила 32% (Таблица 7.10). СС320 был представлен двумя сиквенс-типами: ST320 (n=3) и ST9656 (n=4; новый однолокусный вариант ST320 по аллели *recP*). Все изоляты СС320 имели МЛУ с высокими МПК пенициллина и амоксициллина (диапазон 1-4 мг/л) и резистентностью к эритромицину и ко-тримоксазолу (Таблица 7.11, 7.12). Все изоляты, кроме одного, имели более высокие значения МПК амоксициллина, чем МПК пенициллина; все СС320-пневмококки были чувствительны к хлорамфениколу.

Девять изолятов представляли различные клональные линии или несвязанные сиквенс-типы. Все шесть пенициллин-чувствительных 19А-пневмококков принадлежали к этой группе изолятов и не имели МЛУ (Таблица 7.11, 7.12). Один синглетон (ST10436) демонстрировал высокие значения МПК пенициллина и амоксициллина (2 мг/л) (Таблица 7.12).

**Чувствительность к β -лактамам и частота аминокислотных замен в пенициллинсвязывающих белках
у пневмококков серотипа 19А**

СС	n и (%) изолятов; диапазон МПК (мг/л) ^a									ПСБ ^b		
	PEN			AMX			CTX			% замен аминокислот; среднее (СО)		
	S ≤0,06	I >0,06; ≤2	R >2	S ≤0,5	I >0,5; ≤2	R >2	S ≤0,5	I >0,5; ≤2	R >2	1a	2b	2x
Всего, n (%)	6 (12%)	32 (65%)	11 (23%)	21 (43%)	14 (29%)	14 (29%)	26 (53%)	19 (39%)	4 (8%)	13,9% 1,7%	7,2% 3,3%	8,7% 2,8%
СС663 (n=14)	0	5 (36%)	9 (64%)	1 (7%)	11 (79%)	2 (14%)	3 (21%)	7 (50%)	4 (29%)	13,5% 0,8%	6,0% 1,9%	6,6% 0,7%
	1,0-16			0,5-12			0,250-32					
СС230 (n=12)	0	12 (100%)	0	12 (100%)	0	0	12 (100%)	0	0	14,1% 2,0%	4,3% 0	6,7% 1,1%
	0,094-0,5			0,047-0,5			0,06-0,5					
СС320 (n=7)	0	7 (100%)	0	0	1 (14%)	6 (86%)	0	7 (100%)	0	13,9% 1,2%	11,3% 0,3%	12,1% 0,1%
	1,0-2,0			1,0-4,0 ^c			1-1,5					
СС156 (n=7)	0	5 (71%)	2 (29%)	0	1 (14%)	6 (86%)	3 (43%)	4 (57%)	0	11,6% 1,9%	14,8% 2,0%	10,8% 2,9%
	1,0-4,0			1,5-8,0 ^c			0,5-1,0					
СС63, ST63 (n=1)	0	1	0	1	0	0	1	0	0	9,5%	3,6%	11,3%
	0,125			0,047			0,250					

СС	n и (%) изолятов; диапазон МПК (мг/л) ^a									ПСБ ^b		
	PEN			AMX			CTX			% замен аминокислот; среднее (СО)		
	S ≤0,06	I >0,06; ≤2	R >2	S ≤0,5	I >0,5; ≤2	R >2	S ≤0,5	I >0,5; ≤2	R >2	1a	2b	2x
Всего, n (%)	6 (12%)	32 (65%)	11 (23%)	21 (43%)	14 (29%)	14 (29%)	26 (53%)	19 (39%)	4 (8%)	13,9% 1,7%	7,2% 3,3%	8,7% 2,8%
Синглетон, ST10433 (n=1)	0	1	0	1	0	0	1	0	0	14%	6,5%	6,5%
	0,5			0,5			0,25					
Синглетон, ST10436 (n=1)	0	1	0	0	1	0	0	1	0	14%	9,4%	13,1%
	2			2			1,5					
PEN-S^d (n=6)	6 (100%)	0	0	6 (100%)	0	0	6 (100%)	0	0	0,4 %	0	0
	0,003-0,016			0,01-0,032			0,016-0,08					

Примечание.

^a PEN — пенициллин; AMX — амоксициллин; CTX — цефтриаксон. S — чувствительные; I — промежуточные; R — резистентные.

^b Долю аминокислотных замен рассчитывали путем сравнения аминокислотных последовательностей консервативных мотивов в ПСБ1a (позиции 341-582), ПСБ2b (позиции 375-652) и ПСБ2x (позиции 337-661) исследуемых изолятов с аминокислотными последовательностями ПСБ референсного штамма R6. Шесть пенициллин-чувствительных изолятов было исключено из расчетов общего среднего.

^c У шести из семи изолятов значения МПК амоксициллина были выше, чем МПК пенициллина.

^d PEN-S (penicillin-susceptible) — группа из шести пенициллин-чувствительных изолятов; описана в Таблице 7.11

В целом, чувствительность 19А-пневмококков к β -лактамным антибиотикам была сходной в 2003 и 2010-2013 гг. В течение этого периода доля полностью пенициллин-резистентных изолятов (МПК > 2 мг/л) снизилась с 28% (5/18) до 5% (1/22) ($p=0,041$).

Несмотря на то, что доля эритромицин-резистентных 19А-пневмококков осталась неизменной (67-68%), доля изолятов, несущих две детерминанты резистентности к эритромицину *ermB* и *mef*, увеличилась с 17% (2/12) в 2003 году до 60% (9/15) в 2010-2013 гг. ($p=0,023$). Частота хлорамфеникол-резистентных изолятов значительно снизилась с 33% (6/18) до 5% (1/22) ($p=0,017$). Наоборот, доля резистентных ко-тримоксазолу изолятов в течение периода исследования увеличилась с 44% (8/18) до 82% (18/22) ($p=0,014$).

Носительство генов пилей в зависимости от клональной принадлежности и антибиотикорезистентности

У 29 изолятов (59%) было показано наличие PI1, из которых у семи изолятов дополнительно присутствовали PI2; у 20 изолятов (41%) островков, кодирующих пили, обнаружено не было (Таблица 7.11, 7.10). Носительство PI1 и PI2 имело явную клональность. Пневмококки СС663 и СС156 несли PI1, но не обладали PI2, в то время как в СС320-изолятах были выявлены оба вида PI (Таблица 7.11). Среди остальных пневмококков не было выявлено изолятов, несущих PI, за исключением ST10436, который был PI1-положительным. Частота МЛУ была значительно выше среди PI-положительных изолятов (Таблица 7.13).

Подавляющее большинство пилированных пневмококков были нечувствительны к β -лактамным антибиотикам, однако все изоляты без PI оставались чувствительны к амоксицилину и цефтриаксону, имея низкие и умеренные значения МПК пенициллина (Таблица 7.13, Таблица 7.10). Кроме того, распространенность эритромицин- и клиндамицин-резистентных пневмококков была выше среди пилированных изолятов (Таблица 7.13).

Нечувствительность к антимикробным препаратам и носительство генов пилей у пневмококков серотипа 19А

Препарат ^а	PI-отрицательные ^б (n=20)	PI-положительные ^б (n=29)	p ^с
	n (%) нечувствительных изолятов		
PEN	14 (70%)	29 (100%)	<0,001
AMX	0	28 (97%)	<0,001
CTX	0	23 (79%)	<0,001
ERY	7 (35%)	22 (76%)	0,004
CLI	4 (20%)	16 (55%)	0,003
SXT	16 (80%)	17 (59%)	0,117
CHL	1 (5%)	7 (24%)	0,075
TET	16 (80%)	20 (69%)	0,390
МЛУ (есть)	6 (30%)	19 (66%)	0,015

Примечание.

^а AMX — амоксициллин; CHL — хлорамфеникол; CLI — клиндамицин; CTX — цефтриаксон; ERY — эритромицин; PEN — пенициллин; SXT — ко-тримоксазол; TET — тетрациклин; МЛУ — множественная лекарственная устойчивость.

^б PI (pilus islet) — островок, кодирующий пили. PI-отрицательные — изоляты, не несущие PI; PI-положительные — изоляты, несущие PI1 или PI1 вместе с PI2.

^с Статистически значимые различия в долях нечувствительных изолятов среди PI-отрицательных и PI-положительных пневмококков показаны жирным шрифтом.

Результаты секвенирования пенициллинсвязывающих белков

Аминокислотные последовательности фрагментов ПСБ изучаемых изолятов мы сравнили со структурой ПСБ референсного пенициллин-чувствительного штамма *S. pneumoniae* R6. Число аминокислотных замен различалось между чувствительными и нечувствительными к пенициллину изолятами, а также между клональными линиями (Таблица 7.12, Таблица 7.11). Пенициллин-чувствительные изоляты (n=6) не имели аминокислотных замен в ПСБ2b и ПСБ2x; в ПСБ1a была обнаружена только одна аминокислотная замена. В ПСБ1a, ПСБ2b и ПСБ2x пенициллин-нечувствительных пневмококков были заменены в среднем 13,9%, 7,2% и 8,7% аминокислот соответственно. Различные клоны пенициллин-нечувствительных 19А-пневмококков имели сходную частоту аминокислотных замен в ПСБ1a (Таблица 7.12, Таблица 7.11). У 33 (77%) изолятов аминокислотные замены были найдены в консервативном мотиве ПСБ1a 370STMK373 (T371A/S) и во фланкирующих регионах консервативного мотива 428SRN430 (P432T). Во всех пенициллин-нечувствительных изолятах, кроме одного, присутствовала одинаковая замена из четырех аминокислот (замена TSQF на NTGY в позициях 574-577) (Таблица 7.11). Структура консервативного мотива ПСБ1a 557KTG559 и фланкирующих его регионов была интактна. В ПСБ2b аминокислотные замены чаще встречались у изолятов CC156 и CC320 (Таблица 7.12). Все нечувствительные к пенициллину изоляты несли замену T445A в консервативном мотиве 442SSNT445 и мутацию T488A/S. Все 14 амоксициллин-резистентных 19А-пневмококков содержали уникальный набор из десяти аминокислотных замен в регионе 591-640 ПСБ2b (A591S, G596P, N605D, L608T, A618G, D624G, Q627E, T629N, S639T и D640E), повреждения которого связаны со сниженной чувствительностью к амоксициллину. В консервативном мотиве ПСБ2b 385SVVK388 или рядом с ним мутации отсутствовали. Как и в случае ПСБ2b, структурные изменения ПСБ2x были более выражены у изолятов CC156 и CC320 (Таблица 7.12). У 31 (72%) пенициллиннечувствительного пневмококка внутри консервативного мотива ПСБ2x 337STMK340 присутствовала мутация

T338A/P. Другие частые мутации включали I371T, R384G/S, Q552E, N605T (Таблица 7.11).

Далее мы оценили родство между структурой ПСБ исследованных изолятов и ряда референсных штаммов с помощью построения филогенетического дерева методом ближайших соседей (Рисунок 7.7). Все чувствительные к пенициллину изоляты кластеризовались со штаммом R6 (Рис. 7.7, а-с). Структура ПСБ1а исследованных СС320-изолятов была на 100% идентична референсным последовательностям MDR19A/ST320 и предшественника этого сиквенс-типа – ST236 (клон Taiwan^{19F}-14) (Рис. 7.7а). Один высоко резистентный пневмококк ST10434, относившийся к СС663 (изолят №242; МПК: пенициллин и амоксициллин, 3 мг/л; цефтриаксон 8 мг/л), кластеризовался с этой же ветвью изолятов. Кроме того, вблизи СС320/ST236-группы изолятов локализовались представители СС230. Структура ПСБ изолятов, относившихся к СС156 и СС663, занимала промежуточное положение между MDR19A/ST320 и Spain9V-3/ST156 (Рис. 7.7а).

Аминокислотные последовательности ПСБ2b у изолятов СС320 и СС156 (кроме ST143, обладавшим идентичным ПСБ2b со Spain9V-3/ST156) были эквивалентны или очень близки к структуре ПСБ2b у MDR19A/ST320 (Рис. 7.7, б). Изоляты СС230 и СС663 (за исключением одного экстремально резистентного изолята ST663, описанного ниже) образовывали большой кластер сходных последовательностей в непосредственной близости от R6 и группы пенициллин-чувствительных изолятов.

Следует отметить, что группа высоко резистентных пневмококков, относившихся к СС156 и СС320 и обладавших мутацией A681G в ПСБ2b, кластеризовалась вместе. Один из этих изолятов (ST663) с экстремально высокой резистентностью к β -лактамам (изолят №58, МПК: пенициллин, 16 мг/мл; амоксициллин, 12 мг/мл; цефтриаксон, 32 мг/мл), располагался отдельно от остальных изолятов из СС663, но вместе с MDR19A/ST320-идентичными изолятами (Рис. 7.7, б).

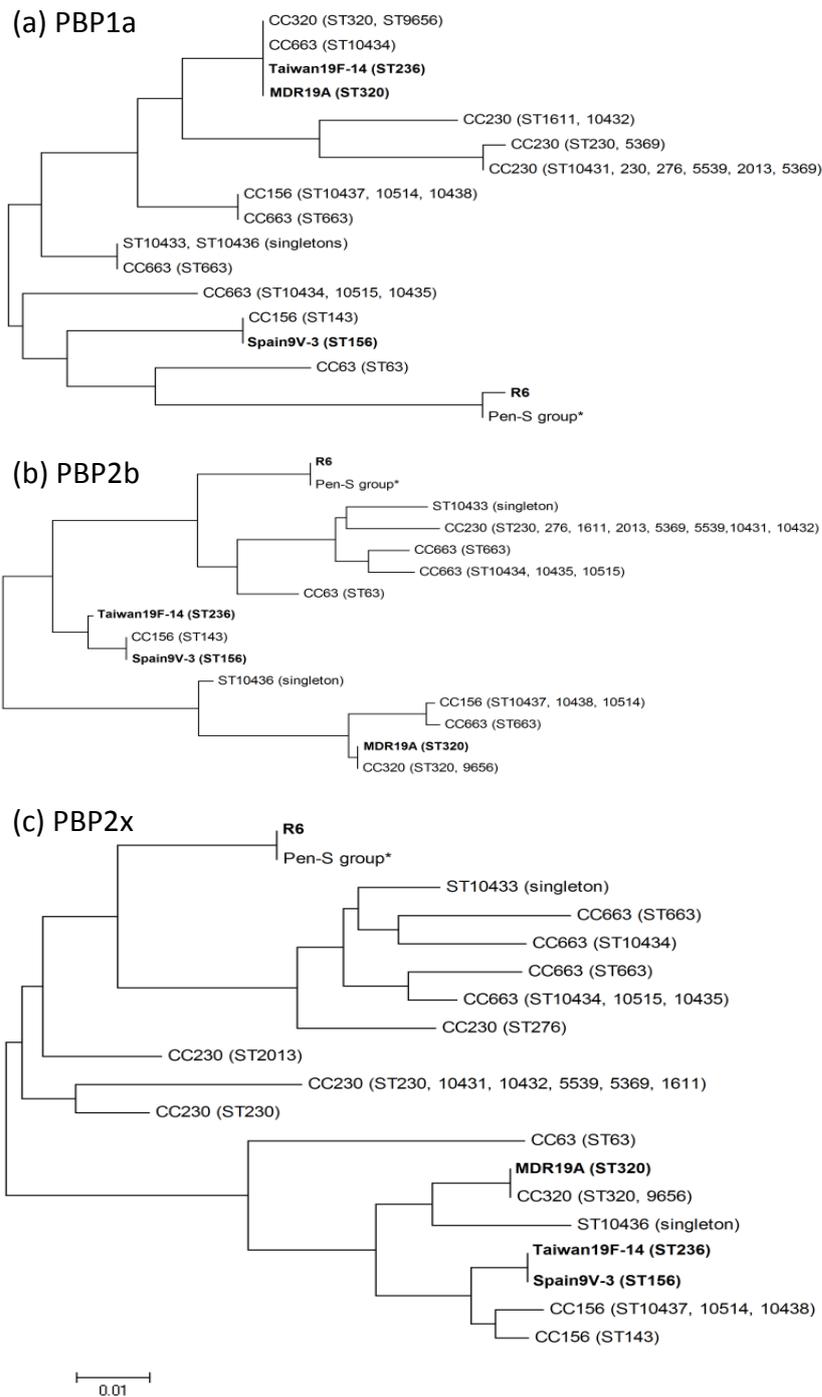


Рисунок 7.7 Родство аминокислотных последовательностей ПСБ исследованных 19А-пневмококков и референсных штаммов

Примечание. Родство ПСБ1а (а), ПСБ2б (б) и ПСБ2х (в) показано путем построения филогенетического дерева методом ближайших соседей с использованием программного обеспечения MEGA. Референсный штамм R6 и клоны Taiwan^{19F}-14 (ST236), Spain^{9V}-3 (ST156) и MDR19A (ST320) показаны жирным шрифтом. Отрезок соответствует генетическому расстоянию в 1%.

Аминокислотные последовательности ПСБ2х СС156-изолятов были близки к таковым у Taiwan19F-14/ST236 и Spain9V-3/ST156 (Рис. 7.7, b). Изоляты из СС320 и клон MDR19A/ST320 имели идентичную структуру ПСБ2х. Эта группа изолятов группировалась отдельно от СС663, который по аминокислотной последовательности ПСБ2х был ближе к R6.

Таким образом, 80% изученной коллекции изолятов 19А-пневмококков относились к четырем глобально распространенным клональным комплексам: СС156, СС230, СС320 и СС663. Циркулирующие в настоящее время в Европейской части России пневмококки серотипа 19А относятся преимущественно к СС230 и СС320 (70%), замещая распространенные ранее СС156 и СС663. Все изоляты СС156, СС320 и СС663 имели значения МПК пенициллина ≥ 1 мг/л, в то время как изоляты СС230 характеризовались умеренными и низкими значениями МПК пенициллина, и были полностью чувствительны к амоксициллину и цефтриаксону. Это свидетельствует о клональных различиях чувствительности к β -лактамам антибиотикам в исследуемой популяции пневмококков. Поскольку данная коллекция изолятов была получена до включения ПКВ в Национальный календарь профилактических прививок в 2014 году, описанная эволюция клональной структура пневмококков серотипа 19А носила ПКВ-независимый характер, как и в некоторых других регионах. Распространение небольшого числа клонов серотипа 19А скорее всего связано с их конкурентными преимуществами на генном уровне, а также с селективным давлением антибиотиков.

7.4. Распространенность и механизмы устойчивости к макролидам *Streptococcus pyogenes*, выделенных у детей

Динамика устойчивости *S. pyogenes* к макролидам и линкозамидам
в период 2011-2016 гг

В настоящей главе проведен анализ уровня устойчивости изолятов *S. pyogenes* к макролидным антибиотикам и выявление ведущих молекулярно-генетических механизмов резистентности.

Изучение частоты и молекулярных механизмов резистентности *S. pyogenes* к макролидам и линкозамиду проходило в 3 периода: 1-й - 2011- 2012 гг (246 штаммов), 2-й - 2013 -2014 (273 штамма) и 3-й - с января 2015 по декабрь 2016 г (267 штаммов). Все 786 исследованных за эти периоды штаммы *S. pyogenes* были выделены при культуральном исследовании 27011 мазков из зева, носа, вагины, отделяемого среднего уха и др., полученных от детей при консультативных поликлинических осмотрах и в соматических отделениях клиник. Источники выделения *S. pyogenes* представалены в таблице 7.14.

Таблица 7.14

Источники выделения *S. pyogenes* в период 2011 – 2016 гг

Материал/локус	Всего, n	Выделено <i>S. pyogenes</i> , n	Частота выделения (%)
Мазки из зева, носа и носоглотки	19077	593	3,1
Отделяемое из вагины и вульвы	1325	97	7,3
Отделяемое раны и кожных покровов	1206	28	2,3
Отделяемое из среднего уха	983	39	4,0
Мокрота и трахеальный аспират	4420	29	0,7
Итого	27011	786	2,9

Данные исследования периода 2015-2016 гг (третий период) антибиотикочувствительности *S. pyogenes* к препаратам, относящимся к разным группам (Таблица 7.15.), показали, что уровень нечувствительности микроорганизма к макролидам составил 15,7%, к клиндамицину – 9,4%, к ко-тримоксазолу - 14,3% и тетрациклину - 8,4%. Самые низкие значения нечувствительности *S. pyogenes* выявлены к хлорамфениколу – у 2,6% штаммов и левофлоксацину - 4,5%.

Таблица 7.15

Устойчивость *S. pyogenes* к антибиотикам (2015-2016 гг)

Антибиотик	Всего, n	Из них НЧ, n, (%)
Эритромицин	267	42 (15,7)
Клиндамицин	267	29 (10,1)
Хлорамфеникол	265	7 (2,6)
Ко-тримоксазол	245	41 (16,7)
Тетрациклин	239	20 (8,4)
Левифлоксацин	243	15 (6,1)

Поскольку макролиды и линкозамиды рассматриваются как альтернативные препараты для лечения пенициллин устойчивых стрептококков, необходим мониторинг устойчивости данных микроорганизмов к этой группе антибиотиков. Нами была прослежена динамика роста устойчивости *S. pyogenes* к макролидам и линкозамидам в течение 2011-2016 гг.

Результаты исследования, полученные при анализе уровней устойчивости *S. pyogenes* в течение 6-летнего периода (2011 - 2016 гг), позволили выявить рост нечувствительности микроорганизма как к отдельным представителям макролидных препаратов, так и к линкозамидам (клиндамицину) (рисунок 7.8). В

2011-2012 гг доля штаммов *S. pyogenes*, нечувствительных (резистентные и умеренно резистентные) к эритромицину, азитромицину, кларитромицину и клиндамицину (маркеру устойчивости к джозамицину и другим 16-членным макролидам), находилась на низком уровне и составила 4,9%, 6,5%, 2,8% и 2,4% соответственно. В 2013 - 2014 гг частота выделения устойчивых штаммов выросла более чем в 2 раза и составила для перечисленных антибиотиков 13,5%, 13,5%, 9,2%. Однако к клиндамицину и 16-членным макролидам она по-прежнему сохранялась на низком уровне (3,8%). Для последнего наблюдаемого периода (2015 - 2016 гг) был характерен продолжающийся небольшой рост устойчивости *S. pyogenes* к эритромицину, достигший 15,7% и резкий подъем устойчивости к клиндамицину (до 9,4%).

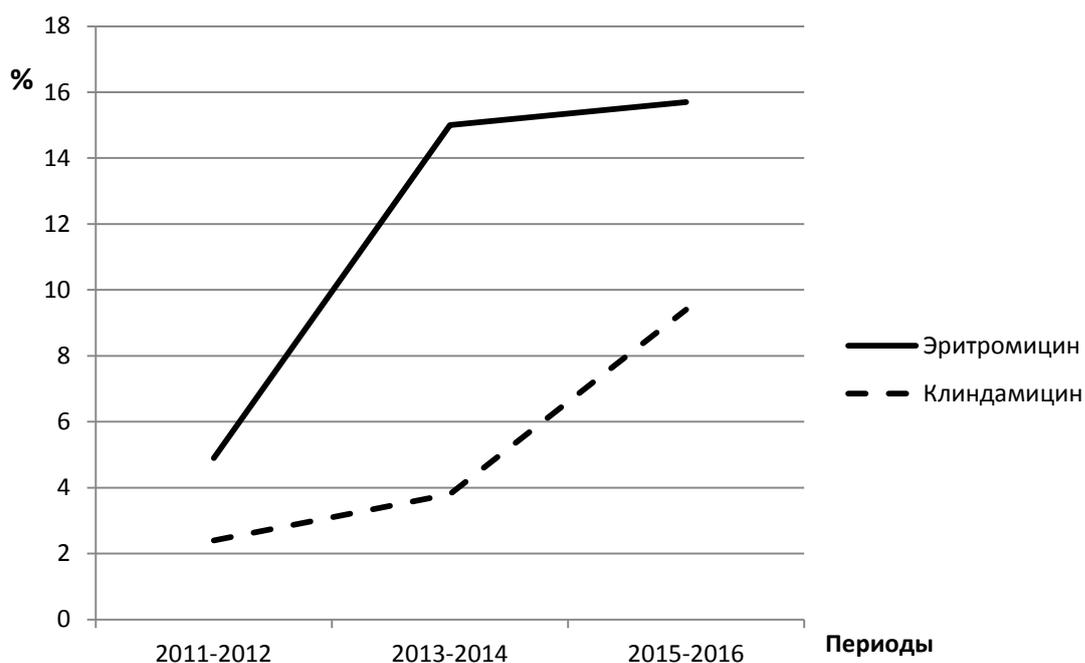


Рис. 7.8 Динамика устойчивости *S. pyogenes* к макролидам и клиндамицину в течение 2011-2016 гг

Молекулярные механизмы устойчивости *S. pyogenes*
к эритромицину и линкозамидам

Результаты определения фенотипа устойчивости у 46 эритромицин-резистентных изолятов, выделенных в 2014 – 2016 годах (6 изолятов выделены в 2013-2014 г и 40– в 2015 -2016 гг), показали, что 11 (24%) из них имели M-фенотип, столько же (24%) - iMLS_B фенотип и 52% - cMLS_B фенотип.

У изолятов с M-фенотипом резистентности МПК эритромицина колебалась от 4 до 32 мг/л, у 33 штаммов с iMLS_B и cMLS_B фенотипами МПК эритромицина составляла 128-256 мг/л и лишь у одного изолята она была на уровне 4 мг/л. Для изолятов с M-фенотипом также были характерны низкие показатели МПК клиндамицина. Они составляли от 0,047 мг/л до 0,125 мг/л, что позволяло отнести их к категории чувствительных. У 11 изолятов с iMLS_B-фенотипом МПК клиндамицина была в пределах 0,064 - 0,38 мг/л, и они также входили в категорию чувствительных микроорганизмов.

Высокие (≥ 256 мг/л) значения МПК эритромицина имели изоляты с cMLS_B фенотипом устойчивости, а МПК клиндамицина у таких изолятов не отличалась единообразием, поскольку у половины из них уровень МПК находился на сравнительно низких значениях (от 0,75 до 3 мг/л). У одного изолята МПК клиндамицина составляла 0,5 мг/л, т.е. находилась на пороговом уровне, но по данным диско-диффузионного метода этот изолят был определен как нечувствительный к антибиотику. У остальных 12 штаммов с cMLS_B-фенотипом устойчивости показатели МПК клиндамицина были ≥ 256 мг/л (таблица 7.16).

Распределение фенотипов, генов резистентности и показателей МПК ERY и CLI у макролид-резистентных изолятов *Streptococcus pyogenes* (n=46)

Фенотип резистентности, n	Ген резистентности, n	Диапазон МПК (мг/л) Верхняя строка ERY Нижняя строка CLI, n
М-фенотип* n=11	<i>mef</i> n=11	4 – 32 0,047 – 0,125 (11)
iMLS_B** n=11	<i>ermB</i> n=6	≥256 (5); 4 (1) 0,064 – 0,19
	<i>ermB</i> + / <i>mef</i> + n=3	≥256 (3) 0,19 - 0,38
	<i>ermB</i> - / <i>mef</i> - n=2	12; ≥256 0,064; 0,125
cMLS_B*** n=24	<i>ermB</i> n=16	128 (1); ≥256 (15) 0,75 – 3 (7) ≥256 (9)
	<i>ermB</i> + / <i>mef</i> + n=8	≥256 (8) 0,5 - 3 (5); ≥256 (3)

Примечания:

* эффлюкс, обусловлен наличием гена *mef*, эффлюксу подвергаются только 14- и 15-членные макролиды, но сохраняется чувствительность к 16-членным макролидам и линкозамидам

** Индуцибельный фенотип проявляется устойчивостью к 14- и 15-членным макролидам при чувствительности или резистентности к 16-членным макролидам и линкозамидам

*** Конститутивный фенотип проявляется устойчивостью микроорганизма на все группы макролидов и линкозамиды

Следует отметить, что изоляты с М-фенотипом были резистентны ко всем исследованным 14- и 15-членным макролидам при сохранении чувствительности к 16-членному макролиду и клиндамицину. Изоляты с iMLS_B-фенотипом (n=11) также были нечувствительны к 14- и 15-членным макролидам, чувствительность к 16-членным макролидам была отмечена у 2-х из них. Штаммы *S. pyogenes* с

cMLS_B-фенотипом были нечувствительны ко всем макролидным антибиотикам и к клиндамицину.

Результаты детекции генов, кодирующих резистентность *S. pyogenes* к макролидным антибиотикам, показали, что только у 11 из 46 изолятов (24%) была экспрессия *mef* гена, кодирующего эффлюксный механизм устойчивости. Все штаммы с *mef*-зависимым эффлюксом относились к M-фенотипу. У 22 (48%) эритромицин-резистентных *S. pyogenes* был обнаружен *ermB*-ген в качестве одной детерминанты, а в 11 (24%) случаях *ermB*-ген находился в ассоциации с *mef*-геном. У двух (4%) изолятов гены резистентности не были идентифицированы. Эритромицин-резистентные изоляты с *ermB*-геном, а также с комбинацией *mef* – гена имели iMLS_B и cMLS_B фенотипы устойчивости.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В нашей работе мы проанализировали колонизацию респираторного тракта во время пребывания больных на ИВЛ в ОРИТ. Доминирующими представителями нозокомиальной микробиоты трахеального аспирата были *A. baumannii*, *K. pneumoniae* и *B. cereus*. В то же время особенности динамики колонизации трахеального аспирата *P. aeruginosa*, характеризующиеся постепенным заселением слизистых оболочек данного локуса независимо от группы госпитализированных детей, указывают на его локальное происхождение и циркуляцию патогена в исследованном стационаре.

A. baumannii

Представленный молекулярно-генетический анализ карба-Р изолятов *A. baumannii*, выделенных у пациентов трех стационаров г. Москвы показал следующее. Подавляющее большинство изолятов принадлежало двум клональным линиям, CC92^{Oxf}/CC2^{Pas} и CC944^{Oxf}/ST78^{Pas}, представленным 14 различными Oxford-сиквенс-типами. Только один исследованный изолят ST441^{Oxf} (CC109^{Oxf}) относился к IC1. Клон CC92^{Oxf}/CC2^{Pas} имеет глобальное распространение и принадлежит к IC2 [227, 391]. Клон CC944^{Oxf}/ST78^{Pas}, напротив, является сравнительно редким. Впервые он был описан как синглетон ST78^{Pas} в нескольких стационарах Италии в 2010 году, в связи с чем получил название «итальянский клон» [128, 308, 189]. Изоляты *A. baumannii* ST78^{Pas} изредка выявляли в других странах Средиземноморья, а также в США (один изолят в госпитале Майами, 2009 г.), Германии (2012-2013 гг.), Кувейте (2011-2012 гг.), Французской Гвиане (во время вспышки в ОРИТ, 2010 г.) [159, 279].

Согласно базе данных МЛСТ *A. baumannii* [93], ST78^{Pas} является эквивалентом ST944^{Oxf}. В исследованной нами коллекции доля изолятов ST944^{Oxf} и его двух новых SLV (ST1103^{Oxf} и ST1104^{Oxf}), которые также были идентичны

ST78^{Pas}, составила 30%. Кроме того, CC944^{Oxf} был представлен во всех трех стационарах.

Таким образом, клон CC944^{Oxf}/ST78^{Pas} стал одним из доминирующих генотипов среди карба-Р изолятов *A. baumannii*, циркулировавших в Москве в период исследования.

Все охарактеризованные нами изоляты CC944^{Oxf}/ST78^{Pas} были носителями гена карбапенемазы *bla*_{OXA-72}, а один изолят дополнительно имел ген *bla*_{OXA-23}. Оригинальный «итальянский клон» ST78^{Pas} продуцировал карбапенемазу OXA-58, позднее сообщалось о его вариантах, имевших OXA-23-подобные карбапенемазы [128, 189]. ST78^{Pas}-изоляты, выделенные во Французской Гвиане, также обладали OXA-23-подобной карбапенемазой, в то время как ST78^{Pas}-изоляты, полученные в Майами, Германии и Кувейте, были носителями *bla*_{OXA-40}-подобного гена [279, 297]. Основным механизмом резистентности к карбапенемам среди изолятов *A. baumannii*, исследованных нами, стала продукция OXA-40-подобной карбапенемазы – OXA-72: ген *bla*_{OXA-72} был выявлен у 85% изолятов, представлявших 12 из 15 Oxford-сиквенс-типов.

Молекулярные характеристики клона CC944^{Oxf}/ST78^{Pas}, представленные в настоящей работе, были идентичны описанию двух изолятов *A. baumannii*, полученных от пациентов из России немецкими авторами [297]. Эти изоляты принадлежали к ST78^{Pas}, являлись носителями генов *bla*_{OXA-72} и *bla*_{CTX-M-115}. Кроме того, в нашей лаборатории мы выполнили МЛСТ двух карба-Р изолятов *A. baumannii*, выделенных в двух разных стационарах г. Перми в 2014. Эти изоляты также принадлежали к CC944^{Oxf}/ST78^{Pas} (изоляты №945 и 946 в базе данных МЛСТ *A. baumannii*) [93]. Отсюда следует, что клон CC944^{Oxf}/ST78^{Pas}, являющийся носителем генов OXA-40-подобной карбапенемазы *bla*_{OXA-72} и β-лактамазы расширенного спектра *bla*_{CTX-M-115}, может быть эндемичным для карба-РА *A. baumannii* в России.

Механизмы, которые способствуют приобретению и распространению определенных групп OXA-карбапенемаз, остаются неясными. Генетическое

окружение и характеристики плазмид гена *bla*_{OXA-40} отличаются от таковых у генов *bla*_{OXA-23} или *bla*_{OXA-58}. В частности, *bla*_{OXA-40}-подобные гены локализуются не только на хромосомах, но и на самопередающихся (self-transmissible) плазмидах, что обеспечивает возможность для горизонтального распространения этих генов. Кроме того, экспериментально было показано, что кодируемые плазмидами *bla*_{OXA-40}-подобные гены могут секретироваться в составе бактериальных везикул (экзосом), образованных наружной мембраной [147].

Наконец, плазмиды, несущие *bla*_{OXA-40}, содержат гены системы токсин/антитоксин, что предполагает их стабильность. Таким образом, высокая трансмиссивность плазмид, содержащих *bla*_{OXA-40}-подобные гены, в сочетании с их стабильностью может объяснить появление и распространение различных генотипов *A. baumannii*, продуцирующих OXA-40-подобные карбапенемазы. Наши данные о выраженном разнообразии генотипов (12 различных Oxford-сиквенс-типов) среди изолятов, несущих *bla*_{OXA-40}-подобный ген *bla*_{OXA-72}, поддерживают эту гипотезу.

Помимо устойчивости к антимикробным препаратам, распространению эпидемически значимых клонов *A. baumannii* могут способствовать другие свойства бактерий. Так, устойчивость к высыханию, повышенная способность к эпителиальной адгезии в сочетании со значительным потенциалом к биопленкообразованию поддерживали циркуляцию и персистенцию подобных клонов в госпитальной среде [189]. Наши результаты не показали значимых отличий по биопленкообразованию у карба-Р и внеклональных карба-Ч изолятов *A. baumannii*. Это предполагает ограниченный вклад способности к биопленкообразованию в клональную экспансию карба-Р *A. baumannii*.

В заключение, наши данные показали доминирование двух клонов среди карба-Р изолятов *A. baumannii* в г. Москве. Один из них, CC92^{Oxf}/CC2^{Pas}, распространен по всему миру. Второй клон, CC944^{Oxf}/ST78^{Pas}, несущий гены *bla*_{OXA-72} и *bla*_{CTX-M-115}, может оказаться эндемичным для московского региона и, возможно, для России в целом. Таким образом, не исключено, что отдельные клоны *A. baumannii*, обладающие подходящим генетическим фоном,

спорадически возникают и независимо эволюционируют на разных территориях, приобретая дополнительные конкурентные преимущества, например, гены резистентности. Очевидно, что такие клоны могут распространяться как внутри страны, так и между странами. Для мониторинга изменений эпидемиологии карба-РА. *baumannii* и улучшения контроля за распространением этих опасных бактерий необходимы дальнейшие исследования.

K. pneumoniae

В нашей работе мы исследовали профиль антибиотикорезистентности и механизмы устойчивости у госпитальных штаммов *K. pneumoniae*, полученных в двух детских ОРИТ в Москве. Все исследованные карба-Ч и карба-Р изоляты были резистентны к цефалоспорином III-IV поколений, что совпадает с данными исследования МАРАФОН (2013-2014 гг), которое сообщало о 90% клебсиелл резистентных цефалоспорином [82]. Доля клебсиелл, устойчивых к карбапенемам, составила 83%. Распространённость устойчивых к карбапенемам штаммов *K. pneumoniae*, выделенных в 2004-2012 гг. в детских стационарах Европы, не превышала 1-3% [228]. Таким образом, наши данные указывают на то, что за последние несколько лет частота устойчивости *K. pneumoniae* к карбапенемам заметно возросла, особенно в детских ОРИТ. Основным механизмом устойчивости к карбапенемам стала продукция карбапенемазы ОХА-48. Ее носителями были 76% исследованных карба-Р-штаммов, и 8% изолятов *K. pneumoniae*, относящиеся к категории карба-Ч. В подавляющем числе случаев карбапенемаза ОХА-48 сочеталась с БЛРС СТХ-М и/или ТЕМ. В исследовании МАРАФОН нечувствительность к карбапенемам у *K. pneumoniae* также была обусловлена наличием ОХА-48 (14,5%) [82].

Наши данные показали доминирование среди карба-Р изолятов *K. pneumoniae* четырех сиквенс-типов: ST395, ST307, ST49 и ST377. ST395, несущий ген *bla*_{ОХА-48}, распространен в Европе [305, 236]. ST307 впервые был зарегистрирован в базе данных МЛСТ в 2008 году, и за последние годы широко

распространился во многих странах [364]. Первоначально он был связан с продукцией глобально распространенной БЛРС СТХ-М-15. В нашей работе изученные ST307-штаммы имели такой генотип в сочетании с OXA-48.

В ходе исследования нами были выявлены два штамма *K. pneumoniae* ST11, относящихся к категории карба-Ч изолятов, который относится к CG258 (SLV ST258). В базе данных МЛСТ *K. pneumoniae* среди относившихся к ST11 (n=206) изолятов было зарегистрировано несколько штаммов-носителей KPC-2, выделенных в странах Южной Америки.

В 2011-2013 гг. были зарегистрированы первые сообщения о появлении штаммов-носителей МБЛ NDM в России. В этот период в Санкт-Петербурге были выявлены множественные случаи инфекций, вызванные *K. pneumoniae*, несущими NDM-1; большинство таких изолятов относилось к ST340 [107, 4]. В нашей работе штаммы *K. pneumoniae* ST340 обнаружены не были. У трех изолятов разных сиквенс-типов ST307, ST147 и ST461 ген *bla_{NDM}* был выявлен в качестве единственной детерминанты резистентности к карбапенемам или в комбинации с другими генами карбапенемаз и БЛРС, что обуславливало фенотип множественной устойчивости к антибиотикам.

Снижение активности β -лактамов в отношении *K. pneumoniae* отмечается с начала 2000 гг. [67] и обусловлено продукцией β -лактамаз различных типов, включая СТХ-М, TEM, SHV, а также их комбинаций [163, 75, 65], что подтверждают и наши данные. Сочетание носительства карбапенемаз и БЛРС формирует МЛУ-фенотип и существенно ограничивает выбор препаратов для эффективного лечения инфекций, вызванных *K. pneumoniae*.

Как показало наше исследование, наибольшую активность в отношении карба-Рштаммов *K. pneumoniae* проявлял тигециклин, относящийся к группе глицилциклинов доля нечувствительных изолятов не превышала 18%. Тигециклин становится препаратом «последней надежды» для лечения инфекций, связанных с полирезистентными возбудителями, сохраняющими чувствительность к этой группе препаратов [218].

Таким образом, в последние годы появились и распространились изоляты *K. pneumoniae*, обладающие МЛУ и сложными сочетаниями молекулярных механизмов резистентности. Циркуляция таких штаммов сильно сужает спектр имеющихся антимикробных препаратов, особенно в ОРИТ, и несет в себе угрозу дальнейшего распространения антибиотикорезистентности. Все вышесказанное диктует необходимость проведения постоянного мониторинга фенотипических и генотипических свойств возбудителей внутрибольничных инфекций. Для мониторинга динамики и распространения резистентности штаммов *K. pneumoniae* необходимо проведение дальнейших многоцентровых исследований с анализом клональной структуры популяции и изучением генетических особенностей резистентных изолятов. Полученные результаты будут полезны для планирования и модификации схем эмпирической антимикробной терапии у пациентов педиатрических ОРИТ.

P. aeruginosa

В настоящей работе мы проанализировали клональную структуру карба-Р изолятов *P. aeruginosa*, полученных в двух педиатрических стационарах г. Москвы. В исследованной популяции отмечалось большое разнообразие генотипов, включавшее 21 индивидуальный сиквенс-тип, однако доминировало небольшое число международных клонов высокого эпидемического риска ST111, ST235, ST654 и ST357 (последний был представлен впервые описанным однолокусным вариантом – ST2592).

Ведущим генотипом в исследованной нами выборке стал ST654, который присутствовал в обоих стационарах и в целом составил долю в 30%. Все ST654-изоляты являлись носителями *bla_{VIM}*. Этот сиквенс-тип относится к числу международных клонов, хотя его распространенность ограничена по сравнению с ST111 и ST235 [383]. ST654 появился в циркуляции не позднее 2006 г. и описан в Великобритании, Польше, Франции и Сингапуре, для которого данный генотип

эндемичен [323] Единичные изоляты ST654 были импортированы в Швецию (как предполагается, из Туниса) и Канаду (изолят от пациента, находившегося на длительном лечении в Индии) [204, 216]. В цитированных работах описаны ST654 *P. aeruginosa* с различными типами МБЛ, включая IMP, KPC, NDM и VIM. В нашей выборке ST654-изоляты впервые получены в 2013 г. в стационаре С1, а в 2014 г. появились в С2, став наиболее распространенным генотипом исследованных карба-Р *P. aeruginosa*.

В ходе работы мы выявили новый ST2592, который является однолокусным вариантом международного клона высокого риска ST357. Клон ST357 получил распространение в центральной Европе, Дании, Великобритании, Китае, Японии [204, 216, 223, 257]. ST357-изоляты, несущие карбапенемазу IMP-7, доминируют в структуре МБЛ-продуцирующих госпитальных изолятов *P. aeruginosa* в Чехии [291]. Для ST357 характерно носительство VIM- и IMP-подобных карбапенемаз, однако у наших ST2592-карба-Р изолятов мы их не обнаружили.

Заметное представительство (6%) в общей популяции карба-Р *P. aeruginosa* имел эндемичный для стационара С2 ST446. Этот генотип был описан ранее в одной из клиник г. Москвы в период 2006-2010 г. [1]. По данным ресурса pubmlst.org, ST446 встречался также в Австралии, Бразилии, Испании и Франции [310]. ST446-изоляты были МБЛ-негативны.

Клон *P. aeruginosa* ST235 имеет глобальное распространение и является доминирующим генотипом карба-Рформ этих бактерий во многих странах мира, включая Россию [383, 354, 162]. Карбапенемрезистентность ST235 в первую очередь ассоциируется с носительством генов различных типов МБЛ в зависимости от региона, но преобладают VIM-подобные карбапенемазы.

Российские данные о популяционной структуре карба-РМБЛ-продуцирующих *P. aeruginosa* были представлены М.В. Эйдельштейном и коллегами [162]. В этом крупнейшем многоцентровом исследовании авторы проанализировали более 3400 клинических изолятов *P. aeruginosa*, выделенных в России в 2002-2010 гг. Доля МБЛ-позитивных изолятов за время наблюдения возросла с 4,5% в 2002 г. до 28,7% в 2008-2010 гг., причем среди них

доминировали *P. aeruginosa* генотипа ST235, которые составляли 685 из 710 (96,5%) МБЛ-позитивных изолятов; 707 из них были носителями *bla*_{VIM-2}. Остальные изоляты принадлежали к ST234 (n=23), ST244 и ST276 (по одному изоляту). В нашем исследовании из числа изолятов 2012-2016 гг. носителям VIM-подобной МБЛ были 57% карба-Р *P. aeruginosa*, других типов МБЛ обнаружено не было. По данным Эдельштейна и соавт. [162], >95% МБЛ-позитивных изолятов представлял ST235 (генотипирование карба-Р *P. aeruginosa*, не являющихся носителями МБЛ, авторы не проводили). В нашей выборке VIM-несущих *P. aeruginosa* лидировал ST654 (51%), доля ST111 и ST235 составила 22% и 26% соответственно.

Таким образом, в отличие от фактически моноклональной популяции карба-Р МБЛ-продуцирующих госпитальных штаммов *P. aeruginosa* в 2002-2010 гг. [162], мы показали наличие как минимум трех близких по распространенности клонов. Эти различия можно отнести на счет незначительного представительства московских изолятов в цитируемой работе (всего 17 изолятов, что составило 2,4% выборки МБЛ-несущих изолятов; все относились к ST235). С другой стороны, вполне вероятно, что в последние годы в московском регионе произошла диверсификация популяционной структуры *P. aeruginosa*, проявившаяся в увеличении клонального разнообразия.

Выявленная нами структура популяции (21 неродственный генотип с преобладанием пяти генотипов) в целом соответствует сформировавшимся представлениям о популяционной структуре карба-Р *P. aeruginosa*. Ее характеризуют как эпидемическую, что означает наличие небольшого числа успешных клонов, имеющих глобальное распространение, на фоне выраженного разнообразия генотипов [301, 383]. Подобная структура популяции формируется в результате отбора из большого числа исходных, сравнительно редких неродственных клонов, обладающих высокой частотой рекомбинаций и способных приспосабливаться к меняющимся условиям существования. Такие «адаптивные» клоны со временем приобретают широкое распространение в окружающей среде, в связи с чем начинают доминировать в популяции

клинически значимых штаммов, отвечая на давление антибиотиков формированием МЛУ.

Отметим, что эпидемическая популяционная структура *P. aeruginosa* с МЛУ-фенотипом отличается от других бактерий, в частности, *A. baumannii*, популяция МЛУ-штаммов которых характеризуются выраженной клональностью.

S. pneumoniae

В настоящей работе мы описали серотиповое разнообразие и профиль устойчивости к АМП более 1000 носоглоточных изолятов пневмококков, полученных в 2010-2016 гг. от детей, получавших стационарную или амбулаторную помощь в ФГАУ «Национальный медицинский исследовательский центр здоровья детей» МЗ РФ, г. Москва. Представленный материал проспективно дополняет и обобщает результаты наших исследований предыдущих лет [11, 261]. За указанный период наблюдения распределение серотипов в целом существенно не изменилось. В числе лидеров остались педиатрические серотипы 19F, 23F, 6B, 14, 6A и 3, которые в совокупности составили долю в 63,2%. ПКВ13 охватывала 74% серотипов у детей до 5 лет. Серотиповой пейзаж неинвазивных пневмококков, включая носоглоточные изоляты, в других регионах России имел похожий состав [38, 26, 64].

В нашем исследовании впервые в России полностью расшифрована серотиповая структура пневмококков серогруппы 6. Было показано, что наряду с распространенными серотипами 6A и 6B в циркуляции присутствовали невакцинные серотипы 6C (1,3%) и 6D (0,9%). Есть сообщения об увеличении носительства 6C-пневмококков в пост-ПКВ периоде, поскольку вакцинация ПКВ13 за счет серотипа 6A обеспечивает ограниченный перекрестный иммунитет в отношении серотипа 6C [304, 158].

Несмотря на то, что часть работы, относящаяся к 2016 г., была выполнена после включения пневмококковой вакцинации в российский Национальный календарь прививок в марте 2014 г. [62], оценивать влияние ПКВ на структуру

циркулирующих серотипов пневмококка преждевременно. Так, есть данные о том, что значимое изменение серотипового состава под давлением ПКВ на популяционном уровне можно ожидать не ранее, чем через 5 лет после начала ее применения при условии высокого охвата вакцинацией ($\geq 90\%$ новорожденных) [299]. Вместе с тем, локальные исследования даже небольших когорт вакцинированных могут быть полезны для демонстрации эффекта ПКВ. Показательна в этом смысле работа Протасовой И.Н. и соавт. из Красноярска [63], которые наблюдали более 100 детей до и через два года после вакцинации 7-валентной ПКВ. Авторы зафиксировали у вакцинированных детей ожидаемое снижение доли вакцинных серотипов, а также феномен замещения серотипов в виде роста серотипа 19A, не входящего в состав ПКВ7 [63, 309].

Таким образом, сероэпидемиология пневмококков в России в пост-ПКВ период требует дальнейшего планомерного мониторинга. Как показало наше исследование, относительная стабильность серотипового пейзажа пневмококков сочеталась с нарастанием устойчивости к β -лактамам и макролидам. Так, резистентность к ОХА выросла с 21,3% в 2010/11 до 35,9% в 2016. У подавляющего большинства ОХА-резистентных изолятов наблюдалось также снижение чувствительности к PEN, в итоге доля PEN-нечувствительных изолятов составила 34,6%. Согласно критериям CLSI (МПК ≤ 2 мг/мл) AMX сохранял активность в отношении 96,5% исследованных изолятов. Похожие результаты были получены при исследовании пневмококков, выделенных в Санкт-Петербурге в 2010-2013 гг. [26]. Авторы наблюдали снижение чувствительности к PEN у 32,4%, а к AMX у 4,8% изолятов. Анализ 148 пневмококков, полученных в четырех центрах на территории России в 2012-2013 гг., показал снижение чувствительности к AMX в 16,2% случаев, в том числе наличие резистентности (МПК >4 мг/л) у 8,1% пневмококков [118].

Наши результаты и приведенные литературные данные свидетельствуют о заметном росте устойчивости пневмококков к β -лактамам в последние годы. Так, по данным крупного многоцентрового исследования ПеГАС 1999-2009 гг. [35, 36], доля пневмококков со сниженной чувствительностью к PEN не превышала

10-11%, а устойчивостью к АМХ обладали единичные изоляты (<1%), что существенно меньше современных цифр. Устойчивость пневмококков к PEN в Москве в 2003 г. составила 18,6% [23]. Более того, за последние годы значительно возросла МПК₉₀ PEN и АМХ, которая, по нашим данным, достигла 1 мг/л, тогда как исследование ПеГАС сообщало о МПК₉₀ PEN и АМХ 0,06-0,125 мг/л и 0,06-0,25 мг/л соответственно [36]. Хотя большинство пневмококков по-прежнему относились к категории АМХ-чувствительных, увеличение МПК этого АМП, возрастание доли PEN-нечувствительных и ОХА-резистентных изолятов свидетельствует о качественных изменениях механизмов устойчивости к β-лактамам в бактериальной популяции, в первую очередь о снижении аффинности пенициллинсвязывающих белков [203]. При сохранении такой динамики появление клинически значимой резистентности пневмококков к этой группе АМП выглядит вполне вероятным.

На фоне сохранения чувствительности к АМХ активность макролидов и линкозамидов в отношении пневмококков драматично снизилась в период 2010-2016 гг. по сравнению с 1999-2009 гг. [36]. Если в исследовании ПеГАС доля нечувствительных к ERY изолятов колебалась от 4,6% до 8,2%, то в нашей выборке она составила 29,9%, значимо увеличившись с 24,5% в 2010/11 гг. до 36,9% в 2016 г. Более того, свыше 75% ERY-резистентных изолятов демонстрировали максимальную МПК ≥ 256 мг/л, что радикально отличалось от данных ПеГАС, где МПК₉₀ ERY не превышала 0,06 мг/л [36]. По данным последних лет, высокий уровень устойчивости пневмококков к ERY был обнаружен также в Санкт-Петербурге – 33,2% [26], а тестирование активности азитромицина в отношении изолятов 2012-2013 гг. показало наличие резистентности у 43,9% пневмококков [118]. Доля CLI-резистентных изолятов с учетом индуцибельной резистентности в исследованной нами выборке пневмококков составила 28,8% против 2,9-4,5% в 1999-2009 г. [36] с увеличением МПК₉₀ до ≥ 256 мг/л.

Доминирующим механизмом резистентности к макролидам и линкозамидам было носительство гена *ermB*. Он присутствовал у 80% ERY-резистентных

изолятов, обеспечивая им MLS_B -фенотип (конститутивный или индуцибельный), т.е. перекрестную устойчивость к макролидам, линкозамидам и стрептограминам [149]. Лишь небольшая доля (18,7%) ERY-резистентных пневмококков, несущих *mef*, сохраняла чувствительность к CLI (M-фенотип). Таким образом, $iMLS_B$ -фенотип имела почти пятая часть всех CLI-резистентных пневмококков. Это подтверждает целесообразность оценки индуцибельной резистентности к CLI у ERY-резистентных/CLI-чувствительных изолятов, которая на практике проводится редко, несмотря на наличие рекомендаций [33, 347].

Доминирование в России *ermB*-ассоциированных механизмов устойчивости пневмококков описывалось ранее как нами [261], так и другими исследователями [317]. Анализ изолятов 2003-2005 гг. показал наличие устойчивости к ERY в 11,1% случаев, при этом ген *ermB* был обнаружен у 80% ERY-резистентных пневмококков [317]. В их числе примерно равная доля изолятов обладала индуцибельным (41%) или конститутивным (39%) MLS_B -фенотипом, остальные (20%) имели M-фенотип. Сравнение этих результатов с нашими данными указывает на увеличение распространенности пневмококков с $sMLS_B$ -фенотипом (69,4%) за счет снижения доли изолятов с индуцибельной резистентностью (17,9%). Интересно, что в нашей выборке из 40 пневмококков с $iMLS_B$ -фенотипом 26 (65%) изолятов принадлежало к серотипу 14 и семь (18%) изолятов – к серотипу 6B, тогда как в сообщении Reinert R. и соавт. более 50% $iMLS_B$ -изолятов относились к серотипу 6B, а серотип 14 вообще не встречался в числе ERY-резистентных пневмококков [317]. Это свидетельствует о существенных сдвигах в пневмококковой популяции на молекулярно-генетическом уровне, которые способствуют отбору и экспансии наиболее адаптированных клонов [210].

Таким образом, наши данные и ряд других исследований свидетельствуют о нарастании устойчивости пневмококков к макролидам, которая достигла в последние годы 35-45%, по меньшей мере в европейской части России. Более того, преобладание механизмов резистентности, связанных с метилированием мишени, не дает больших преимуществ линкозамидам и 16-членным макролидам

[241, 241]. Это ставит под вопрос адекватность использования указанных групп АМП в качестве эмпирической терапии пневмококковых инфекций.

Более благоприятной выглядит ситуация с резистентностью в азиатской части России. Так, в Хабаровском крае доля PEN-устойчивых пневмококков составила 26%, а ERY-резистентность варьировала от 13% до 19% (исследовали 68 изолятов) [86]. В Красноярске было показано наличие устойчивости к PEN у 7% пневмококков, к ERY – у 17%, к CLI – 10% (исследовали 30 изолятов) [63]. Очевидно, что данных из небольших выборок недостаточно для уверенных выводов о положении в целом, тем более что в этих регионах требуется особенно тщательное наблюдение за резистентностью и ее динамикой. Это связано с географической близостью стран Юго-Восточной Азии, прежде всего Китая, где уровень резистентности пневмококков один из самых высоких в мире: доля PEN-нечувствительных пневмококков приближается к 70%, а резистентность к ERY и CLI превышает 90% [219].

В целом, наши данные сопоставимы с результатами оценки уровня резистентности пневмококков в странах Европы, проведенной в 2009-2012 гг.: нечувствительность к PEN составила 28,9%, к ERY – 28,5%, к CLI – 19,5%, а к АМХ были устойчивы менее 5% изолятов [352].

Активность представителей других групп АМП, включая SXT, TET и CHL, продемонстрировала значимые повышающиеся тренды. Исследованные пневмококки оказались наименее резистентны к CHL (4,3% по выборке в целом), а доля SXT- и TET-резистентных изолятов в 2016 г. составила 37,6% и 29% соответственно.

Важно подчеркнуть, что устойчивость к АМП концентрировалась преимущественно среди пневмококков серогрупп/серотипов 6, 14, 19, 23F, которые включали более 90% резистентных изолятов. Именно за счет этих серовариантов пневмококков возросла устойчивость к β -лактамам и макролидам по популяции в целом. В связи с тем, что имеющиеся ПКВ перекрывают эти серотипы, с ростом охвата вакцинацией можно ожидать снижения уровня

устойчивости за счет выхода из циркуляции резистентных вакцинных серотипов, как это наблюдали в других странах в пост-ПКВ периоде [221, 320].

Таким образом, представленная работа является первым исследованием, в котором проведен динамический анализ большой выборки носоглоточных изолятов пневмококков, полученных у детей в крупнейшем по населению регионе России. Наши данные показали, что за семь лет наблюдения в отсутствие крупных сдвигов в структуре серотипов ситуация с устойчивостью пневмококков к β -лактамам и макролидам развивалась неблагоприятно. Это еще раз подчеркивает необходимость проведения мероприятий по рационализации использования АМП. Продолжение работы по сбору и анализу данных о структуре серотипов пневмококков и их устойчивости к АМП в пост-ПКВ периоде позволит оценить эффективность вакцинации и наметить направления для разработки новых вакцин.

S. pneumoniae, серотип 14

Описанные особенности клонов пневмококков серотипа 14 позволяют сделать предположение о том, что главным конкурентным преимуществом СС143, способствовавшим пролиферации этого клона, стала устойчивость к макролидам, ассоциированная с носительством гена *ermB*. Вероятно, что ведущей движущей силой клональной эволюции в этом случае явилась существующая нерациональная практика использования антибиотиков, особенно в педиатрии. Так, по данным многоцентрового исследования ПАТРИОТ (2011-2013 гг.) до 40% назначений антибиотиков детям при острых респираторных инфекциях в амбулаторных условиях были необоснованными, при этом в числе лидеров среди используемых препаратов находились макролиды (азитромицин), на которые приходилось 22% назначений [312, 66]. Фармакодинамические характеристики азитромицина могут способствовать отбору макролид-резистентных клонов пневмококков, большинство из которых обладают множественной устойчивостью и к другим группам АМП [108, 150].

S. pneumoniae, serotип 19 A

В настоящем исследовании мы проанализировали выборку пневмококков серотипа 19А, собранных в период с 2002 по 2013 гг. в нескольких регионах России. В ней доминировали четыре клональных комплекса, включая СС156, СС230, СС320 и СС663, которые составили 80% всей коллекции. Перечисленные клональные линии связаны с главными международными клонами, циркулирующими по всему миру. СС156 наименее представлен среди пневмококков серотипа 19А, и его распространенность существенно не изменилась под влиянием ПКВ [112, 151, 274, 331]. Похожая картина сложилась с клоном PMEN Columbia^{23F}-26, к которому по результатам eBURST-анализа была отнесена наша клональная группа ST663 [112, 273]. Литературные сообщения о пневмококках ST663 единичны, однако свидетельствуют об их высокой устойчивости к β-лактамам антибиотикам и связи с тяжелыми ИПИ [337, 266]. ST66319А-пневмококки имели заметную распространенность (9,6%) в период до введения ПКВ7 в Болгарии [331]. В настоящем исследовании СС663 доминировал в европейской части России в 2003 году. Интересно, что самый первый изолят 19А-пневмококка с ST663, зарегистрированный в базе данных pubmlst.org/spneumoniae, был выделен в России в 1987 году [278]. Таким образом, возможно, что ST663 и родственные сиквенс-типы были локально распространены в Восточной Европе в 1990-х и начале 2000-х годов. Следует отметить, что в течение периода исследования мы не обнаружили ни одного изолята, принадлежащего к СС199, который был широко распространен в пре-ПКВ7 период в США и Европе [361, 274].

В отличие от клонов, описанных выше, в пост-ПКВ7 период существенно возросла доля СС230 и СС320. В то время как экспансия СС230 была отмечена лишь в нескольких странах, таких как Германия и Португалия [362, 98], СС320 в настоящее время является одним из наиболее распространенных клонов 19А-пневмококков на многих территориях, включая США, Канаду, Италию, Испанию [112, 274, 182, 192]. Наши результаты показали, что в 2010-2013 гг. СС230 и

СС320, которые в основном вытеснили СС156 и СС663, составляли более 70% пневмококков серотипа 19А, циркулирующих в европейской части России. 19А-пневмококки СС320 описаны в России, начиная с 2010 года [72]. Мы обнаружили только два сиквенс-типа, связанных с СС320, включая идентификационный для этого клона ST320 и новый ST9656, впервые выявленный в России. Тот факт, что описанная нами коллекция изолятов была собрана до включения ПКВ в Национальный календарь профилактических прививок в 2014 году, допускает предположение о ПКВ-независимой эволюции клональной структуры пневмококков серотипа 19А в России, как это случилось и в некоторых других регионах [133, 217]. Экспансия лишь небольшого числа клонов серотипа 19А предполагает наличие у них конкурентных преимуществ на уровне генотипа. Помимо ПКВ7-опосредованного отбора, клональный успех СС320 и других клонов 19А-пневмококков может быть связан с селективным давлением антибиотиков [210, 334]. Действительно, все исследованные нами изоляты СС320 имели МЛУ с высокими значениями МПК β -лактамов, что согласуется с данными других авторов [112, 150]. Вместе с тем, в европейской части России СС320 заменил другой резистентный клон, СС663, что предполагало участие дополнительных бактериальных факторов в обеспечении конкурентоспособности. В частности, в модельных исследованиях на мышах 19А-пневмококки, относящиеся к ST320, отличались высокой колонизационной активностью по сравнению с бактериями ST236, предшественника ST320 [217]. Повышенная способность к колонизации клона СС320 может быть связана с наличием пилей P11 и P12 [154, 270, 389, 274, 362], которые способствуют адгезии пневмококков на эукариотических клетках [261]. В настоящем исследовании СС320 был единственной клональной линией, обладающей пиллями двух типов, в то время как изоляты СС663 имели только P11. Наличие пилей является клональным признаком [389, 38], и большинство нечувствительных к антибиотикам клонов обладают этими структурами [119].

Таким образом, сочетание обладания пиями и устойчивости к антимикробным препаратам может обеспечивать конкурентные преимущества подобным клональным линиям.

Все изоляты СС156, СС320 и СС663 имели значения МПК пенициллина ≥ 1 мг/л, в то время как представители СС230 обладали умеренными и низкими значениями МПК пенициллина и были полностью чувствительны к амоксициллину и цефтриаксону. Это свидетельствовало о том, что чувствительность к β -лактамам исследованных 19А-пневмококков имела клональный характер. У пневмококков основным механизмом резистентности к β -лактамам является модификация ПСБ [203]. Анализ пенициллинсвязывающих доменов ПСБ, проведенный нами, показал, что аминокислотные последовательности ПСБ у изолятов родственных сиквенс-типов и клональных линий были очень близки, объясняя сходство профилей чувствительности к β -лактамам. Выраженность нарушений ПСБ варьировала у разных клонов, однако большинство мутаций, обнаруженных нами, соответствовало ранее описанным повреждениям их аминокислотных последовательностей. Например, сообщалось, что замена А618G, расположенная вблизи к KTG-мотиву ПСБ2b, связана с повышенными значениями МПК амоксициллина [333]. В настоящем исследовании мутация А618G обеспечивала фенотип в виде МПК амоксициллина > МПК пенициллина у большинства 19А-пневмококков, обладавших этой мутацией. Кроме того, эта замена была обнаружена у двух изолятов с экстремально высокими значениями МПК β -лактамов.

Начиная с 2010 года, расширенная 13-валентная ПКВ, включающая в свой состав серотип 19А, приходит на замену ПКВ7. ПКВ13 продемонстрировала высокую эффективность в снижении частоты ИПИ, связанных с 19А-пневмококками [274, 360]. Эффективно вытесняя вакцинные серотипы из циркуляции, вакцины ПКВ оказывают гораздо более широкое воздействие на микробное сообщество, чем предполагалось ранее [119]. В недавней работе Galanis и соавторы показали, что вакцинация ПКВ способствовала

распространению новых или минорных пневмококковых клонов и увеличивала клональное разнообразие не только у вакцинированных, но и у невакцинированных лиц [180]. Эти данные свидетельствуют о возможности экспансии отдельных серотипов в ПКВ-невакцинированной популяции. Очевидно, что изменение эпидемиологии пневмококковых серотипов, в том числе серотипа 19А, это многофакторное явление, отражающее влияние вакцинация, практику использования антибиотиков, а также естественные колебания.

S. pyogenes

Наши результаты изучения уровня резистентности *S. pyogenes* к макролидам и линкозамидам и их генетических детерминант устойчивости, полученные в период 2011 - 2016 гг, указывают на возросшую резистентность патогена к этим препаратам, особенно отчетливо проявившуюся в 2015-2016 гг. В то же время, рост резистентности *S. pyogenes* к макролидам в период 2013-2014 гг не сопровождался подъемом нечувствительности к клиндамицину, и лишь в 2015-2016 годах мы наблюдаем значимое увеличение устойчивости к клиндамицину, которое сопровождалось преобладанием *ermB*-механизма резистентности в популяции.

При рассмотрении уровня резистентности *S. pyogenes* к макролидам в России следует отметить, что до 2009 года он был невелик: по данным исследования ПеГаС (1999-2003 гг) выделение нечувствительных штаммов варьировало от 2 до 12% в 1999 г и от 0,15% до 8% в 2001-2003 гг. При этом низкая частота (2%) устойчивости к 16-членным представителям и более высокий ее уровень (до 7% - 8%) к 14- и 15-членным макролидам косвенно свидетельствовали об эффлюксной природе устойчивости. В следующие периоды (2004-2006 гг) и (2007-2009 гг) нечувствительные штаммы *S. pyogenes* составляли 8,7% и 8% [34, 5]. В другой российской работе [66], проведенной в аналогичный период (2004 - 2007 гг), получен уровень устойчивости *S. pyogenes* к эритромицину в пределах 12% и выявлена вариабельность этого показателя в

зависимости от региона: наибольший уровень (28,2%) устойчивости микроорганизма к макролидам был отмечен в Иркутске. В то же время результаты исследования 91 изолята *S. pyogenes*, выделенного в период 2008 – 2011 гг в Москве от пациентов со стрептококковой инфекцией мягких тканей, указывают на заметную резистентность патогена к макролидным антибиотикам, составившую 17,6%, 15,4% и 15,4% к азитромицину, кларитромицину и эритромицину соответственно, 5,5% - к клиндамицину и 16-членным макролидам [22].

Вариабельность показателей уровня резистентности к макролидам отмечена как в Европе, Америке, так и в азиатских странах, где регистрируется наибольшая частота резистентности. Резистентность к макролидам является управляемым процессом, поскольку во многом связана с частотой назначения макролидных препаратов, в первую очередь азитромицина. Выявленная зависимость между объемом потребления макролидов в популяции и ростом распространения резистентности стрептококков к макролидам была отмечена еще в 70 - 80-е годы в Финляндии и Японии. В этих странах в результате ограничения потребления препаратов макролидного ряда уровень резистентности к ним резко снизился [171, 145]. В последующие годы в ряде европейских стран (Франция, Германия) также в результате ограничения использования макролидов (и в первую очередь азитромицина) отмечена положительная динамика, выразившаяся в снижении уровня резистентности к этим препаратам с 24% (2002-2003 гг) до 3% (2009-2011 гг) во Франции и с 13,6% (1999-2000 гг) до 2,6% (2006-2009 гг) в Германии [78, 178].

Особенно ярко в нашем исследовании проявилось изменение детерминант молекулярно-генетического механизма, определяющих устойчивость *S. pyogenes* к макролидам и линкозамидам. Если в исследованиях, относящихся к периоду 2004-2007 гг, ведущим механизмом устойчивости был эффлюкс, опосредованный *mef*-геном, а частота MLS_B –фенотипа в Москве составила лишь 13% [76], то результаты нашей работы свидетельствуют не только о резком возрастании устойчивости *S. pyogenes* к макролидам и линкозамидам в период 2014 - 2016 гг,

но и об изменении спектра детерминант резистентности. В генетическом профиле, определяющим устойчивость *S. pyogenes* к макролидам и линкозамидам, стал преобладать (69,5%) *ermB* ген, кодирующий рибосомальное метилирование, экспрессия которого резко повышает резистентность микроорганизма, распространяясь как на 16-членные макролиды, так и на линкозамиды. Сходное распределение генов резистентности к макролидам наблюдалось и у изолятов *S. pyogenes*, выделенных от детей с фарингитом во Франции, где на долю *ermA*- и *ermB*-генов также пришлось 69% [78]. Отмечено, что распространенность *ermB* и *mef*-генов пиогенного стрептококка имеет выраженные региональные особенности.

Среди причин преимущественного преобладания определенного фенотипа резистентности *S. pyogenes* к макролидам авторы прослеживают связь между селекцией резистентности и структурой потребляемых макролидных антибиотиков [329]. Азитромицин более часто приводил к селекции резистентности, чем кларитромицин. Однако, кларитромицин вызывал селекцию более «грозных» штаммов с MLS_B – фенотипом [256]. В то же время, отчетливо прослеживается связь между предпочтительным применением препарата макролидного ряда в том или ином регионе и распространением различных механизмов резистентности. Отмечено, что в странах Европы, где чаще применяют кларитромицин, резистентность к макролидам по *ermB* гену охватывает 84% изолятов [194], в США при предпочтении лечения азитромицином преимущественно и широко распространен M-фенотип [349, 199].

Таким образом, растущая устойчивость *S. pyogenes* к макролидам может явиться серьезной проблемой при назначении этиотропного лечения инфекций, вызванных данным микроорганизмом, у детей с непереносимостью бета-лактамов. Как показали результаты нашей работы, существующий в настоящее время уровень устойчивости *S. pyogenes* к макролидным препаратам еще позволяет использовать их в качестве эмпирической терапии стрептококковой инфекции. Но учитывая стремительный рост устойчивости этого микроорганизма, произошедший за сравнительно короткий период наблюдения, требуется

постоянный мониторинг и контроль этого процесса. Также получены результаты, свидетельствующие о возросшей устойчивости *S. pyogenes* как к 14- и 15-членным макролидным антибиотикам, так и к 16-членным и линкозамидам поскольку *ermB*-ген стал ведущим механизмом устойчивости *S. pyogenes*. И если раньше назначение 16-членных макролидов было обосновано распространением изолированных *mef*-генов, то по данным нашего исследования такие преимущества у препаратов данной группы перед 14- и 15-членными сократились, поскольку ведущим механизмом устойчивости постепенно становится метилирование рибосом. Но даже несмотря на снижение доли клиндамицин чувствительных штаммов, при выборе АМП следует учитывать преимущество 16-членных макролидов и выбирать, при невозможности использования амоксициллина или цефалоспоринов наиболее эффективные макролиды, например, джозамицин, к которому в настоящее время чувствительны 23,9% *mef*-зависимых эритромицин-устойчивых штаммов пиогенного стрептококка.

ВЫВОДЫ

1. Грамотрицательная госпитальная микробиота быстро колонизировала поступающих в отделение реанимации и интенсивной терапии пациентов и отличалась высокой антибиотикорезистентностью. В трахеальном аспирате пациентов, находящихся на искусственной вентиляции легких, преобладали *A. baumannii*, *K. pneumoniae* и *P. aeruginosa*.
2. Большинство изученных госпитальных изолятов *A. baumannii* были устойчивы к основным группам антимикробных препаратов, включая карбапенемы. Среди карбапенемрезистентных изолятов доминировали два клональных комплекса: CC92^{Oxf}/CC2^{Pas} и CC944^{Oxf}/ST78^{Pas}. Ведущим механизмом резистентности к карбапенемам стала продукция карбапенемазы OXA-72; ген *bla*_{OXA-72} был выявлен у 85% изолятов.
3. Основным механизмом устойчивости к карбапенемам у госпитальных изолятов *K. pneumoniae* была продукция карбапенемазы OXA-48, которая в большинстве случаев сочеталась с наличием β -лактамаз расширенного спектра.
4. Популяционная структура госпитальных изолятов карбапенемрезистентных *P. aeruginosa* отличалась разнообразием неродственных сиквенс-типов (21 уникальный сиквенс-тип), на фоне которого преобладали международные клоны высокого эпидемического риска ST111, ST235, ST446, ST654, ST2592. Ген VIM-подобной карбапенемазы присутствовал у 57% карбапенемрезистентных *P. aeruginosa*; носительство *bla*_{VIM} было ограничено сиквенс-типами ST111, ST235, ST654.
5. В течение семилетнего периода наблюдения (2010-2016 гг.) структура носоглоточных серотипов *S. pneumoniae* в целом изменилась незначительно: шесть ведущих педиатрических серотипов 3, 6A, 6B, 14, 19F и 23F суммарно представляли 63,2% выборки; у детей до 5 лет серотипы, входящие в состав 13-валентной пневмококковой конъюгированной вакцины, составляли долю 74%. На уровне отдельных серотипов было

отмечено возрастание доли серотипа 14 с 8% до 15% за счет экспансии клона CC143, характеризовавшегося множественной лекарственной устойчивостью.

6. В период 2010-2016 гг. отмечено нарастание устойчивости *S. pneumoniae* к оксациллину с 21,3% до 35,9% и эритромицину с 24,5% до 36,9%, при этом устойчивостью к амоксициллину обладали менее 5% изолятов.
7. *ermB*-опосредованный механизм был доминирующим механизмом резистентности к макролидам у *S. pneumoniae* (80%) и *S. pyogenes* (72%), обеспечивая эритромицинрезистентным изолятам конститутивный или индуцибельный MLS_B-фенотип, т. е. перекрестную устойчивость к макролидам, линкозамидам и стрептограмину В.
8. *S. pneumoniae* серотипа 19А, выделенные в 2010-2013 гг., относились преимущественно к клональным комплексам CC230 и CC320, заместив распространенные ранее CC156 и CC663.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Для проведения адекватной антибактериальной терапии в отделениях реанимации и интенсивной терапии необходимо проводить мониторинг распространения микроорганизмов и контроль устойчивости к антимикробным препаратам преобладающих микроорганизмов.

2. Для выявления механизмов формирования устойчивости к β -лактамным антибиотикам целесообразно использовать молекулярные методы детекции детерминант резистентности.

3. При проведении эпидемиологического анализа госпитальных изолятов целесообразно проводить мультилокусное сиквенс-типирование.

4. Для обеспечения адекватной эмпирической антибактериальной терапии пневмококковых инфекций и инфекций, вызванных *S. pyogenes*, необходимо проводить локальный мониторинг устойчивости респираторных патогенов к β -лактамным антибиотикам и макролидам.

5. Для мониторинга влияния вакцинации против пневмококка на бактериальную популяцию целесообразно проведение динамического контроля серотипового спектра *S. pneumoniae* и молекулярного исследования клонального разнообразия.

ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШЕЙ РАЗРАБОТКИ ТЕМЫ

1. Продолжение мониторинга микробиоты в педиатрических ОРИТ с использованием методов молекулярной эпидемиологии с целью клональной характеристики резистентной микробиоты.
2. Продолжение исследований, направленных на оценку распространенности резистентности и ее мониторинг среди *A. baumannii*, *K. pneumoniae* и *P. aeruginosa*.
3. Продолжение изучения роли генов карбапенемаз, способности к биопленкообразованию в развитии устойчивости *A. baumannii*, *K. pneumoniae* и *P. aeruginosa* к карбапенемам.
4. Исследование альтернативных механизмов резистентности к различным классам антибиотиков, включая эффлюкс, нарушение функционирования пориновых каналов, модификацию пенициллинсвязывающих белков.
5. Дальнейший анализ динамики серотипового состава *S. pneumoniae* под влиянием универсальной вакцинации пневмококковыми конъюгированными вакцинами.
6. Продолжение динамического изучения антибиотикоустойчивости актуальных респираторных патогенов и характеристика молекулярно-генетических особенностей резистентных штаммов.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

- АМП – антимикробный препарат
- БГСА – β -гемолитический стрептококк серогруппы А
- БЛРС – β -лактамаза расширенного спектра
- ВОЗ – Всемирная организация здравоохранения
- ИВЛ – искусственная вентиляция легких
- ИПИ – инвазивные пневмококковые инфекции
- ИСМП – инфекции, связанные с оказанием медицинской помощи
- карба-Р – штаммы микроорганизмов резистентные к карбапенемам
- карба-Ч – штаммы микроорганизмов чувствительные к карбапенемам
- МБЛ – металло- β -лактамазы
- МЛСТ – мультилокусное сиквенс-типирование
- МЛУ – множественная лекарственная устойчивость
- МПК – минимальная подавляющая концентрация
- НГОБ – неферментирующие глюкозу грамотрицательные бактерии
- ОРИТ – отделение реанимации и интенсивной терапии
- ПКВ – пневмококковая полисахаридная конъюгированная вакцина
- ПСБ – пенициллинсвязывающий белок
- ЧМТ – черепно-мозговая травма
- АКН – амикацин
- АМС – амоксициллин/клавуланат
- АМХ – амоксициллин
- АПИ – ампициллин
- АТМ – азтреонам
- АЗМ – азтреонам
- СС – клональный комплекс
- СИР – ципрофлоксацин
- СЛИ – клиндамицин
- СЛР – кларитромицин

COL - колистин

COX – цефотаксим

CZD – цефтазидим

ERY – эритромицин

ETP – эртапенем

FEP – цефепим

FOS – фосфомицин

GMN – гентамицин

IPM – имипенем

MDR – множественная лекарственная резистентность

MEM – меропенем

MRSA – метициллин-резистентные *Staphylococcus aureus*

NFE – нитрофурантоин

NTM – нетилмицин

OXA – оксациллин

PEN – пенициллин

PIP – пиперациллин

PMEN – Pneumococcal Molecular Epidemiology Network

PZT – пиперациллин/тазобактам

SAM – ампициллин/сульбактам

SPN – спирамицин

ST – сиквенс-тип

SXT – ко-тримоксазол

TCC – тикарциллин/клавуланат

TET – тетрациклин

TGC – тигециклин

TMN – тобрамицин

VNC – ванкомицин

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ:

1. Аветисян, Л.Р. Персистенция штаммов *Pseudomonas aeruginosa* среди пациентов ФНЦ трансплантологии и искусственных органов / Л.Р. Аветисян, О.Л. Воронина, М.Ю. Чернуха, М.С. Кунда, Н.И. Габриелян, В.Г. Лунин, И.А. Шагинян // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. – 2010. – №4. – С. 99-104.
2. Агеевец, В.А., Молекулярная характеристика продуцентов карбапенемаз семейства *Enterobacteriaceae*, выделенных в Санкт-Петербурге: дис. ... канд. биол. наук: 03.02.03 / Агеевец Владимир Андреевич. – СПб., 2016. – С. 137.
3. Агеевец, В.А. Проблема устойчивости к карбапенемным антибиотикам: распространение карбапенемаз в мире и России, эпидемиология, диагностика, возможности лечения / В.А. Агеевец, И.В. Лазарева, С.В. Сидоренко // Фарматека. – 2015. – №14. – С. 9-16.
4. Агеевец, В.А. Чувствительность грамотрицательных бактерий, продуцентов карбапенемаз, к антибиотикам различных групп / В.А. Агеевец, И.В. Партина, Е.С. Лисицына и соавт. // Антибиотики и химиотер. – 2013. – Т.58, № 3-4. – С. 10–13.
5. Азовская, О.В. Динамика антибиотикорезистентности респираторных штаммов *Streptococcus pyogenes* в России за период 1999-2009 гг. / О.В. Азовская, Н.В. Иванчик, А.В. Дехнич, О.И. Кречикова, Р.С. Козлов, исследовательская группа «ПеГАС» // Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. – 2012. – Т.14, № 4. – С. 309-321.
6. Алексеева, Е.И., Слободенюк А.В. Некоторые особенности эпидемического процесса внутрибольничных инфекций в детских ожоговых отделениях / Е.И. Алексеева, А.В. Слободенюк // Гигиена и эпидемиология. – 2007. – Т. 11, №39. – С. 93–95.
7. Алябьева, Н.М. Серотипы и устойчивость к антибиотикам штаммов *Streptococcus pneumoniae*, выделенных у детей при респираторных

- инфекциях: дис. ... канд. мед. наук: 03.02.03 / Алябьева Наталья Михайловна. – М., 2014. – 101 с.
8. Алябьева, Н.М. Молекулярное типирование *Streptococcus pneumoniae* методом мультиплексной полимеразной цепной реакции с учетом распространенности серотипов в Российской Федерации / Н.М. Алябьева, Т.А. Блинова, О.А. Пономаренко и соавт. // Вопросы современной педиатрии. – 2013. – Т.12, № 6. – С. 30-34.
 9. Андреева, С.В. Видовой состав микрофлоры ожоговых ран пациентов Челябинского областного ожогового центра / С.В. Андреева, Л.И. Бахарева, Д.Ю. Нохрин // Вестник Челябинского государственного университета. – 2013. – №. 7. – С. 58-59.
 10. Багирова, Н.С. Диагностика инфекций кровотока (посев крови). Методическое пособие для врачей. Н.С. Багирова, Н.В. Дмитриева. – М.: Издательская группа ФГБУ «РОНЦ им. Н. Н. Блохина» Минздрава России, 59 с.
 11. Баранов, А.А. Современная клинико-эпидемиологическая характеристика пневмококковых инфекций / А.А. Баранов, Н.И. Брико, Л.С. Намазова-Баранова // Лечащий врач. – 2012. – №4. – С. 79.
 12. Баранов, А.А. Роль *Streptococcus pneumoniae* в структуре бактериальных инфекций у детей, госпитализированных в стационары г. Москвы в 2011–2012 гг. // А.А. Баранов, Л.С. Намазова-Баранова, Н.А. Маянский Н.А., Т.В. Куличенко и соавт. // Педиатрическая фармакология. – 2013. – Т.10, № 5. – С. 6–12.
 13. Белобородов, В.Б. Деэскалационная антибактериальная терапия – концепция повышения эффективности лечения тяжелых инфекций / В.Б. Белобородов // Русский медицинский журнал. – 2004. – Т.12, №5. – С.3-7.
 14. Белов, Б.С. А-стрептококковая инфекция глотки в практике интерниста / Б.С. Белов // Вестник оториноларингологии. – 2013. – №3. – С.39-43.

15. Белов, Б.С. Современные аспекты А-стрептококкового тонзилита / Б.С. Белов, Т.П. Гришаева // Вопросы современной педиатрии. –2003. –Т.2, № 4. – С. 40.
16. Белошицкий, Г. В. Эпидемиологическая характеристика пневмококковых менингитов : дис. ... канд. мед. наук : 14.00.30 / Григорий Владимирович Белошицкий. – Москва, 2005. – 187 с.
17. Белошицкий, Г.В. Фенотипическая и генотипическая характеристика штаммов пневмококков, выделенных от больных пневмококковым менингитом / Г.В. Белошицкий, И.С. Королева, К.О. Миронов // Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. – 2011. – Т.13, № 3. – С. 261-266.
18. Белошицкий, Г.В. Серотиповой пейзаж пневмококков, выделенных при пневмококковом менингите в Российской Федерации / Г.В. Белошицкий, И.С. Королева, М.А. Королева // Эпидемиология и вакцинопрофилактика. – 2015. – Т.2, №81. – С. 19-25.
19. Богомолова, Н.С. Неферментирующие грамотрицательные бактерии: частота выделения и чувствительность к антибиотикам / Н.С. Богомолова, Л.В. Большаков, С.М. Кузнецова, Т.Д. Орешкина // Анестезиология и реанимация. – 2010. – №3. – С. 12-18.
20. Богомолова, Н.С. Проблема лечения гнойно-воспалительных осложнений, обусловленных Acinetobacter / Н.С. Богомолова, Л.В. Большаков, С.М. Кузнецова // Анестезиология и реаниматология. – 2014. – №.1. – С. 26–32.
21. Бочков, И.А. Гемофильные бактерии носоглотки здоровых людей / И.А. Бочков, Н.А. Семина // Журнал микробиология. – 1982. –№11. – С. 21-25.
22. Брико, Н.И. Чувствительность к антибиотикам стрептококков группы А различных генотипов, выделенных от больных инвазивными и неинвазивными инфекциями мягких тканей / Н.И. Брико, Н.Ф. Дмитриева, Д.А. Клейменов, К.В. Липатов, Е.В. Глушкова, В.В. Котин // Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. – 2015. – Т.17, №2. – С. 54-166.

23. Грудинина, С.А. Динамика распространения антибиотикорезистентности среди *Streptococcus pneumoniae* в Москве в период с 1998 по 2003 гг. / С.А. Грудинина, С.В. Сидоренко, Л.К. Катосова, Н.А. Фатова, Л.В. Еремина, Н.М. Фурлетова, Н.С. Ютанова // Антибиотики и химиотерапия. – 2014. – Т.49, № 4. – С. 25-34.
24. Заргарьян, О.П. Частота и массивность обсеменения гемофильными бактериями слизистой оболочки носа и глотки / О.П. Заргарьян, Л.В. Колотилова // В книге Детские инфекции. –1982. – Вып. 12. – С. 38-42.
25. Зверев, В.В. Медицинская микробиология, вирусология и иммунология / В.В. Зверева, М.Н. Бойченко, - М.: ГЭОТАР-Медиа, 2010. – 443+474с.
26. Калиногорская, О.С. Антибиотикорезистентность и серотиповой состав *Streptococcus pneumoniae*, выделенных у детей в Санкт-Петербурге в 2010-2013 гг. / О.С. Калиногорская, С.С. Беланов, М.О. Волкова, В.В. Гостев, С.В. Сидоренко // Антибиотики и химиотерапия. – 2015. –Т.60, № 1-2. – С. 10-18.
27. Катосова, Л.К. Клинико-биологическая оценка пневмотропной флоры при острых и хронических бронхолегочных болезнях у детей: дис. ...д-ра биол. наук: 03.00.07 / Катосова Любовь Кирилловна. – М., 1989. – 407 с.
28. Катосова, Л.К. Особенности носительства *Streptococcus pneumoniae* и *Haemophilus influenzae* и сравнительная характеристика штаммов, выделенных от здоровых детей и больных острыми и хроническими респираторными инфекциями / Л.К. Катосова // Журнал микробиология эпидемиология и иммунобиология. –1994. – август-сентябрь. – С. 55-60.
29. Катосова, Л.К. *Haemophilus influenzae* типа b в этиологии острых эпиглоттитов у детей / Л.К. Катосова, М.Р. Богомольский, А.Л. Жилина // Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. – 2005. –Т.7. – Прилож. 1. – С. 32.
30. Катосова, Л.К. Этиология и рациональная терапия тяжелых форм острых средних гнойных отитов у детей / Л.К. Катосова, А.В. Очкасов, М.Р. Богомильский // Антибиотики и химиотерапия. – 2006. – Т. 2. – С. 23-29.

31. Катосова, Л.К. Биологические свойства *Haemophilus influenzae*, выделенных от здоровых детей и больных острыми и хроническими респираторными заболеваниями / Л.К. Катосова, Т.М. Сидорина, Л.П. Клюкина, Н.О. Ряховская Н.О. // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. –1994. – №1. – С. 21-27.
32. Катосова, Л.К. Серотипы *S. pneumoniae* у детей, больных острой пневмонией и плевритом / Л.К. Катосова, В.К.Таточенко, А.А. Арова, А.А. Кешикбаева, А.П. Батуро, Т.А. Кузнецова, А.Б. Левин // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. – 1990. – №5. – С. 23-28.
33. Клинические рекомендации «Определение чувствительности микроорганизмов к антимикробным препаратам. Версия-2015-02». <http://www.antibiotic.ru/minzdrav/clinical-recommendations>.
34. Козлов, Р.С. Антибиотикорезистентность *Streptococcus pyogenes* в России: результаты многоцентрового проспективного исследования Пе-ГАС-1 / Р.С. Козлов, О.И. Сивая, К.В. Шпынев, Е.Д. Агапова, С.М. Розанова, Е.Н. Гугуцидзе и др. // Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. – 2005. – Т.7, № 2. – С. 154-166.
35. Козлов, Р.С. Динамика резистентности *Streptococcus pneumoniae* к антибиотикам в России за период 1999-2009 гг. / Р.С. Козлов, О.В. Сивая, О.И. Кречикова, Н.В. Иванчик // Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. – 2010. – Т.12, №4. – С. 329-341.
36. Козлов, Р.С. Группа исследователей проекта «ПеГАС». Динамика резистентности *Streptococcus pneumoniae* к антибиотикам в России за период 1999–2009 гг. / Р.С. Козлов, О.В. Сивая, О.И. Кречикова, Н.В. Иванчик // Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. – 2010. – Т.12, №4. – С. 269-368.
37. Козлов, Р.С. Чувствительность основных возбудителей бактериальных инфекций к цефтаролину в РФ / Р.С. Козлов, М.В. Сухорукова, С.В.

- Сидоренко, М.В. Эйдельштейн и др. // Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. – 2015. – Т.15, №3. – С. 218 – 226.
38. Козлов, Р.С. Серологическая характеристика и чувствительность к антибиотикам пневмококков, выделенных у детей в возрасте до 5 лет в отдельных регионах Российской Федерации / Р.С. Козлов, А.Н. Чагарян, Л.В. Козлова, А.А. Муравьев А.А. // Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. – 2011. – Т.13, № 2. – С. 177–187.
39. Козлов, Р.С. Пути оптимизации мониторинга, профилактики и фармакотерапии пневмококковой инфекции: автореф. дис. ... докт. мед. наук: 14.00.25, 03.00.07 / Роман Сергеевич Козлов. – С., 2004. – 45 с.
40. Козлов, Р.С. Современные тенденции антибиотикорезистентности возбудителей нозокомиальных инфекций в ОРИТ России: что нас ждет дальше? / Р.С. Козлов, О.У. Стецюк, И.В. Андреева // Интенсивная терапия. – 2007. – №4. – С. 4.
41. Королева, И.С. Серотиповая характеристика пневмококков, выделенных от больных пневмококковым менингитом / И.С. Королева, Г.В. Белошицкий, К.О. Миронов // Вопросы современной педиатрии. – 2012. – Т.11, № 4. – С. 122–127.
42. Королева, И.С. Эпидемиологический надзор за гнойными бактериальными менингитами: материалы 20-летних наблюдений / И.С. Королева, А.А. Демина, А.Е. Платонов, Г.В. Белошицкий, А.М. Грачева, Л.В. Спирихина и др. // Эпидемиология и вакцинопрофилактика. – 2013. – Т.5. – С. 10–13.
43. Королева, И.С. Пневмококковая инфекция в России – эпидемиологическая ситуация / И.С. Королева, С.М. Харит, А.А. Рулева, А.Л. Перова, С.В. Сидоренко // Педиатрическая фармакология. – 2010. – Т.4. – №7. – С. 12-18.
44. Крыжановская, О.А. Чувствительность к антибиотикам и механизмы устойчивости к карбапенемам *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* и *Klebsiella pneumoniae*, выделенных у детей в отделениях реанимации и интенсивной терапи: дис. ... канд. мед. наук: 03.02.03 / Крыжановская Ольга Андреевна. – М., 2016. – 119с.

45. Крыжановская, О.А. Масс-спектрометрическая идентификация возбудителей инфекций кровотока: опыт в педиатрической практике / О.А. Крыжановская, А.В. Лазарева, О.А. Пономаренко, Л.К. Катосова, Р.Ф. Тепаев, О.В. Карасева, И.В. Чеботарь // Российский педиатрический журнал. – 2014. – Т.17. – № 5. – С. 4-9.
46. Кузнецова, М.В. Формирование биопленок нозокомиальными штаммами *Pseudomonas aeruginosa* / М.В. Кузнецова, Н.В. Николаева, С.М. Розанова, Т.И. Карпунина // Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. – 2011. – №4. – С. 8-14.
47. Лабинская, А.С. Частная медицинская микробиология с техникой микробиологических исследований / А.С. Лабинская. – Изд. 4-е, перераб. и доп. М.: Медицина, 2005 г. – 394 с.
48. Лазарева, И.В. Распространение и антибактериальная резистентность грамотрицательных бактерий, продуцентов карбапенемаз, в Санкт-Петербурге и некоторых других регионах Российской Федерации / И.В. Лазарева, В.А. Агеевец, Т.А. Ершова, Л.П. Зуева и соавт. // Антибиотики и химиотерапия. – 2016. – № 11-12. – С. 28-38.
49. Лазарева, М.А. Носоглоточное носительство *Streptococcus pneumoniae* у воспитанников детских домов, дошкольных учреждений и неорганизованных детей младше 5 лет / М.А. Лазарева, Т.В. Куличенко, Н.М. Алябьева, О.А. Пономаренко и соавт. // Вопросы современной педиатрии. – 2015. –Т.14. – № 2. – С. 246-255.
50. Лобзин, Ю.В. Серотипы *Streptococcus pneumoniae*, вызывающие ведущие нозологические формы пневмококковых инфекций / Ю.В. Лобзин, С.В. Сидоренко, С.М. Харит, С.С. Беланов и др. // Журнал инфектологии. – 2013. – Т.5. – № 4. – С. 35-40.
51. Манеров, Ф.К. Клинические варианты пневмококковой пневмонии, особенности ее течения и исходы / Ф.К. Манеров, В.А. Паули, О.М. Чернов и др. // Педиатрия. –1990. – № 8. – С. 23 - 28.

52. Мартинович, А.А. Динамика антибиотикорезистентности и эпидемиология инфекций, вызванных *Acinetobacter* spp. в России / Мартинович А.А. // Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. – 2010. – Т. 12. – С. 96-105.
53. Маянский, А.Н. Стрептококки: микробиология и патология / Маянский А.Н. // Вопросы диагностики в педиатрии. – 2010. – №1. – С.19-13.
54. Маянский, А.Н. Межвидовое общение бактерий и образование смешанной (полимикробной) биоплёнки / А.Н. Маянский, И.В. Чеботарь, Н.И. Евтеева, Е.И. Руднева // Журнал Микробиология. – 2012. – №1. – С. 93-101.
55. Маянский, А.Н. *Pseudomonas aeruginosa*: характеристика биопленочного процесса / А.Н. Маянский., И.В. Чеботарь, Е.И. Руднева, В.П. Чистякова // Молекулярная генетика, микробиология и вирусология. – 2012. – №1. – С. 3–8.
56. Маянский, Н. А. Определение капсульных серотипов пневмококка методом мультиплексной ПЦР / Н. А. Маянский, Н. М. Алябьева, Л. К. Катосова, Т.А. Гречуха, В. Г. Пинелис, Л. С. Намазова-Баранова // Вопросы диагностики в педиатрии. – 2010. –Т. 2. –№ 6. – С. 6-10.
57. Маянский, Н.А. Бактериальная этиология острого среднего отита у детей до 5 лет: роль *Streptococcus pneumoniae* / Н.А. Маянский, Н.М. Алябьева, А.М. Иваненко, О. А. Пономаренко и соавт. // Вопросы диагностики в педиатрии. – 2013. – Т. 5. – № 1. – С. 5–13.
58. Маянский, Н.А. Чувствительность к антибиотикам, клональное и серотиповое разнообразие пневмококков у детей с острым средним отитом в г. Москве / Н.А. Маянский, Н.М. Алябьева, М.А. Лазарева и соавт. // Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. – 2016. – Т.18. – № 2. – С. 84-92.
59. Методические указания по определению чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препаратам. МУК 4.2. 1890-04.
60. Плохинский, Н.А. Биометрия / Н.А. Плохинский. – 2-е изд. – М.: МГУ, 1970. – 367 с.

61. Пономаренко, О.А. Частота носительства *Streptococcus pyogenes* и его возрастающая роль в инфекционно-воспалительных процессах у детей / О.А. Пономаренко, В.Л. Новак, А.Н. Калакуцкая и соавт. // Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. – 2012. – Т.12. – № 2. – Приложение 1. – С. 42.
62. Приказ Министерства здравоохранения Российской Федерации от 21 марта 2014 г. N 125н г. Москва "Об утверждении национального календаря профилактических прививок и календаря профилактических прививок по эпидемическим показаниям".
63. Протасова, И.Н. Чувствительность к антибиотикам пневмококков, выделенных у детей города Красноярска / И.Н. Протасова, О.В. Перьянова, Н.В. Бахарева, А.Б. Салмина, и соавт. // Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. – 2014. –Т. 16. –№ 2. – С. 144-148.
64. Протасова, И.Н. Смена серотипов *Streptococcus pneumoniae* у детей, вакцинированных 7-валентной конъюгированной вакциной / И.Н. Протасова, Н.В. Бахарева, О.В. Перьянова, Т.А. Елистратова, М.В. Коваль // Эпидемиология и вакцинопрофилактика. – 2014. – Т. 5. –№ 78. – С. 67-71.
65. Прямчук, С.Д. Генетические детерминанты устойчивости к антибактериальным средствам в нозокомиальных штаммах *Escherichia coli*, *Klebsiella spp.* и *Enterobacter spp.*, выделенных в России в 2003-2007 гг. / С.Д. Прямчук, Н.К. Фурсова, И.В. Абаев, Ю.Н. Ковалев, Н.А. Шишкова, Э.И. Печерских и соавт. // Антибиотики и химиотер. – 2010. - Т. 55. - № 9. – С.3-10.
66. Рачина, С.А. Практика лечения острых респираторных инфекций у детей в амбулаторно-поликлинических учреждениях РФ: результаты многоцентрового фармакоэпидемиологического исследования / С.А. Рачина, Р.С. Козлов, В.К. Таточенко, Э.В. Дудникова Э.В. и соавт. // Клиническая фармакология и терапия. – 2016. – Т.25. – № 2. – С. 20-27.
67. Решедько, Г. К. Резистентность к антибиотикам грамотрицательных возбудителей нозокомиальных инфекций в ОРИТ многопрофильных

- стационаров России / Г.К. Решедько, Е.Л. Рябкова, О.И. Кречикова, М.В. Сухорукова М. В. и соавт. // Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. – 2008. – Т.10. – № 3. – С. 96—112.
68. Рудакова, А.В. Фармако-экономические аспекты вакцинации детей 13-валентной пневмококковой конъюгированной вакциной в Российской Федерации / А.В. Рудакова, А.А. Баранов, Ю.В. Лобзин Ю.В., Н.И. Брико // Вопросы современной педиатрии. – 2014. – Т. 13. – № 1. – С. 51-59.
69. Руднов, В.А. Инфекции в ОРИТ России: результаты национального многоцентрового исследования / В.А. Руднов В.А., Бельский Д.В., А.В. Дехнич // Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. – 2011. – Т.13. – № 4. – С. 294-304.
70. Рябкова, Е.Л. Оптимизация антибиотикотерапии нозокомиальных инфекций, вызванных *Klebsiella pneumoniae*, в стационарах России: автореф. дис. ... канд. мед. наук: 14.00.25 / Рябкова Елена Леонидовна. С., 2006. – 23с.
71. Рябкова, Е.Л. Резистентность нозокомиальных штаммов *Escherichia coli* в стационарах России / Е.Л. Рябкова, Н.В. Иванчик, М.В. Сухорукова, А.Г. Щебников и соавт. // Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. – 2009. – Т.11. – №2. – С.161-169.
72. Савинова, Т. А. Перспективы применения антипневмококковой вакцинации для сдерживания распространения антибактериальной резистентности среди пневмококков / Т.А. Савинова, Е.Н. Ильина, С.В. Сидоренко // Антибиотики и химиотерапия. – 2011. – Т.56. – С. 5-6.
73. Савинова, Т.А. Генетическое разнообразие и молекулярные основы резистентности *Streptococcus pneumoniae* к β -лактамным антибиотикам: автореф. дис. ... канд. мед. наук: 03.02.03, 03.01.03 / Савинова Татьяна Александровна. М., 2011. - 22с.
74. Савинова, Т.А. Генетическое разнообразие пенициллинустойчивых *Streptococcus pneumoniae* / Т.А. Савинова, О.Ю. Филимонова, С.А. Грудинина С.А, С.В. Сидоренко // Журнал инфектологии. – 2010. – Т.1. – № 4. – С. 66-71.

75. Сидоренко, С.В. Молекулярные механизмы устойчивости грамотрицательных бактерий семейства Enterobacteriaceae к цефалоспориновым антибиотикам / С.В. Сидоренко, А.Г. Березин, Д.В. Иванов // Антибиотики и химиотерапия. – 2004. – Т. 49. – № 3. – С. 3-13.
76. Сидоренко, С.В. Резистентность к макролидам и линкозамидам среди *Streptococcus pneumoniae* и *Streptococcus pyogenes* в Российской Федерации / С.В. Сидоренко, С.А. Грудинина, О.Ю. Филимонова, Л.Г. Столярова, Т.А. Савинова // Клиническая фармакология и терапия. – 2008. – Т. 17. – № 2. – С. 1-5.
77. Сидоренко, С.В. Пневмококковая инфекция и современные возможности ее профилактики – эпидемиологический обзор ситуации в мире и в России / С.В. Сидоренко, Ю.В. Лобзин, С.М. Харит, И.С. Королева, В.К. Таточенко // Вопросы современной педиатрии. – 2010. – Т. 9. – № 1. – С. 62-69.
78. Стецюк, О.У. О селекции устойчивости к макролидам / О.У. Стецюк, И.В. Андреева // Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. – 2010. – Т. 12. – № 3. – С. 255-59.
79. Страчунский, Л.С. Антибактериальная терапия: практическое руководство по антиинфекционной химиотерапии / Л.С. Страчунский, Ю.Б. Белоусова, С.Н. Козлова. – Москва: Полимаг, 2000. – 190 с.
80. Страчунский, Л.С. Чувствительность к антибиотикам пневмококков, выделенных от здоровых детей из организованных коллективов / Л.С. Страчунский, О.И. Кречикова, Г.К. Решедько, О.У. Стецюк и соавт. // Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. – 1999. – Т.1. – №1. – С. 31-39.
81. Сухорукова, М.В. Антибиотикорезистентность нозокомиальных штаммов *Acinetobacter* spp. в стационарах России: результаты многоцентрового эпидемиологического исследования МАРАФОН в 2011–2012 гг. / М.В. Сухорукова, М.В. Эйдельштейн, Е.Ю. Склеенова, Н.В. Иванчик, А.В. и соавт. // Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. – 2014. – Т.16. – №4. – С. 266-72.

82. Сухорукова, М.В. Антибиотикорезистентность нозокомиальных штаммов *Enterobacteriaceae* в стационарах России: результаты многоцентрового эпидемиологического исследования МАРАФОН 2013-2014 / М.В. Сухорукова, М.В. Эйдельштейн, Е.Ю. Склеенова, Н.В. Иванчик и соавт. // Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. – 2017. – Т. 19. – № 1. – С. 49-58.
83. Сухорукова, М.В. Антибиотикорезистентность нозокомиальных штаммов *Acinetobacter spp.* в стационарах России: результаты многоцентрового эпидемиологического исследования МАРАФОН в 2013-2014 / М.В. Сухорукова, М.В. Эйдельштейн, Е.Ю. Склеенова, Н.В. Иванчик Н.В. и соавт. // Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. – 2017. – Т. 19. – № 1. – С. 42-48.
84. Фоминых, С. Г. Раневые инфекции: значение микробиологического мониторинга при составлении больничного формуляра антимикробных препаратов / С. Г. Фоминых // Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. – 2011. – Т. 13, №. 4. – С. 368-375.
85. Харит, С.М. Распространенность пневмококковых пневмоний и отитов у детей младшего возраста (предварительные данные) / С.М. Харит, С.В. Сидоренко, А.А. Рулева и соавт. // Вопросы современной педиатрии. – 2011. – №6. – С. 103-107.
86. Холодок, Г.Н. Микробиологические и патогенетические аспекты внебольничной пневмонии у детей: автореф. дис. ... д-ра мед. наук: 03.02.03 / Холодок Галина Николаевна. – М., 2012. – 41 с.
87. Чеботарь, И.В. Механизмы антибиоплёночного иммунитета / И.В. Чеботарь // Вестник РАМН. – 2012. – № 12. – С. 22-29.
88. Чеботарь, И.В. Нейтрофилы и биопленка: диалектика взаимоотношений / И.В. Чеботарь, А.Н. Маянский, Е.Д. Кончакова // Журнал микробиология. – 2013. – №6. – С. 105-111.
89. Шпынев, К.В. *Streptococcus pyogenes*: характеристика микроорганизма, выделение, идентификация и определение чувствительности к

- антибактериальным препаратам / К.В. Шпынев, О.И. Кречикова, В.А. Кречиков, Р.С. Козлов // Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. – 2007. – Т. 9. – № 2. – С. 104-120.
90. Эйдельштейн, М.В. Антибиотикорезистентность нозокомиальных штаммов *Pseudomonas aeruginosa* в стационарах России: результаты многоцентрового эпидемиологического исследования «МАРАФОН» 2013-2014 / М.В. Эйдельштейн, М.В. Сухорукова, Е.Ю. Склеенова, Н.В. Иванчик и соавт. Клиническая Микробиология и Антимикробная Химиотерапия. – 2017. – Т. 19, №1. – С. 37-41.
91. Яковлев, С.В. Устойчивость *Pseudomonas aeruginosa* к карбапенемам: уроки исследования MYSTIC / С.В. Яковлев // Фарматека. – 2007. – № 8/9. – С 67-70.
92. Abad, C.L. Catheter-related bloodstream infection / C.L. Abad, N. Safdar // Clinical Review. – 2012. – Vol. 39, № 03. – P. 84-98.
93. *Acinetobacter baumannii* MLST [база данных], <http://pubmlst.org/abaumannii/>
94. Adlard, P. A. *Pseudomonas aeruginosa* as a cause of infectious diarrhoea / P. A. Adlard, S. M. Kirov, K.Sanderson, G. E. Cox // Epidemiology and infection. – 1998. – Т. 121, №1. – С. 237-241.
95. Adler, A. Persistence of *Klebsiella pneumoniae* ST258 as the predominant clone of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae in post-acute-care hospitals in Israel, 2008-13 / A. Adler, O. Hussein, D. Ben-David, S. Masarwa, S. Navon-Venezia, M.J. Schwaber, Y. Carmeli // Journal of Antimicrobial Chemotherapy. – 2015. – Vol. 70, № 1. – P. 89-92.
96. Ageevets, V.A. Emergence of carbapenemase-producing Gram-negative bacteria in Saint Petersburg, Russia / V.A. Ageevets, I.V. Partina, E.S. Lisitsyna, E.N. Ilina, Y.V. Lobzin, S.A. Shlyapnikov, S.V. Sidorenko // International Journal of Antimicrobial Agents. – 2014. – Vol. 44, № 2. – P. 152-5.
97. Agodi, A. *Pseudomonas aeruginosa* carriage, colonization, and infection in ICU patients / A. Agodi, M.Barchitta, R. Cipresso, L. Giaquinta et al // Intensive care medicine. – 2007. – Т. 33, №. 7. – С. 1155-1161.

98. Aguiar, S.I., Denmark14 -230 clone as an increasing cause of pneumococcal infection in Portugal within a background of diverse serotype 19A lineages / S.I. Aguiar, F.R. Pinto, S. Nunes et al. // *Journal of Clinical Microbiology*. – 2010. – Vol. 48. – P. 101-8.
99. Aliaga, L. Clinical significance of polymicrobial versus monomicrobial bacteremia involving *Pseudomonas aeruginosa* / L. Aliaga, J. D. Mediavilla, J. Llosa, C. Miranda et al // *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*. – 2000. – T. 19, №. 11. – C. 871-874.
100. Allen, D.M. *Acinetobacter*: a perspective / D.M. Allen, S.Y. Wong // *Singapore Medical Journal*. – 1990. – Vol. 31, №6. – P. 511–514.
101. Angus, D.C. Epidemiology of severe sepsis in the United States: analysis of incidence, outcome, and associated costs of care / D.C. Angus, W.T. Linde-Zwirble, J. Lidicker, G. Clermont, J. Carcillo, M.R. Pinsky // *Critical Care Medicine*. – 2001. – Vol. 29, № 7. – P. 1303-1310.
102. Augustin, P. *Pseudomonas aeruginosa* post-operative peritonitis: clinical features, risk factors, and prognosis / P. Augustin, A. Tran-Dinh, N. Valin, M. Desmard et al. // *Surgical Infections*. – 2013. – Vol. 14, № 3. – P. 297-303.
103. Azzari, C. Evolving role of 13-valent pneumococcal conjugate vaccine in clinical practice / C. Azzari, F. Martínón-Torres, H.J. Schmitt, R. Dagan // *The Pediatric Infectious Disease Journal*. – 2014. – Vol. 33. – P. 858-864.
104. Bae, Y. Green Nail Syndrome Treated with the Application of Tobramycin Eye Drop / Y. Bae, G. M. Lee, J. H. Sim, S. Lee, S. Y. Lee et al // *Annals of dermatology*. – 2014. – T. 26, №. 4. – C. 514-516.
105. Bagirova, N.S. Current state of bacteriemia diagnostics / N.S. Bagirova // *Soprovoditefnaya terapiya v onkologii*. – 2006. – Vol. 3. – P. 23-38.
106. Bagnoli, F. A second pilus type in *Streptococcus pneumoniae* is prevalent in emerging serotypes and mediates adhesion to host cells // F. Bagnoli, M. Moschioni, C. Donati et al. // *Journal of Bacteriology*. – 2008. – Vol. 190. – P. 5480-5492.

107. Barantsevich, E.P. Emergence of *Klebsiella pneumoniae* producing NDM-1 carbapenemase in Saint Petersburg, Russia / E.P. Barantsevich, I.V. Churkina, N.E. Barantsevich, J. Pelkonen, E.V. Schlyakhto, N.Woodford // *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. – 2013. – Vol. 68, № 5. – P. 1204-6.
108. Barkai, G. Community prescribing and resistant *Streptococcus pneumoniae* // G. Barkai, D. Greenberg, N. Givon-Lavi, E. Dreifuss, D. Vardy, R. Dagan. // *Emerging Infectious Diseases*. – 2005. – Vol. 11. – P. 829-837.
109. Baron, E.J. Prolonged incubation and extensive subculturing do not increase recovery of clinically significant microorganisms from standard automated blood cultures / E.J. Baron, J.D. Scott, L.S. Tompkins // *Clinical Infectious Diseases*. – 2005. – Vol. 41. – P. 1677-1680.
110. Bassetti, M. *Pseudomonas aeruginosa* serious infections: mono or combination antimicrobial therapy? / M. Bassetti, E. Righi, C. Viscoli // *Current Medicinal Chemistry*. – 2008. – Vol. 14. – P. 517–522.
111. Beall, B. Pre- and postvaccination clonal compositions of invasive pneumococcal serotypes for isolates collected in the United States in 1999, 2001, and 2002 / B. Beall, M.C. McEllistrem, R.E. Gertz Jr, S.Wedel, D.J. Boxrud, A.L. Gonzalez, et al. // *Journal of Clinical Microbiology*. – 2006. – Vol. 44. – P. 999–1017.
112. Beall, B. Shifting genetic structure of invasive serotype 19A pneumococci in the United States / B. Beall, R. Gertz, R. Hulkower, et al. // *Clinical Infectious Diseases*. – 2011. – Vol. 203. – P. 1360-1368.
113. Bemer-Melchior, P. In vitro activity of new ketolide telithromycin compared with those of macrolides against *Streptococcus pyogenes*: influences of resistance mechanisms and methodological factors / P. Bemer-Melchior, M.E. Juvin, S. Tassin, A. Bryskier, G.C. Schito, H-B. Drugeon // *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. – 2000. – Vol. 44, № 11. – P. 2999-3002.
114. Bender, J.M. Pneumococcal necrotizing pneumonia in Utah: does serotype matter? / J.M. Bende, K. Ampofo, K. Korgenski, J. Daly, A.T. Pavia, et al. // *Clinical Infectious Diseases*. – 2008. – Vol. 46, № 9. – P. 1346-52.

115. Bernards, A.T. Persistent *Acinetobacter baumannii*? Look inside your medical equipment / A.T. Bernards, H.I. Harinck, L. Dijkshoorn, T.J. van der Reijden et al // *Infection Control and Hospital Epidemiology*. – 2004. – Vol. 25. – P. 1002–1004.
116. Bialek-Davenet, S. Genomic definition of hypervirulent and multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* clonal groups / S. Bialek-Davenet, A. Criscuolo, F. Ailloud, V. Passet, et al. // *Emerging Infectious Diseases*. – 2014. – Vol. 20, № 11. – P. 1812-20.
117. Bidet, P. Infections a *Streptococcus pyogenes* ou streptocoque du groupe A chez l'enfant: donnees du Centre national de reference (CNR) / P. Bidet, C. Plainvert, C. Doit, P. Mariani-Kurkdjian, et al. // *Archives de pediatrie*. – 2010. – Vol. 17. – P. 201-208.
118. Biedenbach, D.J. In vitro activity of oral antimicrobial agents against pathogens associated with community-acquired upper respiratory tract and urinary tract infections: a five country surveillance study / D.J. Biedenbach, R.E. Badal, M.Y. Huang, M. Motyl, et al. // *Infectious Diseases and Therapy*. – 2016. – Vol. 5. – P. 139-53.
119. Biesbroek, G. Seven-valent pneumococcal conjugate vaccine and nasopharyngeal microbiota in healthy children / G. Biesbroek, X. Wang, B.J. Keijser et al. // *Emerging Infectious Diseases*. – 2014. – Vol. 20. – P. 201-10.
120. Biesbroek, G. The impact of breastfeeding on nasopharyngeal microbial communities in infants / G. Biesbroek, A.A. Bosch, X. Wang, B.J. Keijser, et al. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*. – 2014. – Vol.190, № 3. – P. 298-308.
121. Boucher, H.W. Bad bugs, no drugs: no ESKAPE! An update from the Infectious Diseases Society of America / H.W. Boucher, G.H. Talbot, J.S. Bradley, J.E. Edwards et al // *Clinical Infectious Diseases*. – 2009. – Vol . 48, №1/ - P. 1-12.
122. Bovo, R. *Pseudomonas* and *Aspergillus* interaction in malignant external otitis: risk of treatment failure / R. Bovo, A. Benatti, A.Ciorba, Libanore, M. Borrelli et al // *Otorhinolaryngologica Italica*. – 2012. – T. 32, №. 6. – C. 416 – 9.

123. Bush, K. Proliferation and significance of clinically relevant beta-lactamases / K. Bush // *Annals of the New York Academy of Sciences*. – 2013. – Vol.1277. – P. 84-90.
124. Butler, J.C. Serotype Distribution of *Streptococcus pneumoniae* infections among Preschool children in the United States, 1978-1994: Implications for Development of a Conjugate Vaccine / J.C. Butler, R.F. Breiman, H.B. Lipman, Jo. Hofman, R.R. Facklam // *The Journal of Infectious Diseases*. – 1995. – Vol. 171. – P. 885-889.
125. Calhoun, J. H. Multidrug-resistant organisms in military wounds from Iraq and Afghanistan / J. H. Calhoun, C. K. Murray, M. M. Manring // *Clinical orthopaedics and related research*. – 2008. – Vol. 466, №. 6. – P. 1356-1362.
126. Campodonico, V. L. Airway epithelial control of *Pseudomonas aeruginosa* infection in cystic fibrosis / V. L. Campodonico, M. Gadjeva, C. Paradis-Bleau, A. Uluer, G. B. Pier // *Trends in molecular medicine*. – 2008. – Vol. 14, №. 3. – P. 120-133
127. Carek, P. J. Diagnosis and management of osteomyelitis / P. J. Carek, L. M. Dickerson, J. L. Sack // *American family physician*. – 2001. – Vol. 63, № 12. – P. 2413-2420.
128. Carretto, E. Widespread carbapenem resistant *Acinetobacter baumannii* clones in Italian hospitals revealed by a multicenter study / E. Carretto, D. Barbarini, L. Dijkshoorn, T.J. van der Reijden, S. Brisse, V. Passet, C. Farina. // *Infection, Genetics and Evolution*. – 2011. – Vol. 11. – P.1319-26.
129. Cerqueira, G.M. Insights into *Acinetobacter baumannii* pathogenicity / G.M. Cerqueira, A.Y. Peleg // *Journal of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology*. – 2011. – Vol. 63, № 12. – P. 1055–1060.
130. Chastre, J. Ventilator-associated pneumonia / J. Chastre, J. Y. Fagon // *American journal of respiratory and critical care medicine*. – 2002. – Vol. 165, №. 7. – P. 867-903.
131. Chebotkevich, V.N. Modern laboratory diagnostic techniques of sepsis / V.N. Chebotkevich, E.I. Kaytandzhan, V.V. Burylev, E.E. Shchetinkina //

- Klinicheskaya mikrobiologiya i antimikrobnaya khimioteriya. – 2013. – Vol.15, № 4. – P. 295-300.
132. Chen, H.H. Fluoroquinolone-nonsusceptible *Streptococcus pneumoniae* isolates from a medical center in the pneumococcal conjugate vaccine era / H.H. Chen, H.C. Li, L.H. Su, C.H. Chiu // *Journal Of Microbiology Immunology And Infection*. – 2017. – Vol.50, №6. – P. 839-845.
133. Choi, E.H. *Streptococcus pneumoniae* serotype 19A in children, South Korea / E.H. Choi, S.H. Kim, B.W. Eun et al. // *Emerging Infectious Diseases*. – 2008. – Vol.14. – P. 275-81.
134. Chotirmall, S. H. *Candida* species in cystic fibrosis: a road less travelled / S. H. Chotirmall, C. M. Greene, N. G. McElvaney // *Medical Mycology*. – 2010. – Vol. 48, № 1. – P.114-124.
135. Chuang, C. H. Shanghai fever: a distinct *Pseudomonas aeruginosa* enteric disease / C. H. Chuang, , Y. H. Wang, H. J. Chang, H. L.Chen, et al // *Journal Gut*. – 2014. – Vol. 63, № 5. – P. 736-743.
136. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing: Twenty-sixth Edition. CLSI Supplement M100S. CLSI, Wayne, PA, USA, 2016.
137. Cohen, R. Impact of 13-valent pneumococcal conjugate vaccine on pneumococcal nasopharyngeal carriage in children with acute otitis media / R. Cohen, C. Levy, E. Bingen, M. Koskas, I. Nave, E. Varon // *The Pediatric Infectious Disease Journal*. – 2012. – Vol.31. – P. 297-301.
138. Cohen, R. Le streptocoque du groupe A. Un pathogene majeur pour la prochaine decennie? *Streptococcus pyogenes* an emerging pathogen / R. Cohen, Y. Aujard, P. Bidet, A. Bourrillon, et al. // *Archives de pediatrie*. – 2005. – Vol.12. – P. 1065-1067.
139. Comite de L'Antibiogramme de la Societe Francaise de Microbiologie. Recommandations 2012. Concentrations, diametres critiques et regles de lecture interpretative (Tableau XIX). www.sfm-microbiologie.org

140. Cornick, J.E. Streptococcus pneumoniae: the evolution of antimicrobial resistance to beta-lactams, fluoroquinolones and macrolides / J.E. Cornick, S.D. Bentley // *Emerging Microbes and Infections*. – 2012. – Vol. 14. – P.573-83.
141. Cox, C. D. Use of 2-aminoacetophenone production in identification of *Pseudomonas aeruginosa* / C. D. Cox, J. Parker // *Journal of clinical microbiology*. – 1979. – Vol. 9, №. 4. – P. 479-484.
142. Croucher, N.J. Rapid pneumococcal evolution in response to clinical interventions / N.J. Croucher, S.R. Harris, C. Fraser, M.A. Quail, et al. // *Science*. – 2011. – Vol. 331. – P. 430-4.
143. Custovic, A. Epidemiological Surveillance of Bacterial Nosocomial Infections in the Surgical Intensive Care Unit / A. Custovic, J. Smajlovic, S. Hadzic, S. Ahmetagic et al // *Materia socio-medica*. – 2014. – Vol. 26, № 1. – P. 7-11.
144. Cuzon, G. Outbreak of OXA-48-positive carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* isolates in France / G. Cuzon, J. Ouanich, R. Gondret, T. Naas, et al. // *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. – 2011. – Vol.55, № 5. – P.2420-2423.
145. d'Humieres, C. Decline in macrolide-resistant *Streptococcus pyogenes* isolates from French children / C. d'Humieres, R. Cohen, C. Levy, Ph. Bidet, et al. // *International Journal of Medical Microbiology*. – 2012. – Vol. 302. – P. 300-303.
146. Da Silva, G.J. Long-term dissemination of an OXA-40 carbapenemase-producing *Acinetobacter baumannii* clone in the Iberian Peninsula / G.J. Da Silva, S. Quinteira, E. Bértolo, J.C. Sousa, et al. // *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. – 2004. – Vol.54. – P. 255-8.
147. Da Silva, G.J. Insights on the Horizontal Gene Transfer of Carbapenemase Determinants in the Opportunistic Pathogen *Acinetobacter baumannii* / G.J. Da Silva, S. Domingues // *Microorganisms*. – 2016. – Vol. 23, № 4. – P.3.
148. Dabernat, H. Laboratory diagnosis of the *Haemophilus* occurring in respiratory infections / Dabernat H. // *Revue de l'Institute Pasteur de Lyon*. – 1982. – Vol. 15, № 1. – P. 99-106.

149. Dabernat, H. Colonisation de l'enfant par *Haemophilus*; serotypes, byotypes et sensibilité aux antibiotiques / H. Dabernat, R. Bauriaud, C. Delmas, M.B. Lareng // *Pathologie Biologie*. – 1983. – Vol.31. – P. 103-106.
150. Dagan, R. Seasonality of antibiotic-resistant *Streptococcus pneumoniae* that causes acute otitis media: a clue for an antibiotic restriction policy? / R. Dagan, G. Barkai, N. Givon-Lavi, A.Z. Sharf, et al. // *The Journal of Infectious Diseases*. – 2008. – Vol.197. – P. 1094–1102.
151. Dagan, R. Introduction and proliferation of multidrug-resistant *Streptococcus pneumoniae* serotype 19A clones that cause acute otitis media in an unvaccinated population / R. Dagan, N. Givon-Lavi, E. Leibovitz et al. // *The Journal of Infectious Diseases*. – 2009. – Vol. 199. – P. 776-85.
152. Dantas, R. C. *Pseudomonas aeruginosa* bacteremia: independent risk factors for mortality and impact of resistance on outcome / R. C. Dantas, M. L. Ferreira, P.P. Gontijo-Filho, and R.M. // *Journal of medical microbiology*. – 2014. – Vol. 63. – P. 1-5.
153. Del Grosso, M. Increase of pneumococcal serotype 19A in Italy is due to expansion of the pilated clone ST416/CC199 / M. Del Grosso, R. Camilli, F. D'Ambrosio et al. // *Journal of Medical Microbiology*. – 2013. – Vol. 62. – P. 1220-5.
154. Del Grosso, M. The macrolide resistance genes *erm(B)* and *mef(E)* are carried by Tn2010 in dual gene *Streptococcus pneumoniae* isolates belonging to clonal complex CC271 / M. Del Grosso, J.G. Northwood, D.J. Farrell, A. Pantosti // *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. – 2007. – Vol. 51. – P. 4184–4186.
155. Del Grosso, M. New composite genetic element of the Tn916 family with dual macrolide resistance genes in a *Streptococcus pneumoniae* isolate belonging to clonal complex 271 // M. Del Grosso, R. Camilli, B. Libisch, M. Füzi M, A. Pantosti // *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. – 2009. – Vol. 53, № 3. – P. 1293-4.
156. Del Grosso, M. The *mef(E)*-carrying genetic element (mega) of *Streptococcus pneumoniae*: insertion sites and association with other genetic elements / M. Del

- Grosso, R. Camilli, F. Iannelli, G. Pozzi, A. Pantosti // *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. – 2006. – Vol. 50, № 10. – P. 3361-6.
157. de Sevilla Maria, F. Clinical presentation of invasive pneumococcal disease in Spain in the era of Heptavalent conjugate vaccine / F. de Sevilla Maria, J.-J. Garcia, C. Esteva et al. // *The Pediatric Infectious Disease Journal*. – 2012. – Vol. 31, №2. – P.124-128.
158. Devine, V.T. The rise and fall of pneumococcal serotypes carried in the PCV era / V.T. Devine, D.W. Cleary, J.M. Jefferies, R. Anderson et al. // *Vaccine*. – 2017. – Vol. 35. – P. 1293-1298.
159. Di Popolo, A. Molecular epidemiological investigation of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* strains in four Mediterranean countries with a multilocus sequence-typing scheme / A. Di Popolo, M. Giannouli, M. Triassi, S. Brisse, R. Zarrilli // *Clinical Microbiology and Infection*. – 2011. – Vol.17. – P.197-201.
160. Douglas, J. In Vitro Activity of Oral antimicrobial agents against pathogens associated with community-acquired upper respiratory tract infections: upper respiratory tract and urinary tract infections: A five-country surveillance study / J. Douglas, Biedenbach, E. B. Robert, H. Ming-Yi , et al // *Infectious Diseases and Therapy*. – 2016. – Vol. 5, №2. – P.139–153.
161. Driscoll, J. A. The epidemiology, pathogenesis and treatment of *Pseudomonas aeruginosa* infections / J. A. Driscoll, S. L. Brody, M. H. Kollef // *Drugs*. – 2007. – Vol. 67, №. 3. – P. 351-368.
162. Edelstein, M.V. Spread of extensively resistant VIM-2-positive ST235 *Pseudomonas aeruginosa* in Belarus, Kazakhstan, and Russia: a longitudinal epidemiological and clinical study / M.V. Edelstein, E.N. Skleenova, O.V. Shevchenko, J.W. D'souza, et al. // *Lancet Infectious Diseases*. – 2013. – Vol. – 13, № 10. – P.867-76.
163. Edelstein, M. Prevalence and molecular epidemiology of CTX-M extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in Russian hospitals / M. Edelstein, I. Pimkin, I. Palagin, I. Edelstein, L.

- Stratchounski // *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. – 2003. – Vol. 47. – P. 3724-32.
164. Egan, C. A. Relapsing Henoch-Schönlein purpura associated with *Pseudomonas aeruginosa* pyelonephritis / C. A. Egan, M. A. O'Reilly, K. P. Meadows // *Journal of the American Academy of Dermatology*. – 2000. – Vol. 42, № 2. – P. 381-383.
165. Enright, M. C. Multilocus sequence typing / M. C. Enright, B. G. Spratt // *Trends in Microbiology*. – 1999. – Vol.7. – P. 482-487.
166. Enright, M.C. A multilocus sequence typing scheme for *Streptococcus pneumoniae*: identification of clones associated with serious invasive disease / M.C. Enright, B.G. Spratt // *Microbiology*. – 1998. – Vol.144. – P.3049-60.
167. Esposito, S. Theoretic coverage of heptavalent pneumococcal conjugate vaccine in the prevention of community-acquired pneumonia in children in Italy // S. Esposito, D.V. Madore, S. Gironi, et al. // *Vaccine*. – 2005. – Vol. 23. – P. 2704-2707.
168. Esposito, S. Bacteremic pneumococcal community-acquired pneumonia in children less than 5 years of age in Italy / S. Esposito, A. Marchese, A. Tozzi, G.A. Rossi, et al. // *The Pediatric Infectious Disease Journal*. – 2012. – Vol.31, № 7. – P. 705-710.
169. Esteva, C. *Streptococcus pneumoniae* serotype 1 causing invasive disease among children in Barcelona over a 20-year period (1989-2008) / C. Esteva, L. Selva, M.F. de Sevilla et al. // *Clinical Microbiology and Infection*. – 2011. – Vol.17. – P. 1441-1444.
170. EUCAST: European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing, version 4, valid from 2014-01-01. p. 28-32.
171. Farmand, S. Significant decline in the erythromycin resistance of group A streptococcus isolates at a German paediatric tertiary care centre / S. Farmand, P. Henneke, M. Hufnagel, R. Berner // *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*. – 2012. – Vol.31. – P.707-710.

172. Farrell, D.J. Emergence and spread of *Streptococcus pneumoniae* with erm(B) and mef(A) resistance / D.J. Farrell, S.G. Jenkins, S.D. Brown, M. Patel, et al. // *Emerging Infectious Diseases*. – 2005. – Vol. 11. – P. 851–858.
173. Feil, E.J. eBURST: Inferring patterns of evolutionary descent among clusters of related bacterial genotypes from multilocus sequence typing data / E.J. Feil, B.C. Li, D.M. Aanensen, W.P. Hanage, B.G. Spratt // *Journal of Bacteriology*. – 2004. – Vol. 186. – P. 1518-1530.
174. Felmingham, D. Regional trends in beta-lactam, macrolide, and fluoroquinolone and telithromycin resistance among *Streptococcus pneumoniae* isolates 2001–2004 / D. Felmingham, R. Canto'n, S.G. Jenkins // *The Journal of Infectious Diseases*. – 2007. – Vol.55. – P. 111–118.
175. Fleiss, J.L. *Statistical methods for rates and proportions*. New York: John Wiley & Sons, Inc.; 2003. J.L. Fleiss, B. Levin, M.C. Paik // <http://dx.doi.org/10.1002/0471445428>.
176. Flemming, H. C. The perfect slime / H. C. Flemming // *Colloids and Surfaces. B: Biointerfaces*. – 2011. – Vol. 86, №. 2. – P. 251-259.
177. Fournier, P.E. The epidemiology and control of *Acinetobacter baumannii* in health care facilities / P.E. Fournier, H. Richet // *Clinical Infectious Diseases*. – 1006. – Vol. 42. – P.692-9.
178. Fujita, K. Decline of erythromycin resistance of group A streptococci in Japan / K. Fujita, K. Murono, V. Yoshikawa, T. Murai // *The Pediatric Infectious Disease Journal*. – 1994. – Vol.13. – P.1075-8.
179. Fursova, N.K., The spread of bla OXA-48 and bla OXA-244 carbapenemase genes among *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis* and *Enterobacter* spp. isolated in Moscow, Russia /N.K. Fursova, E.I. Astashkin, A.I. Knyazeva, N. N. Kartsev, et al // *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*. – 2015. – Vol. 14. – P. 46-55.
180. Galanis, I. Effects of PCV7 and PCV13 on invasive pneumococcal disease and carriage in Stockholm, Sweden / I. Galanis, A. Lindstrand, J. Darenberg et al. // *The European Respiratory Journal*. – 2016. – Vol. 47. – P.1208-18.

181. Gallego, M. *Pseudomonas aeruginosa* isolates in severe chronic obstructive pulmonary disease: characterization and risk factors / M. Gallego, X. Pomares, M. Espasa, E. Castaner, et al // *BMC pulmonary medicine*. – 2014. – Vol. 14, № 1. – P. 103.
182. Gene, A. Pneumococcal serotypes causing acute otitis media among children in Barcelona (1992-2011): emergence of the multiresistant clone ST320 of serotype 19A / A. Gene, E. del Amo, M. Inigo M. et al. // *The Pediatric Infectious Disease Journal*. – 2013. – Vol.32. – P.128-133.
183. Geng, Q. Molecular characterization and antimicrobial susceptibility of *Streptococcus pneumoniae* isolated from children hospitalized with respiratory infections in Suzhou, China / Q. Geng, T. Zhang, Y. Ding, et al. // *PLoS One*. – 2014. – Vol. 9. – P. 93752.
184. Geraci, D.M. Is the monoclonal spread of the ST258, KPC-3-producing clone being replaced in southern Italy by the dissemination of multiple clones of carbapenem-nonsusceptible, KPC-3-producing *Klebsiella pneumoniae*? / D.M. Geraci, C. Bonura, M. Giuffrè, L. Saporito, et al. // *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*. – 2015. – Vol.21, № 3. – P.15-7.
185. Gertz, R.E. Increased penicillin nonsusceptibility of nonvaccine-serotype invasive pneumococci other than serotypes 19A and 6A in post-7-valent conjugate vaccine era / R.E. Gertz, Z. Li, F.C. Pimenta, D. Jackson, B.A. Juni, et al. // *The Journal of Infectious Diseases*. – 2010. – Vol. 201. – P.770-5.
186. Gertz, R.E. Clonal distribution of invasive pneumococcal isolates from children and selected adults in the United States prior to 7- valent conjugate vaccine introduction / R.E. Gertz, M.C. McEllistrem, D.J. Boxrud et al. // *The Journal of Clinical Microbiology*. – 2003. – Vol.41. – P. 4194-216.
187. Giakkoupi, P. An update of the evolving epidemic of *bla*KPC-2-carrying *Klebsiella pneumoniae* in Greece (2009-10) / P. Giakkoupi, C. C. Papagiannitsis, V. Miriagou, O. Pappa, et al. // *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. – 2011. – Vol. 66, № 7. – P. 1510-1513.

188. Giani, T. Epidemic diffusion of KPC carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* in Italy: results of the first countrywide survey, 15 May to 30 June 2011 / T. Giani, B. Pini, F. Arena, V. Conte, S. Bracco, et al. // *Eurosurveillance*. – 2013. – Vol. 30, № 22. – P. 20489.
189. Giannouli, M. Virulence-related traits of epidemic *Acinetobacter baumannii* strains belonging to the international clonal lineages I-III and to the emerging genotypes ST25 and ST78 / M. Giannouli, L.C. Antunes, V. Marchetti, M. Triassi, et al. // *BMC Infectious Diseases*. – 2013. – Vol.13. – P. 282.
190. Gibson, J. *Pseudomonas aeruginosa*-*Candida albicans* interactions: localization and fungal toxicity of a phenazine derivative / J. Gibson, A. Sood, D. A. Hogan // *Applied and environmental microbiology*. – 2009. – Vol. 75, №. 2. – P. 504-513.
191. Gniadek, T.J. Carbapenem-resistant non-glucose-fermenting gram-negative bacilli: the missing piece to the puzzle / T.J. Gniadek, C. Karen, P.J. Simner // *Journal of Clinical Microbiology*. – 2017. – Vol. 54. – P. 1700-10.
192. Golden, A.R. Characterization of MDR and XDR *Streptococcus pneumoniae* in Canada, 2007-13 // A.R. Golden, M. Rosenthal, B. Fultz et al. // *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. – 2015. – Vol.70. – P. 2199-202.
193. Goossens, H. Outpatient antibiotic use in Europe and association with resistance: a cross-national database study / H. Goossens, M. Ferech, R. Vander Stichele, M. Elseviers // *Lancet*. – 2005. – Vol. 365. – P.579-87.
194. Goossens, H. Antibiotic consumption and link to resistance / H. Goossens // *Clinical Microbiology and Infection*. – 2009. – Vol.15, № 3. – P. 12-15.
195. Goubet, V. Comparison of four skin preparation strategies to prevent catheter-related infection in intensive care unit (CLEAN trial): a study protocol for a randomized controlled trial / V. Goubet, J-F. Timsit, J-C- Lucet, A. Lepape, et al. // *Trials* – 2013. – Vol. 14. – P.114.
196. Grady, P.O. Clinical Practice Guidelines for the Diagnosis and Management of Intravascular Catheter-Related Infection: 2009 Update by the Infection diseases Society of America. IDSA Guidelines for Intravascular Catheter-Related

- Infection. / P.O. Grady, I. RAad Issam, J.A. Bart, Rijnders, J. Robert, et al. // Clinical Infectious Diseases. – 2009. – Vol. 49. – P.1-5.
197. Gratten, M. Colonisation of Haemophilus influenza and Streptococcus pneumoniae in the Upper respiratory tract of Neonates and Papua New Guinea; primary acquisition, duration of carriage, and relationship to carriage in mothers / M. Gratten, H. Gratten, A. Poli et al. // Biology of the Neonate. – 1986. Vol.50, № 2. – P.114-120.
198. Gray, B.M. Epidemiological studies of Streptococcus pneumoniae in infants acquisition, carriage and infection during first 24 months of life / B.M. Gray, C.M. Converse, H.C. Dillon // The Journal of Infectious Diseases. – 1980. – Vol.142. – P. 923-933.
199. Guchev, I.A. Management of nonsevere pneumonia in military trainees with the urinary antigen test for Streptococcus pneumoniae: an innovative approach to targeted therapy / I.A. Guchev, V.L. Yu, A. Sinopalnikov, O.I. Klochkov et al. // Clinical Infectious Diseases. – 2005. – Vol. 40, № 11. – P.1608-1616.
200. Guggenheim, M. Changes in bacterial isolates from burn wounds and their antibiograms: a 20-year study (1986–2005) / M. Guggenheim, R.Zbinden, A. E. Handschin, A. Gohritz et al // Burns. – 2009. – Vol. 35, №. 4. – P. 553-560.
201. Gurung, J. Association of biofilm production with multidrug resistance among clinical isolates of Acinetobacter baumannii and Pseudomonas aeruginosa from intensive care unit / J. Gurung, A. B. Khyriem, A. Banik, W. V. Lyngdoh et al // Indian Journal of Critical Care Medicine. – 2013. – Vol. 17, №. 4. – P. 214-218.
202. Hackel, M. Serotype prevalence and antibiotic resistance in Streptococcus pneumoniae clinical isolates among global populations / M. Hackel, C. Lascols, S. Bouchillon, B. Hilton et al. // Vaccine. – 2003. – Vol. 31. – P. 4881-7.
203. Hakenbeck, R. Molecular mechanisms of β -lactam resistance in Streptococcus pneumoniae / R. Hakenbeck, R. Brückner, D. Denapate, P. Maurer // Future Microbiology. – 2012. – Vol.7. – P. 395-410.
204. Hammerum, A.M. Characterisation of an IMP-7-producing ST357 Pseudomonas aeruginosa isolate detected in Denmark using whole genome sequencing / A.M.

- Hammerum, L. Jakobsen, F. Hansen, M. Stegger, et al. // *International Journal of Antimicrobial Agents*. – 2015. – Vol. 45, № 2. – P. 200-1.
205. Hancock, R. E. W. Outer membrane proteins of *Pseudomonas* / R. E. W. Hancock, R. Siehnel, N. Martin // *Molecular microbiology*. – 1990. – Vol. 4, № 7. – P. 1069-1075.
206. Hattemer, A. Bacterial and clinical characteristics of health care-and community-acquired bloodstream infections due to *Pseudomonas aeruginosa* / A. Hattemer, A. Hauser, M. Diaz, M. Scheetz, et al // *Antimicrobial agents and chemotherapy*. – 2013. – Vol. 57, № 8. – P. 3969-3975.
207. Hausdorff, W.P. Epidemiological differences among pneumococcal serotypes / W.P. Hausdorff, D.R. Feikin, K.P. Klugman // *The Lancet Infectious Diseases*. – 2005. – Vol.5. – P. 83-93.
208. Hazlett, L.D. Bacterial infections of the cornea (*Pseudomonas aeruginosa*) / L.D. Hazlett // *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*. – 2007. – Vol.92. – P. 185-194.
209. He, M. Dynamics of serotype 14 *S. pneumoniae* population causing acute respiratory infections among children in China (1997 -2012) / M. He, K. Yao, W. Shi et al. // *BMC Infectious Disease*. – 2015. – Vol. 15. – P. 266.
210. Henriques-Normark, B. The rise and fall of bacterial clones: *Streptococcus pneumoniae* / B. Henriques-Normark, C. Blomberg, J. Dagerhamn, P. Bättig, S. Normark // *Nature Reviews Microbiology*. – 2008. – Vol. 6. – P. 827-37.
211. Hjalmsdottir, M. Prevalence of pilus genes in pneumococci isolated from healthy preschool children in Iceland: association with vaccine serotypes and antibiotic resistance / M. Hjalmsdottir, B. Petursdottir, H. Erlendsdottir, et al. // *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. – 2015. – Vol. 70. – P. 2203-2208.
212. Hobbs, R. D. Four-valve polymicrobial endocarditis caused by *Pseudomonas aeruginosa* and *Serratia marcescens* / R. D. Hobbs, S. E. Downing, V. T. Andriole // *American journal of medicine*. – 1982. – Vol. 72, № 1. – P. 164-168.

213. Hogan, D. A. Pseudomonas-Candida interactions: an ecological role for virulence factors / D. A. Hogan, R. Kolter // *Science*. – 2002. – Vol. 296, № 5576. – P. 2229-2232.
214. Hollenbeak, S. The Cost of Catheter-Related Bloodstream Infections / S. Hollenbeak // *Journal of Infusion Nursing*. – 2011. – Vol. 34, № 5. – P. 309-313.
215. Howard, A.J. Nasopharyngeal carriage and antibiotic resistance of *Haemophilus influenzae* in healthy children / A.J. Howard, K.T. Dunkin, G.W. Millar // *Epidemiology and Infection*. – 1988. – Vol.100, № 2. – P.193-203.
216. Hrabák, J. Regional spread of *Pseudomonas aeruginosa* ST357 producing IMP-7 metallo- β -lactamase in Central Europe / J. Hrabák, D. Cervená, R. Izdebski, W. Duljasz, et al. // *Journal of Clinical Microbiology*. – 2011. – Vol. 49, № 1. – P.474-5.
217. Hsieh, Y.C. Expansion and evolution of *Streptococcus pneumoniae* serotype 19A ST320 clone as compared to its ancestral clone, Taiwan19F-14 (ST236) / Y.C. Hsieh, T.L. Lin, K.Y. Chang et al. // *The Journal of Infectious Diseases*. – 2013. – Vol. 208. – P. 203-10.
218. Hsu, A.J. Treatment of Multidrug-Resistant Gram-Negative Infections in Children / A.J. Hsu, P.D. Tamma // *Clinical Infectious Diseases*. – 2014. – Vol. 58, № 10. – P.1439—1448.
219. Hu, F. Results from the Survey of Antibiotic Resistance (SOAR) 2009-11 and 2013-14 in China / F. Hu, D. Zhu, F. Wang, L. Morrissey, et al. // *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. – 2016. – Vol. 71, № 1. – P. 33-43.
220. Hulten, K.G. Changes in *Streptococcus pneumoniae* serotype 19A invasive infections in children from 1993 to 2011 / K.G. Hulten, S.L. Kaplan, L.B. Lamberth et al. // *The Journal of Clinical Microbiology*. – 2013. – Vol. 51. – P. 1294-7.
221. Janoir, C. Insight into resistance phenotypes of emergent non 13-valent pneumococcal conjugate vaccine type pneumococci isolated from invasive disease after 13-valent pneumococcal conjugate vaccine implementation in France / C.

- Janoir, A. Lepoutre, L. Gutmann, E. Varon // *Open Forum Infectious Diseases*. – 2016. – Vol. 3. – P. 020.
222. Jefferies, J.M.C. Automated pneumococcal MLST using liquid-handling robotics and a capillary DNA sequencer / J.M.C. Jefferies, S. C. Clarke, A. Smith, C. Dowson, et al. // *Molecular Biotechnology*. – 2003. – Vol. 24. – P. 303-308.
223. Ji, J. Multilocus sequence typing reveals genetic diversity of carbapenem- or ceftazidime-nonsusceptible *Pseudomonas aeruginosa* in China / J. Ji, J. Wang, Z. Zhou, H. Wang, et al. // *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. – 2013. – Vol. 57, № 11. – P. 5697-700.
224. Jordana-Lluch, E. Improving the diagnosis of bloodstream infections: PCR coupled with mass spectrometry / E. Jordana-Lluch, M. Gimenez, M.D. Quesada, V. Ausina, et al. // *BioMed Research International*. – 2014. Vol.2014. – ID 501214.
225. Kabiri, M. Neonatal epididymo-orchitis caused by *Pseudomonas aeruginosa*: a case report / M. Kabiri, A.Barkat, H. El Ajaje, N. Allali, et al // *Cases journal*. – 2010. – Vol. 3, № 1. – P. 44.
226. Kaplan, E.L. Reduced ability of penicillin to eradicate ingested group A streptococci from epithelial cells: Clinical and pathogenetic implications / E.L. Kaplan, G.S. Chhatwal, M. Rohde // *Clinical Infectious Diseases*. – 2006. – Vol. 43, № 11. – P. 1398-406.
227. Karah, N., A. Insights into the global molecular epidemiology of carbapenem non-susceptible clones of *Acinetobacter baumannii* / N. Karah, , A. Sundsfjord, K. Towner, Ø. Samuelsen // *Drug Resistance Updates*. – 2012. – Vol.15. – P.237-47.
228. Kehl, S.C. Global Assessment of Antimicrobial Susceptibility among Gram — Negative Organisms Collected from Pediatric Patients between 2004 and 2012: Results from the Tigecycline1 Evaluation and Surveillance Trial / S.C. Kehl, M.J. Dowzicky // *The Journal of Clinical Microbiology*. – 2015. – Vol. 4. – P. 1286—1293.

229. Kerr, J. R. Wilson, R. *Pseudomonas aeruginosa* pyocyanin and 1-hydroxyphenazine inhibit fungal growth / J. R. Kerr, G. W. Taylor, A. Rutman, N. Høiby, et al // *Journal of clinical pathology*. – 1999. – Vol. 52, № 5. – P. 385-387.
230. King, L.B. Serine protease PKF of *Acinetobacter baumannii* results in serum resistance and suppression of biofilm formation / L.B. King, M.K. Pangburn, L.S. McDaniel // *The Journal of Infectious Diseases*. – 2013. – Vol. 207, № 7. – P. 1128–1134.
231. Kirschke, D. L. *Pseudomonas aeruginosa* and *Serratia marcescens* contamination associated with a manufacturing defect in bronchoscopes / D. L. Kirschke, T. F. Jones, A. S. Craig, P. S. Chu et al // *New England Journal of Medicine*. – 2003. – Vol. 348, № 3. – P. 214-220.
232. Kitchel, B. Molecular epidemiology of KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* isolates in the United States: clonal expansion of multilocus sequence type 258 / B. Kitchel, J.K. Rasheed, J.B. Patel, A. Srinivasan, S. Navon-Venezia, et al. // *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. – 2009. Vol. 53, № 8. – P. 3365-70.
233. *Klebsiella pneumoniae* MLST [база данных], <http://www.pasteur.fr/mlst/>.
234. Korman, T. M. Polymicrobial septicemia with *Pseudomonas aeruginosa* and *Streptococcus pyogenes* following traditional tattooing / T. M. Korman, M. L. Grayson, J. D. Turnidge // *Journal of Infection*. – 1997. – Vol. 35, № 2. – P. 203.
235. Korvick, J. A. *Pseudomonas aeruginosa* bacteremia in patients undergoing liver transplantation: an emerging problem / J. A. Korvick, J. W. Marsh, T. E. Starzl, V. L. Yu // *Surgery*. – 1991. Vol.109, №. 1. – P. 62 - 68
236. Kovács, K. Emergence and interhospital spread of OXA-48 producing *Klebsiella pneumoniae* ST395 clone in Western Hungary / K. Kovács, A. Nyul, G. Mestyán, S. Melegh, et al. // *The Journal of Infectious Diseases*. – 2017. – Vol. 49, № 3. – P. 231-233.
237. Kung, V. L. The accessory genome of *Pseudomonas aeruginosa* / V. L. Kung, E. A. Ozer, A. R. Hauser // *Microbiology and molecular biology reviews*. – 2010. – Vol. 74, №. 4. – P. 621-641.

238. Langley, J. Empyema associated with community-acquired pneumonia: A pediatric investigator' collaborative network on infections in Canada (PICNIC) study / J. Langley, J. Kellner, N. Solomon, J. Robinson et al. // *BMC Infectious Diseases*. – 2008. – Vol. 8. – P. 129.
239. Leclair, L. W. Mixed bacterial-fungal infections in the CF respiratory tract / L. W. Leclair, D. A. Hogan // *Medical Mycology*. – 2010. – Vol. 48, №. 1. – P. S125-S132
240. Leclercq, R. EUCAST expert rules in antimicrobial susceptibility testing / R. Leclercq, R. Cantón, D.F. Brown, C.G. Giske, et al. // *Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*. – 2013. – Vol. 19. – P. 141-160.
241. Leclercq, R. Mechanisms of resistance to macrolides and lincosamides: nature of the resistance elements and their clinical implications / R. Leclercq // *Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*. – 2002. – Vol. 34. – P. 482-492.
242. Lepoutre, A. Impact of infant pneumococcal vaccination on invasive pneumococcal diseases in France, 2001–2006 / A. Lepoutre, E. Varon, S. Georges, L. Guttman et al. // *Eurosurveillance*. – 2008. – Vol. 13. – P. 18962.
243. Lerman, S.J. Nasopharyngeal carriage of antibiotic-resistant H. influenzae in healthy children / S.J. Lerman, J. C. Kucera, J.M. Brunken // *Pediatrics*. – 1979. – Vol. 64, № 3. – P. 287-291.
244. Liang, X. Identification of a genomic island present in the majority of pathogenic isolates of *Pseudomonas aeruginosa* / X. Liang, X. Q. T. Pham, M. V. Olson, S. Lory // *Journal of bacteriology*. – 2001. – Vol. 183, №. 3. – P. 843-853.
245. Lin, M. F. *Pseudomonas aeruginosa* Bacteremia: Treatment and Outcome-An Analysis of 56 Episodes / M. F. Lin, Y. L. Chen // *Infectious Diseases in Clinical Practice*. – 2006. – Vol.14, №. 3. – P. 150-153.
246. Linares, J. Changes in antimicrobial resistance, serotypes and genotypes in *Streptococcus pneumoniae* over a 30-year period / J. Linares, C. Ardanuy, R. Pallares, A. Fenoll // *Clinical Microbiology and Infectious Diseases*. – 2010. – Vol. 16. – P. 402-410.

247. Lindsay, A. K. Analysis of *Candida albicans* Mutants Defective in the Cdk8 Module of Mediator Reveal Links between Metabolism and Biofilm Formation / A. K. Lindsay, D. K. Morales, Z. Liu, N. Grahl et al // *PLoS genetics*. – 2014. – Vol. 10, №. 10. – P. e1004567.
248. Lister, P.D. Antibacterial-resistance *Pseudomonas aeruginosa*: Clinical impact and complex regulation of chromosomally encoded resistance mechanisms / P.D. Lister, D.J. Wolter, N.D. Hanson // *Clinical Microbiology*. – 2009. – P.582–610.
249. Lo, W.T. Rate of nasopharyngeal carriage, antimicrobial resistance and serotype of *Streptococcus pneumoniae* among in northern Taiwan / W.T. Lo, C.C. Wang, C.M. Yu, M.L. Chu // *Journal of Microbiology Immunology And Infection*. – 2003. – Vol. 36, № 3. – P. 175-81.
250. Loda, F.A. Occurrence of *Diplococcus pneumoniae* in the upper respiratory tract of children / F.A. Loda, A.M. , W.B. Glezen et al. // *The Journal of Pediatrics*. – 1975. – Vol. 87, № 6. – P. 1087-1093.
251. Lolans, K. Multicity outbreak of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* isolates producing the carbapenemase OXA-40 / K. Lolans, T.W. Rice, L.S. Munoz-Price, J.P. Quinn // *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. – 2006. – Vol. 50. – P. 2941-5.
252. Longo, F. Biofilm formation in *Acinetobacter baumannii* / F. Longo, C. Vuotto, G. Donelli // *New Microbiology*. – 2014. – Vol. 37. – P.119-27.
253. Lota, A. S. A case of necrotising fasciitis caused by *Pseudomonas aeruginosa* / A. S. Lota, F. Altaf, R. Shetty, S. Courtney et al // *Journal of Bone & Joint Surgery, British Volume*. – 2010. – Vol. 92, №. 2. – P. 284-285.
254. Lukac, P.J. Extended-Spectrum β –Lactamase-Producing Enterobacteriaceae in Children: Old Foe, Emerging Threat / P.J. Lukac, R. A. Bonomo, L. K. Logan // *Healthcare epidemiology*. – 2015. – Vol. 60. – P. 1389–1397.
255. Maiden, M.C. Multilocus sequence typing: a portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms / M.C. Maiden, J.A. Bygraves, E. Feil, G. Morelli, et al. // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 1998. – Vol. 95. – P. 3140-5.

256. Malhotra-Kumar, S. Effect of azithromycin and clarithromycin the therapy pharyngeal carriage of macrolide-resistant streptococci in healthy volunteers: a randomized, double-blind, placebo-controlled study / S. Malhotra-Kumar., C. Lammens, K. Herck Van, H. Goossens // *The Lancet*. – 2007. – Vol.369, № 10. – P. 482-90.
257. Mano, Y. Molecular analysis of the integrons of metallo- β -lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* isolates collected by nationwide surveillance programs across Japan / Y. Mano, T. Saga, Y. Ishii, A. Yoshizumi et al. // *BMC Microbiology*. – 2015. – Vol.21. – P.15:41.
258. Mansoor, T. *Pseudomonas aeruginosa* in chronic suppurative otitis media: Sensitivity spectrum against various antibiotics in Karachi / T. Mansoor, M. A. Musani, G. Khalid, M. Kamal // *Ayub Medical College*. – 2009. – Vol. 21, №. 2. – P. 120-123.
259. Martinovich, A. Ten-years resistance trends of nosocomial *Acinetobacter* spp. In Russia / A. Martinovich, N. Ivanchik, O. Kretchikova, G. Reshedko G et al. // 19th European Congress of Clinical Microbiology and Infections Diseases. – 2009. – Helsinki, Finland. Abstract P 1717.
260. May, T. B. Alginate synthesis by *Pseudomonas aeruginosa*: a key pathogenic factor in chronic pulmonary infections of cystic fibrosis patients / T. B. May, D. Shinabarger, R. Maharaj, J. Kato et al // *Clinical microbiology reviews*. – 1991. – Vol. 4, №. 2. – P. 191-206.
261. Mayanskiy, N. Serotypes and antibiotic resistance of non-invasive *Streptococcus pneumoniae* circulating in pediatric hospitals in Moscow, Russia / N. Mayanskiy, N. Alyabieva, O. Ponomarenko, et al. // *The Journal of Infectious Diseases*. – 2014. – Vol. 20. – P. 58-62.
262. Mayanskiy, N. Bacterial etiology of acute otitis media and characterization of pneumococcal serotypes and genotypes among children in Moscow, Russia / N. Mayanskiy, N. Alaybieva N, O. Ponomarenko et al. // *The Pediatric Infectious Disease Journal*. – 2015. – Vol. 34. – P. 255-60.

263. Mayanskiy, N.A. MALDI-TOF mass spectrometry in the clinical microbiology laboratory everyday work / N.A. Mayanskiy, A.N. Kalakutskaya, O.V. Motuzova, G.G. Lominadze, et al. // *Voprosy diagnostiki v pediatrii*. – 2011. – Vol. 3, №5. – P. 20-25.
264. Mayr, F.B. Epidemiology of severe sepsis / F.B. Mayr, S. Yende, D.C. Angus // *Virulence*. – 2014. – Vol. 5, № 1. – P. 4-11.
265. MacDougall, C. Antimicrobial stewardship programs in health care systems / C. MacDougall, R.E. Polk // *Clinical Microbiology Reviews* – 2008. – Vol. 18, № 4. – P. 638-56.
266. McElligott, M. Noninvasive pneumococcal clones associated with antimicrobial nonsusceptibility isolated from children in the era of conjugate vaccines / M. McElligott, I. Vickers, M. Meehan, et al. // *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. – 2015. – Vol. 59. – P. 5761-5767.
267. McGee, L. Nomenclature of major antimicrobial-resistant clones of *Streptococcus pneumoniae* defined by the pneumococcal molecular epidemiology network / L. McGee, L. Mcdougal, J. Zhou, B.G. Spratt et al. // *Journal of Clinical Microbiology*. – 2001. – Vol. 39. – P. 2565-2571.
268. McQueary, C.N. *Acinetobacter baumannii* biofilms: variations among strains and correlations with other cell properties / C.N. McQueary, L.A. Actis // *Journal of Clinical Microbiology*. – 2011. Vol. 49, № 2. – P. 243–250.
269. Mermel, L.A. Clinical Practice Guidelines for the Diagnosis and Management of Intravascular Catheter-Related Infection: 2009 Update by the Infection diseases Society of America. IDSA Guidelines for Intravascular Catheter-Related Infection / L.A. Mermel, M. Allon, E. Bouza, D.E. Graven, et al. // *Clinical Infectious Diseases*. – 2009. – Vol. 49. – P.1-5.
270. Metcalf, B. Strain features and distributions in pneumococci from children with invasive disease before and after 13-valent conjugate vaccine implementation in the USA / B. Metcalf, R. Jr. Gertz., R. Gladstone, et al. // *Journal of Clinical Microbiology*. – 2016. – Vol. 22, № 1. – P. 60.

271. Mittal, R. Urinary tract infections caused by *Pseudomonas aeruginosa*: a minireview / R. Mittal, S. Aggarwal, S. Sharma, S. Chhibber et al // *Journal of infection and public health*. – 2009. – Vol. 2, № 3. – P. 101-111.
272. Molnar, Z. Timing IgM treatment in sepsis: is procalcitonin the answer& in: *Annual update in intensive care and emergency medicine 2012* / Z. Molnar, J. Fogas J. Edited by J.-L. Vincent. – 2012. – P. 109-115.
273. Moore, M. Effectiveness of 13-valent pneumococcal conjugate vaccine for prevention of invasive pneumococcal disease in children in the USA: a matched case-control study / M. Moore, R. Link-Gelles, W. Schaffner, et al. // *The Lancet Respiratory Medicine*. – 2016. – Vol. 4. – P.399-406.
274. Moore, M.R. Population snapshot of emergent *Streptococcus pneumoniae* serotype 19A in the United States, 2005 / M.R. Moore, R.E. Jr Gertz, R.L. Woodbury, et al. // *The Journal of Infectious Diseases*. – 2008. – Vol. 197. – P.1016-27.
275. Morales, D. K. Control of *Candida albicans* metabolism and biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa* phenazines / D. K. Morales, N. Grahl, C. Okegbe, L. E. Dietrich et al // *MBio*. – 2013. – Vol. 4, № 1. – P. e00526-12.
276. Morrill, H.J. Treatment Options for Carbapenem-Resistant Enterobacteriaceae Infections / H.J. Morrill, J.M. Pogue, K.S. Kaye, K.L. LaPlante // *Open Forum Infectious Diseases*. – 2015. – Vol. 5, № 2. – P. 2.
277. Müller, S. Green Nail Syndrome (*Pseudomonas aeruginosa* Nail Infection): Two Cases Successfully Treated with Topical Nadifloxacin, an Acne Medication / S. Müller, M. Ebnöther, P. Itin // *Case reports in dermatology*. – 2014. – Vol. 6, № 2. – P. 180
278. Multilocus sequence typing: *Streptococcus pneumoniae* [database online]. Available at: <http://pubmlst.org/spneumoniae>.
279. Munoz-Price, L.S. Eighteen years of experience with *Acinetobacter baumannii* in a tertiary care hospital. *Crit* / L.S. Munoz-Price, K. Arheart, P. Nordmann, A.E. Boulanger, et al. // *Critical Care Medicine*. – 2013. – Vol. 41. – P. 2733-42.

280. Naas, T. Multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*, Russia / T.Naas, S. Kernbaum, S. Allali, P. Nordmann // *Emerging Infectious Diseases*. – 2007. – Vol. 13. – P. 669-71.
281. Nadel, D.M. Endoscopically guided cultures in chronic sinusitis / D.M. Nadel, D.C. Lanza, D.W. Kennedy // *American Journal of Rhinology* . – 1998. Vol. 12. – P. 233–241.
282. National Nosocomial Infections Surveillance (NNIS) System Report. *American Journal of Infection Control*. – 2004. – Vol. 32. – P. 470–85.
283. Nemeč, A. Long-term predominance of two pan-European clones among multi-resistant *Acinetobacter baumannii* strains in the Czech Republic / A. Nemeč, L. Dijkshoorn, T.J. van der Reijden // *Journal of Medical Microbiology*. – 2004. – Vol. 53. – P. 147–153.
284. Nseir, S. Impact of appropriate antimicrobial treatment on transition from ventilator-associated tracheobronchitis to ventilator-associated pneumonia / S. Nseir, I. Martin-Loeches, D. Makris, E. Jaillette et al // *Crit Care*. – 2014. – Vol. 18, № 3. – P. R129.
285. Obert, C.A. Assessment of molecular typing methods to determine invasiveness and to differentiate clones of *Streptococcus pneumoniae* / C.A. Obert, G. Gao, J. Sublett, E.I. Tuomanen, et al. // *Infection, Genetics and Evolution*. – 2007. – Vol. 7. – P. 708-716.
286. O'Graby, N.P. Healthcare Infection Control Practices Advisory Committee. Guidelines for the prevention of intravascular catheter-related infections / N.P. O'Graby, M. Alexander, L.A. Burns, et al. // *American Journal of Infection Control*. – 2011. – Vol.39. – P. 1-34.
287. O'Toole, G.A. Genetic approaches to study of biofilms / G.A. O'Toole, L.A. Pratt, P.I. Watnick, D.K. Newman, et al. // *Methods in Enzymology* – 1999. – Vol. 310. – P. 91-109.
288. Oteo, J. The spread of KPC-producing Enterobacteriaceae in Spain: WGS analysis of the emerging high-risk clones of *Klebsiella pneumoniae* ST11/KPC-2, ST101/KPC-2 and ST512/KPC-3 / J. Oteo, M. Pérez-Vázquez, V. Bautista, A.

- Ortega, et al. // *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. – 2016. – Vol. 71, № 12. – P. 3392-3399.
289. Pai, R. Clonal association between *Streptococcus pneumoniae* serotype 23A, circulating within the United States, and an internationally dispersed clone of serotype 23F // R. Pai, R.E. Gertz, C.G. Whitney, B. Beall // *The Journal of Clinical Microbiology*. – 2005. – Vol. 43, № 11. – P. 5440-4.
290. Pai, R. Sequential multiplex PCR approach for determining capsular serotypes of *Streptococcus pneumoniae* isolates // R. Pai, R.E. Gertz, B.J. Beall // *The Journal of Clinical Microbiology*. – 2006. – Vol. 44. – P.124 –13.
291. Papagiannitsis, C.C. Molecular Characterization of Carbapenemase-Producing *Pseudomonas aeruginosa* of Czech Origin and Evidence for Clonal Spread of Extensively Resistant Sequence Type 357 Expressing IMP-7 Metallo- β -Lactamase / C.C. Papagiannitsis, M. Medvecky, K. Chudejova, A. Skalova, et. al. // *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. – 2017. – Vol. 22. – P. e01811-17.
292. Pastar, I. Interactions of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* USA300 and *Pseudomonas aeruginosa* in polymicrobial wound infection / I. Pastar, A. G. Nusbaum, J. Gil, S. B. Patel et al // *PloS one*. – 2013. – Vol. 8, № 2. – P. e56846.
293. Paul, M. Combination antimicrobial treatment versus monotherapy: the contribution of meta-analyses / M. Paul, L. Leibovici // *Infectious disease clinics of North America*. – 2009. – Vol. 23, № 2. – P. 277-293.
294. Pelton, S.I. Emergence of 19A as virulent and multidrug resistant *Pneumococcus* in Massachusetts following universal immunization of infants with pneumococcal conjugate vaccine / S.I. Pelton, H. Huot, J.A. Finkelstein, C.J. Bishop, et al. // *The Pediatric Infectious Disease Journal*. – 2007. – Vol. 26. – P. 468–72.
295. Pena, C. Influence of virulence genotype and resistance profile in the mortality of *Pseudomonas aeruginosa* bloodstream infections / C. Pena, G. Cabot, S. Gomez-Zorrilla, L. Zamorano et al // *Clinical Infectious Diseases*. – 2014: ciu866.

296. Pendleton, J.N. Clinical relevance of the ESCAPE Pathogens / J.N. Pendleton, S.P. Gorman, B.F. Gilmore // *Expert Rev Anti Infect Ther.* – 2013. – Vol. 11, №3. – P. 297–308.
297. Pfeifer, Y. Resistance to cephalosporins and carbapenems in Gram-negative bacterial pathogens / Y. Pfeifer, A. Cullik, W. Witte // *International Journal of Medical Microbiology.* – 2010. – Vol. 300, № 6. – P. 371-9.
298. Pfeifer, Y. Carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* ST78 with OXA-72 carbapenemase and ESBL gene *bla*CTX-M-115 / Y. Pfeifer, K.P. Hunfeld, S. Borgmann, D. Maneg, et al. // *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy* . – 2016. – Vol. 71. – P. 1426-8.
299. Pilishvili, T. Pneumococcal disease prevention among adults: strategies for the use of pneumococcal vaccines / T. Pilishvili, N.M. Bennett // *The American Journal of Preventive Medicine.* – 2015. – Vol. 49, № 4. – P. 383-390.
300. Pilishvili, T. Sustained reductions in invasive pneumococcal disease in the era of conjugate vaccine / T. Pilishvili, C. Lexau, M.M. Farley, et al. // *The Journal of Infectious Diseases.* – 2010. – Vol. 201. – P. 32-41.
301. Pirnay, J.P. *Pseudomonas aeruginosa* displays an epidemic population structure / J.P. Pirnay, D. De Vos, C. Cochez, F. Bilocq, et al. // *Applied and Environmental Microbiology.* – 2002. – Vol. 4, № 12. – P. 898-911.
302. Pocket book of hospital care for children: guidelines for the management of common childhood illnesses. 2nd ed. WHO. 2013.
303. Podschun, R. *Klebsiella* spp. as Nosocomial Pathogens: Epidemiology, Taxonomy, Typing Methods, and Pathogenicity Factors / R. Podschun, U. Ullmann // a review. *Clinical Microbiology.* – 1998. – P. 589–603.
304. Porat, N. The impact of pneumococcal conjugate vaccines on carriage of and disease caused by *Streptococcus pneumoniae* serotypes 6C and 6D in southern Israel / N. Porat, R. Benisty, N. Givon-Lavi, R. Treffler, et al. // *Vaccine.* – 2016. – Vol. 34. – P. 2806-2812.

305. Potron, A. European dissemination of a single OXA-48 producing *Klebsiella pneumoniae* clone / A. Potron, J. Kalpoe, L. Poirel, P. Nordmann // *The Journal of Clinical Microbiology*. – 2011. – Vol. 17, № 12. – E. 24-6.
306. Potron, A. Emerging broad-spectrum resistance in *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii*: Mechanisms and epidemiology / A. Potron, L. Poirel, P. Nordmann // *International Journal of Antimicrobial Agents*. – 2015. – Vol. 45, № 6. – P.568-85.
307. Praveen, S. Prevalence of streptococcal pharyngitis in pediatrics / S. Praveen, A. Prema // *Journal of Pharma and Bio Sciences*. – 2014. – Vol. 5, № 3. – P. 1017-1021.
308. Principe, L. Epidemic diffusion of OXA-23-producing *Acinetobacter baumannii* isolates in Italy: results of the first cross-sectional countrywide survey // L. Principe, A. Piazza, T. Giani, S. Bracco, et al // *Journal of Clinical Microbiology*. – 2014. – Vol. 52. – P.3004-10.
309. Protasova, I.N. Molecular characterization of *Streptococcus pneumoniae*, particularly serotype 19A/ST320, that emerged in Krasnoyarsk, Russia / I.N. Protasova, T.W. Wan, N.V. Bakhareva, W.C. Hung, et. al. // *Journal of Microbiology, Immunology and Infection*. – 2017. – Vol. 6, № 9. – P. 359-370.
310. *Pseudomonas aeruginosa* MLST Database [database online]. Режим доступа: <https://pubmlst.org/paeruginosa>.
311. Qadri, S. M. H. Polymicrobial septicemia due to *Shigella flexneri* and *Pseudomonas aeruginosa*: first report / S. M. H. Qadri, S. H. Khalil // *Journal of the National Medical Association*. – 1987. – Vol. 79, № 12. – P. 128 – 1292.
312. Rachina, S. Prescribing of systemic antimicrobials for respiratory infections in children in primary care in Russia [Abstract P0370] / S. Rachina, R. Kozlov, L. Jarkova, Y. Belkova, et. al. // In: 24th ECCMID 2014, Barcelona, Spain.
313. Reimmann, C. PchC thioesterase optimizes nonribosomal biosynthesis of the peptide siderophore pyochelin in *Pseudomonas aeruginosa* / C. Reimmann, H. M. Patel, C. T. Walsh, D. Haas // *Journal of bacteriology*. – 2004. – Vol.186, № 19. – P. 6367-6373.

314. Reinert, R. Pneumococcal disease caused by serotype 19A: review of the literature and implications for future vaccine development / R. Reinert, M.R. Jacobs, S.L. Kaplan // *Vaccine*. – 2010. – Vol. 28. – P. 4249-59.
315. Reinert, R.R. Advances in pneumococcal vaccines: the 13-valent pneumococcal conjugate vaccine received market authorization in Europe / R.R.Reinert, P. Paradiso, B. Fritzel // *Expert Review of Vaccines*. – 2010. – Vol. 9. – P. 229–236.
316. Reinert, R.R. The antimicrobial resistance profile of *Streptococcus pneumoniae* / R.R. Reinert // *Clinical Microbiology and Infection*. – 2009. – Vol. 15, № 3. – P. 7-11.
317. Reinert, R.R. Mechanisms of macrolide resistance among *Streptococcus pneumoniae* isolates from Russia / R.R. Reinert, O.Y. Filimonova, A. Al-Lahham, S.A. Grudinina, et al. // *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. – 2008. – Vol. 52. – P. 2260-2.
318. Resti, M. Community-acquired bacteremic pneumococcal pneumonia in children: Diagnosis and Serotyping by Real-Time Polymerase Chain Reaction Using Blood Samples / M. Resti, M. Moriondo, M. Cortimiglia, G. Indolfi, et al. // *Clinical Infectious Diseases*. – 2010. – Vol. 51, № 9. – P. 1042-49.
319. Retsema, J. Macrolides: structures and microbial targets / J. Retsema // *International Journal of Antimicrobial Agents*. – 2001. – P. 3-10.
320. Richter, S.S. Changes in pneumococcal serotypes and antimicrobial resistance after introduction of the 13-valent conjugate vaccine in the United States / S.S. Richter, D.J. Diekema, K.P. Heilmann, C.L. Dohrn, et al. // *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. – 2014. – Vol. 58. – P. 6484-6489.
321. Richter, S.S. Pneumococcal Serotypes before and after Introduction of Conjugate Vaccines, United States, 1999-2011 / S.S. Richter, K.P. Heilmann, C.L. Dohrn, F. Riahi, et al. // *Emerging Infectious Diseases*. – 2013. – Vol. 19. – P. 1074-83.
322. Richter, S.S. The ongoing genetic adaptation of *Streptococcus pneumoniae* / S.S. Richter, D.M. Musher // *The Journal of Clinical Microbiology*. – 2017. – Vol. 55. – P. 681-685.

323. Rojo-Bezares, B. Characterization of carbapenem resistance mechanisms and integrons in *Pseudomonas aeruginosa* strains from blood samples in a French hospital / B. Rojo-Bezares, L. Cavalié, D. Dubois, E. Oswald, et al. // *The Journal of Medical Microbiology*. – 2016. – Vol. 65, № 4. – P. 311-9.
324. Rodriguez-Bano, J. Biofilm formation in *Acinetobacter baumannii*: associated features and clinical implications / J. Rodriguez-Bano, S. Marti, S. Soto, F. Fernandez-Cuenca et al // *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*. – 2008. – Vol. 14, № 3. – P. 276–278.
325. Russo, T.A. The K1 capsular polysaccharide of *Acinetobacter baumannii* strain 307-0294 is a major virulence factor / T.A. Russo, N.R. Luke, J.M. Beanan, R. Olson et al // *Infection and Immunity*. – 2010. – Vol. 78, № 9. – P. 3993–4000.
326. Salmen, P. Whirlpool-associated *Pseudomonas aeruginosa* urinary tract infections / P. Salmen, D. M. Dwyer, H. Vorse, W. Kruse // *The Journal of the American Medical Association*. – 1983. – Vol. 250, № 15. – P. 2025-2026.
327. Sanchez, C. J. Biofilm formation by clinical isolates and the implications in chronic infections / C. J. Sanchez, K. Mende, M. L. Beckius, K. S. Akers et al // *BMC infectious diseases*. – 2013. – Vol. 13, № 1. – P. 47.
328. Schwaber, M.J. Predictors of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* acquisition among hospitalized adults and effect of acquisition on mortality / M.J. Schwaber, S. Klarfeld-Lidji, S. Navon-Venezia, D. Schwartz, et al. // *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. – 2008. – Vol. 52, № 3. – P.1028-33.
329. Seppala, H. Resistance to erythromycin in-group A streptococci / H. Seppala, A. Nissinen, H. Jarvinen, S. Huovinen et al. // *The New England Journal of Medicine*. – 1992. – Vol. 326– P. 292-7.
330. Seppala, H. A novel erythromycin resistance methylase gene (*ermTR*) in *Streptococcus pyogenes* / H. Seppala, M. Skurnik, H. Soini, M.C. Roberts et al. // *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. – 1998. – Vol. 42. – P. 257-62.
331. Setchanova, L. Dominance of multidrug-resistant Denmark14-32(ST230) clone among *Streptococcus pneumoniae* serotype 19A isolates causing pneumococcal

- disease in Bulgaria from 1992 to 2013 / L. Setchanova, A. Alexandrova, D. Dacheva et al. // *Microbial Drug Resistance*. – 2015. – Vol. 21. – P. 35-42.
332. Sharma, S. Contribution of exotoxin A of *Pseudomonas aeruginosa* in acute and chronic experimental renal infection / S. Sharma, R. Kaur, V. Yadav, K. Harjai et al // *Japanese journal of infectious diseases*. – 2004. – Vol. 57, № 3. – C.119-120.
333. Shouval, D.S. Bacteremia caused by a highly-resistant *Streptococcus pneumoniae* serotype 19A circulating in a daycare center / D.S. Shouval, N. Porat, R. Dagan et al. // *The Journal of Infectious Diseases*. – 2010. – Vol. 14, № 3. – P. 253-5.
334. Siira, L. Antimicrobial resistance in relation to sero- and genotypes among invasive *Streptococcus pneumoniae* in Finland, 2007-2011 / L. Siira, J.J. alava, T. Kaijalainen, et al. // *Microbial Drug Resistance*. – 2014. – Vol. 20. – P.124-130.
335. Silva Filho, L. V. R. F. *Pseudomonas aeruginosa* infection in patients with cystic fibrosis: scientific evidence regarding clinical impact, diagnosis, and treatment / L. V. R. F. Silva Filho, F. D. A. Ferreira, F. J. C. Reis, M. C. A. D. Britto et al // *Jornal Brasileiro de Pneumologia*. – 2013. – Vol. 39, № 4. – P. 495-512.
336. Silva, E. Sepsis: from bench to bedside / E. Silva, R.H.D. Passos, M.B. Ferri, L.F.P. de Figueiredo // *Clinics*. – 2008. – Vol. 63, № 1. – P. 109-120.
337. Sjostrom, K. Clonal success of piliated penicillin nonsusceptible pneumococci / K. Sjostrom, C. Blomberg, J. Fernebro, et al. // *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*. – 2007. – Vol. 104. – P. 12907-12912.
338. Skleenova, E. Sharp increase in carbapenem-non-susceptibility and carbapenemase production rates in nosocomial Gram-negative bacteria in Russia over the last decade / E. Skleenova, M. Sukhorukova, A. Timokhova, J. Savochkina, et al. // *53rd Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy (ICAAC)*, 2012, Denver, CO, USA. Abstract C2-1092.
339. Smith, M.G. New insights into *Acinetobacter baumannii* pathogenesis revealed by high-density pyrosequencing and transposon mutagenesis / M.G. Smith, T.A. Gianoulis, S. Pukatzki, J.J. Mekalanos et al // *Genes and Development*. – 2007. – Vol. 21, № 5. – P. 601–614.

340. Solomennyi, A. Extensively drug-resistant *Acinetobacter baumannii* belonging to the international clonal lineage I in a Russian burn intensive care unit / A. Solomennyi, A. Goncharov, L. Zueva // *The International Journal of Antimicrobial*. – 2015. – Vol. 45. – P. 525-8.
341. Songa, J.-H. The relationship between pneumococcal serotypes and antibiotic resistance / J.-H. Songa, R. Daganc, K.P. Klugmane, B. Fritzell // *Vaccine*. – 2012. – Vol. 30. – P. 2728– 2737.
342. Spinola, S.M. Epidemiology of colonization with nontypable *Haemophilus influenzae* in children: A longitudinal study / S.M. Spinola, J. Peacock, F.W. Denny, et al. // *The Journal of Infectious Diseases*. – 1986. – Vol. 154. – P. 100-9.
343. Stratchounski, L.S. Antimicrobial resistance of nasopharyngeal pneumococci from children from day-care centres and orphanages in Russia: results of a unique prospective multicentre study / L.S. Stratchounski, R.S. Kozlov, P.C. Appelbaum, O.I. Kretchikova, et al. // *The Journal of Clinical Microbiology*. – 2006. – Vol. 12. – P. 853-66.
344. Sutcliffe, J. Detection of erythromycin-resistant determinants by PCR / J. Sutcliffe, T. Grebe, A. Tait-Kamradt, L. Wondrack // *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. – 1996. – Vol. 40, № 11. – P. 2562-6.
345. Tan, T.Q. Pediatric invasive pneumococcal disease in the United States in the era of pneumococcal conjugate vaccines / T.Q. Tan // *Clinical Microbiology Reviews*. – 2012. – Vol. 25. – P. 409-19.
346. Tan, T.Q. Clinical characteristics of children with complicated pneumonia caused by *Streptococcus pneumoniae* / T.Q. Tan, E.O. Jr Mason, E.R. Wald, et al. // *Pediatrics*. – 2002. – Vol. 110, № 1. – P. 1-6.
347. The European Committee on Antimicrobial Susceptibility testing (EUCAST). Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 6.0, 2016. <http://www.eucast.org>.
348. Thomsen, T. R. The bacteriology of chronic venous leg ulcer examined by culture-independent molecular methods / T. R. Thomsen, M. S. Aasholm, V. B.

- Rudkjobing, A. M. Saunders et al // Wound repair and regeneration. – 2010. – Vol. 18, № 1. – P. 38-49.
349. Thornsberry, C. Antimicrobial activity against multidrug-resistant *S. pneumoniae* isolated in United States, 2001 – 2005 / C. Thornsberry, N.P. Brown, D.C. Draghi // Postgraduate Medical Journal. – 2008. – Vol. 120, № 3. – P. 32-8.
350. Tomaras, A.P. Attachment to and biofilm formation on abiotic surfaces by *Acinetobacter baumannii*: involvement of a novel chaperone-usher pili assembly system / A.P. Tomaras, C.W. Dorsey, C.W. Edelman, L.A. Actis // Microbiology. – 2003. – Vol. 149. – P. 3473–3484.
351. Tomashek, F. Head-to-head comparison of two multi-locus sequence typing (MLST) schemes for characterization of *Acinetobacter baumannii* outbreak and sporadic isolates / F. Tomashek, P.G. Higgins, D. Stefanik, H. Wisplinghoff, et al. // International Journal of Infectious Diseases. – 2016. – Vol. 45, № 4. – P. 410.
352. Tomic, V. Regional and global antimicrobial susceptibility among isolates of *Streptococcus pneumoniae* and *Haemophilus influenzae* collected as part of the Tigecycline Evaluation and Surveillance Trial (T.E.S.T.) from 2009 to 2012 and comparison with previous years of T.E.S.T. (2004-2008) / V. Tomic, M.J. Dowzicky // Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials. – 2014. – Vol. 13. – P. 52.
353. Traugott, K. A. Monotherapy or combination therapy? The *Pseudomonas aeruginosa* conundrum / K. A. Traugott, K. Echevarria, P. Maxwell, K.Green et al // Pharmacotherapy: The Journal of Human Pharmacology and Drug Therapy. – 2011. – Vol. 31, № 6. – P. 598-608.
354. Treepong, P. Global emergence of the widespread *Pseudomonas aeruginosa* ST235 clone / P. Treepong, V.N. Kos, C. Guyeux, D.S. Blanc, et al. // Clinical Microbiology and Infection. – 2018. – Vol. 24, №3. – P. 258-266.
355. Trejo-Hernández, A. Interspecies competition triggers virulence and mutability in *Candida albicans* – *Pseudomonas aeruginosa* mixed biofilms / A. Trejo-Hernández, A. Andrade-Domínguez, M. Hernández, S. Encarnación // The ISME journal. – 2014. – Vol. 8, № 10. – P. 1974 – 1988.

356. Tristram, S. Antimicrobial resistance in *Haemophilus influenzae* / S. Tristram, M.R. Jacobs, P.C. Appelbaum // *Clinical Microbiology Reviews*. – 2007. – Vol. 20. – P. 368-89.
357. Turner, J. M. Occurrence, biochemistry and physiology of phenazine pigment production / J. M. Turner, A. J. Messenger // *Advances in microbial physiology*. – 1986. – Vol. 27. – P. 211-275.
358. Tzouvelekis, L.S. Carbapenemases in *Klebsiella pneumoniae* and Other Enterobacteriaceae: an Evolving Crisis of Global Dimensions / L.S. Tzouvelekis, A.A. Markogiannakis, B.M. Psychogiou, P.T. Tassios, A., G.L. Daikos // *Clinical Microbiology Reviews*. – 2012. – Vol.25. – №4. – P. 682–707.
359. van Dessel, H. Identification of a new geographically widespread multiresistant *Acinetobacter baumannii* clone from European hospitals / H. van Dessel, L. Dijkshoorn, T. van der Reijden, N. Bakker N. et al // *Microbiological Research*. – 2004. – Vol.155. – P. 105–112.
360. van der Linden, M. Effects of infant pneumococcal conjugate vaccination on serotype distribution in invasive pneumococcal disease among children and adults in Germany / M. van der Linden, G. Falkenhorst, S. Perniciaro et al. // *PLoS One*. – 2015. – Vol. 10. – e01311494.
361. van der Linden, M. Effectiveness of Pneumococcal Conjugate Vaccines (PCV7 and PCV13) against Invasive Pneumococcal Disease among Children under Two Years of Age in Germany / M. van der Linden, G. Falkenhorst, S. Perniciaro, C. Fitzner, M. Imöhl // *PLoS One*. – 2016. – Vol. 11. – e0161257.
362. van der Linden, M. Epidemiology of serotype 19A isolates from invasive pneumococcal disease in German children / M. van der Linden, R.R. Reinert, W.V. Kern et al. // *BMC Infectious Diseases*. – 2013. – Vol. 13. – P. 70.
363. Vieira, A.C. *Streptococcus pneumoniae*: a study of strains isolated from cerebrospinal fluid / A.C. Vieira, M.C. Gomes, M.R. Filho, J.E. Filho., et al. // *Journal de Pediatria*. – 2007. – Vol. 83, №1. – P. 71-8.

364. Villa, L. Diversity, virulence, and antimicrobial resistance of the KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* ST307 clone / L. Villa, C. Feudi, D. Fortini, S. Brisse, et al. // *Microbial genomics*. – 2017. – Vol. 3, № 4. – e 000110.
365. Villalón, P. Endemic and epidemic *Acinetobacter baumannii* clones: a twelve-year study in a tertiary care hospital / P. Villalón, S. Valdezate, T. Cabezas, M. Ortega, et al. // *BMC Microbiology*. – 2015. – Vol. 15. – P. 47.
366. Vincent, J.L. The prevalence of nosocomial infection in intensive care units in Europe. Results of the European Prevalence of Infection in Intensive Care (EPIC) Study / J.L. Vincent // EPIC International Advisory Committee. *The Journal of the American Medical Association*. – 1995. – Vol. 274, №8. – P. 639-44.
367. Vincent, J.L. European Prevalence of Infection in Intensive Care / J.L. Vincent EPIC II study. 28th ISICEM, 2008.
368. Vincent, J.L. International study of the prevalence and outcomes of infection in intensive care units / J.L. Vincent, J. Rello, J. Marshall, E. Silva, et al. // *The Journal of the American Medical Association*. – 2009. – Vol. 302. – P. 2323-9.
369. Visca, P. Iron-regulated salicylate synthesis by *Pseudomonas* spp. / P. Visca, A. Ciervo, V. Sanfilippo, N. Orsi // *Journal of General Microbiology*. – 1993. – Vol. 139. – P. 1995–2001.
370. Visca, P. Pyoverdine siderophores: from biogenesis to biosignificance / P. Visca, F. Imperi, I. L. Lamont // *Trends in microbiology*. – 2007. – Vol. 15, № 1. – P. 22-30.
371. Visca, P. *Acinetobacter* infection — an emerging threat to human health / P. Visca, H. Seifert, K.J. Towner // *IUBMB Life*. – 2011. – Vol. 63. – №12. – P. 1048–1054.
372. Vitkauskienė, A. *Pseudomonas aeruginosa* bacteremia: resistance to antibiotics, risk factors, and patient mortality / A. Vitkauskienė // *Medicina (Kaunas)*. – 2010. – Vol. 46, №. 7. – P. 490-495.
373. Wagenlehner, F. M. Bacterial prostatitis / F. M. Wagenlehner, A. Pilatz, T. Bschleipfer, T. Diemer et al // *World journal of urology*. – 2013. – Vol. 31, № 4. – P. 711-716.

374. Wahba, A.H. Pyrrobrin-Producing *Pseudomonas aeruginosa* / A.H. Wahba // *Applied microbiology*. – 1965. – Vol.13, №2. – P. 291–292.
375. Weber, D.J. Nosocomial infections in the ICU: the growing importance of antibiotic-resistant pathogens / D.J. Weber, R. Raasch, W. Rutala // *Chest*. – 1999. – №115. – P. 34-41.
376. Weernink, A. Pillows, an unexpected source of *Acinetobacter* / A. Weernink, W.P. Severin, I. Tjernberg, L.J. Dijkshoorn et al // *Journal of Hospital Infection*. – 1995. – Vol. 29, № 3. – P. 189–199.
377. Weinberger, D. M. Serotype replacement in disease after pneumococcal vaccination / D. M. Weinberger, R. Malley, M. Lipsitch // *Lancet*. – 2011. – Vol. 378. – P. 1962-73.
378. Whitney, C.G. Increasing prevalence of multidrug-resistant *Streptococcus pneumoniae* in the United States / C.G. Whitney, M.M. Farley, J. Hadler et al. // *The New England Journal of Medicine*. – 2000. – Vol. 343. – P. 1917–1924.
379. Wilks, M. Control of an outbreak of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii-calcoaceticus* colonization and infection in an intensive care unit (ICU) without closing the ICU or placing patients in isolation / M. Wilks, A. Wilson, S. Warwick, E. Price et al // *Infection Control & Hospital Epidemiology*. – 2006. – Vol. 27, № 7. – P. 654–658.
380. Williams, H. D. Oxygen, Cyanide and Energy Generation in the Cystic Fibrosis Pathogen *Pseudomonas aeruginosa* / H. D. Williams, J. E. A. Zlosnik, B. Ryall // *Advances in microbial physiology*. – 2006. – Vol. 52. – P. 1-71.
381. Wisplinghoff, H. Nosocomial bloodstream infections in US hospitals: analysis of 24,179 cases from a prospective nationwide surveillance study / H. Wisplinghoff, T. Bischoff, S.M. Tallent, H. Seifert, et al. // *Clinical Infectious Diseases*. – 2004. – Vol. 39. – P. 309–317.
382. Wood, K.A. Pharmacoeconomic implications of new therapies in sepsis / K.A. Wood, D.C. Angus // *PharmacoEconomics*. – 2004. – Vol. 22, №14. – P. 895-906.

383. Woodford, N. Multiresistant Gram-negative bacteria: the role of high-risk clones in the dissemination of antibiotic resistance / N. Woodford, J.F. Turton, D.M. Livermore // *FEMS Microbiology Reviews*. – 2011. – Vol. 35, № 5. – P. 736-55.
384. World Health Organization Global priority list of antibiotic-resistant bacteria to guide research, discovery, and development of new antibiotics [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <http://www.who.int/medicines/publications/global-priority-list-antibiotic-resistant-bacteria/en/>
385. Wu, D. C. Pseudomonas Skin Infection / D. C. Wu, W. W. Chan, A. Metelitsa, L. Fiorillo et al // *American journal of clinical dermatology*. – 2011. – Vol. 12, № 3. – P. 157-16.
386. Wyres, K.L. Pneumococcal capsular switching: a historical perspective / K.L. Wyres, L.M. Lambertsen, N.J. Croucher, L. McGee, et al. // *The Journal of Infectious Diseases*. – 2013. – Vol. 207. – P. 439-49.
387. Yang, J. A nosocomial outbreak of KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* in a Chinese hospital: dissemination of ST11 and emergence of ST37, ST392 and ST395 / J. Yang, L. Ye, L. Guo, Q. Zhao, et al. // *Clinical Microbiology and Infection*. – 2013. – Vol. 19, № 11. – P. 509-15.
388. Yu, Y. Hot tub folliculitis or hot hand-foot syndrome caused by *Pseudomonas aeruginosa* / Y. Yu, A. S. Cheng, L. Wang, W.M. Dunne et al // *Journal of the American Academy of Dermatology*. – 2007. – Vol.57, № 4. – P. 596-600.
389. Zähler, D. Increase in pilus islet 2-encoded pili among isolates, Atlanta, Georgia, USA / D. Zähler, A. Gudlavalleti, D.S. Stephens. *Emerging Infectious Diseases*. – 2010. – Vol. 16. – P. 955-62.
390. Zapun, C. Penicillin-binding proteins and beta-lactam resistance / C. Zapun, M. Contreras, T. Vernet // *FEMS Microbiology Reviews*. – 2008. – Vol.32. – P. 361e385.
391. Zarrilli, R. Global evolution of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* clonal lineages / R. Zarrilli, S. Pournaras, M. Giannouli, A. Tsakris // *The International Journal of Antimicrobial Agents*. – 2013. – Vol. 41. – P. 11-9.