

На правах рукописи

КОЗЛОВ Роман Сергеевич

**ПУТИ ОПТИМИЗАЦИИ МОНИТОРИНГА, ПРОФИЛАКТИКИ
И ФАРМАКОТЕРАПИИ ПНЕВМОКОККОВЫХ ИНФЕКЦИЙ**

14.00.25 – фармакология, клиническая фармакология

03.00.07 – микробиология

А в т о р е ф е р а т
диссертации на соискание ученой степени
доктора медицинских наук

Смоленск – 2004

Работа выполнена в Научно-исследовательском институте антимикробной химиотерапии Смоленской государственной медицинской академии Министерства здравоохранения Российской Федерации.

НАУЧНЫЙ КОНСУЛЬТАНТ:

доктор медицинских наук, профессор **Страчунский Леонид Соломонович.**

ОФИЦИАЛЬНЫЕ ОППОНЕНТЫ:

академик РАМН, доктор медицинских наук, профессор **Тотолян Артём Акопович;**

член-корреспондент РАМН, доктор медицинских наук, профессор **Белоусов Юрий Борисович;**

доктор медицинских наук, профессор **Таточенко Владимир Кириллович.**

Ведущая организация – Волгоградский государственный медицинский университет.

Защита состоится 12 марта 2004 года в _____ часов на заседании диссертационного совета Д 208.097.02 при Смоленской государственной медицинской академии по адресу: 214019, г. Смоленск, ул. Крупской, д. 28.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Смоленской государственной медицинской академии.

Автореферат разослан «___» января 2004 г.

**Ученый секретарь диссертационного совета,
доктор медицинских наук, профессор**

Яйленко А. А.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы. С момента первого описания пневмококков в плевральной жидкости пациентов с пневмонией (E. Klebs, 1875), интерес к изучению этих микроорганизмов постоянно возрастает. Распространённость и разнообразие заболеваний, вызываемых пневмококками, их уникальная способность к развитию резистентности к антимикробным препаратам, существенно снижающая эффективность терапии, потенциальная возможность разработки новых подходов к профилактике и лечению этих инфекций с использованием современных эпидемиологических и молекулярно-генетических методов, объясняет необходимость комплексного подхода к их исследованию.

Пневмококк (*Streptococcus pneumoniae*) является одним из основных возбудителей внебольничной пневмонии, бактериемии, менингита, среднего отита, синусита в различных возрастных группах (Л.К. Катосова, 1990; К. Klugman, 2001). Принимая во внимание, что число зарегистрированных случаев пневмонии в России составляет около 500 тысяч, а предполагаемых – не менее 1,5 миллионов (А.Г. Чучалин, 2002), а пневмококки, как минимум, ответственны за 30-40% от общего числа пневмоний, этиологическую значимость этих микроорганизмов трудно переоценить.

Известно, что пневмококки являются представителями резидентной микрофлоры носоглотки и ротовой полости человека и могут передаваться от человека к человеку воздушно-капельным путем при тесных контактах (R. Austrian, 1981; Н.Н. Костюкова, 1989). Учитывая вышесказанное, а также то, что первым этапом развития пневмококковых инфекций является колонизация, особую ценность приобретают проспективные исследования пневмококкового носительства в организованных коллективах, например, в детских дошкольных учреждениях (Т. Cherian, 1994; В.К. Таточенко, 1994). Кроме того, дополнительную ценность подобным исследованиям придаёт тот факт, что именно назофарингеальные штаммы в процессе эволюции первыми приобретают устойчивость к антимикробным препаратам (К. Klugman, 1990).

Снижение чувствительности пневмококков к пенициллину (P. Appelbaum, 1992) в 1990-х гг. приобрело глобальное значение. Кроме того, если в 1960-80 гг. преимущественное распространение имели умереннорезистентные к

пенициллину штаммы (значения минимальных подавляющих концентраций (МПК) ≤ 1 мг/л), то в последние годы увеличилась доля высокорезистентных штаммов (МПК пенициллина ≥ 2 мг/л) (M. Jacobs, 2003), что представляет серьёзную проблему при лечении менингитов и средних отитов.

В дополнение, устойчивость к другим классам препаратов (макролидам, тетрациклинам, линкозамидам, антифолатам, фторхинолонам), описание ванкомицинотолерантных пневмококков (E. Tuomanen, 1986) требует более детального изучения данных феноменов, и, что особенно важно, на региональном уровне.

Несмотря на наличие эффективных антимикробных препаратов, летальность от пневмококковых инфекций сохраняется на высоком уровне, составляя от 5-7% при пневмонии до 30% при менингитах (A. Pikis, et al., 1998), а экономические потери (прямые и косвенные) только от средних отитов превышают в США, например, 5 млрд. долларов в год (S. Dowell, et al., 1999). Анализируя имеющиеся цифры заболеваемости по отдельным видам этой патологии в Российской Федерации, можно предположить и наличие значительных экономических потерь отечественного бюджета.

Учитывая ведущую роль пневмококков в этиологии различных заболеваний, особенно у лиц до 2 лет и старше 65 лет, а также у пациентов с иммунологическими нарушениями, в последние годы значительные усилия были сконцентрированы на профилактике этой инфекции, и, в первую очередь, на создании поливалентных конъюгированных вакцин. Эти иммунобиологические препараты показали высокую эффективность в Западной Европе и США (S. Black, et al., 2000). Однако следует помнить, что без наличия эпидемиологических данных о циркулирующих в конкретной стране серотипов пневмококков, эффективность вакцин, доказанная в этих государствах, не может быть гарантировано достигнута в популяции других стран.

С учётом недостатков классического метода серотипирования пневмококков, в последнее десятилетие были разработаны более дискриминирующие методы типирования, в частности, гель-электрофорез в пульсирующем поле (PFGE), полимеразная цепная реакция (ПЦР) повторяющихся BOX-последовательностей (BOX-PCR), случайная амплификация полиморфной ДНК (RAPD) (P.W.M. Hermans, et al. 1995; A. van Belkum, et al. 1996).

Принимая во внимание относительно небольшую стоимость методов типирования на основе ПЦР, потенциально высокую разрешающую способность, внедрение их в рутинную практику, после проведения исследований дискриминационной информативности в локальных условиях представляется целесообразным и перспективным.

Таким образом, для повышения эффективности медико-профилактических мероприятий, представляется очевидной необходимость комплексного подхода к изучению и решению проблемы пневмококковых инфекций с учетом их микробиологических, клинических особенностей в различных возрастных и популяционных группах, а также современных данных об особенностях фармакокинетических и фармакодинамических характеристик антимикробных препаратов.

Цель исследования

Изучить, с применением современных методов фено-, гено- и серотипирования, циркулирующие в различных регионах России штаммы *S. pneumoniae*, их чувствительность к современным антимикробным препаратам и разработать на этой основе пути оптимизации мониторинга, профилактики и фармакотерапии пневмококковых инфекций.

Задачи исследования

1. Провести проспективное исследование назофарингеального носительства пневмококков в закрытых организованных коллективах различных федеральных округов России.
2. Создать и систематизировать на основе фено- и генотипических характеристик коллекцию клинических штаммов пневмококков, вызывающих инвазивные и неинвазивные инфекции в различных регионах России.
3. Определить чувствительность выделенных пневмококков к современным антимикробным препаратам и изучить механизмы резистентности к различным макролидам и фторхинолонам.
4. Оценить возможность использования различных методов молекулярно-генетического типирования для определения клонального родства циркулирующих в Российской Федерации пневмококков с целью улучшения мониторинга пневмококковых инфекций.

5. Определить серотипы репрезентативной выборки пневмококков, циркулирующих в Российской Федерации, для разработки критериев отбора пневмококковых вакцин.
6. Разработать пути оптимизации профилактики и фармакотерапии пневмококковых инфекций.

Основные положения, выносимые на защиту

1. Фенотипы резистентности к различным классам антимикробных препаратов существенно различаются не только в различных регионах, но и городах одного федерального округа.
2. Более низкая чувствительность пневмококков в детских домах по сравнению с клиническими штаммами и изолятами, выделенными в детских садах свидетельствует об их возможной роли как резервуаров резистентных клонов.
3. Разработка протоколов эмпирической, этиотропной терапии пневмококковых инфекций должна учитывать региональные тенденции резистентности с учётом фармакокинетических и фармакодинамических особенностей антимикробных препаратов.
4. Использование комбинации методов BOX-PCR и RAPD типирования пневмококков позволяет быстро и качественно выявлять циркуляцию близкородственных клонов пневмококков и на этой основе достоверно прогнозировать динамику антибиотикорезистентности.
5. Выявленная высокая степень корреляции циркулирующих у детей серотипов пневмококков с входящими в гептавалентную конъюгированную вакцину, позволяет рекомендовать ее включение в календарь профилактических прививок Российской Федерации.

Научная новизна

Впервые:

- Проведено многоцентровое проспективное исследование назофарингеального носительства пневмококков в закрытых организованных детских коллективах 19 различных регионов Российской Федерации.

- Организована система мониторинга клинических штаммов *S. pneumoniae*, вызывающих инвазивные и неинвазивные инфекции в 25 городах различных федеральных округов России.
- Определена чувствительность пневмококков к различным классам antimicrobных препаратов с помощью международно признанного метода - микроразведений в бульоне.
- Описаны новые механизмы резистентности к макролидам и фторхинолонам у пневмококков, циркулирующих в детских организованных коллективах азиатской и европейской частей России.
- Проведено сравнение дискриминационной информативности различных методов молекулярно-генетического типирования с определением и систематизацией генотипов циркулирующих в Российской Федерации пневмококков.
- Осуществлено серотипирование антибиотикорезистентных штаммов из различных регионов России и их систематизация для оценки перспективной возможности использования пневмококковых вакцин.

Практическая значимость работы

- Разработаны, на основе полученных фармакодинамических данных и с учетом фармакокинетических параметров исследованных antimicrobных препаратов, региональные рекомендации по оптимизации эмпирической и этиотропной терапии инвазивных и неинвазивных пневмококковых инфекций различной локализации.
- Организованный мониторинг antimicrobной резистентности пневмококков является одним из разделов работы Научно-методического центра Минздрава России по мониторингу антибиотикорезистентности.
- Созданная коллекция назофарингеальных и клинических штаммов необходима для оценки перспективности использования новых классов и групп antimicrobных препаратов в Российской Федерации.
- Полученные результаты являются основой создания научно-технической продукции по договору № 034/130/051 от 27 августа 2002 г. «Эпидемиологический и молекулярно-генетический мониторинг антибиотикорезистентности и совершенствование химиотерапии

бактериальных инфекций» в рамках отраслевой программы № 034 «Эпидемиология и микробиология».

- Полученные фармакодинамические данные по активности различных классов и групп антимикробных препаратов позволяют прогнозировать резистентность пневмококков, вызывающих средние отиты, синуситы, пневмонии, менингиты в организованных детских коллективах и разрабатывать мероприятия по профилактике этих инфекций.
- Данные по фенотипам и структуре резистентности *S. pneumoniae* в России включены в международный банк данных по антимикробной резистентности Всемирной Организации Здравоохранения.

Внедрение результатов работы

Результаты исследований, представленные в виде информационных писем, явились основой для разработки региональных рекомендаций по эмпирической терапии пневмококковых инфекций, которые используются в работе медико-профилактических учреждений гг. Анадыря, Волгограда, Воронежа, Владивостока, Екатеринбурга, Иркутска, Казани, Краснодара, Москвы, Нижнего Новгорода, Новосибирска, Санкт-Петербурга, Смоленска, Тюмени, Уфы, Хабаровска, Ханты-Мансийска, Челябинска, Якутска.

Результаты работы внедрены в учебный процесс кафедры микробиологии, клинической фармакологии, госпитальной педиатрии, педиатрии ФУВ, ЛОР-болезней Смоленской государственной медицинской академии: читаются специальные лекции и проводятся практические занятия для студентов и практических врачей различных специальностей.

Особенности клинического применения антимикробных препаратов с учетом полученных фармакодинамических данных были включены в обучающие программы V школы по антимикробной химиотерапии в рамках VII Российского национального конгресса «Человек и лекарство» (Москва, 2000) и VII школы для врачей по специальности «Антимикробная химиотерапия» в рамках X Российского национального конгресса «Человек и лекарство» (Москва, 2003).

Полученные результаты помещены на информационном Интернет-портале www.antibiotic.ru, функционирующим с 17 декабря 1999 г., который посетили более 14 миллионов пользователей, а также используются в

одобренном Министерством здравоохранения Российской Федерации постоянно действующем Интернет-курсе дистанционного последипломного образования «Антимикробная терапия в клинике внутренних болезней» <http://www.antibiotic.ru/rus/re/>.

Результаты исследований нашли отражение в методических рекомендациях: «Выделение, идентификация и определение чувствительности к антибиотикам *Streptococcus pneumoniae*» (Москва, 2000), «Современные методы клинической микробиологии» (выпуск I) (Смоленск, 2003); в пособиях для врачей: «Внебольничная пневмония у взрослых: практические рекомендации по диагностике, лечению и профилактике» (Москва, 2003), «Определение чувствительности пневмококков к антимикробным препаратам» (Смоленск, 2003); в монографиях: «Антибактериальная терапия: практическое руководство» (Москва, 2000), «Пневмония» (Москва, 2002), «Практическое руководство по антиинфекционной химиотерапии» (Москва, 2002).

Разработаны и внедрены в работу лаборатории молекулярной биологии НИИ антимикробной химиотерапии схемы типирования пневмококков с использованием фенотипических (серотипирование), генотипических (BOX-PCR и RAPD) методов; методы идентификации и скрининга резистентности к пенициллину в микробиологической лаборатории Центра госсанэпиднадзора в Смоленской области и бактериологических лабораторий Смоленской области.

В практику здравоохранения внедрены 2 рационализаторских предложения № 1224 «Устройство для гомогенизации и перемешивания бактериальных взвесей в микропробирках» и № 1227 «Устройство для моделирования гидродинамических условий в бактериальных средах», зарегистрированных БРИЗом Смоленской государственной медицинской академии, соответственно, 22 марта 1994 г. и 21 июня 1994 г.

Апробация материалов диссертации

Основные материалы работы были представлены и доложены на следующих конференциях, съездах, симпозиумах:

Всероссийской Юбилейной конференции РАМН (Москва, 1994); 2 European Congress of Chemotherapy and 7 Biennial Conference on Antiinfective Agents and Chemotherapy (Гамбург, 1998); 8 International Congress for Infectious Diseases (Бостон, 1998); Смоленских областных и городских конференциях для врачей

(2000, 2001, 2002); Заседаниях проблемной комиссии по иммунологии, иммуноморфологии и иммунопатофизиологии Смоленской государственной медицинской академии (2000; 2003); Региональной научно-практической конференции «Современные подходы к антибактериальной терапии респираторных инфекций в амбулаторной практике» (Тюмень, 2001); VIII Российском национальном конгрессе «Человек и лекарство» (Москва, 2001); Научно-практической конференции "Антибиотики в интенсивной терапии" (Краснодар, 2001); Краевом семинаре "Современные подходы к антибиотикотерапии" (Владивосток, 2001); 41 Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy (Чикаго, 2001); Научно-практической конференции по антимикробной терапии (Хабаровск, 2001); IV международной конференции Межрегиональной ассоциации по клинической микробиологии и антимикробной химиотерапии (МАКМАХ) «Антимикробная терапия» (Москва, 2001); Научно-практической конференции "Современные подходы к выделению, идентификации возбудителей респираторных инфекций. Принципы антибактериальной терапии" (Волгоград, 2001); Семинаре "Актуальные вопросы клинической микробиологии" (Санкт-Петербург, 2001); Семинаре "Современные проблемы клинической микробиологии" (Воронеж, 2001); Научно-практической конференции "Современные принципы рациональной антибиотикотерапии инфекций дыхательных путей" (Якутск, 2001); Конференции «Современные подходы к терапии распространённых бактериальных инфекций» (Челябинск, 2001); Семинаре "Вопросы выделения, идентификации и определения чувствительности респираторных патогенов" (Новосибирск, 2002); 6 International Conference for Macrolides, Azalides, Streptogramins, Ketolides and Oxazolidinones (Болонья, 2002); Семинаре "Современные проблемы клинической микробиологии" (Уфа, 2002); V международной конференции МАКМАХ "Антимикробная терапия" (Москва, 2002); Краевой научно-практической конференции "Современные подходы к антибиотикотерапии" (Анадырь, 2002); Областной научно-практической конференции "Антибактериальная терапия инфекций, развившихся в амбулаторных условиях" (Иркутск, 2002); 42 Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy (Сан-Диего, 2002); Конференции "Современная антибактериальная терапия: проблемы и решения" (Челябинск, 2003); 13 European Congress on Clinical Microbiology and Infectious Diseases

(Глазго, 2003); Научно-практической конференции «Резистентность микроорганизмов к антимикробным препаратам» (Минск, 2003); 1 FEMS Congress of European Microbiologists (Любляна, 2003); III международной конференции «Идеи Пастера в борьбе с инфекциями» (Санкт-Петербург, 2003); 43 Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy (Чикаго, 2003); 41 Infectious Diseases Society of America Meeting (Сан-Диего, 2003); V Российской конференции «Современные проблемы антимикробной химиотерапии» (Москва, 2003); 5 European Congress on Chemotherapy (Родос, 2003); Конференции и рабочем совещании врачей-бактериологов Центрального федерального округа (Смоленск, 2003); V съезде инфекционистов Республики Беларусь (Минск, 2003); совместном заседании сотрудников кафедр клинической фармакологии, микробиологии, госпитальной педиатрии, детских болезней факультета усовершенствования врачей, факультетской и поликлинической педиатрии с курсом пропедевтики детских болезней, терапии факультета усовершенствования врачей, нормальной физиологии, патологической физиологии, инфекционных болезней, фармакологии, акушерства и гинекологии, урологии, общей хирургии, бионеорганической химии, ЦНИЛ и НИИ антимикробной химиотерапии Смоленской государственной медицинской академии, микробиологической лаборатории ЦГСЭН в Смоленской области (Смоленск, 2003).

Публикации

По результатам выполненных исследований опубликовано 42 научные работы, полный список которых приведен в конце автореферата диссертации.

Структура и объем диссертации

Диссертационная работа изложена на 476 страницах машинописного текста и состоит из введения, обзора литературы, собственных исследований (4 главы), выводов, практических рекомендаций, приложения, указателя литературы, включающего 72 отечественных и 529 зарубежных источников. Текст иллюстрирован 49 таблицами и 169 рисунками.

Диссертация выполнялась по основному плану научно-исследовательских работ Смоленской государственной медицинской академии (номер государственной регистрации темы 01200106625).

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материалы и методы исследования

Исследование назофарингеального носительства пневмококков проводилось с использованием тампонов с альгинатом кальция на гибких алюминиевых стержнях (COPAN Diagnostics, Брешия, Италия).

После забора материала сразу производился посев площадкой на чашки Петри с 5% кровяным колумбийским агаром (bioMérieux, Марси л'Этуаль, Франция), содержащим гентамицин в концентрации 5 мг/л с последующим рассевом и инкубацией в течение 24 ч при температуре +35°C в атмосфере с повышенным (3–5%) содержанием CO₂.

Также исследовались клинические штаммы пневмококков, вызывающие неинвазивные и инвазивные инфекции в различных регионах России.

Идентификацию *S. pneumoniae* проводили на основании морфологии колоний, результатов окраски по Граму, чувствительности к оптохину (bioMérieux, Марси л'Этуаль, Франция) и пробирочного теста лизиса в присутствии 10% дезоксихолата натрия (Sigma, Ст. Луис, США).

Определение чувствительности *S. pneumoniae* методом микроразведений в бульоне Мюллера-Хинтон II (BBL Microbiology Systems, Кокейсвилл, США) проводилось к следующим препаратам: пенициллину, амоксициллину, ампициллину, амоксициллину/клавуланату, цефотаксиму, эритромицину, азитромицину, кларитромицину, миокамицину, клиндамицину, телитромицину, ципрофлоксацину, левофлоксацину, моксифлоксацину, гемифлоксацину, тетрациклину, ко-тримоксазолу, хлорамфениколу и ванкомицину.

Тестирование каждой партии пневмококков сопровождалось внутренним контролем качества с использованием референтного штамма *S. pneumoniae* ATCC 49619.

Репрезентативная выборка штаммов, выделенных в различных регионах, была исследована с помощью гель-электрофореза в пульсирующем поле

(PFGE), полимеразной цепной реакции (ПЦР) повторяющихся ВОХ-последовательностей (ВОХ-PCR) и случайной амплификации полиморфной ДНК (RAPD) для определения степени их генетического родства.

Для PFGE штаммы субкультивировали в бульоне Тодд-Хьюитта (BBL Microbiology Systems, Кокейвилл, США) с добавлением 5% дрожжевого экстракта (BBL Microbiology Systems, Кокейвилл, США) в течение 6 ч при температуре +37°C в атмосфере с повышенным содержанием (3–5%) CO₂.

Клеточный осадок, полученный путем центрифугирования 1,5 мл культуральной жидкости в течение 30 с при 21000 оборотов/мин., ресуспендировали в 150 мкл буфера Pett IV (10 mM Tris-HCL [pH 7,6], 1 M NaCl) с последующим нагреванием до +55°C. Идентичный объем 2% раствора агарозы Incert (FMC, Рокланд, США) в дистиллированной воде добавляли к подогретым клеткам. 100 мкл смеси клеток с агарозой вносили в шаблон и оставляли для застывания.

Полученные цилиндры инкубировали в течение 1 ч при +37°C в лизирующем буфере (6 mM Tris-HCL [pH 7,4], 1 M NaCl, 10 mM ЭДТА [pH 8,0], 0,2% дезоксихолата, 0,5% лауроилсаркозина натрия) с добавлением свежеприготовленных 0,5 мг/мл лизоцима (Sigma, Сент Луис, США) и 0,05 мг/мл лизостафина (Sigma, Сент Луис, США).

Затем лизирующий раствор заменяли на 300 мкл буфера ESP (10 mM Tris-HCL [pH 7,4], 1 mM ЭДТА, 1% додецилсульфата натрия), в который непосредственно перед использованием добавляли 8 ЕД/мл протеиназы К (Sigma, Сент Луис, США).

Цилиндры инкубировали в течение 20-24 ч при +55°C, затем трехкратно промывали 1 мл буфера TE (10 mM Tris-HCL [pH 7,4], 0,1 mM ЭДТА) и хранили в 1 мл TE при температуре +4°C.

Далее пневмококковую ДНК, находившуюся в агарозе, подвергали рестрикции с помощью 20 ЕД фермента *Sma*I (New England Biolabs, Беверли, США) в течение 6 ч при комнатной температуре.

Электрофорез проводили при напряженности электрического поля 6 В/см в течение 18 ч на приборе CHEF DR III (Bio-Rad, Геркулес, США).

В качестве контролей использовались штаммы французских/испанских пенициллинорезистентных клонов серотипов 9V, 14 и полирезистентного испанского/американского клона серотипа 23F.

Для ПЦР использовали коммерческие наборы Ready-To-Go RAPD Beads (Amersham Pharmacia Biotech, Уппсала, Швеция), к которым добавляли 21 мкл деионизированной, не содержащей экзогенной ДНК воды (Invitrogen Ltd., Пайсли, Великобритания), 2 мкл праймера VoxA: 5'-АТАСТСТТСГАААТСТСТТССАААС-3' (для VOX-PCR) или 2 мкл праймера M13-core: 5'-GAGGGTGGCGGTTCT-3' и 2 мкл супернатанта, содержащего ДНК (общий объем реакции – 25 мкл).

Аmplification проводили с помощью термоциклера DNA Engine PTC-200 (MJ Research, Уотертаун, США).

Фрагменты ДНК разделяли в 1,3% агарозе (PLIVA-Lachema a. s., Брно, Чешская Республика) при напряженности электрического поля 4 В/см в течение 3 ч. Гели окрашивали в растворе бромистого этидия (Bio-Rad, Геркулес, США) в концентрации 1 мкг/мл в течение 30 мин. и визуализировали с помощью системы фотодокументации гелей PhotoDoc-IT Link (UVP, Апленд, США).

Кластерный анализ полученных электрофоретических профилей проводили с использованием программы GelComp версии 4.1 (Applied Maths BVBA, Синт-Мартенс-Латем, Бельгия) на основе коэффициента корреляции Пирсона и метода невзвешенного попарного среднего (UPGMA).

Для оценки связи механизмов резистентности к хинолонам с мутациями в топоизомеразе IV и/или ДНК-гиразе, проводили ПЦР-амплификацию и секвенирование фрагментов генов *parC*, *parE*, *gyrA*, *gyrB* с помощью следующих пар праймеров:

- для *parE*: H4023, 5'-GTCAATCACAAAGGTTG-3' и обратный праймер M0361, 5'-TCCGACTCTAATTTCC-3';
- для *parC*: N6894, 5'-TGGGCTTTGTATCATATGTCTAAC-3' и обратный праймер N6893, 5'-TGGCATCAAGAGATGGTC-3';
- для *parE* и *parC*: G8394, 5'-TGAAGCGATTGAGTTCC-3' и обратный праймер M4721, 5'-TGCTGGCAAGACCGTTGG-3';
- для *gyrA*: VGA9, 5'-AAGTGAAGGCAAGGGCG -3' и обратный праймер VGA4, 5'-AGTTGCTCCATTAACCA-3';
- для *gyrB*: M4025, 5'-TTCTCCGATTTCTCATG и обратный праймер M4026, 5'-AGAAGGGTACGAATGTGG-3'.

Для определения механизмов резистентности к макролидам, проводили амплификацию генов *ermB* и *mefA* с помощью ПЦР и следующих пар праймеров:

- для *ermB*: 5'-GAAAARGTACTAACCAAATA-3' и 5'-AGTAAAYGGTACTTAAATTGTTTAC-3';
- для *mefA*: 5'-AGTATCATTAATCACTAGTGC-3' и 5'-CGTAATAGATGCAATCACAGC-3'.

Для *ermB*- и *mefA*-отрицательных макролидорезистентных штаммов дополнительно проводили амплификацию и секвенирование участков генов L4, L22 и 23S рРНК с помощью следующих пар праймеров:

- для L4: 5'-GTGCACGAGTGTCAACT-3' и обратный праймер 5'-GTTGTACAAGTTGTTCC-3'
- для L22: 5'-TGCACCAACTCGTACTT-3' и обратный праймер 5'-TCACGGATGATGCCGAC-3'
- для домена II 23S рРНК: 5'-CTCCCTAGTGACCGATA-3' и обратный праймер 5'-TACGGTGGACAGGATTC-3';
- для домена V 23S рРНК: 5'-TCAGCCGCAGTGAATAG-3' и обратный праймер 5'-GCCAGCTGAGCTACACCGCC-3'

Амплификацию проводили с помощью термоциклера DNA Thermal Cycler (Perkin-Elmer Cetus, Норволк, США). ПЦР продукты очищали с помощью набора QIAquick PCR purification kit (Qiagen, Валенсия, США) и подвергали секвенированию с помощью наборов CEQ DTCS и секвенатора CEQ8000 Genetic Analysis System (Beckman Coulter, Фуллертон, США).

Серотипирование резистентных штаммов проводили с помощью набора 14 пуловых, 25 типовых, 21 групповых и 64 факторных диагностических сывороток (Statens Serum Institut, Копенгаген, Дания).

Данные вводились в специально созданную в Майкрософт® Экссесс 2000 (Microsoft Corp., Рэдмонд, США) компьютерную базу данных. Все статистические тесты выполнялись с помощью пакета компьютерных программ SAS® версия 8.2 (SAS Institute Inc., Кэри, США), для 5% уровня статистической значимости. Дискретные данные представлены абсолютными и относительными частотами. Сравнение групп проводилось с использованием точного критерия Фишера.

Основные результаты работы и их обсуждение

За период с февраля 2001 г. по декабрь 2002 г. проведено обследование 4153 детей в возрасте до 7 лет из 91 дошкольного учреждения (80 детских садов и 11 детских домов) 19 городов Российской Федерации.

Согласно административно-территориальному делению России 11 городов находилось в европейской части (Волгоград, Воронеж, Екатеринбург, Казань, Краснодар, Москва, Нижний Новгород, Санкт-Петербург, Смоленск, Уфа, Челябинск) и 8 – в азиатской части (Анадырь, Владивосток, Иркутск, Новосибирск, Тюмень, Хабаровск, Ханты-Мансийск, Якутск) (рис. 1).



Рис. 1. Города, в которых проводилось исследование

Принимая во внимание существенные различия в эпидемиологической ситуации между детскими садами и детскими домами, представлялось целесообразным проведение отдельного анализа в зависимости от типа детского учреждения.

Детские сады

Исследование было проведено у 3540 детей из 80 детских садов с выделением 1745 штаммов (средняя частота носительства – 49,3%). В

азиатской части России обследовано 1553 ребенка, находившихся в 37 садах, от которых было выделено 835 штаммов со средней частотой колонизации 53,8% (диапазон от 38,5% до 68,8%). От 1987 детей, находившихся в 43 детских садах европейской части России, было выделено 910 пневмококков со средней частотой носительства 45,8% (диапазон от 25,0% до 72,2%).

Для оценки возможных различий в частоте резистентности пневмококков, выделенных в детских садах азиатской и европейской частях России, проводился статистический анализ, для которого штаммы с умеренной и высокой резистентностью были объединены в одну категорию «нечувствительные» (табл. 1).

Таблица 1. Сравнение результатов определения чувствительности штаммов, выделенных у детей из детских садов в азиатской и европейской частях России

| Антимикробный препарат | Азиатская часть | | | Европейская часть | | | p |
|-----------------------------|-----------------|------------|------------|-------------------|------------|------------|--------|
| | % УР (n) | % Р (n) | % НЧ (n) | % УР (n) | % Р (n) | % НЧ (n) | |
| Пенициллин | 13,7 (114) | 0,2 (2) | 13,9 (116) | 9,0 (82) | 0,6 (5) | 9,6 (87) | 0,006 |
| Амоксициллин | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | НЗ |
| Ампициллин | 0,2 (2) | 0 | 0,2 (2) | 0,9 (8) | 0 | 0,9 (8) | НЗ |
| Амоксициллин/ клавуланат | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | НЗ |
| Цефотаксим | 0,1 (1) | 0 | 0,1 (1) | 0,3 (3) | 0 | 0,3 (3) | НЗ |
| Эритромицин | 0,2 (2) | 4,7 (39) | 4,9 (41) | 0,6 (5) | 3,1 (28) | 3,7 (33) | 0,049 |
| Азитромицин | 0,5 (4) | 4,6 (38) | 5,1 (42) | 0,2 (2) | 3,2 (29) | 3,4 (31) | 0,01 |
| Кларитромицин | 0,6 (5) | 4,6 (38) | 5,2 (43) | 0,9 (8) | 1,9 (17) | 2,8 (25) | 0,001 |
| Миокамицин | 0,1 (1) | 2,1 (17) | 2,2 (18) | 0,3 (3) | 1,1 (10) | 1,4 (13) | НЗ |
| Клиндамицин | 0,1 (1) | 2,2 (18) | 2,3 (19) | 0 | 0,8 (7) | 0,8 (7) | 0,005 |
| Телитромицин | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | НЗ |
| Ципрофлоксацин | 2,2 (18) | 0 | 2,2 (18) | 1,8 (16) | 0 | 1,8 (16) | НЗ |
| Левифлоксацин | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | НЗ |
| Моксифлоксацин | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | НЗ |
| Гемифлоксацин | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | НЗ |
| Тетрациклин | 5,2 (43) | 48,0 (401) | 53,2 (444) | 3,9 (35) | 38,8 (353) | 42,7 (388) | <0,001 |
| Ко-тримоксазол | 43,7 (365) | 22,3 (186) | 66,0 (551) | 39,5 (359) | 21,0 (191) | 60,5 (550) | 0,017 |
| Хлорамфеникол | 0 | 10,9 (91) | 10,9 (91) | 0 | 6,5 (59) | 6,5 (59) | 0,001 |
| Ванкомицин | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | НЗ |

Сокращения: УР – умереннорезистентный штамм, Р – резистентный штамм, НЧ – нечувствительный штамм; НЗ – статистически не значимые различия

Как видно из представленных данных, статистически значимая ($p < 0,05$) большая частота встречаемости нечувствительных к пенициллину, эритромицину, азитромицину, кларитромицину, клиндамицину, тетрациклину, хлорамфениколу и ко-тримоксазолу была определена среди пневмококков, выделенных в азиатской части России. Для остальных антимикробных препаратов распространенность резистентности в азиатской и европейской частях России значимо не различалась ($p > 0,05$).

В целом следует отметить, что среди β -лактамных антибиотиков, к амоксициллину и амоксициллину/клавуланату не было выявлено снижения чувствительности, что свидетельствует об их более высокой активности по сравнению с ампициллином.

Сравнительно высокой активностью обладал цефотаксим, к которому 4 штамма обладали умеренной резистентностью (1 – в азиатской части и 3 – в европейской).

Макролидные антибиотики с 14- и 15-членной структурой имели сравнительно высокую *in vitro* активность в отношении исследованных штаммов с общим уровнем нечувствительности менее 6%.

Следует также отметить более высокую активность 16-членных макролидов (миокамицина) и линкозамидов (клиндамицина) (общая частота умереннорезистентных и резистентных штаммов $< 2,5\%$), что, возможно, свидетельствует о M-фенотипе резистентности (механизме активного выброса). Кетолиды (телитромицин) обладали высокой активностью: снижения чувствительности к ним не было обнаружено у штаммов в азиатской и европейской частях.

Определенную тревогу вызывает наличие штаммов со сниженной чувствительностью к ципрофлоксацину (18 – в азиатской и 16 – в европейской частях), что является первым шагом к появлению высокорезистентных пневмококков. Принимая во внимание, что фторхинолоны не разрешены к широкому применению у детей, данный феномен может свидетельствовать о диссеминации клона, циркулирующего у взрослых.

Важным фактом является сохранение чувствительности этих штаммов к левофлоксацину, моксифлоксацину и гемифлоксацину.

Высокий уровень (>40%) циркуляции нечувствительных к тетрациклину и ко-тримоксазолу штаммов свидетельствует о снижении роли этих антибиотиков в качестве препаратов эмпирической терапии пневмококковых инфекций.

Резистентность к хлорамфениколу находится на уровне, не превышающим 11%, что в целом позволяет рассматривать данный препарат как альтернативу цефалоспорином III поколения для лечения пневмококковых менингитов, однако только в регионах со сравнительно невысокой частотой нечувствительных к пенициллину штаммов.

Ванкомицин обладал высокой *in vitro* активностью в отношении исследованных штаммов. Независимо от географического расположения, снижения чувствительности к этому препарату выявлено не было.

Детские дома

Исследование было проведено у 613 детей из 11 детских домов в 8 городах с выделением 311 штаммов (средняя частота носительства – 50,7%).

В азиатской части России обследовано 116 детей, находившихся в 3 детских домах, от которых было выделено 77 штаммов со средней частотой колонизации 66,4% (диапазон от 11,1% до 86,7%).

От 497 детей, находившихся в 8 детских домах европейской части России, было выделено 234 пневмококка со средней частотой носительства 47,1% (диапазон от 32,4% до 63,2%).

Для оценки статистической значимости различий в частоте резистентности пневмококков, выделенных в детских домах азиатской и европейской частей России, был проведен анализ с объединением штаммов с умеренной и высокой резистентностью в одну категорию - «нечувствительные» (табл. 2).

Как видно из представленных данных, статистически значимая ($p < 0,05$) большая частота встречаемости нечувствительных к пенициллину, ампициллину и клиндамицину была определена среди пневмококков из европейской части России. В то же время, распространенность резистентности к хлорамфениколу и ко-тримоксазолу была достоверно выше в азиатской части. Для остальных антимикробных препаратов доля нечувствительных изолятов в азиатской и европейской частях России значимо не различалась ($p > 0,05$).

Таблица 2. Сравнение результатов определения чувствительности штаммов, выделенных у детей из детских домов в азиатской и европейской частях России

| Антимикробный препарат | Азиатская часть | | | Европейская часть | | | p |
|-----------------------------|-----------------|-----------|-----------|-------------------|------------|------------|--------|
| | % УР (n) | % Р (n) | % НЧ (n) | % УР (n) | % Р (n) | % НЧ (n) | |
| Пенициллин | 33,8 (26) | 9,1 (7) | 42,9 (33) | 53,0 (124) | 15,8 (37) | 68,8 (161) | 0,0001 |
| Амоксициллин | 1,3 (1) | 0 | 1,3 (1) | 2,1 (5) | 0,4 (1) | 2,5 (6) | НЗ |
| Ампициллин | 3,9 (3) | 2,6 (2) | 6,5 (5) | 23,1 (54) | 6,0 (14) | 29,1 (68) | 0,0001 |
| Амоксициллин/ клавуланат | 1,3 (1) | 0 | 1,3 (1) | 3,0 (7) | 0,4 (1) | 3,4 (8) | НЗ |
| Цефотаксим | 2,6 (2) | 0 | 2,6 (2) | 5,1 (12) | 0 | 5,1 (12) | НЗ |
| Эритромицин | 0 | 16,9 (13) | 16,9 (13) | 0,4 (1) | 23,5 (55) | 23,9 (56) | НЗ |
| Азитромицин | 1,3 (1) | 16,9 (13) | 18,2 (14) | 0,4 (1) | 23,9 (56) | 24,3 (57) | НЗ |
| Кларитромицин | 0 | 18,2 (14) | 18,2 (14) | 0,9 (2) | 22,2 (52) | 23,1 (54) | НЗ |
| Миокамицин | 5,2 (4) | 7,8 (6) | 13,0 (10) | 0,9 (2) | 20,9 (49) | 21,8 (51) | НЗ |
| Клиндамицин | 1,3 (1) | 6,5 (5) | 7,8 (6) | 0 | 18,4 (43) | 18,4 (43) | 0,02 |
| Телитромицин | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | НЗ |
| Ципрофлоксацин | 1,3 (1) | 0 | 1,3 (1) | 1,3 (3) | 0 | 1,3 (3) | НЗ |
| Левифлоксацин | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | НЗ |
| Моксифлоксацин | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | НЗ |
| Гемифлоксацин | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | НЗ |
| Тетрациклин | 2,6 (2) | 77,9 (60) | 80,5 (62) | 2,1 (5) | 73,1 (171) | 75,2 (176) | НЗ |
| Ко-тримоксазол | 31,2 (24) | 59,7 (46) | 90,9 (70) | 37,6 (88) | 29,1 (68) | 66,7 (156) | 0,0001 |
| Хлорамфеникол | 0 | 28,6 (22) | 28,6 (22) | 0 | 15,8 (37) | 15,8 (37) | 0,02 |
| Ванкомицин | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | НЗ |

Сокращения: УР – умереннорезистентный штамм, Р – резистентный штамм, НЧ – нечувствительный штамм; НЗ – статистически не значимые различия

В целом следует отметить, более высокую по сравнению с детскими садами нечувствительность к пенициллину в азиатской и европейской частях России, превышающую 40%. Среди β -лактамных антибиотиков, амоксициллин и амоксициллин/клавуланат обладали самой высокой активностью: к ним обнаруживался только 1 резистентный штамм (в европейской части), а частота умереннорезистентных штаммов не превышала 3%. Сравнительно высокой активностью обладал цефотаксим, к которому обнаруживались только умереннорезистентные штаммы (2 – в азиатской части и 12 – в европейской).

Активность 14- и 15-членных макролидов значительно снижена в отношении штаммов, выделенных в детских домах азиатской и европейской частях России, с общим уровнем нечувствительности более 15%. Однако, были выявлены существенные различия в резистентности к 16-членным макролидам и линкозамидам пневмококков. Так, например, нечувствительность к миокамицину и клиндамицину составила, соответственно, 13,0% и 7,8% в азиатской и 21,8% и 18,4% в европейской части, достигнув статистической значимости к клиндамицину. Это свидетельствует о различиях в циркулирующих популяциях макролидорезистентных изолятов с преобладанием M-фенотипа в азиатской и MLS_B-фенотипа в европейской части. Кетолиды (телитромицин) обладали высокой *in vitro* активностью независимо от фенотипов резистентности к макролидам.

Распространенность штаммов со сниженной чувствительностью к ципрофлоксацину сравнительно невелика (1 – в азиатской и 3 – в европейской частях), что свидетельствует о спорадической циркуляции подобных изолятов. Все исследованные пневмококки сохраняли чувствительность к левофлоксацину, моксифлоксацину и гемифлоксацину.

Очень высокий уровень (>65%) циркуляции нечувствительных к тетрациклину и ко-тримоксазолу изолятов с преобладанием штаммов с высоким уровнем резистентности свидетельствует о циркуляции высокорезистентных клонов в азиатской и европейской частях России.

Резистентность к хлорамфениколу превышает 15% и в азиатской, и в европейской частях, что, наряду с преобладанием пенициллинонечувствительных штаммов, не позволяет рассматривать данный препарат в качестве адекватной альтернативы для лечения бактериальных менингитов.

Ванкомицин обладал высокой *in vitro* активностью в отношении всех исследованных штаммов. Независимо от географического расположения, снижения чувствительности к этому препарату выявлено не было.

Механизмы резистентности к макролидам

Механизмы резистентности к макролидам были изучены у 40 и 25 пневмококков, соответственно, из азиатской и европейской частей России (табл. 3).

Таблица 3. Механизмы резистентности к макролидам пневмококков, выделенных в азиатской и европейской частях России

| Механизм резистентности | Азиатская часть | | | Европейская часть | | |
|-------------------------|-----------------|--|-----------------|-------------------|--|---------------|
| | Число штаммов | Мутация | | Число штаммов | Мутация | |
| | | Вид | Число штаммов | | Вид | Число штаммов |
| <i>ermB</i> | 16 ¹ | | | 14 | | |
| <i>mefA</i> | 4 ¹ | | | 6 | | |
| Мутации L4 | 7 | ⁶⁹ GTG ₇₁ → ⁶⁹ TPS ₇₁ | 3 ² | 5 | ⁶⁹ GTG ₇₁ → ⁶⁹ TPS ₇₁ | 4 |
| | | S ₂₀ N | 4 ² | | S ₂₀ N | 1 |
| Мутации L22 | 16 | E ₃ K | 1 | 0 | E ₃ K | 0 |
| | | K ₈ I | 15 ² | | K ₈ I | 0 |
| Мутации 23S рРНК | 2 | A ₁₉₈₀ G | 1 ³ | 0 | A ₁₉₈₀ G | 0 |
| | | G ₂₁₄₆ A | 1 ³ | | G ₂₁₄₆ A | 0 |
| Новый (неизвестный) | 1 | | | 0 | | |

¹ у 20 штаммов показано наличие генов *ermB/mefA*

² у 4 штаммов отмечались мутации и в L4, и в L22

³ у 2 штаммов отмечались мутации и в L22, и в 23S рРНК

На основании представленных данных, можно сделать вывод о наличии сходства механизмов резистентности к макролидам у штаммов, циркулирующих в различных частях России. Так, соответственно, 40% и 56% пневмококков, соответственно, в азиатской и европейской частях, обладали геном *ermB*, обуславливающим MLS_B-фенотип.

Также показана циркуляция штаммов с *mefA* геном (M-фенотип), на долю которых приходится 10% и 24% в азиатской и европейской частях и изолятов с мутациями белка L4 (17,5% и 20%).

В то же время, имеются и существенные различия в механизмах резистентности. Мутации в белке L22 и 23S рРНК определяются только у пневмококков из азиатской части России, причем, у 4 штаммов выявлялись комбинированные изменения L4 и L22, а ещё у 2 – L22 и 23S рРНК.

Уникальной особенностью является наличие у 1 изолята из азиатской части нового, ранее не описанного механизма резистентности.

Механизмы резистентности к хинолонам

Механизмы резистентности к хинолонам были изучены у 30 пневмококков (по 15 из азиатской и европейской частей России) (табл. 4).

Таблица 4. Механизмы резистентности к хинолонам пневмококков, выделенных в азиатской и европейской частях России

| Механизм резистентности | Азиатская часть | | | Европейская часть | | |
|-------------------------|-----------------|--------------------------|-----------------|-------------------|--------------------|---------------|
| | Число штаммов | Мутация | | Число штаммов | Мутация | |
| | | Вид | Число штаммов | | Вид | Число штаммов |
| <i>gyrA</i> | 1 | A ₁₄₉ G | 1 ¹ | 0 | A ₁₄₉ G | 0 |
| <i>gyrB</i> | 0 | | | 0 | | |
| <i>parC</i> | 3 | K ₁₃₇ N | 3 ² | 3 | K ₁₃₇ N | 3 |
| <i>parE</i> | 15 | V ₄₆₀ A | 2 | 5 | I ₄₆₁ A | 5 |
| | | I ₄₆₁ V или A | 15 ² | | | |
| | | A ₄₆₆ D | 1 | | | |
| | | V ₄₈₈ A | 1 | | | |
| Новый (неизвестный) | 0 | | | 8 | | |

¹ - 1 штамм имел мутацию в *gyrA*, *parC* и *parE*

² - 3 штамма обладали комбинированными мутациями в *parC* и *parE*

На основании представленных данных, можно сделать вывод о наличии определенного сходства механизмов резистентности к хинолонам у штаммов, циркулирующих в различных частях России.

Так, в азиатской и европейской частях отсутствуют пневмококки с мутациями в гене *gyrB* и по 20% приходится на долю изолятов с измененным *parC*.

В то же время, отмечаются и значительные различия. Так в азиатской части преобладают штаммы с изменениями в *parE* (93,3%), а в европейской – с неизвестным механизмом (53,3%).

В азиатской части также показана циркуляция пневмококков с измененным *gyrA* при отсутствии подобных изолятов в европейской части.

Молекулярно-генетический анализ циркулирующих штаммов

Репрезентативная выборка штаммов, циркулирующих в европейской и азиатской частях России, была исследована методом геле-электрофореза в пульсирующем поле (PFGE).

На рис. 2 представлены результаты PFGE для исследованных пневмококков из азиатской части России.

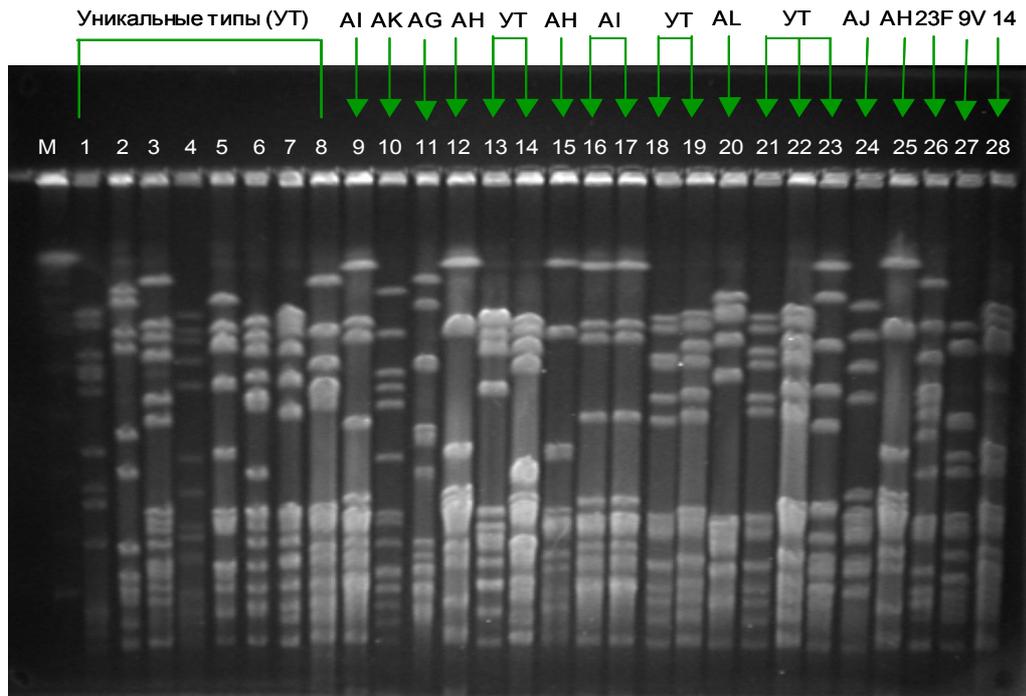


Рис. 2. PFGE-типы штаммов, циркулирующих в азиатской части России

Среди 55 резистентных штаммов, подвергнутых типированию, было выявлено 35 различных PFGE-типов. Наиболее часто определяемыми типами были АК, АГ и АН, к которым принадлежали 7, 6 и 6 штаммов, соответственно. Типы АІ, АЈ и АL характеризовали, соответственно, 3, 2 и 2 пневмококка. Оставшиеся 29 штаммов имели уникальные PFGE-типы.

На рис. 3 представлены результаты PFGE для исследованных пневмококков из европейской части России.

Среди 54 резистентных штаммов, подвергнутых типированию, было выявлено 40 различных PFGE-типов. Наиболее часто определяемыми типами были ЕF, ЕD и ЕН к которым принадлежали, соответственно, 5, 4 и 3 штамма.

Каждый из типов EA, EB, EC, EE и EG характеризовали по 2 пневмококка. Оставшиеся 32 штамма имели уникальные PFGE-типы.

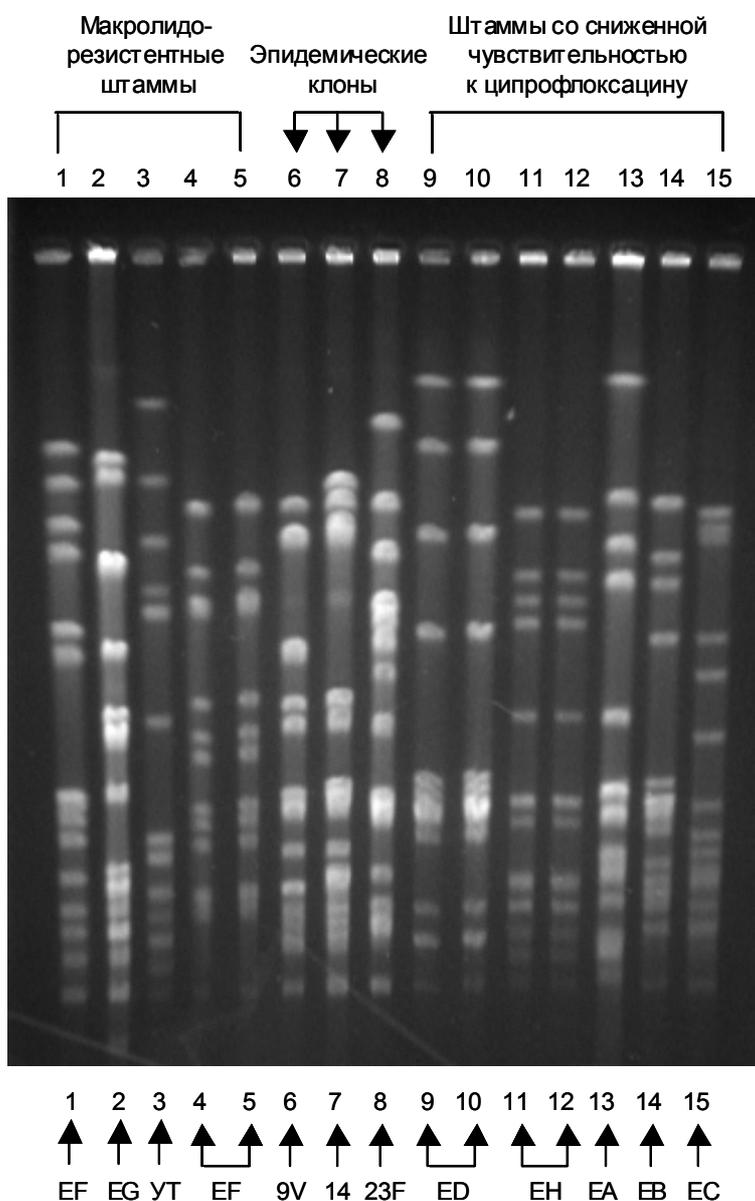


Рис. 3. PFGE-типы штаммов, циркулирующих в европейской части России

Для определения возможного генетического родства 52 пенициллинорезистентных штамма были исследованы с помощью методов случайной амплификации полиморфной ДНК (RAPD) и ПЦР повторяющихся BOX-последовательностей (BOX-PCR).

Кластерный анализ полученных электрофоретических профилей, позволил выявить 8 групп клонально родственных изолятов (рис. 4).

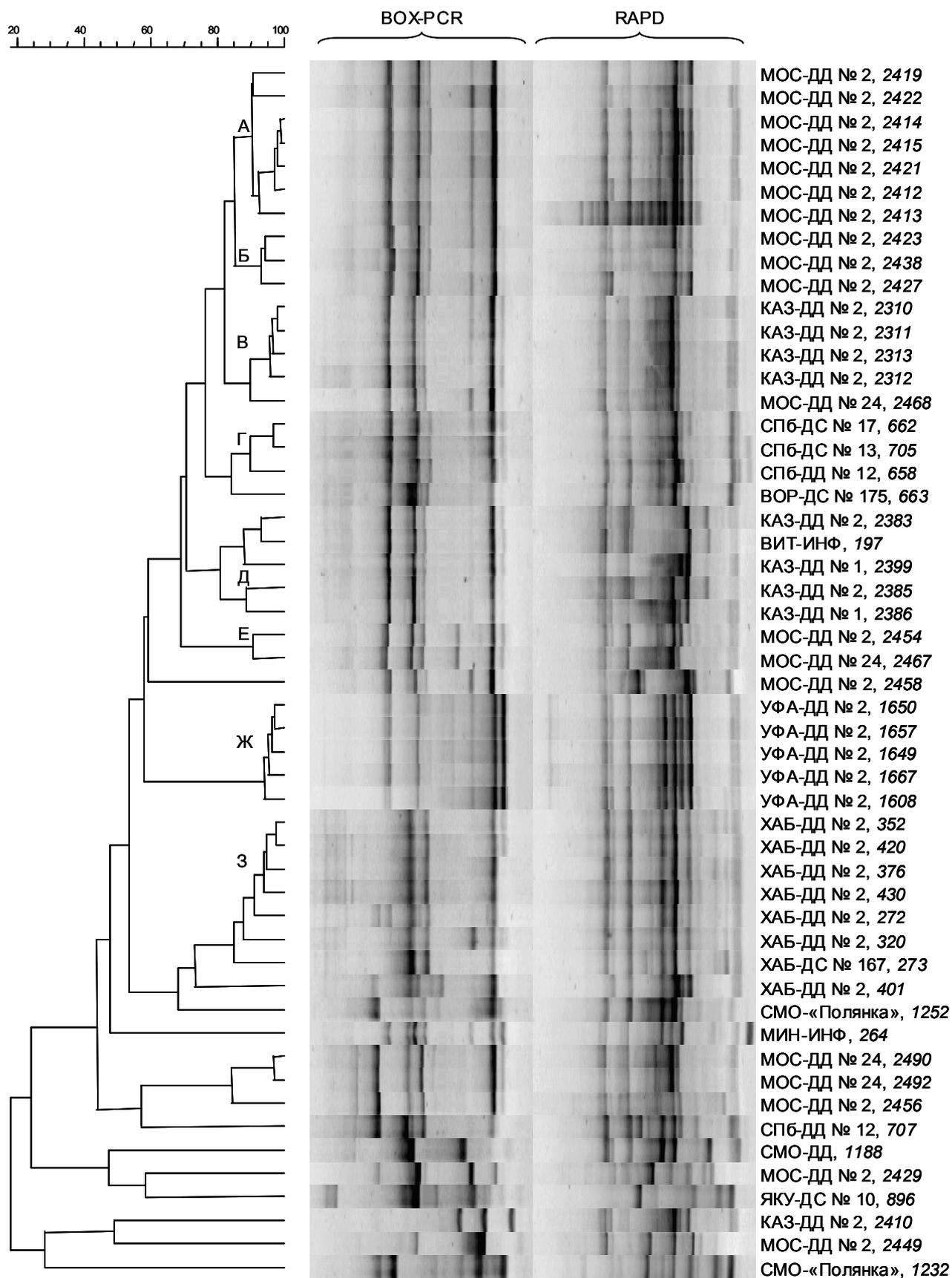


Рис. 4. Дендрограмма генетического родства штаммов на основе комбинированного анализа результатов RAPD и BOX-PCR

Первая из них (А) характеризует исключительно штаммы, циркулирующие в детском доме № 2 Москвы (изоляты 2412, 2413, 2414, 2415, 2419, 2421, 2422). Вторая (Б) также представлена пневмококками из детского дома № 2 Москвы (2423, 2427, 2438). Третья (В) включает изоляты из детских домов № 2 Казани (штаммы 2310, 2311, 2312, 2313) и № 24 Москвы (2468). Четвертая (Г) представлена пневмококками, циркулирующими в детских садах № 12 (штамм 658), № 13 (705), № 17 (662) Санкт-Петербурга и № 175 (663) Воронежа. Пятая (Д) включает штаммы, циркулирующие в детских домах № 1 (2386, 2399) и № 2 (2383, 2385) Казани. Шестая (Е) характеризует пневмококки из детских домов № 2 (2454) и № 24 (2467) Москвы. Седьмая (Ж) представлена исключительно изолятами из детского дома № 2 Уфы (1608, 1649, 1650, 1657, 1667). В восьмую (З) входят штаммы, циркулирующие в детском доме № 2 Хабаровска (№№ 272, 320, 352, 376, 420, 430).

Следует также отметить сходство электрофоретических профилей, характеризующих кластеры А, Б, В, Г, Д и Е (коэффициент корреляции Пирсона $\geq 65\%$), которое указывает на возможность наличия генетического родства между всеми входящими в них изолятами.

На основании представленных данных можно сделать вывод о доминировании резистентных клонов, в основном, в пределах одного детского учреждения. Принимая во внимание сходство кластерных групп, объединяющих штаммы из разных регионов, можно предположить их происхождение от единого резистентного штамма.

Сопоставление результатов PFGE, RAPD и BOX-PCR исследуемых штаммов показывает наличие сходных результатов и указывает на возможность использования указанных ПЦР-методов типирования пневмококков для определения их возможного генетического родства.

При этом следует отметить, что использование методов RAPD и BOX-PCR в комбинации позволяет существенно повысить разрешающую способность типирования.

Учитывая, что стоимость типирования 1 штамма с помощью PFGE составляет около 600 рублей, а комбинации RAPD и BOX-PCR - 300 рублей, очевидны и экономические преимущества использования последних.

Серотипы резистентных штаммов

Для оценки перспектив использования конъюгированных пневмококковых вакцин, было проведено серотипирование 109 резистентных изолятов, выделенных в европейской (54 штамма) и азиатской (55) частях России (рис. 5).

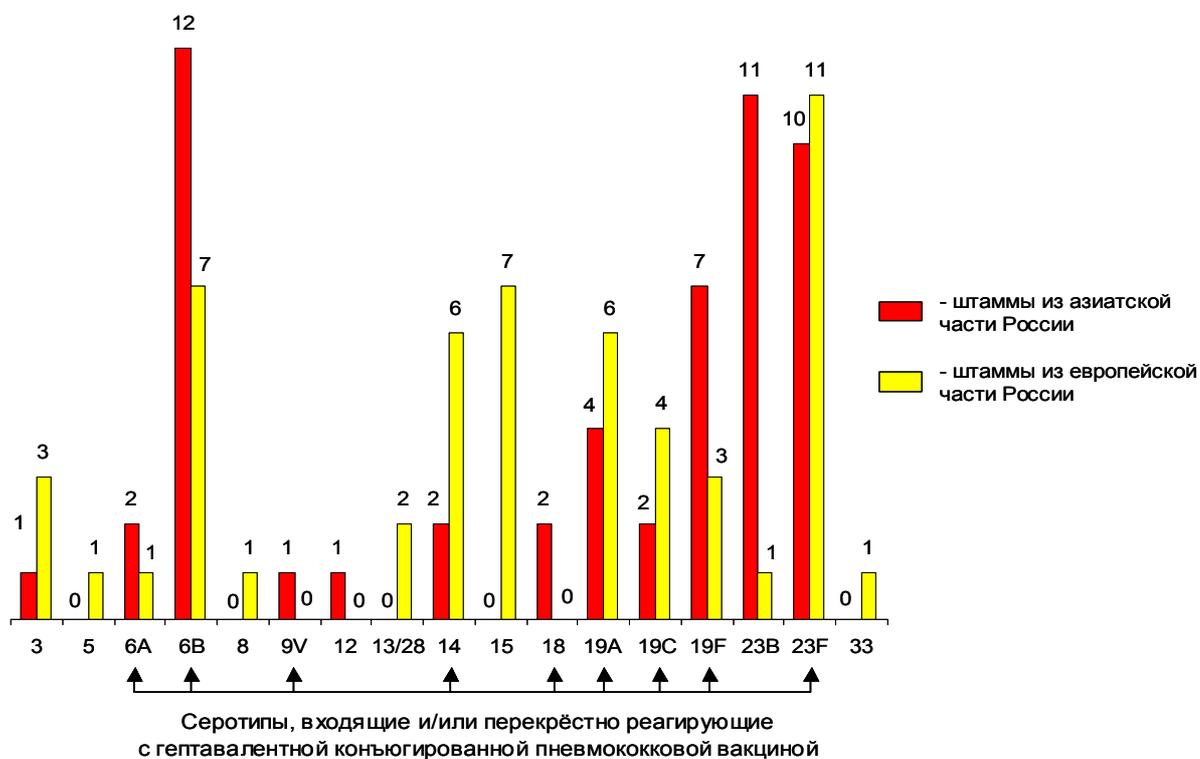


Рис. 5. Серотипы резистентных пневмококков, циркулирующих в детских учреждениях европейской и азиатской частей России

Как видно из представленного рисунка, преобладающим в азиатской части были штаммы серотипа 23, 6 и 19, на долю которых приходилось, соответственно, 38,2%, 25,5% и 23,6%.

В европейской части также доминировали пневмококки серотипа 19, 23 и 6, процент которых составил, соответственно, 24,1%, 22,2% и 14,8%.

В тоже время, были выявлены определенные географические различия в спектре циркулирующих серотипов. Так, например, в азиатской части не встречались штаммы, относящиеся к 5, 8, 13/28, 15 и 33, а в европейской - к 9V, 12 и 18 серотипам.

Важнейшей особенностью является то, что на долю пневмококков с серотипами, входящими в состав и/или перекрестно реагирующими с

гептавалентной конъюгированной пневмококковой вакциной, приходится от 72,2% в европейской до 96,4% в азиатской частях России, в среднем составляя 84,4%.

Данный факт свидетельствует о возможных преимуществах включения данной вакцины в календарь профилактических прививок, используемый в Российской Федерации.

Мониторинг клинических штаммов

Многоцентровое проспективное исследование клинических штаммов (ПеГАС-I) было разделено на 2 этапа.

Фаза «А», в которой было выделено 210 штаммов, была проведена в 1999-2000 гг. с включением 15 центров Центрального (Москва (5 центров), Рязань, Смоленск), (Санкт-Петербург (2 центра)), Приволжского (Казань, Нижний Новгород), Южного (Краснодар) Уральского (Екатеринбург) и Сибирского федеральных округов (Новосибирск, Томск).

В фазе «Б» (2001-2003 гг.), в которой был получен 581 штамм, участвовали 25 центров Центрального (Ковров, Москва (3 центра), Рославль, Рязань, Смоленск, Ярославль, Ярцево), Северо-западного (Санкт-Петербург (2 центра)), Приволжского (Казань, Нижний Новгород, Уфа), Южного (Краснодар, Ставрополь), Уральского (Екатеринбург, Тюмень, Челябинск), Сибирского (Иркутск, Новокузнецк, Новосибирск, Томск) и Дальневосточного (Якутск) федеральных округов.

Сравнение резистентности по федеральным округам (1999-2003 гг.)

Для определения динамики резистентности, был проведен фармакодинамический анализ по различным классам и группам антимикробных препаратов.

Распространённость умереннорезистентных и резистентных к антимикробным препаратам штаммов за период с 1999 по 2003 гг. в различных федеральных округах представлены в табл. 5.

β-Лактамы

В целом, следует отметить, что нечувствительность к этому классу антимикробных препаратов находится на сравнительно низком уровне.

Таблица 5. Резистентность *S. pneumoniae* к антимикробным препаратам в различных федеральных округах России (данные 1999-2003 гг.)

| Антибиотик | Дальневосточный федеральный округ (n = 9) | | Приволжский федеральный округ (n = 45) | | Уральский федеральный округ (n = 56) | | Центральный федеральный округ (n = 361) | | Северо-западный федеральный округ (n = 26) | | Сибирский федеральный округ (n = 242) | | Южный федеральный округ (n = 52) | |
|-----------------------------|---|------|--|------|--------------------------------------|------|---|------|--|------|---------------------------------------|------|----------------------------------|------|
| | УР, % | Р, % | УР, % | Р, % | УР, % | Р, % | УР, % | Р, % | УР, % | Р, % | УР, % | Р, % | УР, % | Р, % |
| Пенициллин | 11,1 | 0 | 13,3 | 0 | 7,1 | 0 | 5,3 | 3,3 | 7,7 | 0 | 10,7 | 0,8 | 9,6 | 1,9 |
| Амоксициллин | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0,4 | 0 | 0 |
| Амоксициллин/ клавуланат | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0,4 | 0 | 0 |
| Цефотаксим | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0,3 | 0 | 0 | 0 | 0,8 | 0 | 0 | 0 |
| Эритромицин | 0 | 0 | 0 | 4,4 | 0 | 3,6 | 0,3 | 11,4 | 0 | 15,4 | 0 | 4,1 | 0 | 9,6 |
| Азитромицин | 0 | 0 | 0 | 4,4 | 0 | 3,6 | 0,6 | 10,8 | 0 | 15,4 | 0,4 | 3,7 | 1,9 | 7,7 |
| Кларитромицин | 0 | 0 | 2,2 | 2,2 | 0 | 3,6 | 0,6 | 10,8 | 0 | 15,4 | 0 | 3,7 | 1,9 | 7,7 |
| Миокамицин | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1,8 | 1,1 | 6,1 | 0 | 15,4 | 0 | 0,4 | 0 | 0 |
| Клиндамицин | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1,8 | 0,3 | 5,0 | 0 | 15,4 | 0 | 0,4 | 0 | 0 |
| Телитромицин | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Тетрациклин | 0 | 44,4 | 0 | 28,9 | 1,8 | 22,4 | 3,1 | 25,8 | 0 | 19,2 | 2,5 | 24,4 | 1,9 | 21,2 |
| Ципрофлоксацин | 0 | 0 | 6,7 | 0 | 0 | 0 | 1,9 | 0,3 | 7,7 | 0 | 3,7 | 0,4 | 1,9 | 0 |
| Левифлоксацин | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Хлорамфеникол | 0 | 0 | 0 | 6,7 | 0 | 5,4 | 0 | 8,6 | 0 | 3,9 | 0 | 7,0 | 0 | 11,5 |
| Ко-тримоксазол | 55,6 | 0 | 37,8 | 11,1 | 28,6 | 1,8 | 27,7 | 3,3 | 11,5 | 11,5 | 19,8 | 6,6 | 36,5 | 11,5 |
| Ванкомицин | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |

УР – умереннорезистентные штаммы

Р – резистентные штаммы

Частота умереннорезистентных и резистентных к пенициллину штаммов варьирует от 7,1% в Уральском до 13,3% в Приволжском федеральном округе при отсутствии статистически значимых различий между регионами.

Фармакодинамические преимущества амоксициллина и его комбинации с ингибитором β -лактамаз по сравнению с пенициллином проявляются в более высокой чувствительности к этой группе препаратов с выделением только 1 высокорезистентного штамма в Сибирском федеральном округе в 1999 г. при отсутствии изолятов со сниженной чувствительностью в других регионах.

Цефотаксим также обладал более высокой *in vitro* активностью в отношении исследованных пневмококков, причём выделялись только 3 умереннорезистентных штамма: один - в Центральном и два – в Сибирском федеральном округе.

Статистически значимых региональных различий в уровне резистентности к аминопенициллинам и цефалоспоринам III поколения выявлено не было.

Макролиды, линкозамиды и кетолиды

В общем, необходимо отметить наличие существенных региональных различий в резистентности к макролидам и линкозамидам.

Частота нечувствительных к 14- и 15-членным макролидам штаммов значимо выше в Северо-Западном ($p=0,04$; 0,04 и 0,03 для эритромицина, азитромицина и кларитромицина) и Центральном (p , соответственно, 0,001; 0,002 и $<0,001$) федеральных округах по сравнению с Сибирским при отсутствии статистически значимых различий между другими регионами.

Ситуация имеет более комплексный характер для 16-членных макролидов и линкозамидов.

Так, значимо более высокая нечувствительность к миокамицину выявлена в следующих федеральных округах: Приволжском в сравнении с Северо-западным ($p=0,02$); Северо-западном – с Сибирским ($p<0,001$), Уральским ($p=0,03$), Южным ($p=0,01$); Центральном – с Сибирским ($p<0,001$).

Более высокая нечувствительность к клиндамицину была определена в следующих федеральных округах: Приволжском в сравнении с Северо-западным ($p=0,02$); Северо-западном – с Сибирским ($p<0,001$), Уральским ($p=0,03$), Южным ($p=0,01$); Центральном – с Сибирским ($p<0,001$).

Статистически значимых различий в нечувствительности к миокамицину и клиндамицину между другими регионами выявлено не было.

Пневмококков со сниженной чувствительностью к телитромицину ни в одном федеральном округе не обнаружено.

Фторхинолоны

Частота штаммов со сниженной чувствительностью к ципрофлоксацину варьирует от 0% в Дальневосточном федеральном округе до 7,7% - в Северо-западном при отсутствии статистически значимых региональных различий.

Умереннорезистентных или резистентных к левофлоксацину пневмококков ни в одном регионе выявлено не было.

Тетрациклин, ко-тримоксазол, хлорамфеникол и гликопептиды

Распространенность штаммов со сниженной чувствительностью к тетрациклину варьирует от 19,2% в Северо-западном федеральном округе до 44,4% - в Дальневосточном при отсутствии статистически значимых региональных различий.

Нечувствительные к ко-тримоксазолу пневмококки выделялись значимо более часто в следующих федеральных округах: в Приволжском в сравнении с Северо-западным ($p=0,04$), Сибирским ($p=0,004$), Центральным ($p=0,02$); Северо-западном – с Южным ($p<0,05$); Южном – с Сибирским ($p=0,004$) и Центральным ($p=0,02$). Сравнительный анализ частот нечувствительности между другими регионами достоверных различий не выявил.

Частота встречаемости штаммов со сниженной чувствительностью к хлорамфениколу варьирует от 0% в Дальневосточном федеральном округе до 11,5% - в Южном при отсутствии статистически значимых региональных различий.

Пневмококков со сниженной чувствительностью к ванкомицину ни в одном федеральном округе обнаружено не было.

Суммируя вышесказанное, следует отметить, что при анализе динамики резистентности наличие значимо более высокой резистентности к пенициллину в Сибирском федеральном округе по сравнению с Центральным в 1999-2000 гг. нивелировалось к 2001-2003 гг., что, возможно, свидетельствует о распространении резистентного клона в различные регионы.

Подобная гипотеза имеет право на существование и в отношении тетрациклинорезистентных клонов, которые ранее обнаруживались значительно более часто в Сибирском федеральном округе по сравнению с Центральным и Северо-западным, однако в настоящее время со сходной частотой встречаются во всех регионах.

В то же время, сохранение достоверно более высокой нечувствительности к ко-тримоксазолу в Приволжском по сравнению с Северо-западным и Сибирским федеральными округами, впервые определенное в 1999-2000 гг., сохраняется и в 2001-2003 гг., что указывает на более эффективную циркуляцию резистентных клонов в этом регионе.

Молекулярно-генетический анализ резистентных штаммов

Для определения возможного генетического родства 74 пенициллинорезистентных пневмококков (17 - из фазы «А» и 57 - из фазы «Б») были исследованы с помощью методов RAPD и BOX-PCR.

Кластерный анализ полученных электрофоретических профилей, позволил выявить 20 групп клонально родственных изолятов (рис. 6).

Первая из них (И) характеризует исключительно штаммы, циркулирующие в г. Новосибирске (изоляты №№ 163 и 169, выделенные в областной клинической больнице (ОКБ)).

Вторая (К) представлена пневмококками из ОКБ г. Иркутска (№ 1482), ОКБ г. Томска (№ 536), городской инфекционной больницы № 1 г. Ярославля (№ 1596), детской республиканской клинической больницы (ДРКБ) г. Казани (№ 641) и диагностического центра (ДЦ) г. Краснодара (№ 289).

Третья (Л) включает изоляты из ОКБ г. Томска (№ 632) и городской инфекционной больницы № 1 г. Ярославля (№ 1409).

Четвертая (М) представлена исключительно пневмококками, циркулирующими в районе, обслуживаемом городской клинической больницей (ГКБ) № 23 г. Москвы (№№ 422, 1578, 1579, 1580, 1585, 1586, 1587).

Пятая (Н) включает штаммы, выделенные в ГКБ № 23 г. Москвы (№№ 1576, 1583, 1584) и клиничко-фармакологическом центре г. Ставрополя (№ 413).

Шестая (О) характеризует пневмококки из Научного центра здоровья детей РАМН (№ 1630), ДЦ г. Екатеринбурга (№ 1225) и ДЦ г. Краснодара (№ 324).

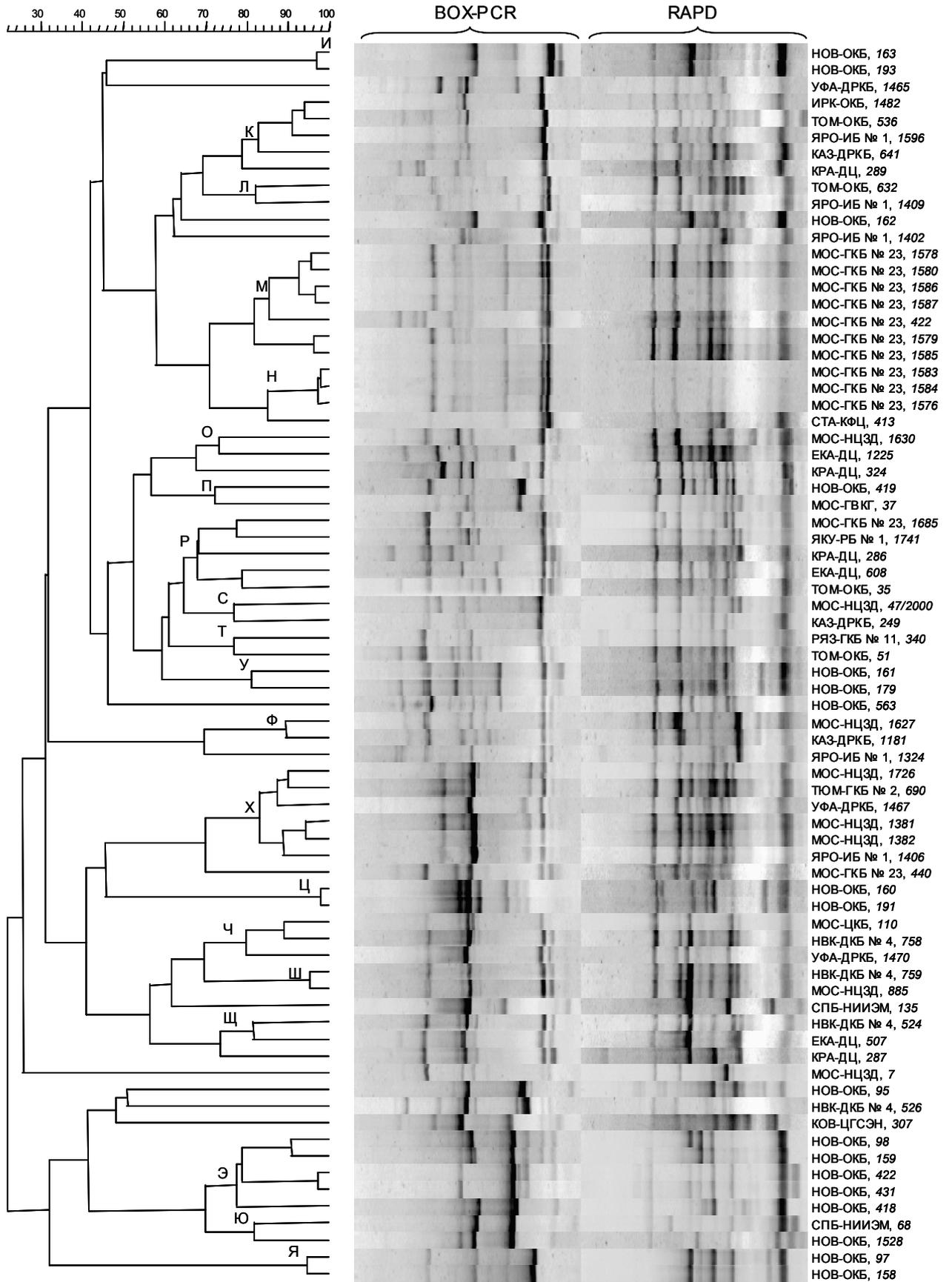


Рис. 6. Дендрограмма генетического родства штаммов на основе комбинированного анализа результатов RAPD и BOX-PCR

Седьмая (П) представлена изолятами из ОКБ г. Новосибирска (№ 419) и Главного военного клинического госпиталя им. академика Н.Н. Бурденко (№ 37).

В восьмую (Р) входят штаммы, выделенные в ГКБ № 23 г. Москвы (№1685), республиканской больницы № 1 г. Якутска (№ 1741), ДЦ г. Краснодара (№ 286), ДЦ г. Екатеринбурга (№ 608) и ОКБ г. Томска (№ 35).

Девятая (С) характеризует пневмококки из Научного центра здоровья детей РАМН (№ 47/2000) и ДРКБ г. Казани (№ 249).

Десятая (Т) представлена изолятами из ГКБ № 11 г. Рязани (№ 340) и ОКБ г. Томска (№ 51).

Одиннадцатая (У) характеризует исключительно штаммы, выделенные в ОКБ г. Новосибирска (№№ 161 и 179).

Двенадцатая (Ф) представлена пневмококками из Научного центра здоровья детей РАМН (№ 1627) и ДРКБ г. Казани (№ 1181).

Тринадцатая (Х) включает изоляты из Научного центра здоровья детей РАМН (№№ 1381, 1382, 1726), ГКБ № 2 г. Тюмени (№ 690), ДРКБ г. Уфы (№ 1467) и инфекционной больницы № 1 г. Ярославля (№ 1406).

Четырнадцатая (Ц) представлена исключительно пневмококками, выделенными в ОКБ г. Новосибирска (№№ 160 и 191).

Пятнадцатая (Ч) включает штаммы, выделенные в Центральной клинической больнице г. Москвы (№ 110), детской клинической больнице № 4 г. Новокузнецка (№ 758) и ДРКБ г. Уфы (№ 1470).

Шестнадцатая (Ш) представлена изолятами из детской клинической больницы № 4 г. Новокузнецка (№ 759) и Научного центра здоровья детей РАМН (№ 885).

Семнадцатая (Щ) характеризует пневмококки из детской клинической больницы № 4 г. Новокузнецка (№ 524), ДЦ г. Екатеринбурга (№ 507) и ДЦ г. Краснодара (№ 287).

Восемнадцатая (Э) включает штаммы, выделенные в ОКБ г. Новосибирска (№№ 98, 159, 422, 431).

Девятнадцатая (Ю) представлена изолятами из научно-исследовательского института эпидемиологии и микробиологии им. Пастера г. Санкт-Петербурга (№ 68) и ОКБ г. Новосибирска (№ 1528).

Двадцатая (Я) представлена исключительно пневмококками, выделенными в ОКБ г. Новосибирска (№№ 97 и 158).

Следует также отметить сходство электрофоретических профилей, характеризующих кластеры К и Л, М и Н, Э и Ю (коэффициент корреляции Пирсона $\geq 65\%$), которое указывает на возможность наличия генетического родства между входящими в них изолятами.

На основании представленных данных можно сделать вывод не только о доминировании резистентных клонов в пределах одного лечебного учреждения (группы И, М, У, Ц, Э, Я), но также и об их распространении между различными федеральными округами (кластеры К, Л, Н, О, П, Р, С, Т, Ф, Х, Ч, Ш, Щ, Ю).

На основании результатов проведенного мониторинга с учётом особенностей фармакодинамических параметров исследованных антимикробных препаратов, рекомендации по эмпирической терапии инфекций различной локализации предполагаемой пневмококковой этиологии могут быть сформулированы следующим образом.

Дальневосточный, Приволжский, Уральский, Сибирский федеральные округа

При лечении инфекций дыхательных путей (внебольничной пневмонии, среднего отита, синусита), не требующих госпитализации, следует использовать пероральную терапию. Препаратами выбора в таком случае являются амоксициллин, амоксициллин/клавуланат.

Альтернативой им могут служить макролиды (азитромицин, кларитромицин, миокамицин (кроме пневмонии), эритромицин), линкозамиды (клиндамицин), респираторные фторхинолоны (левофлоксацин) или кетолиды (телитромицин).

При лечении тяжелых инфекций часто требуется парентеральная терапия. В качестве антибиотиков выбора можно использовать пенициллин, амоксициллин/клавуланат, цефотаксим или цефтриаксон.

Альтернативными препаратами могут служить азитромицин, кларитромицин, клиндамицин или левофлоксацин.

При лечении инвазивных инфекций (например, менингита), препаратами выбора являются цефалоспорины III поколения (цефотаксим или цефтриаксон). Альтернативой может являться ванкомицин в комбинации с рифампицином или хлорамфеникол (за исключением Приволжского федерального округа

вследствие сравнительно большой (>10%) распространённости пенициллинорезистентных изолятов).

Учитывая сравнительно высокую частоту нечувствительных штаммов, следует ограничить использование ко-тримоксазола и тетрациклинов.

Центральный, Северо-западный и Южный федеральные округа

При лечении инфекций дыхательных путей (внебольничной пневмонии, среднего отита, синусита), не требующих госпитализации, следует использовать пероральную терапию. Препаратами выбора в таком случае являются амоксициллин, амоксициллин/клавуланат.

Альтернативой им могут служить левофлоксацин, телитромицин или клиндамицин (за исключением Северо-западного федерального округа).

При лечении тяжелых инфекций часто требуется парентеральная терапия. В качестве антибиотиков выбора можно использовать амоксициллин/клавуланат, цефотаксим или цефтриаксон. Альтернативными препаратами могут служить левофлоксацин или клиндамицин.

При лечении инвазивных инфекций (например, менингита), препаратами выбора являются цефалоспорины III поколения (цефотаксим или цефтриаксон). Альтернативой может являться ванкомицин в комбинации с рифампицином или хлорамфеникол (за исключением Южного федерального округа).

Учитывая сравнительно высокую частоту нечувствительных штаммов, следует ограничить использование ко-тримоксазола и тетрациклинов.

Выводы

1. Многоуровневая система мониторинга антибиотикорезистентности *S. pneumoniae* (детские сады, детские дома, неинвазивные и инвазивные клинические штаммы) позволяет оценить состояние антимикробной резистентности и прогнозировать её дальнейшее развитие с целью рационализации фармакотерапии пневмококковых инфекций.
2. В течение мониторинга с 1999 г. по 2003 г. не отмечено значимых изменений фенотипов и частоты резистентности пневмококков, вызывающих неинвазивные и инвазивные инфекции.

3. Основными проблемами лекарственной устойчивости пневмококков в России являются резистентность к тетрациклинам и ко-тримоксазолу.
4. С фармакодинамической точки зрения, пенициллин, макролиды, линкозамиды, тетрациклины, хлорамфеникол обладали самой низкой активностью в гг. Москве, Казани, Ханты-Мансийске, Новосибирске, Анадыре и Хабаровске.
5. Наиболее активными в отношении назофарингеальных и клинических штаммов пневмококков во всех регионах являются амоксициллин, амоксициллин/клавуланат и левофлоксацин.
6. Фенотипы резистентности среди назофарингеальных и клинических штаммов *S. pneumoniae* существенно отличаются не только в регионах России, но и городах одного федерального округа.
7. В детских домах резистентность пневмококков к различным антибиотикам значительно выше по сравнению с детскими садами и клиническими изолятами. В среднем, резистентность к пенициллину в детских домах, детских садах и у клинических штаммов составила, соответственно, 12,5%; 0,4% и 1,9%; к эритромицину – 20,2%; 3,9% и 7,5%; к клиндамицину – 12,5%; 1,5% и 2,4%; к тетрациклину – 75,5%; 43,4% и 25,0%; к ко-тримоксазолу – 44,4%; 21,7% и 5,9%; к хлорамфениколу – 22,2%; 8,7% и 6,9%.
8. Доказана циркуляция в России пневмококков с уникальными, не встречающимися в других странах мира, механизмами резистентности к макролидам (в азиатской части) и фторхинолонам (в европейской части).
9. При генетическом типировании *S. pneumoniae* комбинация методов случайной амплификации полиморфной ДНК (RAPD) и полимеразной цепной реакции повторяющихся BOX-последовательностей (BOX-PCR) не уступает по разрешающей способности гель-электрофорезу в пульсирующем поле (PFGE) и превосходит его по экономической эффективности.
10. Более высокая резистентность, преимущественно клональный характер циркулирующих штаммов в детских домах, доказанный RAPD и BOX-PCR методами, а также выявленное их распространение между городами (группы В и Г) и различными учреждениями одного города (группы Д и Е), позволяют относить детские дома к резервуарам резистентных клонов.

11. В Российской Федерации циркулируют специфичные клоны антибиотикорезистентных пневмококков, отличающиеся от доминирующих в Западной Европе и США клонов 9V, 14 и 23F.
12. На долю пневмококков с серотипами, входящими в состав или перекрестно реагирующими с гептавалентной конъюгированной пневмококковой вакциной, приходится от 72,2% в европейской до 96,4% в азиатской частях России (в среднем 84,4% штаммов), что позволяет предложить ее включение в отечественный календарь профилактических прививок.

Практические рекомендации

1. Мониторинг антимикробной резистентности пневмококков должен проводиться на национальном, федеральном и региональном уровнях с определением чувствительности, как минимум, к пенициллину, эритромицину, клиндамицину, тетрациклину, ко-тримоксазолу и хлорамфениколу.
2. Для разработки более эффективных путей оптимизации профилактики и фармакотерапии пневмококковых инфекций целесообразно создание региональных центров по мониторингу антибиотикорезистентности и антимикробной терапии.
3. Для контроля распространения резистентных клонов рекомендуется внедрение в работу региональных лабораторий RAPD и BOX-PCR генетического типирования пневмококков.
4. Полученные результаты серотипирования являются объективной основой для рекомендации включения в календарь профилактических мероприятий гептавалентной конъюгированной пневмококковой вакцины («Превнар»).
5. Для более эффективной вакцинации в Российской Федерации необходима разработка конъюгированных вакцин с включением серотипов всех доминирующих пневмококков.
6. При неинвазивных пневмококковых инфекциях, не требующих госпитализации, рекомендуется использовать аминопенициллины (амоксициллин, амоксициллин/клавуланат). Альтернативой им могут служить в Дальневосточном, Приволжском, Уральском, Сибирском

федеральных округах макролиды (эритромицин, азитромицин, кларитромицин, миокамицин), линкозамиды (клиндамицин), респираторные фторхинолоны (левофлоксацин), а в Центральном, Северо-западном и Южном – левофлоксацин (за исключением детей).

7. При неинвазивных пневмококковых инфекциях, требующих госпитализации, во всех федеральных округах в качестве антибиотиков выбора следует использовать амоксициллин/клавуланат, цефотаксим или цефтриаксон; в Дальневосточном, Приволжском, Уральском, Сибирском федеральных округах возможно использование высоких доз пенициллина. Альтернативными препаратами в Дальневосточном, Приволжском, Уральском, Сибирском федеральных округах могут служить азитромицин, кларитромицин, клиндамицин или левофлоксацин (кроме детей) парентерально, а в Центральном, Северо-западном и Южном - клиндамицин или левофлоксацин.
8. При инвазивных пневмококковых инфекциях во всех возрастных группах препаратами выбора являются цефалоспорины III поколения (цефотаксим, цефтриаксон). Альтернативой могут являться ванкомицин в комбинации с рифампицином или хлорамфеникол.
9. С учётом современных фармакодинамических особенностей в Приволжском и Южном федеральных округах хлорамфеникол не может применяться при лечении менингитов вследствие наличия в них более 10% пенициллинонечувствительных пневмококков.
10. Ввиду высокой частоты нечувствительных штаммов (>25%) во всех федеральных округах при терапии пневмококковых инфекций следует ограничить использование тетрациклинов и ко-тримоксазола.

Список работ, опубликованных по теме диссертации

1. Antimicrobial Resistance of *Streptococcus Pneumoniae* in the North-West Part of Russia. Proceedings of the 6th International Congress for Infectious Diseases. Prague, Czech Republic; 1994. - P. 28. (L. Stratchounsky).
2. Резистентность *Streptococcus pneumoniae* к антимикробным препаратам в Смоленской области: Сб. Всероссийской юбилейной конференции РАМН. – Москва, 1994. - С. 181-182. (В соавт. Перьков А.В., Завадкин А.В.).

3. The Study of Nasopharyngeal Carriage of *Streptococcus pneumoniae* in Children from Day-Care Centers in Smolensk (Russia). Proceedings of the 7th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases. Vienna, Austria; 1995. P. 228. (Stratchounsky L., Krechikova O., Zavadkin A.).
4. Сравнение результатов определения чувствительности к антибиотикам на среде АГВ и агарах Мюллер-Хинтона и ИЗОСенситест // Антибиотики и химиотерапия. - 1996. – Т. 41, № 10. - С. 22-27. (В соавт. Страчунский Л.С., Ливермор Д.М., Стецюк О.У., Шаврикова Е.П.).
5. Современные взгляды на применение ко-тримоксазола // Клиническая фармакология и терапия. - 1997. – Т. 6, № 2. - С. 27-31. (В соавт. Страчунский Л.С.).
6. Проблемы выбора карбапенемных антибиотиков в конце 90-х гг // Клиническая фармакология и терапия. - 1997. - Т. 6, № 4. - С. 59-63. (В соавт. Страчунский Л.С., Стецюк О.У., Розенсон О.Л.).
7. Discrepancy Between the Criteria for Penicillin Resistance of *Streptococcus pneumoniae* by Oxacillin Disk and MIC: Is It Time for Changes? Proceedings of the 2nd European Congress of Chemotherapy and 7th Biennial Conference on Antiinfective Agents and Chemotherapy. Hamburg, Germany; 1998. P. 103. (Stratchounski L.S., Kretchikova O.I.).
8. Specific Problems in Antimicrobial Susceptibility Testing (AST) in Russia. Proceedings of the 8th International Congress for Infectious Diseases. Boston, USA; 1998. P. 189. (Stratchounski L.S., Stetsiouk O.U., Rechedko G.K.).
9. Report of ESGNI-001 and ESGNI-002 studies. Bloodstream Infections in Europe. Clin Microbiol Infect 1999;5 (Suppl 2):2S1-2S12. (Bouza E., Perez-Molina J., Munoz P.).
10. Чувствительность к антибиотикам пневмококков, выделенных от здоровых детей из организованных коллективов // Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. – 1999. - Т. 1, № 1. - С. 31-39. (В соавт. Страчунский Л.С., Кречикова О.И., Решедько Г.К., Стецюк О.У.).
11. Antimicrobial Resistance of *Streptococcus pneumoniae* isolated from healthy children in day-care centres: results of a multicenter study in Russia. Pediatr Infect Dis J 2000;19(3):196-200. (Stratchounski L.S., Kretchikova O.I., Reshedko G.K., Stetsiouk O.U., Tarasova G.D., Blochin B.M., Egorova O.A., Boyko L.M.).

12. Нозокомиальные инфекции: эпидемиология, патогенез, профилактика, контроль // Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. - 2000. - Т. 2, № 1. - С. 16-30.
13. Выделение, идентификация и определение чувствительности к антибиотикам *Streptococcus pneumoniae* (методические рекомендации) // Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. - 2000. - Т. 2, № 1. - С. 88-98. (В соавт. Кречикова О.И., Богданович Т.М., Стецюк О.У., Суворов М.М., Катосова Л.К., Вишнякова Л.К., Фаустова М.Е.).
14. Нозокомиальные инфекции // Антибактериальная терапия (практическое руководство) / Под ред. Страчунского Л. С., Белоусова Ю. Б., Козлова С. Н. - М.: РЦ «Фармединфо», 2000. - С. 143-146.
15. Infection control system in Russia. J Hosp Infect 2001;49(3):163-166. (Stratchounski L.S., Dekhnitch A.V.).
16. Сравнительная активность макролидов в отношении *Streptococcus pneumoniae*, выделенных из респираторных источников // Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. - 2001. - Т. 3, Прил. 1. - С. 17. (В соавт. Богданович Т.М., Леонова Н.Н., Кречикова О.И., Сивая О.В.).
17. Сравнение антимикробной резистентности клинических штаммов *Streptococcus pneumoniae* в Москве и Смоленске // Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. - 2001. - Т. 3, Приложение 1. - С. 19. (В соавт. Леонова Н.Н., Богданович Т.М., Кречикова О.И., Катосова Л.К., Гугуцидзе Е.Н., Курчавов В.А., Синопальников А.И., Галеева Е.А., Чернёнская Т.В.).
18. Mechanism of erythromycin A resistance in *S.pneumoniae* and *S.pyogenes* isolates from Russia. Proceedings of the 41st Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy. Chicago, USA; 16-19 Dec 2001. P. 83. (Bozdogan D., Stratchounski L.S., Bogdanovich T.M., Akhmetova L.I., Jacobs M.R., Appelbaum P.C.).
19. Antipneumococcal activity of telithromycin compared with 7 other drugs in Russia. Proceedings of the 41st Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy. Chicago, USA; 16-19 Dec 2001. P. 189. (Stratchounski L.S., Ednie L.M., Bogdanovich T.M., Jacobs M.R., Appelbaum P.C.).
20. Activity of Macrolides, Clindamycin and Quinupristin/Dalfopristin Against Clinical Isolates of *S. pneumoniae* from Children With Community-Acquired Respiratory

- Tract Infections (CARTI). Proceedings of the 6th International Conference for Macrolides, Azalides, Streptogramins, Ketolides and Oxazolidinones (ICMAS-KO 6). Bologne, Italy; 2002. P. 91. (Bogdanovitch T.M., Sivaya O.V., Stratchounski L.S.).
21. Antimicrobial resistance among clinical strains of *S. pneumoniae* isolated from patients with community-acquired respiratory tract infections (CARTI) in Russia. Int J Antimicrob Agents 2002;19(Suppl 1):S7-S8. (Bogdanovitch T.M., Sivaya O.V., Agapova E.D., Ahmetova L.I., Furletova M.E., Gudkova L.V., Gugutsidze E.N., Ilyina V.N., Marusina N.E., Multich I.G., Ortenberg E.A., Schetin E.V., Shturmina S.M., Tseneva G.Ya., Stratchounski L.S.).
22. Современные возможности специфической профилактики пневмококковых инфекций // Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. - 2002. – Т. 4, № 1. - С. 61-69.
23. Инфекции глаз // Практическое руководство по антиинфекционной химиотерапии / Под ред. Страчунского Л.С., Белоусова Ю.Б., Козлова С.Н. - М.: Боргес, 2002. - С. 225-230. (В соавт. Майчук Ю.Ф.).
24. Нозокомиальные инфекции // Практическое руководство по антиинфекционной химиотерапии / Под ред. Страчунского Л.С., Белоусова Ю.Б., Козлова С.Н. - М.: Боргес, 2002. - С. 272-275.
25. Antistreptococcal Activity of Telithromycin Compared with Seven Other Drugs in Relation to Macrolide Resistance Mechanisms in Russia. Antimicrob Agents Chemother 2002;46:2963-2968. (Bogdanovitch T.M., Appelbaum P.C., Ednie L., Stratchounski L.S., Jacobs M.R., Vozdogan B.).
26. Этиология и микробиологическая диагностика внебольничных пневмоний // Пневмония / Под ред. Чучалина А.Г., Синопальникова А.И., Черняховской Н.Е. - М.: Экономика и информация, 2002. - С. 9-48. (В соавт. Зубков М.Н., Стецюк О.У., Страчунский Л.С.).
27. Профилактика внебольничной пневмонии // Пневмония / Под ред. Чучалина А.Г., Синопальникова А.И., Черняховской Н.Е. - М.: Экономика и информация, 2002. - С. 405-423. (В соавт. Синопальников А.И., Белоцерковская Ю.Г.).
28. First multicenter study of resistance of nasopharyngeal pneumococci in children from day-care centers in European Russia. Proceedings of the 42nd Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy. San Diego, USA; 27-30

- September 2002. P. 110. (Appelbaum P.C., Kosowska K., Kretchikova O.I., Stratchounski L.S.).
29. Characterization of macrolide and quinolone resistance mechanisms in *Streptococcus pneumoniae* strains from children in day-care centers in European part of Russia. Proceedings of the 42nd Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy. San Diego, USA; 27-30 September 2002. P. 120. (Kosowska K., Stratchounski L.S., Appelbaum P.C.).
30. Антимикробная резистентность *Streptococcus pneumoniae* в России: результаты проспективного многоцентрового исследования (фаза А проекта ПеГАС-I) // Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. - 2002. – Т. 4, № 3. - С. 267-277. (В соавт. Кречикова О.И., Сивая О.В., Ахметова Л.И., Вишнякова Л.А., Гугуцидзе Е.Н., Ильина В.Н., Катосова Л.К., Курчавов В.А, Кузин В.Б., Марусина Н.Е., Молодова Е.А., Мултых И.Г., Павлов А.Л., Синопальников А.И., Смирнов И.В., Тихонов Ю.Г., Фаустова М.Е., Ларченко В.А., Страчунский Л.С.).
31. Current state of antimicrobial resistance of *S. pneumoniae* in Russia: results of prospective multicentre study (PEHASus-I, phase 'B'). Clin Microbiol Infect 2003;9(Suppl 1):96. (Sivaja O.V., Kretchikova O.I., Stratchounski L.S.).
32. Monitoring of antimicrobial resistance of nasopharyngeal *Streptococcus pneumoniae* in children from orphanages in Russia: results of SPARS study. Proceedings of the 1st FEMS Congress Of European Microbiologists. Ljubljana, Slovenia; June 29-July 3, 2003. P. 498. (Appelbaum P.C., Kosowska K., Kretchikova O.I., Poupard J.A., Stratchounski L.S.).
33. Частота назофарингеального носительства и чувствительность к антибиотикам *Streptococcus pneumoniae* у детей из закрытых организованных коллективов в Республике Беларусь: Матер. научно-практ. конф. «Резистентность микроорганизмов к антимикробным препаратам». - Минск, 2003. - С. 66-68. (В соавт. Дмитраченко Т.И., Семёнов В.М., Страчунский Л.С., Кречикова О.И., Скворцова В.В., Зенькова С.К., Жильцов И.В.).
34. Резистентность пневмококков к антимикробным препаратам в России: результаты многоцентрового исследования: Матер. III международной конференции «Идеи Пастера в борьбе с инфекциями». - Санкт-Петербург, 2003. – С. 99. (В соавт. Никулин А.А.).

35. Comparison of Resistance Rates and Mechanisms of *Streptococcus pneumoniae* from Children in European and Asian Russia. Proceedings of the 43rd Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy. Chicago, USA; 14-17 September 2003. P. 112. (Kosowska K., Stratchounski L.S., Appelbaum P.C.).
36. Comparison of Antimicrobial Resistance of Nasopharyngeal Pneumococci From Children from Day-Care Centers (DCC) in European (ER) and Asian Russia (AR) (results of SPARS study). Proceedings of the 43rd Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy. Chicago, USA; 14-17 September 2003. P. 130. (Appelbaum P.C., Kosowska K., Kretchikova O.I., Eidelstein I.A., Stratchounski L.S.).
37. Russian Multicenter External Quality Assessment (EQA) of Antimicrobial Susceptibility Testing (AST) in 2002: Highlights of the Problems. Proceedings of the 43rd Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy. Chicago, USA; 14-17 September 2003. P. 180. (Stetsiouk O.U., Galkin D.V., Osherov A.A., Stratchounski L.S.).
38. Antimicrobial Resistance in Russia among *Streptococcus Pneumoniae* (SP) Causing Community-Acquired Respiratory Tract Infections (CARTI): PEHASus-I Surveillance Program, 2001-2002. Proceedings of the 41st Infectious Diseases Society of America Meeting. San Diego, USA; 9-12 October 2003. P. 65 (Stratchounski L.S., Sivaya O.V., Poupard J.A.).
39. Comparison of antimicrobial resistance of *S. pneumoniae* in Russia in 1999-2000 and 2001-2002 (PeHASus-I project). Proceedings of the 5th European Congress on Chemotherapy. Rhodes, Greece; 17-20 October 2003. P. 104. (Stratchounski L.S., Sivaja O.V., Kretchikova O.I., Eidelstein I.A.).
40. Внебольничная пневмония у взрослых: практические рекомендации по диагностике, лечению и профилактике (пособие для врачей) // Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. - 2003. – Т. 5, № 3. - С. 198-224. (В соавт. Чучалин А.Г., Синопальников А.И., Яковлев С.В., Страчунский Л.С., Рачина С.А.).
41. Современные методы клинической микробиологии (выпуск I). Методические рекомендации. – Смоленск, 2003. - 104 с. (В соавт. Страчунский Л.С.).
42. Определение чувствительности пневмококков к антимикробным препаратам. Пособие для врачей. – Смоленск, 2003. - 26 с. (В соавт. Кречикова О.И., Стецюк О.У., Эйдельштейн И.А.).

Список рационализаторских предложений по теме диссертации

1. Устройство для гомогенизации и перемешивания бактериальных взвесей в микропробирках. № 1224 от 22 марта 1994 г.
2. Устройство для моделирования гидродинамических условий в бактериальных средах. № 1227 от 21 июня 1994 г.