

**Национальная ассоциация специалистов по контролю инфекций,
связанных с оказанием медицинской помощи (НП «НАСКИ»)**

**МОЛЕКУЛЯРНО-ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКИЙ МОНИТОРИНГ В СИСТЕМЕ
ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКОГО НАДЗОРА ЗА ИНФЕКЦИЯМИ, СВЯЗАННЫМИ С
ОКАЗАНИЕМ МЕДИЦИНСКОЙ ПОМОЩИ**

Федеральные клинические рекомендации

Ноябрь, 2014

УДК 616-036.22:614.2:576.858.9(07)
ББК 51.9я7

Молекулярно-генетический мониторинг в системе эпидемиологического надзора за инфекциями, связанными с оказанием медицинской помощи. Федеральные клинические рекомендации – М., 2014. – 45 с.

Авторский коллектив:

Гончаров А.Е., Зуева Л.П., Колоджиева В.В., Кафтырева Л.А., Егорова С.А., Макарова М.А.

Разработаны:

ГБОУ ВПО «Северо-Западный государственный медицинский университет имени И.И. Мечникова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Санкт-Петербург

ФБУН НИИ экспериментальной медицины, Санкт-Петербург

ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, Санкт-Петербург

Экспертный совет: Брико Н.И. – академик РАН, д.м.н., проф., зав.кафедрой эпидемиологии и доказательной медицины ГБОУ ВПО ПМГМУ им. И.М. Сеченова» Минздрава России, главный внештатный специалист эпидемиолог Минздрава России, председатель НП «НАСКИ» (Москва); Брусина Е.Б. – д.м.н., проф., зав.кафедрой ГБОУ ВПО КемГМА Минздрава России, главный внештатный специалист эпидемиолог Минздрава Кемеровской области (Кемерово); Ковалишена О.В. - д.м.н., проф. кафедры эпидемиологии ГБОУ ВПО НижГМА Минздрава России, исполнительный директор НП «НАСКИ» (Нижний Новгород); Стасенко В.Л. - д.м.н., проф., зав.кафедрой эпидемиологии ГБОУ ВПО ОГМА Минздрава России, главный внештатный специалист эпидемиолог Минздрава Омской области (Омск); Фельдблюм И.В. – д.м.н., проф., зав.кафедрой эпидемиологии с курсом гигиены и эпидемиологии ФПК и ППС ГБОУ ВПО ПГМА им. академика Е.А. Вагнера Минздрава России (Пермь); Шкарин В.В. – член-корр. РАН, д.м.н., проф., президент и зав.кафедрой эпидемиологии ГБОУ ВПО НижГМА Минздрава России (Нижний Новгород).

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Согласованы Профильной комиссией Минздрава России по эпидемиологии 20 ноября 2014 г., протокол №4.

Утверждены на общем собрании членов некоммерческого партнерства «Национальная ассоциация специалистов по контролю инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи» (НП «НАСКИ») 19.11.2014 (Протокол №6) в рамках Всероссийской научно-практической конференции с международным участием специалистов по контролю инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи, г. Москва, 19 - 21 ноября 2014 г.

В федеральных клинических (методических) рекомендациях изложены основные принципы организации и проведения молекулярно-генетического мониторинга возбудителей инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи, приведены критерии выбора методов молекулярно-генетического типирования для решения практических задач эпидемиологического надзора. Рекомендации предназначены для госпитальных эпидемиологов, бактериологов, специалистов, осуществляющих эпидемиологический надзор за инфекциями, связанными с оказанием медицинской помощи с использованием методов молекулярно-генетического типирования.

Содержание

1. Область применения	5
2. Термины и определения	5
3. Обозначения и сокращения	6
4. Нормативные ссылки	7
5. Методология	8
6. Уровни доказательности и градация рекомендаций	9
7. Введение	11
8. Цель и задачи молекулярно-генетического мониторинга возбудителей инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи	13
9. Общие принципы организации и проведения молекулярно-генетического мониторинга возбудителей инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи	14
9.1. Показания к проведению молекулярно-генетического типирования возбудителей ИСМП	16
9.2. Генетические маркеры, используемые при молекулярно-генетическом типировании ведущих возбудителей ИСМП	16
9.3. Основные методы молекулярно-генетического типирования, применяемые в системе эпидемиологического надзора за ИСМП	20
9.4. Принципы выбора метода молекулярно-генетического типирования для решения практических задач эпидемиологического надзора за ИСМП	27
9.5. Молекулярно-эпидемиологический мониторинг механизмов резистентности возбудителей ИСМП к антимикробным препаратам	28
9.6. Взаимодействие лабораторий ЛПМО и научных лабораторий, выполняющих функции референсных центров	34
10. Молекулярно-генетический мониторинг возбудителей инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи, проводимый в лабораториях, выполняющих функции референсных	36
10.1. Идентификация международных эпидемических клонов возбудителей ИСМП	36
10.2. Использование методов филогенетического анализа при молекулярно-генетическом типировании возбудителей ИСМП.	38

10.3. Применение методов полногеномного секвенирования в структуре эпидемиологического надзора за возбудителями ИСМП	40
Приложение 1. Карта сбора данных о культуре микроорганизма, передаваемой в референс-лабораторию для молекулярно-генетического типирования.	41
Список литературы	43

1. ОБЛАСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ

Настоящие методические рекомендации предназначены для специалистов, осуществляющих эпидемиологический надзор за инфекциями, связанными с оказанием медицинской помощи, с использованием методов молекулярно-генетического типирования, госпитальных эпидемиологов, бактериологов и могут быть применены при организации эпидемиологического наблюдения за данными инфекциями в лечебно-профилактических организациях различного профиля.

2. ТЕРМИНЫ И ОПРЕДЕЛЕНИЯ

Термин	Определение
госпитальный штамм	штамм микроорганизма, адаптированный к циркуляции в медицинском учреждении и вызвавший связанные случаи ИСМП
эпидемический штамм (эпидемический клон)	штамм микроорганизма, вызвавший связанные случаи ИСМП в нескольких (не менее чем в двух) различных ЛПМО
международный эпидемический клон	штамм, вызвавший связанные случаи ИСМП в ЛПМО нескольких (не менее чем в двух) географических регионах
молекулярно-генетический мониторинг	слежение за популяционной структурой возбудителей инфекционных заболеваний с целью оценки, прогнозирования эпидемической ситуации и обоснования своевременного вмешательства в ход эпидемического процесса.
лаборатория, выполняющая функции референсного центра	лаборатория, созданная на базе научно-исследовательских учреждений для оказания консультативно-методической и практической помощи учреждениям здравоохранения субъектов Российской Федерации в идентификации и внутривидовом типировании возбудителей ИСМП

3. ОБОЗНАЧЕНИЯ И СОКРАЩЕНИЯ

АМП	антимикробный препарат
БЛРС	бета-лактамазы расширенного спектра
ИСМП	инфекции, связанные с оказанием медицинской помощи
КНС	коагулазонегативные стафилококки
ЛПМО	лечебно-профилактическая медицинская организация
МБЛ	металло-бета-лактамазы
ОКИ	острые кишечные инфекции
ПЦР	полимеразная цепная реакция
ПЦР-РВ	ПЦР в режиме реального времени
ЦРС	цефалоспорины расширенного спектра
MLST	мультилокусное секвенирование - типирование
MRSA	метициллинорезистентный <i>S.aureus</i>
MLVA	мультилокусный анализ VNTR локусов
PFGE	Pulsed Field Gel Electrophoresis, электрофорез в пульсирующем поле
RAPD-ПЦР	полимеразная цепная реакция со «случайными» праймерами
SNP	<i>Single Nucleotide Polymorphism</i> , однонуклеотидный полиморфизм
VNTR	генетический локус с переменным числом tandemных повторов
VRE	ванкомицинрезистентные энтерококки

4. НОРМАТИВНЫЕ ССЫЛКИ

1. Закон РФ № 52-ФЗ от 30.03.1999 г. «О санитарно-эпидемиологическом благополучии населения».
2. Национальная концепция профилактики инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи. Дата вступления в силу 16.11.2011
3. Санитарно-эпидемиологические правила и нормативы СанПиН 2.1.3.2630-10 "Санитарно-эпидемиологические требования к организациям, осуществляющим медицинскую деятельность" от 18 мая 2010 г
4. Лазикова Г.Ф., Мельникова А.А., Фролова Н.В., Дмитренко О.А., Прохоров В.Я., Гинцбург А.Л. Метициллинрезистентные стафилококки – возбудители внутрибольничных инфекций: идентификация и генотипирование: Методические рекомендации – М.: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2006. – 43с.
5. Брусина Е.Б., Дмитренко О.А., Глазовская Л.С., Ефимова Т.В. Эпидемиология и эпидемиологический мониторинг инфекции, вызванных метициллинрезистентными штаммами золотистого стафилококка. Методические рекомендации. URL: http://nasci.ru/resources/directory/7/common/MR_S.aureus.doc (Дата обращения 12.11.2014).
6. МУ 1.3.2569-09 «Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I–IV группы патогенности».
7. МР «Принципы организации мониторинга распространения устойчивости ведущих возбудителей внутрибольничных инфекций к антимикробным препаратам в учреждениях здравоохранения» Утв. протокол №6 от 19.11.2014 Общего собрания членов НП «НАСКИ» и протоколом №4 от 20.11.2014 заседания Профильной комиссии МЗ РФ по эпидемиологии в период проведения Всероссийской научно-практической конференции специалистов по контролю инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи, с международным участием, г.Москва, 19-21 ноября 2014г.

5. МЕТОДОЛОГИЯ

Методы, используемые для сбора/селекции доказательств:

Поиск в электронных базах данных и библиотечных фондах.

Описание методов, использованных для сбора/селекции доказательств:

Доказательной базой для рекомендаций являются тематические монографии, публикации в периодических специализированных изданиях, материалы конференций, съездов. Глубина поиска составляет не менее 5 лет.

Методы, использованные для оценки качества и силы доказательства:

Консенсус экспертов.

Методы, использованные для анализа доказательств:

Обзоры опубликованных исследований.

Методы, использованные для формирования рекомендаций:

Консенсус экспертов.

Индикаторы доброкачественной практики:

Рекомендуемая доброкачественная практика базируется на клиническом, научно-исследовательском, экспертном и организационно-методическом опыте членов рабочей группы по разработке рекомендаций.

Экономический анализ:

Анализ стоимости не проводился и публикации по данному вопросу не рассматривались.

Методы валидации:

Внешняя экспертная оценка.

Внутренняя экспертная оценка.

Описание метода валидации рекомендаций:

Настоящие рекомендации в предварительной версии были рецензированы независимыми экспертами, которых просили оценить рекомендации с позиции доступности для понимания. Получены комментарии со стороны клинических эпидемиологов в отношении доходчивости изложения рекомендаций и их важности как рабочего инструмента повседневной практики. Комментарии, полученные от экспертов, систематизировались и обсуждались членами рабочей группы. Каждый пункт обсуждался и регистрировались вносимые изменения или причины отказа от внесения изменений.

Консультация и экспертная оценка:

Предварительная версия настоящих рекомендаций была выставлена для широкого обсуждения на официальном сайте НП «НАСКИ» для того, чтобы специалисты в области

инфекционного контроля за инфекциями, связанными с оказанием медицинской помощи, имели возможность принять участие в обсуждении и совершенствовании рекомендаций.

Рабочая группа:

Для окончательной редакции членами рабочей группы были повторно проанализированы все замечания и комментарии экспертов, риск систематических ошибок при разработке рекомендаций сведен к минимуму.

6. УРОВНИ ДОКАЗАТЕЛЬНОСТИ И ГРАДАЦИЯ РЕКОМЕНДАЦИЙ

Все требования, предъявляемые настоящими методическими рекомендациями, основаны на результатах научных исследований и практического опыта, учитывают требования законодательства Российской Федерации и международной практики. В настоящем документе применяется следующая система ранжирования доказательств и базирующихся на них рекомендаций по степени их обоснованности:

Уровни доказательности

1++	Мета-анализы высокого качества, систематические обзоры рандомизированных контролируемых исследований (РКИ), или РКИ с очень низким риском систематических ошибок
1+	Качественно проведенные мета-анализы, систематические обзоры или РКИ с низким риском систематических ошибок
1-	Мета-анализы, систематические обзоры или РКИ с высоким риском систематических ошибок
2++	Высококачественные систематические обзоры исследований случай-контроль или когортных исследований. Высококачественные обзоры исследований случай-контроль или когортных исследований с очень низким риском конфаундинга или систематических ошибок и высокой вероятностью причинно-следственной взаимосвязи
2+	Хорошо проведенные исследования случай-контроль или когортные исследования со средним риском конфаундинга или систематических ошибок и

средней вероятностью причинно-следственной взаимосвязи

2- Исследования случай-контроль или когортные исследования с высоким риском конфаундинга или систематических ошибок и значительным риском отсутствия причинно-следственной взаимосвязи

3 Не аналитические исследования, например, описание случаев, серий случаев

4 Мнение экспертов (специалистов)

Рейтинговая схема для оценки силы рекомендаций:

Сила	Описание
А	По меньшей мере один мета-анализ, систематический обзор, или РКИ, оцененные, как 1++, напрямую применимые к целевой популяции и демонстрирующие устойчивость результатов или группа доказательств, включающая результаты исследований, оцененные как 1+, напрямую применимые к целевой популяции и демонстрирующие общую устойчивость результатов
В	Группа доказательств, включающая результаты исследований, оцененные как 2++, напрямую применимые к целевой популяции и демонстрирующие общую устойчивость результатов или экстраполированные доказательства из исследований, оцененных как 1++ или 1+
С	Группа доказательств, включающая результаты исследований, оцененные, как 2+, напрямую применимые к целевой популяции и демонстрирующие общую устойчивость результатов; или экстраполированные доказательства из исследований. Оцененных как 2++
Д	Доказательства уровня 3 или 4; или экстраполированные доказательства из исследований, оцененных как 2+

7. ВВЕДЕНИЕ

Развитие и активное внедрение в медицинскую практику геномных и постгеномных технологий становится в настоящее время все более очевидным фактом, что находит отражение, в том числе и в принятой Правительством РФ «Стратегии развития медицинской науки в РФ до 2025 года», которая относит геномику, протеомику, эпигеномику и биоинформатику к числу приоритетных направлений развития медицины [1].

Также не вызывает сомнений необходимость внедрения современных достижений молекулярной биологии в систему эпидемиологического надзора за инфекционными заболеваниями. Развитие молекулярной эпидемиологии определяется нарастающим многообразием патогенных вариантов микроорганизмов, происходящим вследствие глобальных социальных и экологических процессов, затрагивающих современное общество.

Высказана точка зрения о том, что в современных условиях формируется «система риска», требующая постоянных мониторинговых исследований за популяцией возбудителя [2]. Основными точками приложения подобных мониторинговых исследований являются следующие явления и процессы:

1. возникновение новых эпидемических клонов;
2. антибиотикорезистентность за счет хромосомных и внехромосомных механизмов приобретения;
3. антигенная дивергенция возбудителя с вакцинными штаммами и потеря актуальности вакцин;
4. реверсия патогенности живых вакцин;
5. маскировка патогенов вследствие межвидовой рекомбинации;
6. появление новых онкогенных генотипов бактерий и вирусов и усиление их циркуляции;
7. возврат ликвидированных и ликвидируемых инфекций вследствие заноса возбудителей из эпидемиологически неблагополучных регионов мира.

Исходя из обозначенных выше задач очевидно, что диагностические возможности молекулярно-генетических методов в эпидемиологии не исчерпываются использованием их для выявления источников инфекции и факторов передачи возбудителя во время эпидемических вспышек. Основным назначением молекулярно-генетических методов в эпидемиологии в ближайшее время, по-видимому, должно стать слежение за популяционной структурой возбудителей инфекционных болезней с целью оценки, прогнозирования

эпидемической ситуации и обоснования своевременного вмешательства в ход эпидемического процесса – то есть молекулярно-генетический мониторинг.[3]

Молекулярно-генетический мониторинг позволяет выявить два основных процесса, которые могут привести к развитию эпидемически значимых событий - занос (завоз) возбудителя в популяцию риска извне или направленную перестройку популяции возбудителя *in situ* (спонтанный генетический дрейф), что применительно к эпидемиологии ИСМП обозначает возможность выявления процессов формирования госпитальных штаммов и их эпидемического распространения за пределы стационара. В связи с данным обстоятельством в «Национальной концепции профилактики инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи» особое внимание уделено методам молекулярно-генетического типирования микроорганизмов. В частности, для совершенствования лабораторной диагностики и мониторинга возбудителей ИСМП предлагаются мероприятия, направленные на «расшифровку генома актуальных возбудителей ИСМП, циркулирующих в учреждениях здравоохранения; создание референс-лабораторий, обеспечивающих ... проведение дорогостоящих и технически сложных исследований, включая молекулярно-генетическое типирование» [4].

В настоящих рекомендациях систематизированы методические подходы к реализации эпидемиологического надзора за ИСМП, проводимого с использованием методов молекулярно-генетического типирования.

8. ЦЕЛЬ И ЗАДАЧИ МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКОГО МОНИТОРИНГА ЗА ВОЗБУДИТЕЛЯМИ ИСМП.

В настоящих методических рекомендациях под молекулярно-генетическим мониторингом понимается слежение за популяционной структурой возбудителей ИСМП с целью оценки, прогнозирования эпидемической ситуации и обоснования своевременного вмешательства в ход эпидемического процесса.

Задачи, выполняемые при осуществлении молекулярно-генетического мониторинга за возбудителями ИСМП, следующие:

1. внутривидовое типирование с целью определения генетической (клональной) общности штаммов микроорганизмов, выделенных от заболевших лиц, вероятного источника инфекции и факторов передачи при эпидемических вспышках и в рутинной практике;
2. верификация случаев внутрибольничного инфицирования на основе установленной генетической (клональной) общности штаммов микроорганизмов, идентификация госпитальных штаммов или штаммов, заносимых в стационар;
3. идентификация эпидемических клонов, в том числе международных;
4. выявление штаммов с необычными биологическими свойствами, штаммов с высокой вирулентностью, резистентностью к АМП или контагиозностью в госпитальных условиях;
5. динамическое слежение за микроэволюционными изменениями, происходящими в геномах возбудителей ИСМП, с оценкой их эпидемиологического значения;
5. дифференциация истинных вспышек и псевдовспышек, возникших в результате неправильного отбора проб клинического материала для микробиологических исследований или внутрилабораторной контаминации.

9. ОБЩИЕ ПРИНЦИПЫ ОРГАНИЗАЦИИ И ПРОВЕДЕНИЯ МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКОГО МОНИТОРИНГА ВОЗБУДИТЕЛЕЙ ИСМП.

Для доказательства существования связей между источником инфекции, факторами передачи и последующими случаями заболеваний используют методы внутривидового типирования микроорганизмов. При этом исходят из предположения, что штаммы возбудителя, выделенные от источника инфекции, с объектов внешней среды, являющихся факторами передачи, и от всех заболевших в очаге, связанных с источником инфекции, являются идентичными по своим биологическим свойствам (фенотипическим и генотипическим) в отличие от штаммов, не связанных с изучаемой эпидемической цепочкой. Методы внутривидового типирования микроорганизмов, проводимого с эпидемиологическими целями, подразделяют на фенотипические (также называемые традиционными или немолекулярными) и молекулярно-генетические (генотипические).

К фенотипическим методам внутривидового типирования относят методы, позволяющие устанавливать различия между штаммами микроорганизмов по способности утилизировать или использовать в качестве субстрата те или иные питательные вещества (биотипирование), особенности антигенной структуры (серотипирование, иммунный блоттинг), чувствительность к бактериофагам (фаготипирование), бактериоцинам (бактериоцинотипирование) или АМП (антибиотикотипирование). Следует отметить, что фенотипические методы типирования штаммов микроорганизмов не всегда обеспечивают получение достоверной информации вследствие следующих причин:

1. Невысокая информативность фенотипических методов типирования и низкая дискриминационная способность. Штаммы микроорганизмов, имеющие различное происхождение, могут иметь одинаковые фенотипические свойства в силу единообразия условий окружающей среды. Например, в разных отделениях одного стационара или в разных ЛПМО, в которых используют одни и те же АМП, могут обнаруживаться штаммы возбудителей ИСМП с идентичным профилем устойчивости к АМП. Поэтому «антибиотикотипирование» не может быть использовано в качестве единственного метода при доказательстве эпидемического распространения возбудителей ИСМП из одного отделения стационара в другое или межстационарного распространения возбудителя.
2. Недостаточная воспроизводимость результатов фенотипических методов типирования. В процессе культивирования на различных питательных средах могут происходить изменения биологических свойств, таких как способность к продукции бактериоцинов и токсинов, чувствительность к АМП, включая бактериофаги и др.

В целом, фенотипические методы типирования считают слишком переменными, трудоемкими и медленными для успешного применения в эпидемиологической практике [5] **(уровень доказательности – 4).**

Генотипические методы внутривидового типирования (генотипирование), как правило, лишены указанных недостатков.

9.1. Показания к проведению молекулярно-генетического типирования возбудителей ИСМП

Учитывая указанные выше преимущества методов молекулярно-генетического типирования по сравнению с фенотипическими (немолекулярными) методами, при реализации эпидемиологического наблюдения за ИСМП молекулярно-генетическому типированию следует отдавать предпочтение при наличии в лаборатории ЛПМО технических возможностей для проведения данного типа исследования. Применение методов молекулярно-генетического типирования позволяет сократить время, затрачиваемое на идентификацию госпитальных и эпидемически значимых штаммов микроорганизмов, и своевременно проводить противоэпидемические мероприятия.

Молекулярно-генетическое типирование является методом выбора в следующих ситуациях:

1. при расследовании острых и хронических вспышек ИСМП;
2. в процессе верификации результатов фенотипических методов внутривидового типирования (в частности, антибиотикотипирования, резистенс-типирования), направленного на выявление госпитальных штаммов;
3. при слежении за циркуляцией международных эпидемических клонов в пределах территориальных единиц, субъектов РФ и на национальном уровне.

Проведение молекулярно-генетического типирования обязательно при оценке идентичности изолятов микроорганизмов, выявленных из различных источников, и нерезультативном применении при этом комплекса традиционных (фенотипических) методов.

9.2. Генетические маркеры, используемые при молекулярно-генетическом типировании ведущих возбудителей ИСМП

Молекулярно-генетическое типирование возбудителей ИСМП основано на выявлении специфических генетических особенностей штаммов возбудителя, общих для штаммов, происходящих из одного источника, и различающихся у штаммов из разных источников - генетических маркеров (маркеров геномного полиморфизма).

Генетические маркеры представляют собой участки нуклеотидных последовательностей ДНК или РНК микроорганизма. К их числу относят различные повторяющиеся последовательности ДНК, сайты узнавания эндонуклеазами рестрикции, мобильные генетические элементы, точечные мутации в отдельных генах «домашнего хозяйства». Ниже приводим краткую информацию о наиболее часто используемых генетических маркерах.

Повторяющиеся последовательности ДНК включают прямые повторы, инвертированные повторы, тандемные повторы и палиндромные последовательности, расположенные группами (кластерами).

Прямые повторы представляют собой повторяющиеся последовательности нуклеотидов, имеющие определенное число копий.

Прямой повтор может выглядеть следующим образом:

5'...ТАСТGGСА ... ТАСТGGСА.. ...3' (цифрами обозначены концы цепи ДНК, образованные 5'-фосфатной и 3'-гидроксильной группами, соответственно)

Инвертированный повтор представляет собой последовательность ДНК, имеющую зеркально расположенную копию:

5'... TGCCTGТА.....АТGACCGT ...3'

Тандемные повторы — тандемно повторяющиеся нуклеотидные последовательности: множественные копии последовательностей (единиц), следующие друг за другом. Например, ТАТАТАТА, это тандемный повтор динуклеотида ТА, CGGCGGCGG – тандемный повтор тринуклеотида CGG. Тандемные повторы в одном локусе у разных штаммов могут отличаться количеством повторяющихся единиц.

Палиндромные последовательности ДНК — последовательности, которые по каждой из цепей ДНК считываются одинаково как слева направо, так и справа налево.

Например, последовательность ДНК АССТАGGT является палиндромной, поскольку ей на комплементарной цепи ДНК соответствует последовательность TGGATССА, и обратный порядок нуклеотидов последовательности TGGATССА соответствует последовательности АССТАGGT.

Благодаря наличию участков, которые комплементарны сами себе, молекулы ДНК, содержащие палиндромы, способны формировать сложные структуры, напоминающие шпильки. Данные структуры, будучи нестабильными, играют важную роль в рекомбинационной изменчивости микроорганизмов.

Перечислим некоторые широко распространенные структурные элементы генома прокариот, содержащие повторяющиеся последовательности:

REP (сокр. англ. Repetitive Extragenic Palindrome). Наиболее распространенные короткие повторяющиеся последовательности. REP-элементы, впервые обнаруженные у *E. coli* и *S. enterica* серовар *Turhimurium*, представляют собой палиндромы длиной 38 п. н. Они присутствуют в количестве 500–1000 копий на хромосому, имеют разную взаимную ориентацию, образуют тандемы или собраны в кластеры до 10 копий каждый. В настоящее время REP- и REP-подобные элементы выявлены у представителей большинства

бактериальных семейств, что позволяет использовать их для внутривидового типирования, в том числе с использованием автоматизированных систем.

ERIC (сокр. англ. Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus). Первоначально *nb* инвертированные повторы длиной 126 п. н. были описаны у энтеробактерий. Затем оказалось, что эти элементы широко распространены у представителей домена Bacteria.

CRISPR (сокр. англ. Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats) — это обнаруженные в ДНК многих видов бактерий прямые повторы протяженностью 24–48 п. н., разделенные короткими вариательными участками — так называемыми спейсерами (считают, что эти участки являются фрагментами фаговой ДНК). В пределах вида штаммы бактерий могут различаться наборами спейсеров.

Примером CRISPR может служить **DR**-локус хромосомы микобактерий туберкулезного комплекса, включающий несколько десятков коротких **прямых повторов** (англ. Direct Repeats) нуклеотидов, разделенных уникальными спейсерами (рис. 1). Полиморфизм этого локуса изучают с помощью метода сполиготипирования.

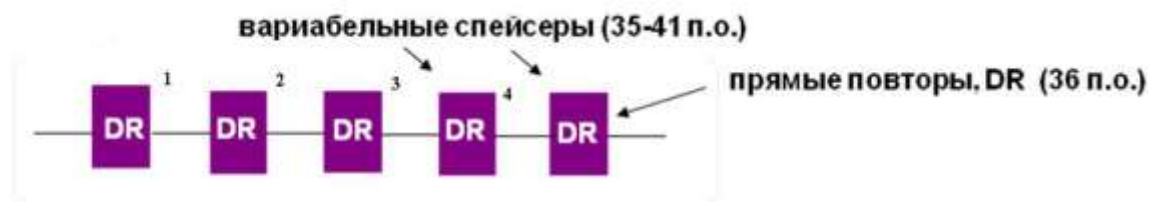


Рис. 1. Структура DR-области хромосомы *Mycobacterium tuberculosis* complex. Схема фрагмента DR-локуса. Прямые повторы (DR) обозначены прямоугольниками; вариательные (по составу нуклеотидов и протяженности) спейсеры (1–4) показаны стрелками

Аналогичные участки обнаружены в геномах *Corynebacterium diphtheriae*, *Streptococcus* группы A, *Salmonella* и других патогенных бактерий.

VNTR-локусы (сокр. англ. Variable Number of Tandem Repeats) содержат различное (вариабельное) число тандемных (сцепленных линейно «голова–хвост») повторов в определенных участках хромосомы (рис. 2).

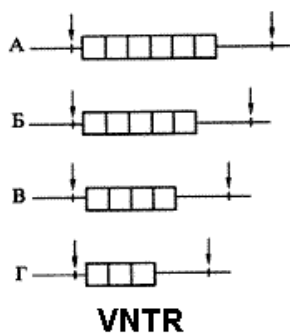


Рис. 2. Тандемные повторы VNTR-локуса. Буквами обозначены изоляты с различным количеством тандемных повторов в VNTR-локусе. Квадратами обозначены тандемные повторы

Полиморфизм межгенной области рибосомного оперона. К особому типу повторяющихся последовательностей можно отнести гены, кодирующие синтез двух фракций рибосомной РНК — **16S** и **23S**. Эти гены, представленные в бактериальных хромосомах несколькими копиями, имеют вариабельную область между геном, кодирующим **16S**, и геном **23S** РНК (рис. 3).



Рис. 3. Вариабельная область между генами рибосомного оперона штаммов 1–3 (схема)

Вариации этой межгенной области позволяют осуществлять межвидовую и внутривидовую дифференциацию штаммов с помощью метода риботипирования.

Сайты узнавания эндонуклеазами рестрикции — это специфические последовательности ДНК, «узнаваемые» особыми ферментами — рестриктазами (эндонуклеазами рестрикции), которые способны разрезать двунитевые молекулы ДНК. В бактериальной клетке они распознают чужеродную ДНК и разрезают ее на фрагменты, выполняя, таким образом, защитную функцию. Каждая рестриктаза распознает только одну, специфическую последовательность нуклеотидов. Например, сайтом узнавания для рестриктазы EcoRI является последовательность G|AATC (вертикальной линией обозначено место разреза), рестриктаза AluI распознает и разрезает последовательность AG|CT.

Рестриктазы, которых в настоящее время известно несколько сотен, используют для рестрикционного анализа молекул ДНК.

Мобильные генетические элементы, широко представленные в бактериальных геномах, представляют собой умеренные бактериофаги, транспозоны, а также IS-элементы (англ. Insertion Sequence) — «встраиваемые последовательности», количество и расположение которых на хромосоме может варьировать у штаммов одного вида. Например, последовательность IS6110 *Mycobacterium tuberculosis*, IS200 — бактерий рода *Salmonella*, IS1548 — *Streptococcus* группы В являются генетическими маркерами штаммов.

Однонуклеотидные полиморфизмы (англ. Single Nucleotide Polymorphism, SNP) — точечные мутации в кодирующих (гены «домашнего хозяйства», гены вирулентности и др.) и не кодирующих последовательностях геномной ДНК служат маркерами для оценки генетической однородности изолятов данного вида с помощью рестрикционного анализа и различных модификаций метода ДНК-секвенирования

9.3. Основные методы молекулярно-генетического типирования, применяемые в системе эпидемиологического надзора за ИСМП.

К числу методов молекулярно-генетического типирования относятся методы, основанные на полимеразной цепной реакции, методы рестрикционного анализа, гибридизации нуклеиновых кислот и ряд методов, основанных на секвенировании.

Как правило, в практических целях при расследовании вспышек используются молекулярно-генетические методы, позволяющие отнести тестируемые изоляты к тому или иному штамму, основываясь на наблюдаемом визуальном наборе «полос» (фрагментов ДНК с разной электрофоретической подвижностью) на электрофореграмме (методы геномной дактилоскопии). Детекция проводится по количеству фрагментов ДНК и их молекулярному весу, который оценивается по молекулярному весу контрольных маркеров и выражается в парах нуклеотидов (bp). Такой индивидуальный набор «полос», являющийся специфическим для каждого изучаемого штамма, называется паттерном или фингерпринтом (фингерпринт - геномный «отпечаток пальца»).

К числу молекулярно-генетических методов, использующих фингерпринты для отнесения культур микроорганизмов к тому или иному штамму, относятся, например, метод RAPD–ПЦР (от англ. Random Amplification of Polymorphic DNA – избирательная амплификация полиморфной ДНК) и метод электрофореза ДНК в пульсирующем поле (кратко «пульс-электрофорез» или PFGE) (см. ниже).

Методы, основанные на полимеразной цепной реакции, являются достаточно широко распространенными при использовании в рутинной практике эпидемиологического надзора и при необходимости принятия экстренных решений (например, при расследовании вспышек) в связи с их относительной простотой, экспрессностью и низкой стоимостью.

К разновидностям метода генотипирования, основанного на ПЦР, относят методы ПЦР с «произвольными» праймерами (RAPD-ПЦР), ПЦР с идентификацией повторяющихся последовательностей ДНК (REP, ERIC-ПЦР), мультилокусный анализ VNTR (Variable Number Tandem Repeat) локусов (MLVA).

Метод RAPD-ПЦР (англ. Random Amplification of Polymorphic DNA) основан на отжиге при невысокой температуре одного праймера с произвольной короткой последовательностью на комплементарных участках обеих цепей ДНК. Число и локализация комплементарных праймеру участков хромосомной ДНК могут варьировать у штаммов одного вида. Как правило, родственные штаммы имеют одинаковые участки отжига праймера, что обеспечивает синтез ПЦР-продуктов различной молекулярной массы, которые выявляются в виде одинакового набора фрагментов на электрофореграмме (рис. 4). Наблюдаемый визуально набор полос на электрофореграмме, являющийся специфическим для каждого изучаемого штамма, называется **паттерном** (или **фингерпринтом** — **геномный «отпечаток пальца»**).

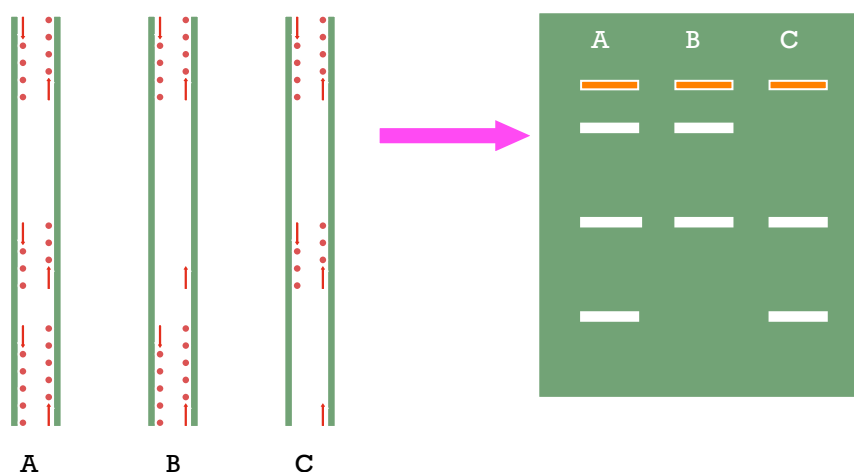


Рис. 4. Схема отжига праймера (слева) и электрофореграмма результата амплификации участков ДНК штаммов А, В, С одного вида (справа). Точками обозначены участки ДНК, которые подвергаются амплификации. Полоски на дорожках А, В, С — продукты ПЦР разного размера, полученные при амплификации разных участков ДНК штаммов А, В, С.

На рис. 5 представлены результаты RAPD-типирования изолятов *Acinetobacter baumannii*, выделенных при вспышке вентилятор-ассоциированной пневмонии в нейрохирургическом стационаре, вызванной единственным штаммом.

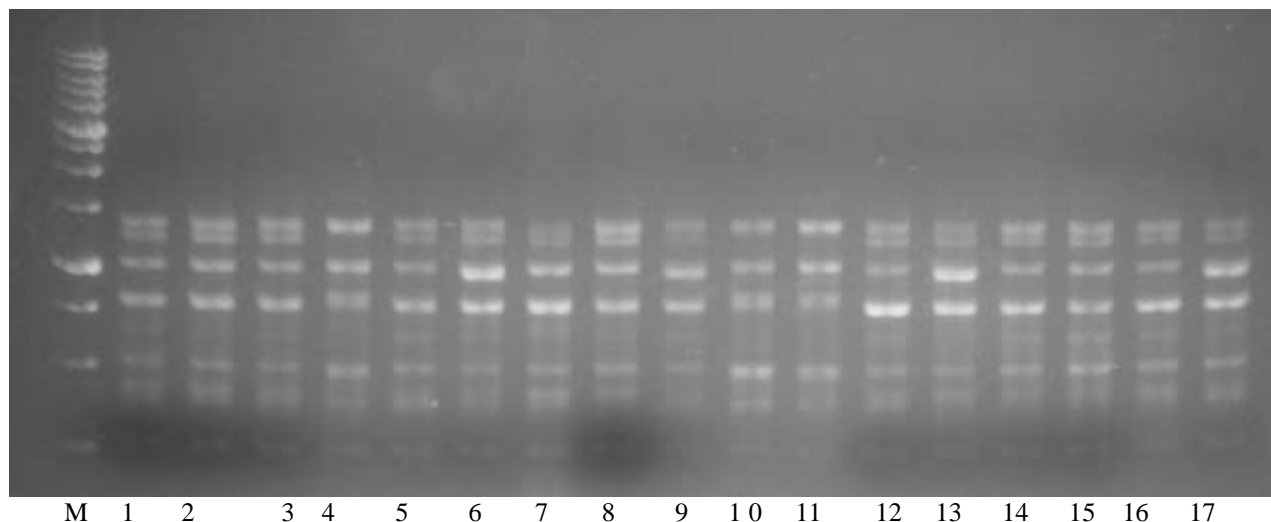


Рис. 5. Электрофореграмма паттернов RAPD-типирования культур *Acinetobacter baumannii*: М — маркер молекулярного веса, 1–17 — номера культур

MLVA-типирование (мультилокусный анализ по VNTR-локусам (участкам с переменным числом тандемных повторов)) основано на идентификации рассеянных в хромосоме VNTR-локусов (участков, содержащих разное число тандемных повторов) при помощи ПЦР. Подобрать праймеры к консервативным концам VNTR-локуса можно, применив метод ПЦР с электрофоретической детекцией, определить его длину и, зная размер входящих в него тандемных повторов, определить их количество.

Поскольку различные изоляты содержат неодинаковое число повторов в VNTR-локусах, информация об их количестве позволяет отнести тестируемые культуры бактерий к тому или иному штамму.

Для повышения информативности и достоверности MLVA-анализа используют не один, а несколько (обычно 5–12) VNTR-локусов в зависимости от видовой принадлежности микроорганизма. Результат анализа записывают в виде цифрового профиля штамма, где каждая цифра обозначает число повторов в каждом VNTR-локусе. Например, результат может выглядеть так:

изолят А — 2 — 16 — 28 — 14 — 5 — 7

изолят В — 2 — 16 — 28 — 14 — 5 — 7

изолят С — 2 — 10 — 32 — 14 — 3 — 1

Изоляты А и В в представленном примере могут быть отнесены на основании MLVA-типирования к одному штамму.

Методы, основанные на анализе рестрикционных профилей ДНК, включают ряд классических методов, которые, несмотря на то, что были разработаны сравнительно давно (несколько десятилетий назад), активно применяются на практике в настоящее время. Генетическими маркерами при использовании этой группы методов являются сайты узнавания рестриктазами, расположенные в плазмидной ДНК (рестрикционный анализ плазмид, RAP), в тотальной геномной ДНК (метод электрофореза в пульсирующем поле) или в ограниченном участке ДНК, амплифицированном методом ПЦР (метод оценки полиморфизма длины рестрикционных фрагментов ПЦР продукта - ПДРФ-ПЦР).

Метод гель-электрофореза в пульсирующем поле (англ. Pulsed Field Gel Electrophoresis, синоним: метод пульс-электрофореза) признан «золотым стандартом» в типировании многих микроорганизмов. Суть данного метода заключается в том, что хромосомную ДНК изолятов микроорганизма расщепляют рестриктазами (часто используют эндонуклеазы рестрикции *SmaI* и *XbaI*) с тем, чтобы получить 10–20 фрагментов. Затем проводят электрофорез таким образом, чтобы направление электрического поля менялось с определенной частотой, т. е. ток подается в импульсном режиме в разных направлениях. В условиях «пульсирующего» электрического поля, в отличие от традиционного электрофореза с постоянным направлением электрического тока, крупные фрагменты ДНК получают возможность мигрировать через поры геля, что позволяет их разделить по массе. Результат электрофореза оценивают при окраске геля бромистым этидием и визуализации в ультрафиолетовом излучении. Профили рестрикции (паттерны) изолятов представляют собой наборы светящихся полос, соответствующих полученным в результате рестрикции фрагментам ДНК. Пульс-электрофорез обладает высочайшей разрешающей способностью, однако длительность, трудоемкость и необходимость использования дорогостоящего оборудования и реактивов ограничивают использование данного метода при расследовании вспышек. При проведении многоцентровых исследований с использованием данного метода требуется проведения внешнего контроля качества. **Категория 2 (уровень доказательности - 3)** [6].

Различные методы генотипирования часто сочетают с гибридной детекцией последовательностей ДНК. Для этого полученные фрагменты ДНК подвергают электрофорезу в агарозном геле, затем при помощи процедуры, которая по имени автора называется переносом по Саузерну (или Саузерн-блоттинг), переносят из геля на специальную нитроцеллюлозную мембрану и гибридизуют с **зондом** — комплементарной короткой последовательностью ДНК, меченой радиоактивной или нерадиоактивной меткой.

Продукты гибридизации визуализируют путем автордиографии (в случае радиоактивного зонда) на светочувствительной пленке или оценивают окрашенные фрагменты на мембране.

В качестве зондов часто используют меченые фрагменты IS-элементов, последовательности рибосомного оперона 16S–23S (метод риботипирования), другие последовательности (например, спейсеры DR-локуса *Mycobacterium tuberculosis* complex).

Анализ полиморфизма DR-локуса (участка, содержащего прямые повторы) хромосомы изолятов микобактерий туберкулеза называется методом **сполиготипирования**. Сполиготипирование (англ. spoligotyping, spacer oligonucleotide typing) основано на детекции 43 последовательностей, находящихся между прямыми повторами (direct repeats) линейно расположенных на хромосоме *Mycobacterium tuberculosis* complex. Данные последовательности называются спейсерами.

В ходе исследования продукты амплифицированного в ПЦР фрагмента DR-локуса исследуемых изолятов, помеченные специальным реагентом — биотином, гибридизуют с 43 спейсерными последовательностями, последовательно нанесенными на специальную мембрану, которую затем экспонируют на светочувствительной фотографической пленке. В случае если гибридизация произошла, биотин засвечивает фотографическую пленку. По наличию или отсутствию в определенных участках пленки темных пятен судят о присутствии или отсутствии у штаммов (изолятов) соответствующих спейсеров (рис. 6).

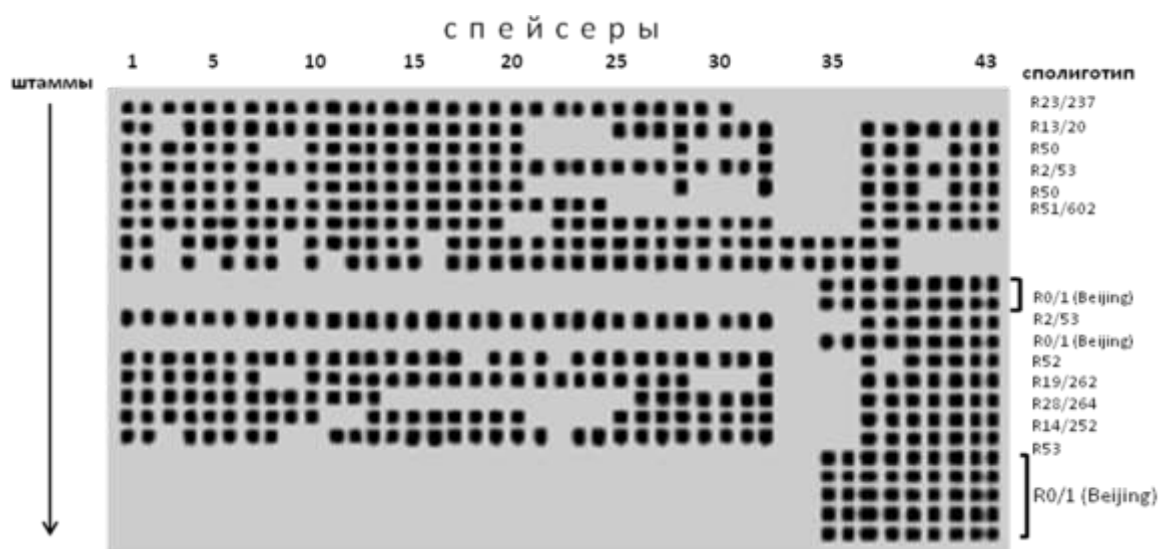


Рис. 6. Профили сполиготипирования 20 штаммов *Mycobacterium tuberculosis* complex как результат гибридизационного анализа. Черными квадратами обозначены выявленные спейсеры.

Как видно на рисунке, каждый штамм характеризуется определенной комбинацией спейсеров (черных пятен на фотографической пленке), т. е. имеет определенный **сполиготип**. Сполиготипы, имеющие незначительные отличия друг от друга по содержанию спейсеров, группируются в **генетические семейства** (известно, например, широко распространенное генетическое семейство Beijing, которое объединяет наиболее вирулентные и резистентные к терапии штаммы микобактерии туберкулеза). Сполиготипирование в комплексе с другими методами молекулярно-генетического типирования может быть использовано при расследовании случаев внутрибольничного инфицирования туберкулезом.

К числу гибридизационных технологий относят генотипирование с использованием **генетических чипов (ДНК-микрочипов)**, которые позволяют с высочайшей степенью достоверности одновременно определять десятки или даже сотни **однонуклеотидных полиморфизмов** и других генетических маркеров.

К основанию каждой из микроскопических ячеек чипа (пластинки размером около 1 см²) прикреплен олигонуклеотидный зонд, комплементарный какой-либо последовательности ДНК или фрагменту какого-либо гена. Гибридизация исследуемой ДНК с использованием генетического чипа позволяет одновременно протестировать наличие или отсутствие нескольких сотен кодирующих последовательностей (генов) или не кодирующих последовательностей, являющихся генетическими маркерами. Таким образом, одновременно можно получить информацию о большом количестве мобильных генетических элементов или генов вирулентности, что является весьма важным при генетическом типировании с эпидемиологическими целями.

Наиболее точными и, по-видимому, наиболее перспективными становятся **методы молекулярного типирования, основанные на секвенировании ДНК** — определении первичной последовательности нуклеотидов (**сиквенса**) в одном вариабельном (однолокусное секвенирование) или нескольких (мультилокусное секвенирование, MLST) участках. При этом изоляты с одним и тем же сиквенсом (например, с одинаковым спектром мутаций) относят к одному штамму.

Современные варианты секвенирования основаны на ПЦР, в которой используются специальные нуклеотиды (2',3'-дидезоксинуклеотиды — ddNTP), способные при встраивании в цепочку ДНК в случайном месте блокировать ее дальнейший синтез. Раствор ДНК, содержащий последовательность, которую предполагается прочесть, и подходящий к ней праймер, распределяют по четырем пробиркам, в каждой из которых находятся четыре дезоксинуклеотида, dATP, dCTP, dGTP и dTTP, и один из четырех 2',3'-

дидезоксинуклеотидов (ddATP, ddTTP, ddGTP или ddCTP). Дидезоксинуклеотид включается по всем позициям в смеси растущих цепей, и после его присоединения рост цепи сразу останавливается. В результате этого в каждой из четырех пробирок при участии ДНК-полимеразы образуется уникальный набор олигонуклеотидов разной длины, включающих праймерную последовательность.

Для автоматического секвенирования используют ddNTP, меченые флуоресцентными красителями. Чтение последовательности ДНК происходит в процессе электрофореза, например в тонких капиллярных трубках, заполненных гелем. При этом луч лазера в определенном месте геля возбуждает флуоресценцию красителей, и детектор определяет, какой нуклеотид в настоящий момент мигрирует через гель. Результаты секвенирования выглядят как график (хроматограмма), где каждому нуклеотиду соответствует определенный пик флуоресценции.

Полученная первичная информация подвергается компьютерной обработке с помощью специального программного обеспечения.

Для большинства патогенов сейчас разработаны унифицированные методы однолокусного или многолокусного (MLST) секвенирования — типирования, результаты которых могут быть внедрены в международные компьютерные базы данных, доступные online.

В последнее время в практику активно внедряются технологии **секвенирования нового поколения** (next generation sequencing, NGS), которые позволили существенно повысить производительность секвенирования и удешевить эту процедуру. С помощью секвенирования нового поколения расшифрованы геномы множества микроорганизмов — возбудителей инфекционных заболеваний.

9.4. Принципы выбора метода молекулярно-генетического типирования для решения практических задач эпидемиологического надзора за ИСМП.

Выбор методов генетического типирования для молекулярно-генетического мониторинга определяется задачами, поставленными в рамках эпидемиологического надзора за ИСМП.

Для оперативного анализа локальных эпидемических вспышек используются быстрые и относительно дешевые методы, как правило, основанные на ПЦР (например, RAPD-ПЦР, ПЦР-RFLP и т. п.).

Методы, имеющие высокую разрешающую способность и высокую межлабораторную воспроизводимость результатов, могут быть применены для оценки циркуляции международных эпидемических клонов, слежения за ходом эволюции тех или иных генетических линий возбудителей ИСМП, а также как референтные методы в сомнительных

случаях. К ним можно отнести методы, основанные на секвенировании (мультилокусное или однолокусное секвенирование-типирование), электрофорез в пульсирующем электрическом поле.

9.5. Молекулярно-эпидемиологический мониторинг механизмов резистентности возбудителей ИСМП к антимикробным препаратам.

Неотъемлемой частью молекулярно-эпидемиологического мониторинга является слежение как за фенотипами резистентности возбудителей ИСМП к АМП, так и за механизмами резистентности, имеющими клиническое и эпидемиологическое значение. Европейская система надзора за резистентностью к АМП (EARS-Net) включает мониторинг циркуляции выделенных из крови и ликвора штаммов *E.coli*, *K.pneumoniae*, *P.aeruginosa*, *Acinetobacter* spp., *S.pneumoniae*, *S. aureus*, *E.faecalis*, *E.faecium*, устойчивых к клинически важным антибиотикам: цефалоспорином, карбапенемам, гликопептидам, фторхинолонам и аминогликозидам (таблица 1). <http://ecdc.europa.eu/en/publications/Publications/antimicrobial-resistance-surveillance-europe-2013.pdf>)

Особое значение при мониторинге уделяют штаммам:

- метициллинрезистентных *S.aureus* (MRSA);
- *E.coli* и *K.pneumoniae*, продуцирующим БЛРС и устойчивым к карбапенемам;
- *P.aeruginosa* и *Acinetobacter* spp., устойчивым к карбапенемам;
- *E.faecalis* и *faecium*, устойчивым к гликопептидам (ванкомицин-резистентные *Enterococcus*, VRE).

Изучение механизмов резистентности микроорганизмов к АМП проводится с использованием как фенотипических (подтверждающие тесты в формате диско-диффузионного метода, латекс-агглютинация и др.), так и молекулярно-генетических методов (детекция генов, ответственных за конкретные механизмы резистентности).

Врач-бактериолог использует фенотипические методы, которые позволяют оценить чувствительность бактерий к АМП и предположить конкретный механизм резистентности. В большинстве случаев достаточно определять чувствительность к набору АМП, рекомендованному нормативными документами, действующими в РФ. При повседневном тестировании штаммов возбудителей ИСМП и других заболеваний некоторые препараты (не применяемые для лечения) внесены в «обязательный» перечень для того, чтобы выявить определенный механизм резистентности.

Например, для детекции у штаммов *Staphylococcus* spp. устойчивости к бета-лактамам препаратам, обусловленной наличием ПСБ2а (так называемые метициллинрезистентные *Staphylococcus*), следует определять чувствительность к цефокситину, как наиболее чувствительному препарату, позволяющему выявить данный механизм (ранее для этих целей использовали оксациллин).

Таблица 1.

Классы АМП, резистентность к которым возбудителей ИСМП является клинически и эпидемиологически значимой и подлежит молекулярно-генетическому мониторингу

	<i>Escherichia coli</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Acinetobacter baumannii</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Enterococcus faecalis/ faecium</i>
1	Аминопенициллины ЦРС ¹ Карбапенемы Фторхинолоны Аминогликозиды	ЦРС ¹ Карбапенемы Фторхинолоны Аминогликозиды	ЦРС ¹ Карбапенемы Фторхинолоны Аминогликозиды	Карбапенемы Фторхинолоны Аминогликозиды	Бета-лактамы Фторхинолоны Рифампицин Линезолид Ванкомицин	Ампициллин Гликопептиды Аминогликозиды
2	Множественная резистентность - устойчивость к препаратам нескольких классов					

¹ ЦРС- цефалоспорины расширенного спектра

Для выявления штаммов *Enterobacteriaceae*, продуцирующих БЛРС, рекомендовано одновременное тестирование двух наиболее чувствительных препаратов из группы цефалоспоринов 3-4 поколения: цефтазидима и цефотаксима.

Чтобы достоверно выявить штаммы *Enterobacteriaceae*, продуцирующие карбапенемазы, из группы карбапенемов следует тестировать меропенем как препарат, обладающий достаточной чувствительностью и специфичностью для выявления этого механизма резистентности.

Устойчивость к фторхинолонам (ципрофлоксацину, норфлоксацину, левофлоксацину и др.), которая в настоящее время широко распространена у штаммов *Enterobacteriaceae* и обусловлена, как правило, мутациями в определенном регионе хромосомы, достоверно выявляется при тестировании наиболее «раннего» хинолона - налидиксовой кислоты. Выявленная устойчивость к этому препарату (несмотря на результат лабораторного исследования «чувствительный» к фторхинолонам) позволяет прогнозировать неудовлетворительный исход лечения фторхинолонами ОКИ и ИМВП.

При решении эпидемиологических задач по ограничению распространения резистентных штаммов/генов резистентности в популяции возбудителей ИСМП большое значение имеют результаты так называемых «подтверждающих» тестов и молекулярно-генетическая детекция механизмов резистентности.

В настоящее время молекулярные методы являются эффективным инструментом экспресс диагностики механизмов резистентности бактерий к АМП и широко используются в научных исследованиях. Применение этих методов для микробиологического мониторинга в системе эпидемиологического надзора за ИСМП позволяет существенно повысить эффективность и скорость выявления механизмов резистентности, имеющих существенное клиническое и эпидемиологическое значение. Это условие в полной мере относится к детекции MRSA, VRE, БЛРС и карбапенемаз.

Молекулярные методы, направленные на выявление механизмов резистентности возбудителей ИСМП, как правило, основаны на ПЦР с электрофоретической детекцией, ПЦР в режиме реального времени, а также ПЦР с гибридизацией на ДНК-чипах. Преимуществом этих методов является высокая скорость получения результатов, высокая стандартизованность и невысокая трудоемкость. В РФ зарегистрированы отечественные наборы реагентов для выявления некоторых механизмов резистентности возбудителей ИСМП методом мультиплексной ПЦР в режиме реального времени (Таблица 2).

Таблица 2. Методы детекции основных возбудителей ИСМП и механизмов резистентности к АМП

Патоген	Фенотип резистентности	Методы выявления патогена/ тест-системы		Методы генотипирования
		Детекция фенотипа	Детекция детерминант резистентности	
<i>S.aureus</i>	MRSA ¹	Хромогенные среды Чувствительность к цефокситину	Ген <i>mecA</i> : ПЦР-РВ ⁴ («Амплисенс MRSA-скрин-титр-FL»), Интерлабсервис)	spa-сиквенс-типирование [7] RAPD-ПЦР [8] MLVA [9, 10] MLST [11]; PFGE
<i>Enterococcus</i> spp.	VRE ²	Хромогенные среды Чувствительность к ванкомицину	Гены <i>vanA</i> , <i>vanB</i> : ПЦР-ЭФ ⁵ [12, 13, 14]	RAPD-ПЦР [15] MLST [16]
<i>E.coli</i> <i>K.pneumoniae</i>	Продуценты БЛРС ³	Хромогенные среды; Чувствительность к цефтазидиму и цефотаксиму; Синергизм с ингибитором; MALDITOF MS ⁶	Гены <i>bla</i> _{CTX-M} , <i>bla</i> _{TEM} , <i>bla</i> _{SHV} и др.: ПЦР-РВ ⁴ , ПЦР-ЭФ ⁵	RAPD-ПЦР [17] MLST [18; 19, 20] PFGE [21]
	Продуценты карбапенемаз	Хромогенные среды; Чувствительность к меропенему; Синергизм с ингибиторами; CarbaNP-тест; MALDITOF MS ⁶	Гены <i>bla</i> _{VIM} , <i>bla</i> _{IMP} , <i>bla</i> _{NDM} , <i>bla</i> _{KPC} , <i>bla</i> _{OXA-48} и др.: ПЦР-РВ ⁴ («Амплисенс MBL-FL»), «Амплисенс MDR KPC/OXA-48-FL»), Интерлабсервис)	
<i>Pseudomonas</i> spp.	Продуценты карбапенемаз	Хромогенные среды; Чувствительность к меропенему и имипенему; CarbaNP-тест; MALDITOF MS ⁶	Гены <i>bla</i> _{VIM} , <i>bla</i> _{IMP} , <i>bla</i> _{NDM} , и др.: ПЦР-РВ ⁴ («АмплиСенс® MDR MBL-FL»), Интерлабсервис)	RAPD-ПЦР [22] MLST [23]
<i>Acinetobacter</i> spp.	Продуценты карбапенемаз	Хромогенные среды; Чувствительность меропенему и имипенему; CarbaNP-тест; MALDITOF MS ⁶	Гены <i>bla</i> _{OXA-23} , <i>bla</i> _{OXA-58} , <i>bla</i> _{OXA-40/24} : ПЦР-РВ ⁴ (Интерлабсервис, тест-система в процессе разработки)	MLST [24] RAPD-ПЦР [25]

Примечания к таблице 2.

¹ MRSA – метициллин-резистентный *S.aureus*; штаммы имеют модифицированный пенициллин-связывающий белок ПСБ2а (гены *mecA*, *mecC*), который обуславливает устойчивость ко всем бета-лактамам антибиотикам (пенициллинам, цефалоспорином, карбапенемам).

² VRE – ванкомицин-резистентный *Enterococcus faecalis/faecium*.

³БЛРС-бета-лактамазы расширенного спектра

⁴ПЦР-РВ – ПЦР в режиме реального времени;

⁵ ПЦР-ЭФ· ПЦР с электрофоретической детекцией

⁶MALDITOF MS - времяпролетная масс-спектрометрия

Для детекции метициллин-резистентных *Staphylococcus* (как *S.aureus*, так и КНС) разработан набор реагентов для ПЦР-РВ «Амплисенс MRSA-скрин-титр-FL», который позволяет выявить видоспецифический ген *S.aureus* и ген *mecA*, обуславливающий устойчивость к бета-лактамам. Набор «АмплиСенс®MBL- FL» позволяет выявлять гены металло-бета-лактамаз групп VIM, IMP и NDM, набор «АмплиСенс®MDR KPC/OXA-48-FL» - гены карбапенемаз групп KPC и OXA-48, характерные для энтеробактерий. Кроме того, в настоящее время разрабатывается набор, направленный на выявление генов OXA-карбапенемаз, характерных для *Acinetobacter* spp. (группы OXA-23-подобных, OXA-58-подобных и OXA-40/24-подобных). Преимуществом данных наборов является возможность анализировать различные образцы – чистые культуры, гемокультуры, посев ликвора на среду обогащения, а также исходный биологический материал (например, мочу при острых инфекциях мочевыводящих путей или мазки со слизистых оболочек ротоглотки и прямой кишки), что делает их незаменимым инструментом при проведении скрининга или эпидемиологических исследований. Наборы обладают высокой чувствительностью и специфичностью.

Еще одним аспектом проблемы антибиотикорезистентности является глобальное распространение определенных полирезистентных генетических клонов микроорганизмов. В силу сочетания различных факторов (множественная устойчивость к АМП и дезинфектантам, вирулентность, выживаемость в окружающей среде и др.) те или иные генетические линии (клоны) микроорганизмов становятся более «успешными», чем другие представители этого вида и начинают доминировать в популяции возбудителей (как внебольничных, так и внутрибольничных). Многие возбудители ИСМП, выделяемые в настоящее время на территории РФ, принадлежат к международным эпидемическим клонам.

Широкое развитие авиасообщений приводит к тому, что сегодня в российский стационар может поступить пациент, который несколько дней назад находился в стационаре в другой части света. Госпитализация нередко сопряжена с риском инфицирования полирезистентными клонами микроорганизмов, которые перемещаются вместе с пациентами из стационаров одной страны в стационары другой страны, где они ранее не циркулировали. В этих условиях в каждом стационаре первостепенное значение приобретает изучение не только устойчивости возбудителей ИСМП к АМП, но и их принадлежности к определенным молекулярным типам (генетическим линиям, клонам). Современные методы генотипирования (особенно основанные на секвенировании) позволяют достаточно быстро получить результаты, которые можно сравнить с международными базами данных.

Многоцентровые исследования, проводимые в последние годы в стационарах России, показали, что доминирующими молекулярными сиквенс-типами *S.aureus* (при генотипировании методом MLST) являлись ST239 и ST8 - эволюционно успешные клоны, широко распространенные во всем мире. Среди этих генетических линий встречаются как метициллин-чувствительные, так и метициллин-устойчивые штаммы; как внутрибольничные, так и внебольничные штаммы [26].

В настоящее время во многих странах среди штаммов *E.coli*, вызывающих ИСМП, значительную долю занимает клон *E.coli* ST131 O25:H4, характеризующийся устойчивостью к ЦРС (за счет продукции БЛРС СТХ-М15) и фторхинолонам (за счет двух хромосомных мутаций в генах *qyrA* и *parC*) [27].

Среди штаммов *K.pneumoniae*, устойчивых к карбапенемам, в странах Европы, Израиле, США и Китае доминирует клон ST258, продуцирующий карбапенемазу KPC-2. Другие генетические линии (ST147, ST383, ST133, ST274 и ST323) занимают значительно меньшее место [28, 29]. Сведений о циркуляции таких штаммов в РФ пока нет.

С 1997 г. в стационарах России, Беларуси и Казахстана установлена циркуляция международного клона *P.aeruginosa* ST235 [30]. Штаммы, относящиеся к этому сиквенс-типу, характеризуются множественной резистентностью, в том числе устойчивы к карбапенемам и являются донором генов МБЛ (чаще всего VIM-2, а также IMP), вызывают ИСМП у пациентов хирургических и ожоговых отделений [31, 32].

Таким образом, молекулярно-генетическая характеристика штаммов с использованием комплексного подхода, включающего фенотипические и молекулярные методы, позволяет проводить молекулярно-эпидемиологический мониторинг в системе эпидемиологического надзора за возбудителями ИСМП.

9.6. Взаимодействие лабораторий ЛПМО и научных лабораторий, выполняющих функции референсных центров.

Учитывая технические и методические возможности, имеющиеся в лабораториях ЛПМО и научных организаций, представляется целесообразным дифференциация видов исследований на различных уровнях (этапах) проведения молекулярно-генетического мониторинга.

На первом этапе в рамках рутинного микробиологического мониторинга (мониторинга антибиотикорезистентности), проводимого в ЛПМО, отбираются штаммы, имеющие идентичный или сходный профиль внутривидового типирования, проведенного с использованием методов, доступных лаборатории ЛПМО (антибиотикотипирование, фаготипирование и т.п.). Затем данные штаммы подвергаются генетическому

типированию доступными методами, основанными на ПЦР (MLVA, RAPD). Штаммы, отнесенные к одной и той же клональной линии по результатам генетического типирования с учетом данных эпидемиологического наблюдения в стационаре, могут быть интерпретированы как госпитальные штаммы. Генетическое типирование на данном этапе могут выполнять как лаборатории стационаров, использующие в своей практике метод ПЦР, так и лаборатории, выполняющие функции региональных центров по мониторингу за возбудителями внутрибольничных инфекций (референс-лаборатории).

Следующий этап предполагает типирование репрезентативных выборок из наиболее распространенных в стационарах региона госпитальных штаммов методами основанными на секвенировании-типировании (spa-сиквенстипирование, MLVA), методом PFGE или иными методами с высокой дискриминирующей способностью. В результате, региональные и национальные референс-лаборатории получают возможность осуществлять слежение за динамикой распространения в регионе штаммов, отнесенных к международным клональным линиям (эпидемическим или пандемическим клоном).

Таким образом, локальный молекулярно-генетический мониторинг включает идентификацию госпитальных штаммов методами, основанными на ПЦР (MLVA, RAPD). Молекулярно-генетический мониторинг, осуществляемый на региональном и национальном (глобальном) уровнях, должен быть направлен на идентификацию эпидемических клонов, анализ их происхождения и связи с другими географическими регионами с использованием международных баз данных.

Передача микроорганизмов в референс – лабораторию должна осуществляться при наличии показаний к молекулярно-генетическому типированию, представленных в п.8.1.

При необходимости длительного хранения культур от момента выделения до отправки в референс - лабораторию выделенные микроорганизмы следует хранить в лаборатории ЛПМО в пробирках со средой для хранения (например триптазо-соевом бульоне с добавлением 15% глицерина) при температуре -18 - 20° С (в морозильной камере холодильника). Допустимо также хранение культур в столбиках полужидкого агара при температуре +4 - +7° С.

Лаборатории ЛПМО предоставляют культуры в пробирках в столбиках полужидкого агара или используют для передачи культур транспортные системы с транспортной средой (например, со средой Стюарта).

Информация о передаваемых культурах

Каждая культура должна сопровождаться направлением, содержащим информацию о больном, сведения о характере гнойно-септической инфекции, обусловленной

выделенным микроорганизмом, о предполагаемых факторах риска колонизации данным микроорганизмом.

Информация о пациентах является конфиденциальной и поэтому, в графе ФИО приводятся только инициалы пациента, которые будут зашифрованы в процессе дальнейшей обработки данных.

Далее указываются наименование учреждения и лаборатории, ФИО лица, направившего культуру, номер культуры по журналу и дата ее отправки в референс- лабораторию.

Образец карты сбора информации на культуру микроорганизма, передаваемую в референсную лабораторию приведен в приложении 2.

Референсная лаборатория предоставляет заинтересованным сторонам заключение по результатам проведенных исследований, в котором должна быть представлена следующая информация:

- количество изученных полученных культур микроорганизмов;
- краткое описание используемой методики генотипирования с указанием используемого оборудования и программного обеспечения, при использовании метода прямого секвенирования — размеров и расположения анализируемых участков генома;
- при использовании методик, результаты которых имеют форму паттернов (фингерпринтов) (MLVA, PFGE) — графическое представление полученных результатов в виде электрофореграммы и дендрограммы (филогенетического дерева), полученной в результате анализа паттернов типирования.

10. МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЙ МОНИТОРИНГ ВОЗБУДИТЕЛЕЙ ИСМП, ПРОВОДИМЫЙ В ЛАБОРАТОРИЯХ, ВЫПОЛНЯЮЩИХ ФУНКЦИИ РЕФЕРЕНСНЫХ.

10.1. Идентификация международных эпидемических клонов возбудителей ИСМП.

Идентификация международных эпидемических клонов возбудителей осуществляется на основании сопоставления данных молекулярно-генетического типирования, проведенного в референс-лаборатории, с данными, представленными в международных электронных базах данных генотипов микроорганизмов, или на основании сравнения с данными, полученными в других регионах (другими референсными лабораториями).

В настоящее время для решения задач «глобальной эпидемиологии» и слежения за распространением международных эпидемических клонов возбудителей активно применяются базы данных, основанные на использовании метода мультилокусного

секвенирования — типирования (MLST): www.mlst.net и www.pubmlst.org, а также базы данных Парижского института Пастера www.pasteur.fr/recherche/genopole/PF8/mlst.

Эти базы данных позволяют сопоставлять полученные исследователем результаты MLST-типирования с уже имеющимися в них данными. Имеется возможность выбора данных по географии штаммов, подвергшихся типированию, по типу клинических проявлений (например, можно выбрать только инвазивные изоляты), по типу эпидемиологических проявлений, связанных с ними (например, можно выбрать спорадические или эпидемические штаммы). Кроме того, имеется возможность построить при помощи алгоритма eBURST дендрограмму, отражающую филогенетические взаимоотношения штаммов, выбранных по заданному критерию. Например, на рис. 7 представлено филогенетическое дерево штаммов *S.aureus*, выделенных в России.

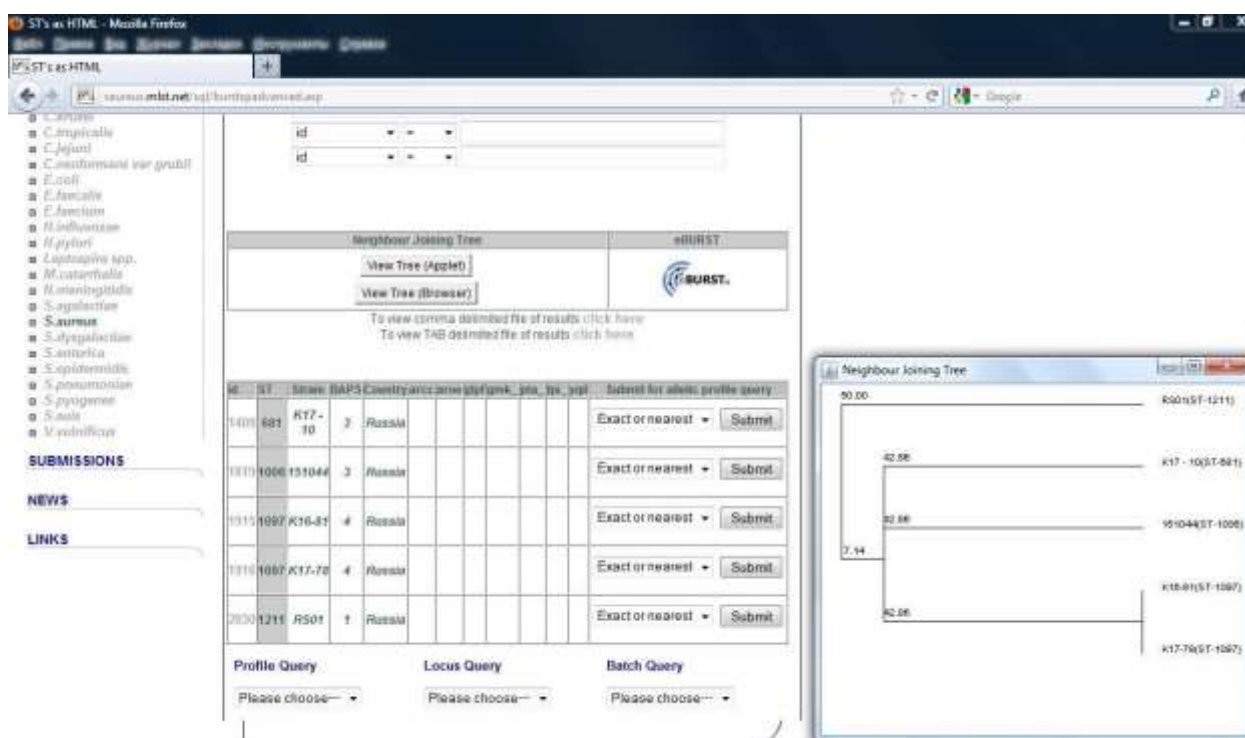


Рис. 7. Вид страницы базы данных www.mlst.net, содержащей дендрограмму, построенную с использованием алгоритма eBURST

Аналогичными возможностями обладают базы данных, основанные на использовании других методов генотипирования. Например, в отношении *S.aureus* хорошо зарекомендовал себя метод секвенирования одного переменного гена поверхностного протеина А (т. н. метод sra-секвенирования). Данный ген имеет множество вариантов (аллелей) в зависимости от числа и состава прямых повторов в нем. Электронная база данных sra-типов доступна по адресу <http://spa.ridom.de>.

При сопоставлении результатов типирования методом MLVA используют базу данных MLVAbank (<http://mlva.u-psud.fr/mlvav4/genotyping/>).

10.2. Использование методов филогенетического анализа при молекулярно-генетическом типировании возбудителей ИСМП.

В настоящий момент считается установленным, что возбудители ИСМП в ходе циркуляции в стационарах подвержены генетическим изменениям, выражающимся в формировании подтипов внутри доминирующего клона. Так, например, штаммы MRSA, сохраняющие свой паттерн PFGE-типирования при многочисленных пересевах *in vitro*, при циркуляции в условиях стационара генерируют множество подтипов, связанных с доминирующим PFGE-типом, причем наиболее активно этот процесс идет в течение эпидемиологически «турбулентных» периодов вспышек [33, 34]. Предполагается, что данный феномен связан с приобретением крупных мобильных генетических элементов, таких как транспозоны.

В связи с данным обстоятельством, установление эпидемиологических связей и отнесение тестируемых изолятов к одному штамму (клональной линии) на основании молекулярно-генетического типирования должно включать в себя количественную оценку степени генетического родства между изолятами с помощью филогенетического анализа.

Филогенетический анализ основан на оценке эволюционных дистанций - т.е. количества генетических изменений у сравниваемых изолятов (например, относительного количества нуклеотидных замен в молекуле ДНК или РНК). Чем меньше эволюционные дистанции между сравниваемыми культурами микроорганизмов, тем более они родственны друг другу и тем более вероятным является отнесение их к одному госпитальному или эпидемическому штамму.

Степень филогенетического родства между штаммами микроорганизмов может быть отображена графически в виде дендрограммы (филогенетического дерева).

Дендрограммы, используемые в молекулярной эпидемиологии, строят на основании эволюционных дистанций, полученных в результате генотипирования. Существует ряд компьютерных программ, позволяющих построить филогенетические деревья на основании данных генетического типирования.

Например, соответствующая функция построения дендрограмм по качественным признакам (таким, как наличие или отсутствие полос на электрофореграмме при использовании метода PFGE или RAPD) представлена на интернет-ресурсе http://insilico.ehu.es/dice_upgma.

Для построения дендрограммы с использованием данного интернет-ресурса необходимо закодировать результаты генетического типирования. При этом каждой полосе (бэнду) в паттерне генотипирования (полученного при проведении PFGE или RAPD) соответствует значение «1» – если полоса (ПЦР-продукт) соответствующей молекулярной массы присутствует в паттерне и значение «0» - если полоса (ПЦР-продукт) соответствующей молекулярной массы отсутствует в паттерне. Обозначение паттернов типирования, в этом случае может выглядеть следующим образом:

Штамм1: 0;1;1;0;0;1;1;0;1;0;1;1;1;0;0;1;0;0;0;1;1;1;0;1;

Штамм 2: 0;1;1;0;0;1;1;0;1;0;1;1;1;0;0;1;0;0;0;1;1;0;0;1;

Штамм 3: 0;1;1;0;0;1;1;0;1;0;1;1;1;0;0;1;0;0;0;1;1;0;1;1;

Штамм 4: 0;1;1;0;0;1;1;0;1;0;1;1;1;0;0;1;0;0;0;1;1;0;0;1;

Штамм 5: 0;1;1;0;0;1;1;0;1;0;1;1;1;0;0;1;0;0;1;1;1;0;0;1;

Штамм 6: 0;1;1;0;0;1;1;0;1;0;1;1;1;0;0;1;0;0;0;1;1;0;0;1;

Штамм 7: 0;1;1;0;0;1;1;0;1;0;1;1;1;0;0;1;0;0;0;1;1;0;0;1;

а дендрограмма, построенная по результатам генотипирования, приведенного в примере выглядит следующим образом:

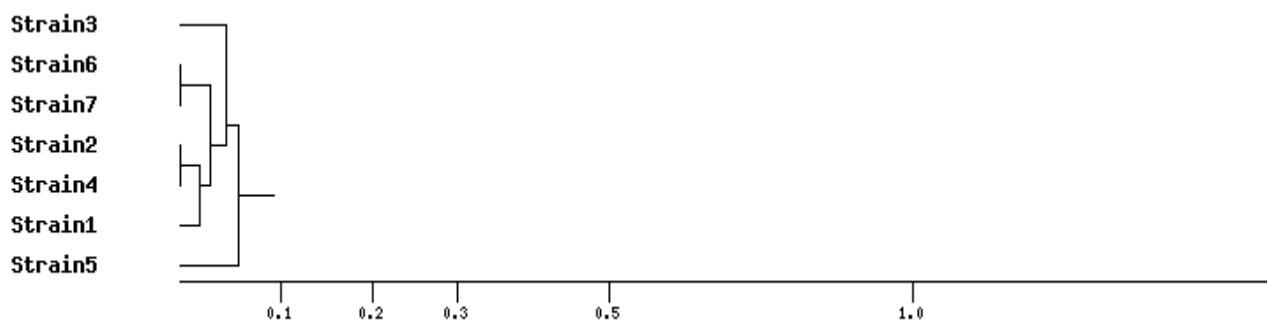


Рис. 8. Пример построения филогенетического дерева методом UPGMA с использованием интернет-ресурса http://insilico.ehu.es/dice_upgma. Шкала снизу обозначает относительное генетическое расстояние (эволюционную дистанцию) между сравниваемыми штаммами.

Наиболее достоверным способом установления филогенетического родства между штаммами является использование результатов секвенирования одного или нескольких переменных генов (однолокусное и многолокусное секвенирование - типирование).

Кластеризация результатов секвенирования – типирования и построение дендрограмм может быть проведена с использованием различных компьютерных программ, в частности пакета программ MEGA [35]. Использование данной программы является бесплатным, дистрибутив программы доступен для скачивания по адресу URL:<http://www.megasoftware.net/mega.php>. (дата обращения 12.11.2014).

После построения дендрограммы необходимо оценить ее топологию (расположение ветвей и наличие кластеров штаммов). Изоляты, находящиеся в одном кластере, как правило, относят к одному эпидемическому штамму (клону) или клональному комплексу, поскольку филогенетическое родство входящих в кластер изолятов фактически означает, что между ними существовали эпидемические связи.

В зависимости от топологии филогенетического дерева различают звездообразную (star-like) или кактусообразную (cactus-like) филогению.

Для звездообразной филогении характерно наличие на дендрограмме коротких внутренних ветвей при относительно длинных внешних ветвях, т. е. различные филогенетические линии отпочковываются практически из одной точки.

Кактусообразная филогения характеризуется наличием длинных внутренних ветвей, которые отделяются через значительные промежутки времени.

Звездообразная филогения характерна для периода эпидемического распространения, при этом предэпидемический период до момента появления высококонтагиозного эпидемического клона будет характеризоваться кактусообразной филогенией.

10.3. Применение методов полногеномного секвенирования в структуре эпидемиологического надзора за возбудителями ИСМП.

Секвенирование целых геномов микроорганизмов позволяет получить наиболее полную информацию о генетических особенностях изучаемых штаммов, включая наличие отдельных генов и мобильных генетических элементов, определяющих патогенный и эпидемический потенциал изучаемого штамма. Полногеномное секвенирование может быть использовано при изучении молекулярной эпидемиологии возбудителей ИСМП, для верификации филогенетических связей между эпидемическими штаммами, циркулирующими в различных географических регионах. При этом проводят сравнение геномов эпидемических штаммов, идентифицированных в различных географических регионах и выявляют кластеры штаммов, на основании которых судят о степени генетического родства штаммов, циркулирующих на различных территориях.

Аннотирование (расшифровка) геномов микроорганизмов может быть проведена в автоматическом режиме с использованием сервиса, представленного на web-ресурсе RAST (<http://rast.nmpdr.org>). Поиск генов антибиотикорезистентности в секвенированных бактериальных геномах может быть проведен с использованием программы ResFinder 2.0 (<http://cge.cbs.dtu.dk/services/ResFinder/>), генов вирулентности – с использованием программы PathogenFinder (<http://cge.cbs.dtu.dk/services/PathogenFinder/>).

ПРИЛОЖЕНИЕ 1.

Карта сбора данных о штаммах микроорганизмов, передаваемых в референс-лабораторию для молекулярно-генетического типирования

Учреждение _____
 Лаборатория _____ Направил(а) _____ (ФИО)
 Номер штамма по журналу _____ Дата отправки штамма _____

Материал (отметить)

кровь	
рана	
моча	
отделяемое по дренажу	
аспират БАЛ	
мокрота	
спинномозговая жидкость	
биопсия	
кал	
отделяемое половых органов	
секрет предстательной железы	
аутопсийный материал	
другое (впишите)	

Вид микроорганизма (указать) _____

Дата забора материала _____

Цель проведения микробиологического исследования (подчеркнуть):

1. клинические показания;
2. скрининг по эпидемиологическим показаниям;
3. расследование вспышки

Результаты предыдущих микробиологических исследований (отметить даты микробиологических исследований и их результаты) при поступлении:

в процессе пребывания в стационаре: _____

Данные о пациенте

Возраст Пол **М / Ж** **ФИО (только инициалы)** _____

№ истории болезни Дата поступления
 Отделение _____

Основной диагноз

Исход: (подчеркнуть) **выписка перевод смерть** Дата исхода

Наличие ИСМП (поставьте галочку в соответствующем поле)

инфекция в области хирургического вмешательства

инфекция нижних дыхательных путей

инфекция кровотока

инфекция мочевыводящих путей

инфекция другой локализации (напишите локализацию) _____

Госпитализации в течение года, предшествовавшего госпитализации

да/нет/неизвестно

Если да, то в каком стационаре:

Госпитализация № 1				
дата поступления	дата выписки	город, страна	стационар	диагноз
Госпитализация № 2				
дата поступления	дата выписки	город, страна	стационар	диагноз

Страна, регион, город постоянного проживания _____

Выезды за пределы региона постоянного проживания в течение года, предшествовавшего госпитализации

Регион, населенный пункт _____

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Распоряжение Правительства РФ от 28 декабря 2012 г. N 2580-р
2. Жебрун А.Б., Мукомолов С.Л., Нарвская О.В., Ценева Г.Я., Кафтырева Л.А., Мокроусов И.В. Биоразнообразие и эволюция циркулирующих популяций бактерий и вирусов. Новые проблемы медицинской микробиологии. Журн.микробиол.,2011, №5, С.93-98.
3. Введение в молекулярную эпидемиологию инфекционных. заболеваний: учебное пособие / Л.П. Зуева, А.Е. Гончаров, О.В. Нарвская – СПб, 2013 г – 86 С.
4. Национальная концепция профилактики инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи. Утв. Главным государственным санитарным врачом РФ 06.11.2011.
5. Arbeit RD. Laboratory procedures for the epidemiologic analysis of microorganisms. In: Murray PR, Barron EJ, Pfaller MA, eds. Manual of clinical microbiology. 6th edition. American society for Microbiology.1995:190-208.
6. Deplano A., De Mendonça R., De Ryck R. Struelens MJ. External Quality Assessment of Molecular Typing of Staphylococcus aureus Isolates by a Network of Laboratories. J. Clin. Microbiol. 2006, 44(9):3236.
7. Sabat A, Krzyszton-Russjan J, Strzalka W, Filipek R, Kosowska K, et al. (2003). New method for typing Staphylococcus aureus strains: multiple-locus variable number tandem repeat analysis of polymorphism and genetic relationships of clinical isolates. J Clin Microbiol 41: 1801–1804.
8. Martin B, Garriga M, Hugas M, Aymerich T.Genetic diversity and safety aspects of enterococci from slightly fermented sausages. J Appl Microbiol. 2005;98(5):1177-90.
9. Harmsen D, Claus H, Witte W, Rothgänger J, Claus H, Turnwald D, Vogel U Typing of methicillin-resistant Staphylococcus aureus in a university hospital setting by using novel software for spa repeat determination and database management. J Clin Microbiol. 2003 Dec;41(12):5442-8.
10. www.mlva.net
11. www.mlst.net
12. Dutka-Malen S, Evers S, Courvalin P. Detection of glycopeptide resistance genotypes and identification to the species level of clinically relevant enterococci by PCR. J Clin Microbiol. 1995; 33:1434.
13. Dahl KH, Simonsen GS, Olsvik O, Sundsfjord A. Heterogeneity in the vanB gene cluster of genomically diverse clinical strains of vancomycin-resistant enterococci. Antimicrob Agents Chemother. 1999;43:1105-10.

14. Gazin M, Lammens C, Goossens H, Malhotra-Kumar S; MOSAR WP2 Study Team. Evaluation of GeneOhm VanR and Xpert vanA/vanB molecular assays for the rapid detection of vancomycinresistant enterococci. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2012;31:273-6.
15. Martin B, Garriga M, Hugas M, Aymerich T. Genetic diversity and safety aspects of enterococci from slightly fermented sausages. *J Appl Microbiol*. 2005;98(5):1177-90
16. www.pubMLST.org
17. Соломенный А.П., Максимов А.Ю. Саралов А.И., Яфаев Р.Х. и др Появление интегрон-позитивного полирезистентного штамма *Acinetobacter baumannii* в российских стационарах. *Журн. микробиол. эпидемиол. иммунобиол.* – 2008. – № 4. – С. 89-91.
18. www.mlst.net
19. www.pubMLST.org
20. www.pasteur.fr/recherche/genopole/PF8/mlst
21. www.pulsenetinternational.org
22. Соломенный А.П., Максимов А.Ю. Саралов А.И., Яфаев Р.Х. и др Появление интегрон-позитивного полирезистентного штамма *Acinetobacter baumannii* в российских стационарах. *Журн. микробиол. эпидемиол. иммунобиол.* – 2008. – № 4. – С. 89-91.
23. www.mlst.net
24. www.pubMLST.org
25. Соломенный А.П., Максимов А.Ю. Саралов А.И., Яфаев Р.Х. и др Появление интегрон-позитивного полирезистентного штамма *Acinetobacter baumannii* в российских стационарах. *Журн. микробиол. эпидемиол. иммунобиол.* – 2008. – № 4. – С. 89-91.
26. Романов А.В., Дехнич А.В., Эйдельштейн М.В. Молекулярная эпидемиология штаммов *Staphylococcus aureus* в детских стационарах России// *Клин. Микробиол. Антимикроб. Химиотер.*- 2012.-Том 14, № 3.-С. 201-208.
27. Johnson J.R., Johnston B., Clabots C., Kuskowski M.A, and Castanheira M. *Escherichia coli* Sequence Type ST131 as the Major Cause of Serious Multidrug-Resistant *E. coli* Infections in the United States// *Clinical Infectious Diseases*.-2010.- № 51, Vol. 3.-P.286–294.
28. Jain R, Walk ST, Aronoff DM, Young VB, Newton DW, Chenoweth CE, Washer LL. Emergence of Carbapenemaseproducing *Klebsiella pneumoniae* of Sequence type 258 in Michigan, USA// *Infect. Dis. Rep.* -2013.-№ 19, Vol.5(1).
29. Canton R., Akova M., Carmeli Y., Giske C. G., Glupczynski Y., Gniadkowski M., Livermore D. M., Miriagou V., Naas T., Rossolini G. M., Samuelsen Ø., Seifert H., Woodford N. and Nordmann P. Rapid evolution and spread of carbapenemases among Enterobacteriaceae in Europe// *Clin. Microbiol. Infect.*- 2012.-Vol. 18.-P.413–431.

30. Эйдельштейн М.В., Склеенова Е.Ю., Шевченко О.В. и др. Распространённость и молекулярная эпидемиология грамотрицательных бактерий, продуцирующих металло-бета-лактамазы, в России, Беларуси и Казахстане. Клин Микробиол Антимикроб Химиотер. 2012; 14(2):132-152
31. Воронина О.Л., Кунда М.С., Аветисян Л.Р., Чернуха М.Ю., Габриэлян Н.И., Шагинян И.А., Лунин В.Г. Особенности штаммов *Pseudomonas aeruginosa*, вызывающих госпитальные инфекции у пациентов хирургических отделений ФНЦТИО им. В.И. Шумакова// Клин. Микробиол. Антимикроб. Химиотер.- 2012.- Том 14, № 2.-С. 88-99.
32. Гординская Н.А., Сабирова Е.В., Абрамова Н.В., Дударева Е.В., Склеенова Е.Ю., Некаева Е.С. Фенотипические и молекулярно-генетические особенности возбудителей раневой ожоговой инфекции// Клин. Микробиол. Антимикроб. Химиотер.- 2012.- Том 14, № 4.-С. 342-346.
33. Dominguez MA, de Lencastre H., Linares J et al. Spread and maintenance of a dominant methicillin – resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) clone during an outbreak of MRSA disease in a Spanish hospital. J Clin Microbiol. 1994;32:2081 – 2087.
34. Santos – Sanches I., Aires de Sousa M., Cleto L. et al. Tracing the origin of an outbreak of methicillin – resistant *Staphylococcus aureus* infections in a Portuguese hospital by molecular fingerprinting methods. Microb Drug Resistance. 1996.
35. Tamura K, Dudley J, Nei M, Kumar S MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0.Mol Biol Evol. 2007 Aug;24(8):1596-9. Epub 2007 May