

УДК [616.9-02:579.84]-036.22

Неферментирующие грамотрицательные бактерии в этиологии внутрибольничных инфекций: клинические, микробиологические и эпидемиологические особенности

И.А. Шагинян, М.Ю. Чернуха

Научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф. Гамалеи РАМН, Москва, Россия

Грамотрицательные неферментирующие бактерии (НФБ) являются одними из ведущих возбудителей нозокомиальных инфекций (НИ). Кроме наиболее значимого из них – *Pseudomonas aeruginosa*, инфекции у человека могут вызывать представители других родов, таких как *Acinetobacter*, *Burkholderia*, *Stenotrophomonas*, *Chryseobacterium*. НФБ, как правило, вызывают НИ у лиц с предрасполагающими факторами (иммунодефициты, предшествующая антибиотикотерапия, ИВЛ, злокачественные новообразования и др.). Большое значение такие НФБ, как *P. aeruginosa* и *Burkholderia cepacia*, имеют при инфекциях нижних дыхательных путей у больных муковисцидозом. Клинически важной особенностью НФБ является высокая частота резистентности микроорганизмов к различным классам антимикробных препаратов. Наиболее значимым механизмом, обеспечивающим полирезистентность у НФБ, являются мембранные системы активного выброса (эффлюкса). Среди них наиболее изучены MexAB-OprM, MexCD-OprJ, MexEF-OprN и MexXY у *P. aeruginosa*; подобные системы описаны у *Stenotrophomonas*

spp., *Acinetobacter baumannii*, *Burkholderia pseudomallei*. Другим важным свойством НФБ является наличие у них межклеточной сигнальной системы «quorum sensing» – механизма, который следит за плотностью клеток бактериальной популяции и отвечает за контроль продукции многих внеклеточных факторов патогенности, что обеспечивает бактериям преодоление защитных сил макроорганизма при инфекции. Еще одним свойством НФБ является способность к формированию биопленки, структура и физиологические свойства которой обеспечивают повышение устойчивости к антибиотикам, дезинфектантам и влиянию со стороны иммунной системы и других факторов макроорганизма. В данном обзоре также коротко рассмотрены вопросы таксономии НФБ и эпидемиологические особенности вызываемых ими инфекций.

Ключевые слова: *Pseudomonas*, *Burkholderia*, *Stenotrophomonas*, *Acinetobacter*, внутрибольничные инфекции, нозокомиальные инфекции, муковисцидоз, антибиотикорезистентность, эффлюкс, quorum sensing, биопленка.

Контактная информация:
Игорь Андроникович Шагинян
Лаборатория молекулярной эпидемиологии госпитальных инфекций
ГУ НИИЭМ им. Н.Ф. Гамалеи РАМН
123098, Россия, Москва,
Эл. почта: shaginyan@riem.ru

Infections Caused by Nonfermenting Gram-negative Rods: Epidemiological, Microbiological and Clinical Features

I.A. Schagenyan, M.Ju. Tchernukha

Gamaleya Research Institute of Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russia

Nonfermenting gram-negative rods (NGR) are one of the leading nosocomial pathogens. Among them *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter* spp., *Burkholderia* spp., *Stenotrophomonas* spp., and *Chryseobacterium* spp. are of clinical importance. NGR usually cause infections in patients with predisposing conditions, such as immunocompromise status, previous administration of broad-spectrum antimicrobials, ventilation, malignancies, etc. *P. aeruginosa* and *B. cepacia*, play major role in lower respiratory tract infections in patients with cystic fibrosis. The most important feature of NGR from clinical point of view is high rates of resistance to different classes of antimicrobials. Majority of multiresistance problems linked to efflux pumps, among which MexAB-OprM, MexCD-OprJ,

MexEF-OprN and MexXY in *P. aeruginosa* are studied in detail; similar systems described in *Stenotrophomonas* spp., *Acinetobacter baumannii*, *B. pseudomallei*. Another important characteristics of NGR are so called «quorum sensing» – the mechanism that controls the production of many factors of pathogenicity, and ability to form biofilm, the structure and physiological nature of which provide decreased susceptibility to antibiotics, antiseptics, and to immune system. In the present review the taxonomy and epidemiology of NGR are also discussed.

Key words: *Pseudomonas*, *Burkholderia*, *Stenotrophomonas*, *Acinetobacter*, nosocomial infections, cystic fibrosis, antimicrobial resistance, efflux, quorum sensing, biofilm.

Введение

Среди возбудителей госпитальных инфекций значительное место занимают грамотрицательные неферментирующие микроорганизмы, общими клинически значимыми свойствами которых являются: природная устойчивость ко многим антибиотикам, высокая резистентность к дезинфектантам и распространение в стационарах от пациента к пациенту, часто с помощью рук медицинского персонала и медицинского оборудования. Грамотрицательные *неферментирующие бактерии* (НФБ), наиболее часто вызывающие инфекции, принадлежат к нескольким родам и условно могут быть разделены на оксидазоположительные – роды *Pseudomonas* (кроме видов *P. luteola* и *P. oryzihabitans*), *Burkholderia*, *Moraxella*, *Chryseobacterium* и оксидазоотрицательные – роды *Stenotrophomonas*, *Acinetobacter*, *Bordetella* (кроме *B. pertussis*, *B. avium*, *B. bronchiseptica*, *B. hinzii*) [1–3].

Большинство из упомянутых выше родов и видов НФБ обладают высокой степенью фенотипического и генотипического родства с бактериями рода *Pseudomonas* и многие из них еще в 90-х годах прошлого века относились к данному роду. Однако совершенствование фенотипических и генотипических методов лабораторной диагностики и использование для дифференциации многофазного таксономического подхода позволило выделить из рода *Pseudomonas* роды *Burkholderia*, *Stenotrophomonas* (ранее *Xanthomonas*) и др.

Все НФБ могут быть выделены из различных источников окружающей среды, однако клинической значимостью характеризуются только некоторые виды вышеуказанных родов. Так, по результатам исследования состава грамотрицательных нозокомиальных возбудителей и их чувствительности к антибиотикам, проведенного в 1997–99 гг., *P. aeruginosa* была первым по частоте (30%) микроорганизмом, выделяемым в *отделении реанимации и интенсивной терапии* (ОРИТ). Со сравнительно меньшей частотой выделялись грамотрицательные микроорганизмы семейства *Enterobacteriaceae* (*Escherichia coli* – 18,4%, *Klebsiella pneumoniae* – 14,6%, *Proteus* spp. – 10%, *Enterobacter* spp. – 7,6%), за ними следовал другой представитель НФБ – *Acinetobacter* spp. (6,9%) [4].

Клиническое значение НФБ

***Pseudomonas aeruginosa*.** Данный микроорганизм является хорошо известным возбудителем *внутрибольничных инфекций* (НИ), имеющим наибольшее значение у пациентов с иммунодефицитными состояниями, особенно с нейтропенией, и у лиц, получавших антимикробную терапию. Этот микроорганизм занимает первое место в этиологии нозокомиальной пневмонии, связанной в основном с *искусственной вентиляцией легких* (ИВЛ) [1, 5]. Инфекции, вызываемые синегнойной палочкой, характеризуются высоким уровнем летальности. Например, при синегнойной пневмонии и/или бактериемии летальность достигает 40–50% [1, 6].

Несмотря на то, что *P. aeruginosa* широко рас-

пространена в природе (ее можно найти практически в любом водоеме), этот микроорганизм является достаточно редким возбудителем внебольничных инфекций, за исключением, пожалуй, злокачественного наружного отита у больных сахарным диабетом. Однако ВИЧ-инфицированные, число которых постоянно растет, представляют собой новую группу риска по развитию синегнойных инфекций во внебольничных условиях. Так, в серии наблюдений, включавших 28 эпизодов бактериемии, вызванной *P. aeruginosa*, у больного СПИДом более 1/3 случаев развилось во внебольничных условиях.

***Acinetobacter* spp.** В настоящее время даны названия 10 видам рода *Acinetobacter*, хотя по морфологическим свойствам и результатам биохимических тестов выделены как минимум 19 видов [2, 7]. Для рутинных клинических целей ряд геномовидов (1, 2, 3 и 13TU) объединяют в комплекс *Acinetobacter calcoaceticus-Acinetobacter baumannii*. Это связано с тем, что большинство геномовидов не могут быть надежно дифференцированы друг от друга на основе стандартных биохимических тестов и фенотипических признаков. Хотя, конечно же, такой подход несколько затрудняет оценку эпидемиологических данных. По-видимому, оптимальным является разделение видов рода *Acinetobacter* на сахаролитические и асахаролитические.

Подобно *P. aeruginosa*, бактерии рода *Acinetobacter* широко распространены в окружающей среде. Некоторые штаммы являются толерантными к детергентам (например к мылу), в связи с чем эти микроорганизмы являются одними из наиболее частых грамотрицательных бактерий, выделяемых с рук медицинского персонала и у госпитализированных пациентов. У 25% здорового населения этим микроорганизмом колонизированы кожные покровы, а у 7% – носоглотка [8].

Acinetobacter spp. является вторым наиболее часто выделяемым из клинического материала неферментирующим микроорганизмом. Наиболее важно клиническое значение видов рода *Acinetobacter* в этиологии нозокомиальной, в особенности вентилятор-ассоциированной пневмонии. Основными факторами риска возникновения внутрибольничной пневмонии, вызванной *Acinetobacter* spp., являются интубация трахеи, предшествующая антибиотикотерапия, пребывание в ОРИТ.

Во внебольничных условиях инфекции, вызываемые этим возбудителем, выявляются редко.

Интересным является тот факт, что в Северном полушарии наблюдается сезонность инфекций, вызываемых *Acinetobacter* spp.: в летние месяцы они развиваются более часто, чем в другие времена года [9]. Замечено также, что инфекции, вызы-

ваемые этими бактериями, встречаются чаще в тропиках, чем в других климатических зонах, а во время войны во Вьетнаме этот микроорганизм был одним из наиболее частых возбудителей инфекций при огнестрельных ранениях. В международном исследовании профилей резистентности среди грамотрицательных микроорганизмов, выделяемых от пациентов в ОРИТ, бактерии рода *Acinetobacter* выявлялись более чем в 2 раза чаще в КНР, чем в США.

***Stenotrophomonas maltophilia*.** Этот микроорганизм, ранее обозначавшийся как *Pseudomonas maltophilia* (до 1988 г.), позднее – *Xanthomonas maltophilia*, является распространенным комменсалом, часто выделяемым из воды, почвы и сточных вод [10, 11]. Значимость этого микроорганизма при выделении не всегда ясна и зависит от наличия факторов риска.

S. maltophilia наиболее часто выделяется при пневмонии, особенно у больных с *муковисцидозом* (МВ) [12], но может также вызывать различные другие НИ. Наибольшее число инфекций встречается в медицинских учреждениях, в которых находятся пациенты со злокачественными новообразованиями, проводится длительная катетеризация центральных вен и массивная антибиотикотерапия [13, 14]. В исследовании, включавшем 91 случай бактериемии, вызванной *S. maltophilia*, у 78% больных были злокачественные новообразования, а источником инфекции был центральный венозный катетер. Летальность от НИ в данном исследовании составила 38%.

Недавно описано несколько необычных проявлений инфекции, вызванной *S. maltophilia*. Так, в сообщении о 114 случаях инфекции в онкологическом центре, у 17 больных наблюдали инфекции слизистой оболочки и кожных покровов и/или инфекции мягких тканей, 6 больных имели метастатические целлюлиты и 1 пациент – поражение в виде гангренозной эктимы.

***Burkholderia cepacia*.** Этот микроорганизм, ранее носивший название *Pseudomonas cepacia*, является патогеном растений и был впервые описан в 1950 г. Р. Burkholder как причина мягкой гнили лука. Хотя *B. cepacia* можно выделить из источников окружающей среды, таких как почва, вода, растения, частота его выделения из клинического материала является низкой [1]. Имеется немного сообщений, в которых описываются тяжелые инфекции (пневмония с бактериемией, злокачественный наружный отит), вызываемые этим микроорганизмом, у лиц без сопутствующей патологии. Главную опасность *B. cepacia* представляет для больных с МВ, вызывая у них тяжелые инфек-

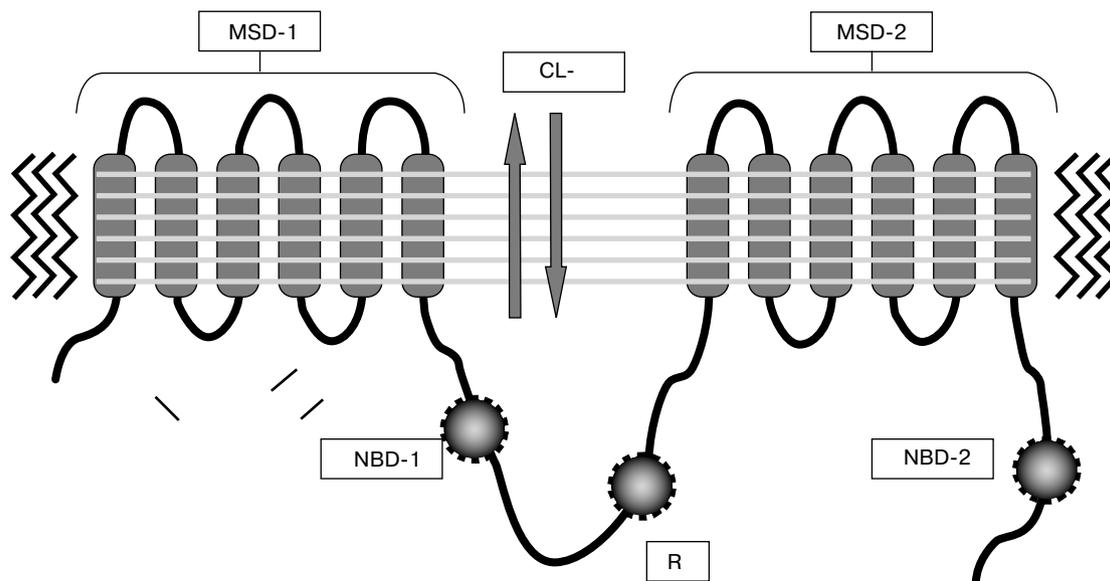


Рис. 1. Предполагаемая структура трансмембранного регулятора муковисцидоза. Пояснения в тексте.

ции нижних дыхательных путей. Патогенез и этиология пневмоний у больных МВ подробно рассматриваются в ряде обзоров [15, 16]. С разработкой в 1985 г. селективной среды для выделения *B. ceracia* значимость этого возбудителя для пациентов с МВ стала очевидной. При этом выявление *B. ceracia* в популяции таких пациентов возросло и в настоящее время составляет 6–7%, а в некоторых специализированных центрах для больных МВ достигает 20–30% [17, 18]. Однако пока остается неясным, с чем связано столь очевидное увеличение выявления возбудителя: с большей продолжительностью жизни больных или значительно лучшим выявлением возбудителя?

Инфекции, вызываемые НФБ, у больных муковисцидозом

Каждый из рассматриваемых нами видов НФБ способен вызывать развитие хронических рецидивирующих инфекций нижних дыхательных путей у пациентов с МВ. Муковисцидоз – это достаточно часто встречающееся наследственное аутосомно-рецессивное заболевание. В Великобритании, например, оно регистрируется с частотой 1 на 2500 новорожденных [19]. Заболевание является следствием дефекта гена, локализованного на длинном плече VII хромосомы. Примерно каждый двадцатый человек европейской расы является носителем мутантного ($\Delta F508$) гена муковисцидоза. Данный ген отвечает за экспрессию белка, получившего название *трансмембранный регулятор муковисцидоза* – МВТР (CFTR – cystic fibrosis transmembrane conductance regula-

tor), который осуществляет и регулирует транспорт электролитов через клеточные мембраны [20, 21]. Ген имеет длину 250 тыс. п.н. и состоит из 27 экзонов; образующийся при его экспрессии МВТР состоит из 1480 аминокислотных остатков.

МВТР является представителем семейства ABC (ATP-binding cassette) белков-переносчиков (рис. 1), которые обнаружены у млекопитающих, насекомых, дрожжеподобных грибов и бактерий. К ним, например, относятся: белки системы эффлюкса, обеспечивающего множественную лекарственную устойчивость (MDR1 – multidrug resistance), транспортные белки, связанные с процессингом антигенов (TAP1 и TAP2 – transporter associated with antigen processing), бактериальная гистидинпермеаза.

Высоко консервативная аминокислотная последовательность, наличие которой определяет принадлежность белка к семейству ABC, включает мембранный домен, содержащий 6 трансмембранных пептидов, соединенный с нуклеотид-связывающим доменом (NBD – nucleotide binding domen). Функцией последнего является связывание с АТФ и ее гидролиз, в результате чего выделяется энергия, необходимая для функционирования (открытия и закрытия) ионного (хлоридного) канала, которым является МВТР. Подобно многим представителям семейства ABC, белок МВТР состоит из тандемных повторов этой консервативной аминокислотной последовательности.

Недавно показано, что два NBD МВТР функционируют координированно, опосредуя последовательное открытие и закрытие поры ионного

канала. При этом N-концевой NBD (NBD-1) гидролизует одну молекулу АТФ, что обеспечивает открытие канала, а С-концевой NBD (NBD-2) гидролизует вторую молекулу АТФ, что приводит к закрытию канала [16]. Нуклеотид-связывающие домены МВТР содержат аминокислотные последовательности, имеющиеся у многих других белков семейств ABC и не-ABC. Однако они также содержат последовательности, которые характерны только для семейства ABC или даже только для одной подгруппы этого семейства. Наиболее консервативными последовательностями NBD у белков семейства ABC являются участок Walker A (на N-конце каждого NBD) и участок Walker B (на С-конце каждого NBD), которые участвуют в связывании и координации взаимодействия АТФ и ионов Mg^{2+} соответственно. Более того, NBD белков семейства ABC содержат уникальную для этого семейства последовательность – участок С, расположенный между участками Walker A и Walker B непосредственно выше участка Walker B. Также NBD МВТР содержит четвертую высоко консервативную последовательность, характерную только для некоторых белков семейства ABC. Она называется центральным участком и расположена посередине между участками Walker A и Walker B. В то время как мутации в участках Walker A и Walker B, а также в участке С приводят к нарушению функции белка, значение центрального участка зависит от того, о каком белке-переносчике семейства ABC идет речь. Так, например, самая распространенная мутация белка МВТР – $\Delta F508$ является мутацией центрального участка.

В дополнение к двум указанным доменам (мембранный и NBD) белок МВТР содержит регуляторный (или R) домен, который путем фосфорилирования/дефосфорилирования тех или иных остатков серина модулирует активность этого белка как ионного канала. Регуляторный домен содержат лишь некоторые белки семейства ABC.

В настоящее время описано более 1000 природных мутаций гена МВТР [22]. Они включают в себя «миссенс»-, «нонсенс»-мутации, мутации сдвига рамки считывания, сплайсинг-мутации, делеции. Мутация МВТР $\Delta F508$ является наиболее частой и составляет около 70% всех мутантных аллелей МВТР. Она представляет собой делецию в первом нуклеотид-связывающем домене (NBD-1) участка ЦТТ, который представляет собой 3-й нуклеотид кодона АТЦ (изолейцин) в позиции 507, и первые 2 нуклеотида кодона ТТТ (фенилаланин) в позиции 508. «Дикий» тип кодона АТЦ превращается в АТТ, который тоже кодирует изолейцин, поэтому нормальная последовательность кодона ГТТ (глицин)

в позиции 509 остается неизменной. В результате мутантный $\Delta F508$ МВТР не перемещается в комплекс Гольджи, что является необходимым условием для его экспрессии на клеточной мембране. Показано, что большая часть его задерживается в эндоплазматической сети, откуда он медленно проникает в промежуточный компартмент (эндоплазматическая сеть – комплекс Гольджи). В конечном счете, мутантный $\Delta F508$ МВТР, не завершивший процессинг, разрушается внутри клетки. В свою очередь, низкий уровень мембранной экспрессии МВТР в клетках, гомозиготных по аллелю $\Delta F508$, приводит к низкому или практически неопределяемому транспорту ионов хлора, что, по крайней мере отчасти, и определяет нарушение состава эпителиальных секретов у пациентов с МВ.

Аллель $\Delta F508$ МВТР чрезвычайно распространена в некоторых популяциях. Так, она встречается с частотой 2–5% среди представителей европеоидной расы. Несмотря на то, что аллель $\Delta F508$ составляет около 70% всех мутантных аллелей МВТР, существуют определенные географические различия в ее встречаемости – от низкой, составляющей 27% в Турции, до 87% – в Дании. В семьях больных МВ встречается с частотой около 25%, т.е. с величинной, характерной для аутосомно-рецессивного типа наследования [16, 19].

Хотя при МВ поражаются различные органы и системы, главной клинической проблемой является хроническая легочная инфекция, являющаяся основной причиной, приводящей к смерти больных с МВ. До конца 40-х гг. XX века хроническая легочная инфекция у пациентов с МВ была относительно редким событием. Это вероятно связано с тем, что выживаемость пациентов с этой патологией в то время была очень низкой и хроническая инфекция не успевала развиваться. Так, для больных, родившихся в 1950 г., средняя выживаемость составляла 9 мес., в период 1968–1976 гг. – уже 14–17 лет, а в настоящее время составляет более 30 лет.

Этиология хронической инфекции легких при МВ сходна для всех пациентов. В раннем детском возрасте причиной инфекции чаще являются *Staphylococcus aureus* и нетипируемые штаммы *Haemophilus influenzae*, а на более поздних этапах жизни – *P. aeruginosa*, *B. cepacia* и другие НФБ. Уже в 1960-е гг. в ряде сообщений было показано, что НФБ и прежде всего *P. aeruginosa* стали доминирующими бактериями, выделяемыми из дыхательных путей у больных с МВ. Это совпало с организацией специализированных центров для лечения пациентов с МВ и одновременным увеличением медианы выживаемости до 17 лет при использовании комплексной терапии. Позднее исследованиями,

проведенными в Дании, было подтверждено, что пребывание в специализированном центре является фактором повышенного риска распространения возбудителей, вызывающих хроническую инфекцию легких у больных с МВ [23].

Микробиологические особенности НФБ

Способность вызывать НИ, а также инфекции у определенных групп больных позволяет полагать, что несмотря на то, что НФБ относятся к различным родам и видам, они, вероятно, должны обладать сходными характеристиками.

И действительно, анализируя свойства этих возбудителей, можно видеть, что наиболее сходными признаками их являются природная устойчивость микроорганизмов ко многим антимикробным препаратам, наличие межклеточной сигнальной системы «quorum sensing», регулирующей продукцию факторов патогенности, и способность к образованию биопленок при контакте возбудителя с различными поверхностями (в том числе макроорганизма) и при развитии персистирующей инфекции.

Устойчивость НФБ к антимикробным препаратам

Природная устойчивость ко многим антибактериальным препаратам, наиболее подробно изученная у *P. aeruginosa*, является признаком не только данного возбудителя, но характерна и для многих других представителей НФБ – *Acinetobacter* spp., *S. maltophilia*, *B. cepacia*. В связи с этим борьба с НИ, вызванными полирезистентными грамотрицательными бактериями, в последние 20 лет прошлого века стала значимой проблемой в экономически развитых странах.

Антибиотикорезистентные микроорганизмы являются одной из главных проблем мирового здравоохранения в связи с тем, что ряд важнейших патогенов человека в настоящее время имеют механизмы, обеспечивающие им устойчивость фактически ко всем доступным препаратам. Известно, что действие антимикробных препаратов может блокироваться вследствие следующих процессов: ферментативной инактивации препарата, образования альтернативных метаболических путей, нарушения проницаемости внешних структур микробной клетки, изменения мишени действия препарата [24]. Любой из этих механизмов устойчивости детерминируется генами, во многих случаях локализованными на конъюгативных R-плазмидах, реже – трансдуцирующими бактериофагами, способных как к внутривидовому, так и к межвидовому обмену среди циркулирующих в стационарах штаммов.

Еще один механизм устойчивости, который ста-

новится все более важным, включает мембранные системы активного выброса (эффлюкса), которые транспортируют токсические для микроорганизма продукты, в том числе и антибиотики, из микробной клетки [25, 26].

Большинство антимикробных препаратов, как природных, так и синтетических, могут являться субстратами для систем эффлюкса (фторхинолоны, хлорамфеникол, тетрациклины, беталактамы, аминогликозиды, а также некоторые антисептики, например хлоргексидин).

Также к настоящему времени описано большое число транспортных белков, включенных в системы активного выброса из клетки широкого круга антимикробных препаратов и таким образом обеспечивающих *множественную резистентность* (МР) [27].

При этом для обеспечения резистентности необходима экспрессия генов на уровне, значительно превышающем уровень их экспрессии у диких штаммов. Эти данные поддерживают предположение, что системы эффлюкса, обеспечивающие МР, обычно выполняют физиологические функции, такие как защита против низких уровней токсических гидрофобных молекул, выделяемых в естественных условиях многими организмами, или транспорт специфических метаболитов [27]. Однако для некоторых систем эффлюкса доказано, что выведение антимикробных соединений является в настоящее время первичной функцией этих систем, что обеспечивает многие патогенные бактерии защитой против антибиотиков, антисептиков и дезинфектантов.

У *P. aeruginosa* в настоящее время выявлены 4 системы эффлюкса и установлено, что основной причиной приобретения повышенной устойчивости к структурно не родственными антибиотикам являются мутации, ведущие к избыточной экспрессии белков этих систем эффлюкса (рис. 2). Один из них – MexAB-OprM имеет сложную структуру, состоящую из 3 частей, представленной цитоплазматическим компонентом «насоса» – MexB, мембранным белком слияния – MexA и каналом внешней мембраны – OprM (см. рис. 2). Этот комплекс MexAB-OprM может одновременно транспортировать антибиотики как через цитоплазматическую, так и через наружную мембрану, что обеспечивает высокоэффективный механизм устойчивости, когда он комбинируется с низкой проницаемостью наружной мембраны *P. aeruginosa* [25]. MexAB-OprM совместно с MexCD-OprJ, MexEF-OprN и MexXY образуют семейство комплексных систем эффлюкса, ответственных за множественную резистентность, которые имеют чрез-

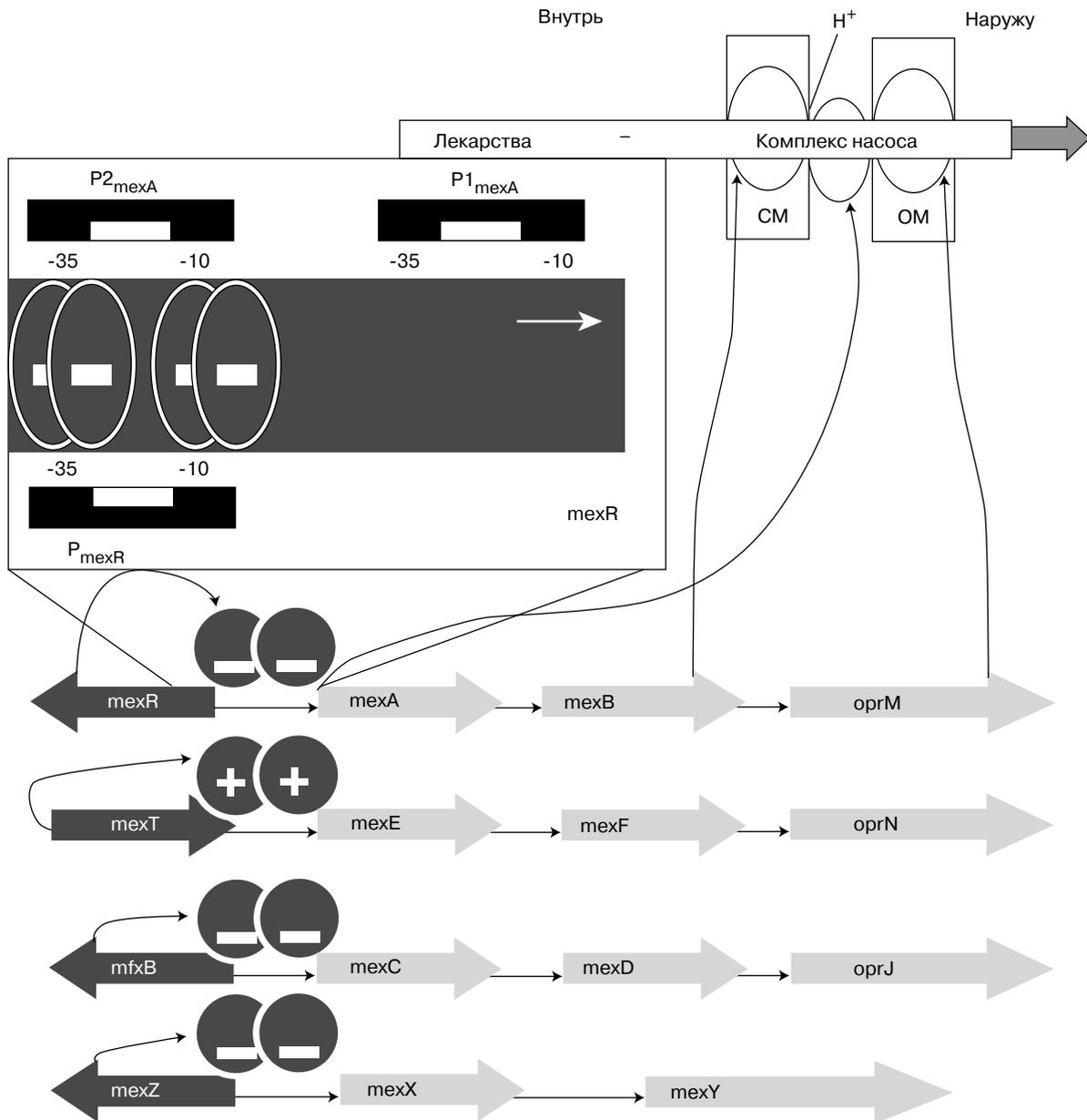


Рис. 2. Генетическая организация локусов MDR *mexR-mexAB-oprM*, *mexT-mexEF-oprN*, *mfxB-mexCD-oprJ*, *mexZ-mexXY* у *P. aeruginosa*.

Каждый оперон содержит гены (серые стрелки), кодирующие белки системы эффлюкса веществ из клетки и регулируемые продуктом вышестоящего гена (черные стрелки), который или репрессирует (–) или активирует (+) экспрессию оперона.

вычайно широкий субстратный диапазон. Каждый из оперонов имеет свой регуляторный белок транскрипции (см. рис. 2).

Системы эффлюкса могут участвовать и в других физиологических функциях, например, в экспорте вторичных метаболитов [26]. Так, продемонстрирована роль MexAB-OprM в активном выведении N-(3-оксододеканоил)-гомосерин лактона – аутоиндуктора системы «quorum sensing» у *P. aeruginosa* [28].

В дополнение к описанным выше четырем системам эффлюкса, обеспечивающим МР, большим геном *P. aeruginosa*, возможно, кодирует ряд дополнительных систем эффлюкса, которые обладают значительной гомологией с уже известными экспортерами [29–31].

Природная устойчивость к антибиотикам еще одного представителя НФБ – *Stenotrophomonas* spp. частично обусловлена системами множественного эффлюкса, в то время как повышенная экспрессия

позволяет им взаимодействовать между собой посредством передачи межклеточных сигналов. Этот феномен дифференцированной оценки плотности популяции был назван «quorum sensing» [34, 35]. Первая подобная межклеточная сигнальная система, ответственная за контроль активности генов биолюминесценции, была описана у *Vibrio fischeri*, а вскоре подобные системы были описаны у многих грамотрицательных и грамположительных бактерий. У грамотрицательных бактерий сигнальные системы состоят из маленькой молекулы аутоиндуктора, который синтезируется с помощью синтазы аутоиндуктора, и белка, активирующего транскрипцию. Различные аутоиндукторы, описанные у грамотрицательных бактерий, представляют собой гомосерин-лактоны, отличающиеся друг от друга длиной и заменами в ацильных цепях. С увеличением плотности бактерий увеличивается и внеклеточная и внутриклеточная концентрация аутоиндуктора, при этом молекулы аутоиндуктора связываются с особым рецепторным белком (R-белок). По достижении определенной пороговой концентрации комплекс аутоиндуктор/R-белок связывается со специфическими ДНК-последовательностями генов-мишеней и увеличивает их транскрипцию. При этом увеличение экспрессии этих генов может быть 1000-кратным. Следовательно, аутоиндуктор одновременно является: 1) «языком общения» бактериальных клеток друг с другом; 2) индикатором плотности популяции и 3) регулятором активности определенных генов популяции, а не отдельных ее клеток.

Первая межклеточная система, описанная у *P. aeruginosa*, контролирует экспрессию гена *lasB*, кодирующего эластазу, и названа *las* системой (рис. 3). Эта система состоит из *lasI* – гена синтазы аутоиндуктора, которая ответственна за синтез N-[3-оксодеканонил]-L-гомосерин-лактона, и гена *lasR*, кодирующего белок, который является активатором транскрипции. Установлено, что данная система регулирует экспрессию эластазы LasB и необходима для оптимальной продукции других факторов вирулентности *P. aeruginosa*, таких как протеаза и экзотоксин А.

Помимо *las* системы *P. aeruginosa* имеет вторую межклеточную сигнальную систему, названную *rhl* системой в связи с тем, что она способна контролировать продукцию рамнолипида (Rhl). Эта система также состоит из аутоиндуктора – гомосерин-лактона, но имеющего другое строение, а именно: N-бутирил-гомосерин-лактон (ранее PAI-2), из гена синтазы аутоиндуктора и гена *rhlR*, кодирующего белок, который является активатором транскрипции. Данная система регулирует

экспрессию *rhlAB* оперона, кодирующего рамнозилтрансферазу, необходимую для продукции рамнолипида. Кроме того, эта система необходима для оптимальной продукции эластазы LasB, протеазы LasA, пиоцианина, цианида и щелочной протеазы. Следовательно, подобно *las* системе, межклеточная сигнальная *rhl* система регулирует экспрессию различных внеклеточных факторов вирулентности *P. aeruginosa* [36].

Установлено, что обе вышеописанные системы взаимодействуют друг с другом, выявлены предпочтительные промоторы, которые активирует та или иная система. Так, *las* система способна активировать *rhl* систему, что свидетельствует о том, что *las* иерархически выше *rhl*. Кроме того, N-[3-оксодеканонил]-L-гомосерин-лактон может связываться с RhlR, тем самым, блокируя связывание N-бутирил-гомосерин-лактона с его активатором транскрипции. Следовательно, *las* система контролирует *rhl* систему как на уровне транскрипции, так и на посттрансляционном уровне.

Значимость систем «quorum sensing» у *P. aeruginosa* для ее существования в макроорганизме во время острой инфекции, вероятно, связана с необходимостью преодоления защитных сил организма-хозяина. Незначительная продукция факторов патогенности небольшим числом бактерий, возможно, приводила бы к эффективному ответу хозяина, который нейтрализовал бы вирулентные свойства возбудителя и его самого. Однако координированная экспрессия генов вирулентности всей популяцией при достижении определенной плотности бактерий позволяет *P. aeruginosa* продуцировать внеклеточные факторы только тогда, когда они могут производиться в количествах, позволяющих преодолеть защитные силы макроорганизма. Изменение баланса между защитными силами и продукцией бактериальных токсинов может приводить к инвазии кровеносных сосудов, диссеминации возбудителя и синдрому системного воспалительного ответа. Даже адекватная антибиотикотерапия не всегда способна остановить течение заболевания на этом этапе, поэтому такой процесс необходимо блокировать как можно раньше, прежде чем системой «quorum sensing» не будет скоординирована экспрессия генов вирулентности.

У *B. cepacia* система «quorum sensing» вначале была выявлена у штамма III K65-2 [37, 38]. Установлено, что ген синтазы аутоиндуктора *cepIR* управляет синтезом N-октаноил-L-гомосерин-лактона (ОНЛ) и N-гексаноил-L-гомосерин-лактона (ННЛ). Регулятор транскрипции *CepR* отрицательно регулирует биосинтез сидерофора – орнибактина и положительно – протеазы, а также ОНЛ

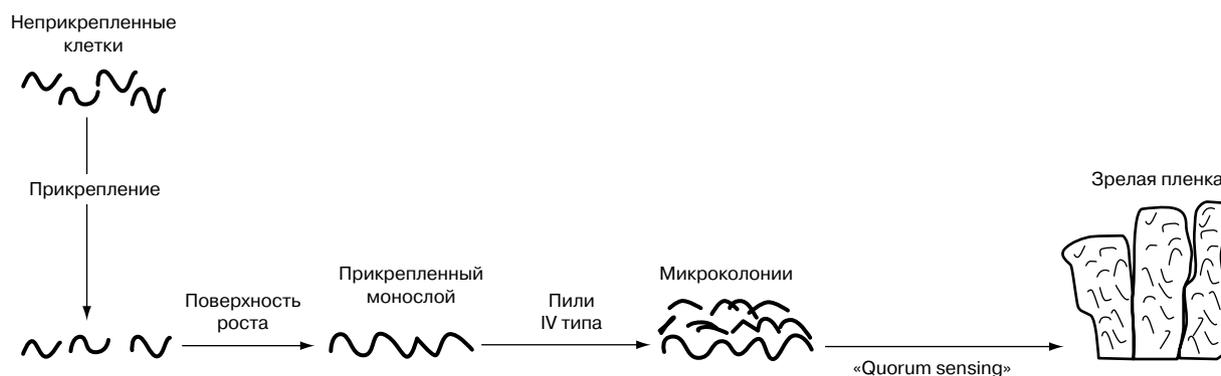


Рис. 4. Схема созревания биопленки *P. aeruginosa*.

Неприкрепленные клетки, которые соприкасаются с поверхностью, могут прикрепиться к ней. Прикрепленные клетки размножаются на поверхности и, используя специфические функции, активно формируют микроколонии. Микроколонии дифференцируются в зрелую биопленку посредством зависимого механизма системы «quorum sensing».

и NHL. Показано, что гены *cepR* и *cepI* присутствуют у геномоваров I и III *B. cepacia*, *B. stabilis* и *B. vietnamiensis*, а ген *cepR* – у *B. multivorans* и геномовара VI *B. cepacia* [39–41].

Формирование биопленки как способ выживания клинически значимых микроорганизмов

Начиная с XVII века, когда А. Левенгук описал «animaculum» в кариозном пятне собственного зуба, биопленки описаны во многих системах. Однако только в 1978 г. была сформулирована общая теория существования биопленок. Эта теория устанавливает, что большинство бактерий растут в замкнутых матрицах-биопленках, прикрепленных к поверхностям любых обеспечивающих питанием и содержащих воду экосистем, и что эти обширно связанные с поверхностью бактериальные клетки существенно отличаются от своих планктонных (свободно плавающих) двойников [42].

В течение почти 25 лет было предложено несколько определений биопленок. Последнее из них звучит следующим образом: биопленка – это микробное сообщество, состоящее из клеток, плотно прикрепленных к субстрату, поверхности или друг к другу, заключенное в матрицу внеклеточных полимерных субстанций, продуцирующих и проявляющих измененный фенотип в соответствии с уровнем роста и транскрипцией генов [43].

Последующие исследования с «дикими» и хорошо адгезирующимися штаммами показали, что гладкие поверхности колонизируются так же легко, как и шероховатые, а физические особенности поверхности очень незначительно влияют на бактериальную адгезию.

Развитие зрелой биопленки проходит через про-

граммированную серию событий (рис. 4). После прикрепления клетки размножаются, образуя монослой на твердой поверхности. Отдельные клетки далее проявляют поверхностную подвижность, зависящую от наличия пилей IV типа. В результате поверхностной подвижности *P. aeruginosa* формирует небольшие группы, названные микроколониями. Микроколонии затем дифференцируются для формирования зрелой биопленки. Микроколонии в зрелой биопленке имеют башню и грибовидную архитектуру. Клетки в этих структурах упаковываются во внеклеточные полисахаридные матрицы. Структуру биопленки пронизывают водные каналы, через которые внутрь поступают питательные вещества и удаляются продукты метаболизма. При этом внутри биопленки наблюдается значительная гетерогенность. Так, у биопленок *P. aeruginosa* выявлен огромный градиент перепада кислорода. Если на периферии биопленки кислород присутствует в измеряемых концентрациях, то в более глубоких слоях он только переносится по водным каналам. Сходные градиенты выявлены для pH и питательных веществ. Эти градиенты обуславливают физиологическую вариабельность среди отдельных клеток биопленки. Так, клетки, находящиеся в глубоких слоях биопленки, характеризуются низкой скоростью роста, а клетки на периферии растут более активно. При этом если биопленка сформировалась в слабо подвижной среде, то она имеет низкую силу натяжения и легко разрывается, тогда как биопленка, сформированная в высокоподвижной среде, имеет высокую силу натяжения и очень устойчива к разрывам.

Природа структуры биопленки и ее физиологические свойства обеспечивают входящим в ее состав микроорганизмам повышение устойчивости

Таблица 1. Чувствительность к отдельным антибиотикам планктонных бактерий и бактерий, формирующих биопленку

Микроорганизм	Антибиотик	МПК или МБК для планктонных бактерий, мг/л	Концентрация, эффективная против бактерий в биопленке, мг/л	Ссылка
<i>S. aureus</i> NCTC 8325-4	Ванкомицин	2 (МБК)	20 ^a	[44]
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	Имипинем	1 (МПК)	>1024 ^b	[45]
<i>E. coli</i> ATCC 25922	Ампициллин	2 (МПК)	512 ^b	[45]
<i>P. pseudomallei</i>	Цефтазидим	8 (МБК)	800 ^a	[46]
<i>Streptococcus sanguis</i> 804	Доксициклин	0,063 (МПК)	3,15 ^c	[47]

Примечание: a – концентрация, необходимая для уменьшения популяции биопленки на 99%; b – минимальная концентрация, необходимая для эрадикации биопленки; c – концентрация, необходимая для уменьшения популяции биопленки более чем на 99%.

к антибиотикам, дезинфектантам и влиянию со стороны макроорганизма [42]. В табл. 1 представлены отличия в чувствительности планктонных бактерий и микроорганизмов в биопленке к некоторым антимикробным препаратам. Механизмы приобретенной устойчивости могут быть следующими: 1) значительное снижение проникновения антимикробного препарата в матрицу биопленки; 2) медленное размножение микроорганизмов в биопленке; 3) другие физиологические изменения, связанные с механизмом роста биопленки.

Кроме устойчивости к антимикробным препаратам, структура биопленки делает клетки бактерий в ее составе труднодоступными для атаки иммунной системы макроорганизма.

В соответствии с постулатами Коха в настоящее время нет прямых доказательств, что образование биопленки является определяющим моментом в развитии инфекции. Однако можно полагать, что биопленки играют важную роль при хронических и персистирующих бактериальных инфекциях. Для некоторых гнойно-воспалительных заболеваний, таких как периодонтиты, эндокардиты, инфекции легких при МВ, связь является достаточно выраженной, для других – менее заметной. Как уже подчеркивалось, любой из грамотрицательных неферментирующих микроорганизмов способен вызвать хроническую легочную инфекцию у больных МВ, и поэтому можно предположить, что образование биопленок для этих микроорганизмов является общим фенотипическим признаком.

Другой не менее значимой проблемой является формирование биопленок на медицинских приборах и инструментах [48]. Способностью формировать биопленки на медицинском оборудовании обладают как грамположительные (*Enterococcus* spp., *Staphylococcus* spp., *Streptococcus viridans*), так и грамотрицательные (*E. coli*, *K. pneumoniae*, *Proteus mirabilis*, *P. aeruginosa*, *B. cepacia*) микроорганизмы [49–51]. На скорость и обширность формирования биопленок на медицинских приборах влияет ряд факторов. Среди них необ-

ходимо отметить количество контаминирующих микробных клеток, скорость потока жидкости через прибор, физико-химические характеристики поверхности и температуру окружающей среды. При этом компоненты жидкости могут менять свойства поверхности и скорость прикрепления к ней микробных клеток. Формирование биопленки начинается сразу после прикрепления клеток. Среди медицинских приборов, на которых показано формирование биопленок, наиболее значимыми являются центральные венозные катетеры, искусственные клапаны сердца и мочевые катетеры.

В ряде исследований показано, что созревание биопленки находится под контролем системы «quorum sensing» [38, 40, 52–54]. Установлено, что мутация в гене *lasI* *P. aeruginosa* резко изменяет созревание биопленки [35]. Мутанты по *lasI* не способны к синтезу N-[3-оксододеcanoил]-L-гомосерин-лактона, и развитие биопленки в таких мутантах ограничивается только стадией формирования микроколоний до их созревания в толстые структурированные скопления. Таким образом, биопленки мутантов *lasI* являются недифференцированными. Архитектура нормальной биопленки может быть восстановлена при добавлении в среду извне веществ, ответственных за «quorum sensing» (или систему коллективного восприятия) – N-[3-оксододеcanoил]-L-гомосерин-лактона.

Следует отметить, что биопленки, образуемые мутантными по гену *lasI* микроорганизмами, чувствительны к обработке додецилсульфатом натрия, в то время как биопленки, образуемые «дикими» штаммами, устойчивы к этому детергенту.

Требования полифазного таксономического подхода для идентификации и дифференциации ряда представителей НФБ

Бактерии, в настоящее время классифицируемые как представители рода *Acinetobacter*, имеют длинную историю таксономических изменений. На сегодняшний день к роду *Acinetobacter* отнесены

грамотрицательные оксидазотрицательные неферментирующие бактерии, которые ранее обозначались, по крайней мере, 15 различными наименованиями. Среди них лучше всего известны *Bacterium anitratum*, *Herellea vaginicola*, *Mima polymorpha*, *Achromobacter*, *Alcaligenes*, *Micrococcus calcoaceticus*, *Moraxella glucidolica*, *Moraxella kwoffii*. Только недавно появились рациональные предложения, касающиеся таксономии этих микроорганизмов.

Род *Acinetobacter* в настоящее время определяется как включающий грамотрицательные (иногда трудно окрашиваемые) коккобактерии с содержанием в ДНК G+C 39–47 мол/%, облигатно аэробные, неподвижные, каталаза(+) и оксидаза(-) микроорганизмы. Традиционно считается, что микробный вид представляет собой группу штаммов, дающих высокую степень сходства при тестировании их с помощью методов, определяющих фенотипические признаки. Однако в настоящее время является общепринятым, что гибридизация нуклеиновых кислот и секвенирование обеспечивают наиболее достоверные данные для обозначения вида и определения родства между различными организмами [2]. На основании ДНК-критериев сходства внутри рода *Acinetobacter* выявлено 18 ДНК-ДНК гомологичных групп (геномовидов). Семь из этих геномовидов получили формальные видовые наименования. Показано, что группы 1, 2, 3 и 13TU характеризуются очень высокой степенью генетического родства и поэтому некоторыми исследователями обозначаются как комплекс *A. calcoaceticus* – *A. baumannii* [3, 7]. Многочисленными исследованиями установлено,

Таблица 2. Виды и геномвары комплекса *B. cepacia* [2]

Геномвар	Вид
I	<i>B. cepacia</i>
II	<i>B. multivorans</i>
III	<i>B. cenocepacia</i>
IV	<i>B. stabilis</i>
V	<i>B. vietnamiensis</i>
VI	<i>B. dolosa</i>
VII	<i>B. ambifaria</i>
VIII	<i>B. anthina</i>
IX	<i>B. pyrrocinia</i>

что *A. baumannii* является главным геномовидом, связанным со вспышками НИ. При исследовании 584 штаммов *Acinetobacter* spp., выделенных от 420 больных в 12 различных стационарах в течение одного года, 426 (72,9%) штаммов были идентифицированы как *A. baumannii*. 208 из этих штаммов были выделены из дыхательных путей, 113 – из

крови, 70 – из ран и 35 – из других органов и тканей. Остальные 158 штаммов принадлежали к другим видам *Acinetobacter*: 55 – к геномовиду 3, 29 – к *A. johnsonii* и 21 – к *A. kwoffii*.

Хотя *A. baumannii* в настоящее время считается видом, имеющим наибольшую клиническую значимость, трудно оценивать данные из более ранней литературы, чтобы сказать с определенностью о каких культурах сообщалось в 1980 г., когда описывали *A. anitratum*. Даже сейчас многие сообщения об инфекциях, вызываемых *A. baumannii*, не включают всех необходимых специфических тестов, чтобы с уверенностью можно было говорить об этом виде.

S. maltophilia по культуральным свойствам напоминает *B. cepacia* и может выращиваться на многих плотных питательных средах (кровяной агар, агар МакКонки, селективная среда для *B. cepacia*). Для биохимической идентификации могут быть использованы системы API 20NE (BioMerieux) или PASCO (Difco).

Подобно роду *Acinetobacter* бактерии рода *Burkholderia* также претерпели ряд таксономических изменений, а существующая классификация не является окончательной и завершенной. Сразу после получения родового и видового названий в 1992 г. (*Pseudomonas cepacia* → *Burkholderia cepacia*) штаммы *B. cepacia* были подразделены на несколько геномваров, которые в дальнейшем получили видовые наименования (табл. 2). Последними получившими видовые наименования были *B. cenocepacia* и *B. dolosa*, но несомненно, что число видов данного рода еще будет возрастать. В связи с этим *B. cepacia* предложено называть бактериями комплекса *B. cepacia*. Некоторые представители этого комплекса способны вызывать тяжелые инфекции у больных МВ. Идентификация и дифференциация бактерий комплекса *B. cepacia* осуществляется с помощью ряда фенотипических и генотипических методов, доступных далеко не каждой клинической микробиологической лаборатории [41]. В связи с этим можно полагать, что истинные показатели НИ, вызываемые этим возбудителем, особенно в ОРИТ, даже в экономически развитых странах значительно выше, чем о них сообщается в научной литературе и статистических отчетах.

Эпидемиологические особенности инфекций, вызываемых НФБ

Основным признаком большинства видов грамотрицательных НФБ, вероятно, можно считать то, что они вызывают инфекции у определенных контингентов пациентов (прежде всего, пациентов с иммунодефицитами), в связи с чем чаще выявляются в специализированных отделениях.

Исключением является *P. aeruginosa*, занимающая 4-е место по частоте среди возбудителей НИ в целом и 1-е место среди микроорганизмов, вызывающих нозокомиальные пневмонии.

Важным признаком является природная устойчивость НФБ ко многим антибиотикам. Это связано с тем, что для многих микроорганизмов основной экологической нишей является почва, а среди почвенных микроорганизмов известно достаточно большое число штаммов-продуцентов антибиотиков, а также с многообразием у этих представителей различных внехромосомных элементов (например, плазмид), способных нести в составе генома детерминанты лекарственной устойчивости. Помимо хорошо известных механизмов резистентности к антимикробным препаратам у НФБ распространены системы эффлюкса, роль которых в множественной резистентности к антибиотикам, антисептикам и дезинфектантам в последние годы признается крайне важной.

Наличие ряда особенностей у НФБ отражается на эпидемиологии инфекций, вызываемых этими возбудителями. Так, постоянное обсеменение госпитальной среды носителями, разнообразные механизмы устойчивости к антимикробным препаратам и способность длительно персистировать в окружающей среде позволяют этим микроорганизмам быстро адаптироваться в больничной среде [55, 56].

По нашим данным, в каждой из обследованных нами клиник Москвы циркулируют одновременно несколько генотипов штаммов *V. cepacia* [41]. При такой дивергентности возбудителей для эффективной борьбы с НИ в стационаре необходимо внедрение системы молекулярно-микробиологического мониторинга для своевременного выявления новых эпидемических штаммов возбудителей. Налаживание такого мониторинга является тем более необходимым, что, как подчеркивалось выше, некоторые НФБ требуют для идентификации и дифференциации полифазного таксономического подхода и только при его использовании может быть выявлена истинная значимость этих микроорганизмов как возбудителей НИ. Высокая степень носительства НФБ предъявляет требования к медицинскому персоналу, аналогичные требованиям при стафилококковом носительстве.

Необходимо помнить, что ряд НФБ способны контаминировать медицинские приборы, образуя биопленки, устойчивые к антибиотикам и дезинфектантам. Использование таких приборов для проведения тех или иных лечебных процедур может также приводить к развитию НИ у отдельных больных, а в случае использования медицинских приборов коллективного пользования и к вспышкам НИ.

Заключение

P. aeruginosa, *Acinetobacter* spp., *B. cepacia*, *S. maltophilia* имеют целый ряд общих признаков, в связи с чем еще 10 лет назад многие из них входили в род *Pseudomonas* spp. Общим признаком грамотрицательных НФБ является прежде всего то, что они могут существовать фактически в любой из экологических ниш – почве, воде, воздухе, в тканях и органах животных и растений, демонстрируя этим свои впечатляющие компенсаторные возможности. Некоторые из этих «компенсаторных систем» нам известны. К ним относятся рассмотренные в статье межклеточная сигнальная система «quorum sensing», детерминанты устойчивости к антимикробным препаратам, многочисленные факторы патогенности. Благодаря всему этому НФБ способны существовать не только в естественных экологических нишах, но и в искусственных, созданных человеком – больничной среде, медицинских приборах и инструментах, предметах бытовой техники (кондиционеры и др.). В определенных условиях такое существование приводит к развитию инфекций. При этом распространение НФБ в больничной среде, в связи с их устойчивостью к различным условиям внешней среды и способностью распространяться горизонтально через предметы или руки больных и медперсонала, является достаточно значимым, а экономический ущерб, связанный с распространенностью НИ, вызываемых этими возбудителями, ежегодно только в США измеряться сотнями миллионов долларов.

За исключением *P. aeruginosa*, способной вызывать НИ фактически в любой возрастной группе и в любом специализированном отделении, другие НФБ вызывают инфекции фактически только у определенных групп пациентов – с муковисцидозом, первичными и вторичными иммунодефицитами, больных со злокачественными новообразованиями, хронической гранулематозной болезнью, гемобластозами. Одним из важнейших методов борьбы с инфекциями, вызванными НФБ, должна являться организация системы постоянного молекулярно-микробиологического мониторинга в ЛПУ для своевременного выявления новых эпидемических штаммов. В специализированных отделениях, где лечат таких больных, должна применяться более жесткая система противоэпидемических мероприятий, направленных на борьбу с НИ.

Одним из существенных признаков инфекционных заболеваний XXI века ученые считают появление новых множественноустойчивых штаммов, для которых лечащий врач не будет способен найти эффективный антибиотик [24, 30, 57]. По нашему

мнению, именно НФБ, ввиду наличия у них природной устойчивости ко многим антимикробным препаратам и множества внехромосомных детерминант устойчивости, будут представлять основную проблему в терапии НИ.

Неспособность во многих лабораториях точно идентифицировать бактерии комплексов *Acinetobacter* и *B. cepacia* оставляют этих возбудителей НИ за пределами внимания госпитальных эпидемиологов, что, с одной стороны, скрывает истинную картину заболеваемости НИ в ЛПУ,

создавая состояние мнимого благополучия, а с другой стороны, не позволяет детально изучить эпидемиологию НИ, вызываемых НФБ. В связи с этим представляется целесообразным создание специализированных референтных лабораторий. Можно полагать, что с созданием таких лабораторий будут значительно лучше изучены микробиологические и эпидемиологические аспекты НИ, вызываемых неферментирующими грамотрицательными бактериями.

Литература

1. Kiska D.L., Gilligan P.H. *Pseudomonas*. In: Murray P.R., Baron E.J., Jorgensen J.H., Tenover F.C., Tenover F.C., eds. Manual of Clinical Microbiology. 8th ed. Washington: ASM Press; 2003. p. 719-728.
2. Gilligan P.H., Lum G., Vandamme P.A.R., Whittier S. *Burkholderia*, *Stenotrophomonas*, *Ralstonia*, *Brevundimonas*, *Comamonas*, *Delftia*, *Pandorea*, and *Acidovorax*. Ibid. p. 729-748.
3. Schreckenberger P.C., Daneshvar M.I., Weyant R.S., Hollis D.G. *Acinetobacter*, *Achromobacter*, *Chryseobacterium*, *Moraxella*, and other nonfermentative gram-negative rods. Ibid. p. 749-779.
4. Страчунский Л.С., Решедько Г.К., Рябкова Е.Л. и др. Рекомендации по оптимизации антимикробной терапии нозокомиальных инфекций, вызванных грамотрицательными бактериями в отделениях реанимации и интенсивной терапии. Пособие для врачей. Смоленск: Боргес; 2002. 22 с.
5. Quinn J.P. Clinical problems posed by multiresistant nonfermenting gram-negative pathogens. Clin Infect Dis 1998; 27 (Suppl.):S117-S124.
6. Osmon S., Ward S., Fraser V.J., Kollef M.H. Hospital mortality for patients with bacteremia due to *Staphylococcus aureus* or *Pseudomonas aeruginosa*. Chest 2004; 125:607-16.
7. Bergogne-Berezin E., Towner K.J. *Acinetobacter* spp. as nosocomial pathogens: microbiological, clinical, and epidemiological features. Clin Microbiol Rev 1996; 9:148-65.
8. Seifert H., Dijkshoorn L., Gerner-Schmidt P., Pezler N., Tjernberg I., Vaneechoutte M. Distribution of *Acinetobacter* species on human skin; comparison of phenotypic and genotypic identification methods. J Clin Microbiol 1997; 35:2819-25.
9. McDonald L.C., Banerjee S.N., Jarvis W.R. Seasonal variation of *Acinetobacter* infections: 1987-1996. Nosocomial Infections Surveillance System. Clin Infect Dis 1999; 29:1133-7.
10. Denton M., Todd N.J., Kerr K.G., et al. Molecular epidemiology of *Stenotrophomonas maltophilia* isolated from clinical specimens from patients with cystic fibrosis and associated environmental samples. J Clin Microbiol 1998; 36:1953-8.
11. Denton M., Kerr K.G. Microbiology and clinical aspects of infection associated with *Stenotrophomonas maltophilia*. Clin Microbiol Rev 1998; 11:57-80.
12. Valdezate S., Vindel A., Maiz L. Persistence and variability of *Stenotrophomonas maltophilia* in cystic fibrosis patients, Madrid, 1991-1998. Emerg Infect Dis 2001; 7:113-22.
13. VanCouwenberghe C.J., Farver T.B., Cohen S.H. Risk factors associated with isolation of *Stenotrophomonas (Xantomonas) maltophilia* in clinical specimens. Infect Control Hosp Epidemiol 1997; 18:316-21.
14. Apisarnthanarak A., Mayfield J.L., Garison T., et al. Risk factors for *Stenotrophomonas maltophilia* bacteremia in oncology patients: a case-control study. Infect Control Hosp Epidemiol 2003; 24:269-74.
15. Govan J.R.W., Hughes J.E., Vandamme P. *Burkholderia cepacia*: medical, taxonomic and ecological issues. J Med Microbiol 1996; 45:395-407.
16. Luczak J.B., Cannon C.L., Pier G.B. Lung infections associated with cystic fibrosis. Clin Microbiol Rev 2002; 15:194-222.
17. Cystic Fibrosis Foundation. Patient Registry 1999 Annual Data Report. Cystic Fibrosis Foundation, Bethesda, 2000.
18. Jones A.M., Todd M.E., Webb A.K. *Burkholderia cepacia*: current clinical issues, environmental controversies and ethical dilemmas. Eur Respir J 2001; 17:295-301.
19. Bentranpetit J., Calafell F. Genetic and geographical variability in cystic fibrosis: evolutionary considerations. Ciba Found Symp 1996; 197:97-114; discussion 114-118.
20. Bear C.E., Li C.H., Kartner N., et al. Purification and functional reconstitution of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR). Cell 1992; 68:809-18.
21. Cahill P., Nason M.W., Ambrose C., et al. Identification of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator domains that are important for interactions with ROMK2. J Biol Chem 2000; 275:16697-701.
22. Pier G.B. CFTR mutations and host susceptibility to *Pseudomonas aeruginosa* infection. Curr Opin Microbiol 2002; 5:81-6.
23. Frederiksen B., Koch C., Hoiby N. Changing epidemiology of *Pseudomonas aeruginosa* infection in Danish cystic fibrosis patients (1974-1995). Pediatr Pulmonol 1999; 28:159-66.

24. Davies J.E. Origins, acquisition and dissemination of antibiotic resistance determinants. In: Chadwick D.J, editor. Antibiotic resistance: origins, evolution, selection and spread. Chichester (UK): John Wiley and Sons Ltd.; 1997. p. 15-35.
25. Grkovic S., Brown M.H., Skurray R.A. Regulation of bacterial drug export systems. *Microbiol Mol Biol Rev* 2002; 66:671-701.
26. Jack D.L., Yang N.M., Saier M.H. Jr. The drug/metabolite transporter superfamily. *Eur J Biochem* 2001; 268:3620-39.
27. Neyfakh A.A. Mystery of multidrug transporters: the answer can be simple. *Mol Microbiol* 2002; 44:1123-30.
28. Pearson J.P., Van Delden C., Iglewski B.H. Active efflux and diffusion are involved in transport of *Pseudomonas aeruginosa* cell-to-cell signals. *J Bacteriol* 1999; 181:1203-10.
29. FitzSimmons S.C. The changing epidemiology of cystic fibrosis. *Curr Probl Pediatr* 1994; 24:171-9.
30. Masuda N., Sakagawa E., Ohya S. Outer membrane proteins responsible for multiple drug resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* 1995; 39:645-9.
31. Poole K. Multidrug efflux pump and antimicrobial resistance in *Pseudomonas aeruginosa* and related organisms. *J Mol Microbiol Biotechnol* 2001; 3:255-64.
32. Zhang L., Li X.Z., Poole K. SmeDEF multidrug efflux pump contributes to intrinsic multidrug resistance in *Stenotrophomonas maltophilia*. *Antimicrob Agents Chemother* 2001; 45:3497-503.
33. Moore R.A., DeShazer D., Reckseidler S., et al. Efflux-mediated aminoglycoside and macrolide resistance in *Burkholderia pseudomallei*. *Antimicrob Agents Chemother* 1999; 43:465-70.
34. Albus A.M., Pesci E.C., Runyen-Janecky L.J., et al. Vfr controls quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* 1997; 179:3928-35.
35. Van Delden C., Iglewski B.H. Cell-to-cell signaling and *Pseudomonas aeruginosa* infections. *Emerg Infect Dis* 1998; 4:561-70.
36. Bertani I., Sevo M., Kojic M., Venturi V. Role of GacA, LasI, RhlI, Ppk, PsrA, Vfr and ClpXP in the regulation of the stationary-phase sigma factor rpoS/RpoS in *Pseudomonas*. *Arch Microbiol* 2003; 180:264-71.
37. Gotschlich A., Huber B., Geisenberger O., et al. Synthesis of multiple N-acylhomoserine lactones is widespread among members of the *Burkholderia cepacia* complex. *Syst Appl Microbiol* 2001; 24:1-14.
38. Huber B., Riedel K., Hentzer M., et al. The cep quorum-sensing system of *Burkholderia cepacia* H111 controls biofilm formation and swarming motility. *Microbiology* 2001; 147:2517-28.
39. Conway B. A., Greenberg E.P. Quorum sensing signals and quorum sensing genes in *Burkholderia vietnamiensis*. *J Bacteriol* 2002; 184:1187-91.
40. Lutter E., Lewenza S., Dennis J.J., et al. Distribution of quorum-sensing genes in *Burkholderia cepacia* complex. *Infect Immun* 2001; 69:4661-6.
41. Шагинян И.А., Чернуха М.Ю. Бактерии комплекса *Burkholderia cepacia*: особенности диагностики, генома и метаболизма. Молекулярная генетика, микробиология, вирусология 2003; (2):3-10.
42. O'Toole G., Kaplan H.B., Kolter R. Biofilm formation as microbial development. *Annu Rev Microbiol* 2000; 54:49-79.
43. Donlan R.M., Costerton J.W. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clin Microbiol Rev* 2002; 15:167-93.
44. Williams I., Venables W.A., Lloyd D., et al. The effects of adherence to silicone surfaces on antibiotic susceptibility in *Staphylococcus aureus*. *Microbiology* 1997; 143:2407-13.
45. Ceri H., Olson M.E., Stremick C., et al. The Calgary Biofilm Device: new technology for rapid determination of antibiotic susceptibilities of bacterial biofilms. *J Clin Microbiol* 1999; 37:1771-6.
46. Vorachit M., Lam K., Jayanetra P., Costerton J.W. Resistance of *Pseudomonas pseudomallei* growing as a biofilm on silastic disks to ceftazidime and co-trimoxazole. *Antimicrob Agents Chemother* 1993; 37:2000-2.
47. Larsen T., Fiehn N.-E. Resistance of *Streptococcus sanguis* biofilms to antimicrobial agents. *APMIS* 1996; 104:280-4.
48. Donlan R.M. Biofilms and device-associated infections. *Emerg Infect Dis* 2001; 7:277-81.
49. Brooun A., Liu S., Lewis K. A dose-response study of antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Antimicrob Agents Chemother* 2000; 44:640-6.
50. Drenkard E., Ausubel F.M. *Pseudomonas* biofilm formation and antibiotic resistance are linked to phenotypic variation. *Nature* 2002; 416:740-3.
51. Xu K.D., McFeters G.A., Stewart P.S. Biofilm resistance to antimicrobial agents. *Microbiology* 2000; 146:547-9.
52. Conway B.A., Venu V., Speert D.P. Biofilm formation and acyl homoserine lactone production in the *Burkholderia cepacia* complex. *J Bacteriol* 2002; 184:5678-85.
53. Davies D.G., Parsek M.R., Pearson J.P., et al. The involvement of cell-to cell signals in the development of a bacterial biofilm. *Science* 1998; 280:295-8.
54. Singh P.K., Schaeer A.L., Parsek M.R., et al. Quorum-sensing signals indicate that cystic fibrosis lungs are infected with bacterial biofilms. *Nature* 2000; 407:762-4.
55. Laing F.P.Y., Ramotar K., Read R.R., et al. Molecular epidemiology of *Xanthomonas maltophilia* colonization and infection in the hospital environment. *J Clin Microbiol* 1995; 33:513-8.
56. Liang X., Pharm X., Olsen M.V., Lory S. Identification of genomic island present in the majority of pathogenic isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* 2001; 183:843-53.
57. Jones A.M., Govan J.R.W., Doherty C.J., et al. Spread of a multiresistant strain of *Pseudomonas aeruginosa* in an adult cystic fibrosis unit. *Lancet* 2001; 358:557-8.