

# ЭПИДЕМИОЛОГИЯ И МЕХАНИЗМЫ РЕЗИСТЕНТНОСТИ, СОВРЕМЕННЫЕ МЕТОДИКИ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ ГРИБОВ

***Александр Валерьевич ВЕСЕЛОВ***

Зам. директора  
НИИ антимикробной химиотерапии  
ФГБОУ ВО СГМУ Минздрава России

# РАССМАТРИВАЕМЫЕ ВОПРОСЫ

---

## I. Грибы рода *Candida*

- Азолы vs. не-*albicans* виды *Candida*
- Эхинокандины vs. *Candida*
- *Candida auris*
- Методики определения чувствительности дрожжей

## II. Грибы рода *Aspergillus*

- Азолы vs. *Aspergillus fumigatus*
- Методики определения чувствительности мицелиальных грибов

# ПРИРОДНАЯ (ПЕРВИЧНАЯ) РЕЗИСТЕНТНОСТЬ

Organism	Antifungal agent								
	AmB <sup>a</sup>	Flu	Itr	Vor	Pos	Anidulafungin	Caspofungin	Micafungin	Flucytosine
<i>Aspergillus</i> species	+	-	+	+	+	+	+	+	-
<i>A. flavus</i>	±	-	+	+	+	+	+	+	-
<i>A. fumigatus</i>	+	-	+	+	+	+	+	+	-
<i>A. niger</i>	+	-	±	+	+	+	+	+	-
<i>A. terreus</i>	-	-	+	+	+	+	+	+	-
<i>Candida</i> species	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>C. albicans</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>C. glabrata</i>	+	±	±	+	+	+	+	+	+
<i>C. krusei</i>	+	-	±	+	+	+	+	+	±
<i>C. lusitaniae</i>	-	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>C. parapsilosis</i>	+	+	+	+	+	±	±	±	+
<i>C. tropicalis</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Cryptococcus neoformans</i>	+	+	+	+	+	-	-	-	+
<i>Coccidioides</i> species	+	+	+	+	+	± <sup>b</sup>	± <sup>b</sup>	± <sup>b</sup>	-
Blastomyces	+	+	+	+	+	± <sup>b</sup>	± <sup>b</sup>	± <sup>b</sup>	-
<i>Histoplasma</i> species	+	+	+	+	+	± <sup>b</sup>	± <sup>b</sup>	± <sup>b</sup>	-
<i>Fusarium</i> species	±	-	-	+	+	-	-	-	-
<i>Scedosporium apiospermum</i>	±	-	±	+	+	-	-	-	-
<i>Scedosporium prolificans</i>	-	-	-	±	±	-	-	-	-
Zygomycetes	±	-	-	-	+	-	-	-	-

**NOTE.** Plus signs (+) indicate that the antifungal agent has activity against the organism specified. Minus signs (-) indicate that the antifungal agent does not have activity against the organism specified. Plus-minus signs (±) indicate that the agent has variable activity against the organism specified. AmB, amphotericin B; Flu, fluconazole; Itr, itraconazole; Pos, posaconazole; Vor, voriconazole. Data are derived from [5-26].

<sup>a</sup> Includes lipid formulations.

<sup>b</sup> In vitro data show that the echinocandins (specifically, micafungin) may have variable activity against the dimorphic fungi, depending on whether they are in the mycelial or yeastlike form. To date, there has been one case report of successful therapy with caspofungin for *C. immitis* infection.

# АЗОЛЫ vs. *Candida*: В ЧЕМ ПРИЧИНЫ?

---

- Распространенность кандидоза стабильно высока
- Наиболее применяемый класс АМ в течение многих лет
- Необоснованное назначение (профилактика!)
- Низкие дозы
- Некачественные генерики
- Широкий спектр потенциальных механизмов формирования резистентности и их сочетание

# МЕХАНИЗМ ДЕЙСТВИЯ АЗОЛОВ

Фермент системы цитохрома P450

**14- $\alpha$ -деметилаза**

Дрожжи  
**ERG11**



Мицелиальные грибы  
**Cyp51**



**ланостерол** → **эргостерол**

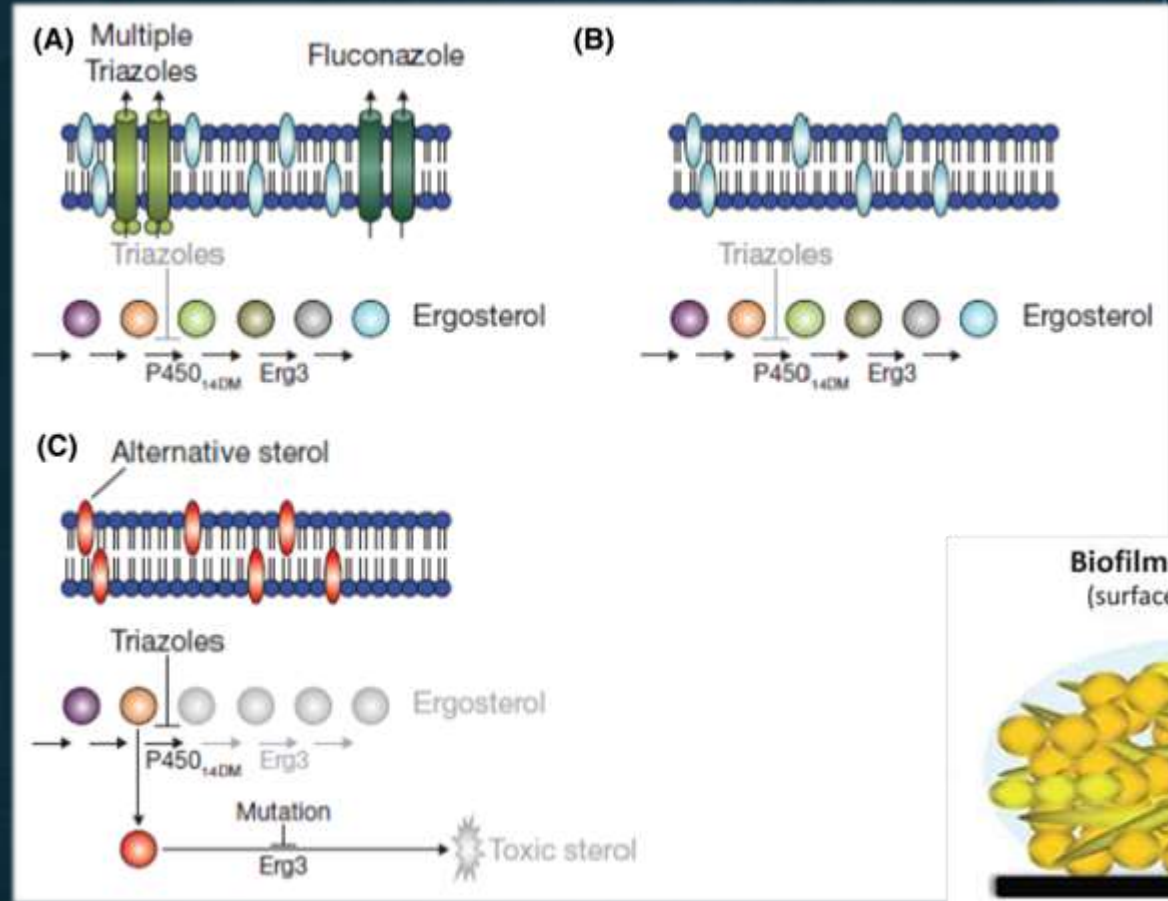
Удаление  
метиловой  
группы в C14

**Фунгистатическое**  
действие

**Фунгицидное**  
действие

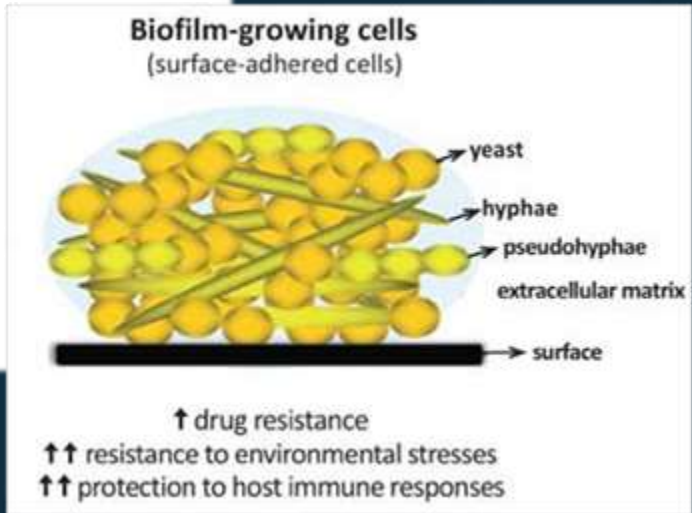
# АЗОЛЫ vs. *Candida*: МЕХАНИЗМЫ РЕЗИСТЕНТНОСТИ

Индукция эффлюксных механизмов (MFS-, ABC-транспортеры: Tac1, Mrr1, CgPdr1, ...) **Поли-Р**



Изменение или повышенная регуляция фермента-мишени ланостерол-14- $\alpha$ -деметилазы (до 140 точечных мутаций *ERG11*)

Создание обходных путей метаболизма предупреждение синтеза токсичного 14- $\alpha$ -метил-3,6-диола за счет мутаций *ERG3*, кодирующего стерол- $\delta$ 5,6-десатуразу



**Биопленки**  
захват молекул насыщенным глюкозам полимерным матриксом

# ЭПИДЕМИОЛОГИЯ КАНДИДЕМИИ И ИК

Страна, год	Частота в год	<i>C. albicans</i> / не- <i>albicans</i> , %	Азол-Р, %	30-дневная летальность, %
<b>США,</b> 2008-11	13,3-26,2/100.000 населения	<b>37 / 63</b>	<b>7</b>	28-29
<b>Исландия,</b> 2000-11	5,7/100.000 населения	<b>56 / 44</b>	<b>3</b>	30
<b>Испания,</b> 2010-11	8,1/100.000 населения	<b>45 / 55</b>	<b>21</b>	31
<b>Бразилия,</b> 2007-10	НД	<b>34 / 66</b>	<b>9</b>	72
<b>Перу,</b> 2013-15	2/1.000 госпитализаций	<b>28 / 72</b>	<b>3</b>	40
<b>Лат. Америка,</b> 2008-10	0,3-2/1.000 госпитализаций	<b>38 / 62</b>	<b>3</b>	41
<b>Индия,</b> 2011-12	6,5/1.000 госпитализаций	<b>21 / 79</b>	<b>12</b>	45

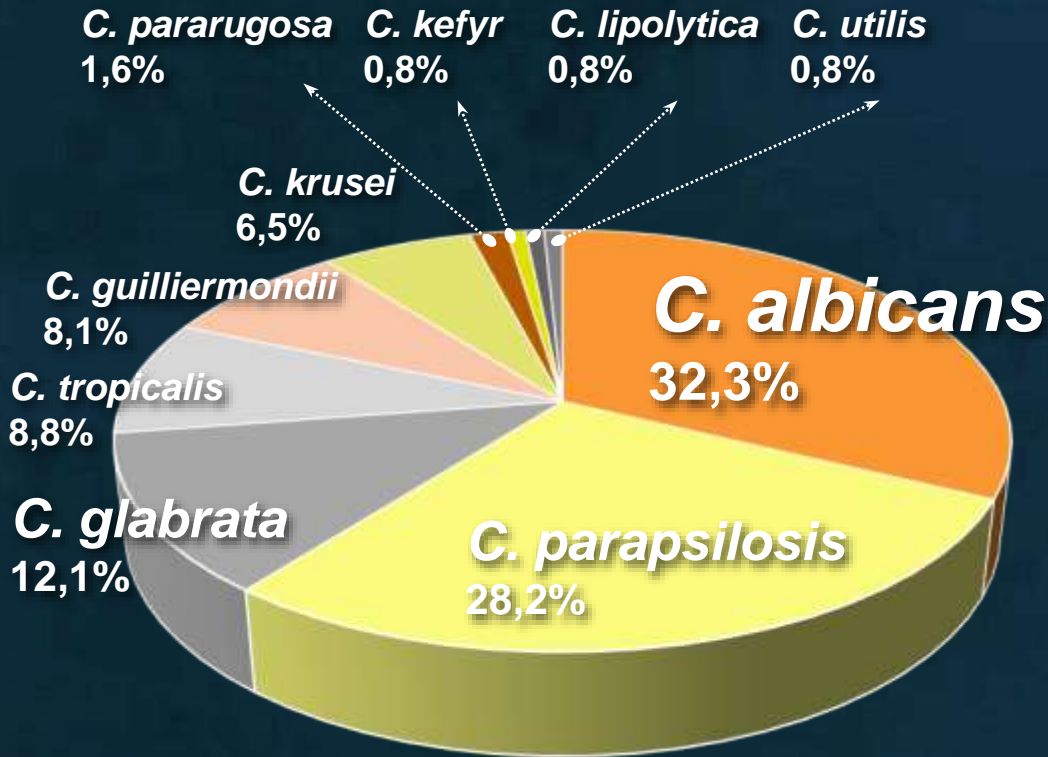
АВВ



Cleveland A., 2012; Asmundsdottir L., 2013; Puig-Asensio M., 2014; Doi A., 2016; Rodriguez L., 2017; Nucci M., 2013; Chakrabarti A., 2015.

# РЕЗИСТЕНТНОСТЬ *Candida*: СИТУАЦИЯ В РОССИИ

- N=124 (2011-15 гг.) из стерильных биосубстратов



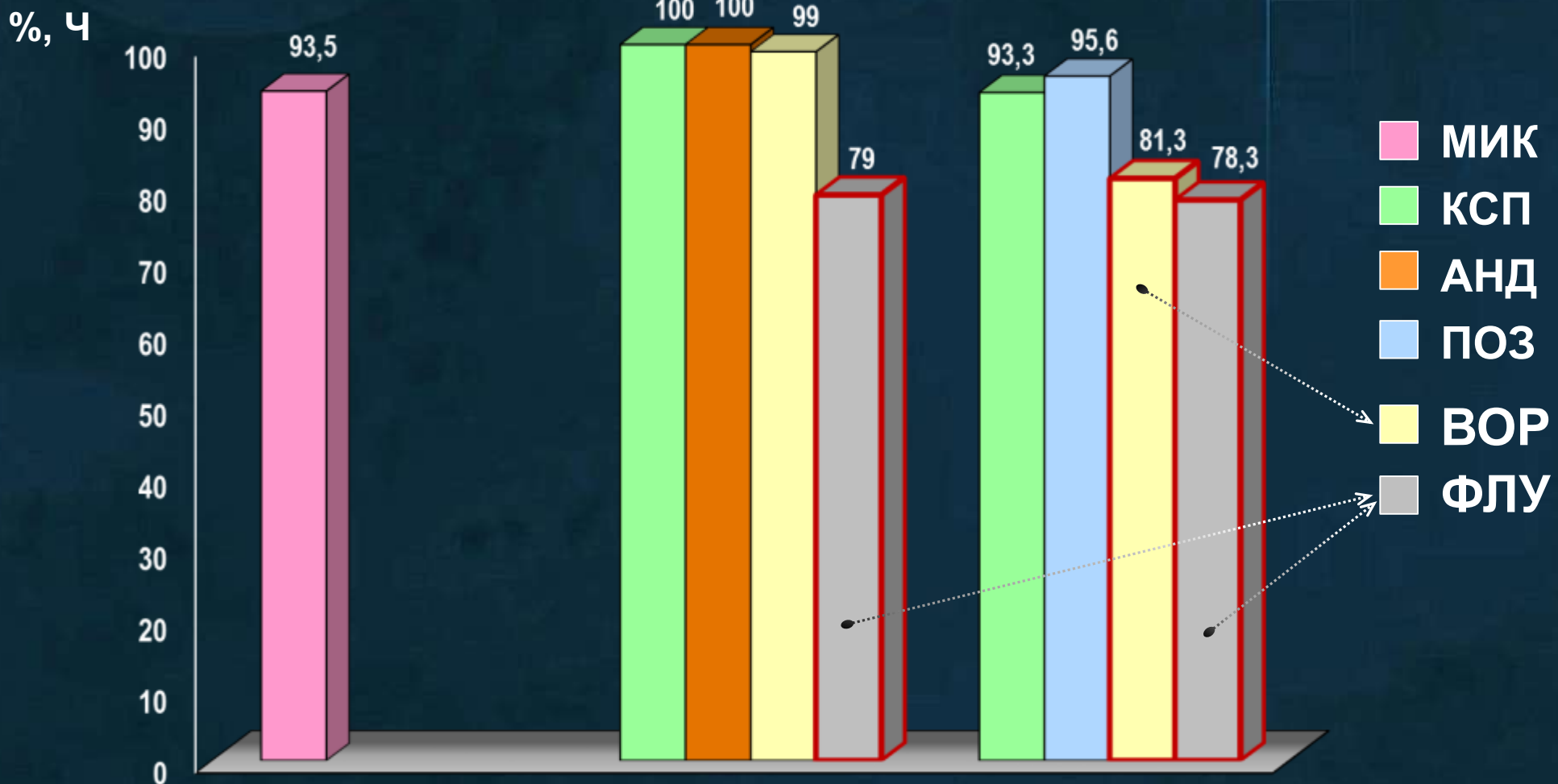
## Флуконазол

	CLSI M44-A	CLSI M27-A3
Ч	65,3	66,9
ЧДЗ	17,7	16,1
Р	17	17

Корреляция **95,2%**



# РЕЗИСТЕНТНОСТЬ *Candida*: СИТУАЦИЯ В РОССИИ



Грачева А.Н., 2014:  
307 штаммов  
*Candida* из крови

Климко Н.Н., 2015:  
211 пациентов  
≥18 лет с ИК в ОРИТ

Клясова Г.А., 2017:  
462 штамма  
*Candida* из крови

# КОГДА НЕОБХОДИМО ОПРЕДЕЛЯТЬ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ *Candida* К АЗОЛАМ?

---

- Все стерильные в норме биосубстраты
- Терапия азолами в анамнезе (ближайший год)
- (Почти) все не-*albicans* виды (*C. glabrata*) *C. albicans*, *C. tropicalis*
- Высокий локальный уровень резистентности

**Каждое** медицинское учреждение, в котором **регулярно** применяются **азолы** для терапии или профилактики, должны проводить **постоянный мониторинг спектра** возбудителей и **чувствительности** выделяемых патогенов к азолам

# ЧЕМ ВОЗМОЖНО ОПРЕДЕЛИТЬ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ *Candida* К АЗОЛАМ?

---

- **Методы разведений:**  
CLSI (M27-A4) / EUCAST (E.DEF 7.3.1., 01.2017)
- **Методики на основе диффузии препарата в агар:**  
Диско-диффузионный метод (CLSI M44-A2)  
Е-тесты
- **Готовые тест-системы на основе колориметрии:**  
Sensititre<sup>®</sup> YeastOne<sup>™</sup>  
Fungitest<sup>®</sup>  
Candifast<sup>®</sup> / Fungifast<sup>®</sup>
- **Автоматизированные системы:**  
VITEK 2  
ATB Fungus 3

# KORRELYACIJA METODIK

Comparison of the Vitek 2 Antifungal Susceptibility System with the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) and European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) Broth Microdilution Reference Methods and with the Sensititre YeastOne and Etest Techniques for *In Vitro* Detection of Antifungal Resistance in Yeast Isolates<sup>∇||</sup>

Manuel Cuenca-Estrella,\* Alicia Gomez-Lopez, Ana Alastruey-Izquierdo, Leticia Bernal-Martinez, Isabel Cuesta, Maria J. Buitrago, and Juan L. Rodriguez-Tudela

CLSI  
EUCAST  
vs.  
Vitek 2  
Etest  
SYO

TABLE 1. Essential agreement rates between results given by the Vitek 2 system, Sensititre YeastOne, and Etest and the reference procedures, by antifungal agent

Antifungal agent <sup>∇</sup>	% EA between <sup>b</sup> :								
	Vitek and EUCAST	Vitek and CLSI24H	Vitek and CLSI48H	Etest and EUCAST	Etest and CLSI24H	Etest and CLSI48H	SYOne and EUCAST	SYOne and CLSI24H	SYOne and CLSI48H
AMB	98.7	99.3	100	98.4	97.4	96.4	97.9	97.4	96.0
5FC	98.0	98.6	96.0	96.4	95.2	95.2	96.0	95.2	95.2
FLC	97.5	96.6	96.2	97.2	96.4	95.2	97.2	96.0	95.6
VRC	97.5	96.8	96.6	95.2	95.2	95.2	95.5	95.6	95.2
Total	97.9	97.8	97.3	96.8	96.1	95.5	96.6	96.1	95.5

>95%



# МЕХАНИЗМ ДЕЙСТВИЯ ЭХИНОКАНДИНОВ

I. Неконкурентные ингибиторы синтеза **1,3-β-D-глюкана**

II. Он обеспечивает целостность структуры клетки

- Клеточные стенки *Candida* и *Aspergillus* содержат большое количество 1,3-βDг
- Комплекс синтеза глюкана локализован на концах гиф мицелиальных грибов



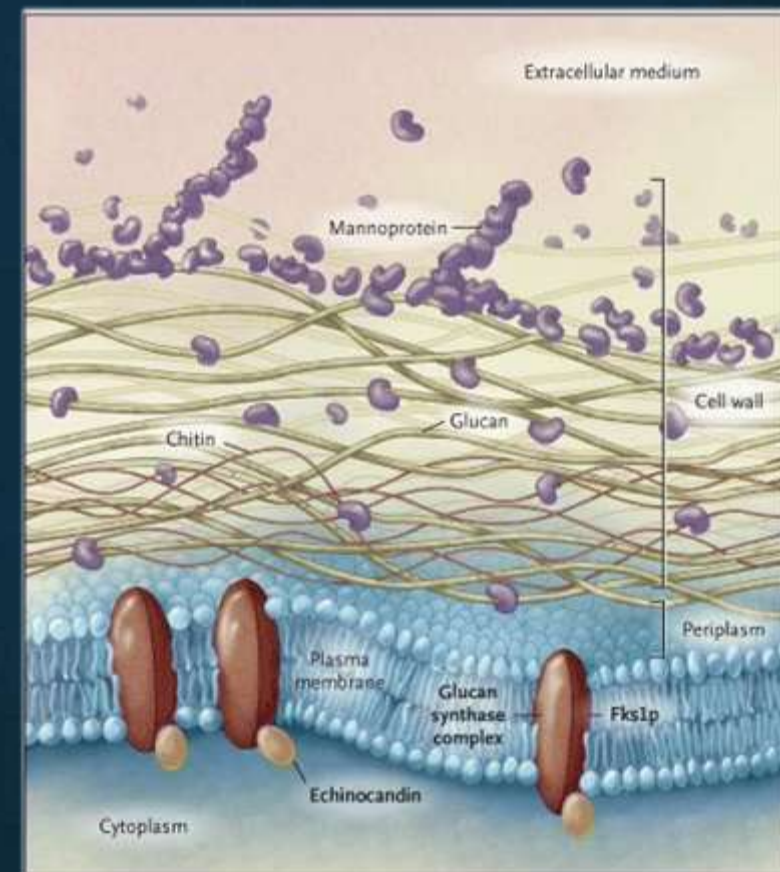
III. Нарушение синтеза 1,3-βDг приводит к:

- *Candida*: изменениям морфологии и потере жизнеспособности = фунгицидное действие
- *Aspergillus*: значимым изменениям морфологии и структуры концевых участков гиф мицелия = фунгистатическое действие



# МЕХАНИЗМЫ РЕЗИСТЕНТНОСТИ *Candida* К ЭК

- Приобретенные мутации генов *Fks* (*Fks1*, *Fks2*, *Fks3*):
  - ↓ чувствительности Гл-синт
  - повышение МПК
  - **клиническая НЕэффективность**
- Природные мутации *Fks*:
  - *C. parapsilosis* и *C. guilliermondii*
  - сопровождаются повышением МПК
  - меньшее ↓ чувствительности Гл-синт
  - клиническая неэффективность +/-
- **Адаптивный стрессовый ответ:**
  - ↑↑ синтеза хитина (*C. parapsilosis*)
  - heat-shock protein 90 (HSP90) pathway
  - osmolarity glycerol (HOG) pathway
  - клиническая эффективность **сохранена**



# МЕХАНИЗМЫ РЕЗИСТЕНТНОСТИ *Candida* К ЭК

- *C. albicans*

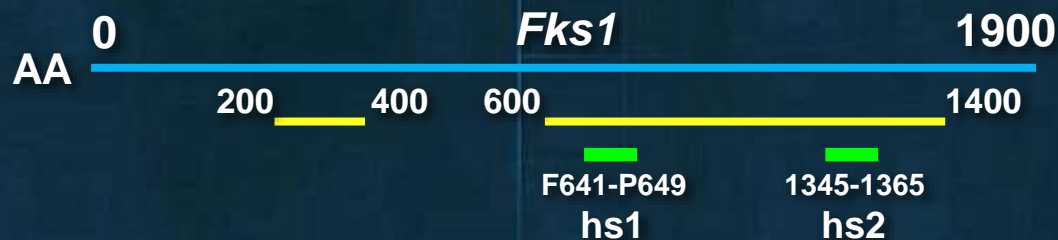
- мутации *Fks1* hs1 в 90% случаев
- 93% Р штаммов: S645 / S641

- *C. glabrata*

- мутации *Fks2* в 3 раза чаще *Fks1*
- *Fks2*: >50% Р штаммов S663P
- *Fks1*: >30% Р штаммов S629P

- В 99% случаев любая из мутаций приводит к перекрестной резистентности

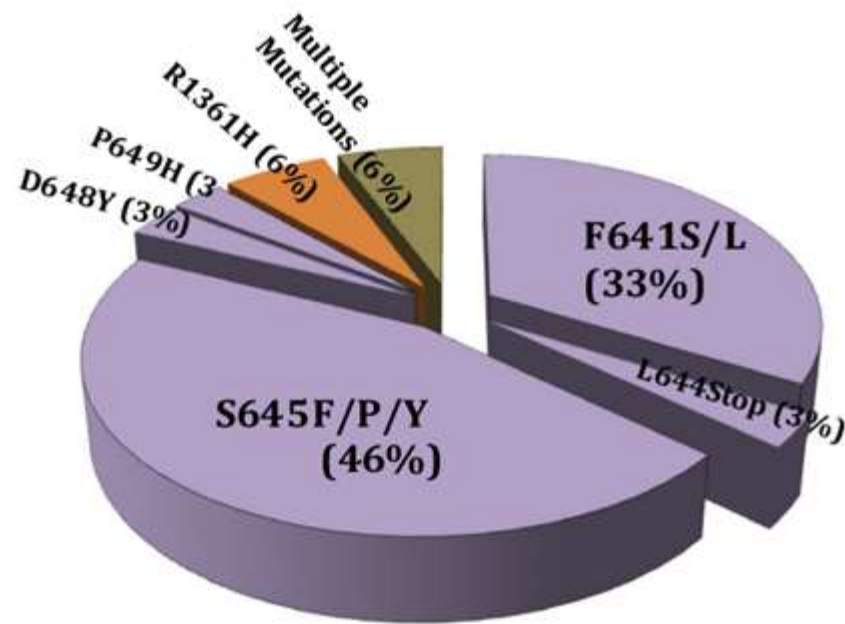
- Предикторы мутаций гена *Fks* – **предшествующая терапия ЭК** (ОШ 19.647 [95% ДИ, 7.19-58.1])\*



**A**

Organism	Fks1		Fks2	
	Hot Spot 1	Hot Spot 2	Hot Spot 1	Hot Spot 2
<i>C. albicans</i>	R <sub>641</sub> LTLRLRDP	DWIRRYTL	NO	NO
<i>C. krusei</i>	F <sub>655</sub> LILSIRDP	DWIRRYTL	NO	NO
<i>C. glabrata</i>	R <sub>625</sub> LILSIRDP	DWIRRYTL	R <sub>663</sub> LILRLRDP	D <sub>618</sub> IRYTL
<i>C. guilliermondii</i>	F <sub>632</sub> MALSIRDP	DWIRRYTL	NO	NO
<i>C. tropicalis</i>	R <sub>641</sub> LTLRLRDP	DWIRRYTL	NO	NO
<i>C. parapsilosis</i> *	F <sub>652</sub> LTLSIRDA	DWIRRYTL	NO	NO
<i>C. orthopsilosis</i>	F <sub>641</sub> LTLSIRDA	DWIRRYTL	NO	NO
<i>C. metapsilosis</i>	F <sub>641</sub> LTLSIRDA	DWIRRYTL	NO	NO

**B**



# ЭК-Р ШТАММЫ *Candida* spp.

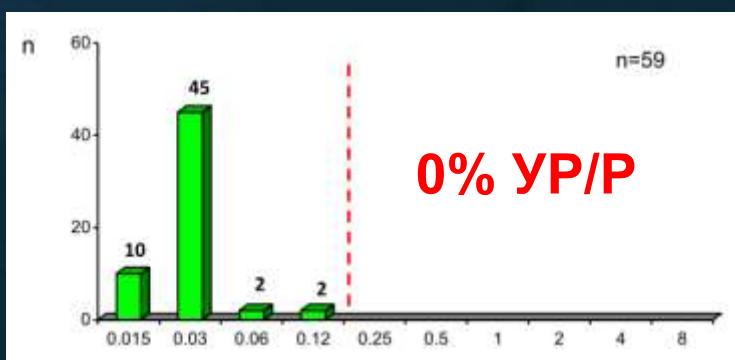
---

- Частота встречаемости мутаций генов *Fks* в целом остается **низкой** среди клинических штаммов *Candida*
  - **Европа** – не более 1-2%
  - **США** – 1-5%, отдельные клиники до 10% (*C. glabrata*)
- Наиболее часто мутации возникают **среди *Cg*, реже *Calb***
- В большинстве случаев это штаммы от пациентов, **получавших длительную (недели, месяцы) терапию ЭК**
- Не всегда есть четкая связь мутаций в генах *Fks* и клинической неэффективности → **влияние факторов** со стороны пациента, терапии, других механизмов резистентности
- В стационарах с высоким потреблением ЭК необходим **постоянный мониторинг** видового состава

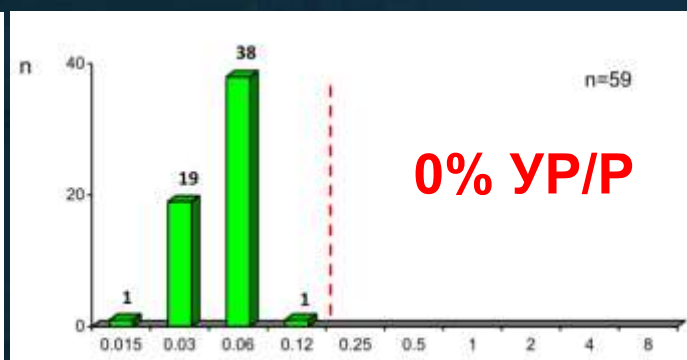


# РЕЗИСТЕНТНОСТЬ *Candida*: СИТУАЦИЯ В РОССИИ

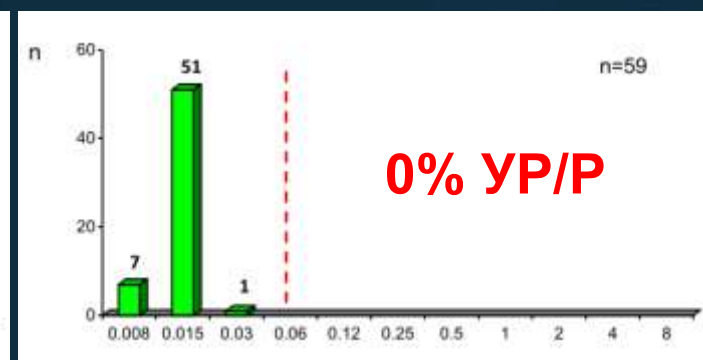
- 59 штаммов *C. glabrata* из 6 центров
- 44% штаммов из периферической крови
- Чувствительность к ФЛУ и ЭК с помощью Sensititre™ YeastOne™ / CLSI
- **ФЛУ**: все штаммы чувствительные дозозависимые (2-32 мг/Л)
- **ЭК**: большинство показателей МПК от 0,015 до 0,03 мг/Л



**Анидулафунгин**  
0,03 мг/Л у 76,2% штаммов



**Каспофунгин**  
0,06 мг/Л у 64,4% штаммов



**Микафунгин**  
0,015 мг/Л у 88,1% штаммов

# КОГДА НЕОБХОДИМО ОПРЕДЕЛЯТЬ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ *Candida* К ЭХИНОКАНДИНАМ?

---

- Выделение *C. glabrata* у пациента с предшествующей терапией ЭК
- Штаммы из стерильных биосубстратов при неэффективности начальной терапии и прорывных инфекциях
- Высокий локальный уровень резистентности к ЭК (?)
- *C. parapsilosis* – рекомендовано IDSA 2016
- Нет смысла определять чувствительность ко всем 3 ЭК  
**EUCAST**                    анидулафунгин или микафунгин  
**CLSI**                        анидулафунгин

# ЧЕМ ВОЗМОЖНО ОПРЕДЕЛИТЬ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ *Candida* К ЭХИНОКАНДИНАМ?

- **Методы разведений:**  
CLSI (M27-A4) / EUCAST (E.DEF 7.3.1., 01.2017)
- **Методики на основе диффузии препарата в агар:**  
Диско-диффузионный метод (CLSI M44-A2)  
E-тесты
- **Готовые тест-системы на основе колориметрии:**  
Sensititre™ YeastOne™
- **Автоматизированные системы:**  
VITEK 2

# КОРРЕЛЯЦИЯ МЕТОДИК

Comparison of the Sensititre YeastOne colorimetric antifungal panel with CLSI microdilution for antifungal susceptibility testing of the echinocandins against *Candida* spp., using new clinical breakpoints and epidemiological cutoff values<sup>☆</sup>

M.A. Pfaller<sup>a,b</sup>, V. Chaturvedi<sup>c</sup>, D.J. Diekema<sup>a,\*</sup>, M.A. Ghannoum<sup>d</sup>, N.M. Holliday<sup>e</sup>, S.B. Killian<sup>e</sup>, C.C. Knapp<sup>e</sup>, S.A. Messer<sup>a,b</sup>, A. Miskou<sup>e</sup>, R. Ramani<sup>c</sup>

**Table 1**  
Categorical agreement (CA) between Sensititre YeastOne antifungal panel MICs and 24-h CLSI BMD anidulafungin, caspofungin, and micafungin MICs for 580 isolates of *Candida* using new clinical breakpoints or epidemiological cutoff values.

Species (no. of isolates tested)	Antifungal agent	% of MICs by category <sup>a,b</sup>			CA%	% of errors <sup>c</sup>		
		S	I	R		VME	ME	Minor
<i>C. albicans</i> (174)	Anidulafungin	100.0	0.0	0.0	100.0	0.0	0.0	0.0
	Caspofungin	100.0	0.0	0.0	98.3	0.0	0.0	1.7
	Micafungin	100.0	0.0	0.0	100.0	0.0	0.0	0.0
<i>C. glabrata</i> (87)	Anidulafungin	95.4	3.4	1.2	93.1	1.1	0.0	5.8
	Caspofungin	83.9	11.5	4.6	89.7	1.1	1.1	8.1
	Micafungin	97.6	1.2	1.2	98.9	0.0	0.0	1.1
<i>C. parapsilosis</i> (90)	Anidulafungin	98.9	1.1	0.0	96.7	0.0	0.0	3.3
	Caspofungin	100.0	0.0	0.0	100.0	0.0	0.0	0.0
	Micafungin	100.0	0.0	0.0	100.0	0.0	0.0	0.0
<i>C. tropicalis</i> (73)	Anidulafungin	98.6	1.4	0.0	100.0	0.0	0.0	0.0
	Caspofungin	100.0	0.0	0.0	100.0	0.0	0.0	0.0
	Micafungin	98.6	0.0	1.4	100.0	0.0	0.0	0.0
<i>C. krusei</i> (81)	Anidulafungin	100.0	0.0	0.0	98.8	0.0	0.0	1.2
	Caspofungin	76.5	23.5	0.0	69.1	1.2	0.0	29.7
	Micafungin	100.0	0.0	0.0	100.0	0.0	0.0	0.0
<i>C. lusitaniae</i> (75)	Anidulafungin	100.0		0.0	100.0	0.0	0.0	0.0
	Caspofungin	100.0		0.0	100.0	0.0	0.0	0.0
	Micafungin	98.7		1.3	98.7	1.3	0.0	0.0
All <i>Candida</i> spp. (580)	Anidulafungin	99.1	0.7	0.2	98.3	0.2	0.0	1.5
	Caspofungin	94.1	5.0	0.9	93.6	0.3	0.2	5.9
	Micafungin	99.3	0.2	0.5	99.6	0.2	0.0	0.2

CLSI

vs.

SYO

Каспо?



# КОРРЕЛЯЦИЯ МЕТОДИК

Multicenter Comparison of the Etest and EUCAST Methods for Antifungal Susceptibility Testing of *Candida* Isolates to Micafungin

M.-E. Bougnoux,<sup>a</sup> E. Dannaoui,<sup>b</sup> I. Accoceberry,<sup>c</sup> A. Angoulvant,<sup>d</sup> E. Bailly,<sup>e</sup> F. Botterel,<sup>f</sup> S. Chevrier,<sup>g</sup> T. Chouaki,<sup>h</sup> M. Cornet,<sup>i</sup> F. Dalle,<sup>j</sup> A. Datry,<sup>k</sup> A. Dupuis,<sup>l</sup> A. Fekkar,<sup>k,l</sup> J. P. Gangneux,<sup>g</sup> J. Guitard,<sup>l,m</sup> C. Hennequin,<sup>l,m</sup> Y. Le Govic,<sup>n</sup> P. Le Pape,<sup>o</sup> D. Maubon,<sup>i</sup> S. Ranque,<sup>p</sup> M. Sautour,<sup>h</sup> B. Sendid,<sup>q</sup> J. Chandener<sup>q,r</sup>

EUCAST  
vs.  
Etest

>96%

TABLE 2 *In vitro* susceptibilities of the 933 *Candida* isolates to micafungin as determined by the Etest method and EUCAST broth microdilution method<sup>a</sup>

Species (no. of isolates)	Etest MIC (µg/ml)				EUCAST MIC (µg/ml)				% essential agreement
	Range	MIC <sub>50</sub>	MIC <sub>90</sub>	GM	Range	MIC <sub>50</sub>	MIC <sub>90</sub>	GM	
<i>C. albicans</i> (159)	≤0.015–0.06	0.015	0.015	0.016	≤0.015–0.06	0.015	0.015	0.016	100
<i>C. glabrata</i> (152)	≤0.015–0.125	0.015	0.015	0.016	≤0.015–1	0.015	0.015	0.018	98.7
<i>C. parapsilosis</i> (152)	0.06–4	0.5	2	0.63	≤0.125–4	1	2	1.15	96.7
<i>C. tropicalis</i> (152)	≤0.015–0.5	0.015	0.03	0.019	≤0.015–1	0.015	0.03	0.021	99.3
<i>C. kefyr</i> (136)	≤0.015–0.25	0.03	0.125	0.036	≤0.015–0.125	0.03	0.06	0.044	97.8
<i>C. krusei</i> (127)	≤0.015–0.25	0.125	0.125	0.084	≤0.015–0.25	0.125	0.125	0.089	98.4
Other <i>Candida</i> spp. <sup>b</sup> (55)	≤0.015–1	0.03	0.25	0.057	≤0.015–1	0.06	0.5	0.068	98.2
Total (933)	≤0.015–4	0.03	0.5	0.046	≤0.015–4	0.03	1	0.054	98.5

TABLE 3 Categorical agreement between the EUCAST and Etest methods for *in vitro* testing of susceptibility of the major pathogenic *Candida* species to micafungin<sup>a</sup>

Species (total no. of isolates)	Categorical agreement		Minor error		Major error		Very major error	
	No. of isolates	% of isolates	No. of isolates	% of isolates	No. of isolates	% of isolates	No. of isolates	% of isolates
<i>C. albicans</i> (159)	154	96.9			3	1.9	2	1.2
<i>C. glabrata</i> (152)	147	96.7			1	0.7	4	2.6
<i>C. parapsilosis</i> (152)	151	99.3	1	0.7	0	0	0	0
<i>C. tropicalis</i> (152)	150	98.7			2	1.3	0	0
<i>C. krusei</i> (127)	127	100			0	0	0	0
All isolates (742)	729	98.2	1	0.1	6	0.8	6	0.8

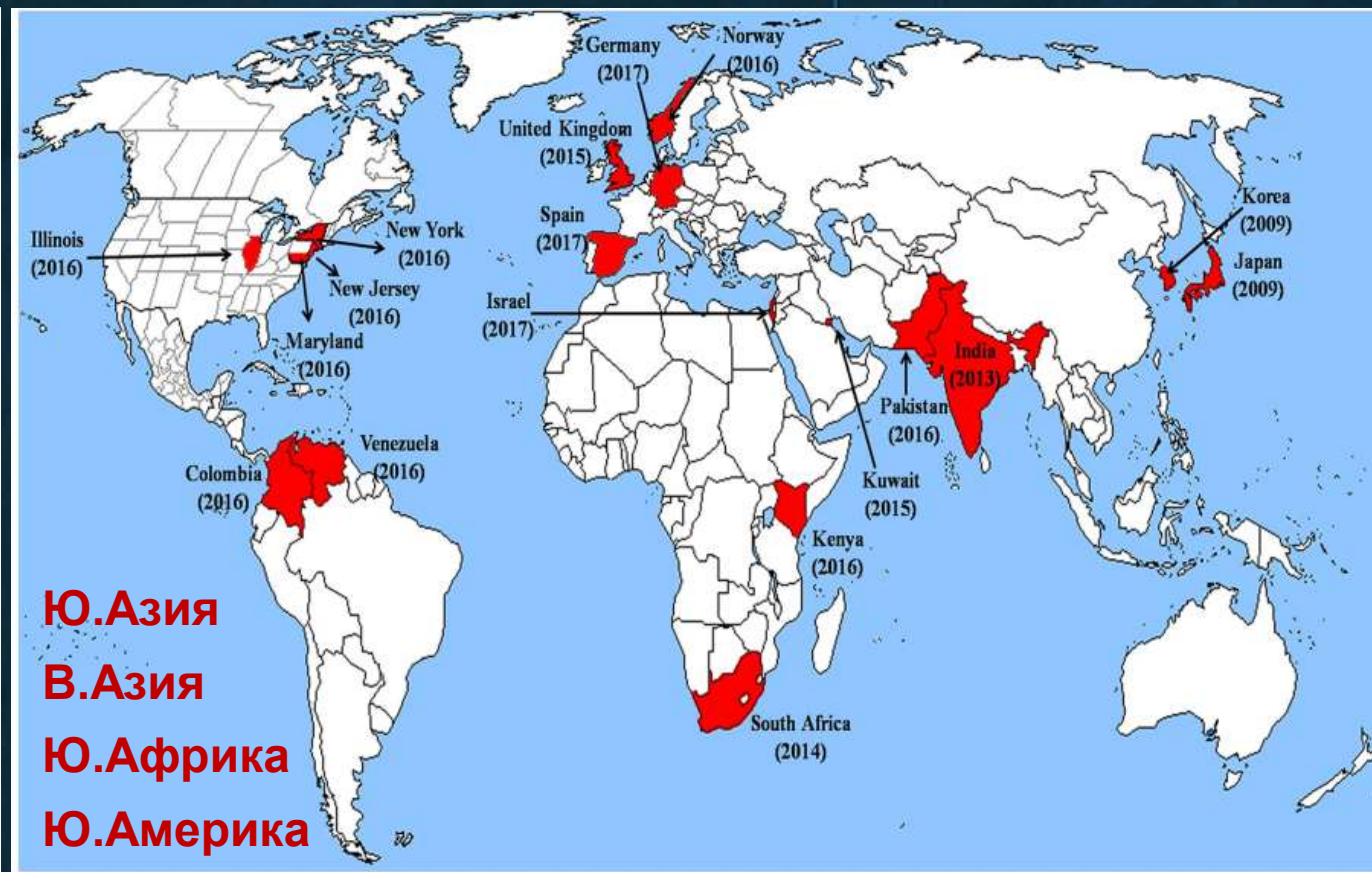
# ***Candida* spp.: МЕТОДИКИ НА ОСНОВЕ ПЦР**

---

- Азолы – маловероятно (разные механизмы, их сочетание)
- Потенциально – резистентность *C. glabrata* к ЭК (мутации *Fks1/2*)
- **Pham, 2014:** быстрая (5 ч) идентификация SNP на основе Luminex xMAP с использованием полистироловых микросфер
- **Dudiuk, 2014:** детекция 10 наиболее частых мутаций в течение 4 часов с помощью классической ПЦР
- **Zhao, 2016:** быстрое (3 ч) генотипирование генов *Fks* с помощью асимметричной ПЦР с использованием аллель-специфических молекулярных маяков и анализом кривых плавления

# ЭПИДЕМИОЛОГИЯ ИНФЕКЦИЙ *Candida auris*

Год	Страна	Изоляты
2009	Япония	1
2009	Корея	15
2011	Ю.Корея	6
2013/17	Индия	12/15/4/102/51
2015	Кувейт	1
2016	В-Британия	12/50
2014	Кения	21
2014	Ю.Африка	4
2016	США	6
2016	Венесуэла	18
2017	Израиль	6
2017	Испания	8
2017	США	10
2017	Колумбия	17



- Относится к *C. haemulonii* complex (Metchnikowiaceae)
- Впервые выделена из наружного слухового прохода у пациентки 70 лет в Японии в 2009 году
- SENTRY 2004-15 гг. – 4 штамма из >15.000, ранее – ?

# ЭПИДЕМИОЛОГИЯ ИНФЕКЦИЙ *Candida auris*

По состоянию на 16 февраля 2018 года во всем мире зарегистрировано **243** случая инфекции *C. auris*

28th **ESCMID** EUROPEAN CONGRESS OF  
CLINICAL MICROBIOLOGY  
AND INFECTIOUS DISEASES



**Natalya Vasilyeva**

Alexander Kruglov

Ivan Mikhailovich Pchelin

Igor Riabinin

Ekaterina Raush

Galina Chilina

Tat'yana Bogomolova

Ilya Bosak

Olga Shurpitskaya

Nikolai Klimko

Olesya Generalova

Nikolay Kruglyakov

Anastasiya Taraskina

The first Russian case of candidaemia due to  
*Candida auris*

Session: *Candida auris* in focus



View Paper poster #P0311



# ЭПИДЕМИОЛОГИЯ ИНФЕКЦИЙ *Candida auris*

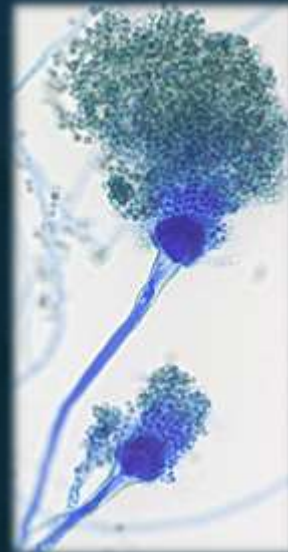
- Первые 3 случая нозокомиальной кандидемии в 2011 году в Ю. Корее
- Летальность 30-60%
- Частые ошибки при идентификации рутинными методами

Identification Method	Organism <i>C. auris</i> can be misidentified as
Vitek 2 YST	<i>Candida haemulonii</i> <i>Candida duobushaemulonii</i>
API 20C	<i>Rhodotorula glutinis</i> (characteristic red color not present) <i>Candida sake</i>
BD Phoenix yeast identification system	<i>Candida haemulonii</i> <i>Candida catenulata</i>
Microscan	<i>Candida famata</i> <i>Candida guilliermondii</i> <i>Candida lusitanae</i> <i>Candida parapsilosis</i>

- Штаммы от 54 пациентов Пакистана, Индии, Ю. Африки и Венесуэлы: 93% Р к ФЛУ, 35% к АмВ, 7% к ЭК; 41% Р к двум, 4% – к 3 классам АМ
- Механизмы резистентности: азолы – до конца не ясен (*Erg3*, *Erg11?*), ЭК – S639F в *Fks1* (hs 1)
- Е-тесты сопровождаются наиболее согласованными результатами  
**Завышенные МПК АмВ и КСП при исследовании Vitek 2**

# *A. fumigatus* – ХАРАКТЕРИСТИКА ВОЗБУДИТЕЛЯ

- Один из наиболее часто встречающихся эукариотов на Земле
- Сапрофит в окружающей среде (разлагающиеся биомассы)
- Его конидии находятся в огромном числе в почве и воздухе
- Панмиктический вид с несистематизированными межвидовыми скрещиваниями – генетические вариации
- Уникальные аллели TR<sub>34</sub>/L98H имеют селективное преимущество перед аллелями «дикого» типа
- И они обладают неограниченным потенциалом для распространения



# ЭПИДЕМИОЛОГИЯ РЕЗИСТЕНТНОСТИ *A. fumigatus*

- Первый азол-Р штамм *A. fumigatus* – конец 1980х гг., Калифорния (ретроспективно, 2 пациента, получавшие итраконазол)
- 1997 г., Нидерланды – 3 итра-Р штамма *Af*
- 1999 г., Франция – 4 итра-Р штамма *Af*
- 2007 г. – Р *Af* у пациента, не получавшего до этого терапию азолами



2007

Neimegen 20%  
Manchester 7%

2009

5,8% по всему  
миру (ARTEMIS)

2014

Fuhren J., JAC 2015  
20% как минимум к 1 азолу  
16% Р к ВОРИ

# ЭПИДЕМИОЛОГИЯ РЕЗИСТЕНТНОСТИ *A. fumigatus*

Prospective Multicenter  
International Surveillance of  
Azole Resistance in *Aspergillus fumigatus*

Van der Linden J., EID 2015

Проспективное многоцентровое исследование  
3788 клинических штаммов *Af* (22 центра / 19 стран)  
Средняя частота азол-Р  $Af_{TR34}$  – 3,2% (0,6-4,2%)

Нидерланды 0,8-9,4%

Бельгия 5,5%

ВБритания 6,6-27,8%

Германия 3,2%

Испания 0,3-4,2%

Дания 4-6%

Греция 2,7%

Польша 4,1%

Турция 10,2%

Китай 5,8%

Индия 1,7%

Иран 3,2%

Япония 6,1%

Таиланд 3,2%

Австралия 2,6%

США 0,6-11,8%

# ЭПИДЕМИОЛОГИЯ РЕЗИСТЕНТНОСТИ *A. fumigatus*



- Наиболее часто при НЕинвазивных формах ХЛА, АБЛА, аспрегиллома
- Длительные курсы терапии + Азолы – единственный вариант для пероральной терапии
- Азол-Р и азол-Ч колонии в культуре
- Применение азолов в с/х
- Пенконазол, дифеноконазол, тетраконазол, тебуконазол, ...
- ≈70% без терапии в анамнезе
- Географическая принадлежность

Точечные мутации в *Сур51А*

Тандемные повторы в промотере *Сур51А*

# МЕХАНИЗМЫ РЕЗИСТЕНТНОСТИ *A. fumigatus*

## ОСНОВНОЙ (внешняя среда):

Тандемные повторы в промотере *Cyp51A*

TR<sub>34</sub>/Leu98His; TR<sub>46</sub>/Tyr121Phe/Thr289Ala; TR<sub>53</sub>

→ гиперэкспрессия *Cyp51A*

## ДРУГИЕ (разные условия):

Точечные мутации в *Cyp51A*:

Gly54, Gly138, Met220, Gly448

→ изменения локуса связывания азолов

Эффлюксные помпы (АТРВС / MFS)

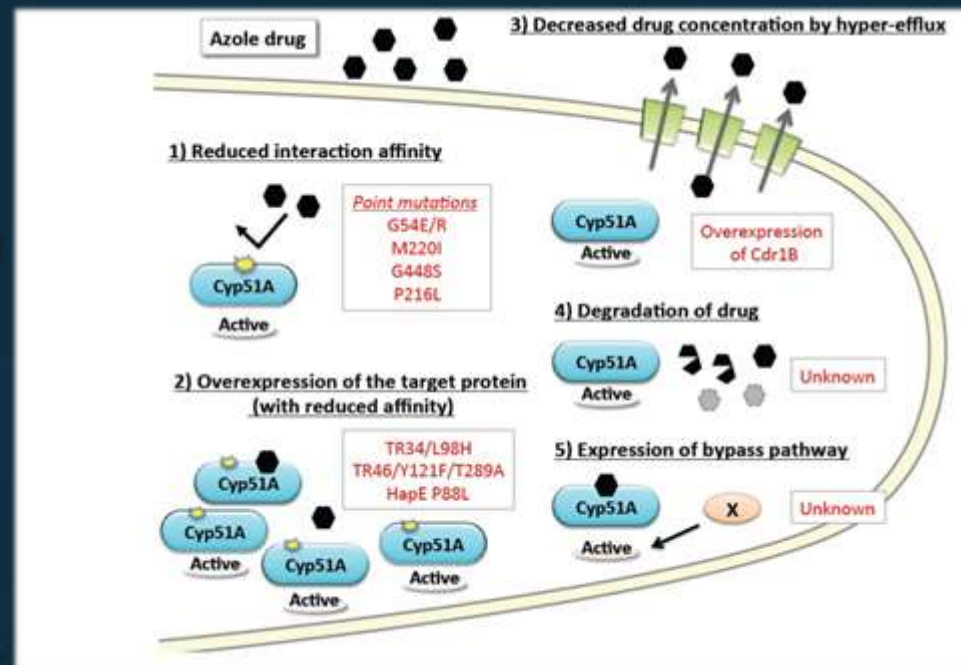
Ген *HapE* (P88L) – СССААТ-binding TrscrpFctr

Импорт холестерина (гиперэкспрессия *SrbA*)

Гиперэкспрессия *Cyp51B* (редко)

Биопленки

# Cyp51A



# МЕХАНИЗМЫ РЕЗИСТЕНТНОСТИ *A. fumigatus*

---

Тандемные повторы в промотере *Cyp51A*

TR<sub>34</sub>/Leu98His; TR<sub>46</sub>/Tyr121Phe/Thr289Ala; TR<sub>53</sub>

TR<sub>34</sub>/L98 – ИТРА-Р, ВОРИ и ПОЗА – варибельно, возможна пан-Р

TR<sub>46</sub>/T121F/T289A – ↑↑ВОРИ-Р

TR<sub>53</sub> – ИТРА-Р, ВОРИ-Р, ↑МПК ПОЗА, возможна пан-Р

Точечные мутации в *Cyp51A*: Gly54, Gly138, Met220, Gly448

Gly54, Gly138 – перекрестная резистентность ИТРА / ПОЗА

Gly448 – ВОРИ-Р, снижение чувствительности и ИТРА и ПОЗА

Met220 – варибельные профили чувствительности

Gly54E/R/V, Met220I/V/T/K – наиболее часто на фоне терапии азолами >4 мес

# ЭПИДЕМИОЛОГИЯ РЕЗИСТЕНТНОСТИ *A. fumigatus*



Страны, где выделены азол-Р штаммы *Af* из окружающей среды с  $TR_{34}/L98H$  и  $TR_{46}/T121P/T289A$

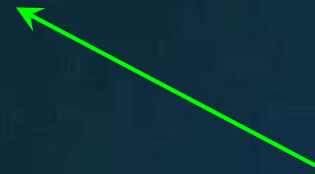




# ЭПИДЕМИОЛОГИЯ РЕЗИСТЕНТНОСТИ *A. fumigatus*



**5 из 6** исследованных партий  
были контаминированы азол-Р *Af*  
(TR<sub>46</sub>/Y121F/T289A и TR<sub>34</sub>/L98H)



2014 год: экспорт **2,48 млн**  
луковиц тюльпанов

# КОГДА НЕОБХОДИМО ОПРЕДЕЛЯТЬ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ *Aspergillus* К АЗОЛАМ?

---

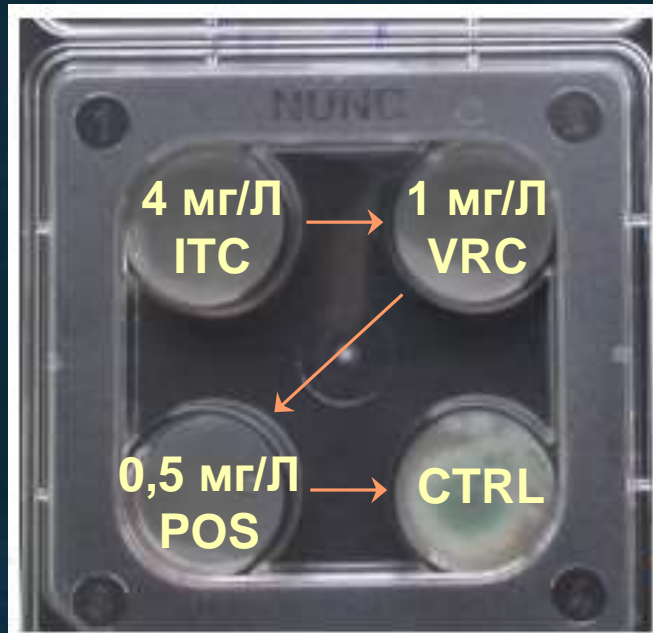
- Определение чувствительности мицелиальных грибов
  - (пока) редко необходимо
  - трудно для выполнения
  - сопровождается высокими межлабораторными расхождениями
- Плохая высеваемость + сочетание азол-Ч / азол-Р колоний
- Получение результата только через 5-7 дней
- Нет рекомендаций по рутинному применению IDSA / ESCMID
- Когда может потребоваться?
  - отсутствие ответа на терапию азолами / прорывная инфекция
  - пациент с длительной терапией азолами + рецидив выделения *Asp*

# ЧЕМ ВОЗМОЖНО ОПРЕДЕЛИТЬ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ *Aspergillus* К АЗОЛАМ?

- **Методы разведений:**  
CLSI (M38-A3) / EUCAST (E.DEF 9.3.1., 012017)
- **Методики на основе диффузии препарата в агар:**  
Диско-диффузионный метод (CLSI M51)  
Е-тесты
- **Скрининг-системы:**  
4-луночная плашка с ИТР, ВОР, ПОЗ (VIPcheck™, Nunc® IVF multidish)  
*пока доступны только для исследовательских целей*



# СКРИНИНГ РЕЗИСТЕНТНОСТИ *Aspergillus spp.*



4-луночные плашки  
с RPMI 1640 + 2% глюкоза

ИТРА 4 мг/Л  
ВОРИ 1 мг/Л  
ПОЗА 0,5 мг/Л  
КОНТРОЛЬ

- Инокулюм 0,5 McFarland в стерильной воде
- 25 мкл в каждую лунку (верхний левый → ... → нижний правый)
- Инкубация при  $35 \pm 2^\circ\text{C}$  в течение 2 дней (до 3 при спорном росте)
- Оценка в баллах:  
**0** – нет роста, **1** – слабый рост, **2** – есть рост, но меньше, чем в контроле, **3** – неингибируемый рост, совпадающий с контролем

# *Aspergillus* spp.: МЕТОДИКИ НА ОСНОВЕ ПЦР

- Важная роль – положительные культуры только в 25-50%
- TR<sub>34</sub>/L98H – 80% клинических изолятов азол-Р *Af*
- Коммерческие тест-системы:  
**AsperGenius<sup>®</sup>** (PathoNostics) – видовая идентификация + детекция TR<sub>34</sub>/L98H и TR<sub>46</sub>/Y121F/T289A (жидкость БАЛ)  
→ гематология Ч 88,9% С 89,3%; ОРИТ: Ч 80% С 93,3%  
→ низкая Ч при анализе сыворотки
- Проблемы чувствительности методики – в каждой клетке *Aspergillus* присутствует единственная копия гена *Сур51А*
- Описано около 15 мутаций *Сур51А* – пока только 2 доступны для определения с помощью ПЦР

# CLSI M60: Performance Standards for Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts, 1<sup>st</sup> Edition

Пограничные значения МПК для метода разведений при тестировании *Candida* spp. после 24 часов инкубации

Antifungal Agent	Species	MIC Breakpoints and Interpretive Categories, µg/mL			
		S	I <sup>†</sup>	SDD <sup>†</sup>	R
Anidulafungin <sup>1,2</sup>	<i>C. albicans</i>	≤0.25	0.5	–	≥1
	<i>C. glabrata</i>	≤0.12	0.25	–	≥0.5
	<i>C. guilliermondii</i>	≤2	4	–	≥8
	<i>C. krusei</i>	≤0.25	0.5	–	≥1
	<i>C. parapsilosis</i>	≤2	4	–	≥8
	<i>C. tropicalis</i>	≤0.25	0.5	–	≥1
Caspofungin <sup>1,2,8</sup>	<i>C. albicans</i>	≤0.25	0.5	–	≥1
	<i>C. glabrata</i>	≤0.12	0.25	–	≥0.5
	<i>C. guilliermondii</i>	≤2	4	–	≥8
	<i>C. krusei</i>	≤0.25	0.5	–	≥1
	<i>C. parapsilosis</i>	≤2	4	–	≥8
	<i>C. tropicalis</i>	≤0.25	0.5	–	≥1
Micafungin <sup>1,2</sup>	<i>C. albicans</i>	≤0.25	0.5	–	≥1
	<i>C. glabrata</i>	≤0.06	0.12	–	≥0.25
	<i>C. guilliermondii</i>	≤2	4	–	≥8
	<i>C. krusei</i>	≤0.25	0.5	–	≥1
	<i>C. parapsilosis</i>	≤2	4	–	≥8
	<i>C. tropicalis</i>	≤0.25	0.5	–	≥1
Voriconazole <sup>2,4,5</sup>	<i>C. albicans</i>	≤0.12	<b>0.25–0.5</b>	–	≥1
	<i>C. glabrata</i> <sup>8</sup>	–	–	–	–
	<i>C. krusei</i>	≤0.5	<b>1</b>	–	≥2
	<i>C. parapsilosis</i>	≤0.12	<b>0.25–0.5</b>	–	≥1
	<i>C. tropicalis</i>	≤0.12	<b>0.25–0.5</b>	–	≥1
Fluconazole <sup>3,†</sup>	<i>C. albicans</i>	≤2	–	4	≥8
	<i>C. glabrata</i> <sup>**</sup>	–	–	≤32	≥64
	<i>C. krusei</i> <sup>**</sup>	–	–	–	–
	<i>C. parapsilosis</i>	≤2	–	4	≥8
	<i>C. tropicalis</i>	≤2	–	4	≥8

# CLSI M60: Performance Standards for Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts, 1<sup>st</sup> Edition

Диаметры зон задержки роста и эквивалентные пограничные значения МПК при тестировании *Candida* spp. после 24 часов инкубации

Antifungal Agent	Species	Zone Diameter Breakpoints and Interpretive Categories, mm*				Equivalent MIC Breakpoints and Interpretive Categories, µg/mL			
		S	I	SDD	R	S	I	SDD	R
Caspofungin	<i>C. albicans</i>	≥17	15–16	–	≤14	≤0.25	0.5	–	≥1
	<i>C. glabrata</i>	–	–	–	–	≤0.12	0.25	–	≥0.5
	<i>C. guilliermondii</i>	≥13	11–12	–	≤10	≤2	4	–	≥8
	<i>C. krusei</i>	≥17	15–16	–	≤14	≤0.25	0.5	–	>1
	<i>C. parapsilosis</i>	≥13	11–12	–	≤10	≤2	4	–	≥8
	<i>C. tropicalis</i>	≥17	15–16	–	≤14	≤0.25	0.5	–	>1
Micafungin	<i>C. albicans</i>	≥22	20–21	–	≤19	≤0.25	0.5	–	≥1
	<i>C. glabrata</i> <sup>†</sup>	≥30	28–29	–	≤27	≤0.06	0.12	–	≥0.25
	<i>C. guilliermondii</i>	≥16	14–15	–	≤13	≤2	4	–	≥8
	<i>C. krusei</i>	≥22	20–21	–	≤19	≤0.25	0.5	–	≥1
	<i>C. parapsilosis</i>	≥16	14–15	–	≤13	≤2	4	–	≥8
	<i>C. tropicalis</i>	≥22	20–21	–	≤19	≤0.25	0.5	–	≥1
Voriconazole <sup>‡</sup>	<i>C. albicans</i>	≥17	15–16	–	≤14	≤0.12	0.25–0.5	–	≥1
	<i>C. glabrata</i> <sup>§</sup>	–	–	–	–	–	–	–	–
	<i>C. krusei</i>	≥15	13–14	–	≤12	≤0.5	1	–	≥2
	<i>C. parapsilosis</i>	≥17	15–16	–	≤14	≤0.12	0.25–0.5	–	≥1
	<i>C. tropicalis</i>	≥17	15–16	–	≤14	≤0.12	0.25–0.5	–	≥1
Fluconazole	<i>C. albicans</i>	≥17	–	14–16	≤13	≤2	–	4	≥8
	<i>C. glabrata</i>	–	–	≥15	≤14	–	–	≤32	≥64
	<i>C. krusei</i> <sup>¶</sup>	–	–	–	–	–	–	–	–
	<i>C. parapsilosis</i>	≥17	–	14–16	≤13	≤2	–	4	≥8
	<i>C. tropicalis</i>	≥17	–	14–16	≤13	≤2	–	4	≥8

# Candida: КРИТЕРИИ ИНТЕРПРЕТАЦИИ EUCAST

## EUCAST Antifungal Clinical Breakpoint Table v. 9.0 valid from 2018-02-12

Antifungal agent	MIC breakpoint (mg/L)															
	<i>C. albicans</i>		<i>C. dubliniensis</i>		<i>C. glabrata</i>		<i>C. krusei</i>		<i>C. parapsilosis</i>		<i>C. tropicalis</i>		<i>C. guilliermondii</i>		Non-species related breakpoints <sup>1</sup>	
	S ≤	R >	S ≤	R >	S ≤	R >	S ≤	R >	S ≤	R >	S ≤	R >	S ≤	R >	S ≤	R >
Amphotericin B	1	1	IE	IE	1	1	1	1	1	1	1	1	IE	IE	IE	IE
Anidulafungin	0.032	0.032	IE	IE	0.064	0.064	0.064	0.064	0.002	4	0.064	0.064	IE <sup>2</sup>	IE <sup>2</sup>	IE	IE
Caspofungin	Note <sup>3</sup>	Note <sup>3</sup>	IE	IE	Note <sup>3</sup>	Note <sup>3</sup>	Note <sup>3</sup>	Note <sup>3</sup>	Note <sup>3</sup>	Note <sup>3</sup>	Note <sup>3</sup>	Note <sup>3</sup>	IE <sup>2</sup>	IE <sup>2</sup>	IE	IE
Fluconazole	2	4	IE	IE	0.002	32	-	-	2	4	2	4	IE <sup>2</sup>	IE <sup>2</sup>	2	4
Isavuconazole	IE	IE	IE	IE	IE	IE	IE	IE	IE	IE	IE	IE	IE	IE	IE	IE
Itraconazole	0.064	0.064	0.064	0.064	IE <sup>2</sup>	IE <sup>2</sup>	IE <sup>2</sup>	IE <sup>2</sup>	0.125	0.125	0.125	0.125	IE <sup>2</sup>	IE <sup>2</sup>	IE	IE
Micafungin	0.016	0.016	IE	IE	0.032	0.032	IE <sup>4</sup>	IE <sup>4</sup>	0.002	2	IE <sup>4</sup>	IE <sup>4</sup>	IE <sup>4</sup>	IE <sup>4</sup>	IE	IE
Posaconazole	0.064	0.064	0.064	0.064	IE <sup>2</sup>	IE <sup>2</sup>	IE <sup>2</sup>	IE <sup>2</sup>	0.064	0.064	0.064	0.064	IE <sup>2</sup>	IE <sup>2</sup>	IE	IE
Voriconazole <sup>6</sup>	0.064 <sup>5</sup>	0.25 <sup>5</sup>	0.064	0.25	IE	IE	IE	IE	0.125 <sup>5</sup>	0.25 <sup>5</sup>	0.125 <sup>5</sup>	0.25 <sup>5</sup>	IE <sup>2</sup>	IE <sup>2</sup>	IE	IE



# ПРЕДВАРИТЕЛЬНЫЕ КРИТЕРИИ ДЛЯ *Candida auris*



Class/Drug	Tentative MIC Breakpoints (µg/mL)	Comment
<b>Triazoles</b>		
Fluconazole	≥32	Modal minimum inhibitory concentration (MIC) to fluconazole among isolates tested at CDC was ≥256; isolates with MICs ≥32 were shown to have a resistance mutation in the <i>Erg11</i> gene, making them unlikely to respond to fluconazole.
Voriconazole and other second generation triazoles	N/A	Consider using fluconazole susceptibility as a surrogate for second generation triazole susceptibility assessment. However, isolates that are resistant to fluconazole may respond to other triazoles occasionally. The decision to treat with another triazole will need to be made on case-by-case basis.
<b>Polyenes</b>		
Amphotericin B	≥2	Recent pharmacokinetic/pharmacodynamic analysis of <i>C. auris</i> in a mouse model of infection indicates that under standard dosing, the breakpoint for amphotericin B should be 1 or 1.5, similar to what has been determined for other <i>Candida</i> species. Therefore, <b>isolates with an MIC of ≥2</b> should now be considered resistant. If using Etest for amphotericin B and an MIC of 1.5 is determined, that value should be rounded up to 2.
<b>Echinocandins</b>		
Anidulafungin	≥ 4	Tentative breakpoints are based on the modal distribution of echinocandin MICs of approximately 100 isolates from diverse geographic locations.
Caspofungin	≥ 2	
Micafungin	≥ 4	

# Aspergillus: КРИТЕРИИ ИНТЕРПРЕТАЦИИ

## EUCAST Antifungal Clinical Breakpoint Table v. 9.0 valid from 2018-02-12

Antifungal agent	MIC breakpoint (mg/L)											
	<i>A. flavus</i>		<i>A. fumigatus</i>		<i>A. nidulans</i>		<i>A. niger</i>		<i>A. terreus</i>		Non-species related breakpoints <sup>1</sup>	
	S ≤	R >	S ≤	R >	S ≤	R >	S ≤	R >	S ≤	R >	S ≤	R >
Amphotericin B	IE <sup>2</sup>	IE <sup>2</sup>	1	2	Note <sup>3</sup>	Note <sup>3</sup>	1	2	-	-	IE	IE
Anidulafungin	IE	IE	IE	IE	IE	IE	IE	IE	IE	IE	IE	IE
Caspofungin	IE	IE	IE	IE	IE	IE	IE	IE	IE	IE	IE	IE
Fluconazole	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Isavuconazole	IE <sup>2</sup>	IE <sup>2</sup>	1	1	0.25	0.25	IE <sup>2</sup>	IE <sup>2</sup>	1	1	IE	IE
Itraconazole <sup>4</sup>	1	2	1	2	1	2	IE <sup>2,5</sup>	IE <sup>2,5</sup>	1	2	IE <sup>5</sup>	IE <sup>5</sup>
Micafungin	IE	IE	IE	IE	IE	IE	IE	IE	IE	IE	IE	IE
Posaconazole <sup>4</sup>	IE <sup>2</sup>	IE <sup>2</sup>	0.125 <sup>6</sup>	0.25 <sup>6</sup>	IE <sup>2</sup>	IE <sup>2</sup>	IE <sup>2</sup>	IE <sup>2</sup>	0.125 <sup>6</sup>	0.25 <sup>6</sup>	IE	IE
Voriconazole <sup>4</sup>	IE <sup>2</sup>	IE <sup>2</sup>	1	2	IE	IE	IE <sup>2</sup>	IE <sup>2</sup>	IE <sup>2</sup>	IE <sup>2</sup>	IE	IE

**Table 1.** Interpretation of *A. fumigatus* MIC values for reference broth microdilution methods.

Strain	Antifungal	CLSI <sup>2</sup>	EUCAST <sup>1</sup> Clinical Breakpoint	
			S ≤	R >
<i>A. fumigatus</i>		ECOFFs		
	Itraconazole	1	1	2
	Posaconazole	0.25 <sup>2,3</sup>	0.125	0.25
	Voriconazole	1	1	2
	Isavuconazole	1	1	1

- ECOFF: для интерпретации показателей МПК, когда недостаточно клинических данных для получения breakpoints
- Значения выше ECOFF говорят о вероятности приобретенной Р
- Нельзя спрогнозировать эффективность

M61

# ЧТО ДОЛЖНО БЫТЬ В АРСЕНАЛЕ...

КАЖД

 <b>НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ЦЕНТР ФАРМАКОТЕРАПИИ</b> 192236, Россия, Санкт-Петербург, ул. Белы Куна, д. 30, лит. А. Тел./факс (812) 327-5581, 320-7169 E-mail: nicf@nicf.spb.ru URL: www.nicf.spb.ru					
<b>1. ИНДИКАТОРНЫЕ ДИСКИ И ИХ НАБОРЫ</b>					
№ п/п	№ каталожный	Наименование	Цена, руб. (НДС в т.ч.)	Ед. измерения	Изготовитель
57	011155	Диски с триметопримом 1,25 мкг и сульфаметоксазолом 23,75 мкг № 100	110,00	фл.	НИЦФ
58	011156	Диски с флуконазолом <u>40 мкг</u> № 100	110,00	фл.	НИЦФ
59	011157	Диски с фосфомицином № 50	110,00	фл.	НИЦФ

## Лаборатории в клиниках с **ВЫСОКИМ ПОТРЕБЛЕНИЕМ АНТИМИКОТИКОВ** (онкология/гематология)

- Качественные диски с флуконазолом и вориконазолом
- Sensititre™ YeastOne™ (азолы + ЭК)
- *Высокая частота мицелиальных микозов – Е-тесты ИТР/ВОР (скрининг-тесты), референтная лаборатория?*
- Быть знакомыми с методами разведений

**СПАСИБО ЗА  
ВНИМАНИЕ!**

**Веселов Александр Валерьевич**

**(4812) 45 06 02**

**[Alex.Veselov@antibiotic.ru](mailto:Alex.Veselov@antibiotic.ru)**