

УДК 579.841.11:615.015.8(476)

Клональное распространение штаммов *Pseudomonas aeruginosa* – продуцентов метало-бета-лактамаз на территории Беларуси

В.А. Осипов¹, Д.В. Тапальский¹, Е.Ю. Склеенова², А.В. Романов², С.В. Жаворонок³¹ Гомельский государственный медицинский университет, Гомель, Республика Беларусь.² НИИ антимикробной химиотерапии Смоленской государственной медицинской академии, Смоленск, Россия.³ Белорусский государственный медицинский университет, Минск, Республика Беларусь.

Clonal spreading of *Pseudomonas aeruginosa* strains - metallo-beta-lactamases producers in territory of Belarus

¹ V.A. Osipov, ¹D.V. Tapalski, ²E.Yu.Sleenova, ²A.V. Romanov, ³S.V. Zhavoronok¹ Gomel State Medical University, Gomel, Republic of Belarus² Institute of Antimicrobial Chemotherapy, Smolensk State Medical Academy, Smolensk, Russian Federation³ Belarusian State Medical University, Minsk, Republic of Belarus

Аннотация

Исследовано 19 карбапенемрезистентных изолятов *Pseudomonas aeruginosa* из шести лечебных учреждений Гомеля, Минска и Могилева. Для обнаружения генов VIM и IMP типов использована мультиплексная ПЦР в режиме реального времени. Для оценки структуры интегров, несущих гены МБЛ, использован метод ПЦР-рестрикционного картирования.

Выполнено эпидемиологическое маркирование МБЛ-положительных изолятов *P.aeruginosa* с использованием мультилокусного анализа тандемных повторов (MLVA). Проведена оценка количества тандемных повторов в шести VNTR-локусах. Выполнен кластерный анализ полученных MLVA-профилей.

Для 19 карбапенемрезистентных изолятов в ПЦР выявлено наличие *bla*_{VIM}-генов. Установлена идентичность структуры интегров, несущих ген МБЛ, у всех изолятов. По результатам MLVA-типирования показана принадлежность 18 из 19 МБЛ-положительных штаммов к единому клональному комплексу, о чем свидетельствует соответствие количества тандемных повторов по 5-6 анализируемым VNTR-локусам. Показано клональное распространение МБЛ-продуцирующих штаммов *P.aeruginosa* на территории республики.

Ключевые слова

Pseudomonas aeruginosa, карбапенемы, антибиотикорезистентность, метало-бета-лактамазы, популяционная структура

Summary

19 carbapenem-resistant isolates *Pseudomonas aeruginosa* from six medical organizations from Gomel, Minsk and Mogilev was investigated. Multiplex real time PCR was used for detection of *bla*_{VIM} and *bla*_{IMP} MBL-genes. PCR-restriction mapping method was used for studying of structure of integrons carrying genes of MBL. Epidemiological marking for MBL-positives isolates of *P.aeruginosa* was carry out with using of multiple-locus variable number tandem repeat analysis (MLVA) in six VNTR-loci. The cluster analysis of the received MLVA-patterns was performed.

The presence of *bla*_{VIM}-genes in 19 carbapenem-resistant isolates was detected. Identity of structure of integrons carrying gene of MBL was established for all isolates.

The belonging of 18 from 19 MBL-positives strains to the common clonal complex was detected by results of a MLVA-typing. The clonal spreading of MBL-producing strains of *P.aeruginosa* in territory of republic was shown.

Keywords

Pseudomonas aeruginosa, carbapenems, antimicrobial resistance, metallo-beta-lactamases, structure of population

Pseudomonas aeruginosa является самым частым возбудителем нозокомиальной пневмонии и также относится к ведущим возбудителям инфекций мочевыводящих путей и хирургических инфекций. Инфекции, вызванные этим микроорганизмом, характеризуются тяжелым течением и ассоциируются с высокой летальностью [1]. В частности, при бактериемии, вызванной *P.aeruginosa*, атрибутивная летальность составляет от 18 до 39%. В связи с высокой летальностью при нозокомиальных псевдомонадных инфекциях критическое значение приобретает адекватный выбор стартового режима антибактериальной терапии. Задержка с назначением эффективного режима терапии псевдомонадных инфекций приводит к увеличению летальности [2, 3].

Спектр антибиотиков, активных в отношении *P.aeruginosa*, довольно широк и включает цефалоспорины III–IV поколения, обладающие антисинегнойной активностью (цефтазидим, цефоперазон, цефепим), уреидо- и карбоксипенициллины (пиперациллин, тикарциллин) и их «защищенные» формы, аминогликозиды (наиболее активен амикацин), фторхинолоны (ципрофлоксацин, офлоксацин) и карбапенемы (меропенем и имипенем/циластатин).

Проблемы выбора адекватного стартового режима антибактериальной терапии в наибольшей степени связаны с тем, что нозокомиальные штаммы *P.aeruginosa* обычно характеризуются устойчивостью ко многим потенциально эффективным антибиотикам, в частности антипсевдомонадным пенициллинам и цефалоспорином, в т.ч. ингибиторозащищенным, карбапенемам, аминогликозидам, фторхинолонам [4].

Последние годы характеризовались увеличением устойчивости *P.aeruginosa* практически ко всем антибактериальным препаратам. Массивное и не всегда рациональное использование данных антибиотиков в клиниках, а также использование отдельных антибиотиков в течение длительного времени способствуют возникновению приобретенной резистентности *P.aeruginosa*, что существенно ограничивает спектр препаратов, применение которых возможно в конкретном стационаре у конкретного больного.

Большинство штаммов *P.aeruginosa*, выделяемых у больных, находящихся в отделениях реанимации и интенсивной терапии (ОРИТ), являются полирезистентными, т.е. проявляющими устойчивость к трем и более потенциально эффективным антибиотикам. Панрезистентные штаммы синегнойной палочки в настоящее время уже не являются экзотическими находками, причем

описаны вспышки нозокомиальных инфекций в ОРИТ, вызванных такими штаммами [5, 6].

Множественная устойчивость *P.aeruginosa* к антибиотикам объясняется тем, что микроорганизм способен формировать резистентность с помощью разных механизмов, часто сочетающихся. В дополнение к природной резистентности к большинству пенициллинов и цефалоспоринов, эти микроорганизмы способны быстро приобретать резистентность к антибактериальным препаратам различных классов. В частности, продукция инактивирующих ферментов может обеспечивать устойчивость к аминогликозидам и карбапенемам, а хромосомные мутации в гене *gugA* ДНК-гиразы – к резистентности к фторхинолонам. Устойчивость к β -лактамам антибиотикам может быть опосредована нарушением проницаемости микробной клетки для антибиотика в результате утраты поринового канала *OprD*, активацией эффлюксных систем (*MexAB-OprM*, *MexEF-OprN*, *MexXY-OprM*), продукцией β -лактамаз классов А, С и D плазмидной или хромосомной локализации. Хромосомные β -лактамазы класса С (*AmpC*) гидролизуют цефалоспорины III поколения и антисинегнойные пенициллины, в т.ч. ингибиторозащищенные, плазмидные β -лактамазы расширенного спектра гидролизуют цефалоспорины III и IV поколения и азтреонам.

Металло- β -лактамазы (МБЛ) способны инактивировать карбапенемы и все другие β -лактамы, за исключением монобактамов (азтреонама). Опасность ферментов данного класса обусловлена целым рядом причин, обуславливающим высокую эпидемиологическую значимость данного механизма антибиотикорезистентности:

- высокая каталитическая активность;
- широкий спектр субстратной специфичности, включающий практически все β -лактамы антибиотиков;
- сцепление генов МБЛ с другими детерминантами резистентности и как следствие множественная лекарственная устойчивость или панрезистентность штаммов-продуцентов МБЛ;
- локализация генов, кодирующих продукцию МБЛ, в составе высоко мобильных интегронов, способных быстро распространяться между микроорганизмами с помощью плазмид и транспозонов;
- формирование отдельных эпидемиологически значимых клонов полиантибиотикорезистентных МБЛ-продуцентов, способных быстро распространяться на обширных географических территориях и вызы-

вать серьезные инфекции, трудно поддающиеся терапии [7].

В настоящее время существует по меньшей мере девять различных типов приобретенных метало- β -лактамаз: IMP, VIM, SPM, GIM, SIM, AIM, KHM, NDM, TMB [8, 9]. Важнейшими по распространенности и клинической значимости являются МБЛ типов IMP, VIM, SPM и NDM.

Цель исследования – выявить продукцию метало- β -лактамаз среди клинических изолятов *P.aeruginosa* в различных регионах Беларуси и изучать популяционную структуру продуцентов метало-бета-лактамаз.

Материалы и методы

В исследование включено 19 карбапенемрезистентных изолятов, отобранных в ходе выполненного в Беларуси многоцентрового исследования [10, 11], у которых в фенотипическом тесте «метод двойных дисков с ЭДТА» была выявлена продукция МБЛ.

Определение чувствительности к 15 антибактериальным препаратам (ампициллин/ сульбактам, тикарциллин, тикарциллин/ клавуланат, пиперациллин, пиперациллин+тазобактам, цефепим, имипенем, меропенем, цефтазидим, амикацин, гентамицин, тобрамицин, ципрофлоксацин, колистин, котримоксазол) выполнено методом пограничных концентраций с использованием автоматического бактериологического анализатора АТВ Expression (bioMerieux, Франция) на планшетах АТВ PSE 5 согласно инструкции производителя, для контроля качества использовались рекомендованные штаммы *E.coli* ATCC 25922 и *E.coli* ATCC 35218.

Для выявления генов МБЛ bla_{VIM} и bla_{IMP} проведена мультиплексная полимеразная цепная реакция. Для амплификации использовали две пары праймеров: VIM-Fa 5'-GTTTGGTTCGCATATCGC-3'; VIM-Ra 5'-TCGTCATGAAAGTGCCT-3'; IMP1-F 5'-GCTAAAGATACTGAAAAATTAGT-3'; IMP1-R 5'-TCATTTGTTAATTCAGATGCATA-3'. Идентификация амплификационных фрагментов bla_{VIM} и bla_{IMP} генов проводилась путем определения температур их плавления (~80°C для bla_{IMP} и ~85°C для bla_{VIM}) в присутствии интеркалирующего флуоресцентного красителя SYBR Green I. Дополнительно сравнивались кривые плавления опытных образцов с кривыми плавления позитивных контрольных штаммов. В качестве контрольных культур использованы штаммы *P.aeruginosa* из коллекции НИИ антимикробной химиотерапии (г. Смоленск,

РФ): *P.aeruginosa* ATCC 27853 – отрицательный контроль, МБЛ(-); *P.aeruginosa* 565 – положительный контроль, VIM-2, МБЛ(+); *P.aeruginosa* 010 – положительный контроль, VIM-10, МБЛ(+); *P.aeruginosa* 1477 – положительный контроль, IMP-1, МБЛ(+).

Для оценки структуры интегронов, несущих гены МБЛ, использован метод ПЦР-рестрикционного картирования (O. Shevchenko и соавт., 2008 г.). Варибельные участки интегронов I класса амплифицированы с помощью праймеров к 5' (*intI1*) и 3' (*qacED1* или *tniC/Tn5090*) консервативным последовательностям интегронов в парах с внутренними праймерами к генам bla_{VIM} и подвергнуты рестрикции эндонуклеазой *TaqI*. Полученные рестрикционные профили ПЦР фрагментов сопоставлены с соответствующими профилями известных МБЛ-кодирующих интегронов, использованных в качестве контролей.

MLVA-типирование карбапенемрезистентных МБЛ-продуцирующих изолятов *P.aeruginosa* выполнено по схеме L. Onteniente и соавт. [12]. Проведена оценка количества tandemных повторов в шести VNTR-локусах (VNTR – Variable Number Tandem Repeat, tandemные повторы с переменным числом звеньев). Характеристика анализируемых VNTR-локусов представлена в табл. 1. Структура прямых и обратных праймеров для амплификации анализируемых VNTR-локусов представлена в табл. 2.

Амплификация шести VNTR-локусов выполнена в мультиплексной ПЦР в реальном времени (по 2 отдельные реакции для каждого изолята). Анализ размеров продуктов амплификации шести VNTR-локусов выполнен методом капиллярного электрофореза с флуоресцентной детекцией (фрагментный анализ) на автоматическом секвенаторе ABI-310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems).

Полученные во фрагментном анализе значения размеров каждого из шести VNTR-локусов обработаны в программе BioNumerics v.5.00 (Applied-Maths) как количественные значения. Проведен кластерный анализ MLVA-паттернов с использованием алгоритма UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic mean). Результаты представлены в виде дендрограмм минимальных расстояний (minimum spanning tree, MST). Дополнительно с использованием BioNumerics v.5.00 проведено сопоставление MLVA-паттернов МБЛ-позитивных штаммов *P.aeruginosa*, выделенных в Беларуси, с MLVA-паттернами 306 МБЛ-позитивных *P.aeruginosa*,

Таблица 1. Анализируемые VNTR-локусы *Pseudomonas aeruginosa* и их характеристика

Наименование локуса	Длина одного повтора в локусе, п.н.	Диапазон размеров ПЦР-продукта, п.н.	Количество аллелей	Индекс полиморфизма
ms010	6	143-233	16	0.91
ms061	6	85-139	10	0.87
ms077	39	349-520	7	0.61
ms127	15	210-225	2	0.45
ms142	115	200-775	7	0.68
ms172	54	573-843	8	0.75

Таблица 2. Последовательности праймеров для VNTR-локусов *Pseudomonas aeruginosa*

Праймер, метка	Последовательность (5'-3')
ms010-F(ROX)	GCAGGAACGCTTGCAGCAGGT
ms010-R	CTTCGCCGACCCAGGGATCA
ms061-F (FAM)	CTTGCCGTGCTACCGATCC
ms061-R	CCCCCATGCCAGTTGC
ms077-F (FAM)	GCGTCATGGTCTGCATGTC
ms077-R	TATACCCTCTTCGCCAGTC
ms127-F (FAM)	CTCGGAGTCTCTGCCAACTC
ms127-R	GGCAGGACAGGATCTCGAC
ms142-F (R6G)	AGCAGTGCCAGTTGATGTTG
ms142-R	GTGGGGCGAAGGAGTGAG
ms172-F (FAM)	GGATTCTCTCGCACGAGGT
ms172-R	TACGTGACCTGACGTTGGTG

выделенных в ходе многоцентрового исследования на территории Российской Федерации.

Результаты и обсуждение

У всех 19 МБЛ-позитивных клинических изолятов, включенных в исследование, и позитивных контролей *P.aeruginosa* 565 (VIM-2) и *P.aeruginosa* 010 (VIM-10) амплифицировался участок *bla*_{VIM}-гена с пиком плавления 85°C. У позитивного контроля *P.aeruginosa* 1477 (IMP-1) амплифицировался участок *bla*_{IMP}-гена с пиком плавления 79,8°C. Не обнаружено продуктов амплификации в отрицательном контроле *P.aeruginosa* ATCC 27853. Таким образом, подтверждена принадлежность всех МБЛ-продуцирующих клинических изолятов *P.aeruginosa* к генетической группе VIM.

Проанализирована ассоциированная резистентность МБЛ-продуцирующих штаммов. Все они имели общий фенотип резистентности (устойчивы к ампициллин/ сульбактаму, тикарцил-

лину, тикарциллин/ клавуланату, пиперациллину, пиперациллин-тазобактаму, цефепиму, имипенему, меропенему, цефтазидиму, амикацину, гентамицину, тобрамицину, цiproфлоксацину, котримоксазолу; чувствительны к колистину), что является одним из свидетельств их возможного единого клонального происхождения.

Методом ПЦР-рестрикционного картирования установлена идентичность структуры интегронов, несущих ген МБЛ, у данных изолятов и VIM-2-кодирующего интегрона с набором генетических кассет: *aacA7-bla*_{VIM-2}-*dhfrB5-aacC-A5* (GenBank Acc. No. DQ52233), ранее описанного у штаммов *P.aeruginosa* из США, России и Норвегии.

Результаты MLVA-типирования МБЛ-продуцирующих изолятов представлены в таблице 3. Показана принадлежность 18 из 19 МБЛ-позитивных штаммов к единому клональному комплексу, о чем свидетельствует полное соответствие количества тандемных повторов по 5-6 анализируемым VNTR-локусам.

Так, 10 из 14 МБЛ-положительных изолятов *P.aeruginosa*, выделенных в лечебных учреждениях г. Минска, имели общий MLVA-паттерн 109-225-392-826-180-191 (последовательно представлены размеры ампликонов для локусов ms061-ms127-ms077-ms172-ms142-ms010). Другие проанализированные штаммы, выделенные в г. Минске, а также в стационарах г. Гомеля отличались от представленного доминирующего MLVA-паттерна количеством tandemных повторов только в одном из шести анализируемых VNTR-локусов (в ms061 или ms010). Штамм №4922, выделенный в Могилевской областной больнице, имел отличия от преобладающего MLVA-паттерна одновременно по ms061 и ms010 (115-225-392-826-180-185). Отдельного внимания заслуживает штамм №2950 (Могилевская городская больница №1), имеющий значительные отличия от преобладающего MLVA-паттерна (паттерна 139-210-392-826-961-233, отличия по четырем VNTR-локусам: ms061, ms127, ms142 и ms010). Представленный изолят не являлся частью единого клонального комплекса, в который входили все другие выделенные на территории Беларуси МБЛ-продуцирующие штаммы *P.aeruginosa*.

Проведенное сопоставление MLVA-паттернов МБЛ-положительных изолятов *P.aeruginosa*, выделенных в Беларуси, с MLVA-паттернами 306 МБЛ-положительных *P.aeruginosa*, выделенных в ходе многоцентрового исследования на территории Российской Федерации, показало при-

надлежность 18 МБЛ-положительных белорусских изолятов *P.aeruginosa* к большому единому клональному комплексу (кластер ST235 по результатам мультилокусного секвенс-типирования), также широко представленному в Российской Федерации.

Заключение

В результате проведенного исследования решен ряд задач, позволяющих прогнозировать дальнейшее распространение устойчивости к карбапенемам среди штаммов *P.aeruginosa*, предупреждать и ограничивать циркуляцию МБЛ-продуцирующих изолятов в лечебных учреждениях республики, а также проводить эффективную антибактериальную терапию оппортунистических инфекций, вызванных МБЛ-продуцентами. Изучена ассоциированная устойчивость карбапенемрезистентных изолятов и показано, что все выявленные МБЛ-продуцирующие штаммы являются полиантибиотикорезистентными, сохраняющими устойчивость только к полимиксинам (полимиксину и колистину). Общий для всех МБЛ-продуцентов резистентотип является одним из подтверждений их единого клонального происхождения. Не обнаружено МБЛ-продуцирующих изолятов, устойчивых к колистину, что позволяет рекомендовать данный препарат для терапии инфекций, вызванных госпитальными панрезистентными штаммами *P.aeruginosa*.

У всех выявленных в ходе исследования МБЛ-положительных клинических изолятов *P.aeruginosa*

Таблица 3. MLVA-паттерны МБЛ-продуцирующих *P.aeruginosa*, выделенных в лечебных учреждениях Беларуси

Город Центр (число изолятов)	MLVA паттерн (ms061-ms127-ms077-ms172-ms142-ms010)	Тип интегрона / МБЛ
Минск		
Центр 1 (n=1)	109-225-392-826-180-191	DQ52233 / VIM-2
Центр 2 (n=7)	109-225-392-826-180-191	DQ52233 / VIM-2
Центр 2 (n=1)	115-225-392-826-180-191	DQ52233 / VIM-2
Центр 2 (n=2)	109-225-392-826-180-197	DQ52233 / VIM-2
Центр 2 (n=1)	109-225-392-826-180-203	DQ52233 / VIM-2
Центр 3 (n=2)	109-225-392-826-180-191	DQ52233 / VIM-2
Гомель		
Центр 1 (n=1)	109-225-392-826-180-185	DQ52233 / VIM-2
Центр 2 (n=1)	109-225-392-826-180-185	DQ52233 / VIM-2
Могилев		
Центр 1 (n=1)	115-225-392-826-180-185	DQ52233 / VIM-2
Центр 2 (n=1)	109-225-392-826-180-185	DQ52233 / VIM-2
Центр 2 (n=1)	139-210-392-826-961-233	DQ52233 / VIM-2

в мультиплексной ПЦР обнаружено присутствие bla_{VIM} -генов, что позволило отнести их к генетической группе VIM. При проведении эпидемиологического маркирования МБЛ-продуцентов показано, что большинство из них являются представителями единого клонального комплекса, также распространенного на территории Российской Федерации. Выявлена возможность горизонтального переноса bla_{VIM} -генов от представителей эпидемического клона локальным эндемичным штаммам *P.aeruginosa* в составе интегрона I класса. Данный факт требует дальнейшего изучения в связи с опасностью формирования локальных популяций карбапенемрезистентных *P.aeruginosa*, максимально адаптированных к условиям госпитальной среды.

В связи с появлением в отдельных лечебных учреждениях республики МБЛ-продуцирующих изолятов *P.aeruginosa* требуется создание системы микробиологического мониторинга,

направленного на выявление колонизированных пациентов и ограничение распространения МБЛ-продуцентов. Микробиологический мониторинг должен включать фенотипическое выявление МБЛ у штаммов, устойчивых к меропенему и имипенему, или имеющих сниженную чувствительность к этим препаратам. Фенотипические тесты (например, метод «двойных дисков» с ЭДТА) могут использоваться в рутинной практике локальных микробиологических лабораторий, занимающихся диагностикой оппортунистических инфекций. Штаммы с выявленной в фенотипическом тесте продукцией МБЛ, а также штаммы с сомнительными результатами фенотипического теста должны передаваться в референсную лабораторию для выполнения молекулярно-генетических исследований (выявление генов МБЛ и молекулярно-генетическое типирование для оценки клональной родственности).

Литература

- Rossolini G.M., Mantengoli E. Treatment and control of severe infections caused by multiresistant *Pseudomonas aeruginosa*. *Clinical Microbiology and Infection*. 2005; 11: Suppl 4: 17–31.
- Kang C.I., Kim S.H., Kim H.B., et al. *Pseudomonas aeruginosa* bacteremia: risk factors for mortality and influence of delayed receipt of effective antimicrobial therapy on clinical outcome. *Clinical Infectious Diseases*. 2003; 37: 745–51.
- Micek S.T., Lloyd A.E., Ritchie D.J., et al. *Pseudomonas aeruginosa* bloodstream infection: importance of appropriate initial antimicrobial treatment. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2005; 49: 1306–11.
- Яковлев С.В. Устойчивость *Pseudomonas aeruginosa* к карбапенемам: уроки исследования MYSTIC. *Фарматека*. 2007; 8: 67–70.
- Mesaros N., Nordmann P., Plesiat P., et al. *Pseudomonas aeruginosa*: resistance and therapeutic options at the turn of the new millennium. *Clinical Microbiology and Infection*. 2007; 13: 560–78.
- Wang C.Y., Jermg J.S., Cheng K.Y., et al. Pandrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* among hospitalised patients: clinical features, risk-factors and outcomes. *Clinical Microbiology and Infection*. 2006; 12: 63–8.
- Шевченко О.В., Эйдельштейн М.В., Степанова М.Н. Металло-I-лактамазы: значение и методы выявления у грамотрицательных неферментирующих бактерий. *Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия*. 2007; 9(3): 211–18.
- Queenan A.M., Bush K. Carbapenemases: the versatile beta-lactamases. *Clinical Microbiology Reviews*. 2007; 20: 440–58.
- Walsh T.R., Toleman M.A., Poirel L., Nordmann P. Metallo-beta-lactamases: the quiet before the storm? *Clinical Microbiology Reviews*. 2005; 18: 306–25.
- Тапальский Д.В., Осипов В.А., Копычко А.Н. и др. Продукция метало-бета-лактамаз клиническими изолятами *P.aeruginosa* в Беларуси. *Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия*. 2009; 11(1): 35.
- Тапальский Д.В., Осипов В.А., Скленова Е.Ю. и др. Значение металло-I-лактамаз в формировании и распространении устойчивости *Pseudomonas aeruginosa* к карбапенемам. *Достижения медицинской науки Беларуси: реценз. науч.-практ. ежегодник*. Минск: ГУ РНМБ; 2010: 146–7.
- Onteniente L., Brisse S., Tassios P.T., Vergnaud G. Evaluation of the polymorphisms associated with tandem repeats for *Pseudomonas aeruginosa* strain typing. *Journal of Clinical Microbiology*. 2003; 41: 4991–7.

Сведения об авторах:

Тапальский Дмитрий Викторович - заведующий кафедрой микробиологии, вирусологии и иммунологии Гомельского государственного медицинского университета, к.м.н., доцент. Гомельский государственный медицинский университет, ул. Ланге, 5, г. Гомель, 246000, Беларусь, тел. +375 232 703260

Поступила 5.11.2012 г.