

ВНЕБОЛЬНИЧНАЯ ПНЕВМОНИЯ У ВИЧ-ИНФИЦИРОВАННЫХ: МИКРОФЛОРА, АНТИБИОТИКОРЕЗИСТЕНТНОСТЬ, РОЛЬ В РАЗВИТИИ В ЗАВИСИМОСТИ ОТ УРОВНЯ CD4-ЛИМФОЦИТОВ

Акушева Д.Н.^{1,2}, Хохлова О.Е.^{1,2}, Камшилова В.В.³, Мотова А.И.³,
Перьянова О.В.^{1,2}, Упирова А.А.³, Поткина Н.К.^{1,2}, Ямамото Татсуо⁴

¹ ФГБОУ ВО «Красноярский государственный медицинский университет имени профессора В.Ф. Войно-Ясенецкого» Министерства здравоохранения РФ, г. Красноярск, Россия

² Российско-Японский центр микробиологии, метагеномики и инфекционных заболеваний, г. Красноярск, Россия

³ КГБУЗ «Красноярская межрайонная клиническая больница скорой медицинской помощи имени Н.С. Карповича», г. Красноярск, Россия

⁴ Международный медицинский образовательно-исследовательский центр (IMERC), Ниигата, Япония

Резюме. Гнойно-воспалительные заболевания различной нозологии и этиологии у ВИЧ-инфицированных являются одной из главных причин их гибели. Целью данной работы явилось определение спектра возбудителей внебольничной пневмонии и профиля их резистентности, зависимости от уровня CD4-лимфоцитов, а также выявление роли метициллинрезистентных *Staphylococcus aureus* и их молекулярно-генетических особенностей у ВИЧ-инфицированных пациентов г. Красноярск. В период 2012-2016 гг. было обследовано 152 ВИЧ-инфицированных пациента пульмонологического отделения с клиническим диагнозом «внебольничная пневмония». От больных забирались мокрота, бронхоальвеолярный лаваж, плевральная жидкость, промывные воды, гной из плевры, а также мазок из носа и зева на выявление микрофлоры, кровь на стерильность. Использован бактериологический метод. Антибиотикочувствительность определяли диско-диффузионным методом; чувствительность стафилококков проводили методом скрининга, ПЦР, методом серийных разведений в плотной среде в соответствии с международными рекомендациями CLSI, EUCAST. Для генотипирования и определения молекулярно-генетических особенностей — ПЦР, М-ПЦР, секвенирование. Обработку результатов проводили с использованием компьютерной программы WHONET (ВОЗ). Уровень значимости $p < 0,05$. На протяжении всего периода исследования от ВИЧ-инфицированных пациентов неизменно выделялись дрожжеподобные грибы рода *Candida* (30,4 и 35,6%). Данные микроорганизмы выделялись в монокультуре в этиологически значимом количестве от каждого третьего ВИЧ-инфицированного пациента. При этом они являлись активными ассоциантами, наиболее часто образуя ассоциации с представителями семейства *Enterobacteriaceae*. При этом установили, что наиболее часто грибы рода *Candida* в нижних отделах дыхательных путей выявлялись у ВИЧ-инфицированных с тяжелым иммунодефицитом с уровнем CD4 < 200 клеток/мкл. Также были выделены неферментирующие грамотри-

Адрес для переписки:

Хохлова Ольга Евгеньевна
ФГБОУ ВО «Красноярский государственный медицинский университет имени профессора В.Ф. Войно-Ясенецкого» Министерства здравоохранения РФ
660022, Россия, г. Красноярск,
ул. Партизана Железняка, 1.
Тел.: 8 (391) 220-13-61.
E-mail: khokhlovaol@mail.ru

Address for correspondence:

Khokhlova Olga E.
Krasnoyarsk State V.F. Voyno-Yasenetsky
Medical University
660022, Russian Federation, Krasnoyarsk,
Partizan Zheleznyak str., 1.
Phone: 7 (391) 220-13-61.
E-mail: khokhlovaol@mail.ru

Образец цитирования:

Д.Н. Акушева, О.Е. Хохлова, В.В. Камшилова, А.И. Мотова, О.В. Перьянова, А.А. Упирова, Н.К. Поткина, Татсуо Ямамото «Внебольничная пневмония у ВИЧ-инфицированных: микрофлора, антибиотикорезистентность, роль в развитии в зависимости от уровня CD4-лимфоцитов» // Медицинская иммунология, 2019. Т. 21, № 3. С. 457-466. doi: 10.15789/1563-0625-2019-3-457-466
© Акушева Д.Н. и соавт., 2019

For citation:

D.N. Akusheva, O.E. Khokhlova, V.V. Kamshilova, A.I. Motova, O.V. Peryanova, A.A. Upirova, N.K. Potkina, Tatsuo Yamamoto "Community-acquired pneumonia in HIV-infected subjects: microflora, antibiotic resistance: dependence on the levels of CD4 lymphocytes", Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya Immunologiya, 2019, Vol. 21, no. 3, pp. 457-466. doi: 10.15789/1563-0625-2019-3-457-466

DOI: 10.15789/1563-0625-2019-3-457-466

патогенные бактерии (12,9%), стафилококки (8,9%), представители семейства *Enterobacteriaceae* (4,4%). Микроорганизмы характеризовались полирезистентностью к антимикробным препаратам. Клоном MRSA среди ВИЧ-инфицированных являлся ST239/spa3(t037)/agr1/SCCmecIII.1.1.2(IIIA)/coaIV/tst⁺; характеризующийся высоким уровнем вирулентности и мультирезистентностью. Таким образом, установлено, что в развитии внебольничной пневмонии у ВИЧ-инфицированных пациентов играют роль полирезистентные микроорганизмы, в том числе грибы рода *Candida*, грамотрицательные микроорганизмы, MRSA, зачастую в составе микробных ассоциаций. Наиболее часто грибы рода *Candida* выявлялись у ВИЧ-инфицированных с тяжелым иммунодефицитом с уровнем CD4 < 200 клеток/мкл. Высокая частота выделения таких штаммов требует коррекции антимикробной терапии внебольничной пневмонии у ВИЧ-инфицированных.

Ключевые слова: пневмония, ВИЧ-инфицированные, CD4-лимфоциты, микрофлора, антибиотикорезистентность, MRSA, молекулярно-генетические особенности

COMMUNITY-ACQUIRED PNEUMONIA IN HIV-INFECTED SUBJECTS: MICROFLORA, ANTIBIOTIC RESISTANCE: DEPENDENCE ON THE LEVELS OF CD4 LYMPHOCYTES

Akusheva D.N.^{a, b}, Khokhlova O.E.^{a, b}, Kamshilova V.V.^c, Motova A.I.^c, Peryanova O.V.^{a, b}, Upirova A.A.^c, Potkina N.K.^{a, b}, Yamamoto Tatsuo^d

^a Krasnoyarsk State V.F. Voyno-Yasenetsky Medical University, Krasnoyarsk, Russian Federation

^b Russian-Japanese Center of Microbiology, Metagenomics and Infectious Diseases, Krasnoyarsk, Russian Federation

^c Krasnoyarsk State N.S. Karpovich Emergency Hospital, Krasnoyarsk, Russian Federation

^d International Medical Education and Research Center, Niigata, Japan

Abstract. Purulent inflammatory diseases of various types and etiology comprise major causes of death among the HIV-infected individuals. The purpose of this work was to determine a variety of community-acquired pathogens causing pneumonia, their antibiotic resistance profiles, and dependence on the CD4 lymphocyte levels, as well as identification of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* species and their molecular genetic characteristics in HIV-infected patients from the Krasnoyarsk City. Over the period of 2012 to 2016, we have examined 152 HIV-infected patients at the Clinical Pulmonology Department with a verified diagnosis of community-acquired pneumonia. Sputum specimens, bronchoalveolar lavage, pleural fluid, washings, pleural pus, as well as nasal and pharyngeal smears were studied for microflora, and blood tests for sterility were performed in these patients, by means of bacteriological techniques. Antibiotic sensitivity was determined by the disc diffusion method; drug sensitivity of staphylococci was performed by screening, PCR technique, serial dilution in semi-solid medium, according to the CLSI and EUCAST recommendations. PCR, M-PCR, and gene sequencing were applied for genotyping and determination of their genetic features. The results were processed with WHONET digital program (WHO). The significance level was $p < 0.05$. During the entire study period, the yeast-like fungi of *Candida* genus (30.4 and 35.6%) were consistently isolated from HIV-infected patients. These microorganisms were isolated in a pure cultures at etiologically significant amounts from one-third of the HIV-infected cohort. At the same time, they formed active associations, mostly with *Enterobacteriaceae* family members. At the same time, *Candida* fungi were most frequently detected in the lower respiratory tract of those HIV-infected persons who showed severe immunodeficiency (CD4 cell levels < 200 cells/ μ l). We have also isolated non-fermenting Gram-negative bacteria (12.9%), staphylococci (8.9%), and *Enterobacteriaceae* (4.4%). The microorganisms were characterized by polyresistance to antimicrobial agents. The MRSA clone circulating in the HIV-infected cohort was characterized as ST239/spa3(t037)/agr1/SCCmecIII.1.1.2 (IIIA)/coaIV/tst⁺ with high virulence and multiresistance levels. Hence, we have found a number of poly-resistant microorganisms playing a role for development of community-acquired pneumonia in HIV-infected patients, i.e., *Candida spp*, Gram-negative microorganisms, MRSA, often presenting a component of microbial associations. *Candida* fungi were detected most often in the HIV-infected individuals with severe immunodeficiency, at the CD4 level of < 200 cells/ μ l. High detection frequency of such microflora requires some modifications of antimicrobial therapy in HIV-infected subjects affected by the community-acquired pneumonia.

Keywords: pneumonia, HIV-infected, CD4 lymphocytes, microflora, antibiotic resistance, MRSA, molecular genetic features

Введение

В Российской Федерации наблюдается рост заболеваемости ВИЧ-инфекцией. Несмотря на предпринимаемые меры профилактики, в том числе массовое скрининговое обследование на ВИЧ, увеличение охвата антиретровирусной терапией широкого круга ВИЧ-инфицированных, эпидемия ВИЧ не снижается [10].

По данным СПИД-центра, в 2018 году эпидемическая ситуация по ВИЧ-инфекции в Красноярском крае продолжает оставаться напряженной. По состоянию на 1 декабря 2018 года кумулятивное количество впервые зарегистрированных случаев ВИЧ-инфекции за весь период наблюдения в крае составило 34 042 человек, из них 3036—с впервые в жизни установленным диагнозом. Показатель заболеваемости в Красноярском крае составил 105,5 на 100 тыс. населения, что аналогично уровню прошлого года.

Отмечается переход ВИЧ-инфекции из маргинальных и социально уязвимых групп населения в общую популяцию.

С увеличением общего числа ВИЧ-инфицированных в популяции возрастает количество ВИЧ-инфицированных пациентов в учреждениях здравоохранения, в том числе в отделениях стационара скорой медицинской помощи. Одна из причин госпитализации ВИЧ-инфицированных — поражение органов дыхания [13]. Риск развития пневмонии у ВИЧ-инфицированных выше в 8 раз по сравнению с ВИЧ-отрицательными пациентами. В структуре летальных исходов от ВИЧ-инфекции 25% занимает пневмония, вызванная грамположительными кокками [3, 5].

Состояние иммунного дефицита способствует колонизации таких пациентов наиболее агрессивными микроорганизмами с выраженной устойчивостью к противомикробным/антифунгеальным препаратам, что требует коррекции антимикробной терапии [6]. Установлено, что MRSA выделяется от ВИЧ-инфицированных чаще, чем от здоровых лиц [8].

Кроме этого, иммунокомпрометированные пациенты наиболее подвержены внутрибольничным инфекциям, что утяжеляет течение болезни. К традиционным внутрибольничным патогенам, таким как *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *A. baumannii* и *K. pneumoniae*, можно причислить дрожжевые грибы рода *Candida*, которые представляют известную опасность для данной категории пациентов из-за глубокого угнетения клеточного звена иммунитета [9]. При снижении количества CD4-клеток и при выявлении грибов рода *Candida* в двух и более локусах увеличивается вероятность развития инвазивного кандидоза [2]. Кандидоз выявляется у 70% умерших от ВИЧ-инфекции. При этом характерно увеличение

доли нон-альбикантных видов, более устойчивых к антифунгеальной терапии [1].

Цель — определить спектр возбудителей внебольничной пневмонии и профиль их резистентности, их зависимость от уровня CD4-лимфоцитов, а также выявить роль метициллинрезистентных *Staphylococcus aureus* и их молекулярно-генетических особенностей у ВИЧ-инфицированных пациентов г. Красноярска.

Материалы и методы

В период 2012–2016 гг. на клинической базе КГБУЗ «КМКБСМП им. Н.С. Карповича» г. Красноярска было обследовано 152 ВИЧ-инфицированных пациента пульмонологического отделения с клиническим диагнозом «внебольничная пневмония». В 2012–2014 гг. было обследовано 30 ВИЧ-инфицированных пациентов. В 2015–2016 гг. было обследовано 122 пациента. От больных в первые 48 часов после госпитализации и далее по мере необходимости забирались мокрота, бронхоальвеолярный лаваж, плевральная жидкость, промывные воды, гной из плевры, а также мазок из носа и зева на выявление микрофлоры. У больных с тяжелым течением внебольничной пневмонии (27 человек) была забрана кровь на стерильность, от каждого больного забирали как минимум 2 пробы и до 6 проб крови (в среднем от каждого пациента 3,3 пробы), исследовано 88 проб крови. Кровь забирали из периферической вены при соблюдении правил асептики в соответствии с рекомендациями. 90 пациентов обследовались однократно, 32 пациента — в динамике заболевания. У определенной доли пациентов наблюдались лихорадка неясного генеза или симптомы сепсиса (2%). У всех обследованных был выраженный иммунодефицит с уровнем CD4 200–349 клеток/мкл или тяжелый иммунодефицит с уровнем CD4 < 15 %. Критерии включения: возраст ≥ 18 лет, диагноз «внебольничная пневмония», ВИЧ-инфекция. Критерии исключения: туберкулез, сахарный диабет, беременность. Всего было исследовано 118 клинических образцов в 2012–2014 гг. и 187 образцов — в 2015–2016 гг. Изоляты, выделенные от одного пациента и имеющие одинаковый профиль резистентности, из исследования исключались.

Для оценки качества взятия материала мокроту микроскопировали, далее гомогенизировали с бусами 1 мл мокроты и 9 мл мясопептонного бульона в течение 20 мин, готовили последовательные десятикратные разведения и засевали по 0,1 мл из исходного разведения 1:10 на колумбийский агар с добавлением 5% крови (Хай-Медиа, Индия), желточно-солевой агар, среды Эндо и Сабуро (ФБУН ГНЦ ПМБ, пгт Оболенск); из разведений мокроты 10⁻⁴ и 10⁻⁶ засевали на чашки с колумбийским агаром с добавлением 5% крови (Хай-Медиа, Индия). Бронхоальвео-

лярное содержимое засекали методом секторных посевов (по Gould) калибровочной петлей. Идентификацию исследуемых культур проводили на основании морфо-тинкториальных, культуральных и биохимических свойств, используя, помимо рутинных методов, тест-системы Remel (США), Bio Merieux (Франция) для идентификации микроорганизмов. Недостатком в нашей работе явилось отсутствие выявления прихотливых микроорганизмов, таких как *M. pneumoniae*, *C. pneumoniae*, *H. influenzae*.

Чувствительность микроорганизмов к антибиотикам определяли диско-диффузионным методом на агаре Мюллера–Хинтона с использованием дисков OXOID (Великобритания); чувствительность стафилококков к оксациллину (Sigma-Aldrich, США), цефокситину OXOID (Великобритания) проводили методом скрининга; чувствительность стафилококков к другим антимикробным препаратам проводили методом серийных разведений в соответствии с международными рекомендациями CLSI, EUCAST. Продукцию бета-лактамаз расширенного спектра (БЛРС) у энтеробактерий определяли фенотипически: методом «двойных дисков», при котором продукция определяется за счет синергизма цефалоспоринона (цефотаксим, цефтазидим, цефепим) с клавулановой кислотой на среде Muller–Hinton с использованием дисков с антибиотиками OXOID (Великобритания) [7, 11]. Продукцию металло-β-лактамаз (МБЛ) проводили методом инактивации карбапенемов (CIM) [15]. Для внутрилабораторного контроля определения антибиотикочувствительности и метициллино-резистентности использовали референс-штаммы из коллекции ATCC (*S. aureus* ATCC 25923, *E. coli* ATCC 25922 и *P. aeruginosa* ATCC 27853).

Для генетических исследований MRSA микроорганизмы культивировали в бульоне LB (Difco, Detroit, MI) при температуре 37 °C до фазы логарифмического роста.

Исследовали гены *nuc* и *tesA* с помощью ПЦР для определения принадлежности к MRSA. Исследовали 42 гена патогенности (ПЦР): 2 лейкоцидина; 4 гемолизина; 19 генов стафилококковых энтеротоксинов (SE): *tst*, *sea*, *seb*, *sec*, *sed*, *see*, *seg*, *seh*, *sei*, *sej*, *sek*, *sel*, *sem*, *sen*, *seo*, *sep*, *seq*, *seu*; 3 эксфолиатина; *set*, *edin*, *ssl*; 14 генов адгезии [14]. Детекцию продуктов амплификации ПЦР проводили электрофорезом в 1,5% агарозном геле с бромистым этидием. Использовали 100 bp DNA ladder (Sigma-Aldrich Japan, Tokyo).

Молекулярное типирование штаммов MRSA проводили в соответствии с международными стандартами [12]. MLST типирование основано на изучении семи «генов домашнего хозяйства» и определения аллельного профиля (аллельный номер) с использованием вебсайта (<http://www.mlst.net/>). Данные были проанализированы с помощью программного обеспечения eBURST.

SCCmec типирование (I-V типы) – с применением ПЦР, М-ПЦР. Субтипирование SCCmec проводили в соответствии с рекомендациями (<http://www.staphylococcus.net/>).

Обработку результатов проводили с использованием компьютерной программы WHONET (ВОЗ). Качественные признаки представлялись в виде долей (%) и абсолютных чисел. В сравнительном анализе использовался двусторонний критерий Фишера. Уровень значимости $p < 0,05$.

Результаты

В 2012–2014 гг. при посеве мокроты был получен рост микроорганизмов от 23 пациентов из 30 (73,3%) (рис. 1). Всего было выделено 24 штамма – от 22 пациентов получены монокультуры (95,5% случаев), от 1 пациента была выделена ассоциация микроорганизмов (4,5% случаев). Среди монокультур доминировали дрожжеподобные грибы рода *Candida* (30,4% случаев) и бактерии семейства *Enterobacteriaceae* (30,4%), представленные в основном *K. pneumoniae* (17,4%). На втором месте по частоте встречаемости у ВИЧ-инфицированных пациентов – грамположительные микроорганизмы, которые были выделены в 26,1% случаев, при этом *S. aureus* выделен в 8,7% случаев (2 из 23 штаммов), *S. epidermidis* – также в 8,7% случаев (2 штамма). На долю неферментирующих грамотрицательных бактерий приходилось 13,1% (рис. 2).

Из крови ВИЧ-инфицированных пациентов при тяжелом течении пневмонии выделялся преимущественно *S. aureus* (3 штамма из 4), при этом один из штаммов являлся MRSA. 1 штамм, выделенный из крови, был представлен *E. coli*. У 2 пациентов при дальнейших исследованиях из крови были выделены MRSA и *C. albicans*.

В 2015–2016 гг. при посеве клинического материала от ВИЧ-инфицированных пациентов рост был получен в 72,2% случаев (135 образцов из 187), при этом монокультуры были выделены из 86 образцов (63,7%), ассоциации – из 49 образцов (36,3%). Значительную долю среди микроорганизмов, выделяемых из мокроты ВИЧ-инфицированных в монокультуре, составили дрожжевые грибы рода *Candida* – 35,6% случаев (48 штаммов) (рис. 3). На втором месте – неферментирующие грамотрицательные бактерии (12,9% – 16 штаммов), за ними следовали грамположительные микроорганизмы – стафилококки (8,9% – 12 штаммов) – и представители семейства *Enterobacteriaceae* (4,4% – 6 штаммов). По 1,5% приходилось на энтерококки и бета-гемолитический стрептококк группы А (по 2 штамма соответственно). Частота выделения *C. albicans* среди всех дрожжевых грибов рода *Candida* составила 97,9%, non-albicans видов – 2,1%. Среди неферментирующих грамотрицательных бактерий основную долю составила

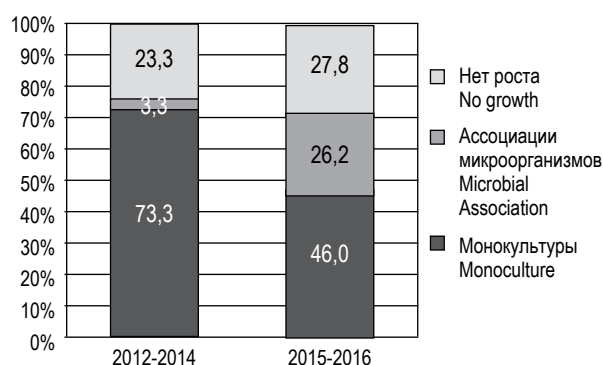


Рисунок 1. Структура микроорганизмов, выделенных от ВИЧ-инфицированных больных в 2012-2016 гг. (%)

Figure 1. The structure of microorganisms, isolated from HIV-infected in 2012-2016 (%)

P. aeruginosa. Синегнойная палочка представляла 75,0% (12 штаммов) всех НГОБ, выделенных в монокультуре. Значительна роль и *A. baumannii* — 25,0% (4 штамма). На третьем месте по частоте выделения в монокультуре — бактерии рода *Staphylococcus* (8,9%). Преимущественно от ВИЧ-инфицированных пациентов выделялся *S. aureus* (73,0%). На долю *S. epidermidis* приходилось 23,0%. Семейство *Enterobacteriaceae* было представлено *K. pneumoniae* — 83,3% и *P. mirabilis* — 16,7% (5 и 1 штамм соответственно). *E. coli* встречалась только в ассоциациях.

Характерна в 2015-2016 гг. для ВИЧ-инфицированных большая доля выделяемых ассоциаций (26,2% от общего числа исследуемых образцов, 36,3% от числа выделенных микроорганизмов). Были выделены двух-, трех- и четырехкомпонентные ассоциации. Наиболее часто в ассоциациях участвовали грибы рода *Candida* (17% от общего количества образцов), энтеробактерии (16%) и стафилококки (15%). Наименее активные ассоцианты — НГОБы (6%) и энтерокки (2%) (рис. 4).

Грибы рода *Candida* преимущественно выделялись в ассоциациях с энтеробактериями (10% от общего числа образцов) и стафилококками (6%). 3% от общего числа образцов приходилось на ассоциации НГОБ и энтеробактерий, 2% — ассоциации энтеробактерий и стафилококков. Трех- и четырехкомпонентные ассоциации составляли разнообразные сочетания микроорганизмов при обязательном присутствии грибов рода *Candida*.

При исследовании микрофлоры ВИЧ-инфицированных в динамике заболевания отмечалась смена возбудителя на более устойчивые виды и формирование ассоциаций. Так, отмечалась замена *C. albicans* на нон-альбикантные виды, более устойчивые к противогрибковым

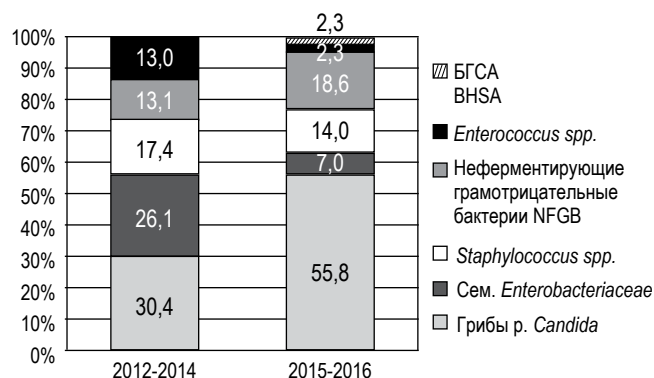


Рисунок 2. Структура микроорганизмов, выделенных в монокультуре от ВИЧ-инфицированных в 2012-2014 гг. (%)

Figure 2. The structure of microorganisms, isolated in monoculture from HIV-infected in 2012-2014 (%)

препаратам — *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. krusei*, которые наиболее часто встречались в ассоциациях микроорганизмов.

В 2012-2014 гг. представители семейства *Enterobacteriaceae*, выделенные от ВИЧ-инфицированных пациентов, проявляли резистентность к цефтазидиму и ампициллину/сульбактаму в 100% случаев; к цефоперазону/сульбактаму и амикацину — в 14,3% случаев; устойчивость к ципрофлоксацину была выявлена у 57,1% штаммов; все выделенные штаммы обладали чувствительностью к карбапенемам.

Штаммы *A. baumannii*, изолированные от ВИЧ-инфицированных в 2012-2014 гг., демонстрировали 100% резистентность к изученным антибактериальным препаратам, в том числе карбапенемам.

Доля MRSA варьировала в зависимости от типа клинического материала (50% MRSA были выделены из мокроты, 33% — из крови). Доля MRSE среди всех *S. epidermidis*, выделенных из мокроты, составила 50% (1 штамм).

В 2015-2016 гг. штаммы *A. baumannii*, выделенные от ВИЧ-инфицированных пациентов, характеризовались резистентностью к амикацину в 77,5% случаев (7 штаммов из 9), к ципрофлоксацину — в 88,9% случаев (8 штаммов из 9), к ампициллину/сульбактаму — в 25% случаев (2 штамма из 9), к имипенему и меропенему — в 55,6 и 62,7% случаев (5 и 6 штаммов из 9 соответственно). Выделенные штаммы обладали 100% чувствительностью к цефоперазону/сульбактаму (рис. 5).

Штаммы *P. aeruginosa* проявили резистентность к амикацину в 84,6% случаев, ципрофлоксацину — в 92,3% (12 штаммов из 13). Такое же количество штаммов были резистентны к имипенему и меропенему. 38,5% штаммов обладали резистентностью к цефоперазону/суль-

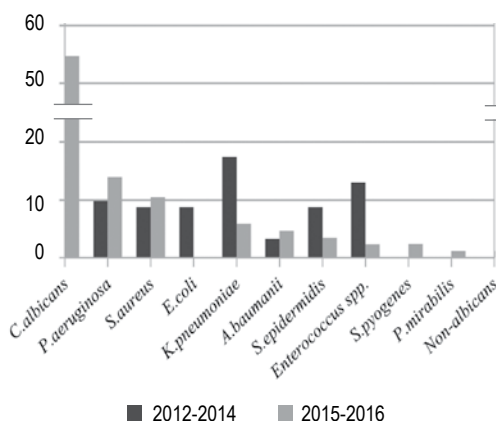


Рисунок 3. Видовой состав микрофлоры, выделенной в монокультуре от ВИЧ-инфицированных (%)

Figure 3. The microflora, isolated in monoculture from HIV-infected (%)

бактерию. Металлобеталактамазы продуцировали 23,1% выделенных штаммов *P. aeruginosa* (3 штамма).

Штаммы *K. pneumoniae* обладали резистентностью к амикацину в 22,2% случаев, цефтазидиму — 63,0%, ципрофлоксацину — 80,8%, ампициллину/сульбактаму — 65,4% случаев. 77,8% штаммов *K. pneumoniae* являлись продуцентами БЛРС, при этом 100% штаммов оказались чувствительными к цефоперазону/сульбактаму. Резистентность к имипенему и меропенему проявил один штамм, что составило 3,7% (рис. 6).

Штаммы *E. coli* были резистентны к ципрофлоксацину в 60% случаев, резистентны к ампициллину/сульбактаму и амикацину в 40% случаев, к меропенему и цефтазидиму — в 20% случаев. Все штаммы были чувствительными к имипенему и цефоперазону/сульбактаму. 60% выделенных штаммов являлись продуцентами БЛРС.

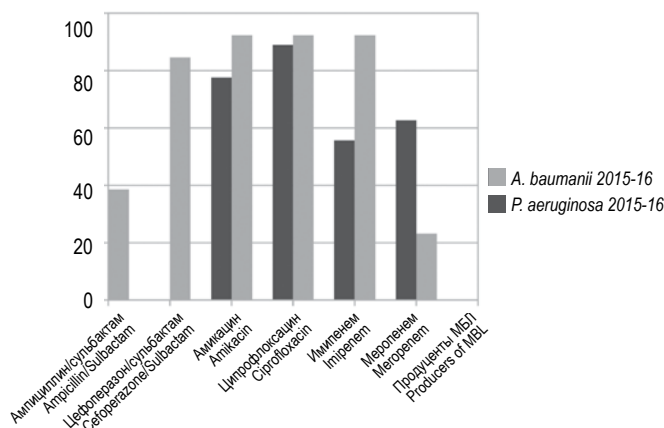


Рисунок 5. Резистентность неферментирующих грамотрицательных бактерий, выделенных от ВИЧ-инфицированных пациентов в 2015-2016 гг. (%)

Figure 5. The antibiotics resistance of non-fermentative gram-negative bacteria, isolated from HIV-infected in 2015-2016 (%)

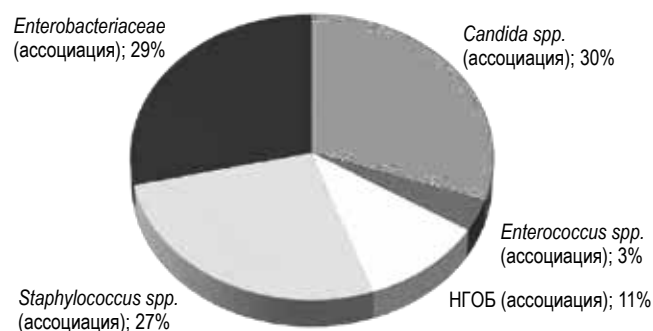


Рисунок 4. Участие микроорганизмов в формировании ассоциаций (%)

Figure 4. Participation of microorganisms in the formation of associations (%)

P. mirabilis в 50% случаев был резистентен к ципрофлоксацину и ампициллину/сульбактаму. Штаммов, устойчивых к амикацину, цефтазидиму, имипенему, меропенему, не обнаружено. Все штаммы являлись БЛРС-отрицательными.

Частота встречаемости метициллинрезистентных штаммов стафилококка составила 25% для MRSA (2 штамма) и 67% для MRSE (2 штамма).

У обследованных ВИЧ-инфицированных была также изучена микрофлора верхних дыхательных путей — зева и носа. Установили в 50% случаев идентичный видовой состав микроорганизмов в мазках из зева, носа и из мокроты, как в ассоциациях, так и в виде моноинфекции. Из мазков зева и носа выделяли такие микроорганизмы, как *C. albicans*, *C. tropicalis*, *S. aureus*, *E. coli*, *K. pneumoniae*, *E. aerogenes*, *P. aeruginosa* и др. Различный видовой спектр микроорганизмов как грибковой, так и бактериальной этио-

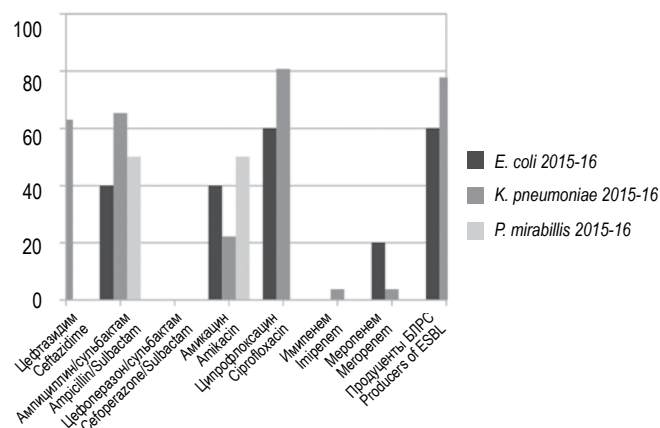


Рисунок 6. Резистентность представителей семейства Enterobacteriaceae, выделенных от ВИЧ-инфицированных пациентов в 2015-2016 гг. (%)

Figure 6. The antibiotic resistance of *Enterobacteriaceae*, isolated from HIV-infected in 2015-2016 (%)

логии в указанных материалах выявлялся в 50% случаев.

Проведено генотипирование 4 штаммов MRSA, в том числе 1 штамма из воздушно-носных путей, 1 штамма из крови (были выделены в 2012-2014 гг.) и 2 штаммов из воздушно-носных путей (выделены в 2015-2016 гг.). Все выделенные штаммы MRSA были PVL-негативными, отнесены к генотипу ST239/spa3(t037)/agr1/SCCmecIII.1.1.2(III A)/coaIV (ST239_{Kras}), характеризовались наличием лейкоцидина lukED, гемолизина, токсина синдрома токсического шока TSST-1 (*tst*), энтеротоксинов SEK (*sek*), SEQ (*seq*), адгезинов (за исключением *bbp*) (табл. 1). Характеризовались антибиотикорезистентностью к аминогликозидам, макролидам, линкозамидам, фторхинолонам, хлорамфениколу, рифампицину (МПК > 128 мкг/мл), сульфаметоксазол/триметоприму и чувствительностью к гликопептидам (ванкомицин, МПК = 0,5 мкг/мл), линезолиду, мупироцину, фузидиевой кислоте. В 2015-2016 гг. установлено, что штаммы MRSA относились к hVISA, так как уровень МПК для ванкомицина уже составил 2 мкг/мл. При этом все выделенные штаммы данного генотипа, вероятно, относились к госпитальным, так как были выделены от пациентов позднее 48 часов пребывания в стационаре.

Обсуждение

На протяжении всего периода исследования от ВИЧ-инфицированных пациентов неизменно выделялись дрожжеподобные грибы рода *Candida* (30,4 и 35,6%). Данные микроорганизмы выделялись в монокультуре в этиологически значимом количестве от каждого третьего ВИЧ-инфицированного пациента. При этом они являлись активными ассоциантами, наиболее часто образуя ассоциации с представителями семейства *Enterobacteriaceae*. При этом установили, что наиболее часто грибы рода *Candida* в нижних отделах дыхательных путей выявлялись у ВИЧ-инфицированных с тяжелым иммунодефицитом с уровнем CD4 < 200 клеток/мкл. Ранее было показано, что *C. albicans* потенцирует рост *K. pneumoniae*. В 2015-2016 гг. *K. pneumoniae* выделялся чаще в ассоциации с *C. albicans*, чем в монокультуре. При этом у таких пациентов не было выделено *S. pneumoniae*. Таким образом, у ВИЧ-инфицированных с внебольничной пневмонией грибы рода *Candida* в 2015 г. были выявлены у 63% пациентов, в 2016 г. — у 64%. Отмечен высокий уровень встречаемости грибов рода *Candida* в верхних отделах дыхательных путей у ВИЧ-инфицированных в 2015-2016 гг. (68,75%). Различный видовой спектр грибов рода *Candida* в верхних и нижних отделах дыхательных путей установлен в 18,75% случаев. Идентичный видовой спектр грибов рода *Candida* в верхних и нижних отделах дыхательных путей установлен лишь

ТАБЛИЦА 1. МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ШТАММОВ MRSA, ИЗОЛИРОВАННЫХ ОТ ВИЧ-ИНФИЦИРОВАННЫХ С ВНЕБОЛЬНИЧНОЙ ПНЕВМОНИЕЙ В 2012-2016 гг.

TABLE 1. THE MOLECULAR-GENETIC CHARACTERISTICS OF MRSA, ISOLATED FROM HIV-INFECTED WITH COMMUNITY PNEUMONIA IN 2012-2016

Определяемые характеристики Characteristics	Результаты типирования штаммов MRSA Results of typing of MRSA n = 4
CC	239
ST	239
spa	3 (t037)
SCCmec	III.1.1.2 (III A)
agr	1
coa	IV
Токсины: Toxins:	
Лейкоцидины Leucocidins	
lukPVSF	-
lukE-lukD	+
lukM	-
Гемолизины Hemolysins	
hla, hlg, hlg-v	+
hlb (split)	(+)
Пептидные цитоллизины Peptide cytolysins	
psma, hld	+
Энтеротоксины Enterotoxins	
sea	-
tst	+
sec, sep, seb, sed, see, seh, set, sel	-
Sap15 (sek, seq)	+
sej, seu, egc*	-
Эксфолиатины Exfoliatins	
eta, etb, etd	-
Адгезины Adhesins	
c12ag'	+
cna	+
bbp	-

Таблица 1 (окончание)
Table 1 (continued)

Определяемые характеристики Characteristics	Результаты типирования штаммов MRSA Results of typing of MRSA n = 4
Другие Others	
ACME (<i>arcA</i>)	-
<i>ssl</i>	+
<i>edin</i>	-
Антибиотикорезистентность Resistance to antibiotics	
Имипенем (МПК, мкг/мл) Imipenem (MIC, mcg/ml)	32-64
Оксациллин (МПК, мкг/мл) Oxacillin (MIC, mcg/ml)	> 128
Ампициллин (МПК, мкг/мл) Ampicillin (MIC, mcg/ml)	32-64
Аминогликозиды Aminoglycosides	100%
Тетрациклины Tetracyclines	100%
Макролиды Macrolides	100%
Линкозамиды Lincosamides	100%
Фторхинолоны Fluoroquinolones	100%
Рифампицин (МПК, мкг/мл) Rifampin (MIC, mcg/ml)	100% > 128
Хлорамфеникол Chloramphenicol	100%
Сульфаметоксазол/Тримето- прим Sulfamethoxazole/Trimetoprim	100%
Гликопептиды Glycopeptides	0%
Ванкомицин (МПК, мкг/мл) Vancomycin (MIC, mcg/ml)	0,5-2
Оксазолидиноны Oxazolidinones	0%
Мупироцин Mupirocin	0%

Примечание. egc* – кластер генов *seg*, *sei*, *sem*, *sen*, *seo*, кодирующих синтез энтеротоксинов, *c12ag** – кластер генов *icaA*, *icaD*, *eno*, *fnbA*, *fnbB*, *ebpS*, *clfA*, *clfB*, *fib*, *sdrC*, *sdrD*, *sdrE*, кодирующих синтез адгезинов.

Note. egc*, the cluster of genes, encoded of enterotoxins *seg*, *sei*, *sem*, *sen*, *seo*; *c12ag**, the cluster of genes, encoded of adhesins *icaA*, *icaD*, *eno*, *fnbA*, *fnbB*, *ebpS*, *clfA*, *clfB*, *fib*, *sdrC*, *sdrD*, *sdrE*.

в 12,5% случаев. Такая высокая доля грибов рода *Candida* в этиологической структуре внебольничной пневмонии у ВИЧ-инфицированных может быть связана с тяжелым иммунодефицитом. В 12,5% случаев не исключена контаминация материала, забираемого из нижних отделов дыхательных путей грибами рода *Candida*, штаммами микроорганизмов, обитающих в ротовой полости, хотя качество забранной мокроты соответствовало стандарту. Несмотря на контроль качества забираемого материала из нижних отделов дыхательных путей, полностью предотвратить попадание грибов рода *Candida* из содержимого ротовой полости в мокроту не представляется возможным. С другой стороны, совпадение микробного пейзажа в верхних и нижних отделах дыхательных путей может говорить об эндогенном происхождении инфекции. В период 2015-2016 гг. возросло количество ассоциаций. Преимущественно ассоциации выявлялись при повторных обследованиях в динамике заболевания.

Резистентность микроорганизмов, выделенных от ВИЧ-положительных пациентов, выше по сравнению с результатами многоцентровых исследований, представленных на платформе AMRmap [4]. Такой высокий уровень резистентности к антимикробным препаратам среди штаммов, выделенных от ВИЧ-инфицированных, можно объяснить неоднократными госпитализациями такого рода пациентов. При лечении внебольничной пневмонии ВИЧ-инфицированных пациентов включают несколько антибактериальных препаратов, в том числе ко-тримоксазол, вследствие высокого риска развития пневмоцистной пневмонии. ВИЧ-инфицированным пациентам, поступившим с диагнозом «внебольничная пневмония», помимо антибактериальных препаратов, в комплексное лечение обязательно включают противогрибковый препарат флуконазол. Также высокий уровень резистентности штаммов, выделенных позднее 48 часов пребывания в стационаре, возможно, связан с госпитализацией больных в пульмонологическое отделение, где одновременно находятся на стационарном лечении пациенты, ранее госпитализированные в отделение реанимации и интенсивной терапии, и существует риск циркуляции госпитальной флоры.

Установлено, что на протяжении 2012-2016 гг. среди ВИЧ-инфицированных с внебольничной пневмонией циркулировали представители одного генетического варианта MRSA ST239_{Kras}, который широко распространен на территории г. Красноярск, Красноярского края и циркулирует в условиях различных стационаров. При этом представители данного генетического варианта MRSA характеризовались устойчивостью к одинаковому спектру антимикробных препаратов. Наличие у данных штаммов MRSA набора генов, кодирующих токсинообразование, в част-

ности гена *tst*, определяет тяжесть течения инфекционного процесса.

Таким образом, установлено, что в развитии внебольничной пневмонии у ВИЧ-инфицированных пациентов играют роль полирезистентные микроорганизмы, в том числе грибы рода *Candida*, грамотрицательные микроорганизмы, MRSA, зачастую в составе микроб-

ных ассоциаций. Наиболее часто грибы рода *Candida* выявлялись у ВИЧ-инфицированных с тяжелым иммунодефицитом с уровнем CD4 < 200 клеток/мкл. Высокая частота выделения таких штаммов требует коррекции анти-микробной терапии внебольничной пневмонии у ВИЧ-инфицированных.

Список литературы / References

1. Буркина Е.С., Шахова Т.С., Михайлова Н.Р. Структура летальных исходов и частота встречаемости оппортунистических заболеваний у больных ВИЧ-инфекцией г. Оренбурга // Вестник совета молодых ученых и специалистов Челябинской области, 2017. Т. 4, № 19. С. 18-20. [Burkina E.S., Shakhova T.S., Mikhaylova N.R. The structure of deaths and the incidence of opportunistic diseases in patients with hiv infection in the city of Orenburg. *Vestnik soveta molodykh uchionykh i spetsialistov Chelyabinskoy oblasti* = *Bulletin of the Council of Young Scientists and Specialists of the Chelyabinsk Region*, 2017, Vol. 4, no. 19, pp. 18-20. (In Russ.)]
2. Гяургиева О.Х. Кандидоз кожи при ВИЧ-инфекции // Успехи современной науки и образования, 2016. Т. 3, № 1. С. 20-22. [Gyaurgieva O.Kh. Candidiasis of skin with hiv infection. *Uspekhi sovremennoy nauki i obrazovaniya* = *Modern Science Success*, 2016, Vol. 3, no. 1, pp. 20-22. (In Russ.)]
3. Долгова О.Б., Соколова С.Л., Корешников А.В. Вторичные инфекционные заболевания при ВИЧ-инфекции в стадии СПИД // MEDICUS, 2016. Т. 6, № 12. С. 86-89. [Dolgova O.B., Sokolova S.L., Koreshnikov A.V. Postprimary contagious diseases at hiv infection of aids stage. *MEDICUS*, 2016, Vol. 6, no. 12, pp. 86-89. (In Russ.)]
4. Кузьменков А.Ю., Трушин И.В., Авраменко А.А., Эйдельштейн М.В., Дехнич А.В., Козлов Р.С. AMRmap: Интернет-платформа мониторинга антибиотикорезистентности // Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия, 2017. Т. 19, № 2. С. 84-90. [Kuzmenkov A.Yu., Trushin I.V., Avramenko A.A., Eidelstein M.V., Dekhnich A.V., Kozlov R.S. AMRmap: an online platform for monitoring antibiotic resistance. *Klinicheskaya mikrobiologiya i antimikrobnaya khimioterapiya* = *Clinical Microbiology and Antimicrobial Chemotherapy*, 2017, Vol. 19, no. 2, pp. 84-90. (In Russ.)]
5. Николенько В.В., Воробьева Н.Н., Николенько А.В., Окишев М.А. Клинические особенности течения внебольничных пневмоний, вызванных *Streptococcus pneumoniae* и *Staphylococcus aureus*, у ВИЧ-инфицированных пациентов // Пермский медицинский журнал, 2016. Т. 33, № 5. С. 9-14. [Nikolenko V.V., Vorobyova N.N., Nikolenko A.V., Okishev M.A. Clinical peculiarities of community-acquired pneumonia course induced by *Streptococcus pneumoniae* and *Staphylococcus aureus* in HIV-infected patients. *Permskiy meditsinskiy zhurnal* = *Perm Medical Journal*, 2016, Vol. 33, no. 5, pp. 9-14. (In Russ.)]
6. Солонин С.А., Шахова О.Б., Белова М.В., Годков М.А. Нозологическая и возрастно-половая структура ВИЧ-инфицированных пациентов, поступающих в стационар скорой медицинской помощи // Архивъ внутренней медицины, 2018. Т. 8, № 3. С. 194-203. [Solonin S.A., Shakhova O.B., Belova M.V., Godkov M.A. Medical conditions, age and sex structure of patients infected with HIV at emergency hospital. *Arkhiv vnutrenney meditsiny* = *Russian Archives of Internal Medicine*, 2018, Vol. 8, no. 3, pp. 194-203. (In Russ.)]
7. Фенотипическое определение *Enterobacter* – продуцентов β-лактамаз расширенного спектра: обзор и руководство по проведению испытаний. Европейское общество клинической микробиологии и инфекционных болезней // Клиническая микробиология и инфекционные заболевания, 2008. Т. 14. С. 90-103. [Phenotypic determination of *Enterobacter* – producers of extended-spectrum β-lactamases: a review and a test guide. European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases. *Klinicheskaya mikrobiologiya i infektsionnye zabolovaniya* = *Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 2008, Vol. 14, pp. 90-103. (In Russ.)]
8. Хохлова О.Е., Акушева Д.Н., Перьянова О.В., Корецкая Н.М., Абарникова О.В., Королькова Е.К., Белоусова Ю.Н., Саламатина О.В., Безручкина Т.Н., Князева К.М., Шогжал И.С., Поткина Н.К., Элярт В.Ф., Ямамото Т. Молекулярно-генетические особенности метициллинрезистентных *S. aureus*, выделенных от лиц пенитенциарной системы, инфицированных ВИЧ // Сибирское медицинское обозрение, 2018. № 2. С. 13-18. [Khokhlova O.E., Akusheva D.N., Peryanova O.V., Koretskaya N.M., Abarnikova O.V., Korolkova E.K., Belousova Yu.N., Salamatina O.V., Bezruchkina T.N., Knyazeva K.M., Shogzhal I.S., Potkina N.K., Elyarte V.F., Yamamoto T. Molecular-genetic features of methicillin-resistant *S. aureus*, have got from the persons of the penitentiary system, infected with HIV. *Sibirskoe meditsinskoe obozrenie* = *Siberian Medical Review*, 2018, no. 2, pp. 13-18. (In Russ.)]
9. Чарушина И.П., Фельдблюм И.В., Баландина С.Ю., Александрова Г.А., Смирнова Л.Н., Маркович Н.И. Сравнительная оценка обсемененности грибами *Candida albicans* пациентов и объектов больницы среды стационара для ВИЧ-инфицированных при регистрации случаев инвазивного кандидоза и в благополучный период // Профилактическая и клиническая медицина, 2017. Т. 1, № 62. С. 5-11. [Charushina I.P., Feldbljum I.V., Balandina S.Ju., Aleksandrova G.A., Smirnova L.N., Markovich N.I. Comparison of micromycetes *Candida albicans* contamination in patients and medical items in the hospital for hiv-infected patients with invasive candidiasis and in a welfare period. *Profilakticheskaya i klinicheskaya meditsina* = *Preventive and Clinical Medicine*, 2017, Vol. 1, no. 62, pp. 5-11. (In Russ.)]
10. Шабунцова А.А., Калачикова О.Н., Короленко А.В. Обзор мировых и региональных тенденций заболеваемости ВИЧ-инфекцией и обусловленной ей смертности // Социальные аспекты здоровья населения, 2017. Т. 54, № 2. С. 9-13. [Shabunova A.A., Kalachikova O.N., Korolenko A.V. Review of global and regional trends

in HIV morbidity and mortality. *Sotsialnye aspekty zdorovya naseleniya = Social Aspects of Public Health*, 2017, Vol. 54, no. 2, pp. 9-15. (In Russ.)]

11. Drieux L., Brossier F., Sougakoff W., et al. Phenotypic detection of extended-spectrum β -lactamase production in *Enterobacteriaceae*: review and bench guide. *Clin. Microbiol. Infect.*, 2008, Vol. 14, pp. 90-103.

12. International working group on the classification of staphylococcal cassette chromosome elements (IWG-SCC). Classification of staphylococcal cassette chromosome mec (SCCmec): guidelines for reporting novel SCCmec elements. *Agents Chemother.*, 2009, Vol. 53, pp. 4961-4967.

13. Mkoko P., Raine R.I. HIV-positive patients in the intensive care unit: A retrospective audit. *S. Afr. Med. J.*, 2017, Vol. 107, no. 10, pp. 877-771.

14. Takano T., Hung W.C., Shibuya M., Higuchi W., Iwao Y., Nishiyama A., Reva I., Khokhlova O.E., Yabe S., Ozaki K., Takano M., Yamamoto T. A new local variant (ST764) of the globally disseminated ST5 lineage of hospital-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) carrying the virulence determinants of community-associated MRSA. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2013, Vol. 57, no. 4, pp. 1589-1595.

15. van der Zwaluw K., de Haan A., Pluister G.N., Bootsma H.J., de Neeling A.J., Schouls L.M. The carbapenem inactivation method (CIM), a simple and low-cost alternative for the Carba NP test to assess phenotypic carbapenemase activity in gram-negative rods. *PLoS ONE*, 2015, Vol. 10, no. 3, pp. 1-12.

Авторы:

Акушева Д.Н. — преподаватель кафедры микробиологии им. доцента Б.М. Зельмановича ФГБОУ ВО «Красноярский государственный медицинский университет имени профессора В.Ф. Войно-Ясенецкого» Министерства здравоохранения РФ; Российско-Японский центр микробиологии, метагеномики и инфекционных заболеваний, г. Красноярск, Россия

Хохлова О.Е. — к.б.н., доцент, ФГБОУ ВО «Красноярский государственный медицинский университет имени профессора В.Ф. Войно-Ясенецкого» Министерства здравоохранения РФ; Российско-Японский центр микробиологии, метагеномики и инфекционных заболеваний, г. Красноярск, Россия

Камшилова В.В. — к.б.н., КГБУЗ «Красноярская межрайонная клиническая больница скорой медицинской помощи имени Н.С. Карповича», г. Красноярск, Россия

Мотова А.И. — врач, КГБУЗ «Красноярская межрайонная клиническая больница скорой медицинской помощи имени Н.С. Карповича», г. Красноярск, Россия

Перьянова О.В. — к.б.н., заведующая кафедрой, ФГБОУ ВО «Красноярский государственный медицинский университет имени профессора В.Ф. Войно-Ясенецкого» Министерства здравоохранения РФ; Российско-Японский центр микробиологии, метагеномики и инфекционных заболеваний, г. Красноярск, Россия

Упирова А.А. — заведующая отделением КГБУЗ «Красноярская межрайонная клиническая больница скорой медицинской помощи имени Н.С. Карповича», г. Красноярск, Россия

Поткина Н.К. — научный сотрудник ФГБОУ ВО «Красноярский государственный медицинский университет имени профессора В.Ф. Войно-Ясенецкого» Министерства здравоохранения РФ; Российско-Японский центр микробиологии, метагеномики и инфекционных заболеваний, г. Красноярск, Россия

Ямамото Татсуо — к.м.н., профессор, директор, Международный медицинский образовательно-исследовательский центр (IMERC) Ниигата, Япония

Authors:

Akusheva D.N., Lecturer, B.M. Zelmanovich Department of Microbiology, Krasnoyarsk State V.F. Voyno-Yasenetsky Medical University; Russian-Japanese Center of Microbiology, Metagenomics and Infectious Diseases, Krasnoyarsk, Russian Federation

Khokhlova O.E., PhD (Biology), Associate Professor, Krasnoyarsk State V.F. Voyno-Yasenetsky Medical University; Russian-Japanese Center of Microbiology, Metagenomics and Infectious Diseases, Krasnoyarsk, Russian Federation

Kamshilova V.V., PhD (Biology), Krasnoyarsk State N.S. Karpovich Emergency Hospital, Krasnoyarsk, Russian Federation

Motova A.I., Doctor, Krasnoyarsk State N.S. Karpovich Emergency Hospital, Krasnoyarsk, Russian Federation

Perianova O.V., PhD (Biology), Head of the Department, Krasnoyarsk State V.F. Voyno-Yasenetsky Medical University; Russian-Japanese Center of Microbiology, Metagenomics and Infectious Diseases, Krasnoyarsk, Russian Federation

Upirova A.A., Head of the Department, Krasnoyarsk State N.S. Karpovich Emergency Hospital, Krasnoyarsk, Russian Federation

Potkina N.K., Research Associate, Krasnoyarsk State V.F. Voyno-Yasenetsky Medical University; Russian-Japanese Center of Microbiology, Metagenomics and Infectious Diseases, Krasnoyarsk, Russian Federation

Yamamoto Tatsuo, PhD (Medicine), Professor, Director, International Medical Education and Research Center, Niigata, Japan

Поступила 31.12.2018

Отправлена на доработку 04.01.2019

Принята к печати 04.03.2019

Received 31.12.2018

Revision received 04.01.2019

Accepted 04.03.2019