

На правах рукописи

Крыжановская Ольга Андреевна

Чувствительность к антибиотикам и механизмы устойчивости к карбапенемам
Acinetobacter baumannii, *Pseudomonas aeruginosa* и *Klebsiella pneumoniae*,
выделенных у детей в отделениях реанимации и интенсивной терапии

03.02.03 - Микробиология

АВТОРЕФЕРАТ

Диссертации на соискание ученой степени

кандидата медицинских наук

Москва - 2016

Работа выполнена в Федеральном государственном автономном учреждении «Научный центр здоровья детей» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Научный руководитель:

доктор медицинских наук,
профессор РАН

Маянский Николай Андреевич

Официальные оппоненты:

Попов Дмитрий Александрович – доктор медицинских наук, Федеральное Государственное Бюджетное Учреждение «Научный центр сердечно-сосудистой хирургии им. А.Н. Бакулева» Министерства здравоохранения Российской Федерации, заведующий лабораторией клинической микробиологии и антимикробной терапии

Черенькая Татьяна Витальевна – кандидат медицинских наук, Государственное бюджетное учреждение здравоохранения города Москвы «Научно-исследовательский институт скорой помощи им. Н.В. Склифосовского Департамента здравоохранения города Москвы», заведующая научной лабораторией клинической микробиологии

Ведущее учреждение: Федеральное государственное бюджетное учреждение «Приволжский федеральный медицинский исследовательский центр» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Защита состоится «__» _____ 2016 г. в 10.00 часов на заседании диссертационного совета Д 208.046.01 в Федеральном бюджетном учреждении науки «Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н. Габричевского» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека по адресу: 125212, г. Москва, ул. Адмирала Макарова, д. 10.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке и на сайте Федерального бюджетного учреждения науки «Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н. Габричевского» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека по адресу: 125212, Москва, ул. Адмирала Макарова, 10, <http://www.gabrich.ru>

Автореферат разослан “__” _____ 2016 г.

Ученый секретарь диссертационного совета
доктор медицинских наук, доцент

Борисова Ольга Юрьевна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования

С начала 1990-х гг. наблюдается неуклонный рост числа инфекций, связанных с грамотрицательными возбудителями, которые обладают множественной устойчивостью к антибиотикам (Edelstein M., 2003; Прямчук С.Д., 2010; Агеевец В.А., 2013, 2015). В структуре грамотрицательных бактерий – возбудителей внутрибольничных инфекций (инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи (Покровский В.И., 2011)) – видное место занимают представители семейства *Enterobacteriaceae* (в частности, *Klebsiella pneumoniae*) и группы неферментирующих глюкозу бактерий (НФГБ), включая, *Acinetobacter baumannii* и *Pseudomonas aeruginosa* (Tomaras A.P., 2003; Vijayakanthi N., 2013; Сухорукова М.В., 2014). По данным многоцентрового эпидемиологического исследования возбудителей нозокомиальных инфекций МАРАФОН 2011-2012 гг., охватившего 25 стационаров 18 городов России, *A. baumannii*, *P. aeruginosa* и *K. pneumoniae* суммарно составляют более 50% в структуре возбудителей внутрибольничных инфекций (Сухорукова М.В., 2014).

Данные возбудители обладают свойством приобретать устойчивость к антимикробным препаратам, которое наиболее ярко проявляется в условиях отделений реанимации и интенсивной терапии, где большинство пациентов получают антибиотики широкого спектра действия или их комбинацию, что оказывает селективное воздействие и способствует отбору резистентных форм (Яковлев С.В., 2002; Сидоренко С.В., 2004; Козлов Р.С., 2007; Bush K., 2010; Агеевец В.А., 2013, 2015; Лукас Р.Дж., 2015).

В связи с ростом устойчивости *K. pneumoniae* к антимикробным препаратам, а также распространением *A. baumannii* и *P. aeruginosa*, обладающих природно сниженной чувствительностью к различным группам антибиотиков, в последние годы увеличилось применение резервной группы β -лактамов – карбапенемов (Сидоренко С.В., 2004; Bush K., 2010, Лукас Р.Дж., 2015). Вовлечение карбапенемов в рутинную клиническую практику сопровождалось ростом резистентности возбудителей к этой группе антимикробных препаратов.

Описаны различные механизмы, опосредующие устойчивость к карбапенемам. Однако, наибольшую тревогу вызывают карбапенемазы. Это группа ферментов, которая инактивирует β -лактамные антибиотики и включает сериновые протеазы (например, КРС- и ОХА-подобные ферменты), а также металло- β -лактамазы (МБЛ), такие как IMP, NDM, VIM (Tzouveleki, L.S., 2012). Карбапенемазы из группы МБЛ способны разрушать все β -лактамные антибиотики (за исключением монобактамов), что резко ограничивает спектр потенциально эффективных антимикробных препаратов.

Проблемы антибиотикорезистентности и ее механизмов в педиатрической практике требуют особого внимания по ряду причин. У детей в 2 раза чаще, по сравнению со взрослыми, встречается бактериемия (Oteo J., 2012, 2013). Кроме того, профили чувствительности возбудителей инфекции, выделенных у детей разных

возрастных групп и взрослых, могут различаться (Higgins, P.G., 2010), что предполагает отдельные подходы к антибактериальной терапии у педиатрических пациентов. Ряд эффективных антимикробных препаратов не разрешен к применению в педиатрической практике, или данные об их эффективности у детей ограничены (фторхинолоны, фосфомицин, тигециклин, полимиксины) (Агеев В.А., 2013; Сухорукова М.В., 2014).

Таким образом, все это диктует необходимость выверенного подхода к выбору и применению антибиотиков в педиатрической практике с учетом знаний о структуре микробиоты у детей и спектре ее чувствительности к антибиотикам, а также разработки и внедрения мер по контролю за распространением антибиотикорезистентности, что будет способствовать улучшению лечения инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи, у пациентов отделений реанимации и интенсивной терапии.

Степень разработанности темы исследования

Впервые устойчивость к антибиотикам цефалоспоринового ряда у энтеробактерий была описана в 1983 году. С течением времени наблюдался рост числа штаммов бактерий, продуцирующих β -лактамазы расширенного спектра. В связи с этим примерно в это же время в практику был внедрен первый антимикробный препарат группы карбапенемов – имипенем. В конце 1980-х гг. устойчивость к нему уже была выявлена у *P. aeruginosa*. Карбапенемаза группы IMP, определяющая устойчивость ко всем β -лактамным антибиотикам, была выявлена в Японии в 1988, в 2000 г. – группы VIM во Франции (Агеев В.А., 2015).

Согласно данным многоцентровых исследований (Козлов Р.С., 2007; Сухорукова М.В., 2014) в России, начиная с 2002 года, происходила смена состава возбудителей нозокомиальной инфекции в структуре микробиоты у взрослых пациентов, находящихся в отделениях реанимации и интенсивной терапии, и формировалась устойчивость к различным группам антибиотиков. Стало ясно, что структура возбудителей нозокомиальной инфекции постоянно меняется, поэтому данные о преобладании того или иного микроорганизма и механизма устойчивости должны все время обновляться. В начале 2000-х годов были опубликованы рекомендации по фенотипическому выявлению механизмов устойчивости к антимикробным препаратам, однако все большую актуальность приобретают молекулярно-генетические методы (Breidenstein E.V.M., 2001; Сидоренко С.В., 2004, Страчунский Л.С., 2007; Шевченко О.В., 2007; Lister P.D., 2009; Edelstein M.V., 2013).

На сегодняшний день в литературе описаны многоцентровые исследования по России (Козлов Р.С., 2007; Сухорукова М.В., 2014) и по отдельным городам (Агеев В.А., 2013) среди штаммов, выделенных у взрослых пациентов, редко встречаются исследования по определенному стационару, лечебно-профилактической организации, а также среди педиатрических учреждений. Особое значение имеет изучение распространенности возбудителей нозокомиальных инфекций в педиатрических отделениях реанимации и интенсивной терапии и определение молекулярных механизмов резистентности в связи с ограниченностью выбора антибиотиков в детской популяции.

Цель исследования - определить профиль чувствительности к различным группам антибиотиков у штаммов *A. baumannii*, *P. aeruginosa* и *K. pneumoniae*, выделенных у детей в отделении реанимации и интенсивной терапии, а также раскрыть механизмы устойчивости к карбапенемам для улучшения эмпирической антимикробной терапии.

Задачи исследования:

1. Изучить видовой состав микробиоты у детей в отделениях реанимации и интенсивной терапии и оценить вклад *A. baumannii*, *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae* в ее структуру.
2. Определить профиль чувствительности штаммов *A. baumannii*, *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae* к основным группам антимикробных препаратов, включая карбапенемы.
3. Оценить распространенность генов карбапенемаз среди карбапенем-нечувствительных изолятов *A. baumannii* и дать их клональную характеристику путем мультилокусного сиквенс-типирования.
4. Проанализировать роль металло- β -лактамаз и эффлюкс-механизмов в формировании устойчивости к карбапенемам у штаммов *P. aeruginosa*.
5. Описать молекулярные механизмы устойчивости к β -лактамам антибиотикам у чувствительных и устойчивых к карбапенемам изолятов *K. pneumoniae*.

Научная новизна

Охарактеризована структура микробиоты у детей двух педиатрических отделений реанимации и интенсивной терапии г. Москвы и получены новые данные о частоте выделения штаммов *A. baumannii*, *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae*, которая составила 14%, 24% и 41% в общей структуре, соответственно. Впервые установлено, что возбудители из группы неферментирующих глюкозу бактерий присутствовали преимущественно (*Stenotrophomonas maltophilia*, *Burkholderia spp.*) или исключительно (*Elizabethkingia spp.*, *Ralstonia spp.*) в клинически значимых локусах (трахея, стома/рана, кровь, моча), что может свидетельствовать об их этиологическом значении при внутрибольничной инфекции. В локусах мониторинга (зев, анус) чаще встречались штаммы *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa*, примерно с одинаковой частотой в этих локусах обнаруживали штаммы *A. baumannii*.

Получены новые данные о распространенности устойчивости к β -лактамам антибиотикам, в т.ч. карбапенемам, у изолятов *A. baumannii*, *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae*, выделенных у детей в отделениях реанимации и интенсивной терапии. Доля штаммов *A. baumannii*, нечувствительных к карбапенемам, варьировала от 61 до 75%. Частота устойчивости штаммов *P. aeruginosa* к антисинегнойным цефалоспорином составила 46%-64%, к карбапенемам 55%-63%. Диапазон устойчивости к цефалоспорином среди изолятов *K. pneumoniae* составил 81%-90%, к карбапенемам – 24%-28%. Наибольшую чувствительность изученные возбудители сохраняли к колистину.

Впервые показано, что ведущим молекулярным механизмом резистентности у штаммов *A. baumannii*, выделенных у детей в отделениях реанимации и интенсивной терапии, к карбапенемам является карбапенемаза ОХА-40, которая была обнаружена у 97% карбапенемнечувствительных изолятов. Впервые охарактеризована клональная структура штаммов *A. baumannii* с помощью метода мультилокусного сиквенс-типирования и установлено, что большинство (95%) из них относится к двум клональным комплексам (СС92, СС944), которые распространены во всем мире. Впервые были описаны и депонированы в базе данных (<http://pubmlst.org/abaumannii>) 6 новых сиквенс-типов *A. baumannii* (1097, 1098, 1099, 1103, 1104, 1106, 1197).

Впервые установлено, что ведущим механизмом устойчивости к карбапенемам у изолятов *P. aeruginosa*, выделенных у детей в отделениях реанимации и интенсивной терапии, является сочетание продукции карбапенемаз и эффлюкс-механизма (75%); карбапенемаза VIM была обнаружена у 93% карбапенемнечувствительных изолятов с фенотипической метало- β -лактамазной активностью.

Впервые установлено сочетание механизмов устойчивости к β -лактамам антибиотикам у изолятов *K. pneumoniae*, выделенных у детей в отделениях реанимации и интенсивной терапии. Частота носительства двух групп β -лактамаз расширенного спектра (СТХ-М; TEM) и карбапенемазы ОХА-48 составила 68% среди карбапенемнечувствительных штаммов *K. pneumoniae*.

Теоретическая и практическая значимость работы

Новые данные о частоте встречаемости грамотрицательных микроорганизмов расширяют представления о современном разнообразии микробиоты у детей в отделениях реанимации и интенсивной терапии. Знания о распространенности устойчивых к антимикробным препаратам штаммов *A. baumannii*, *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae* будут способствовать совершенствованию антибактериальной терапии у детей в отделениях реанимации и интенсивной терапии и организации локальных противоэпидемических мероприятий.

Полученные данные о сиквенс-типах *A. baumannii* формируют представления о клональной структуре нозокомиальных штаммов и их генетической гетерогенности, а также обосновывают необходимость определения молекулярно-генетической природы устойчивости.

Результаты исследования устойчивости к антимикробным препаратам позволили выявить ключевые механизмы резистентности у штаммов *A. baumannii*, *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae*, выделенных у детей в отделениях реанимации и интенсивной терапии, к карбапенемам. Эти сведения будут востребованы для определения потенциальных мишеней при разработке новых способов преодоления карбапенемрезистентности.

Методические подходы для выявления антибиотикорезистентных штаммов с применением фенотипических (выявление эффлюкс-активности) и молекулярно-

генетических (полимеразная цепная реакция) исследований могут быть использованы при проведении мониторинга механизмов устойчивости микробиоты у детей в отделениях реанимации и интенсивной терапии, а также при разработке практических рекомендаций по его осуществлению.

Сформирован банк ДНК клинических штаммов *A. baumannii*, *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae*, выделенных у детей в отделениях реанимации и интенсивной терапии, а также компьютерная база данных, содержащая информацию о локусе выделения, профиле чувствительности к антимикробным препаратам, механизмах резистентности и принадлежности к сиквенс-типам. Указанная коллекция может быть использована в дальнейшей работе по изучению механизмов резистентности и клонального разнообразия возбудителей внутрибольничной инфекции.

Результаты исследований и разработок внедрены в научно-исследовательскую работу лаборатории микробиологии и лаборатории молекулярной генетики и клеточной биологии ФГАУ «НЦЗД» Минздрава России (акт внедрения от 30.08.2016), а также используются в качестве учебного материала на лекциях и занятиях для курсантов, проходящих обучение на кафедре педиатрии и детской ревматологии педиатрического факультета ФГБОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России по программам повышения квалификации по специальности «педиатрия» (акт внедрения от 29.08.2016).

Методология и методы исследования

Методология настоящего исследования спланирована согласно поставленной цели. Предметом исследования стали проблемы, связанные с распространением и антибиотикоустойчивостью клинических штаммов *A. baumannii*, *P. aeruginosa* и *K. pneumoniae*, выделенных у детей педиатрических отделений реанимации и интенсивной терапии в г. Москве.

Анализ научной литературы, посвященной проблеме, проведен на основе формально-логических методов исследования. Планирование и проведение исследований, направленных на решение поставленных задач, осуществлялось на основе общенаучных и специфических методов.

Штаммы микроорганизмов

За период 2012–2014 гг. было проанализировано 17302 образцов биологического материала, полученного от 935 детей, госпитализированных в ОРИТ. С целью выявления колонизации оппортунистическими патогенами у пациентов ОРИТ дважды в неделю осуществлялось взятие биологического материала из зева и ануса, которые мы обозначили, как локусы мониторинга (ЛМ). У пациентов с признаками вероятной бактериальной инфекции с диагностической целью материал получали из предполагаемого локуса инфекции, включая кровь, мочу, трахею, стому/рану. Данные локусы определили как клинически значимые локусы (КЗЛ). В исследование были включены штаммы *A. baumannii*, *P. aeruginosa* и *K. pneumoniae*, выделенные в лаборатории микробиологии ФГАУ «НЦЗД» Минздрава России.

Расчет общей распространенности основных выделенных видов микроорганизмов и структуры микробиоты по локусам.

Общую распространенность конкретного вида возбудителя рассчитывали как отношение числа недублирующихся изолятов данного вида к общему числу пациентов и выражали в процентах. При расчете распространенности учитывали как КЗЛ, так и ЛМ. При расчете структуры распространенности основных возбудителей по локусам выделения учитывали все недублирующиеся изоляты, выделенные у одного пациента из разных локусов.

Микробиологические методы исследования

Посев полученных образцов производили на питательные среды: кровяной агар (BioRad, США), среду Эндо (ГНЦ ПМБ, пос. Оболенск), желточно-солевой агар (ЖСА) (Biorad, США) и Uri-select (Biorad, США). Посевы инкубировали в термостате при температуре 37°C в течение 24 - 48 ч. Все образцы крови, инокулированные во флаконы для гемокультивирования, инкубировали в анализаторе гемокультур ВАСТЕС 9050 (Becton Dickinson). Видовую идентификацию полученных микроорганизмов проводили на масс-спектрометре MALDI-TOF-MS Biotyper MicroFlex (Bruker, Германия) и в баканализаторе VITEK (BioMerieux, Франция).

Для определения чувствительности к АМП использовали три метода: диско-диффузионный (диски Bio-Rad, США), метод E-тестов (BioMerieux, Франция) на среде Мюллера-Хинтона (Biorad, США) и автоматизированный на баканализаторе VITEK 2 Compact (BioMerieux, Франция). Метод E-тестов использовали для определения МПК имипенема, меропенема, колистина и тигециклина. Результаты интерпретировали, руководствуясь оценочными критериями (EUCAST 2015, МУК 4.2.1890-04 «Определение чувствительности микроорганизмов к антибиотическим препаратам»). При описании результатов тестирования антибиотикорезистентности использовали терминологию «нечувствительные» и «чувствительные» бактерии. Нечувствительными считали штаммы с МПК слабочувствительных и резистентных категорий; остальные штаммы относили к чувствительным.

Молекулярно-генетические методы исследования

Для выделения ДНК использовали суточную культуру, полученную при посеве на плотные питательные среды, указанные выше. Бактериальную ДНК выделяли с помощью коммерческих наборов «ГК-экспресс» (ЦНИИЭ Роспотребнадзора) согласно инструкции производителя. Полученные образцы хранили до использования при -20°C.

Для выявления генов БЛРС и карбапенемаз использовали метод ПЦР. Выявление генов БЛРС (*bla*_{CTX-M} и *bla*_{TEM}) выявляли с помощью праймеров, предложенных Edelstein M., et all (2003). Выявление генов, кодирующих продукцию карбапенемаз, проводили с использованием наборов с гибридационно-флуоресцентной детекцией «АмплиСенс® MDR MBL-FL» (IMP, NDM, VIM),

«АмплиСенс[®] MDR КРС/ОХА-48-FL» (КРС, ОХА-48), «АмплиСенс MDR Аб-ОХА-FL» (ОХА-23, ОХА-40, ОХА-58), производства ЦНИИЭ Роспотребнадзора.

Для генотипирования штаммов *A. baumannii* использовали метод мультилокусного сиквенс-типирования (МЛСТ). Подготовка матриц для секвенирования включала амплификацию внутренних фрагментов генов «домашнего хозяйства»: *gltA*, *gyrB*, *gdhB*, *recA*, *cpn60*, *gpi*, *rpoD*. Праймеры и условия амплификации приведены на сайте www.pubmlst.org. Секвенирование проводили с использованием наборов реагентов и оборудования фирмы Applied Biosystem (США) по методике, описанной производителем.

Анализ результатов секвенирования генов «домашнего хозяйства» с определением сиквенс-типов (ST) проводили с использованием базы данных МЛСТ (<http://pubmlst.org/abaumannii/>). ST определяли на основании комбинации аллелей. Штаммы, находящиеся в базе данных, сгруппированы в клональные комплексы на основании кластеризации методом eBURST (<http://eburst.mlst.net/>) для бактерий вида *A. baumannii*.

Выявление МБЛ и активности эффлюкс-систем у изолятов *P. aeruginosa*

Наличие МБЛ определяли с помощью подавления МБЛ активности этилендиаминтетрауксусной кислотой (ЭДТА) – методом двойных дисков. (Шевченко О.В., 2007). Для оценки активности эффлюкс-систем штаммы *P. aeruginosa* засеивали на плотную питательную среду с последующей инкубацией 37⁰С в течение 24 часов. Далее получали бактериальную суспензию мутностью 0,5 по МакФарланду в бульоне Мюллера-Хинтона (Biograd, США). Для всех штаммов были определены минимальные подавляющие концентрации (МПК) меропенема в диапазоне двукратных разведений, содержащих от 0,5 до 8192 мкг/мл этого антибиотика. Критерий МПК₅₀ подразумевал значение МПК для 50% исследованных штаммов, МПК₉₀ – для 90% штаммов.

Для выявления эффлюкс активности в лунки 96-луночного планшета вносили полученную бактериальную суспензию *P. aeruginosa*, меропенем в указанных выше разведениях и карбонил-цианид-3-хлорфенилгидразона (СССР - от англ. «carbonyl cyanide 3-chlorophenylhydrazone») в конечной концентрации 25 мкг/мл. Каждый штамм исследовали трехкратно в двух повторах. В качестве контроля использовали пробы без добавления СССР. Инкубировали планшеты в термостате 24 часа при 37⁰С. Далее оценивали активность эффлюкса как отношение МПК меропенема в культурах без СССР к МПК при его добавлении (кратность уменьшения МПК, КУ МПК). КУ МПК \geq 4 расценивали как критерий эффлюкса, значимого для формирования карбапенемрезистентности.

Статистические методы

Статистическую обработку данных проводили с помощью программ SPSS 20.0 (SPSS Statistics, США) и Excel. Для сравнения долей использовали z-критерий. Сравнение МПК проводили с помощью критерия Краскелла-Уоллиса с последующим

попарным сравнением методом Манна-Уитни. Различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

Личное участие автора в получении результатов

Личное участие соискателя в получении результатов, изложенных в диссертации, заключалось в микробиологической части исследования (культуральный посев, идентификация микроорганизмов, определение резистентности АМП диско-диффузионным методом и методом Е-тестов, тесты на выявление МБЛ) в лаборатории микробиологии ФГАУ «НЦЗД» Минздрава России. Определение эффлюкс-активности культур *P. aeruginosa* проводилось совместно с ведущим научным сотрудником д.м.н. Чеботарем И.В. в лаборатории микробиологии ФГАУ «НЦЗД» Минздрава России. Молекулярно-генетическая часть исследования (выделение ДНК, постановка ПЦР, учет и интерпретация результатов ПЦР) осуществлялось автором совместно со старшим научным сотрудником к.м.н. Алябьевой Н.М. в лаборатории экспериментальной иммунологии и вирусологии ФГАУ «НЦЗД» Минздрава России. Секвенирование культур *A. baumannii* проводилось совместно с к.б.н. Пушковым А.А. в лаборатории молекулярной генетики и клеточной биологии ФГАУ «НЦЗД» Минздрава России.

Основные положения диссертации, выносимые на защиту

1. Проведенное исследование структуры видового состава микробиоты у детей в педиатрических ОРИТ показал преобладание грамотрицательных возбудителей, частота *A. baumannii*, *P. aeruginosa*, *K.pneumoniae* составила 14%, 24% и 41%, соответственно.
2. Устойчивость к карбапенемам у штаммов, выделенных у детей в ОРИТ, в основном обусловлена выработкой карбапенемаз. Карбапенем-нечувствительные изоляты продуцировали следующие карбапенемазы: *A. baumannii* - ОХА-40 (95%), *P. aeruginosa* – VIM (93%), *K. pneumoniae* – ОХА-48 (89%).
3. Клональная характеристика изолятов *A. baumannii* показала их принадлежность к двум глобальным клональным комплексам CC92 и CC944. Впервые описаны 6 ST, которые депонированы в базе данных (<http://pubmlst.org/abaumannii>).

Степень достоверности и апробация результатов исследования

О достоверности результатов работы свидетельствует использование сертифицированных микробиологических методов, которые характеризуются высокой чувствительностью и специфичностью. Проведен достаточный объем исследований, что позволило корректно осуществить статистическую обработку полученных данных.

Комплексное молекулярно-генетическое определение генов β-лактамаз позволило получить результаты, сопоставимые с традиционными микробиологическими методами оценки чувствительности, что свидетельствует о достоверности полученных результатов.

Диссертация апробирована на заседании лабораторного отдела НИИ Педиатрии ФГАУ «НЦЗД» Минздрава России (протокол № 3 от 09.06.2016 г.).

Материалы диссертации были доложены и обсуждены на XVII Конгрессе педиатров России, Москва, 2014; на XVI, XVII Международных конгрессах по антимикробной терапии МАКМАХ/ESCMID, Москва, 2014, 2015; на 26-ом Европейском конгрессах по клинической микробиологии и инфекционным заболеваниям (ЕССMID), Амстердам, 2016; XIX Кашкинские чтения, Санкт-Петербург, 2016.

Публикации. По теме диссертации опубликовано 10 печатных работ, из них 4 статьи опубликованы в рецензируемых научных изданиях, 6 – в материалах конференций.

Структура диссертации. Материалы диссертации изложены на 119 страницах машинописного текста, иллюстрированы 20 таблицами, 8 рисунками. Диссертация состоит из введения, обзора литературы, 4 глав описания результатов собственных исследований, заключения, выводов, практических рекомендаций, перспективных направлений дальнейшей разработки темы, списка сокращений и списка литературы. Библиографический указатель включает 132 источника литературы, из них 33 - отечественных и 99 - иностранных авторов.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

1. Видовой состав микробиоты у детей в ОРИТ

В период с 2012 по 2014 г. было проанализировано 17302 образцов биоматериала, полученных от 935 детей, находившихся в отделениях реанимации и интенсивной терапии двух детских стационаров города Москвы. При их сравнении были выявлены схожие тенденции по структуре микробиоты у детей и ее устойчивость к основным группам антибиотиков. Распространенность возбудителей с долей $\geq 1\%$ представлена в Таблице 1.

Помимо общей структуры микробиоты, мы оценили и сравнили распространенность различных возбудителей в клинически значимых локусах (КЗЛ: трахея, стома/рана, кровь, моча) и локусах мониторинга (ЛМ: зев, анус). Результаты данного анализа показаны в Таблице 2. Структура микробиоты КЗЛ и ЛМ различалась статистически значимо ($\chi^2 = 26,4$, $p < 0,001$). Большую долю в структуре возбудителей КЗЛ, по сравнению с ЛМ, имели *A. baumannii* (12% против 6%) и другие НФГБ (суммарно 13% против 5%).

Примечательно, что возбудители *S. maltophilia*, *Burkholderia spp.* присутствовали преимущественно, а *Elizabethkingia spp.*, *Ralstonia spp.* исключительно в КЗЛ, что свидетельствовало о развитии нозокомиальной инфекции.

Из числа клинически значимых изолятов *A. baumannii* большинство было выделено из трахеи (70%, 64/91), примерно в равных долях они встречались в крови (15%, 14/ 91) и стоме/ране (12%, 14/91).

Таблица 1

Общая структура микробиоты у детей в ОРИТ

Микроорганизм	n	%
<i>K. pneumoniae</i>	387	41
<i>E. coli</i>	254	27
<i>P. aeruginosa</i>	222	24
<i>E. faecium</i>	177	19
<i>Candida spp.</i>	170	18
<i>A. baumannii</i>	128	14
<i>S. maltophilia</i>	96	10
<i>S. aureus</i>	81	9
<i>Ralstonia spp.</i>	25	3
<i>Elizabethkingia spp.</i>	13	1
<i>Burkholderia spp.</i>	12	1

Примечание. В таблице представлены микроорганизмы с долей $\geq 1\%$. Долю рассчитывали как отношение числа недублирующихся штаммов каждого вида микроорганизма к числу пациентов (n=935). Сумма в «%» превышает 100, т.к. у 1 пациента могло быть выделено несколько видов микроорганизмов.

Реже всего ацинетобактерии выделялись из мочи – 2% (2/91). Изоляты *A. baumannii* из ЛМ чаще выделялись в зеве (70%, 58/ 82), по сравнению с анусом (29%, 24/82).

Наибольшее число изолятов *P. aeruginosa* в КЗЛ было выделено из трахеи (45% , 69/151). Из стомы/раны было выделено 28% (42/151), из мочи – 16% (25/151) изолятов *P. aeruginosa*. В крови было обнаружено 10% (15/151) штаммов этого возбудителя. *P. aeruginosa* присутствовала примерно в равных долях в обоих ЛМ, включая анус (52%, 101/344) и зев (47%, 92/344).

Изоляты *K. pneumoniae* из КЗЛ чаще обнаруживались в трахее (34%, 71/208) и в моче (28%, 58/208). Из крови было выделено 17% (35/208) штаммов, из стомы/раны – 21% (44/208) клинически значимых изолятов. В ЛМ *K. pneumoniae* чаще выявлялись в анусе (60%, 223/372), по сравнению с зевом (40%, 149/372).

Таблица 2

Структура микробиоты в клинически значимых локусах (КЗЛ) и локусах мониторинга (ЛМ)

Микроорганизм	Всего, n ^{a)}	Структура в локусах				p ^{б)}
		КЗЛ		ЛМ		
		n	%	n	%	
<i>K. pneumoniae</i>	580	208	28	372	29	0.63
<i>E. coli</i>	287	43	6	244	19	<0.001
<i>P. aeruginosa</i>	344	151	20	193	15	0.004
<i>E. faecium</i>	209	52	7	157	12	0.01
<i>Candida spp.</i>	200	66	9	134	10	0.46
<i>A. baumannii</i>	173	91	12	82	6	0.001
<i>S. aureus</i>	82	37	5	45	3	0.02
<i>Elizabethkingia spp.</i>	15	15	13	0	5	<0.001
<i>S. maltophilia</i>	97	40		57		
<i>Burkholderia spp.</i>	13	13		3		
<i>Ralstonia spp.</i>	25	25		0		
Всего изолятов	2025	739	36,5	1286	63,5	

Примечание. КЗЛ – трахея, стома/рана, моча, кровь; ЛМ – зев, анус; ^{a)} – Число *n* не совпадает с числом изолятов в Таблице 1, т.к. возбудитель одного вида мог присутствовать в разных локусах у одного и того же пациента; ^{б)} – Значимость различий между долями соответствующего микроорганизма в КЗЛ и ЛМ. Жирным шрифтом выделены значимые различия.

2. Определение чувствительности *A. baumannii*, *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae* к основным группам АМП

В настоящем разделе приведены результаты определения чувствительности указанных возбудителей к АМП, проведенного в ходе рутинной работы лаборатории с помощью диско-диффузионного метода или анализатора Vitek-2. При расчете доли учитывали только недублирующиеся изоляты одного вида, т.е. 1 пациент – 1 изолят конкретного вида.

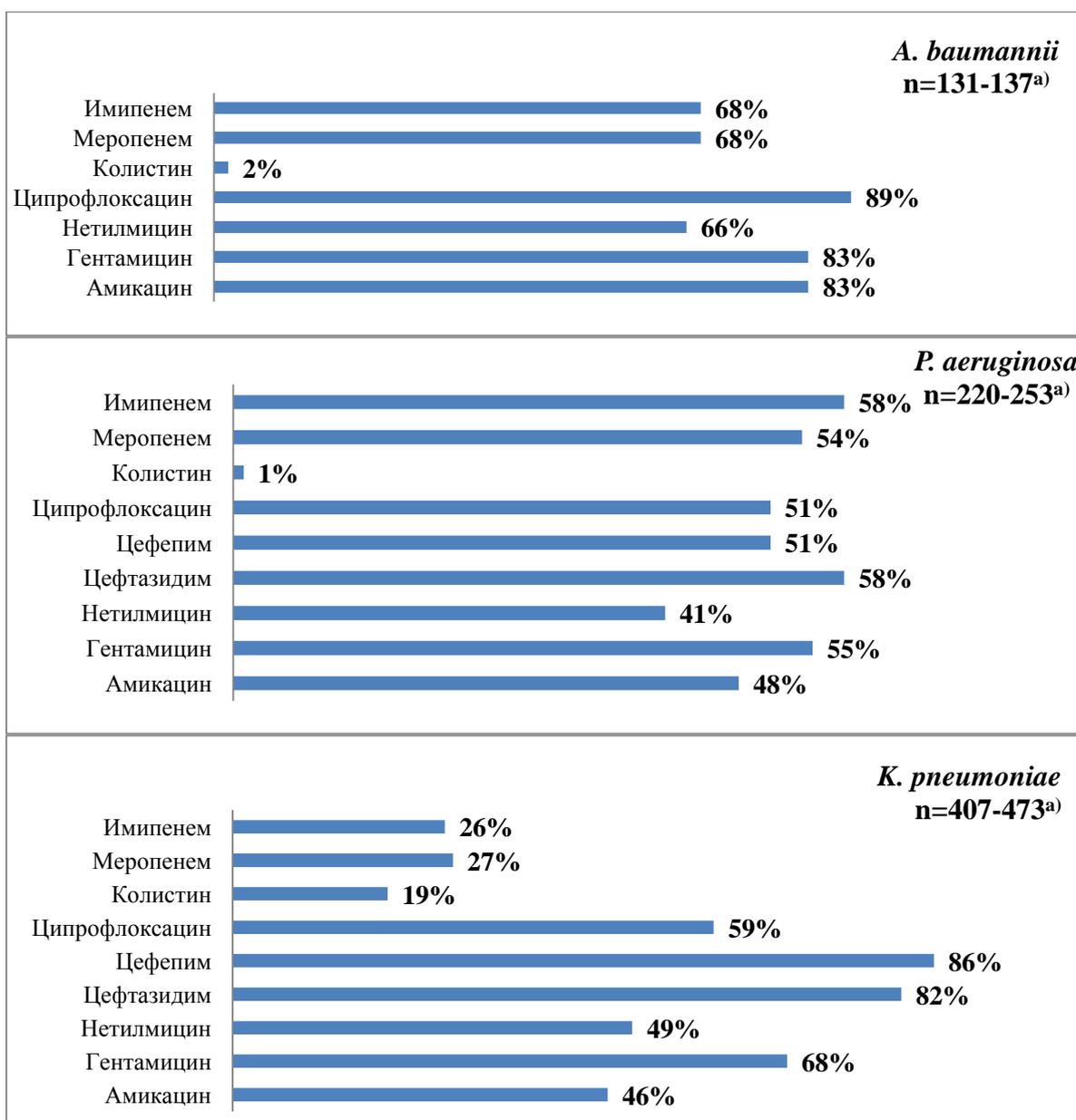


Рисунок 1. Доля (%) нечувствительных изолятов *A. baumannii*, *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae* к АМП.

Примечание. АМП - антимикробный препарат; НЧ – нечувствительный; КЗЛ – клинически значимые локусы; ЛМ – локусы мониторинга; ^{a)} Абсолютные числа «n» представлены в виде диапазона, т.к. результаты тестирования устойчивости конкретного АМП были доступны для разного числа изолятов.

Доля резистентных ацинетобактерий превышала 60% для всех АМП, за исключением колистина (2%) (Рисунок 1). Особенно высокой была резистентность к ципрофлоксацину (89%) и аминогликозидам (амикацин, гентамицин) (83%). К числу карбапенем–нечувствительных изолятов (карба-НЧ) относились 68% исследованных *A. baumannii*. Устойчивость у изолятов *P. aeruginosa* к различным группам АМП (за исключением колистина) варьировала от 41% до 58%.

Большинство изолятов *K. pneumoniae* сохраняли чувствительность к карбапенемам (доля резистентных штаммов 26-27%). В то же время, многие *K.*

pneumoniae (19%) были устойчивы к колистину, тогда как среди *A. baumannii* и *P. aeruginosa* лишь единичные изоляты обладали резистентностью к этому АМП (Рисунок 1).

3. Распространенность генов карбапенемаз и клональная характеристика карбапенем-нечувствительных изолятов *A. baumannii*

Для проведения данного этапа работы были отобраны 76 изолятов *A. baumannii*, включая 65 карбапенем-нечувствительных (карба-НЧ) и 11 карбапенем-чувствительных (карба-Ч) изолятов. Все карба-НЧ изоляты были устойчивы к ципрофлоксацину, большинство (78-88%) – к аминогликозидам (гентамицину, нетилмицину) (Таблица 3). Карба-Ч *A. baumannii* были менее устойчивы к ципрофлоксацину (64%) и нетилмицину (45%). Все изоляты, исследованные в данном разделе работы, были чувствительны к колистину.

Таблица 3

Устойчивость к антибиотикам и диапазон МПК *A. baumannii* (n=76)

АМП	НЧ, МПК > (мкг/мл)	Карба-Ч ^а , n= 11		Карба-НЧ ^а , n=65		p
		Доля НЧ (%)	Диапазон МПК (мкг/мл)	Доля НЧ (%)	Диапазон МПК (мкг/мл)	
Гентамицин	4	64	1-16	78	2-16	0.31
Нетилмицин	4	45	1- >32	88	1- >32	0.001
Ципрофлоксацин	1	64	0.25-4	100	4	< 0.001
Колистин	2	0	0.5	0	0.016-2	НТ
Меропенем ^а	2	0	0.125-1	100	>32	НТ
Имипенем ^а	2	0	0.125 - 1	100	>32	НТ

Примечание. НЧ – нечувствительный; НТ – не тестировали; p – значимость различий при сравнении долей нечувствительных к соответствующему антибиотику карба-Ч и карба-НЧ изолятов; ^а) Разделение на группы карба-Ч и карба-НЧ проводили по признаку нечувствительности к меропенему и/или имипенему.

Все штаммы были протестированы на наличие карбапенемаз групп OXA-23, OXA-40, OXA-58, IMP, NDM, VIM. У карба-Ч изолятов гены всех указанных карбапенемаз отсутствовали. В числе карба-НЧ *A. baumannii* не было обнаружено ни одного носителя генов МБЛ IMP, NDM, VIM, а наибольшую распространенность (97% изолятов, 63/65) имела карбапенемаза OXA-40. Еще у 3 изолятов (5%) определялся ген OXA-23. У 1 штамма было обнаружено сочетание OXA-40 и OXA-23.

Анализ клональной структуры *A. baumannii* был проведен с помощью метода мультилокусного сиквенс-типирования (МЛСТ) по схеме Oxford. Всего было выявлено 14 сиквенс-типов (ST), из них 6 сиквенс-типов были описаны впервые и депонированы

в базе данных <http://pubmlst.org/abaumannii>. Новые сиквенс-типы получили следующие номера: 1097, 1098, 1099, 1197, 1103, 1104, 1106. В таблице 4 представлены сводные данные по распределению исследованных изолятов по клональным комплексам и устойчивости к АМП.

Десять ST принадлежали к 2 глобальным клональным комплексам (CC) – CC92 и CC944, а оставшиеся 4 ST не имели определенной клональной принадлежности. CC92 был наиболее представительным (51/76, 67% от выборки в целом) и включал 7 ST. В его составе преобладали *A. baumannii* с ST348 (n=27), ST450 (n=10) и ST208 (n=8), которые суммарно составляли 59% от выборки в целом. Состав CC944 (21/76, 28% от выборки в целом) был менее разнообразен, включая 3 ST: ST944 (n=13), ST1104 (n=7) и ST1103 (n=1). (Таблица 4, Рисунок 2).

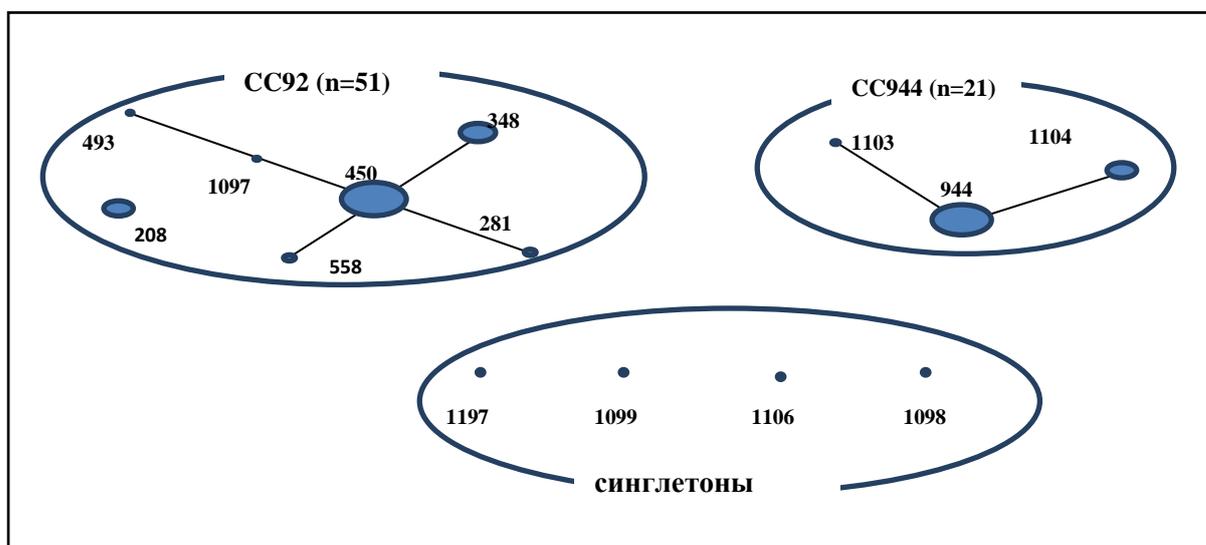


Рисунок 2. Популяционная структура *A. baumannii*, полученная с помощью МЛСТ-анализа.

Примечание. Показано распределение популяции исследованных штаммов, построенное с использованием eBURST-анализа. ST обозначены кружком с соответствующим номером. Размер кружка пропорционален числу изолятов, принадлежащих данному ST. Однолокусные варианты соединены линиями.

Таблица 4

Распределение по сиквенс-типам, клональным комплексам и устойчивости к АМП *A. baumannii*

СС	ST (n)	Меропенем	Имипенем	Колистин ^{б)}	Гентамицин	Нетилмицин	Ципрофлоксацин
		Диапазон МПК (мкг/мл) и доля НЧ изолятов			Доля (%) нечувствительных изолятов		
СС92 (n=51)	208 (8)	0,5 - >32 (37.5%)	1 - >32 (37.5%)	0,125 - 0,5	100	100	100
	281 (2)	>32 (100%)	>32 (100%)	0,016 - 0,25	100	50	100
	348 (27)	>32 (100%)	>32 (100%)	0,5	82	100	100
	450 (10)	1 - >32 (90%)	1 - >32 (90%)	0,094 - 2	100	90	100
	493 (1) ^{в)}	>32 (100%)	>32	0,19	100	100	100
	558 (2)	1 - >32 (50%)	1 - >32 (50%)	0,125 - 0,5	100	0	100
	1097 (1) ^{в)}	>32 (100%)	>32	0,125	100	100	100
СС944 (n=21)	944 (13)	>32 (100%)	>32 (100%)	0,125 - 2	85	100	100
	1103 (1)	>32 (100%)	>32	1,5	100	100	100
	1104 (7)	>32 (100%)	>32 (100%)	0,125 - 0,19	28	14	100
Нет (n=4)	(4) ^{а)}	0,125-1	0,25-0,5	0,016-0,064	0	0	0

Примечание.

^{а)} Группа из 4 ST без определенной клональной принадлежности: ST1106, ST1098, ST1099, ST2005; каждый ST представлен 1 изолятом.

Все изоляты были чувствительны к тестируемым АМП

^{б)} Все штаммы были чувствительны к колистину

^{в)} ST представлены 1 изолятом, нечувствительным к тестируемым АМП

Таким образом, основным механизмом, наделяющим исследованные *A. baumannii* устойчивостью к карбапенемам, является карбапенемаза ОХА-40. Карба-НЧ *A. baumannii* также отличаются выраженной устойчивостью к аминогликозидам и фторхинолонам, но сохраняют чувствительность к колистину. Устойчивые к АМП изоляты характеризуются высокой клональностью и принадлежат к двум глобально распространенным клональным комплексам СС92 и СС944. При этом внеклональные изоляты не обладают резистентностью.

4. Распространенность МБЛ и роль эффлюкс-механизмов в формировании устойчивости к карбапенемам у карба-НЧ *P. aeruginosa*

Для исследования механизмов формирования устойчивости к карбапенемам у *P. aeruginosa* были отобраны 77 карба-НЧ изолятов этого возбудителя. Подавляющее большинство исследованных изолятов обладало высокой МПК к меропенему и имипенему. У 79 % изолятов были отмечены максимальные МПК >32 мкг/мл. Все карба-НЧ штаммы оказались нечувствительны к исследованным цефалоспорином 3-4 поколения с МПК от 8 до > 64 мкг/мл (Таблица 5).

Таблица 5

Устойчивость к АМП и диапазон МПК у карба-НЧ *P. aeruginosa* (n=77)

АМП	НЧ, МПК > (мкг/мл)	Доля НЧ (%)	Диапазон МПК (мкг/мл)
Цефтазидим	8	100	16 - > 64
Цефепим	8	100	8 - > 64
Амикацин	8	61	2 - > 64
Гентамицин	4	52	1 – 16
Нетилмицин	4	43	1 – 32
Колистин	4	1	0.25 - 6
Меропенем	2	100	4 - >32
Имипенем ^а	4	99	2 - >32

Примечание. НЧ – нечувствительный; ^а) 1 изолят имел МПК=2 мкг/мл и относился к категории чувствительных.

Фенотипический тест на МБЛ-активность с помощью метода двойных дисков дал положительный результат у 54 из 77 (70%) карба-НЧ изолятов *P. aeruginosa*, а ген *bla_{VIM}* был обнаружен у 50 (65%) карба-НЧ изолятов *P. aeruginosa* (Таблица 6). Все VIM-положительные изоляты обладали также фенотипической МБЛ-активностью. Следовательно, у 50 из 54 (93%) МБЛ-положительных *P. aeruginosa* устойчивость к карбапенемам была ассоциирована с МБЛ из группы VIM. Таким образом, у 30-35% карба-НЧ *P. aeruginosa* устойчивость к карбапенемам может быть связана с наличием других механизмов резистентности, не связанным с гидролизом АМП.

Для определения вклада эффлюксных механизмов в уменьшение чувствительности к карбапенемам у карба-НЧ *P. aeruginosa* мы протестировали 53 таких изолята на модели

угнетения эффлюкса меропенема в присутствии ионофора СССР (Таблица 7). В этой модели МПК меропенема мы определяли методом серийных разведений. Значения МПК у исследованных штаммов варьировали в диапазоне от 8 до 4096 мкг/мл, МПК₅₀ составила 512 мкг/мл, МПК₉₀ – 2048 мкг/мл.

Таблица 6

Фенотипическая МБЛ-активность и носительство *bla_{VM}*

у карба-НЧ *P. aeruginosa*

Носительство <i>bla_{VM}</i>		Фенотипический тест на МБЛ-активность		Всего
		Положительный	Отрицательный	
<i>bla_{VM}</i>	Положительный ^{a)}	50	0	50 (65%)
	Отрицательный ^{a)}	4	23	27 (35%)
Всего		54 (70%)	23 (30%)	77 (100%)

Примечание. ^{a)} Не было обнаружено генов других β-лактамаз, включая IMP, NDM, OXA-23, 40, 58.

У 28 (53%) штаммов под влиянием СССР наблюдалось уменьшение МПК в 4 и более раз, что свидетельствовало о наличии активного эффлюкса (эффлюкс-положительные штаммы). У штаммов обнаружены различные сочетания МБЛ и их эффлюкс-активности (Таблица 7). Самым распространенным оказался вариант сочетания продукции МБЛ и активного эффлюкса: он встречался у 21 (40%) исследованных штаммов. Еще 15 (28%) штаммов обладали МБЛ, но не проявляли эффлюкс-активности. В 7 (13%) случаях регистрировался активный эффлюкс без продукции МБЛ.

Таблица 7

Активность эффлюкс-систем и значения МПК меропенема у МБЛ-позитивных и МБЛ-негативных штаммов *P. aeruginosa*

Активность эффлюкса ^{a)}	n (%) ^{a)}	МБЛ «+»		МБЛ «-»	
		n (%) ^{b)}	МПК меропенема (мкг/мл) ^{b)}	n (%) ^{b)}	МПК меропенема (мкг/мл) ^{b)}
Отсутствует (КУ МПК < 4)	25 (47%)	15/25 (60%)	256 (32; 1024)	10/25 (40%)	512 (512; 1024)
Умеренная (4 ≤ КУ МПК ≤ 16)	23 (43%)	17/23 (74%)	128 (64; 512)	6/23 (20%)	1024 (512; 1024)
Высокая (КУ МПК > 16)	5 (10%)	4/5 (80%)	2048 (1024; 2048)	1/5 (20%)	4096

Примечание. МБЛ – фенотипический тест на выявление металло-β-лактамаз; «+» – положительный результат, «-» - отрицательный результат; КУ МПК – коэффициент уменьшения МПК меропенема в присутствии СССР; ^{a)} – Доля изолятов в выборке в целом

(n=53); ^{б)} – Доля изолятов в соответствующей категории активности эффлюкса; ^{в)} – Медиана (P25;P75)

У 10 (19%) изолятов не было обнаружено ни МБЛ, ни активности эффлюкс-систем. Медианы МПК всех перечисленных групп не отличались между собой (во всех случаях $p > 0,05$): в этих группах не было обнаружено корреляций между значениями МПК и наличием эффлюкса либо продукцией МБЛ. У 25 штаммов (47%) эффлюкс меропенема отсутствовал; умеренный уровень наблюдался у 23 (43%); 5 штаммов (10%) с КУ МПК > 16 были отнесены к группе с высокой активностью эффлюкса, в которой КУ МПК варьировал в диапазоне от 64 до 512. Медианы МПК меропенема в группах с отсутствием эффлюкса или с его низким уровнем отличались между собой статистически незначимо ($p = 0,093$), но были значимо ниже значений МПК меропенема для группы штаммов с высокой активностью эффлюкса ($p = 0,022$).

Таким образом, данный раздел исследования выявил штаммы *P. aeruginosa* с высокими значениями МПК меропенема – до 4096 мкг/мл, показал значительную распространенность МБЛ-позитивных штаммов (70%), среди которых карбапенемазную активность определял фермент из группы VIM (93%). Доля эффлюкс-активных штаммов составила 53%. Продукция МБЛ и эффлюкс-активность встречались в различных сочетаниях. Было выявлено, что устойчивость к карбапенемам у исследованных изолятов определялась сочетанием продукции МБЛ и эффлюкс-активности в 40% (27/53).

5. Молекулярные механизмы устойчивости к β -лактамным антибиотикам *K.pneumoniae*

Для анализа были отобраны 57 карба-НЧ и 10 карба-Ч изолятов *K. pneumoniae*. Спектр устойчивости к антибиотикам и диапазоны МПК исследованных штаммов представлены в Таблице 8.

Все изученные штаммы оказались нечувствительны к исследованным цефалоспорином 3-4 поколения с МПК от 4 до > 64 мкг/мл. Доля штаммов, нечувствительных к аминогликозидам, варьировала от 50% до 84%. Более 90% карба-НЧ изолятов были нечувствительны к ципрофлоксацину и фосфомицину, причем распространенность устойчивых изолятов была значимо выше среди карба-НЧ *K. pneumoniae*, по сравнению с карба-Ч бактериями. Наибольшую чувствительность исследованные изоляты проявляли в отношении тигециклина и колистина. К тигециклину были чувствительны все карба-Ч изоляты (МПК ≤ 1 мкг/мл).

Все изоляты, включая карба-Ч бактерии, были протестированы на наличие генов БЛРС (СТХ-М, ТЕМ), а карба-НЧ изоляты дополнительно исследовали на гены карбапенемаз IMP, KPC, OXA-48, NDM, VIM. Носителем гена БЛРС $bla_{\text{СТХ-М}}$ были 100% (10/10) карба-Ч изолятов, причем у 6 из них он комбинировался с геном $bla_{\text{ТЕМ}}$ (Таблица 9).

Таблица 8

Устойчивость к антибиотикам и диапазон МПК штаммов *K. pneumoniae*

АМП	НЧ, МПК >, (мкг/мл)	Карба-Ч ^a , n=10		Карба-НЧ ^a , n=57		p
		Доля НЧ (%)	Диапазон МПК, мкг/мл	Доля НЧ (%)	Диапазон МПК, мкг/мл	
Цефотаксим	2	100	4 - > 64	100	> 64	1
Цефтазидим	1	100	4 - > 64	100	4 - > 64	1
Цефепим	1	100	4 - > 64	100	8 - > 64	1
Амикацин	8	50	2 - > 64	72	2 - > 64	0,16
Гентамицин	2	60	1 - 16	84	1 - > 64	0,08
Нетилмицин	2	70	1 - > 32	72	1 - > 32	0,9
Ципрофлоксацин	0,5	60	0,25 - 4	91	0,25 - 4	0,008
Фосфомицин	32	60	16 - > 256	96	16 - > 256	<0,001
Колистин	2	20	0,5 - 16	25	0,5 - 16	0,73
Тигециклин	1	0	0,19-1	25	0,25 - 6	0,075
Меропенем ^a	2	0	0,016 - 2	100	4 - > 32	НТ
Имипенем ^a	2	0	0,25 - 2	98	4 - > 32	НТ

Примечание. НЧ – нечувствительный; НТ – не тестировали; p – значимость различий при сравнении долей нечувствительных к соответствующему антибиотику карба-Ч и карба-НЧ изолятов; ^a Разделение на группы карба-Ч и карба-НЧ проводили по признаку нечувствительности к меропенему и/или имипенему.

Таблица 9

Распространенность генов резистентности и их комбинаций у штаммов *K. pneumoniae*

	Один ген		Комбинация генов			
	СТХ-М	ОХА-48	СТХ-М +ТЕМ	ТЕМ+ ОХА-48	СТХ-М +ОХА-48	СТХ-М +ТЕМ +ОХА-48
Карба-НЧ n=57	0	1 (2%)	6 (10%)	1 (2%)	10 (18%)	39 (68%)
Карба-Ч n=10	4 (40%)	НТ	6 (60%)	НТ	НТ	НТ

Примечание. НТ – не тестировали (гены карбапенемазы определяли только у карба-НЧ изолятов)

У 89% (51/57) карба-НЧ изолятов был выявлен ген карбапенемазы $bla_{\text{ОХА-48}}$, причем только у 1 штамма этот ген присутствовал в качестве единственной детерминанты резистентности, а в остальных случаях он сочетался с генами $bla_{\text{СТХ-М}}$ и/или $bla_{\text{ТЕМ}}$ (Таблица 9). Носителями $bla_{\text{СТХ-М}}$ были 97% (55/57) карба-НЧ изолятов, ген $bla_{\text{ТЕМ}}$ встречался у 81% (46/57) карба-НЧ бактерий. Наиболее распространенной комбинацией детерминант резистентности стало сочетание гена карбапенемазы $bla_{\text{ОХА-48}}$ с двумя генами БЛРС $bla_{\text{СТХ-М}}$ и $bla_{\text{ТЕМ}}$, обнаруженное у 68% (39/57) карба-НЧ изолятов.

Таким образом, все изученные нами изоляты *K. pneumoniae* были нечувствительны к цефалоспорином 3-4 поколения, большинство изолятов обладали устойчивостью к аминогликозидам, фторхинолонам, фосфомицину. Низкая активность β -лактамов в отношении карба-Ч изолятов *K. pneumoniae* обусловлена продукцией β -лактамаз различных типов, включая СТХ-М, ТЕМ, а также их комбинаций (60%). Основным механизмом устойчивости к карбапенемам у карба-НЧ изолятов стала продукция карбапенемазы ОХА-48. Ее носителями были около 90% исследованных карба-НЧ штаммов, преимущественно в сочетании с БЛРС СТХ-М и/или ТЕМ (68%), что формировало фенотип множественной устойчивости к антибиотикам. Наибольшую активность в отношении карба-НЧ *K. pneumoniae* проявляли колистин и тигециклин; доля нечувствительных к ним изолятов не превышала 25%, а полностью резистентных к тигециклину клебсиелл (МПК>8 мкг/мл) мы не выявили.

Выводы:

1. В структуре микробиоты у пациентов педиатрических отделений реанимации и интенсивной терапии преобладают грамотрицательные возбудители; распространенность штаммов *A. baumannii*, *P. aeruginosa* и *K. pneumoniae* составляет 14%, 24% и 41%, соответственно.
2. Большинство (66-83%) изученных изолятов *A. baumannii* устойчивы к основным группам антимикробных препаратов, включая карбапенемы; среди штаммов *P. aeruginosa* широко распространены изоляты, нечувствительные к цефалоспорином (51-58%) и карбапенемам (54-58%); у штаммов *K. pneumoniae* устойчивость к цефалоспорином составила 82-86%, к карбапенемам – 26-27%. Наибольшую чувствительность изученные возбудители сохраняют к колистину: доля колистин-резистентных штаммов *A. baumannii*, *P. aeruginosa* и *K. pneumoniae* составляет 2%, 1% и 19%, соответственно.
3. У нечувствительных к карбапенемам штаммов *A. baumannii* ведущим механизмом устойчивости является наличие карбапенемазы ОХА-40, которая встречается у 97% штаммов; карбапенем-нечувствительные изоляты *A. baumannii* относятся к двум глобальным клоональным комплексам 92 и 944.
4. Карбапенем-нечувствительные штаммы *P. aeruginosa* обладают металло- β -лактамазной активностью (70% изолятов), которая в 93% случаев обусловлена наличием карбапенемазы из группы VIM, и осуществляют эффлюкс меропенема (53% изолятов).
5. Устойчивость к карбапенемам у штаммов *K. pneumoniae* ассоциируется с карбапенемазой ОХА-48 в 89% случаев; 68% карбапенем-нечувствительных изолятов этого возбудителя являются носителями комбинации генов трех детерминант резистентности *bla*_{ОХА-48}, *bla*_{СТХ-М}, *bla*_{ТЕМ}.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Для обеспечения адекватной эмпирической антибактериальной терапии внутрибольничных инфекций (ИСМП) целесообразно проводить локальный мониторинг устойчивости *A. baumannii*, *P. aeruginosa* и *K. pneumoniae* к антимикробным препаратам, в т.ч. карбапенемам.
2. Для выявления механизмов формирования устойчивости к β -лактамам антимикробным препаратам рекомендуется использовать молекулярные методы детекции детерминант резистентности.
3. Для мониторинга распространения нозокомиальных изолятов как на уровне стационара, так и на региональном уровне целесообразно использование мультилокусного сиквенс-типирования штаммов.

ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШЕЙ РАЗРАБОТКИ ТЕМЫ

1. Дальнейший мониторинг циркулирующих изолятов *A. baumannii*, *P. aeruginosa* и *K. pneumoniae* в педиатрических ОРИТ.
2. Продолжение исследований, направленных на выявление устойчивых изолятов *A. baumannii*, *P. aeruginosa* и *K. pneumoniae* и их клональную характеристику.
3. Продолжение изучения роли генов карбапенемаз и эффлюкс-активности в развитии устойчивости *A. baumannii*, *P. aeruginosa* и *K. pneumoniae* к карбапенемам.
4. Выявление других молекулярных механизмов резистентности к различным классам антибиотиков.

СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. **Крыжановская, О.А.** Мониторинг трахеального аспирата у детей с черепно-мозговой травмой в отделении реанимации и интенсивной терапии / **О.А. Крыжановская**, А.В. Лазарева, О.А. Пономаренко, Л.К. Катосова, О.В. Карасева, А.Л. Горелик // Материалы XVII конгресса педиатров России с международным участием «Актуальные проблемы педиатрии», 14-16 февраля 2014 г. Москва, 2014. Сборник материалов. С.531.
2. Лазарева, А.В. Антибиотикорезистентность микробиоты трахеального аспирата у детей в отделении реанимации и интенсивной терапии / А.В. Лазарева, **О.А. Крыжановская**, О.В. Карасева, А.Л. Горелик, О.А. Пономаренко, Л.К. Катосова // Материалы XVII конгресса педиатров России с международным участием «Актуальные проблемы педиатрии», 14-16 февраля 2014 г. Москва, 2014. Сборник материалов. С.533.
3. **Крыжановская, О.А.** Механизмы резистентности к карбапенемам у штаммов *Klebsiella pneumoniae* и *Acinetobacter baumannii*, выделенных от детей в отделениях реанимации и интенсивной терапии / **О.А. Крыжановская**, А.В. Лазарева, О.А. Пономаренко, О.В. Карасева, А.Л. Горелик, Л.К. Катосова // Материалы XVI международного конгресса по антимикробной терапии МАКМАХ/ESCMID, 21-23

- мая 2014 г. - Москва, 2014. - Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. - Т.16. - №2. - Приложение 1. - С.25.
4. Чеботарь, И.В. Отсутствие корреляции между антибиотикорезистентностью и способностью формировать биопленки у госпитальных штаммов *Acinetobacter baumannii*:/ И.В. Чеботарь И.В., А.В. Лазарева, **О.А. Крыжановская** // Материалы XVI Международного конгресса по антимикробной терапии МАКМАХ/ESCMID, 21-23 мая 2014 г. - Москва, 2014. - Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. - Т.16. -№2. - Приложение 1. - С.40.
 5. **Лазарева, А.В. Мониторинг и профиль антибиотикорезистентности микробиоты трахеального аспирата у детей с тяжелой черепно-мозговой травмой в отделении реанимации и интенсивной терапии** // А.В. Лазарева, Л.К. Катосова, **О.А. Крыжановская**, О.А. Пономаренко, О.В. Карасева, А.Л. Горелик, Н.А. Маянский // **Антибиотики и химиотерапия. – 2014. – Т.58. №7-8. – С.8-15.**
 6. **Лазарева, А.В. Распространенность металло-β-лактамаз и эффлюкс-механизмов у карбапенемрезистентных госпитальных штаммов *Pseudomonas aeruginosa*, выделенных в г. Москве в 2012-2015 гг.** / А.В. Лазарева, **О.А. Крыжановская**, Ю.А. Бочарова, И.В. Чеботарь, Н.А. Маянский // **Вестник Российской академии медицинских наук. – 2015. – Т.70. №6. – С.679-683.**
 7. **Лазарева, А.В. *Pseudomonas aeruginosa*: патогенность, патогенез и патология** / А.В. Лазарева, И.В. Чеботарь, **О.А. Крыжановская**, В.И. Чеботарь, Н.А. Маянский // **Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. 2015. Т.17. №3. С.170-186.**
 8. **Крыжановская, О.А.** Молекулярно-генетическая характеристика карбапенемрезистентных штаммов *Acinetobacter baumannii*, выделенных от больных ОРВИ трех стационаров г.Москвы / О.А. Крыжановская, Н.М. Алябьева, А.В. Лазарева, Н.А. Маянский // Материалы XVII международного конгресса по антимикробной терапии МАКМАХ/ESCMID, - 20-22 мая 2015 г. - Москва, 2015. - Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. - Т.17. - №2. - Приложение 1. - С.33.
 9. **Крыжановская, О.А.** Спектр антибиотикорезистентности и распространенности ОХА-карбапенемаз среди штаммов *Acinetobacter baumannii*, выделенных у пациентов хирургических и реанимационных отделений в Москве / **О.А.Крыжановская**, А.В. Лазарева, И.В. Чеботарь, Ю.А. Бочарова, Н.А. Маянский // **Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. – 2016. №1. – С.40-45.**
 10. **Kryzhanovskaya, O.** Molecular epidemiology of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* isolated in intensive care unit in Moscow, Russia / **O. Kryzhanovskaya**, N. Alyabieva, A. Lazareva, Yu. Bocharova, I. Chebotar, N. Mayanskiy // Abstract book. ESCMID-2016, Amsterdam. P.245.

Список сокращений

АМП – антимикробный препарат

БЛРС – β -лактамаза расширенного спектра

Карба-Ч – карбапенем-чувствительный

Карба-НЧ – карбапенем-нечувствительные

КЗЛ – клинически значимый локус

КУ – кратность уменьшения

ЛМ – локусы мониторинга

МБЛ – металло- β -лактамаза

МЛСТ – мультилокусное сиквенс-типирование

МПК – минимальная подавляющая концентрация

НЧ – нечувствительный;

ОРИТ – отделение реанимации и интенсивной терапии

ПЦР – полимеразная цепная реакция

ПЦР-РВ – полимеразная цепная реакция в режиме реального времени

СС – clonal complex (клональный комплекс)

СССР – от англ. «carbonyl cyanide 3-chlorophenylhydrazone» - карбонил-цианид-3-хлорфенилгидразон

ST – сиквенс-тип (sequence type)