

На правах рукописи

Лазарева Анна Валерьевна

Микробиологическая характеристика, механизмы устойчивости
к антибиотикам и молекулярная эпидемиология резистентных форм респираторных патогенов и
госпитальных грамотрицательных бактерий

03.02.03 - Микробиология

АВТОРЕФЕРАТ

Диссертации на соискание ученой степени
доктора медицинских наук

Москва 2019

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

Научный консультант:

доктор медицинских наук, профессор РАН

Маянский Николай Андреевич

Официальные оппоненты:

Клясова Галина Александровна – доктор медицинских наук, профессор, ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр гематологии» Минздрава России, лаборатория клинической бактериологии, микологии и антибиотической терапии, заведующая лабораторией;

Грубер Ирина Мироновна – доктор медицинских наук, профессор, ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова», лаборатория экспериментальной микробиологии, заведующая лабораторией;

Боронина Любовь Григорьевна – доктор медицинских наук, доцент, ФГБОУ ВО «Уральский государственный медицинский университет» Минздрава России, кафедра клинической лабораторной диагностики и бактериологии, профессор кафедры

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Приволжский исследовательский медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Защита состоится « ___ » _____ 2019 г. в ____ на заседании Диссертационного Совета Д 208.040.08 ФГАОУ ВО Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет) по адресу: 119992, г. Москва, ул. Трубецкая, д. 8, стр. 2.

С диссертацией можно ознакомиться в ЦНМБ ФГАОУ ВО Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет) по адресу: 119034, г. Москва, Zubovskiy bulvar, d. 37/1 и на сайте организации: www.sechenov.ru

Автореферат разослан « ___ » _____ 2019 г.

Ученый секретарь диссертационного совета

Доктор медицинских наук, профессор

Калужин Олег Витальевич

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы диссертационного исследования

Проблемы возникновения, распространения и эволюции резистентности микробов к антибиотикам находятся в центре внимания клинической микробиологии. Антибиотикорезистентность расценивают как одну из значимых угроз для человечества в XXI веке (Morrill H.J., Gniadek T.J., 2017). Это связано с тем, что на фоне замедления разработки новых антимикробных препаратов наблюдается повсеместный рост резистентности к ним и появление панрезистентных штаммов микробов (MacDougall C., 2008, Edelstein M.V., 2013). Серьезность сложившейся ситуации побудила Всемирную организацию здравоохранения (ВОЗ) составить перечень антибиотикорезистентных возбудителей, распространение которых вызывает наибольшую угрозу. В этот список, опубликованный в феврале 2017 г., вошли 12 видов бактерий, в том числе устойчивые к карбапенемам представители семейства *Enterobacteriaceae*, карбапенемрезистентные *Acinetobacter spp.* и *Pseudomonas spp.*, а также нечувствительные к пенициллину *Streptococcus pneumoniae*. Указанная инициатива ВОЗ имела целью привлечь внимание всех заинтересованных сторон, включая исследовательские организации, фармацевтические компании и правительственные структуры, к решению проблемы нарастающей резистентности микробов к антибиотикам, стимулировать разработку новых антибиотиков и развитие национальных программ по борьбе с антибиотикорезистентностью.

Российские данные свидетельствуют о том, что приведенный ВОЗ список патогенов актуален и для нашей страны. В этиологической структуре инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи (ИСМП), ведущая роль принадлежит грамотрицательным условно-патогенным бактериям, включая *Enterobacteriaceae* (в том числе *Klebsiella pneumoniae*), *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* и ряд других (Сухорукова М.В., 2017, Эйдельштейн М.В., 2017, Ageevets V.A., 2014). Госпитальные штаммы указанных микроорганизмов, как правило, обладают множественной лекарственной устойчивостью (МЛУ). Так, по данным многоцентрового исследования об устойчивости грамотрицательных патогенов МАРАФОН (2013-2014 гг.), МЛУ-фенотипом обладали 82,2% госпитальных изолятов *Enterobacteriaceae*, 64,4% – *A. baumannii* и 51,4% – *P. aeruginosa* (Сухорукова М.В., 2017, Эйдельштейн М.В., 2017).

Особую обеспокоенность вызывает неуклонно возрастающая устойчивость грамотрицательных бактерий к антибиотикам из группы карбапенемов. В течение длительного времени карбапенемы считались антибиотиками резерва, и большинство патогенов сохраняли к ним чувствительность (Прямчук С.Д., 2010, Edelstein M., 2003). Однако в последние годы их эффективность начала снижаться из-за распространения устойчивых штаммов, нередко

обладающих целым набором детерминант резистентности. Одним из движущих факторов нарастания резистентности стало увеличение объема потребления карбапенемов, в первую очередь в отделениях реанимации и интенсивной терапии (ОРИТ) (Агеев В.А., 2015). Главным механизмом резистентности к β -лактамам в целом и к карбапенемам в частности является продукция ферментов, гидролизующих антибиотики, таких как β -лактамазы расширенного спектра (БЛРС) и карбапенемазы (Pfeifer Y., 2010). Важную роль в формировании резистентности могут играть: эффлюкс антибиотика из бактериальной клетки, модификация мишени, а также нарушение проницаемости за счет изменения структуры пориновых каналов (Агеев В.А., 2015, Сидоренко С.В., 2004, Bush K., 2013, Лукас, P.J., 2015).

В распространении устойчивости к карбапенемам важную роль играют неферментирующие глюкозу грамотрицательные бактерии (НГОб) *A. baumannii* и *P. aeruginosa*. Как было указано выше, наряду с представителями семейства *Enterobacteriaceae* они приобрели заметный вес в структуре ИСМП. Природная устойчивость данных микроорганизмов ко многим классам антибиотиков объясняет трудности лечения инфекций, ассоциированных с ними, и обуславливает необходимость использования карбапенемов и их комбинаций с другими антибиотиками широкого спектра действия. Обладая пластичным геномом, *A. baumannii* и *P. aeruginosa* способны приобретать и интегрировать новые детерминанты резистентности, в частности, карбапенемазы, приобретая МЛУ-фенотип и становясь векторами диссеминации устойчивости к карбапенемам не только на уровне вида, но и между видами (Potron A., 2015). Это объясняет пристальное внимание к представителям *Acinetobacter* spp. и *Pseudomonas* spp. как микробиологов, так и специалистов в области эпидемиологии.

В педиатрической практике недостаточно изучена структура микробиоты детей в ОРИТ, ее чувствительность к антибиотикам, распространенность и механизмы резистентности. По данным S.C. Kehl, Dowzicky M.J., среди грамотрицательных патогенов, выделенных у детей с 2004 по 2012 годы, большинство бактерий семейства *Enterobacteriaceae* показали высокую чувствительность (>95%) к амикацину, тигециклину и карбапенемам (имипенем и меропенем). *A. baumannii* в 90% случаях проявлял чувствительность к миноциклину. Амикацин был наиболее активным против *P. aeruginosa* (90%). Штаммы *K. pneumoniae*, продуцирующие БЛРС, составили 24%. Статистически значимые различия в уровнях чувствительности отмечались между возрастными группами (1-5 лет, 6-12 лет или 13-17 лет). Значительные различия были зарегистрированы для всех патогенов при сравнении чувствительности в детской и взрослой популяциях. Так, амикацин, тигециклин и карбапенемы были активны *in vitro* против большинства грамположительных патогенов, выделенных у детей, а *A. baumannii* и *P. aeruginosa* были восприимчивы к меньшему количеству противомикробных препаратов (Kehl S.C., 2015). Следует отметить, что спектр применяемых антимикробных препаратов в педиатрической

практике имеет возрастные ограничения. Так, препаратами выбора при лечении инфекций, вызванных устойчивыми к карбапенемам бактериями, являются колистин, полимиксин В, фосфомицин, тигециклин, которые разрешены у детей только старшего возраста (Агеев В.А., 2013).

Развитие и совершенствование молекулярно-генетических технологий внесло существенный вклад в формирование базы знаний, касающихся механизмов устойчивости к антибиотикам, их эволюции и распространения. Применение секвенирования нуклеотидных последовательностей консервативных участков нескольких генов «домашнего хозяйства» (метод получил название мультилокусное сиквенс-типирование – МЛСТ) позволяет оценивать генетическую структуру бактериальной популяции. Базы данных МЛСТ, содержащие сведения о генотипах (сиквенс-типах – ST) бактерий, дают возможность выявлять местные особенности в контексте мировой информации. С появлением МЛСТ стало очевидно, что многие виды бактерий имеют клональную структуру, а некоторые клоны распространены повсеместно (Woodford N., 2011). Наибольшую опасность представляют международные клоны высокого эпидемического риска, обладающие МЛУ, которые способны быстро распространяться. В связи с этим мониторинг молекулярной эпидемиологии приоритетных патогенов является важным инструментом для контроля за распространением антибиотикорезистентности и разработки мер по ее профилактике.

Респираторные инфекции занимают ведущее место в структуре детской заболеваемости и являются наиболее частой причиной обращения за медицинской помощью, а также назначения антибиотиков (Баранов А.А., 2013). Большинство инфекций бактериальной этиологии связано с несколькими видами микроорганизмов и прежде всего со стрептококками, среди которых лидирующие позиции занимают *Streptococcus pneumoniae* (пневмококк) и *Streptococcus pyogenes* (пиогенный стрептококк, β-гемолитический стрептококк серогруппы А – БГСА) (Белошицкий Г. В., 2005, Катосова Л.К., 2005, Королева И.С., 2013, Сидоренко С.В., 2004). С пневмококками ассоциирован широкий спектр заболеваний, в первую очередь у детей, начиная от острого среднего отита и синусита, мукозальной пневмонии и заканчивая тяжелыми жизнеугрожающими инвазивными пневмококковыми инфекциями (ИПИ), включая бактериемию и менингит (Лазарева М.А., 2015, Esposito S., 2012, Vieira A.C., 2007). По данным ВОЗ, пневмококковые инфекции являются наиболее распространенной причиной детской заболеваемости и смертности в мире, вызывая около 0,7-1 млн смертей ежегодно у детей младше 5 лет (Баранов А.А., 2012). Пиогенный стрептококк является возбудителем инфекционных поражений верхних дыхательных путей (тонзиллофарингиты, отиты), кожи и мягких тканей (пиодермия, импетиго, рожистое воспаление, некротический фасциит) и служит причиной скарлатины, эндокардита, гнойного артрита, остеомиелита, омфалита и тяжелых генерализованных процессов с синдромом

токсического шока (Белов Б.С., 2013). Наблюдения последних лет показали возрастание (до 22%) роли *S. pyogenes* в этиологии острого отита у детей и особенно его тяжелых форм (до 47%) (Катосова Л.К., 2006, Маянский Н.А., 2013).

Для лечения стрептококковых инфекций в течение долгого времени с успехом применялись препараты пенициллинового ряда. Однако за последние 30 лет во всем мире наблюдается неблагоприятная тенденция возрастания устойчивости пневмококков к β -лактамам (*S. pyogenes* сохраняет полную чувствительность к пенициллину). В зависимости от региона, доля нечувствительных к пенициллину изолятов колеблется от 5 до 50%, а появление пневмококков, обладающих МЛУ, вызывает большую обеспокоенность (Алябьева Н.М., 2014, Калиногорская О.С., 2015, Козлов Р.С., 2010, Маянский Н.А., 2016, Linares J., 2010, Reinert R.R., 2009, Tomić V., 2014). В качестве альтернативы β -лактамам при респираторных инфекциях широкую популярность, в том числе в педиатрической практике, приобрели препараты из группы макролидных антибиотиков. Массовое использование макролидов, зачастую неадекватное и/или необоснованное, быстро привело к появлению устойчивых форм пневмококков и *S. pyogenes*. В настоящее время резистентность к макролидам у стрептококков в различных регионах мира варьирует от 5-10% до 100%, как это наблюдается в ряде стран Юго-Восточной Азии (Tomić V., 2014). Российские данные по стрептококковой резистентности имеют существенные региональные различия, что требует проведения регулярной оценки местных особенностей профиля антибиотикочувствительности и определения механизмов устойчивости.

Внедрение в практику вакцинации пневмококковыми конъюгированными вакцинами (ПКВ), охватывающими от 7 до 13 серотипов пневмококков, ожидаемо вывело из циркуляции бактерии, обладающие вакцинными серотипами (Richter S.S., 2013, Weinberger D. M., 2011). Вместе с этим резко снизилась заболеваемость ИПИ, которые были ассоциированы преимущественно с этими серотипами. В то же время, ПКВ оказали выраженное влияние на структуру пневмококковой популяции, в которой появились невакцинные серотипы и выросла доля ранее редких генетических линий (клонов). В первую очередь это относилось к не-ПКВ7 серотипу 19А и его клону ST320 (Azzari C., Goossens H., 2009). Сложившуюся ситуацию объясняли ПКВ-опосредованным феноменом замещения серотипов, то есть экспансией ранее существовавших минорных популяций пневмококка с не-ПКВ7 серотипами под давлением вакцины. Однако ПКВ7-независимое увеличение частоты 19А-пневмококков, наблюдавшееся в ряде стран, указывает на то, что на клональную эволюцию пневмококков может влиять не только тип капсульного полисахарида, но и другие бактериальные факторы, в частности, устойчивость к антибиотикам. Вакцинация ПКВ была введена в Российский национальный календарь профилактических прививок в 2014 году. В связи с этим мониторинг серотипового состава

пневмококковой популяции и отслеживание ее клональной структуры является актуальной задачей.

Актуальные данные о частоте и механизмах резистентности конкретного вида возбудителя инфекционного процесса лежат в основе эффективности антибактериальной терапии. В связи с этим изучение приоритетных патогенов с использованием микробиологических и молекулярно-генетических методов, нацеленное на определение распространенности и механизмов устойчивости к антибиотикам, характеристику генетической структуры бактериальных популяций, будет способствовать рациональному выбору антимикробных препаратов и разработке мер по преодолению устойчивости.

Степень разработанности темы диссертационного исследования

В отечественной и мировой литературе проблемам антибиотикорезистентности уделяется серьезное внимание. Так, недавно были опубликованы результаты многоцентрового исследования МАРАФОН, в котором представлены данные о динамике устойчивости грамотрицательных патогенов в 2013-2014 гг. в более чем 20 городах России (Эйдельштейн М.В., 2017, Сухорукова М.В., 2017). Отдельные публикации дополнительно описывают частоту антибиотикорезистентности в Санкт-Петербурге (Лазарева И.В., 2016, Агеевец, В.А., 2016) и Москве (Богомолова Н.С., 2010, Крыжановская О.А., 2016). Кроме того, исследуется эпидемиология механизмов резистентности, в первую очередь характеристики бета-лактамаз (Эйдельштейн М.В., 2017, Сухорукова М.В., 2017, Агеевец В.А., 2016, Крыжановская О.А., 2016, Лазарева И.В., 2016, Прямчук С.Д., 2010, Fursova N.K., 2015).

Изучение серотипового пейзажа пневмококков в России проводилось с конца 1980-х гг. (Катосова Л.К., 1990) и получило новый импульс накануне включения вакцинации ПКВ в Национальный календарь иммунизации. Был проведен ряд многоцентровых исследований, которые показали серологические особенности инвазивных изолятов пневмококков и штаммов, выделенных от носителей (Баранов А.А., 2012, Белошицкий Г.В., 2011, Козлов Р.С., 2010, Лобзин Ю.В., 2013).

Анализ резистентности стрептококков, в первую очередь пневмококков и *S. pyogenes*, стал темой ряда публикаций последнего десятилетия. Полученные данные свидетельствуют о выраженной региональной вариабельности уровня резистентности пневмококков к основным группам антибиотиков, используемых в педиатрической практике, но в целом отмечают неблагоприятную тенденцию нарастания устойчивости и расширения ее географии (Алябьева Н.М., 2014, Калиногорская О.С., 2015). Несмотря на то, что *S. pyogenes* сохраняет абсолютную чувствительность к β -лактамам антибиотикам, актуальной проблемой является появление у

этого патогена устойчивости к макролидам, которая в некоторых регионах мира превышает 30%. Исследования, проведенные в нашей стране, свидетельствуют об умеренной резистентности *S. pyogenes* к этой группе антибиотиков, однако регистрируется постепенное возрастание доли устойчивых к макролидам изолятов (Азовская О.В., 2012, Брико Н.И., 2015, Сидоренко С.В., 2008).

Методы молекулярной эпидемиологии приобретают все большую значимость для изучения бактериальных популяций. При помощи МЛСТ было показано, что многие из них построены по клональному принципу, и лишь в отдельных, немногочисленных клонах сосредоточивается основное число резистентных изолятов. Это оказалось справедливо для приоритетных патогенов, включая *Enterobacteriaceae spp.*, *A. baumannii*, *P. aeruginosa* и *S. pneumoniae*, а распространение некоторых успешных клонов с МЛУ-фенотипом носит глобальный характер (Woodford N., 2011, Linares J., 2010). В отечественной литературе эта тема получила освещение лишь в редких исследованиях (Агеевец В.А., 2016, Алябьева Н.М., 2014, Савинова Т. А., 2011, Edelstein M.V., 2013).

Цель исследования

Цель исследования – дать микробиологическую и молекулярно-генетическую характеристику внебольничных и госпитальных штаммов условно-патогенных бактерий, выделенных у детей, определить механизмы устойчивости к антибиотикам в этой группе микробов для обеспечения рационального применения антимикробных препаратов в педиатрической практике.

Задачи исследования

1. Охарактеризовать микробиоту клинически значимых локусов у детей, находящихся в реанимационных отделениях, и оценить ее динамику.
2. Дать характеристику антибиотикочувствительности госпитальных изолятов *A. baumannii*, *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa*.
3. Описать клональное разнообразие и молекулярно-генетические механизмы устойчивости к карбапенемам у карбапенемрезистентных изолятов *A. baumannii*, *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa*.
4. Определить спектр серотипов носоглоточных изолятов *S. pneumoniae*, выделенных у детей, и описать его динамику.
5. Оценить профиль чувствительности к антибиотикам и его динамику у изолятов *S. pneumoniae* и *S. pyogenes*.

6. Описать клональную эволюцию *S. pneumoniae* серотипов 14 и 19А в призме их чувствительности к антибиотикам.

Научная новизна

Определена динамика колонизации слизистых оболочек респираторного тракта у детей, находящихся на искусственной вентиляции легких. Впервые показано, что грамотрицательная госпитальная микробиота быстро колонизирует поступающих в ОРИТ пациентов и отличается высокой резистентностью к основным антибактериальным препаратам, в том числе карбапенемам. Доминирующими представителями микробиоты, выделенными из трахеального аспирата, были *A. baumannii*, *K. pneumoniae* и *P. aeruginosa*.

Впервые установлены доминантные клоны карбапенемрезистентных (карба-Р) *A. baumannii*, включавшие распространенный по всему миру $CC92^{Oxf}/CC2^{Pas}$ и $CC944^{Oxf}/ST78^{Pas}$, который может оказаться эндемичным не только для московского региона, но и для России в целом.

Впервые исследован биопленочный рост карба-Р *A. baumannii*. Было показано, что биопленочный потенциал выше у изолятов $CC92^{Oxf}$ по сравнению с $CC944^{Oxf}$ и другими клонами: высокой способностью к образованию биопленок обладало 95% исследованных представителей $CC92^{Oxf}$.

Получены новые данные о распространенности β -лактамаз у карба-Р изолятов *A. baumannii*. Установлено, что 82% изолятов являлись носителями карбапенемазы ОХА-72, а 15% изолятов – карбапенемазы ОХА-23. В популяции *A. baumannii* клона $CC944^{Oxf}$ наряду с ОХА-23-позитивными изолятами показано наличие носителей ОХА-72. Выявлено, что все $CC944^{Oxf}$ -изоляты *A. baumannii*, за исключением одного, обладали геном БЛРС *bla_{CTX-M-115}*.

Впервые проанализировано клональное разнообразие карба-Р изолятов *K. pneumoniae*. Установлено, что среди них доминировали два сиквенс-типа – ST395 (37%) и ST307 (24%), а основным механизмом устойчивости к карбапенемам была продукция карбапенемазы ОХА-48, которая в большинстве случаев сочеталась с наличием БЛРС.

Дополнены данные о популяционной структуре карба-Р *P. aeruginosa*. Выявлено преобладание трех генотипов из числа международных клонов высокого риска – ST654 (30%), ST235 (23%) и ST111 (13%). Более 50% карба-Р *P. aeruginosa* продуцировали VIM-подобную МБЛ.

На основе ретроспективного когортного исследования впервые была описана динамика серотипового состава и профиля чувствительности к антибиотикам носоглоточных изолятов *S. pneumoniae*. Впервые в России была полностью расшифрована композиция серотипов

серогруппы 6; было показано, что наряду с распространенными серотипами 6А и 6В в циркуляции присутствовали серотипы 6С (1,3%) и 6D (0,9%), не входящие в состав ПКВ13.

Получены новые сведения о молекулярных механизмах, определяющих рост резистентности *S. pneumoniae* и *S. pyogenes* к макролидам. Показано увеличение распространенности *ermB*-механизма устойчивости, придающего бактериям MLS_B-фенотип, т.е. перекрестную устойчивость к макролидам, линкозамидам и стрептограмину В.

Впервые получены данные о составе и эволюции клонального спектра изолятов *S. pneumoniae* серотипов 14 и 19А. Установлена связь между ростом резистентности пневмококков серотипа 14 к пенициллину и макролидам с клональными перестановками в циркулирующей популяции этих бактерий.

В международных базах данных МЛСТ *A. baumannii*, *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa* и *S. pneumoniae* аннотированы 43 новых сиквенс-типа и 14 новых аллелей генов «домашнего хозяйства».

Теоретическая и практическая значимость работы

Выявленные особенности микробиоты и знания о распространенности устойчивых к антибиотикам госпитальных изолятов грамотрицательных бактерий в педиатрических стационарах позволяют уточнить спектр препаратов, используемых для эмпирической антимикробной терапии, и будут способствовать повышению ее эффективности. Данные о динамике колонизации обосновывают внедрение мер инфекционного контроля при госпитализации пациентов в ОРИТ.

Полученные данные о генетических механизмах устойчивости к антибиотикам у ведущих госпитальных оппортунистических патогенов в педиатрических стационарах вносят фундаментальный вклад в понимание природы резистентности грамотрицательных бактерий, а также обосновывают значимость использования молекулярных методов для ее детекции.

Исследование популяционной структуры генотипов карба-Р изолятов основных возбудителей ИСМП при помощи метода МЛСТ позволило установить их взаимосвязь с международными клонами высокого эпидемического риска, а также выявить эндемичные клоны.

Сведения о современном спектре серотипов *S. pneumoniae* свидетельствуют о его высоком охвате существующими ПКВ, что позволяет прогнозировать эффективность серотипспецифической вакцинации.

Полученные данные о разнообразии генотипов *S. pneumoniae* и его динамике вскрывают закономерности эволюции генетической структуры пневмококковой популяции и указывают на то, что одним из важных факторов этой эволюции является устойчивость к антибиотикам.

Нарастание устойчивости *S. pneumoniae* к пенициллину и макролидам обосновывает необходимость динамического наблюдения за их популяцией. Доминирующий механизм резистентности *S. pneumoniae* и *S. pyogenes* к макролидам, а именно *ermB*-опосредованное метилирование мишени антибиотика, предопределяет перекрестную устойчивость ко всем макролидам, в том числе 16-членным, линкозамидам и стрептограмину В, что не позволяет рекомендовать указанные группы антибиотиков для эмпирической терапии инфекций в детской популяции. Сохранение на высоком уровне активности амоксициллина в отношении *S. pneumoniae* подтверждает обоснованность выбора данного препарата и его модификаций в качестве основы эмпирической терапии острых респираторных инфекций бактериальной этиологии в педиатрии.

По результатам исследования в международные базы данных внесены сведения о новых вариантах генотипов бактерий *A. baumannii*, *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa* и *S. pneumoniae*, которые будут способствовать осуществлению мониторинга за циркуляцией актуальных бактериальных возбудителей.

Результаты исследований и разработок внедрены в научно-исследовательскую работу лаборатории молекулярной генетики и клеточной биологии и лаборатории микробиологии ФГАУ «НМИЦ здоровья детей» Минздрава России, а также в материалы лекций по рациональной антибактериальной терапии у детей, и используются в учебной программе на кафедре педиатрии в ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет).

Методология и методы исследования

Методология настоящего исследования спланирована согласно поставленной цели. Предметом исследования стали проблемы, связанные с увеличением антибиотикоустойчивости клинических штаммов *A. baumannii*, *P. aeruginosa* и *K. pneumoniae*, выделенных у детей. Кроме того, были проанализированы серотипы и профиль чувствительности к антибиотикам штаммов *S. pneumoniae* и *S. pyogenes*, выделенных у детей 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.

Основные положения, выносимые на защиту

1. В педиатрических ОРИТ выявлено преобладание грамтрицательных возбудителей *A. baumannii*, *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae*.

2. Устойчивость к карбапенемам грамотрицательных бактерий преимущественно обусловлена выработкой карбапенемаз: *A. baumannii* – продукция ОХА-72, ОХА-23, *P. aeruginosa* – VIM, *K. pneumoniae* – ОХА-48.
3. Подавляющее большинство изолятов *A. baumannii* принадлежит к двум клональным линиям, CC92^{Oxf}/CC2^{Pas} и CC944^{Oxf}/ST78^{Pas}, представленным 14 различными Oxford-сиквенс-типами.
4. В популяционной структуре карба-Р изолятов *P. aeruginosa* лидировали представители пяти сиквенс-типов: ST111, ST235, ST446, ST654 и ST2592, которые суммарно составляли 78%.
5. Шесть ведущих педиатрических серотипов *S. pneumoniae*, включая серотипы 3, 6А, 6В, 14, 19F и 23F, суммарно составили 63%. Множественной устойчивостью к антибиотикам обладают 23% циркулирующих в Москве штаммов *S. pneumoniae*. Основная доля резистентных изолятов приходилась на пневмококки пяти наиболее распространенных серотипов (6А, 6В, 14, 19F и 23F) и серотипа 19А.
6. В последние годы произошло нарастание устойчивости стрептококков к макролидам: *S. pneumoniae* до 35-45%, *S. pyogenes* до 15%.

Личное участие автора в получении результатов

Личное участие соискателя в получении результатов, изложенных в диссертации, заключалось в проведении микробиологической части исследования (культуральный посев, идентификация микроорганизмов, определение резистентности к антибиотикам диско-диффузионным методом и методом Е-тестов, определение минимальных подавляющих концентраций меропенема и имипенема, фенотипические методы определения МБЛ у грамотрицательных бактерий и MLSв-фенотип у стрептококков) в лаборатории микробиологии ФГАУ «НМИЦ здоровья детей» 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. Алябевой Н.М. в лаборатории экспериментальной иммунологии и вирусологии ФГАУ «НМИЦ здоровья детей» Минздрава России. Секвенирование культур *A. baumannii*, *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae*, *S. pneumoniae* проводилось совместно с к.б.н. Пушковым А.А. в лаборатории молекулярной генетики и клеточной биологии ФГАУ «НМИЦ здоровья детей» Минздрава России. Выявление генов карбапенемаз проводилось совместно с к.б.н. Савиновой Т.А. (лаборатория молекулярной микробиологии ФГАУ «НМИЦ здоровья детей»

Минздрава России). Биоинформатическая обработка результатов (генетических исследований) проводилась совместно с Маянским Н.А. (ФГАУ «НМИЦ здоровья детей» Минздрава России), Карасевой О.В. «НИИ неотложной детской хирургии и травматологии» Департамента здравоохранения города Москвы).

Внедрение результатов в практику

Результаты исследований в качестве диагностических технологий внедрены в практическую работу подразделений ФГАУ «НМИЦ здоровья детей» Минздрава России, «НИИ неотложной детской хирургии и травматологии» Департамента здравоохранения города Москвы, ГБУЗ «Городская клиническая больница № 15 им. О.М. Филатова» Департамента здравоохранения города Москвы.

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 сопоставимые результаты с традиционными микробиологическими методами оценки чувствительности, что свидетельствует о достоверности полученных результатов.

Диссертация апробирована на заседании лабораторного отдела НИИ педиатрии ФГАУ «НМИЦ здоровья детей» Минздрава России (протокол № 4 от 22.12.2017г.).

Материалы диссертации были доложены и обсуждены на XVII, XVIII, XIX Конгрессе педиатров России, Москва, 2014, 2015, 2016; на XVI, XVII, XVIII, XIX, XX Международных конгрессах по антимикробной терапии МАКМАХ/ESCMID, Москва, 2014, 2015, 2016, 2017; на 26 (Амстердам, 2016), 27 (Вена, 2017), 28 (Мадрид, 2018) Европейском конгрессе по клинической микробиологии и инфекционным заболеваниям (ESCMID); на XIX, XX Кашкинских чтениях, Санкт-Петербург, 2016, 2017.

Соответствие диссертации паспорту научной специальности

Научные положения диссертации соответствуют формуле специальности 03.02.03 – «микробиология», области исследований «Морфология, физиология, биохимия и генетика микроорганизмов».

Публикации

Результаты проведенного диссертационного исследования в полном объеме изложены в 22 научных работах. В журналах из перечня рецензируемых научных изданий ВАК опубликовано 17 работ, из них 13 оригинальные статьи и 4 обзора литературы. В журналах реферируемых РИНЦ опубликовано 15 работ (11 оригинальные статьи и четыре обзора литературы). В журналах реферируемых базой данных Scopus и/или Web of Science 14 работ (12 оригинальных статей и два обзора литературы).

Объем и структура диссертации

Диссертация изложена на 233 страницах машинописного текста и состоит из введения, основной части (обзора литературы, описания материалов и методов исследования и 7 глав, отражающих результаты собственных исследований), заключения, выводов, практических рекомендаций, описания перспектив дальнейшей разработки темы, списка сокращений и условных обозначений, списка литературы. Диссертация иллюстрирована 40 таблицами и 12 рисунками. Библиографический указатель включает 391 источник литературы, в том числе 91 ссылка на отечественных авторов и 300 ссылок на зарубежных авторов.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

1. Материалы и методы исследования

Все образцы крови и ликвора инокулированные во флаконы для гемокультивирования, инкубировали в анализаторе гемокультур ВАСТЕС 9050 (Becton Dickinson, США) до момента регистрации микробного роста. В качестве методов идентификации изолятов применяли микроскопическое исследование, посев на селективные и хромогенные питательные среды, иммунохимические и биохимические методы, включая использование автоматического бактериологического анализатора Vitek 2 (BioMerieux, Франция).

Посевы биологического материала производили на питательные среды: кровяной агар и Uri-select agar (BioRad, США), затем инкубировали в термостате при температуре 37°C в течение 24 - 48 ч. Видовую идентификацию проводили на масс-спектрометре MALDI-TOF-MS (Bruker Daltonics, Германия) и в баканализаторе Vitek 2.

Для определения чувствительности к антимикробным препаратам (АМП) использовали три метода: диско-диффузионный (диски Bio-Rad, США), метод Е-тестов (BioMerieux, Франция) на среде Мюллера-Хинтона (Biorad, США) и автоматизированный метод на баканализаторе ВИТЕК 2 Compact (BioMerieux, Франция). Метод Е-тестов использовали для определения МПК

имипенема, меропенема и тигециклина. Результаты интерпретировали, руководствуясь оценочными критериями установленными Клиническими рекомендациями «Определение чувствительности микроорганизмов к антимикробным препаратам» и Европейским комитетом по определению чувствительности микроорганизмов к антимикробным препаратам (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing, EUCAST). В качестве контрольных штаммов использовали *E. coli* ATCC 25922, *E. coli* ATCC 35218, *P. aeruginosa* ATCC 27653, *A. baumannii* ATCC 19606. В отношении устойчивости к карбапенемам штаммы делили на 2 группы: карбапенемчувствительные (карба-Ч) и карбапенемрезистентные (карба-Р).

Бактериальную ДНК выделяли с помощью коммерческих наборов «ГК-экспресс» (ЦНИИЭ Роспотребнадзора) согласно инструкции производителя. Для выявления генов БЛРС и карбапенемаз использовали метод ПЦР. Для выявления генов БЛРС *bla_{CTX-M}* и *bla_{TEM}* были использованы праймеры, предложенные Edelstein M., 2003. Компоненты реакционной смеси смешивали непосредственно перед проведением эксперимента. Результаты реакции оценивали путем проведения горизонтального электрофореза в 2% агарозном геле.

Выявление генов, кодирующих продукцию карбапенемаз, проводили с использованием наборов с гибридационно-флуоресцентной детекцией «АмплиСенс® MDR MBL-FL» (IMP, NDM, VIM), «АмплиСенс® MDR KPC/OXA-48-FL» (KPC, OXA-48), «АмплиСенс MDR Ab-OXA-FL» (OXA-23, OXA-40, OXA-58), производства ЦНИИЭ Роспотребнадзора. Компоненты реакционной смеси смешивали непосредственно перед проведением амплификации. В качестве положительного и отрицательного контролей использовали соответствующие образцы, входящие в состав набора. Результаты оценивали согласно инструкции производителя.

Для генотипирования штаммов *A. baumannii*, *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae* использовали метод МЛСТ. Использовали ДНК, экстрагированную из чистых культур. Подготовка матриц для секвенирования включала амплификацию внутренних фрагментов генов «домашнего хозяйства». Очистку ПЦР-продуктов от избытка праймеров, димеров праймеров и дНТФ проводили ферментативным разрушением с помощью экзонуклеазы I и щелочной фосфатазы (SAP, Affymetrix, США) при 37⁰С в течение 30 мин. с последующей инактивацией при 85⁰ С. Секвенирование проводили с использованием наборов реагентов и оборудования фирмы Applied Biosystems (США) по методике, описанной производителем. Полученные в результате секвенирования нуклеотидные последовательности генов «домашнего хозяйства» обрабатывали с помощью программы SeqMan, затем сравнивали с базой аллелей, используя специализированную программу для обработки результатов типирования, исследуемой аллели присваивался соответствующий номер.

Пневмококки выделяли из посева биоматериала носоглотки на колумбийском кровяном агаре с добавлением 3% лошадиной сыворотки. Идентификацию проводили на основании

морфологических и культуральных свойств, а также с помощью теста с оптохином и реакции латекс-агглютинации (Slidex Pneumo-Kit, BioMerieux, Франция). Капсульный тип определяли путем серологического типирования в реакции латексной агглютинации и/или реакции набухания капсулы по Нейфельду с использованием сывороток Statens Serum Institut (Дания), а также с помощью молекулярного типирования методом мультиплексной ПЦР с последующим серологическим типированием редких серотипов (Алябьева Н.М. и соавт., 2013). Нетипируемыми считали пневмококки, которые не агглютинировались ни одной из пуловых сывороток (пулы А-I и Р-Т). Чувствительность пневмококков к оксацилину (ОХА), эритромицину (ERY), клиндамицину (CLI), триметоприму/сульфаметоксазолу (SXT), хлорамфениколу (CHL) и тетрациклину (TET) определяли при помощи диско-диффузионного метода (диски Bio-Rad, США). ОХА-, ERY- и CLI-резистентные пневмококки дополнительно исследовали с использованием E-тестов (BioMerieux, Франция). Наличие индуцибельной устойчивости к CLI у ERY-резистентных/CLI-чувствительных пневмококков регистрировали в случае уплощения зоны подавления роста (D-феномен) вокруг диска с CLI, расположенного рядом с ERY-диском (расстояние между краями дисков 12-16 мм). Детекцию генов резистентности *ermB* и *mef* у ERY-резистентных пневмококков проводили при помощи ПЦР описанными ранее методами (Алябьева Н.М., 2014).

Для посева *S. pyogenes* использовали 5% кровяной агар. Идентификацию проводили общепринятыми в микробиологии методами, используя диски с бацитрацином, реакцию латекс-агглютинации (Slidex strepto-kit, bioMerieux) и на анализаторе MALDI-TOF MS. Чувствительность к ERY и CLI определяли диско-диффузионным методом (диски BioRad) на среде Мюллера-Хинтона с добавлением 5% крови. У ERY-резистентных изолятов *S. pyogenes*, выделенных в 2014 - 2016 гг, МПК ERY и CLI определяли с помощью E-теста, (bioMerieux, Франция). Интерпретацию результатов чувствительности штаммов *S. pyogenes* к антибиотикам проводили по критериям, указанным выше. Результаты чувствительности *S. pyogenes* к азитромицину и кларитромицину, полученные диско-диффузионным методом, интерпретировали по МУК 4.2. 1890-04 в связи с отсутствием соответствующих критериев в стандартах EUCAST. Результаты определения чувствительности к спирамицину диско-диффузионным методом трактовались согласно стандартам комитета по антибиотикограммам Французского общества микробиологов (CASFM-2012). К категории «нечувствительный» мы относили изоляты, обладавшие умеренным и высоким уровнем резистентности.

Статистический анализ проводили с применением пакета IBM SPSS Statistics for Windows, версия 20.0 (IBM Corp.). Для анализа таблиц сопряженности при сравнении долей использовали χ^2 или z-критерий, где это необходимо. Различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

2. Госпитальные грамотрицательные бактерии

Состав микробиоты, выделенной из трахеального аспирата включал 235 изолятов на 136 проб. С наибольшей частотой от пациентов, находящихся на ИВЛ, выделялись: *K. pneumoniae* (24,6%), *A. baumannii* (23,8%), *P. aeruginosa* (11,9%), *Ralstonia pickettii* (7,7%) и *Staphylococcus aureus* (7,2%). Долевое участие в микробиоте трахеального аспирата *E. faecium* и *E. coli* составило 3,8% и 4,2% соответственно. На остальные виды микроорганизмов, выделенных из трахеального аспирата с частотой от 0,5% до 2,5%, пришлось 14,8%.

Анализ динамики колонизации слизистых респираторного тракта при исследовании трахеального аспирата проведенного по трем периодам пребывания в ОРИТ, показал, что при поступлении в ОРИТ (I период) в совокупности было выделено всего 37 изолятов, включавших *K. pneumoniae* (27%), *A. baumannii* (29,7%), *S. aureus* (18,9%) и *E. coli* (13,5%).

Во II периоде (3-5 сутки пребывания в ОРИТ) в микробный спектр трахеального аспирата добавились и другие представители внутрибольничной микробиоты, такие как *R. pickettii* (10,5%) и *P. aeruginosa* (9,2%). В этот же период уменьшилась в 2 раза (до 9,2%) частота выделения *S. aureus*.

В III периоде (>5 суток) практически исчез *S. aureus* (до 2,4%, $p < 0,001$), но увеличилось долевое участие в микробиоте *P. aeruginosa* (до 16,4%, $p < 0,05$). В то же время *K. pneumoniae* (28,7%) и *A. baumannii* (22,1%) и в этот период сохранили свое доминирующее положение внутри микробиоты трахеального аспирата.

Мониторинг антибиотикорезистентности проводился у представителей ведущей группы патогенов, учитывая высокую частоту их циркуляции в ОРИТ. Результаты определения резистентности к антибиотикам у выделенных штаммов грамотрицательной флоры (Таблица 1) выявили, что среди изолятов *K. pneumoniae*, *A. baumannii* и *P. aeruginosa* резистентностью к меропенему обладали 20,5%, 69,6% и 61,5% штаммов соответствующих микроорганизмов.

К эртапенему было резистентных 22,2% штаммов *K. pneumoniae*. На высоком уровне определялась резистентность к аминогликозидам у *A. baumannii* (96,4% - 56%), *P. aeruginosa* (80,6% - 69,2%) и *K. pneumoniae* (67,7% - 41,1%).

Сравнительный анализ антибиотикоустойчивости штаммов *K. pneumoniae*, выделенных в 3 периода исследования (2014, 2015 и 2016 гг.), выявил рост резистентности к тестируемым препаратам в последний период.

**Резистентность (в %) к антибиотикам грамотрицательных бактерий, выделенных от детей
в ОРИТ в период 2014 -2016 гг**

Антибиотики	<i>K. pneumoniae</i>		<i>A. baumannii</i>		<i>P. aeruginosa</i>	
	n	%	n	%	n	%
AMC	44	93,2	-	-	-	-
MEM	73	20,5	56	69,6	39	61,5
IPM	73	20,5	56	66,1	39	64,1
ETP	9	22,2	-	-	-	-
CZD	73	79,4	15	93,3	38	71,0
FEP	69	91,3	45	95,6	39	66,7
GMN	73	56,2	56	96,4	36	80,6
AKN	73	64,4	55	96,4	39	69,2
NTM	73	41,1	56	76,8	36	75,0
TMN	31	67,7	50	56,0	39	69,2
CIP	71	70,4	55	98,2	38	68,4

Наиболее значимым было увеличение доли изолятов, нечувствительных к карбапенемам (меропенему и имипенему), которая поднялась с 16% до 47% $p < 0,05$ в 2016, г. За этот же период отмечено возрастание уровня резистентности и к таким антибиотикам, как нетилмицин (с 20% до 82%, $p < 0,001$), цiproфлоксацин (с 60% до 94%, $p < 0,01$), ко-тримоксазол (с 60% в 2015 г до 82% в 2016 г, $p = 0,189$).

Относительно *A. baumannii* отмечено, что резистентность к меропенему и имипенему за сравнимые периоды наблюдения возросла с 27,3% до 87,5% и 83,3% соответственно ($p < 0,001$). Также отмечено возрастание частоты выявления нечувствительных штаммов к нетилмицину (с 45,4% до 83,3%, $p < 0,05$). Однако в период 2015 г среди изолятов *A. baumannii* отмечено уменьшение частоты штаммов, устойчивых к сульперазону (с 63,6% до 38,1%, $p = 0,161$).

Результаты динамического наблюдения за изолятами *P. aeruginosa* показали цикличность изменений уровня устойчивости микроорганизма к карбапенемам и цефалоспорином. После снижения уровня нечувствительности к карбапенемам в 2015 г (с 60,0% до 35,7%) в 2016 г вновь происходит увеличение частоты циркуляции нечувствительных изолятов до 86,7% ($p < 0,01$). Сходная динамика проявлялась и в отношении цефтазидима, цефепима, тобрамицина и цiproфлоксацина.

В период 2013 – 2016 гг. было проанализировано 3232 гемокультур, полученных от детей, находившихся в ОРИТ С-1, с симптомами бактериальной инфекции и с диагностической целью (мониторинг). Для мониторинга забор крови осуществлялся дважды в неделю. Кроме того, был исследован 341 образец гемокультуры от пациентов с тяжелой черепно-мозговой травмой, находившихся в ОРИТ С-2.

В С-1 в монокультуре микроорганизмы высевали в 91,4% случаях, в ассоциациях – 8,6%. Лидирующее место по частоте изоляции занимают грибы рода *Candida* – 62 (28,7%). *K. pneumoniae* составила 19,9% микробного спектра, энтерококки были представлены: *E. faecalis* – 17 (7,8%), *E. faecium* – 12 (5,5%). *P. aeruginosa* и *S. marcescens* выделяли из положительных образцов крови с одинаковой частотой – 11 (5%). *A. baumannii* выделили в 9 (6,9%) случаях. На долю *S. aureus* пришлось всего 5 (2,3%) случаев. Доля других микроорганизмов суммарно составила 12,9% (28).

Как было сказано выше, лидирующее место в микробном спектре положительных гемокультур занимали грибы рода *Candida*. Обращает на себя внимание тот факт, что 82% состава грибов рода *Candida* занимает *C. parapsilosis*, и только этот вид грибов встречался как в монокультуре 46 (92%), так и в ассоциациях 5 (9,8%). На долю грибов *C. albicans*, *C. glabrata* и *C. guilliermondii* пришлось 7 (11,3%), 3 (4,8%) и 1 (1,6%) случаев, соответственно.

В положительных образцах крови, полученных из С-2, в монокультуре микроорганизмы высевали в 89% случаях, а в ассоциациях – 11%.

Лидирующее место в микробном спектре положительных гемокультур занимала *K. pneumoniae*, составлявшая 36,3% (12/33) всех изолятов. Второе место в равной доле (по четыре штамма, 12,1%) принадлежало *A. baumannii* и грибам *C. albicans*. На долю *S. marcescens*, *S. maltophilia*, *P. aeruginosa*, *E. faecium*, *E. faecalis* пришлось по 6%. На долю других представителей микробного спектра: *S. mitis*, *S. aureus*, *B. gladiolii* пришлось по 3%.

С практических позиций для проведения адекватной антибиотикотерапии инфекционного процесса необходимо знание чувствительности возбудителя к антибактериальным препаратам. Для этой цели был проведен анализ чувствительности к антибиотикам основных микроорганизмов, выделенных из положительных гемокультур и ликвора в период 2013 - 2016 гг.

Результаты изучения резистентности к антибиотикам изолятов *A. baumannii* показали, что эти штаммы обладали высокой резистентностью ко всем группам антибиотиков. Так, к аминогликозидам гентамицину, нетилмицину и тобрамицину резистентность составила по 53%, а для амикацина - 69%. К карбапенемам резистентными были 61% гемоизолятов *A. baumannii*. EUCAST не рекомендует определять чувствительность *Acinetobacter spp* к цефалоспорином ввиду их низкой активности в отношении этих бактерий. Однако мы оценили уровень резистентности *A. baumannii* к цефепиму диско-диффузионным методом по критериям CLSI. Результаты нашего исследования показали, что резистентность *A. baumannii* к цефепиму составила 53%. Резистентность к ципрофлоксацину составила 69% (таблица 2).

Результаты изучения резистентности к антибиотикам *K. pneumoniae* показали, устойчивость к ампициллину и амоксициллину/клавуланату у 67% и 69% изолятов соответственно. Среди аминогликозидов наибольшая устойчивость была выявлена для

гентамицина (72%), к амикацину и нетилмицину нечувствительные штаммы встречались в 41% и 47% соответственно. Большинство гемоизолятов *K. pneumoniae* сохраняло чувствительность к карбапенемам, доля резистентных штаммов составила 23%. К бисептолу резистентность составила 49%, к ципрофлоксацину 80% (таблица 2).

Таблица 2

**Частота резистентных штаммов,
выделенных из положительных гемокультур**

Антибиотик	<i>A. baumannii</i> (n=13)		<i>K. pneumoniae</i> (n=55)	
	n	%	n	%
AKN	9	69	23	41,8
GMN	7	53	40	72,7
NTM	7	53	26	47,3
TMN	7	53	н/г*	н/г
MEM	8	61	13	23,6
IPM	8	61	13	23,6
COL	0	0	-	-
FEP	7	53	-	-
CIP	9	69	44	80
API	-	-	37	67,2
AMC	-	-	38	69,1
SXT	н/г	н/г	27	49,1

Примечание: * - не тестировали, «-» - не определяется чувствительность

Для штаммов *P. aeruginosa* была определена чувствительность к аминогликозидам, карбапенемам, антисинегнойным пенициллинам, цефалоспорином, ципрофлоксацину. К аминогликозидным антибиотикам устойчивость варьировала от 38% (нетилмицин) до 53% (амикацин, гентамицин). На долю нечувствительных к карбапенемам (меропенему и имипенему) изолятов *P. aeruginosa* пришлось по 46%. К антисинегнойным пенициллинам пиперациллин/тазобактаму и тикарциллин/клавуланату резистентность была низкая – 15% и 38% соответственно. Активность антисинегнойных цефалоспоринов (цефтазидим, цефепим) была невысока: устойчивых штаммов к цефтазидиму было 40%, а к цефепиму 53%. На уровне 30% была выявлена резистентность штаммов к ципрофлоксацину.

Все штаммы энтерококков были чувствительны к линезолиду и тигециклину. Нечувствительных штаммов к ампициллину среди *E. faecalis* найдено не было, а среди *E. faecium* резистентность к данному антибиотику составила 86%. К ванкомицину был резистентен только один штамм *E. faecium*. К левофлоксацину и ципрофлоксацину доля нечувствительных штаммов для *E. faecalis* составила 31% и 26%, а для *E. faecium* была значительно выше – 71% и 81% соответственно. К нитрофурантоину резистентных штаммов *E. faecalis* выявлено не было, а доля *E. faecium* составила 40%.

Результаты нашего исследования показали, что все штаммы *S. aureus*, выделенные из положительных гемокультур, были чувствительны к ванкомицину, линезолиду, тигециклину и фузидину. Доля MRSA составила 33%. По одному штамму были нечувствительны к амикацину, и рифампицину.

За период 2013-2016 гг. из С-1 была получена 31 проба ликвора и из С-2 446 образцов ликвора. Рост микрофлоры С-1 был получен лишь в трех образцах. Микроорганизмы были представлены тремя видами, выделенными только в монокультуре.

H. influenzae была выделена у пациента 11 месяцев, с диагнозом: Острый бактериальный менингит. Острый средний катаральный отит. При бактериологическом исследовании носоглотки и крови *H. influenzae* не обнаружена.

S. pneumoniae был выявлен у ребенка 5 лет 3 месяцев с диагнозом: Острый гнойный мастоидит. Острый менингит. В бактериологических посевах из носоглотки, зева и крови данный возбудитель не обнаружен.

S. warneri был выделен из ликвора у больного 6 лет 5 месяцев с диагнозом: Посттравматическая отоликворея. В мазке из зева и крови этот микроорганизм не обнаружен.

Рост микрофлоры из образцов ликвора С-2 был зафиксирован в 27 (6,1%) пробах. Микроорганизмы высевались как в монокультуре 22 (81%), так и в ассоциациях – 5 (18%). С одинаковой частотой выявлялись *A. baumannii* и *K. pneumoniae* - 4 (16,7%). На долю *E. faecalis* пришлось 12,5%. Другие представители микробного спектра - *P. aeruginosa*, *Streptococcus spp.* (*salivarius*, *infantis*) составили по 8,3%.

Микробные ассоциации, составившие 18%, в основном были двухкомпонентными, в которых одним из представителей была грамотрицательная бактерия рода *Acinetobacter*: *A. baumannii*+*K. pneumoniae*, *A. baumannii*+*E.coli*, *A. junni*+*B. flexus*, *A. lwoffii*+*E. faecalis*. Одна ассоциация состояла из трех микроорганизмов *P. aeruginosa*+*K. pneumoniae*+*E. faecalis*.

Из четырех изолятов *A. baumannii* один штамм был нечувствителен к нетилмицину, три штамма были резистентны к тобрамицину, а к амикацину и генамицину проявили резистентность все четыре штамма. К карбапенемам устойчивых штаммов было два. К цефепиму и ципрофлоксацину были резистентны все исследуемые штаммы.

Все четыре изолята *K. pneumoniae* были не чувствительны к ампициллину, амоксициллину/клавуланат, бисептолу, нитрофурантоину и амикацину. К ципрофлоксацину было нечувствительно три штамма. К имипенему резистентных было два штамма, а к меропенему – один.

Все протестированные штаммы *E. faecalis* (n=3) были чувствительными к ванкомицину, имипенему, линезолиду, нитрофурантоину, тигециклину. К ампициллину, ципрофлоксацину и левофлоксацину было нечувствительных по одному изоляту.

Из двух штаммов *P. aeruginosa*, выделенных из ликвора, один штамм обладал МЛУ и был чувствителен только к колистину. Другой штамм имел чувствительность к амикацину и нетилмицину, карбапенемам, ципрофлоксацину и колистину.

Выделенные микроорганизмы из ликвора у детей с острым менингитом были чувствительны ко всем тестируемым группам антибиотиков.

Таким образом, возбудители, выделенные из положительных проб ликвора у детей С-2, отличались от таковых полученных от детей С-1, которые были типичными возбудителями острого менингеального воспаления и обладали чувствительностью к антибактериальным препаратам, которые используются для лечения этих инфекций. У детей С-2 в микробном пейзаже преобладали оппортунистические возбудители, что говорит о вероятном инфицировании в стационаре. Микроорганизмы, выделенные из положительных образцов крови в монокультуре, скорее всего, указывают на истинную бактериемию. Возбудители, выделенные в ассоциациях, скорее всего, являются следствием контаминации при взятии материала. Чаще всего, из положительных гемокультур у детей С-2 выделялись оппортунистические микроорганизмы, а от пациентов С-1 СКН. Возможно, это связано с неправильным забором материала (например, кровь забирали из ЦВК), что значительно увеличивает риск контаминации. Результаты изучения резистентности к антибиотикам изолятов, выделенных из положительных гемокультур и проб ликвора, показали высокую долю резистентных штаммов оппортунистических микроорганизмов. Однако возбудители острых менингитов были чувствительны ко всем антибиотикам, которые обычно применяют при данном виде инфекции.

3. Клональное разнообразие, молекулярные механизмы устойчивости к карбапенемам и био пленкообразование у карбапенемрезистентных штаммов *Acinetobacter baumannii*, выделенных в г. Москве

Всего было исследовано 88 карба-Р изолятов *A. baumannii*, выделенных из крови (14%), трахеального аспирата (48%), отделяемого раны (9%) и скрининговых мазков из зева/ануса (29%). Исходно для всех изолятов мы провели МЛСТ по схеме Oxford, выявив 15 сиквенс-типов, которые принадлежали к трем клональным комплексам: CC92^{Oxf} (n=61), CC109^{Oxf} (n=1) и CC944^{Oxf} (n=26). CC92^{Oxf} (69%) был представлен тремя однолокусными вариантами (single locus variant, SLV) и восемью двухлокусными вариантами (double locus variant, DLV) ST92^{Oxf}. Доминирующим генотипом был ST348^{Oxf} (n=30), который составил 34% всей коллекции. CC944^{Oxf} состоял из 26 изолятов (30% всей коллекции), относившихся к трем сиквенс-типам, включая ST944^{Oxf} (n=16) и два его SLV: ST1103^{Oxf} (n=3) и ST1104^{Oxf} (n=7). Один изолят ST441^{Oxf} принадлежал к CC109^{Oxf}. Взаимосвязи между сиквенс-типом и типом образца – источником

изолята выявлено не было. Шесть из 15 Oxford-сиквенс-типов ранее не были представлены в базе данных МЛСТ *A. baumannii*. Новые комбинации аллелей встречались у пяти из шести впервые описанных сиквенс-типов; ST1128^{Oxf} содержал новую *gpi*-аллель. Восемь из 11 изолятов ST493^{Oxf} несли делецию размером 18 п.о. в аллели *rpoD* (позиции 229-246). Этот вариант ST493, который мы обозначили как ST493 Δ *rpoD*^{Oxf}, встречался только в одном изучаемом стационаре, С-3. Впервые описанные ST1103^{Oxf} и ST1104^{Oxf} составили 38% (10/26) изолятов из числа представителей СС944^{Oxf}. Для выявления взаимосвязи между изолятами СС944^{Oxf} и известными международными клонами мы провели дополнительное генотипирование *A. baumannii* по схеме Pasteur. Все три сиквенс-типа СС944^{Oxf} соответствовали ST78^{Pas}.

Мы провели дальнейшее сравнение схем МЛСТ Oxford и Pasteur, выполнив Pasteur-МЛСТ как минимум одного изолята каждого Oxford-сиквенс-типа из каждого стационара. Обе схемы МЛСТ распределили исследованные изоляты между тремя клональными группами: СС92^{Oxf}/СС2^{Pas} (относится к IC2), СС109^{Oxf}/СС1^{Pas} (относится к IC1) и СС944^{Oxf}/ST78^{Pas}. В то же время, схема Oxford позволила идентифицировать 15 сиквенс-типов, тогда как схема Pasteur выделила только пять сиквенс-типов. Единственный Pasteur-сиквенс-тип ST2^{Pas} охватывал семь из одиннадцати Oxford-сиквенс-типов, принадлежавших к СС92^{Oxf}; ST78^{Pas} соответствовал трем сиквенс-типам схемы Oxford. ST493^{Oxf} был эквивалентен двум сиквенс-типам схемы Pasteur: ST45^{Pas} и ST570^{Pas}; последний был идентичен ST493 Δ *rpoD*^{Oxf}. В связи с тем, что схема Oxford показала более высокую разрешающую способность, мы использовали ее для анализа разнообразия генотипов карба-Р *A. baumannii* на уровне стационара (Рис. 1).

Распространенность клонов в трех исследуемых стационарах отличалась незначимо ($\chi^2=7,3$; $p=0,294$), однако распределение сиквенс-типов было разным ($\chi^2=123$; $p<0,001$). Десять из 15 выявленных Oxford-сиквенс-типов встречались в единственном стационаре, пять сиквенс-типов были обнаружены в двух стационарах, и только ST944^{Oxf} присутствовал во всех трех стационарах (Рис. 1).

Например, все изоляты ST450^{Oxf} ($n=9$) и ST1104^{Oxf} ($n=7$) были выявлены в С-1; ST493 Δ *rpoD*^{Oxf} ($n=8$) и ST1128^{Oxf} ($n=3$) встречались только в С-3.

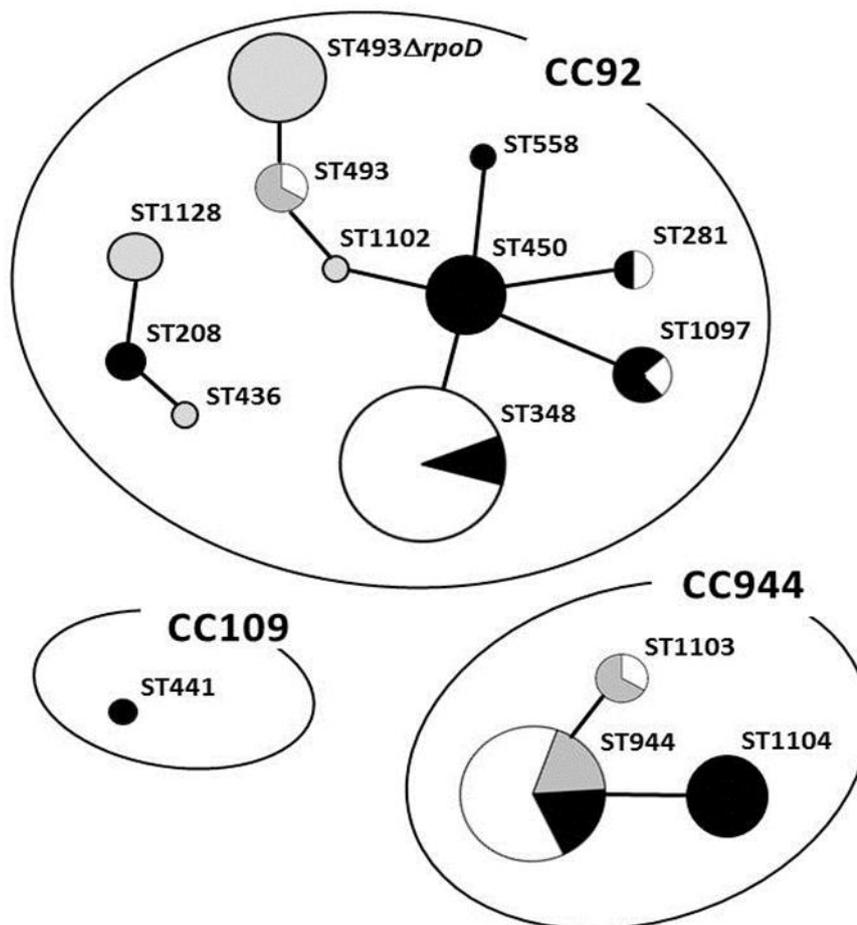


Рисунок 1. Популяционная структура 88 карбапенемрезистентных изолятов *A. baumannii*, выделенных в трех стационарах г. Москвы

Примечание. Цвет кружков обозначает стационар: черный – С-1, белый – С-2, серый – С-3. Размер кружков пропорционален числу изолятов с соответствующим сиквенс-типом. Линии обозначают однолокусные варианты (SLV).

Интересно, что все изоляты ST1104^{Oxf} (n=7) были выявлены в ОРИТ С-1 в течение пяти недель в ноябре-декабре 2014 г., что указывало на вспышку, а девять изолятов ST450^{Oxf} присутствовали здесь в течение почти всего периода исследования, с сентября 2012 по декабрь 2014 гг. В С-2 было получено 27 из 30 изолятов ST348^{Oxf}, что сделало этот генотип доминирующим в данном стационаре; выделение изолятов было равномерно распределено во времени исследования.

МПК карбапенемов у всех исследованных изолятов *A. baumannii* составила ≥ 32 мг/л. Все штаммы были резистентны к ципрофлоксацину (МПК > 1 мг/л); 88% и 82% изолятов проявляли устойчивость к гентамицину и нетилмицину соответственно. Все карба-Р изоляты были чувствительны к колистину с МПК в пределах 0,125-0,5 мг/л.

У всех карба-Р изолятов *A. baumannii* были выявлены гены карбапенемазы из группы ОХА. Большинство изолятов (73/88; 82%) несли ОХА-40-подобную карбапенемазу, у 15% (13/88) была обнаружена ОХА-23-подобная карбапенемаза, еще два изолята имели обе карбапенемазы. Ни один изолят не обладал ОХА-58-подобной карбапенемазой. Секвенирование амплифицированных фрагментов *bla*_{ОХА-23}- и *bla*_{ОХА-40}-подобных генов показало, что они были идентичны *bla*_{ОХА-23} и *bla*_{ОХА-72} соответственно.

Таким образом, наличие ОХА-40-подобной карбапенемазы типа ОХА-72 было наиболее распространенным механизмом устойчивости к карбапенемам у исследованных нами изолятов *A. baumannii*.

Среди представителей СС944^{Oxf} встречались носители как ОХА-72 (75%; 46/61), так и ОХА-23 (23%; 14/61), однако изоляты СС944^{Oxf} обладали исключительно ОХА-72 (у одного изолята она сочеталась с ОХА-23). Примечательно, что каждый сиквенс-тип отличался наличием гена определенной карбапенемазы, за некоторыми исключениями. Например, все изоляты ST348^{Oxf} (n=30) и ST944^{Oxf} (n=16) несли ген *bla*_{ОХА-72}, в то время как все изоляты ST493^{Oxf} (n=8) и ST1128^{Oxf} (n=3) обладали геном *bla*_{ОХА-23}. Исключение составили изоляты ST493^{Oxf}, которые имели карбапенемазу ОХА-72 (2 из 3) или ОХА-23 (1 из 3), а также два изолята, которые продуцировали обе карбапенемазы (по одному изоляту ST450^{Oxf} и ST1103^{Oxf}). Все изоляты СС944^{Oxf}/ST78^{Pas}, за исключением одного, несли ген *bla*_{СТХ-М-115}. Ни один из оставшихся карба-Р изолятов *A. baumannii* не был носителем *bla*_{СТХ-М-115}, за исключением единственного изолята ST558.

4. Клональное разнообразие, молекулярные механизмы устойчивости к карбапенемам у карбапенемрезистентных штаммов *K. pneumoniae*

Для анализа были отобраны 84 штамма карба-Р и 17 карба-Ч *K. pneumoniae*, выделенных из крови/ликвора (25%), трахеального аспирата (17%), отделяемого раны/дренажи/стомы (11%), мочи (6%) и локусов мониторинга зева/ануса (37%).

Все исследованные карба-Ч и карба-Р изоляты были резистентны к цефалоспорином III-IV поколений. К аминогликозидам доля нечувствительных штаммов у карба-Ч варьировала от 59% до 100%, а у карба-Р от 71% до 86%. К ципрофлоксацину и фосфомицину резистентность карба-Ч изолятов составила 94% и 31%, соответственно, а карба-Р штаммы в 94% случаев были резистентны и к ципрофлоксацину и фосфомицину. Наибольшую чувствительность исследованные изоляты проявляли в отношении тигециклина. Нечувствительных штаммов к тигециклину было 18% как среди карба-Ч, так и для карба-Р изолятов.

Все изоляты были протестированы на наличие генов БЛРС (СТХ-М, ТЕМ) и карбапенемаз IMP, KPC, OXA-48, NDM, VIM (Таблица 3).

Таблица 3

**Распространенность генов резистентности и их комбинаций
у штаммов *K. pneumoniae* (n=101)**

Гены	Карба-Р, n=84	Карба-Ч, n=17
СТХ-М	0	1 (6%)
СТХ-М + OXA-48	17 (20%)	1 (6%)
СТХ-М + ТЕМ	5 (6%)	8 (47%)
СТХ-М + ТЕМ + OXA-48	53 (63%)	5 (35%)
СТХ-М + ТЕМ + NDM	1 (1%)	0
СТХ-М + ТЕМ + OXA-48 + NDM	1 (1%)	0
OXA-48	5 (6%)	0
ТЕМ + OXA-48	1 (1%)	2 (3%)
NDM	1 (1%)	0

Среди карба-Ч штаммов ген БЛРС *bla*_{СТХ-М} был найден только у одного изолята (6%), а восемь штаммов (47%) обладали комбинацией, состоящей из двух генов *bla*_{СТХ-М} и *bla*_{ТЕМ}. Нами были выявлены также комбинации генов БЛРС и карбапенемаз. Так, пять (35%) штаммов обладали комбинацией, состоящей из трех генов: *bla*_{СТХ-М}+*bla*_{ТЕМ}+*bla*_{OXA-48}. Ген карбапенемаз *bla*_{OXA-48} в двух случаях сочетался с геном *bla*_{ТЕМ} и в одном случае с *bla*_{СТХ-М}.

Среди карба-Р штаммов гены карбапенемаз *bla*_{OXA-48} в качестве единственной детерминанты резистентности присутствовали в пяти (6%) изолятах, ген *bla*_{NDM} только у одного штамма. Используемый нами ПЦР-метод не выявил ни одного штамма *K. pneumoniae*, обладающего генами IMP, KPC, VIM. Наиболее распространенной комбинацией детерминант резистентности стало сочетание гена карбапенемазы *bla*_{OXA-48} с двумя генами БЛРС *bla*_{СТХ-М}+*bla*_{ТЕМ} выявленное у 53 (63%) изолятов, при этом у 17 (20%) карба-Р изолятов был выявлена комбинация *bla*_{OXA-48}+*bla*_{СТХ-М} и только у одного изолята *bla*_{OXA-48}+*bla*_{ТЕМ}. Сочетание гена карбапенемаз *bla*_{ТЕМ} и гена БЛРС *bla*_{СТХ-М} было найдено в 5 (6%) случаях. У одного штамма были обнаружены комбинации двух генов карбапенемаз *bla*_{ТЕМ} + *bla*_{NDM} с геном БЛРС *bla*_{СТХ-М}. Один штамм имел четыре детерминанты резистентности: два гена карбапенемаз и два гена БЛРС.

Всего 84 карба-Р и 13 карба-Ч штаммов *K. pneumoniae* были исследованы методом МЛСТ. Разнообразие сиквенс-типов представлено на рисунке 2. Проанализированные изоляты относились к 15 сиквенс-типам, в том числе был обнаружен один новый сиквенс-тип, зарегистрированный в базе данных МЛСТ под номером ST3024.

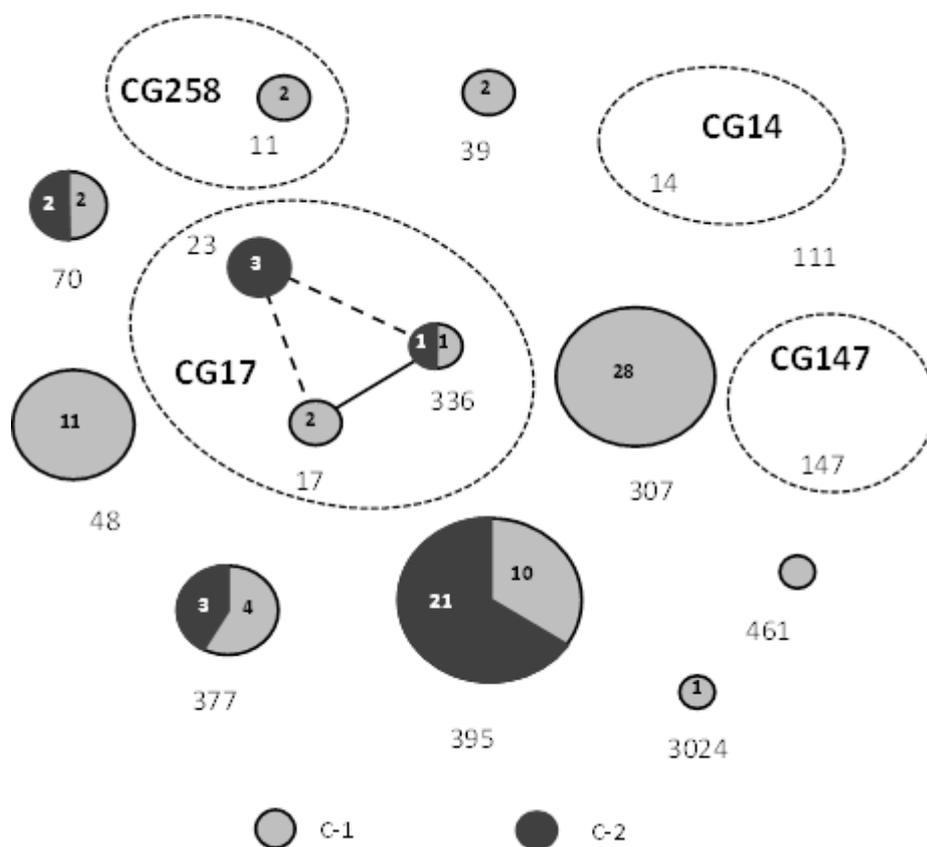


Рисунок 2. Распределение сиквенс-типов штаммов *K. pneumoniae*

Примечание: числа в кругах обозначают количество изолятов, относящихся к соответствующему ST. Прямой линией показаны SLV (single locus variant, однолокусный вариант), прерывистой – DLV (double locus variant, двухлокусный вариант); CG (clonal group) – клональная группа.

В целом, в исследованной популяции преобладали четыре сиквенс-типа: ST395 (n=31; 32%), ST307 (n=28; 29%), ST48 (n=11; 11%) и ST377 (n=7; 7%), в совокупности, составлявшие 79% всей выборки. Большинство карба-Р штаммов относилось к ST395 (n=31; 37% этой части коллекции). Не было обнаружено ни одного карба-Ч изолята, относившегося к данному сиквенс-типу. Вторым по частоте среди карба-Р изолятов был ST307 (n=10; 24%), данный сиквенс-тип доминировал среди карба-Ч изолятов (8/13; 62% этой части коллекции). В популяции карба-Р *K. pneumoniae* были выявлены 10 (12%) и 7 (8%) изолятов, относившихся к ST48 и ST377 соответственно. К четырем вышеописанным генотипам суммарно относились 68 (81%) карба-Р изолятов *K. pneumoniae*. Остальные девять сиквенс-типов этой части коллекции

были представлены 1-3 штаммами. Карба-Ч изоляты отличались меньшим клональным разнообразием: три из пяти выявленных сиквенс-типов (ST48, ST70, ST111) были представлены единичными изолятами. ST11 и ST111 не встречались в карба-Р части коллекции.

Далее, мы проанализировали распределение сиквенс-типов штаммов *K. pneumoniae*, выделенных в период с 2012 по 2016 гг. в двух педиатрических стационарах. Из 15 выявленных сиквенс-типов 10 встречались только в С1, а один сиквенс-тип (ST23) был обнаружен только в С2. Изоляты, принадлежавшие к четырем сиквенс-типам (ST395, 337, 70 и 336), были обнаружены в обоих стационарах. Составлявшие значительную часть коллекции штаммы ST307 (n=28) и ST48 (n=11) были выделены только у пациентов в С1. Интересно, что клон ST307 доминировал в данном стационаре в течение всего периода исследования. ST395 также встречался в С1 (10/31) и С2 (21/31) на протяжении всего проанализированного периода. Изоляты ST48 (n=11) выделяли в С1 в период с января 2014 по сентябрь 2015 гг., а ST377 (n=7) выявляли в С2 с апреля по июнь 2015 г (n=3), а в С1 с апреля 2015 по март 2016 гг. (n=4). Среди карба-Р изолятов *K. pneumoniae* доминирующим был ST395 (n=31), который встречался в обоих исследованных стационарах. Семь штаммов данного сиквенс-типа были носителями генов БЛРС и карбапенемаз *bla_{CTX-M}* + *bla_{OXA-48}*, 20 изолятов дополнительно несли ген БЛРС *bla_{TEM}*. Три штамма имели только ген *bla_{OXA-48}*, а один изолят обладал комбинацией двух генов БЛРС.

5. Популяционная структура карбапенемрезистентных *P. aeruginosa* и носительство металло-β-лактамаз

Всего было отобрано 87 изолятов *P. aeruginosa*, которые были резистентны (МПК >8 мг/л) к меропенему и/или имипенему (карба-Р изоляты). Из них 78 (90%) изолятов были резистентны к обоим карбапенемам, еще восемь (9%) изолятов обладали умеренной устойчивостью к меропенему (МПК 4-8 мг/л) и один (1%) изолят был умеренно устойчив в имипенему (МПК 8 мг/л). Максимальную МПК ≥ 32 мг/л меропенема и имипенема имели 85 (98%) и 78 (90%) изолятов соответственно. Анализ чувствительности карба-Р *P. aeruginosa* к некарбапенемным антибиотикам показал их высокую устойчивость ко всем группам исследованных препаратов, включая цефалоспорины, аминогликозиды и фторхинолоны. Наиболее высокая резистентность наблюдалась к амикацину, гентамицину и цефепиму (>80% устойчивых изолятов). Таким образом, все исследованные изоляты обладали МЛУ.

Все выделенные изоляты были подвергнуты генотипированию с помощью МЛСТ. Всего был выявлен 21 уникальный сиквенс-тип. В структуре с большим отрывом лидировали представители пяти сиквенс-типов, включая ST111, ST235, ST446, ST654 и ST2592, которые суммарно составляли 78% выборки карба-Р *P. aeruginosa*; из них самыми распространенными

стали ST654 (30%), ST235 (23%) и ST111 (13%). Оставшиеся 16 сиквенс-типов формировали 22% выборки. Популяционная структура карба-Р *P. aeruginosa* в двух исследованных стационарах значительно различалась ($\chi^2=46$, $p=0,001$). В стационаре С2 было обнаружено семь, а в стационаре С1 – 16 различных сиквенс-типов. Два наиболее распространенных генотипа ST235 и ST654 были представлены в обоих стационарах, тогда как ST111 присутствовал только в С2, а уникальным для С1 стал ST446; для С2 был эндемичным также ST2592. Одиннадцать из 16 сиквенс-типов, обнаруженных в стационаре С1, были представлены единичными изолятами, доля которых в общем числе изолятов из С2 составила 25% (Рисунок 3).

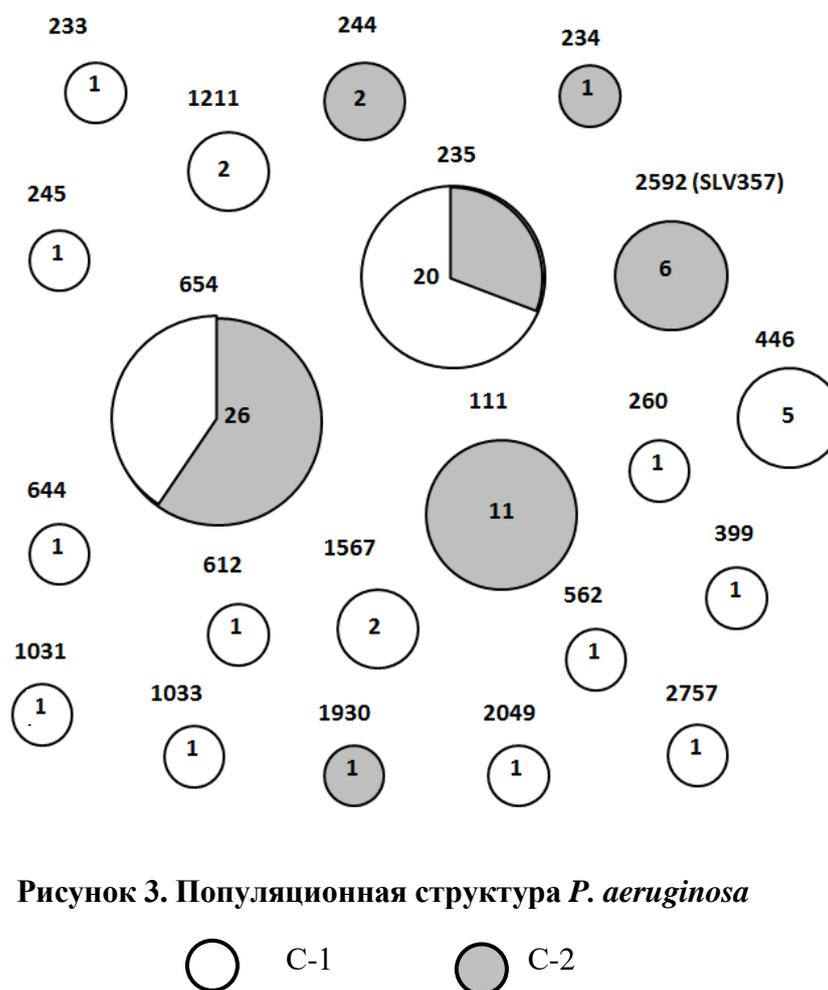


Рисунок 3. Популяционная структура *P. aeruginosa*

У 50 (57%) исследованных изолятов карба-Р *P. aeruginosa* был выявлен ген МБЛ *bla_{VIM}*; носительство других карбапенемаз, включая *bla_{NDM}* и *bla_{IMP}*, обнаружено не было. Продуцентами VIM-подобных карбапенемаз были представители трех сиквенс-типов: ST111, ST235 и ST654. Носителями *bla_{VIM}* были все изоляты ST111 и ST654, а также 13 (65%) ST235-изолятов. В структуре в структуре VIM-позитивных изолятов лидировал ST654 (52%, 26/50), ST111 и ST235 занимали долю 23% (11/50) и 26% (13/50) соответственно (таблица 4).

Распределение карбапенрезистентных изолятов *P. aeruginosa* в соответствии с генотипом, распространенностью в стационарах, носительством *bla_{VIM}*

ST	n (%)	Носители <i>bla_{VIM}</i> ^a	C1	C2	<i>p</i> ^б
654	26 (30%)	26 (100%)	10 (23%)	16 (37%)	>0,05
235	20 (23%)	13 (65%)	14 (32%)	6 (14%)	0,048
111	11 (13%)	11 (100%)	0	11 (26%)	<0,001
2592	6 (7%)	0	0	6 (14%)	0,01
446	5 (6%)	0	5 (11%)	0	0,023
244	2 (2%)	0	0	2 (5%)	>0,05
1211	2 (2%)	0	2 (5%)	0	>0,05
1567	2 (2%)	0	2 (5%)	0	>0,05
Другие	13 (15%)	0	11 (25%) ^г	2 (5%) ^б	0,008
Всего	87 (100%)	50 (57%)	44 (100%)	43 (100%)	

Примечание. Представлены сиквенс-типы с частотой ≥ 2 . ST – сиквенс-тип, C1 – стационар 1, C2 – стационар 2. ^aВ скобках указана доля *bla_{VIM}*-положительных изолятов от общего числа изолятов соответствующего сиквенс-типа. ^б Значение *p* указывает на значимость различий (критерий χ^2) между частотой встречаемости соответствующего сиквенс-типа в двух стационарах; значимые различия выделены жирным шрифтом. ^б ST234, ST1930. ^г Всего 11 сиквенс-типов: 233, 245 260, 399, 562, 612, 644, 1031, 1033, 2049, 2757; каждый представлен одним изолятом.

Таким образом, наше исследование показало широкое распространение (>50%) носительства VIM-подобных карбапенемаз среди Карба-Р *P. aeruginosa*, что делает их наличие ведущим механизмом устойчивости к карбапенемам у госпитальных штаммов этих возбудителей. В то же время, у значительной доли Карба-Р изолятов механизмы резистентности остаются нерасшифрованными. Все это свидетельствует о необходимости дальнейших исследований, направленных на мониторинг устойчивости к антибиотикам и популяционной эволюции госпитальных штаммов *P. aeruginosa* на территории России.

6. Респираторные патогены

Всего было идентифицировано 48 различных серотипов пневмококков, 25 (2,3%) изолятов относились к категории нетипируемых. Шесть ведущих педиатрических серотипов, включая серотипы 3, 6А, 6В, 14, 19F и 23F, суммарно составили 63,2% в общем распределении; лидировал серотип 19F (18,8%). Помимо перечисленных серотипов заметную долю ($\geq 2\%$) имели серотипы 11А, 15В/С, 23А. Распространенность остальных серотипов составила <2%.

Распределение серотипов зависело от возраста ($\chi^2=103$, $p<0,001$). У детей младше 5 лет было выявлено 39 серотипов, у детей старше 5 лет был обнаружен 41 серотип. Серотипы 6А, 6В, 15В/С и 19F чаще встречались в младшей возрастной группе, а серотипы 3, 33F и 37 были больше

распространены у детей старше 5 лет, причем серотип 37 встречался исключительно у старших детей. У младших детей также чаще встречался серотип 14 ($z=1,7$; $p=0,087$).

За шестилетний период наблюдения структура серотипов в целом не претерпела заметных изменений. Так, доля серотипов, входящих в 13-валентную ПКВ, менялась незначимо и колебалась около 70% ($\chi^2=3,9$; $p=0,423$; Рис.4А); по всей выборке она составила 70,2% (95% ДИ 67,5%-72,9%). Отметим, что доля вакцинных серотипов была значимо выше у детей до 5 лет, достигнув 74% (95% ДИ 70,8% -77,2%) против 63,3% (95% ДИ 58,6%-68%) у старших детей ($z=3,7$; $p<0,001$).

Динамика распространенности отдельных серотипов показала разнонаправленные тренды. Доля серотипа 14 повысилась с 8% в 2010/2011 гг. до 13-15% в 2014-2016 гг. ($\chi^2=10,5$, $p=0,033$), а в группе младших детей этот рост был еще заметнее (с 7,3% до 16,6% в 2016 г.). Напротив, частота серотипов 6А и 6В демонстрировала значимый тренд к снижению ($\chi^2=15,9$, $p=0,003$ и $\chi^2=15,1$, $p=0,003$ соответственно).

Частота выявления серотипов 19F и 23F в период наблюдения носила осциллирующий характер, без явно направленных трендов ($\chi^2=5,4$, $p=0,251$ и $\chi^2=6,2$, $p=0,188$ соответственно). Из числа редких серотипов интересна динамика серотипа 37: все десять его изолятов были получены в первые годы наблюдения (2010-2012 гг.) и не встречались в дальнейшем.

Для оценки спектра устойчивости пневмококков использовали АМП шести групп, включая β -лактамы (ОХА, АМХ), макролид (ЕРУ), линкозамид (СЛИ), сульфаниламид (SXT), тетрациклин (ТЕТ), хлорамфеникол (СНЛ). Результаты анализировали по выборке в целом, по наиболее распространенным и/или резистентным серотипам, а также по отдельным периодам наблюдения для выявления динамики. Устойчивость к различным группам АМП по выборке в целом варьировала от <5% для СНЛ до 47,8% для SXT, при этом доля изолятов с МЛУ составила 23,5%. Частота изолятов, устойчивых к PEN и ERY, составила 30,7% и 29,9% соответственно. Устойчивость к АМП была свойственна ограниченному числу пневмококковых серотипов. Основная доля резистентных изолятов, в том числе изолятов с МЛУ, приходилась на пневмококки пяти наиболее распространенных серотипов (6А, 6В, 14, 19F и 23F) и серотипа 19А. Частота SXT-резистентных пневмококков среди них варьировала от 50,8% до 74,4%, более 50% пневмококков серотипов 14, 19А и 19F обладали устойчивостью к ОХА. Эти же серотипы и серотип 6В отличались высокой резистентностью к ERY и ТЕТ. Более 40% 6В- и 19F-изолятов были СЛИ-резистентны. Наибольшая доля пневмококков с МЛУ была у серотипов 6В (41,6%), 14 (49,5%), 19А (35%), 19F (47,3%). Резистентность была менее выражена у пневмококков серотипов 6А и 23F (10,4% и 11,9% изолятов с МЛУ соответственно).

Доля резистентных изолятов среди пневмококков других серотипов не превышала 10% для ОХА, ERY, CLI и CHL; к SXT и TET были устойчивы соответственно 25,3% и 16,3% изолятов. МЛЮ обладала минимальная часть (5,5%) из этих пневмококков. В их числе выделялся серотип 9V, 5 из 17 (29%) изолятов которого имели МЛЮ.

Частота устойчивости пневмококков в отношении всех исследованных АМП, за исключением CLI, в течение 2010-2016 гг. значимо изменилась. По сравнению с начальным периодом наблюдения, в 2014-2016 гг. возросла распространенность ОХА- и ERY-резистентных пневмококков, которая в 2016 г. достигла 35,9% до 36,9% соответственно. Вместе с тем, для SXT, CHL и TET просматривался противоположный тренд, т.е. доля резистентных изолятов за время наблюдения значимо снизилась. Примечательно, что устойчивость к ОХА и ERY преимущественно нарастала в популяции наиболее распространенных серотипов, в то время как доля устойчивых изолятов среди других серотипов за период наблюдения изменилась незначимо (Рис. 4А, Б). Наиболее значимый индивидуальный тренд на повышение резистентности к ОХА и ERY ($\chi^2=14,7$, $p=0,005$ и $\chi^2=14,1$, $p=0,007$ соответственно) показал серотип 14: к 2016 г. доля нечувствительных пневмококков этого серотипа достигла 68% для ОХА и 60% для ERY.

Скрининг чувствительности к β -лактамам, проведенный с помощью диска с ОХА, показал наличие резистентности у 226 из 633 (35,7%) изолятов пневмококка, исследованных в 2013-2016 гг. Из числа ОХА-резистентных пневмококков 96,9% (219/226) относились к категории нечувствительных к PEN (МПК >0,06 мг/л) по результатам E-теста, т.е. доля PEN-нечувствительных изолятов по выборке в целом составила 34,6% (219/633). Подавляющее большинство изолятов (96,5%) имели МПК AMX \leq 2 мг/л, т.е. были чувствительны к этому АМП.

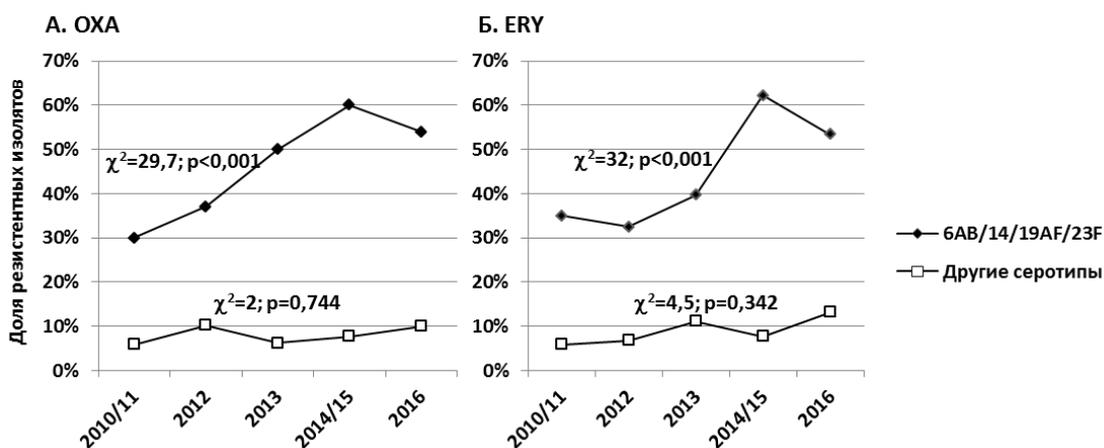


Рисунок 4. Динамика устойчивости носоглоточных изолятов пневмококка к оксациллину (А) и эритромицину (Б) в зависимости от серотипа
 ОХА – оксациллин, ERY – эритромицин. Над кривыми указаны значения критерия χ^2 и p для трендов изменения частоты резистентных изолятов в течение 2010-2016 гг.

Резистентностью к ERY и CLI (CLI – без учета индуцибельной резистентности) в 2013-2016 гг. обладали 35,4% (224/633) и 21,9% (138/631) изолятов пневмококка соответственно. Тестирование МПК у ERY- и CLI-резистентных пневмококков показало, что более 90% из них имело МПК ≥ 256 мг/л.

Из 219 PEN-нечувствительных пневмококков 164 (74,9%) имели ассоциированную резистентность к ERY. По выборке в целом доля PEN-нечувствительных/ERY-резистентных изолятов составила 25,9% (164/633).

Распределение МПК PEN и AMX различалось в зависимости от серотипа. Наибольшей устойчивостью к PEN обладали пневмококки серотипа 14. МПК PEN $> 0,06$ мг/л (категория нечувствительных, т.е. умеренно-резистентных и резистентных) была зарегистрирована у 69,7% (108/155) изолятов этого серотипа, из них два (1,3%) были полностью резистентны к PEN (МПК > 2 мг/л). Из числа 19F-пневмококков 60,3% (114/121) были PEN-нечувствительными, при этом семь (5,8%) из них относились к категории резистентных.

Анализ серотиповых особенностей распределения МПК AMX показал следующую картину. Большинство исследованных пневмококков соответствовало категории чувствительных (МПК AMX ≤ 2 мг/л). AMX-резистентностью с МПК > 4 мг/л обладали три (2,1%) пневмококка серотипа 14 и четыре (3,3%) 19F-пневмококков, а среди 6В- и 23F-пневмококков таких изолятов не было. При этом значения МПК₉₀ AMX для серотипов 6В и 23F были невысоки ($\leq 0,25$ мг/л). Наибольшая МПК₅₀ AMX, составившая 1 мг/л, была обнаружена у пневмококков 14 серотипа, а самая высокая МПК₉₀ была у 19F-пневмококков – 4 мг/л.

Из 224 ERY-резистентных пневмококков 37,9% изолятов были носителями гена *ermB*, еще у 41,1% изолятов было выявлено сочетание *ermB* и *mef*. Ген *mef* имели 17,9% ERY-резистентных изолятов, еще у 3,1% изолятов ни один из генов не определялся. Таким образом, ведущим механизмом резистентности к ERY стало метилирование мишени, опосредуемое через ген *ermB*, который был обнаружен у 79% (177/224) ERY-резистентных пневмококков. *ermB*-механизм предполагает устойчивость ко всем макролидам, линкозамидам и стрептограмину В, определяя так называемый MLS_B-фенотип. Тестирование чувствительности к линкозамиду CLI показало наличие резистентности к нему у 142 из 224 (63,4%) ERY-резистентных пневмококков, что соответствовало конститутивному MLS_B-фенотипу (сMLS_B). Ген *ermB* был обнаружен у 138 из 142 сMLS_B-изолятов; оставшиеся четыре изолята оказались *ermB/mef*-негативными (Таблица 5).

При рутинном тестировании диско-диффузионным методом чувствительность к CLI показали 82 из 224 (36,6%) ERY-резистентных пневмококков. Эти изоляты были исследованы на наличие индуцибельной резистентности к CLI (фенотип iMLS_B) путем определения активности CLI в присутствии макролида. Подавление активности CLI было выявлено у 40 из 82 (49%) изолятов, что позволило отнести их к CLI-резистентным пневмококкам с iMLS_B-фенотипом. Все

iMLS_B-пневмококки (за исключением двух) были носителями *ermB*, как и изоляты с конститутивной устойчивостью к CLI. В отношении остальных 42 изолятов (51%) CLI сохранял активность в присутствии ERY, т.е. эти изоляты были CLI-чувствительными, обладая М-фенотипом (устойчивость только к макролидам). Среди пневмококков с М-фенотипом доминировали носители *mef* (40 из 42, 95%). В целом, с учетом индуцибельной резистентности, в выборке 2013-2016 гг. доля CLI-резистентных пневмококков составила 28,8% (182/631), а среди ERY-резистентных изолятов этого периода □ 81,3% (182/224).

Таблица 5

**Носительство генов *ermB* и *mef* у эритромицинрезистентных пневмококков
и их чувствительность к клиндамицину**

Фенотип	n (%)	Генотип, % (n)			
		<i>ermB</i> + <i>/mef</i> -	<i>ermB</i> + <i>/mef</i> +	<i>ermB</i> - <i>/mef</i> +	<i>ermB</i> - <i>/mef</i> -
Всего ERY-резистентных	224 (100%)	37,9% (85)	41,1% (92)	17,9% (40)	3,1% (7)
Из них ^a:					
cMLS_B-фенотип (CLI-резистентность)	142 (63,4%)	40% (57)	57% (81)	0	3% (4)
iMLS_B-фенотип (CLI-резистентность)	40 (17,9%)	70% (28)	25% (10)	2,5% (1)	2,5% (1)
М-фенотип (CLI-чувствительность)	42 (18,7%)	0	0	95% (40)	5% (2)

Примечание. ERY – эритромицин, CLI – клиндамицин.

^a cMLS_B-фенотип – конститутивная устойчивость ко всем макролидам, линкозамидам, стрептограмину В; iMLS_B-фенотип – индуцибельная устойчивость ко всем макролидам, линкозамидам, стрептограмину В (наличие индуцибельной устойчивости регистрировали в случае уплощения зоны подавления роста вокруг диска с CLI, расположенного рядом с ERY-диск); М-фенотип – устойчивость к 14- и 15-членным макролидам.

Таким образом, за семь лет наблюдения крупных сдвигов в структуре серотипов носоглоточных пневмококков не произошло. Они сохраняют высокую чувствительность к АМХ, однако значимо возросла их устойчивость к макролидам, что, с учетом преобладающего механизма резистентности, затрудняет использование любых макролидов и линкозамидов для эмпирической терапии пневмококковых инфекций у детей.

Как показал анализ динамики отдельных серотипов в течение 2010-2016 гг. произошло повышение доли серотипа 14 в общей структуре пневмококковых серотипов с 8% в 2010-2011 гг. до 13-15% в 2014-2016 гг. ($\chi^2=10,5$, $p=0,033$). Кроме того, был зафиксирован рост устойчивости пневмококков серотипа 14 к различным классам АМП, включая PEN, ERY и CLI. В 2013-2015 гг.

по сравнению с 2010-2012 гг. доля PEN-устойчивых изолятов возросла до 92%, а устойчивыми к ERY и CLI стали 80% и 74% соответственно, при этом доля изолятов с МЛУ увеличилась до 74%. Устойчивость к SXT была на высоком уровне в оба периода исследования (77-80%). AMX и CHL сохраняли активность в отношении большинства исследованных изолятов. Доля пневмококков, устойчивых к этим АПМ, составила 7% и 4% соответственно. Для того чтобы определить возможную взаимосвязь изменений спектра антибиотикочувствительности со сдвигами в клональной структуре, мы провели МЛСТ пневмококков серотипа 14, полученных в 2010-2015 гг., разделив выборку по времени выделения изолятов на два периода: 2010-2012 и 2013-2015 гг. (в каждую группу вошло по 39 изолятов). Всего было выявлено 26 сиквенс-типов (в том числе 13 новых сиквенс-типов), 19 (70%) из которых принадлежали трем клонам, включая СС15 (семь сиквенс-типов), СС143 (семь сиквенс-типов) и СС156 (пять сиквенс-типов) (Рисунок 5).

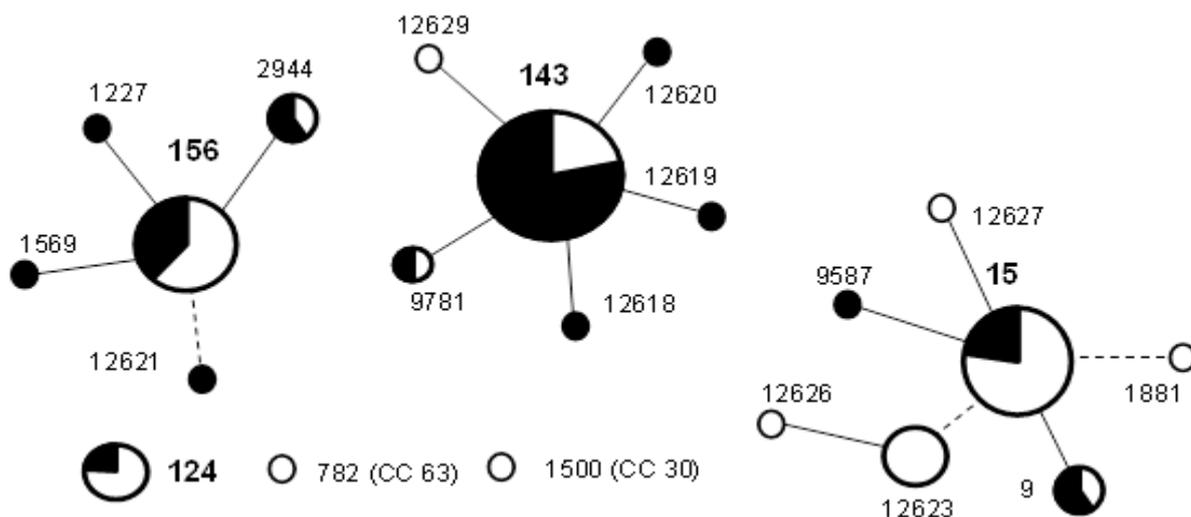


Рисунок 5. Популяционная структура пневмококков серотипа 14, выделенных в 2010-2015 гг., eBURST-анализ

Примечание. Однолокусные варианты (SLV) обозначены сплошными линиями, двухлокусные варианты (DLV) - пунктирными линиями. Размер круга пропорционален числу изолятов. Белым цветом представлены изоляты, выделенные в 2010-2012 гг., черным – в 2013-2015 гг.

Несмотря на то, что ST143 является DLV ST156 (по локусам *gdh* и *recP*), для целей настоящего исследования мы выделили ST143 и родственные сиквенс-типы, которые отличались от ST156 по динамике распространенности и профилю устойчивости к АМП, в отдельный клональный комплекс.

СС15, СС143 и СС156 содержали большинство исследованных изолятов (67/78, 86%), а самым представительным по их числу стал СС143 (39%, 30/78). В СС143 доминировали пневмококки ST143 (73%, 22/30), которые также лидировали по выборке в целом на уровне сиквенс-типа (28%, 22/78). Доли двух других ведущих сиквенс-типов ST15 и ST156 составили

13% (10/78) и 10% (8/78) соответственно. Распространенность как клональных комплексов, так и отдельных сиквенс-типов значительно отличалась в зависимости от периода ($\chi^2=19$, $p<0,001$ и ($\chi^2=38$, $p=0,043$ соответственно).

Так, в 2010-2012 гг. в популяции преобладал СС15 (41%, 16/39), а СС143 и СС156 были менее представительны (18%, 7/39 каждый). При этом 23% (9/39) выборки этого периода составляли сиквенс-типы из других клональных групп. Напротив, в 2013-2015 гг. лидирующим клоном стал СС143, который составил долю в 59% (23/39) в числе изолятов этого периода ($z=3,72$, $p<0,001$), а доля СС15 снизилась до 13% (5/39) ($z=-2,81$, $p=0,005$). Доля СС156 изменилась незначительно, составив 23% (9/39) ($z=0,56$, $p=0,575$), а распространенность сиквенс-типов из группы «Другие» значительно уменьшилась до 5% (2/39; $z=-2,26$, $p=0,023$). Возрастание доли СС143 произошло преимущественно за счет пневмококков ST143, которые увеличили свое представительство с 10% (4/39) в 2010-2012 гг. до 46% (18/39) в 2013-2015 гг. ($z=3,52$, $p<0,001$). Сокращение СС15 было обусловлено значимым снижением доли ST15 с 21% (8/39) до 5% (2/39) ($z=-2,03$, $p=0,042$) и прекращением циркуляции пневмококков ST12623 (4/39 против 0/39 в 2010-2012 и 2013-2015 гг. соответственно; $z=-2,05$, $p=0,04$).

Таким образом, число сиквенс-типов пневмококков серотипа 14 сократилось с 19 в 2010-2012 гг. до 15 в 2013-2015 гг. Экспансия СС143 привела к снижению разнообразия циркулирующих генотипов (т.е. к повышению клональности в популяции пневмококков серотипа 14). Это выразилось в статистически значимом уменьшении индекса биоразнообразия Шеннона за время исследования с 2,63 (95% ДИ 2,93-2,33) до 2,05 (95% ДИ 2,47-1,64) (t-тест Хатчисона, $t=2,22$, $p=0,03$).

Пневмококковые клоны серотипа 14 обладали разным профилем чувствительности к АМП. Изоляты СС143 отличались МЛУ-фенотипом (29/30, 97%), 100% были нечувствительны к PEN с высокой МПК₅₀ и МПК₉₀ (1 мг/л); 97% обладали резистентностью к ERY (МПК₅₀, МПК₉₀ ERY ≥ 256 мг/л), причем у 97% (28/29) ERY-резистентных изолятов присутствовал ген *ermB*, что делало их CLI-резистентными и придавало MLS_B-фенотип. Большинство СС143-изолятов сохраняли чувствительность к AMX (2/30 нечувствительных, в т.ч. один AMX-резистентный). Устойчивость к SXT проявляли 87% (26/30) СС143-изолятов. Все изоляты СС143, выделенные с 2010 по 2015 гг., были чувствительны к CHL. Фенотип изолятов СС143 за время исследования качественно не изменился, а их вклад в уровень резистентности вырос за счет увеличения доли в популяции циркулирующих пневмококков. Отметим, что в 2013-2015 гг. СС143 был представлен ST143, к которому принадлежало 46% (18/39) из общего числа изолятов в данном периоде исследования, и пятью SLV этого сиквенс-типа, четыре из которых были впервые описаны. Кроме того, в 2013-2015 гг. пневмококки ST143, ST9781 и ST12620 приобрели дополнительную детерминанту устойчивости к макролидам, став носителями гена *mf*, который наряду с *ermB*

присутствовал у семи из 23 ERY-резистентных изолятов этого периода. У других клонов одновременного носительства *ermB* и *mef* выявлено не было. Большинство из 21 CC15-изолята сохраняло чувствительность к бета-лактамам, лишь четыре изолята (19%) ST15 (n=3) и ST9587 (n=1) обладали умеренной резистентностью к PEN с МПК 0,12-1 мг/л (МПК₉₀ 0,5 мг/л). Устойчивость к ERY и CLI была выявлена соответственно у 8 (38%) и 5 (27%) изолятов CC15. Три из восьми ERY-резистентных изолятов (все – ST9) были носителями гена *mef* с M-фенотипом, т.е. они сохраняли чувствительность к CLI. Два из трех CHL-резистентных изолятов всей исследованной выборки относились к данному клональному комплексу.

Большинство CC15-изолятов (16/21, 76%) были устойчивы к SXT. В 2010-2012 гг. клон CC15 был представлен 16 изолятами, относившимися к шести сиквенс-типами, среди которых преобладали ST15 (n=8) и его DLV, впервые описанный ST12623 (n=4). Все ST12623-изоляты были чувствительны к PEN, ERY и CLI, четверть из них к CHL. В 2013-2015 гг. CC15 составляло пять изолятов трех сиквенс-типов, все были резистентны к ERY, 3/5 – нечувствительны к PEN. МЛЮ была выявлена у 24% (5/21) CC15-изолятов. CC156 в рассматриваемые периоды был представлен ST156 и четырьмя его SLV. Фенотипический профиль CC156-изолятов в целом за время наблюдения не претерпел заметных изменений. Все они были нечувствительны к PEN с МПК₉₀ 2 мг/л, 19% (3/16) обладали сниженной чувствительностью к AMX (МПК₉₀ 4 мг/л), 88% (14/16) были резистентны к SXT. В то же время, большинство CC156-пневмококков сохраняли чувствительность к ERY и CLI, в том числе все пневмококки ST156. Резистентностью к этим АМП обладали пневмококки ST1227 (n=2), ST1569 (n=1) и ST2944 (n=1). Доля изолятов с МЛЮ-фенотипом в CC156 была невысока – 25% (4/16).

Изоляты ST124 (CC124, n=4), ST782 (n=1, CC63), ST1500 (n=1, CC30) были чувствительны ко всем тестируемым АМП (ST782 был устойчив к SXT). Изоляты синглетонов ST12621 и ST12624, а также группы из двух сиквенс-типов ST12622 (1 из 2 изолятов) и ST12625 были устойчивы к PEN с МПК 0,25-1 мг/л. Группа ST12622/12625 обладала резистентностью к ERY и CLI с MLS_B-фенотипом, связанной с носительством *ermB*. Эта группа из трех изолятов, единственная из числа внеклональных изолятов, обладала МЛЮ-фенотипом. Разнообразие клональных линий и сиквенс-типов 19А-пневмококков в зависимости от времени выделения и его географии представлено на Рисунке 6.

Всего было выявлено 25 сиквенс-типов (14 из них были описаны впервые), принадлежавших к шести основным клонам; три сиквенс-типа не имели определенной клональной принадлежности, т.е. были синглетонами. Распределение клональных комплексов в течение периода исследования существенно различалось ($\chi^2 = 29,60$, $p < 0,001$). Европейские изоляты 2003 г. были представлены двумя клонами, CC663 (n=12) и CC156 (n=6). В период 2010-2013 гг. распространенность этих клонов снизилась, и они были в значительной степени

замещены клонами CC230 и CC320, которые составили 73% (16/22) от всех изолятов, выделенных в 2010-2013 гг. Пять из девяти изолятов из азиатской части России были представлены синглтонами; три изолята принадлежали к CC230.

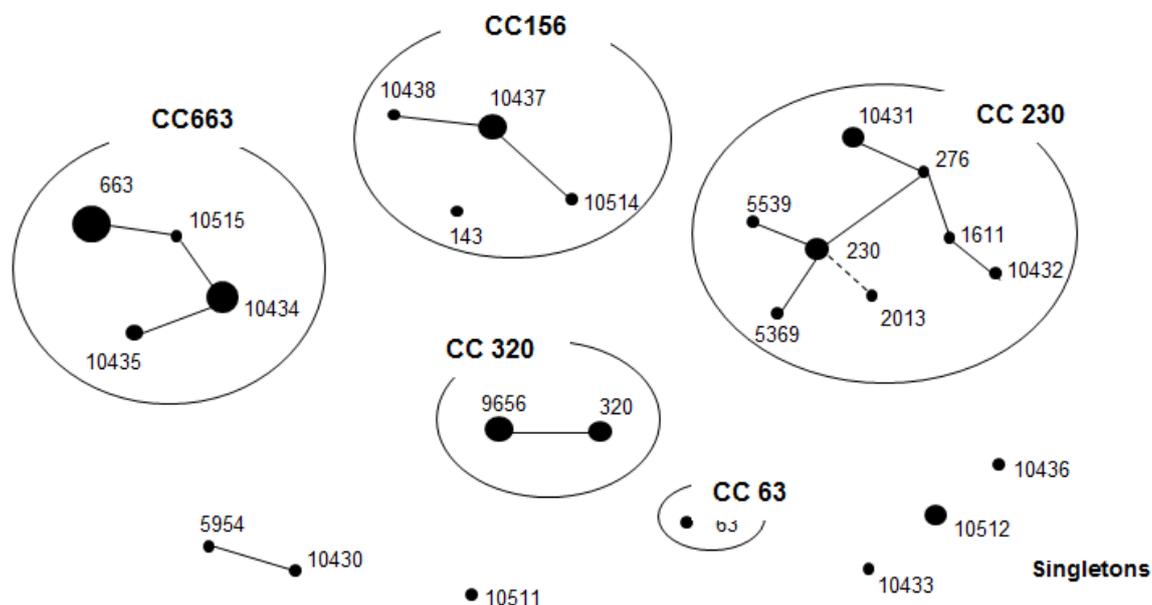


Рисунок 6. Популяционная структура пневмококков серотипа 19А, выделенных в России в 2002-2013 гг., eBURST анализ

Примечание. SLV обозначены сплошными линиями; DLV - пунктирными линиями. Размер круга пропорционален числу изолятов.

Наиболее распространенный клон CC663 ($n=14$, 28% от всей коллекции) был представлен четырьмя родственными сиквенс-типами. CC663 преобладал в европейской части России в 2003 году (67%); в 2010-2013 гг. были выделены только два изолята CC663. Большинство изолятов CC663 (79%) имели МЛУ-фенотип с высокими значениями МПК β -лактамов.

Все резистентные к цефтриаксону изоляты ($n=4$; МПК > 2 мг/л) принадлежали к этому клональному комплексу. Более того, изоляты ST10434 ($n=5$), входящего в CC663, обладали экстремальной резистентностью, т.к. были нечувствительны к пяти из шести тестируемых групп антибиотиков, включая пенициллин, эритромицин, клиндамицин, тетрациклин и хлорамфеникол; они сохраняли чувствительность только к ко-тримоксазолу.

Вторым по распространенности клоном был CC230 ($n=12$, 25% от всей коллекции), который включал восемь сиквенс-типов. Большинство изолятов CC230 было выделено в Москве в 2010-2013 гг., составляя 41% от этой части коллекции; три изолята было получено в азиатской части России. CC230 характеризовался умеренными и низкими значениями МПК β -лактамов, в большинстве случаев сохранял чувствительность к клиндамицину, тетрациклину и

хлорамфениколу, но обладал резистентностью к ко-тримоксазолу. МЛУ обладали пять (42%) изолятов СС230, которые были резистентны к эритромицину.

СС156 был представлен семью 19А-пневмококками (14% от всей коллекции), относящимися к четырем сиквенс-типам. Шесть из семи изолятов были выделены в городах европейской части России в 2003 году, сформировав субклон в составе трех новых близкородственных сиквенс-типов: ST10437, ST10438 и ST10514. Эти пневмококки обладали примечательным фенотипом, будучи полностью резистентными к амоксициллину с МПК 4-8 мг/л, которые превышали МПК пенициллина. Кроме того, эти изоляты были устойчивы к ко-тримоксазолу, но сохраняли чувствительность к эритромицину, клиндамицину, тетрациклину и хлорамфениколу.

СС320-пневмококки (n=7, 14% от всей коллекции) были выделены исключительно в 2010-2013 гг., их доля в этот период составила 32%. СС320 был представлен двумя сиквенс-типами: ST320 (n=3) и ST9656 (n=4; новый однолокусный вариант ST320 по аллели *recP*). Все изоляты СС320 имели МЛУ с высокими МПК пенициллина и амоксициллина (диапазон 1-4 мг/л) и резистентностью к эритромицину и ко-тримоксазолу. Все изоляты, кроме одного, имели более высокие значения МПК амоксициллина, чем МПК пенициллина; все СС320-пневмококки были чувствительны к хлорамфениколу.

Девять изолятов представляли различные клональные линии или несвязанные сиквенс-типы. Все шесть пенициллин-чувствительных 19А-пневмококков принадлежали к этой группе изолятов и не имели МЛУ. Один синглетон (ST10436) демонстрировал высокие значения МПК пенициллина и амоксициллина (2 мг/л).

В целом, чувствительность 19А-пневмококков к β -лактамам была сходной в 2003 и 2010-2013 гг. В течение этого периода доля полностью пенициллин-резистентных изолятов (МПК > 2 мг/л) снизилась с 28% (5/18) до 5% (1/22) (p=0,041). Несмотря на то, что доля эритромицин-резистентных 19А-пневмококков осталась неизменной (67-68%), доля изолятов, несущих две детерминанты резистентности к эритромицину *ermB* и *mef*, увеличилась с 17% (2/12) в 2003 году до 60% (9/15) в 2010-2013 гг. (p=0,023). Частота хлорамфеникол-резистентных изолятов значительно снизилась с 33% (6/18) до 5% (1/22) (p=0,017). Наоборот, доля резистентных ко-тримоксазолу изолятов в течение периода исследования увеличилась с 44% (8/18) до 82% (18/22) (p=0,014).

Таким образом, 80% изученной коллекции изолятов 19А-пневмококков относились к четырем глобально распространенным клональным комплексам: СС156, СС230, СС320 и СС663. Циркулирующие в настоящее время в Европейской части России пневмококки серотипа 19А относятся преимущественно к СС230 и СС320 (70%), замещая распространенные ранее СС156 и СС663. Все изоляты СС156, СС320 и СС663 имели значения МПК пенициллина ≥ 1 мг/л, в то

время как изоляты СС230 характеризовались умеренными и низкими значениями МПК пенициллина, и были полностью чувствительны к амоксициллину и цефтриаксону. Это свидетельствует о клональных различиях чувствительности к β -лактамным антибиотикам в исследуемой популяции пневмококков. Поскольку данная коллекция изолятов была получена до включения ПКВ в Национальный календарь профилактических прививок в 2014 году, описанная эволюция колнальной структура пневмококков серотипа 19А носила ПКВ-независимый характер, как и в некоторых других регионах. Распространение небольшого числа клонов серотипа 19А скорее всего связано с их конкурентными преимуществами на генном уровне, а также с селективным давлением антибиотиков.

7. Распространенность и механизмы устойчивости к макролидам *Streptococcus pyogenes*, выделенных у детей

Изучение частоты и молекулярных механизмов резистентности *S. pyogenes* к макролидам и линкозамиду проходило в 3 периода: 1-й - 2011- 2012 гг (246 штаммов), 2-й - 2013 -2014 (273 штамма) и 3-й - с января 2015 по декабрь 2016 г (267 штаммов). Все 786 исследованных за эти периоды штаммы *S. pyogenes* были выделены при культуральном исследовании 27011 мазков из зева, носа, вагины, отделяемого среднего уха и др., полученных от детей при консультативных поликлинических осмотрах и в соматических отделениях клиник.

Данные антибиотикочувствительности *S. pyogenes* к препаратам, относящимся к разным группам показали, что уровень нечувствительности микроорганизма к макролидам составил 15,7%, к клиндамицину – 9,4%, к ко-тримоксазолу - 14,3% и тетрациклину - 8,4%. Самые низкие значения нечувствительности *S. pyogenes* выявлены к хлорамфениколу – у 2,6% штаммов и левофлоксацину - 4,5%.

Поскольку макролиды и линкозамиды рассматриваются как альтернативные препараты для лечения пенициллин устойчивых стрептококков, необходим мониторинг устойчивости данных микроорганизмов к этой группе антибиотиков. Нами была прослежена динамика роста устойчивости *S. pyogenes* к макролидам и линкозамидам в течение 2011-2016 гг.

Результаты исследования, полученные при анализе уровней устойчивости *S. pyogenes* в течение 6-летнего периода (2011 - 2016 гг), позволили выявить рост нечувствительности микроорганизма как к отдельным представителям макролидных препаратов, так и к линкозамидам (клиндамицину) (рисунок 7). В 2011-2012 гг доля штаммов *S. pyogenes*, нечувствительных (резистентные и умеренно резистентные) к эритромицину, азитромицину, кларитромицину и клиндамицину (маркеру устойчивости к джозамицину и другим 16-членным макролидам), находилась на низком уровне и составила 4,9%, 6,5%, 2,8% и 2,4% соответственно.

В 2013 - 2014 гг частота выделения устойчивых штаммов выросла более чем в 2 раза и составила для перечисленных антибиотиков 13,5%, 13,5%, 9,2%. Однако к клиндамицину и 16-членным макролидам она по-прежнему сохранялась на низком уровне (3,8%). Для последнего наблюдаемого периода (2015 - 2016 гг) был характерен продолжающийся небольшой рост устойчивости *S. pyogenes* к эритромицину, достигший 15,7% и резкий подъем устойчивости к клиндамицину (до 9,4%).

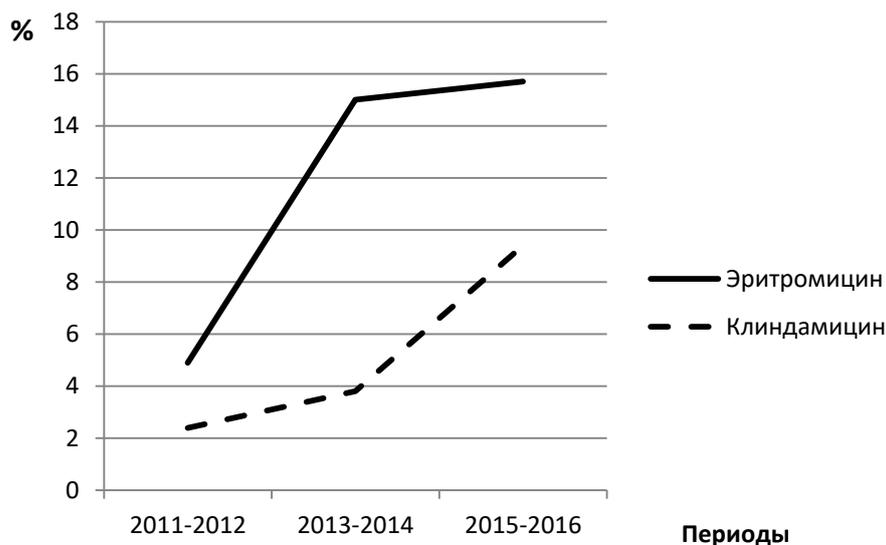


Рисунок 7. Динамика устойчивости *S. pyogenes* к макролидам и клиндамицину в течение 2011-2016 гг

Результаты определения фенотипа устойчивости у 46 эритромицин-резистентных изолятов, выделенных в 2014 – 2016 годах (6 изолятов выделены в 2013-2014 г и 40– в 2015 -2016 гг), показали, что 11 (24%) из них имели М-фенотип, столько же (24%) - iMLS_B фенотип и 52% - cMLS_B фенотип. У изолятов с М-фенотипом резистентности МПК эритромицина колебалась от 4 до 32 мг/л, у 33 штаммов с iMLS_B и cMLS_B фенотипами МПК эритромицина составляла 128-256 мг/л и лишь у одного изолята она была на уровне 4 мг/л. Для изолятов с М-фенотипом также были характерны низкие показатели МПК клиндамицина. Они составляли от 0,047 мг/л до 0,125 мг/л, что позволяло отнести их к категории чувствительных. У 11 изолятов с iMLS_B-фенотипом МПК клиндамицина была в пределах 0,064 - 0,38 мг/л, и они также входили в категорию чувствительных микроорганизмов.

Высокие (≥ 256 мг/л) значения МПК эритромицина имели изоляты с cMLS_B фенотипом устойчивости, а МПК клиндамицина у таких изолятов не отличалась единообразием, поскольку у половины из них уровень МПК находился на сравнительно низких значениях (от 0,75 до 3 мг/л). У одного изолята МПК клиндамицина составляла 0,5 мг/л, т.е. находилась на пороговом уровне,

но по данным диско-диффузионного метода этот изолят был определен как нечувствительный к антибиотику. У остальных 12 штаммов с сMLS_B-фенотипом устойчивости показатели МПК клиндамицина были ≥ 256 мг/л.

Следует отметить, что изоляты с М-фенотипом были резистентны ко всем исследованным 14- и 15-членным макролидам при сохранении чувствительности к 16-членному макролиду и клиндамицину. Изоляты с iMLS_B-фенотипом (n=11) также были нечувствительны к 14- и 15-членным макролидам, чувствительность к 16-членным макролидам была отмечена у 2-х из них. Штаммы *S. pyogenes* с сMLS_B-фенотипом были нечувствительны ко всем макролидным антибиотикам и к клиндамицину.

Результаты детекции генов, кодирующих резистентность *S. pyogenes* к макролидным антибиотикам, показали, что только у 11 из 46 изолятов (24%) была экспрессия *mef* гена, кодирующего эффлюксный механизм устойчивости. Все штаммы с *mef*-зависимым эффлюксом относились к М-фенотипу. У 22 (48%) эритромицин-резистентных *S. pyogenes* был обнаружен *ermB*-ген в качестве одной детерминанты, а в 11 (24%) случаях *ermB*-ген находился в ассоциации с *mef*-геном. У двух (4%) изолятов гены резистентности не были идентифицированы. Эритромицин-резистентные изоляты с *ermB*-геном, а также с комбинацией *mef* – гена имели iMLS_B и сMLS_B фенотипы устойчивости.

ВЫВОДЫ

1. Грамотрицательная госпитальная микробиота быстро колонизировала поступающих в отделение реанимации и интенсивной терапии пациентов и отличалась высокой антибиотикорезистентностью. В трахеальном аспирате пациентов, находящихся на искусственной вентиляции легких, преобладали *A. baumannii*, *K. pneumoniae* и *P. aeruginosa*.
2. Большинство изученных госпитальных изолятов *A. baumannii* были устойчивы к основным группам антимикробных препаратов, включая карбапенемы. Среди карбапенемрезистентных изолятов доминировали два клональных комплекса: CC92^{Oxf}/CC2^{Pas} и CC944^{Oxf}/ST78^{Pas}. Ведущим механизмом резистентности к карбапенемам стала продукция карбапенемазы OXA-72; ген *bla*_{OXA-72} был выявлен у 85% изолятов.
3. Основным механизмом устойчивости к карбапенемам у госпитальных изолятов *K. pneumoniae* была продукция карбапенемазы OXA-48, которая в большинстве случаев сочеталась с наличием β-лактамаз расширенного спектра.
4. Популяционная структура госпитальных изолятов карбапенемрезистентных *P. aeruginosa* отличалась разнообразием неродственных сиквенс-типов (21 уникальный сиквенс-тип), на

фоне которого преобладали международные клоны высокого эпидемического риска ST111, ST235, ST446, ST654, ST2592. Ген VIM-подобной карбапенемазы присутствовал у 57% карбапенемрезистентных *P. aeruginosa*; носительство *bla_{VIM}* было ограничено сиквенс-типами ST111, ST235, ST654.

5. В течение семилетнего периода наблюдения (2010-2016 гг.) структура носоглоточных серотипов *S. pneumoniae* в целом изменилась незначимо: шесть ведущих педиатрических серотипов 3, 6A, 6B, 14, 19F и 23F суммарно представляли 63,2% выборки; у детей до 5 лет серотипы, входящие в состав 13-валентной пневмококковой конъюгированной вакцины, составляли долю 74%. На уровне отдельных серотипов было отмечено возрастание доли серотипа 14 с 8% до 15% за счет экспансии клона CC143, характеризовавшегося множественной лекарственной устойчивостью.
6. В период 2010-2016 гг. отмечено нарастание устойчивости *S. pneumoniae* к оксациллину с 21,3% до 35,9% и эритромицину с 24,5% до 36,9%, при этом устойчивостью к амоксициллину обладали менее 5% изолятов.
7. *ermB*-опосредованный механизм был доминирующим механизмом резистентности к макролидам у *S. pneumoniae* (80%) и *S. pyogenes* (72%), обеспечивая эритромицинрезистентным изолятам конститутивный или индуцибельный MLS_B-фенотип, т. е. перекрестную устойчивость к макролидам, линкозамидам и стрептограмину В.
8. *S. pneumoniae* серотипа 19A, выделенные в 2010-2013 гг., относились преимущественно к клональным комплексам CC230 и CC320, заместив распространенные ранее CC156 и CC663.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Для проведения адекватной антибактериальной терапии в отделениях реанимации и интенсивной терапии необходимо проводить мониторинг распространения микроорганизмов и контроль устойчивости к антимикробным препаратам преобладающих микроорганизмов.
2. Для выявления механизмов формирования устойчивости к β-лактамам целесообразно использовать молекулярные методы детекции детерминант резистентности.
3. При проведении эпидемиологического анализа госпитальных изолятов целесообразно проводить мультилокусное сиквенс-типирование.
4. Для обеспечения адекватной эмпирической антибактериальной терапии пневмококковых инфекций и инфекций, вызванных *S. pyogenes*, необходимо проводить локальный

мониторинг устойчивости респираторных патогенов к β -лактамным антибиотикам и макролидам.

5. Для мониторинга влияния вакцинации против пневмококка на бактериальную популяцию целесообразно проведение динамического контроля серотипового спектра *S. pneumoniae* и молекулярного исследования клонального разнообразия.

ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШЕЙ РАЗРАБОТКИ ТЕМЫ

1. Продолжение мониторинга микробиоты в педиатрических ОРИТ с использованием методов молекулярной эпидемиологии с целью клональной характеристики резистентной микробиоты.
2. Продолжение исследований, направленных на оценку распространенности резистентности и ее мониторинг среди *A. baumannii*, *K. pneumoniae* и *P. aeruginosa*.
3. Продолжение изучения роли генов карбапенемаз, способности к биопленкообразованию в развитии устойчивости *A. baumannii*, *K. pneumoniae* и *P. aeruginosa* к карбапенемам.
4. Исследование альтернативных механизмов резистентности к различным классам антибиотиков, включая эфлукс, нарушение функционирования пориновых каналов, модификацию пенициллинсвязывающих белков.
5. Дальнейший анализ динамики серотипового состава *S. pneumoniae* под влиянием универсальной вакцинации пневмококковыми конъюгированными вакцинами.
6. Продолжение динамического изучения антибиотикоустойчивости актуальных респираторных патогенов и характеристика молекулярно-генетических особенностей резистентных штаммов.

ПЕРЕЧЕНЬ РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Маянский, Н.А. Антибиотикорезистентность и клональная эволюция *Streptococcus pneumoniae* серотипа 19 А в России, 2003-2013 гг. / Н.А. Маянский, Т.А. Савинова, Н.М. Алябьева, О.А. Пономаренко, Е.А. Бржозовская, **А.В. Лазарева**, Л.К. Катосова, Р.С. Козлов // **Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия.** – 2017. –Т. 19, № 2. – С. 145-151.
2. Маянский, Н.А. Динамика распространенности серотипов и антибиотикорезистентности носоглоточных пневмококков, выделенных у детей в 2010-2016 гг.: результаты ретроспективного когортного исследования / Н.А. Маянский, Н.М. Алябьева, О.А. Пономаренко, Т.В. Куличенко, И.В. Артемова, **А.В. Лазарева**, Е.А. Бржозовская, О.В. Шамина, Л.К. Катосова // **Вопросы современной педиатрии.** – 2017. – Т.16, №5. – С. 413-423.

3. Mayanskiy, N. Antimicrobial resistance, penicillin-binding protein sequences, and pilus islet carriage in relation to clonal evolution of *Streptococcus pneumoniae* serotype 19A in Russia, 2002-2013 / N Mayanskiy, T Savinova, N Alyabieva, O Ponomarenko, E Brzhozovskaya, **A. Lazareva**, L. Katosova, R. Kozlov // *Epidemiology and Infection*. – 2017. – Vol. 145, № 8. – P.1708-1719.
4. Mayanskiy, N. Emergence of the Uncommon Clone ST944/ST78 Carrying blaOXA-40-like and blaCTX-M-like Genes Among Carbapenem-Nonsusceptible *Acinetobacter baumannii* in Moscow, Russia. / N Mayanskiy, I Chebotar, N Alyabieva, O Kryzhanovskaya, T Savinova, A Turenok, Y Bocharova, **A Lazareva**, S Polikarpova, O Karaseva // *Microbial Drug Resistant*. – 2017. – Vol. 23, № 7. – P. 864-870.
5. Катосова, Л.К. Распространение и механизмы устойчивости к макролидам *Streptococcus pyogenes*, выделенных у детей / Л.К. Катосова, **А.В. Лазарева**, Т.А. Хохлова, О.А. Пономаренко, Н.М. Алябьева // **Антибиотики и химиотерапия**. – 2016. – Т. 61, № 3-4. – С. 23-29.
6. Крыжановская, О.А. Устойчивость к антибиотикам и молекулярные механизмы резистентности у карбапенем-нечувствительных изолятов *Klebsiella pneumoniae*, выделенных в педиатрических ОРИТ г. Москвы / О.А. Крыжановская, **А.В. Лазарева**, Н.М. Алябьева, Р.Ф. Тепаев Р.Ф., О.В. Карасева, И.В. Чеботарь, Н.А. Маянский // **Антибиотики и химиотерапия**. – 2016. – Т. 61, № 7-8. – С. 22-26.
7. Маянский, Н.А. Чувствительность к антибиотикам, клональное и серотиповое разнообразие пневмококков у детей с острым средним отитом в г. Москве / Н.А. Маянский, Н.М. Алябьева, М.А. Лазарева, А.М. Иваненко, О.А. Пономаренко, **А.В. Лазарева**, Л.К. Катосова, Т.В. Куличенко Т.В. // **Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия**. – 2016. – Т. 18, № 2. – С. 84-92.
8. Yatsyshina, S. Detection of respiratory pathogens in pediatric acute otitis media by PCR and comparison of findings in the middle ear and nasopharynx / S Yatsyshina, N Mayanskiy, O Shipulina, T Kulichenko, N Alyabieva, L Katosova, **A Lazareva** et al // *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*. – 2016. – Vol. 85, № 1. – P. 125-30.
9. **Лазарева, А.В.** *Pseudomonas aeruginosa*: патогенность, патогенез и патология / А.В. Лазарева, И.В. Чеботарь, О.А. Крыжановская, Н.А. Маянский // **Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия**. – 2015. – Т.17, №3. – С.170-186.
10. Лазарева, М.А. Носоглоточное носительство *Streptococcus pneumoniae* у воспитанников детских домов, дошкольных учреждений и неорганизованных детей младше 5 лет / М.А. Лазарева, Т.В. Куличенко, Н.М. Алябьева, О.А. Пономаренко, **А.В. Лазарева**, Л.К. Катосова, Н.А. Маянский // **Вопросы современной педиатрии**. – 2015. – Т. 14, № 2. – С. 246-255.

11. Маянский, А.Н. Пневмококковые биопленки / А.Н. Маянский, И.В. Чеботарь, **А.В. Лазарева**, Н.А. Маянский // Молекулярная генетика, микробиология и вирусология. – 2015. –Т. 33, № 3. – С. 16-22.
12. Mayanskiy, N. Bacterial etiology of acute otitis media and characterization of pneumococcal serotypes and genotypes among children in Moscow, Russia. / N Mayanskiy, N Alyabieva, O Ponomarenko, A Pakhomov, T Kulichenko, A Ivanenko, M Lazareva, **A Lazareva**, L Katosova et al // The Pediatric Infectious Disease Journal. – 2015. – Vol. 34, № 3. – P. 255-60.
13. Крыжановская, О.А. Масс-спектрометрическая идентификация возбудителей инфекций кровотока: опыт в педиатрической практике / О.А. Крыжановская, **А.В. Лазарева**, О.А. Пономаренко, Л.К. Катосова, Р.Ф. Тепаев, О.В. Карасева, И.В. Чеботарь. // **Российский педиатрический журнал**. – 2014. - Т. 17, №5. – С. 4-9.
14. **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.59, №7-8. – С.8-15.
15. Маянский, Н.А. Серотиповое разнообразие и резистентность пневмококков / Н.А. Маянский, Н.М. Алябьева, **А.В. Лазарева**, Л.К. Катосова // **Вестник Российской академии медицинских наук**. – 2014. – Т. 69, № 7-8. – С. 38-45
16. Чеботарь, И.В. *Acinetobacter*: микробиологические, патогенетические и резистентные свойства / И.В. Чеботарь, **А.В. Лазарева**, Я.К. Масалов, В.М. Михайлович, Н.А. Маянский// Вестник Российской академии медицинских наук. – 2014. – Т.69, № 9-10. – С.39-50.
17. Mayanskiy, N. Serotypes and antibiotic resistance of non-invasive Streptococcus pneumoniae circulating in pediatric hospitals in Moscow, Russia. / N Mayanskiy, N Alyabieva, O Ponomarenko, **A Lazareva**, L Katosova et al // The Pediatric Infectious Disease Journal. – 2014. – Vol. 20. – P. 58-62.
18. Алябьева, Н.М. Молекулярное типирование Streptococcus pneumoniae методом мультиплексной полимеразной цепной реакции с учетом распространенности серотипов в Российской Федерации / Н.М. Алябьева, Т.А. Блинова, О.А. Пономаренко, **А.В. Лазарева**, Л.К. Катосова, Н.А. Маянский // **Вопросы современной педиатрии**. – 2013. – Т.12, №6. – С. 30-34.
19. Баранов, А.А. Роль Streptococcus pneumoniae в структуре бактериальных инфекций у детей, госпитализированных в стационары г. Москвы в 2011-2012 гг. / А.А. Баранов, Л.С. Намазова-Баранова, Н.А. Маянский, Т.В. Куличенко, Т.А. Полунина, **А.В. Лазарева**, Н.М. Алябьева,

- Л.К. Катосова, О.А. Пономаренко, И.Е. Колтунов, А.М. Иваненко, Е.А. Дегтярева и соавт. // **Педиатрическая фармакология.** – 2013. – Т.10, №5. – С. 6-12.
20. Ломинадзе, Г.Г. Применение MALDI-TOF Масс-спектрометрии для идентификации микроорганизмов в гемокультурах пациентов с подозрением на сепсис / Г.Г. Ломинадзе, Е.А. Семенова, О.В. Мотузова, А.Н. Калакуцкая, А.С. Балабанов, **А.В. Лазарева**, О.А. Крьжановская, Л.К. Катосова, Н.А. Маянский // **Вопросы диагностики в педиатрии.** –2013. – Т. 5, № 2. – С. 28-32.
21. Маянский, Н.А. Бактериальная этиология острого среднего отита у детей до 5 лет: роль *Streptococcus pneumoniae* / Н.А. Маянский, Н.М. Алябьева, А.М. Иваненко, О.А. Пономаренко, Л.К. Катосова, **А.В. Лазарева**, Т.В. Куличенко, Л.С. Намазова-Баранова // **Вопросы диагностики в педиатрии.** – 2013. – Т.5, №3. – С.5-13.
22. Чеботарь, И.В. Антибиотикорезистентность биопленочных бактерий / И.В. Чеботарь, А.Н. Маянский, Е.Д. Кончакова, **А.В. Лазарева**, В.П. Чистякова // Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. – 2012. – Т. 14, № 1. – С. 51-58.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

- АМП – антимикробный препарат
- БЛРС – β-лактамаза расширенного спектра
- ВОЗ – Всемирная организация здравоохранения
- ИПИ – инвазивные пневмококковые инфекции
- ИСМП – инфекции, связанные с оказанием медицинской помощи
- карба-Р – штаммы микроорганизмов резистентные к карбапенемам
- карба-Ч – штаммы микроорганизмов чувствительные к карбапенемам
- МБЛ – металло-β-лактамазы
- МЛСТ – мультилокусное сиквенс-типирование
- МЛУ – множественная лекарственная устойчивость
- МПК – минимальная подавляющая концентрация
- ОРИТ – отделение реанимации и интенсивной терапии
- ПКВ – пневмококковая полисахаридная конъюгированная вакцина
- АКН – амикацин
- АМС – амоксициллин/клавуланат
- АМХ – амоксициллин
- АПИ – ампициллин
- СС – клональный комплекс
- СІР – ципрофлоксацин
- СІІ – клиндамицин

COL - колистин

ERY – эритромицин

ETP – эртапенем

FEP – цефепим

FOS – фосфомицин

GMN – гентамицин

IPM – имипенем

MEM – меропенем

NTM – нетилмицин

OXA – оксациллин

PEN – пенициллин

ST – сиквенс-тип

SXT – ко-тримоксазол

TET – тетрациклин

TMN – тобрамицин