

Федеральное государственное автономное учреждение
«Научный центр здоровья детей»
Министерства здравоохранения Российской Федерации

На правах рукописи

Крыжановская Ольга Андреевна

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

03.02.03 - Микробиология

Диссертация на соискание ученой степени

кандидата медицинских наук

Научный руководитель:
доктор медицинских наук,
профессор РАН
Маянский Н.А.

Москва - 2016

СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	4
Актуальность темы исследования.....	4
Степень разработанности темы исследования.....	8
Цель исследования.....	9
Задачи исследования.....	10
Научная новизна.....	10
Теоретическая и практическая значимость.....	12
Методология и методы исследования.....	13
Штаммы микроорганизмов.....	14
Микробиологические методы исследования.....	15
Молекулярно-генетические методы исследования.....	16
Статистические методы.....	22
Личное участие автора в получение результатов.....	22
Основные положения диссертации, выносимые на защиту.....	23
Степень достоверности и апробация результатов исследования	24
ГЛАВА 1. Обзор литературы.....	25
1.1. Структура микробиоты у пациентов ОРИТ.....	26
1.2. Общая характеристика штаммов <i>A. baumannii</i> , <i>P. aeruginosa</i> и <i>K. pneumoniae</i>	28
1.2.1. <i>A. baumannii</i>	28
1.2.2. <i>P. aeruginosa</i>	30
1.2.3. <i>K. pneumoniae</i>	34
1.3. Механизмы формирования резистентности к АМП.....	35
1.3.1. Особенности формирования резистентности к АМП у штаммов <i>A. baumannii</i>	44

1.3.2. Особенности формирования резистентности к АМП у штаммов <i>P. aeruginosa</i>	47
1.3.3. Особенности формирования резистентности к АМП у штаммов <i>K. pneumoniae</i>	49
1.4. Пути преодоления антибиотикорезистентности.....	53
РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ.....	56
ГЛАВА 2. Видовой состав и профиль чувствительности микробиоты у детей в ОРИТ.....	56
2.1. Видовой состав микробиоты у детей в ОРИТ.....	56
2.2. Определение чувствительности штаммов <i>A. baumannii</i> , <i>P. aeruginosa</i> , <i>K. pneumoniae</i> к основным группам АМП.....	60
2.2.1. <i>A. baumannii</i>	61
2.2.2. <i>P. aeruginosa</i>	62
2.2.3. <i>K. pneumoniae</i>	63
ГЛАВА 3. Распространенность генов карбапенемаз и клональная характеристика карбапенем-нечувствительных изолятов <i>A. baumannii</i>	65
ГЛАВА 4. Распространенность металло- β -лактамаз и роль эффлюкс-механизмов в формировании устойчивости к карбапенемам у карбапенем-нечувствительных штаммов <i>P. aeruginosa</i>	77
ГЛАВА 5. Молекулярные механизмы устойчивости к β -лактамным антибиотикам у штаммов <i>K. pneumoniae</i>	85
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	90
ВЫВОДЫ.....	98
ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ.....	99
ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШЕЙ РАЗРАБОТКИ ТЕМЫ.....	99
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	100
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	101

Введение

Актуальность темы исследования

С начала 1990-х гг. наблюдается неуклонный рост числа инфекций, связанных с грамотрицательными возбудителями, которые обладают множественной устойчивостью к антибиотикам [1; 2; 19; 65]. Такие инфекции приводят к повышению заболеваемости и смертности как среди взрослых, так и среди детей, обозначая одну из главных клинических проблем современности на глобальном уровне. Являясь условно-патогенными, указанные возбудители представляют наибольшую опасность для пациентов отделений реанимации и интенсивной терапии (ОРИТ). К колонизации нозокомиальными патогенами и манифестации оппортунистической инфекции в отделениях реанимации и интенсивной терапии предрасполагают как тяжесть состояния пациента, так и различные манипуляции, повышающие вероятность присоединения инфекции. Так, факторами риска служат большие хирургические вмешательства, тяжелые травмы, обширные ожоги, злокачественные новообразования, лучевая, гормональная и цитостатическая терапия, патология новорожденных, младенческий и пожилой возраст, а также искусственная вентиляция легких, диализ, наличие имплантированных медицинских устройств (катетеры, дренажные трубки) и пр. [98; 119].

В структуре грамотрицательных бактерий – возбудителей внутрибольничных инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи, – видное место занимают представители семейства *Enterobacteriaceae* и группы неферментирующих глюкозу бактерий (НФГБ) [26; 27; 28; 111; 117]. По данным многоцентрового эпидемиологического исследования возбудителей нозокомиальных инфекций МАРАФОН 2011-2012 гг., охватившего 25 стационаров 18 городов России, энтеробактерии составляли 34% госпитальных штаммов, причем более половины изолятов относились к *Klebsiella*

pneumoniae [26]. Из числа неферментирующих глюкозу бактерий наибольшее значение имела *Pseudomonas aeruginosa*, один из наиболее распространенных возбудителей нозокомиальных инфекций с долей в структуре патогенов 20-25% [28], и бактерии рода *Acinetobacter*, в первую очередь *Acinetobacter baumannii* (14%) [27]. Таким образом, *A. baumannii*, *P. aeruginosa* и *K. pneumoniae* суммарно составляют более 50% в структуре возбудителей нозокомиальных инфекций.

Клиническая значимость перечисленных возбудителей обусловлена не только их широкой распространенностью, но выраженной способностью приобретать устойчивость к антимикробным препаратам (АМП) [1; 2; 24; 50; 83]. Это свойство наиболее ярко проявляется в условиях отделений реанимации и интенсивной терапии, где с учетом тяжести состояния и высокого риска развития инфекционных осложнений большинство пациентов получают антибиотики широкого спектра действия или комбинации нескольких антимикробных препаратов, что оказывает селективное воздействие и способствует отбору резистентных форм [11; 33].

Преобладание в структуре возбудителей отделений реанимации и интенсивной терапии грамотрицательных бактерий предполагает эффективность нескольких групп антимикробных препаратов, включая β-лактамы, аминогликозиды и фторхинолоны [113; 130; 131]. Интенсивное использование этих групп антибиотиков в популяции тяжелых, иммунокомпрометированных пациентов отделений реанимации и интенсивной терапии стимулирует появление и распространение устойчивых штаммов микроорганизмов. Например, исследование МАРАФОН показало устойчивость 80% нозокомиальных изолятов *K. pneumoniae* к цефалоспорином III-IV поколения, 60% и 71% были устойчивы к аминогликозидам и фторхинолонам, соответственно, а среди *P. aeruginosa* нечувствительными к цефалоспорином III-IV

поколения оказались до 60% изолятов, 60% были резистентны к аминогликозидам, 70% – к фторхинолонам [26; 28].

В связи с ростом устойчивости энтеробактерий, включая *K. pneumoniae*, к антимикробным препаратам, а также распространением среди госпитальной микробиоты у пациентов неферментирующих глюкозу бактерий, которые обладают пониженной природной чувствительностью в отношении многих классов антибиотиков, включая пенициллины и цефалоспорины, в последние годы увеличилось применение резервной группы β -лактамов – карбапенемов [23; 50; 83]. Вовлечение карбапенемов в рутинную клиническую практику сопровождалось ростом резистентности возбудителей к этой группе антимикробных препаратов. Наиболее заметно устойчивость к карбапенемам выросла у *A. baumannii* и *P. aeruginosa*: если в 2002-2004 гг. было выявлено 6% имипенем-нечувствительных *A. baumannii*, то в 2011-2012 гг. их доля составила уже 96% [27]. Для *P. aeruginosa* аналогичные цифры составили 39% и 88%, соответственно [28]. Рост устойчивости к карбапенемам среди энтеробактерий был менее заметным (доля имипенем-нечувствительных изолятов составила 3,6% в 2002-2004 гг. против 8,4% в 2011-2012 гг.) [26].

Описаны различные механизмы, опосредующие устойчивость к карбапенемам. Они включают продукцию ферментов, инактивирующих карбапенемы (карбапенемазы), снижение проницаемости пориновых каналов, повышение активности эффлюксных систем [2; 24; 49; 83]. Наибольшую тревогу вызывает карбапенемазный механизм резистентности, что связано с чрезвычайным разнообразием карбапенемаз и неуклонным ростом их распространенности. Эта группа ферментов инактивирует β -лактамы антибиотики и включает сериновые протеазы (например, КРС- и ОХА-подобные ферменты), а также металло- β -лактамазы (МБЛ), такие как IMP, NDM, VIM [113]. Карбапенемазы из группы МБЛ способны разрушать все β -лактамы

антибиотики (за исключением монобактамов), что резко ограничивает спектр потенциально эффективных антимикробных препаратов. Локализация генов карбапенемаз на подвижных элементах упрощает их внутри- и межвидовую передачу, нередко вместе с генами резистентности к другим классам антибиотиков [2; 24; 49; 83]. Все это способствует появлению и поддержанию циркуляции изолятов с множественной устойчивостью к антимикробным препаратам. Так, во многих стационарах на территории России получили распространение металло- β -лактамазо-продуцирующие *P. aeruginosa*, отличающиеся резистентностью ко всем классам антибиотиков, кроме полимиксинов [27; 66]. Ситуация осложняется тем, что *P. aeruginosa* и другие неферментирующие глюкозу бактерии, включая *A. baumannii*, могут служить резервуаром и векторами для переноса генов карбапенемаз в другие виды грамотрицательных бактерий [113]. Это делает актуальным изучение молекулярных механизмов резистентности, а также проведение генотипирования нозокомиальных возбудителей с целью мониторинга за циркуляцией устойчивых штаммов и выработки мер по профилактике распространения резистентных форм и преодолению устойчивости к антибиотикам

Проблемы антибиотикорезистентности и ее механизмов в педиатрической практике требуют особого внимания по ряду причин. Бактериальные инфекции у детей имеют свои особенности. В частности, у детей в 2 раза чаще, по сравнению со взрослыми, встречается бактериемия [93; 94]. Кроме того, профили чувствительности возбудителей инфекции, выделенных у детей разных возрастных групп и взрослых, могут различаться [75], что предполагает отдельные подходы к антибактериальной терапии у педиатрических пациентов. Ряд эффективных антимикробных препаратов не разрешен к применению в педиатрической практике или данные об их эффективности у детей ограничены. В частности, сюда относятся фторхинолоны, а также

препараты выбора для лечения инфекций, вызванных устойчивыми к карбапенемам возбудителями, включая фосфомицин, тигециклин, полимиксины [1; 26; 27; 28]. Все это диктует необходимость выверенного подхода к выбору и применению антибиотиков в педиатрической практике с учетом знаний о структуре микробиоты и спектре ее чувствительности к антимикробным препаратам.

Таким образом, резистентность нозокомиальной микробиоты у детей и распространение грамотрицательных бактерий – носителей карбапенемаз, которые обладают множественной устойчивостью к антимикробным препаратам, представляют растущую угрозу для госпитализированных пациентов, в том числе, находящихся в педиатрических отделениях реанимации и интенсивной терапии. В связи с этим данные о составе микробиоты у детей, профиле ее резистентности к антибиотикам и молекулярных механизмах устойчивости будут востребованы при выборе антибактериальной терапии, разработке и внедрении мер по контролю за распространением антибиотикорезистентности, что будет способствовать улучшению лечения инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи, у пациентов отделений реанимации и интенсивной терапии в целом.

Степень разработанности темы исследования

Впервые устойчивость к антибиотикам цефалоспоринового ряда у энтеробактерий была описана в 1983 году. С течением времени наблюдался рост числа штаммов бактерий, продуцирующих β -лактамазы расширенного спектра. В связи с этим примерно в это же время в практику был внедрен первый антимикробный препарат группы карбапенемов – имипенем. В конце 1980-х гг устойчивость к нему уже была выявлена у штаммов *P. aeruginosa*. Штаммы, продуцирующие карбапенемазу группы IMP, определяющую устойчивость ко всем β -

лактамным антибиотикам, были выявлены в Японии в 1988, в 2000 г. – группы VIM во Франции [2].

Согласно данным многоцентровых исследований [11; 26; 27; 28] в России, начиная с 2002 года, происходила смена состава возбудителей нозокомиальной инфекции в структуре микробиоты у взрослых пациентов, находящихся в отделениях реанимации и интенсивной терапии, и формировалась устойчивость к различным группам антибиотиков. Стало ясно, что структура возбудителей нозокомиальной инфекции постоянно меняется, поэтому данные о превалировании того или иного микроорганизма и механизма устойчивости должны все время обновляться. В начале 2000-х годов были опубликованы рекомендации по фенотипическому выявлению механизмов устойчивости к антимикробным препаратам, однако все большую актуальность приобретают молекулярно-генетические методы [24; 25; 31; 45; 66; 82].

На сегодняшний день в литературе описаны многоцентровые исследования по России [11; 26; 27; 28] и по отдельным городам [1] среди штаммов, выделенных у взрослых пациентов, редко встречаются исследования по определенному стационару, лечебно-профилактической организации, а также среди педиатрических учреждений. Особое значение имеет изучение распространенности возбудителей нозокомиальных инфекций в педиатрических отделениях реанимации и интенсивной терапии и определение молекулярных механизмов резистентности в связи с ограниченностью выбора антибиотиков в детской популяции.

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

Задачи исследования:

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

Научная новизна

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

встречались штаммы *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa*, примерно с одинаковой частотой в этих локусах обнаруживали штаммы *A. baumannii*.

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

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

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

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

Теоретическая и практическая значимость работы

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

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

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

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

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

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

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

Методология и методы исследования

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

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

Штаммы микроорганизмов

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

Расчет общей распространенности выделенных видов микроорганизмов и структуры микробиоты по локусам

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

Микробиологические методы исследования

Идентификация

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

Определение чувствительности к АМП

Для определения чувствительности к АМП использовали три метода: диско-диффузионный (диски Bio-Rad, США), метод E-тестов (BioMerieux, Франция) на среде Мюллера-Хинтона (Biorad, США) и автоматизированный метод в баканализаторе VITEK 2 Compact (BioMerieux, Франция). Метод E-тестов использовали для определения МПК имипенема, меропенема, колистина и тигециклина. Результаты интерпретировали, руководствуясь оценочными критериями (breakpoint) EUCAST [131], МУК 4.2.1890-04 [16] и клиническими рекомендациями [130].

Для определения чувствительности использовали диски с меропенемом (10 мкг/мл), имипенемом (10 мкг/мл), эртапенемом (10 мкг/мл), амикацином (30 мкг/мл), гентамицином (10 мкг/мл), нетилмицином (10 мкг/мл), цефтазидимом (10 мкг/мл), цефепимом (30 мкг/мл), ципрофлоксацином (5 мкг/мл).

В качестве контрольных штаммов использовали *E. coli* ATCC 25922, *E. coli* ATCC 35218, *P. aeruginosa* ATCC 27653, *A. baumannii*

АТСС 19606. Для описания результатов тестирования антибиотикорезистентности использовали терминологию «нечувствительные» и «чувствительные» бактерии. Нечувствительными считали штаммы с промежуточной чувствительностью и резистентных категорий; остальные штаммы относили к чувствительным. В отношении устойчивости к карбапенемам штаммы делили на 2 группы: карбапенемчувствительные (карба-Ч) и карбапенемнечувствительные (карба-НЧ). К группе карба-Ч относили изоляты, имеющие значения МПК меропенема и имипенема в диапазоне чувствительных. К карба-НЧ относили штаммы с резистентностью или слабой чувствительностью к меропенему и/или имипенему.

Молекулярно-генетические методы исследования

Выделение ДНК

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

Определение генетических маркеров резистентности

Для выявления генов БЛРС и карбапенемаз использовали метод ПЦР. Выявление генов БЛРС (bla_{CTX-M} и bla_{TEM}), определяющих резистентность ко всем β -лактамным антибиотикам, за исключением карбапенемов, были использованы праймеры, предложенные [63] (Таблица 1).

Общий объем реакционной смеси составлял 20 мкл, содержал 4 мкл ПЦР-микс с полимеразой горячего старта (5xScreenMix-HS, Евроген), по 2 мкл каждого из праймеров, 10 мкл деионизированной

воды и пробы 2 мкл ДНК. Компоненты реакционной смеси смешивали непосредственно перед проведением эксперимента.

Таблица 1

Праймеры для идентификации генов $bla_{\text{CTX-M}}$ и bla_{TEM}

№	Праймер	Последовательность 5' – 3'	Продукт (bp)
<i>bla_{CTX-M}</i>			
1	CTX-M/F	5'-tttgcgatgtgcagtagc-3'	544
2	CTX-M/R	5'-gatatcggttggtggtgccat-3'	
<i>bla_{TEM}</i>			
3	TEM/F	5'-ataaaattcctgaagacgaaa-3'	1080
4	TEM/R	5'-gacagttaccaatgcttaatca-3'	

Реакцию амплификации проводили по схеме:

1. Начальная денатурация - 94°C – 1,5'

2. Денатурация 94°C – 10"

Отжиг праймеров 54°C – 10"

Элонгация 72°C – 45"

Количество температурных циклов 35

3. Пост ПЦР 72°C – 3'

Результаты реакции оценивали путем проведения горизонтального электрофореза в 2% агарозном геле.

ПЦР в режиме реального времени (ПЦР-РВ)

Выявление генов, кодирующих продукцию карбапенемаз, проводили с использованием наборов с гибридизационно-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.

Проведение ПЦР-РВ включало в себя следующие этапы:

1. Выделение ДНК (см. выше)
2. Амплификация с гибридационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени»
3. Анализ и интерпретация результатов

Общий объём реакционной смеси составил 25 мкл, включая 10 мкл пробы ДНК. Компоненты реакционной смеси смешивали непосредственно перед проведением амплификации. В качестве положительного и отрицательного контролей использовали соответствующие образцы, входящие в состав набора.

Реакцию амплификации проводили по схеме, указанной в Таблице 2. Результаты оценивали согласно инструкции производителя. Образец считали положительным при значении $Ct \leq 32$. Отрицательными считали результаты с циклом порогового значения $Ct > 32$.

Таблица 2

**Программа амплификации ПЦР-РВ для выявления генов
карбапенемаз**

Цикл	Температура, °C	Время	Количество циклов
1	95	15 мин	1
2	95	5с	35
	60	30 с детекция флуор. сигнала	
	72	15 с	

Мультилокусное сиквенс-типирование

Для генотипирования штаммов *A. baumannii* применяли метод мультилокусного сиквенс-типирования (МЛСТ) (<http://pubmlst.org/abaumannii/>). Использовали ДНК, экстрагированную из чистых культур ацинетобактерий. Подготовка матриц для секвенирования включала амплификацию внутренних фрагментов генов

«домашнего хозяйства»: *gltA* (citrate synthase), *gyrB* (DNA gyrase subunit B), *gdhB* (glucose dehydrogenase), *recA* (homologous recombination factor), *cpn60* (60-kDa chaperonin), *gpi* (glucose-6-phosphate isomerase), *rpoD* (RNA polymerase sigma factor). Праймеры для амплификации приведены в Таблице 3.

Очистку ПЦР-продуктов от избытка праймеров, димеров праймеров и дНТФ проводили ферментативным разрушением с помощью экзонуклеазы I и щелочной фосфатазы (SAP, Affymetrix, США) при температуре 37°C в течение 30 мин. с последующей инактивацией при 85°C.

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.

Сиквенс-тип (sequence type – ST) определялся на основании комбинации аллелей. Штаммы, находящиеся в базе данных, группировали в клональные комплексы на основании кластеризации методом eBURST (<http://eburst.mlst.net/>) для бактерий вида *A. baumannii*.

Таблица 3

Праймеры для выявления «генов домашнего хозяйства» штаммов *A. baumannii*

Локус	Праймеры	Последовательность	Продукт (bp)
<i>gltA</i>	Citrato F1	AAT TTA CAG TGG CAC ATT AGG TCC C	722
	Citrato R12	GCA GAG ATA CCA GCA GAG ATA CAC G	
<i>gyrB</i>	gyrB_F	TGA AGG CGG CTT ATC TGA GT	594
	gyrB_R	GCT GGG TCT TTT TCC TGA CA	
<i>gdhB</i>	GDHB 1F	GCT ACT TTT ATG CAA CAG AGC C	774
	GDH SEC F	ACC ACA TGC TTT GTT ATG	
	GDHB 775R	GTT GAG TTG GCG TAT GTT GTG C	
	GDH SEC R	GTT GGC GTA TGT TGT GC	
<i>recA</i>	RA1	CCT GAA TCT TCY GGT AAA AC	425
	RA2	GTT TCT GGG CTG CCA AAC ATT AC	
<i>cpn60</i>	cpn60_F	GGT GCT CAA CTT GTT CGT GA	640
	cpn60_R	CAC CGA AAC CAG GAG CTT TA	
<i>gpi</i>	gpi_F	GAA ATT TCC GGA GCT CAC AA	456
	gpi_R	TCA GGA GCA ATA CCC CAC TC	
<i>rpoD</i>	rpoD-F	ACC CGT GAA GGT GAA ATC AG	672
	rpoD-R	TTC AGC TGG AGC TTT AGC AAT	

Выявление МБЛ-активности

Наличие МБЛ определяли с помощью подавления МБЛ-активности этилендиаминтетрауксусной кислотой (ЭДТА) методом «двойных дисков» (Рисунок 1) [31]. Данная методика основана на способности ЭДТА хелатировать ионы цинка из активного центра МБЛ и подавлять их гидролитическую активность в отношении β -лактамных субстратов. При наличии МБЛ у исследуемого изолята наблюдается расширение зоны подавления роста вокруг диска с карбапенемом, связанное с ингибированием МБЛ, и восстановлением его активности (Рисунок 1А).

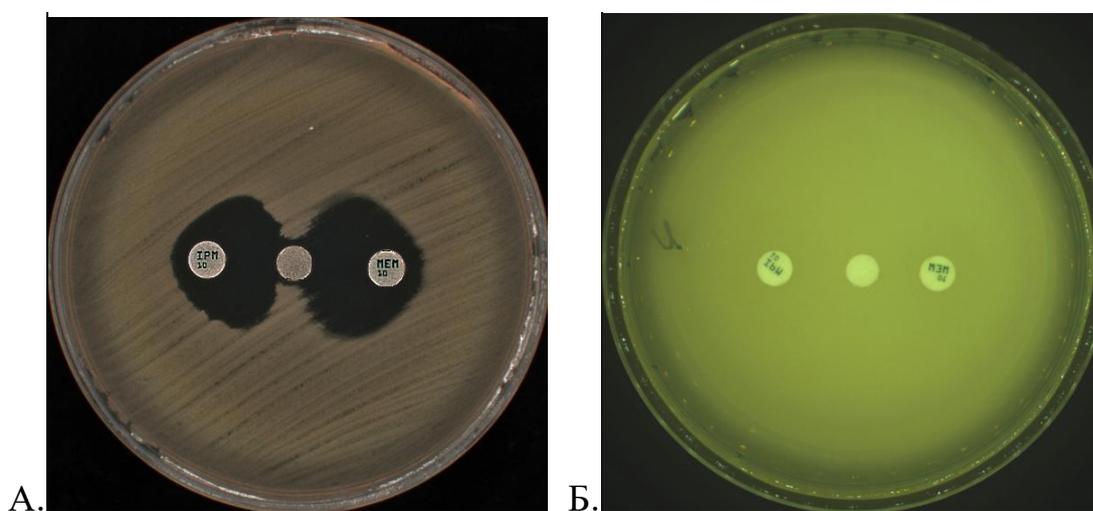


Рисунок 1. Фенотипический тест на выявление МБЛ методом «двойных дисков». На чашку нанесена бактериальная взвесь *P. aeruginosa* мутностью 0,5 по МакФарланду; по центру чашки – диск с 5 мкл 0,5М раствора ЭДТА (рН 8,0); на расстоянии 15 мм – диски с имипенемом (слева) и меропенемом (справа); А – положительный результат теста (есть МБЛ); Б – отрицательный результат теста (нет МБЛ).

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

Для оценки активности эффлюкс-систем штаммы *P. aeruginosa* засеивали на чашки с плотной питательной средой с последующей инкубацией при температуре 37⁰С в течение 24 часов. Далее в бульоне Мюллера-Хинтона получали бактериальную суспензию мутностью 0,5 по МакФарланду. Для всех штаммов были определены МПК меропенема в диапазоне двукратных разведений, содержащих от 0,5 до 8192 мкг/мл

этого антибиотика. Критерий МПК₅₀ подразумевал значение МПК для 50% исследованных штаммов, МПК₉₀ – для 90% штаммов.

В 96-луночный планшет вносили полученную бактериальную суспензию, меропенем в указанных выше разведениях и карбонилцианид-3-хлорфенилгидразона (СССР - от англ. «carbonyl cyanide 3-chlorophenylhydrazone») в конечной концентрации 25 мкг/мл. Каждый штамм исследовали трехкратно в двух повторах. В качестве контроля использовали пробы без добавления СССР. Планшеты инкубировали в термостате 24 часа при температуре 37°C. Далее, оценивали активность эффлюкса как отношение МПК меропенема в культурах без СССР к МПК при его добавлении (кратность уменьшения МПК, КУ МПК). При величине КУ МПК < 4 регистрировали отсутствие эффлюкса, при КУ МПК в диапазоне от 4 до 16 отмечали умеренную активность эффлюкса, при КУ МПК > 16 – его высокую активность. В целом, КУ МПК ≥ 4 расценивали как критерий эффлюкса, значимого для формирования карбапенемрезистентности.

Статистические методы

Статистическую обработку данных проводили с помощью программ SPSS 20.0 (SPSS Statistics, США) и Excel. Для сравнения долей использовали z-критерий. Сравнение МПК проводили с помощью критерия Краскелла-Уоллиса с последующим попарным сравнением методом Манна-Уитни. Различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

Личное участие автора в получении результатов

Личное участие соискателя в получении результатов, изложенных в диссертации, заключалось в проведении микробиологической части исследования (культуральный посев, идентификация микроорганизмов, определение резистентности АМП диско-диффузионным методом и методом Е-тестов, тесты на выявление МБЛ) в лаборатории

микробиологии ФГАУ «НЦЗД» Минздрава России. Определение эффлюкс-активности культур *P. aeruginosa* проводилось совместно с ведущим научным сотрудником, д.м.н. Чеботарем И.В. в лаборатории микробиологии ФГАУ «НЦЗД» Минздрава России. Молекулярно-генетическая часть исследования (выделение ДНК, постановка ПЦР, учет и интерпретация результатов ПЦР) осуществлялось автором совместно со старшим научным сотрудником, к.м.н. Алябьевой Н.М. в лаборатории экспериментальной иммунологии и вирусологии ФГАУ «НЦЗД» Минздрава России. Секвенирование культур *A. baumannii* проводилось совместно с к.б.н. Пушковым А.А. в лаборатории молекулярной генетики и клеточной биологии ФГАУ «НЦЗД» Минздрава России.

Основные положения диссертации, выносимые на защиту

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

Степень достоверности и апробация результатов исследования

О достоверности результатов работы свидетельствует использование сертифицированных микробиологических методов, которые характеризуются высокой чувствительностью и специфичностью. Проведен достаточный объем исследований, что позволило корректно осуществить статистическую обработку полученных данных. Комплексное молекулярно-генетическое определение генов β -лактамаз позволило получить сопоставимые результаты с традиционными микробиологическими методами оценки чувствительности, что свидетельствует о достоверности полученных результатов.

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

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

ГЛАВА 1. Обзор литературы

Инфекции, вызванные полирезистентными грамотрицательными бактериями, стали одной из наиболее волнующих проблем в современном мире [50]. Одним из факторов, обуславливающих развитие множественной устойчивости бактерий к АМП, служит продукция ферментов, разрушающих антибиотики. В первую очередь, это относится к β -лактамам антибиотикам, включая карбапенемы. Большое семейство ферментов обеспечивают эффективный гидролиз β -лактамного кольца, вследствие чего большинство АМП этой группы теряют свою активность. Эволюционно формирование β -лактамаз было обусловлено необходимостью защиты бактерий от агрессивных факторов окружающей среды. В настоящее время продукция β -лактамаз является ключевым механизмом резистентности к β -лактамам. Инфекции, вызванные возбудителями с β -лактамазной активностью, связаны с риском развития нозокомиальных инфекций и увеличением смертности повсеместно [11; 50; 51]. Среди взрослых пациентов хорошо описаны эпидемиология, факторы риска, исходы, терапия и меры борьбы с бактериями, продуцирующими β -лактамазы. Меньше внимания уделяется данной проблеме среди педиатрических пациентов. К сожалению, продуцирующие β -лактамазы бактерии у детей занимают важное место среди появляющихся полирезистентных бактерий. Схемы лечения полирезистентных бактериальных инфекций лимитированы ограничением применения некоторых групп АМП у детей, а небольшое число клинических испытаний АМП в педиатрической практике еще сильнее усугубляет данную проблему [77; 83]. Знания о распространенности и механизмах формирования антимикробной устойчивости позволяют клиницистам выбрать адекватную антимикробную терапию для лечения внутрибольничных инфекций. В связи с этим большое внимание уделяется изучению эпидемиологии. Антибиотикотерапия считается адекватной, когда хотя бы один из

используемых АМП оказывается эффективным в отношении возбудителя данной инфекции, выделенной в результате бактериологического исследования [3].

Традиционно, карбапенемы являются препаратами резерва для наиболее тяжелых инфекций, вызванных грамотрицательными бактериями и возбудителями, устойчивыми к АМП других групп. В последнее время наблюдается быстрое распространение резистентности к данной группе антибиотиков. Основную угрозу представляют карбапенемазы, гены которых локализованы на различных подвижных элементах, что определяет их способность к быстрому внутри- и межвидовому распространению [50]. Проблема резистентности вследствие выработки карбапенемаз изначально остро стояла среди *P. aeruginosa* и *A. baumannii*, но с течением времени появились штаммы *K. pneumoniae*, резистентные к карбапенемам и продуцирующие карбапенемазы.

1.1. Структура микробиоты у пациентов ОРИТ

Нозокомиальные инфекции являются одной из важнейших проблем ОРИТ, они могут быть как основной причиной госпитализации пациентов, так и осложнять течение других заболеваний [33]. Обычно развитие нозокомиальной инфекции сопровождается ухудшением состояния пациента с появлением признаков воспаления и интоксикации. В случае генерализации нозокомиальная инфекция может не иметь яркой клинической симптоматики, поэтому крайне важным является установление очага и выделение из него возбудителя [3]. Американское общество по инфекционным заболеваниям объединило бактерии, которые занимают лидирующие позиции по частоте встречаемости и устойчивости к АМП, в группу ESKAPE. К данной группе относятся такие микроорганизмы, как *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter*

baumannii, *Pseudomonas aeruginosa* и *Enterobacter spp.* [96]. В России, согласно данным многоцентрового исследования МАРАФОН в 2011-2012 гг., доля изолятов *Acinetobacter spp.* в структуре возбудителей нозокомиальных инфекций составила 14,8%, в т.ч. *A. baumannii* – 13,9 %, *P. aeruginosa* – 20%, *K. pneumoniae* – 17%. Согласно другому отечественному исследованию, проведенному в 2004 – 2006 гг., среди возбудителей вентилятор-ассоциированной пневмонии в ОРИТ стабильно доминируют грамотрицательные бактерии (71 - 64%), среди которых наиболее значимыми являются *K. pneumoniae* (19%), *P. aeruginosa* (15%) и *Acinetobacter spp.* (12%). [32] В Бразилии и в Турции причиной инфекционных осложнений в педиатрических ОРИТ в 47% и 80%, соответственно, случаев была грамотрицательная флора [40; 100].

В Англии инфекции, вызванные грамотрицательными возбудителями, часто являются причиной смерти детей младше 14 лет, а в Колумбии являются основным фактором риска детской смертности. В американском исследовании TEST была показана роль грамотрицательных возбудителей в развитии инфекции у детей. Наравне со взрослыми пациентами, относительная распространенность грамотрицательных возбудителей у детей во многом зависит от ряда факторов, таких как регион, стационар и тип инфекции [77]. Учитывая литературные данные о распространенности штаммов в ОРИТ и их устойчивости к АМП, а также особенности педиатрических ОРИТ, в нашей работе для более глубокого исследования мы остановились на трех грамотрицательных микроорганизмах: *A. baumannii*, *P. aeruginosa* и *K. pneumoniae*.

1.2. Общая характеристика штаммов *A. baumannii*, *P. aeruginosa* и *K. pneumoniae*

1.2.1. *A. baumannii*

Ацинетобактерии являются типичными условно-патогенными микроорганизмами, которые вызывают инфекционный процесс только на фоне иммуносупрессии. Факторами риска служат тяжелые травмы, обширные ожоги, злокачественные новообразования, большие хирургические вмешательства, лучевая, гормональная и цитостатическая терапия, патология новорожденных, синдром приобретенного иммунодефицита, старческий возраст [120]. Искусственная вентиляция легких, диализ, наличие имплантированных медицинских устройств (катетеры, дренажные трубки и т.д.) в значительной степени усиливают риск присоединения ацинетобактериальной инфекции [120].

Микробиологическая характеристика A. baumannii

Ацинетобактерии относятся к роду грамотрицательных неферментирующих бактерий (НФБ) семейства *Moraxellaceae* порядка *Pseudomonadales* класса *Gamma proteobacteria* (тип *Proteobacteria*). Согласно классификации Bergey, к роду ацинетобактеров относится 16 видов. Наибольшее медицинское значение имеют: *A. calcoaceticus*, *A. baumannii*, *A. lwoffii*, *A. baylyi*, *A. haemolyticus*, *A. junii*, *A. nosocomialis*. Ацинетобактерии представляют собой неподвижные грамотрицательные палочки (коккобациллы), располагаются парами или цепочками различной длины. Являются строгими аэробами, каталазопозитивными, оксидазонегативными неподвижными бактериями-прототрофами, имеющими капсулу. Растут на простых питательных средах, образуя гладкие выпуклые колонии диаметром до 2–3 мм, некоторые штаммы могут продуцировать слизь, бледно-желтый и светло-серый пигмент. Также *Acinetobacter spp.* дает характерный рост на хромогенных агарх CHROMagar, UriSelect и т.д. [4].

Факторы патогенности

Ацинетобактерии являются почвенными и водными сапрофитами, они заселяют любые биотопы и контаминируют самые разнообразные объекты и материалы. Естественным резервуаром и источником инфекции являются почва и природные водоемы, с которыми чаще сопряжено инфицирование раневой поверхности. В госпитальных условиях ацинетобактерии могут быть обнаружены на кухонных принадлежностях, в системах вентиляции и увлажнения, на различном медицинском оборудовании, включая контуры аппаратов искусственной вентиляции легких, на коже рук персонала и т.д.

Факторы патогенности, определяющие повреждение тканей и выживание ацинетобактерий в организме, активно действуют на всех этапах инфекционного процесса - адгезии, инвазии, в случае диссеминации и персистенции, а также вызывают прямую интоксикацию и обеспечивают ускользание от иммунного ответа.

Важными факторами адгезии являются пили [111]. Адгезия может быть обусловлена не только пилиями, но и аморфным (полисахаридсодержащим) материалом, присутствующим в местах контакта адгезированных бактерий. Ацинетобактерии могут активно проникать через эпителиальные барьеры. Механизмы инвазии включают процессы, направленные на разрушение тканевых барьеров - клеток и межклеточного вещества. Факторами инвазии являются ферменты, апоптозиндуцирующие белки, сидерофоры, эндотоксин (ЛПС) [43; 56; 88]. К числу ферментов инвазии принадлежат липазы (в т.ч. фосфолипазы С и D), белки с ДНКазной (OmpA) активностью, сериновая протеаза. Фосфолипазы обеспечивают разрушение мембранных структур клеток человека.

Ацинетобактерии способны к внутриклеточной инвазии, персистенции внутри макрофагов и легочных эпителиоцитов [58; 101]. Среди факторов ускользания от иммунных эффекторов наиболее

изучены антифагоцитарные и антикомплементарные факторы. Ряд штаммов *A. baumannii* имеет в составе капсулы полисахарид К (его продукция находится под контролем генов *ptk* и *epsA*), который обеспечивает выживание микроба в организме хозяина [104].

Особое значение для стойкого выживания в организме (даже в условиях антибиотикотерапии) имеет способность клинических штаммов ацинетобактерий формировать биопленки [103].

1.2.2. *P. aeruginosa*

Синегнойная палочка, *Pseudomonas aeruginosa*, входит в число наиболее актуальных возбудителей в клинике оппортунистических инфекций. Начав свое «восхождение» в качестве социальноопасного нозокомиального патогена в 60-80-х годах двадцатого века, синегнойная палочка не теряет своей роли и продолжает прогрессировать в госпитальной патологии двадцать первого века. Синегнойная палочка поражает разнообразием вызываемой патологии, являясь причиной широкого круга заболеваний - от интоксикаций до обширных гнойно-воспалительных процессов и септического шока. Логично, что внимание, уделяемое синегнойной инфекции научно-медицинским сообществом, в течение многих лет остается высоким: согласно статистике ресурса PubMed в 2013 году проблемам, связанным с *P. aeruginosa*, в мире было посвящено более 2700 научных публикаций. Объем информации о молекулярных механизмах патогенности и антибиотикорезистентности синегнойной палочки расширяется стремительными темпами. На основе этих данных создаются новые способы диагностики синегнойной патологии, разрабатываются методы оценки чувствительности *P. aeruginosa* к антимикробным препаратам и детекции механизмов резистентности.

Микробиологическая характеристика P. aeruginosa

P. aeruginosa - это аэробные неферментирующие каталазо- и оксидазопозитивные грамотрицательные подвижные психрофильно-мезофильные бактерии-прототрофы, имеющие прямую или слегка изогнутую палочковидную форму. Клеточная стенка и ЛПС наружной мембраны имеют типовое для грамотрицательных бактерий строение. На внешней мембране синегнойной палочки присутствуют поверхностные белки (Outer Membrane Proteins, или Omp) [73]. В зависимости от типа поверхностные белки выполняют разнообразные функции, включая транспорт (порины), захват железа (сидерофоры), стабилизируют внешнюю мембрану при физиологических и стрессовых состояниях. *P. aeruginosa* не образует спор, формирует полисахаридную капсулу. Синегнойная палочка подвижна, имеет один или два полярно расположенных жгутика. Обладает твичинг-подвижностью (twitching motility), реализуемой через сокращение-расслабление пилей IV типа. Многие штаммы образуют слизь, основой которой является альгинат [87]. В состав слизи могут входить рамнолипиды, Pls- и Pel-полисахариды, дериваты клеточной ДНК, протеины [15; 68].

P. aeruginosa продуцирует богатый спектр окрашенных веществ, которые расцениваются как пигменты [112; 120]. Штаммы, продуцирующие сразу два или три пигмента, немногочисленны, большинство изолятов продуцируют лишь одну группу пигментов, встречаются также беспигментные формы. Многие штаммы обладают гемолитической активностью, она воспроизводится на 5%-ном кровяном агаре (с эритроцитами барана). Рост синегнойной палочки часто сопровождается специфичным ароматом, который авторы описывали по-разному, сравнивая с запахом винограда, цветущей липы, жасмина и даже гниющего картофеля. Вероятно, что различия в оценке ароматов связаны не только с субъективным восприятием исследователей, но и с индивидуальными особенностями штаммов, продуцирующими разные

спектры летучих соединений, главными из которых являются 2-аминоацетофенон, 2,4-диметилхиназолин и 4-метилхиназолин (Сох С. D;1979). Встречаются штаммы, не синтезирующие пахучие вещества.

Факторы патогенности

Синегнойная палочка обладает большим набором компонентов, которые могут играть роль факторов патогенности. При синегнойной инфекции факторы активно действуют на всех этапах инфекционного процесса – адгезии, инвазии, в случае диссеминации и персистенции, а также вызывают прямую интоксикацию и обеспечивают ускользание от иммунного ответа.

Важнейшим фактором адгезии являются пили (реснички, фимбрии). Вторым по значимости адгезином являются белки жгутиков – флагеллярные протеины. В совокупности пили и флагеллин вносят наибольший вклад в реализацию адгезии на тканях человека и абиотических поверхностях [74; 107]. В процессе адгезии может участвовать липид А, который инициирует закрепление липополисахарида (частью которого он является) на поверхностных молекулах TLR 1–10 типов (от англ. «Toll-like receptors» - Толл-подобные рецепторы) на клетках легочной ткани, роговицы [54]. Белки, ассоциированные с поверхностной мембраной, также вносят вклад в адгезивный процесс. Поверхностные протеины из семейств Omp (LptF), Opr (OprQ, OprF) обеспечивали адгезию беспилевых штаммов на многих субстратах, включая муцин, лактотрансферрин, ламинин, фибронектин и др. [38; 39; 51; 70]. На поверхности клетки присутствуют адгезины, распознающие сиаловые кислоты, ганглиозиды, а также адгезивные лектины PA-II and PA-III [92].

Механизмы инвазии включают процессы, направленные на разрушение тканевых барьеров – клеток и межклеточного вещества. В качестве факторов инвазии могут прямо или косвенно выступать

ферменты, токсины дистантного и контактного типов, эндотоксин (ЛПС), апоптоз-индуцирующие белки, сидерофоры, вторичные токсины синегнойного и тканевого происхождения. Важнейшими протеолитическими ферментами инвазии являются два варианта эластазы – LasA и LasB, щелочная протеаза (AprA), протеаза IV (PrpL). Все они характеризуются активностью в отношении широкого спектра субстратов. Эластазы разрушают эластин, коллаген и фибрин, вызывая деструкцию соединительной ткани и нарушая раневые барьеры; она может вызывать деградацию иммуноглобулинов классов G и A, интерферонов [115]. Щелочная протеаза активна в отношении фибрина, факторов комплемента [106]. Протеаза IV вызывает деструкцию эластина, факторов комплемента, молекул иммуноглобулина G и Fe-связывающих белков человека лактоферрина и трансферрина [39; 59].

Синегнойная палочка продуцирует два различных класса экзотоксинов. К первому классу относится экзотоксин А (ExoA), ко второму ЛПС (эндотоксин). Синегнойная палочка обладает способностью продуцировать токсин синильную кислоту (гидрогенцианид), которая за счет местной и общей интоксикации усугубляет течение хронического бронхо-легочного воспаления при муковисцидозе, ассоциированных с синегнойной палочкой.

Пигменты также расцениваются в качестве факторов инвазии: пиоцианин вызывает непосредственное повреждение эпителиальных тканей, пиовердин и пиоцианин обладают способностью к прямому гемолизу эритроцитов [81; 108].

Ускользание от иммунного ответа реализуется за счет антифагоцитарных свойств у капсульных полисахаридов, ЛПС, флагеллина, белков семейств Omp и Opr, пигментов, альгината. Самой совершенной и сложной стратегией ухода бактерий от иммунной атаки является образование биопленок.

1.2.3. *K. pneumoniae*

K. pneumoniae является одним из самых известных представителей грамотрицательного семейства *Enterobacteriaceae* наравне с *Escherichia coli*, и вместе они широко распространены как в больницах, так и среди населения [96], и являются наиболее частыми возбудителями нозокомиальных инфекций. В России *K. pneumoniae* третий по частоте грамотрицательный возбудитель нозокомиальных инфекций. В ряде стационаров *Klebsiella spp.* – превалирующий микроорганизм, который составляет 24,5% - 43,6% [22]. По данным многоцентрового эпидемиологического исследования МАРАФОН в 2011-2012 гг. в 34% случаев энтеробактерии являлись причиной нозокомиальной инфекции, а *K. pneumoniae* составила 17% в общей структуре возбудителей [26].

Микробиологическая характеристика K. pneumoniae

K. pneumoniae впервые была описана в 1875 г. Э. Клебсом, к честь которого и получила свое название. Род Клебсиелл относится к семейству *Enterobacteriaceae*, в которое входит более 20 родов. *K. pneumoniae* представляют собой короткие толстые грамотрицательные, неподвижные, неспорообразующие палочки, имеющие полисахаридную капсулу. Клебсиеллы являются факультативными анаэробами и хемоорганогетеротрофами, культивируются на простых питательных средах. На агаризованных питательных средах образуют круглые слизистые серовато-белые колонии, в бульоне - равномерное помутнение среды с образованием тягучего слизистого осадка и плёнки. Расщепляют лактозу, поэтому относятся к группе колиформных бактерий, не образует индола, оксидазонегативна [7; 13].

Факторы патогенности

Чаще всего *K. pneumoniae* является частью сапрофитной флоры в желудочно-кишечном тракте, она является условно-патогенным микроорганизмом, т.е. при определенных условиях клебсиеллы могут стать причиной различных воспалительных процессов: пневмонии, заболевания урогенитального тракта, поражения суставов, гнойно-септических заболеваний, септицемии и менингитов у новорожденных в отделении реанимации [13; 98]. Такие условия могут возникнуть при нахождении пациента в отделении реанимации и интенсивной терапии (ОРИТ) на фоне снижения иммунитета. Патогенез большинства вышеперечисленных заболеваний чаще всего обусловлен факторами патогенности клебсиелл: продукция термостабильного и термолабильного энтеротоксина, способность к адгезии (обладают пилиями 3 типов), выработка патогенных ферментов (нейраминидаза, ДНКаза, фосфатаза) [7; 98].

K. pneumoniae обладает О-ЛПС и К- (капсульные полисахариды) антигенами [7; 13]. Капсула клебсиелл обладает антифагоцитарными свойствами. Она сформирована двумя слоями полисахаридных волокон, образуя во внутреннем слое плотные толстые пучки, которые перпендикулярны наружной мембране [96].

1.3. Механизмы формирования резистентности к АМП

Настоящий переворот в истории мировой медицины произошел после открытия Флемингом в 1928 г. первого β -лактамного антибиотика пенициллина. Активное использование АМП началось с 1940 г., что привело к увеличению средней продолжительности жизни, принципиально изменив отношение к инфекционным болезням. На сегодняшний день сложно представить медицину без антибиотиков. В настоящее время β -лактамы занимают лидирующее положение в структуре потребления АМП (60%) [2]. С начала 1980-х гг. и до

недавнего времени цефалоспорины III, а затем и IV поколения, а также защищенные пенициллины составляли основу этиотропной терапии подавляющего большинства инфекционных болезней человека [2; 79].

Параллельно с внедрением новых АМП стали появляться устойчивые к ним микроорганизмы. Так, β -лактамазы расширенного спектра действия были выявлены в 1983 году, когда появились первые данные о специфических ферментах *bla_{SHV}*, разрушающих природные и полусинтетические пенициллины, цефалоспорины всех поколений. Массовое применение в качестве эмпирической терапии β -лактамов расширенного спектра привело к селекции клонов, продуцирующих БЛРС. Локализация генов БЛРС на подвижных генетических элементах способствовало их повсеместному распространению [24; 50; 83].

Проблема формирования устойчивости к известным АМП стала настолько серьезной, что стимулировала начать рассматривать антибиотикорезистентность как «новую инфекцию» [24]. Природная или первичная резистентность – это способность бактерий сохранять жизнеспособность в присутствии АМП в концентрациях, реально достижимых в организме человека. Данное свойство обычно связано с отсутствием у микроорганизма мишени действия АМП или низким сродством к имеющейся мишени, а также является постоянным видовым признаком [25]. В критериях по оценке чувствительности также указываются данные о природной устойчивости к АМП. Например, неферментирующая грамотрицательная бактерия *Stenotrophomonas maltophilia* имеет природную устойчивость к карбапенемам и аминогликозидам. У *K. pneumoniae* отсутствует данное свойство, но она обладает способностью формировать приобретенную или вторичную резистентность к разным классам АМП [24; 50]. Под этим свойством понимают способность бактерий сохранять жизнеспособность при концентрациях АМП, подавляющих основную часть микробной популяции [32].

Лечение инфекций, вызванных продуцентами БЛРС, оказалось сложной задачей, поскольку такие бактерии не только устойчивы к β -лактамам, но и проявляли устойчивость к антибиотикам других групп – фторхинолонам и аминогликозидам. В сложившейся ситуации единственными эффективными препаратами стали карбапенемы [113]. В течение длительного времени они считались антибиотиками «резерва» и их применение было ограничено. Однако параллельно с ростом частоты распространения БЛРС возрастал и объем потребления карбапенемов, что привело к формированию устойчивости и к этим антибиотикам. Основную угрозу представляют карбапенемазы, гены которых локализованы на различных подвижных элементах, что определяет их способность к быстрому внутри- и межвидовому распространению [2; 24; 49; 83].

A. baumannii, *P. aeruginosa* и *K. pneumoniae* имеют несколько механизмов, формирующих антибиотикорезистентность к β -лактамам: модификация мишени, снижение проницаемости внешних структур, активное выведение (эффлюкс) и инактивация [2; 24; 25].

Мишенями действия β -лактамов являются ферменты – пенициллин-связывающие белки (ПСБ), участвующие в синтезе клеточной стенки бактерий. В результате модификации у некоторых ПСБ уменьшается их сродство к β -лактамам, что проявляется в повышении МПК этих препаратов и снижении клинической эффективности. Изменение структуры ПСБ имеет значение для устойчивости к β -лактамам среди стафилококков и пневмококков. Среди грамотрицательных бактерий резистентность, связанная с модификацией ПСБ, встречается редко.

Внешняя мембрана грамотрицательных микроорганизмов является препятствием для проникновения β -лактамов внутрь клетки. Транспорт антибиотика через внешнюю мембрану к чувствительным мишеням

осуществляется через воронкообразные белковые структуры, получившие название «порины» или «пориновые каналы» [82]. Они играют важную роль в физиологии бактериальной клетки для транспорта сахаров, аминокислот, фосфатов, двухвалентных катионов и сидерофоров. Определенные гидрофильные антибиотики, такие как β -лактамы, аминогликозиды и фторхинолоны, могут попадать в клетку через пориновые каналы. Известно, что потеря специфического поринового канала может снижать чувствительность к определенным АМП [25; 82]. Указанный механизм устойчивости встречается практически у всех грамотрицательных бактерий, обычно в сочетании с другими факторами [25].

В то время как потеря порина является эффективным барьером для входа АМП в клетку, снижение накопления и активный экспорт АМП из клетки (эффлюкс) достигается за счет мембран-ассоциированного насоса (Рисунок 2) [14; 25].

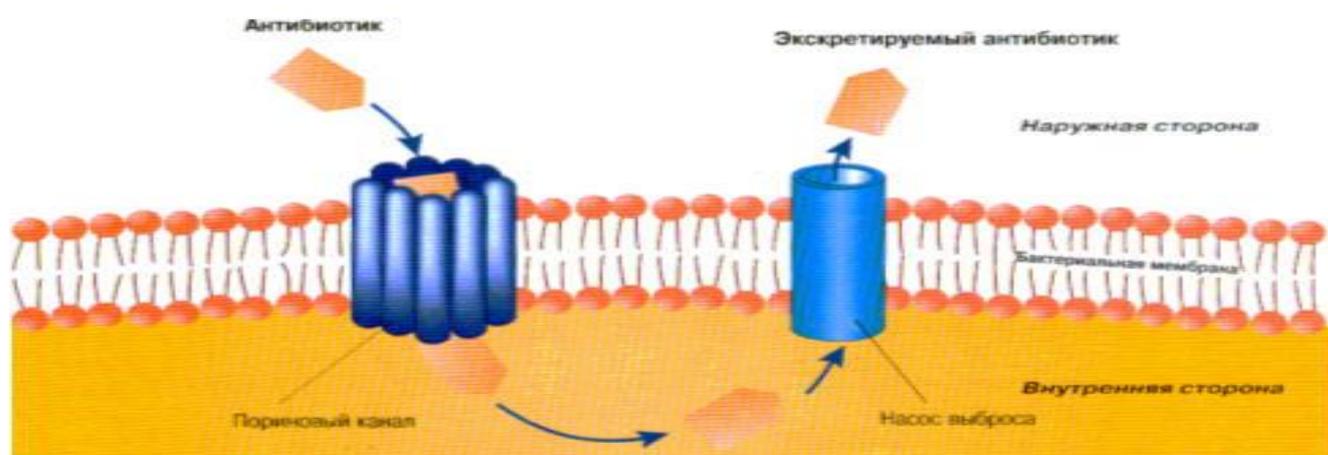


Рисунок 2. Строение эффлюксных систем. (<http://www.medlinks.ru/>)

Эффлюксные насосы подразделяются на 5 суперсемейств, различающихся по аминокислотной последовательности, энергетическим ресурсам, затрачиваемым на экспорт АМП, и по субстратной специфичности. Первое суперсемейство – ABC – транспортеры, второе – SMR (the **S**mall **M**ultidrug **R**esistance), третье – MFS (the **M**ajor **F**acilitator **S**uperfamily), четвертое – RND (**R**esistance

Nodulation Division), и пятое – MATE (the Multidrug And Toxic compound Extrusion). Эффлюксная система четвертого суперсемейства (RND) наиболее распространена среди грамотрицательных бактерий, в частности, у *P. aeruginosa*. Данный механизм обеспечивает природную устойчивость изолятов *P. aeruginosa* к цефотаксиму и цефтриаксону [14; 82].

На рисунке 2 представлена схема строения эффлюксного насоса. RND - насос представляет собой тройную систему. В состав системы входят: белок-транспортер, периплазматический белок-адаптер и белок, формирующий канал внешней мембраны.

Инактивация или ферментативный гидролиз относится к основным механизмам устойчивости бактерий к β -лактамным антибиотикам. К настоящему времени описано более 1000 β -лактамаз, различающихся по субстратной специфичности, чувствительности к действию ингибиторов, локализации генов [2; 47; 48; 50].

Классификация β -лактамаз

β -лактамазы отличаются между собой как по происхождению (плазмидные или хромосомно-кодируемые), так и по аминокислотной последовательности. Существует два подхода к классификации β -лактамаз. Первый подход основан на структурной и функциональной классификации. Разделение на классы (A, B, C, D) происходит по способности гидролизовать β -лактамы и разрушать β -лактамазы за счет ингибирования clavulanовой кислотой, сульбактамом и тазобактамом [50]. Второй подход основан на молекулярных характеристиках, таких как локализация генов β -лактамаз, сравнении их аминокислотной последовательности и четвертичных структур этих ферментов [24].

Все β -лактамазы можно разделить на 3 функциональные группы (Таблица 4) [47].

Таблица 4

Классификация β - лактамаз с указанием их субстратной специфичности и ингибиторов

Группа	Мол. класс	Подклассы	Примеры β - лактамаз	Основной субстрат	Ингибирование		
					Клавулановая кислота	Тазобактам	ЭДТА
1	C		AmpC	Цефалоспорины	Не ингибируются	Не ингибируются	Не ингибируются
2	A	2a, 2b, 2e, 2br, 2ber, 2f	TEM, SHV, CTX-M, GES, KPC	Пенициллины, цефалоспорины	Ингибируются	Ингибируются	Не ингибируются
	D	2c, 2d, 2de, 2df	OXA	Пенициллины	Ингибируются/ Не ингибируются (2df)	Ингибируются	Не ингибируются
3	B	B1, B2, B3	VIM, IMP, NDM, SPM	Карбапенемы	Не ингибируются		Ингибируются

В первую группу входят плазмидно-кодируемые ферменты, относящиеся к молекулярному классу С (типа AmpC). Также их еще называют цефалоспориназы за их активность в отношении цефалоспоринов. Они малочувствительны к действию ингибиторов, таких как clavulanовая кислота, тазобактам и сульбактам, а их ключевым отличием является высокая аффинность к азтреонаму. Следует также отметить такое свойство данной группы, как повышение клинически значимой резистентности к АМП (карбапенемам) в виде повышения МПК, если наряду с выработкой фермента происходят мутации в пориновом канале.

Вторая группа является одной из самых крупных, в нее входят β -лактамазы молекулярных классов А и D. Они являются плазмидно-кодируемыми, вследствие чего можно говорить об их способности к быстрому распространению. Данная группа разделена на подгруппы: 2a, 2b, 2be, 2br, 2ber, 2c, 2d, 2de, 2df, 2e, 2f.

Подгруппа 2a представляет собой небольшую группу ферментов, к ней относятся β -лактамазы грамположительных микроорганизмов (*Staphylococcus spp.*, *Bacillus spp.*), которые эффективно гидролизуют пенициллины, малоактивны в отношении цефалоспоринов, карбапенемов и монобактамов, ингибируются clavulanовой кислотой и тазобактамом. Исключение составляет их способность гидролизовать нитроцефин [48].

В группу 2b входят 9 видов TEM и 29 SHV. Наиболее широко известными представителями подгруппы 2b β -лактамаз являются SHV-1, TEM-1,2 [50]. Они эффективны в отношении пенициллинов (кроме уреидопенициллинов) и малоактивны в отношении цефалоспоринов. Широко известные БЛРС относятся к группе 2be. Их объединяет активность в отношении пенициллинов и цефалоспоринов I - IV поколений. Наибольшую действенность они проявляют в отношении цефотаксима, цефтазидима и азтреонама. Основными представителями данной группы являются ферменты TEM, SHV, CTX-M. Они плазмидно-

кодируемые, хотя их предшественники (SHV-1, TEM-1,2) являются хромосомно-кодируемыми. Большинство ферментов группы CTX-M гидролизуют цефотаксим сильнее, чем цефтазидим, многие из них гидролизуют цефепим. В отличие от TEM и SHV БЛРС-группы CTX-M-ферменты лучше ингибируются тазобактамом, чем клавулановой кислотой. Также в эту подгруппу входят BEL-1, BES-1, SFO-1, TLA-1, TLA-2, PER and VEB – лактамазы.

Следующая подгруппа – 2 br. К ней относятся β -лактамазы, устойчивые к действию ингибиторов (клавуланой кислоты, тазобактама, сульбактама), спектр их активности соответствует группе 2b. К данной подгруппе были отнесены 36 видов TEM (TEM-30,31) и 72 вида SHV по функциональным характеристикам. Ни один вид CTX-M не относится к данной подгруппе. В субгруппу 2 br не входят ферменты группы TEM, которые включают в себя расширенный спектр с устойчивостью к ингибированию клавулановой кислотой.

Ферменты подгруппы 2c объединены по способности гидролизовать карбенициллин или тикарциллин наравне с пенициллинами, клоксациллином и оксациллином. Эта подгруппа легко ингибируется клавулановой кислотой или тазобактамом [47]. Субгруппа 2d β -лактам аз отличается способностью гидролизовать клоксациллин или оксациллин, их еще называют оксациллиназы. Самым известным представителем данной группы являются ферменты группы ОХА. Они являются второй по величине подгруппой после БЛРС. К субгруппе 2de относятся ферменты, расщепляющие оксациллин, клоксациллин, оксиамино- β -лактам, но не карбапенемы. К ним относятся ОХА-11,15. Они наиболее часто встречались в Турции и Франции (у *P. aeruginosa*), в этом случае уровень резистентности выше, чем у *E. coli*. Резистентность к цефтазидиму обычно более прогнозируемая, чем к цефотаксиму или азтреонаму. Однако микроорганизмы, продуцирующие некоторые виды оксациллиназ (ОХА-1,31), могут быть чувствительны к цефтазидиму и

устойчивы к цефепиму. Оксациллиназы с карбапенем-гидролизной активностью относятся к подгруппе 2df. Они часто встречаются у *Acinetobacter baumannii* и обычно локализованы на хромосомах, хотя ОХА-23 и ОХА-48, выделенные у *Enterobacteriaceae*, являются плазмидными производными. У данных оксациллиназ гидролитическая активность выше в отношении имипенема, чем в отношении меропенема. Они нечувствительны к действию клавулановой кислоты [121].

Подгруппа 2e характеризуется цефалоспориноазами, которые ингибируются клавулановой кислотой и тазобактамом. Они очень сходны с пенициллиназами группы 1 AmpC или с БЛРС, т.к. могут продуцироваться у одних и тех же микроорганизмов и определять примерно одинаковый профиль устойчивости к АМП. Их основным отличием от вышеперечисленных подгрупп является низкая аффинность к азтреонаму.

Сериновые карбапенемазы молекулярного класса А формируют подгруппу 2f. Субстратом для них являются карбапенемы, которые ингибируются тазобактамом, но не клавулановой кислотой. Наиболее «тревожными» плазмидно-кодируемые β -лактамазы данной группы являются КРС и GES [102].

Третья группа карбапенемаз металло- β -лактамазы (МБЛ) обладает уникальностью, как в функциональном, так и в структурном отношении. МБЛ обычно продуцируются в комбинации с другими ферментами, и являются вторыми или третьими факторами резистентности в клинических изолятах. Данная группа отличается от других тем, что в структуре активного центра фермента присутствует цинк. Функционально они отличаются своей способностью гидролизовать карбапенемы, но такое свойство имеют и сериновые β -лактамазы. МБЛ характеризуется низкой аффинностью или гидролитической активностью в отношении монобактамов и не

ингибируются ни тазобактамом, ни клавулановой кислотой. Напротив, они ингибируются ЭДТА и дипиколиновой кислотой [85]. Эти металлоферменты подразделяются на подгруппы согласно их структуре (В1, В2, В3) или функции (3а, 3б, 3с). Группы В1 и В3 очень схожи функционально. МБЛ изначально были идентифицированы как хромосомно-кодируемые у грамположительных и грамотрицательных микроорганизмов (*B. fragilis*, *S. maltophilia*), их число оставалось постоянным в течение долгого времени. Когда МБЛ начали появляться на подвижных элементах, они быстрее распространялись и стали предметом для эволюционного отбора, в результате чего появилось несколько десятков групп. К подгруппе 3а относятся семейства ферментов VIM и IMP, которые имеют глобальное распространение, чаще всего встречаются у неферментирующих грам-отрицательных бактерий, реже – у *Enterobacteriaceae*, они принадлежат к молекулярному классу В1. Субгруппа 3б намного меньше по числу входящих в него семейств МБЛ и обладает свойствами, характерными для всей третьей группы ферментов [24; 47; 49; 50].

1.3.1. Особенности формирования резистентности к АМП *A. baumannii*

Одним из негативных клинических свойств ацинетобактерий является антибиотикорезистентность. Доля карбапенем- и полирезистентных штаммов, вызывающих внутрибольничные вспышки в самых разных регионах мира, растет в геометрической прогрессии [127]. Недавнее исследование, проведенное в Республике Беларусь, показало, что 92–95% клинических штаммов *A. baumannii* устойчивы к незащищенным β-лактамам и ципрофлоксацину, 73% изолятов нечувствительны к амикацину и 28,9% - к ампициллину/сульбактаму [29]. У ацинетобактерий можно выделить природную и приобретенную резистентность. Данные о природной резистентности ацинетобактерий к

антибиотикам противоречивы. Перечень препаратов, чувствительность к которым рекомендовано определять в клинической практике, по-разному определяется российскими [9], европейскими (EUCAST) и американскими (CLSI) экспертами. Считается, что критическое нарастание приобретенной антибиотикорезистентности ацинетобактерий произошло в период с 1980 по 1990 г. Именно в эти годы ацинетобактерии стали приобретать резистентность к ампициллину, карбенициллину, цефокситину, гентамицину, хлорамфениколу [37]. Примерно тогда же в период с 1985 по 1999 г. были зарегистрированы первые случаи резистентности *A. baumannii* к карбапенемам и колистину [109].

В настоящее время доказано, что ацинетобактерии могут продуцировать β -лактамазы, аминогликозидазы, тетрациклиназы, хинолоназы, активируют эффлюксные механизмы, осуществляют модификацию мишени макролидов путем рибосомального метилирования рРНК [95]. Самыми актуальными ферментами резистентности являются β -лактамазы. Ацинетобактерии способны продуцировать все 3 молекулярных класса (А, С и D) сериновых β -лактамаз, а также β -лактамазы класса В. Ацинетобактерии могут продуцировать несколько типов фермента КРС: КРС-2, КРС-3 и КРС-4. КРС наиболее активно гидролизует пенициллины, цефалоспорины I–IV поколения, карбапенемы, азтреонам. Фермент GES-14 имеет аналогичный спектр субстратов, включающий пенициллины, цефалоспорины, карбапенемы, азтреонам [42]. Лактамазы типа В (МБЛ) обеспечивают гидролиз всех β -лактамов (включая карбапенемы), кроме азтреонама. МБЛ обнаруживаются у меньшего числа клинических изолятов, чем ОХА-ферменты, но при этом они характеризуются очень высокой (в 100–1000 раз выше, чем ОХА) гидролизующей активностью в отношении карбапенемов. МБЛ ацинетобактерий представлены семействами IMP, VIM, SIM, NDM.

Доминирующей группой карбапенемаз являются лактамазы типа D — ОХА-ферменты, которые обеспечивают устойчивость не только к пенициллинам, но и к карбапенемам. ОХА-51-подобные ферменты (около 40 видов), обладающие пенициллиназной активностью в отношении бензилпенициллина, ампициллина, тикарциллина, пиперациллина [127]. К «профессиональным» ОХА-карбапенемазам ацинетобактерий относят ОХА-23, ОХА-24/40, ОХА-25, ОХА-26, ОХА-27, ОХА-49, ОХА-58, ОХА-72, ОХА-73, ОХА-96, ОХА-97, ОХА-143, ОХА-231 [78]. Наибольшее клиническое значение имеют ОХА-23 и ОХА-58. Гены, кодирующие ОХА-белки — *bla*ОХА, располагаются в хромосомах (ОХА-23, ОХА-24/40, ОХА-58, ОХА-97) и плазмидах (ОХА-23, ОХА-24/40, ОХА-58, ОХА-72, ОХА-97, ОХА-143, ОХА-231). Важно, что активность ферментов ОХА-23, ОХА-58, ОХА-40 не ингибируется клавулановой кислотой [99].

В целом, резистентность ацинетобактерий к карбапенемам существенно варьирует в зависимости от региона. В Европе доля карбапенемрезистентных штаммов колеблется от 4% (Швеция) до 85% (Греция), демонстрируя увеличение распространенности устойчивых штаммов по направлению с севера на юг, что получило в литературе название «градиент резистентности Север–Юг» [77]. Резистентность к колистину также зависит от региона и категории пациентов и составляет от 0,3 до 40,7% [52].

В России, согласно данным многоцентрового исследования МАРАФОН в 2011-2012 гг., доля изолятов *Acinetobacter spp.* в структуре возбудителей нозокомиальных инфекций составила 14,8%, в т.ч. *A. baumannii* – 13,9 %. Доля нечувствительные к меропенему и имипенему изолятов составили 67,5% и 96,0%, что существенно выше аналогичных показателей в 2006–2007 гг.(38,6% и 6%). У 46,8% изолятов *A. baumannii* выявлено наличие генов приобретенных карбапенемаз ОХА-40 (38,0%), ОХА- 23 (4,6%) и ОХА-58 (4,2%) [27]. Исследования, проведенные

Горбичем Ю.Р. и соавт. в Республике Беларусь в 2010 году, показывают рост карбапенемрезистентности: устойчивость к имипенему составляла 53,5%, к меропенему – 60,6% [5]. Другой группой исследователей были получены данные об обнаружении МБЛ-карбапенемазы группы NDM у изолятов *A. genomospecies* 13 в Санкт-Петербурге [1]. По данным зарубежной литературы в мире присутствуют схожие тенденции. Исследования, оценивающие антибактериальную устойчивость в Южной Америке, Европе, Латинской Америке и Южно-Тихоокеанском регионе, показали, что доля нечувствительных изолятов *A. baumannii* к меропенему и имипенему составила 45,9 % и 48,2%, соответственно [34]. В Южной Индии доминирует МБЛ-карбапенемаза – IMP-1(42%) [72]. В Китае карбапенемаза OXA-23 (97%) является преобладающей детерминантой резистентности, причем 82% этих изолятов принадлежит к ST92 (CC92), который широко распространен по всему миру [52].

Таким образом, доминирующей детерминантой устойчивости ацинетобактерий к карбапенемам является продукция карбапенемаз группы OXA, которые распространены во всем мире.

1.3.2. Особенности формирования резистентность к АМП *P. aeruginosa*

P. aeruginosa обладает природной резистентностью к ряду АМП: ампициллину, амоксициллин-клавуланату, цефазолину, цефотаксиму, цефтриаксону, эртапенему, канамицину, неомицину, тетрациклину, тигециклину, триметоприму, триметоприма-сульфаметоксазолу [131]. Для определения чувствительности к АМП, согласно европейским рекомендациям [131], клинические изоляты *P. aeruginosa* следует тестировать к: пиперациллину, пиперациллин-тазобактаму, тикарциллину, тикарциллин-клавуланату, цефепиму, цефтазидиму, дорипенему, имипенему, меропенему, азтреонаму, ципрофлоксацину,

левофлоксацину, амикацину, гентамицину, нетилмицину, тобрамицину, колистину.

Устойчивость к β -лактамным антибиотикам у *P. aeruginosa* формируется за счет продукции β -лактамаз, которая может сочетаться с другими детерминантами резистентности. Продукция инактивирующих ферментов может обеспечивать устойчивость к аминогликозидам и карбапенемам, а хромосомные мутации в гене *gyrA* ДНК_гиразы – резистентности к фторхинолонам. Устойчивость к β -лактамным антибиотикам может быть опосредована нарушением проницаемости микробной клетки для антибиотика в результате утраты поринового канала OprD, активацией эффлюксных систем (MexAB_OprM, MexEF_OprN, MexXY_OprM), продукцией β -лактамаз классов А, С и D плазмидной или хромосомной локализации.

Хромосомные β -лактамазы класса С (AmpC) гидролизуют цефалоспорины III поколения и антисинегнойные пенициллины, в т. ч. ингибиторзащищенные, плазмидные β -лактамазы расширенного спектра гидролизуют цефалоспорины III и IV поколения и азтреонам [18].

В последнее время широкое распространение получили МБЛ, хотя раньше доминирующим механизмом резистентности к карбапенемам было снижения проницаемости мембраны из-за потери порина OprD [80]. Гены, кодирующие МБЛ, располагаются на генетических кассетах в интегронах, которые обеспечивают им дальнейшую экспрессию и диссеминацию. Клиническое значение у изолятов *P. aeruginosa* приобрели ферменты МБЛ 9 групп: IMP, VIM, SPM-1, GIM, SIM-1, AIM, KHM, NDM-1 и DIM-1, но наиболее широко распространены по всему миру карбапенемазы групп VIM и IMP [73].

В России по данным многоцентрового исследования МАРАФОН в 2011-2012 гг. доля *P. aeruginosa* в общей структуре нозокомиальных инфекций составила 20%, устойчивость к меропенему и имипенему составила 88% и 67%. Карбапенемаза группы VIM была выявлена в 28%

случаев. В Республике Беларусь также ключевой карбапенемазой, определяющей устойчивость МБЛ-продуцирующих штаммов *P. aeruginosa*, была группа VIM (100%) [18]. В Европе структура групп МБЛ-карбапенемаз более гетерогенна. Согласно данным Castanheira и соавт., МБЛ была обнаружена у 20% нечувствительных к карбапенемам *P. aeruginosa*, которые относились к группам VIM-2 (72%), VIM-4 (13%), VIM-1 (7%) и VIM-5 (5%), а также были выявлены новые группы МБЛ (IMP-33, VIM-36, VIM-37). Опять же подчеркивается рост доли устойчивости к карбапенемам в 2011 (31%) по сравнению с предыдущими исследованиями (2009 г. – 13%; 2010 г. – 12%) [55].

Таким образом, проблема устойчивости к карбапенемам среди изолятов *P. aeruginosa* носит глобальный характер. Одним из ключевых механизмов устойчивости является МБЛ группы VIM.

1.3.3. Особенности формирования резистентности к АМП штаммов *K. pneumoniae*

Спектр антибиотиков, рекомендуемых для лечения клебсиеллезной инфекции, достаточно широк и закреплён документально. Согласно российским клиническим рекомендациям «Определения чувствительности микроорганизмов к антимикробным препаратам» и европейским критериям определения чувствительности к антимикробным препаратам EUCAST, для лечения инфекций, вызванных *K. pneumoniae*, рекомендованы следующие группы препаратов: пенициллины, цефалоспорины, карбапенемы, монобактамы, фторхинолоны, аминогликозиды, тетрациклины, глицилциклины и другие.

Одним из наиболее распространенных механизмов приобретения лекарственной устойчивости у *K. pneumoniae* является продукция БЛРС. В последнее десятилетие наиболее часто встречающимся, эпидемически распространившимся по всему миру, стал СТХ-М тип БЛРС,

включающий в себя ферменты, обеспечивающие устойчивость к цефалоспорином расширенного спектра действия [19].

В России нозокомиальные штаммы энтеробактерий – продуценты БЛРС впервые были описаны в 1997 – 1998 гг. Эйдельштейном М.В. и соавт. [65]. Доля БЛРС-положительных штаммов *K. pneumoniae* составляла 60,8%, среди которых ген СТХ-М был обнаружен в 34,9% случаев. Позже, в 2004 г., Сидоренко С.В. с соавт. опубликовали данные о продуцентах БЛРС семейства *Enterobacteriaceae*, выделенных в 2002 – 2003 гг. В работе было показано, что их число выросло до 51,2%, а также обнаружено, что в одном штамме могут сочетаться одновременно β -лактамазы разных типов (СТХ-М, ТЕМ и SHV) [2]. В 2010 году в работе Прячук С.Д. [19] был показан рост числа штаммов СТХ-М - продуцентов до 90%, а также показано увеличение доли штаммов, несущих несколько генов БЛРС, по сравнению с более ранними работами. В Северной Америке по данным исследования SMART (2008-2010), при интраабдоминальной инфекции у детей 25% *K. pneumoniae* были БЛРС-позитивными [83]. Ген СТХ-М обнаружен в 74% случаев, а также встречались комбинации разных генов БЛРС.

Одним из основных факторов риска в приобретении штаммов БЛРС у взрослых служит фекальная колонизация, которая возникает вследствие употребления мяса фермерских животных, розничных продуктов животного происхождения, недавнее лечение антибиотиками [123]. Описаны случаи широкого распространения БЛРС - носительства в семьях. У детей основным фактором колонизации БЛРС - позитивными *K. pneumoniae* является нахождение ребенка в ОРИТ [93; 94]. Кроме того, колонизации способствует недоношенность, маловесность, длительное нахождение на аппарате искусственной вентиляции легких и лечение АМП [93; 94; 117]. По результатам исследований, проводившихся в Германии, риск колонизации у детей микроорганизмами с БЛРС возрастает в 6 раз, если мамы были их

носителями [83]. Исследование Ильиной В.Н. [8] показало наличие резистентности *K. pneumoniae* к цефалоспорином III и IV поколения у 87% и 78%, соответственно, при этом фенотипический тест на БЛРС был положительным у 60% изолятов. Пациенты, у которых была выделена устойчивая к цефалоспорином III-IV поколения *K. pneumoniae*, имели предшествующую госпитализацию. Многоцентровое французское исследование, проведенное в 1999 – 2003 гг., впервые отразило появление БЛРС – продуцентов у детей. Тест на БЛРС был положительный у 23,2% *K. pneumoniae* и у *E. coli* – 1,4%. В 2004 году исследование SENTRY показало рост числа БЛРС-продуцентов: у *E. coli* – 5,4%, у *Klebsiella spp.* – 21,2 – 24,7%. В более позднем исследовании SMART 2008-2010 гг. процент БЛРС-продуцентов штаммов *E. coli* вырос до 6% при интраабдоминальных инфекциях. Имеются также европейские данные о молекулярной эпидемиологии БЛРС. В Венгрии в начале 2000-х годов самой распространенной БЛРС был SHV-5-тип у *K. pneumoniae*. В 2009 г. в Польше 90% продуцентов БЛРС были носителями гена *bla_{CTX-M}*. Дети находятся в большой зоне риска при появлении мультирезистентных штаммов семейства *Enterobacteriaceae* из-за ограниченного спектра разрешенных к применению АМП [83].

В клинике наиболее значимыми карбапенемазами у *K. pneumoniae* считают ферменты молекулярных классов А - КРС-группу, В (МБЛ) – VIM, IMP, NDM и D – OXA-48. КРС-β-лактамаза подавляет активность АМП широкого спектра, такие как пенициллины, цефалоспорины, азтреонам и карбапенемы. Первая вспышка КРС-продуцентов *K. pneumoniae* произошла в начале 21 века в США, эпицентром вспышки был штат Нью-Йорк [113]. Позднее продуценты КРС стали выявлять и в соседних штатах, а также в этот же период и в Латинской Америке, в Израиле, Китае, Греции. МЛСТ носителей КРС показало что, большинство изолятов принадлежало к ST258.

Впервые VIM-продуцирующая *K. pneumoniae* была описана в 2001 - 2003 гг. в Северной Европе. Следует отметить, что такой тип карбапенемазы встречается редко среди *K.pneumoniae* и в основном отдельными вспышками в определенном стационаре. IMP-продуцирующие изоляты *K. pneumoniae* часто встречаются в Японии, где они впервые и были выявлены в 1990-х годах. В других странах такие изоляты встречаются крайне редко. Очагом появления NDM-продуцирующих изолятов является Индия, где распространение и колонизация происходит как у человека, так и в окружающей среде. В Европе, Австралии и Северной Америке также были зарегистрированы случаи выявления NDM – продуцентов *K.pneumoniae*, но они достаточно редки.

Наиболее распространены OXA-48-продуцирующие *K. pneumoniae*. Изначально β -лактамазы семейства OXA (OXA-23, OXA-24/40, OXA-58) чаще всего встречались у ацинетобактерий и обладали слабой карбапенемазной активностью. В 2001 году впервые был выявлен штамм *K. pneumoniae* с β -лактамазой OXA-48 с высоким уровнем карбапенемазной активности. Гидролитическая активность OXA-48 у клебсиелл в отношении имипенема примерно в 10 раз выше по сравнению с OXA-лактамазами у ацинетобактерий [113]. Оказалось, что механизм гидролиза OXA-48-карбапенемазы отличается от других групп семейства OXA. OXA-48 осуществляет гидролиз АМП за счет вращения карбапенем-альфа-гидрокси группы вокруг активного центра, что позволяет вращать деацилированную воду по отношению к ациллированному остатку серина. Таким образом, OXA-48-продуцирующие штаммы *K. pneumoniae* показывают высокие значения МПК в отношении карбапенемов [76; 77; 113]. В Европе впервые OXA-48-позитивный мультирезистентный штамм *K. pneumoniae* был выделен во Франции. Кроме карбапенемаз, у данного штамма обнаружен ген

БЛРС (bla_{CTX-M-15}), что свидетельствует о комбинированном механизме резистентности к карбапенемам [63].

В России в 2013 году в работе Агеевца и соавт. [1] были описаны высокорезистентные штаммы *K. pneumoniae*, у которых были выявлены высокие значения МПК для цефалоспоринов, карбапенемов, аминогликозидов, азтреонама, чувствительность сохранялась только для тигециклина и полимиксина В. У данных изолятов были обнаружены карбапенемазы типа KPC-2 и NDM-1. По данным многоцентрового эпидемиологического исследования МАРАФОН в 2011-2012 гг. в России нечувствительность к меропенему, имипенему и эртапенему проявляли, соответственно, 2,8%, 8,4%, и 14% изолятов *K. pneumoniae*, у 3,7% изолятов выявлена продукция карбапенемаз групп OXA-48 (3,3%) и NDM-1 (0,4%) [26].

Таким образом, представители семейства *Enterobacteriaceae*, в частности *K. pneumoniae*, являются одними из наиболее опасных возбудителей нозокомиальной инфекции, т.к. способны быстро формировать устойчивость к основным группам АМП. Ключевым механизмом является продукция β-лактамаз, группы которых различны в зависимости от региона, страны и стационара.

1.4. Пути преодоления антибиотикорезистентности

Согласно стратегии ВОЗ, одним из путей преодоления антибиотикорезистентности является улучшение антимикробной терапии [46]. Препаратами резерва для лечения нозокомиальных инфекций, вызванных полирезистентными *A. baumannii*, являются ампициллин/сульбактам, полимиксины и тигециклин. Ингибитор сульбактам сохраняет активность в отношении карбапенем-устойчивых изолятов. Полимиксины могут быть использованы для лечения нозокомиальных пневмоний, бактериемий и менингитов, вызванных штаммами *A. baumannii*. Только в случае отсутствия чувствительности к

другим АМП рекомендуется назначение тигециклина. Однако, для борьбы с полирезистентными штаммами *P. aeruginosa* тигециклин не рекомендован, АМП резерва являются полимиксины и фосфомицин [76].

АМП резерва для лечения инфекций, вызванных карбапенем-устойчивыми штаммами *K. pneumoniae*, являются полимиксин В, колистин, фосфомицин и тигециклин [76]. Однако в 2009 году в Америке было зарегистрировано 5 случаев выявления колистин-резистентных карбапенем-устойчивых изолятов *K. pneumoniae*, чуть ранее в 2004 г. в Греции также выявлены подобные изоляты. В 2010 году в Италии 36% изолятов *K. pneumoniae* были устойчивы к колистину и 20,4% тигециклину. Тигециклин не рекомендован детям до 18 лет, его назначение в ОРИТ проводится при отсутствии альтернативы в виде других АМП [76]. В 2014 году было предложено 7 новых АМП для лечения полирезистентных грамотрицательных инфекций (цефтазидим/авибактам, цефтаролин/авибактам, плазомицин, эравациклин, азтреонам/авибактам, имипенем/релебактам, цефтолозан/тазобактам), но только один из них (цефтазидим/авибактам) был рекомендован для детей [83]. Цефтазидим/авибактам и цефтралин/авибактам (цефалоспорины) направлены на лечение инфекций, вызванных продуцентами карбапенемаз групп ОХА-48 и КРС; плазомицин (аминогликозиды) – КРС, эравациклин (тетрациклины) – КРС [89].

Такие эпидемиологические меры, как изоляция пациентов, тщательная гигиена, персонифицированный медицинский персонал и альтернативный антимикробный режим, работают эффективно на пути снижения распространения микроорганизмов, продуцирующих β -лактамазы. Проведение активного мониторинга по выявлению носительства устойчивых микроорганизмов также является частью программы по борьбе с распространением резистентности. Согласно исследованию NICU, еженедельное выявление БЛРС-продуцирующих *K.*

pneumoniae сократило долю неонатальной колонизации на 52% [41]. Однако авторы исследования отмечают, что в периоды активной госпитализации повышения числа БЛРС-продуцирующих бактерий было связано со снижением мониторинга среди персонала. Снижение потребления АМП в животноводстве и разработка обучающих программ по использованию АМП в педиатрии также является одной из эффективных мер по борьбе с появлением полирезистентных штаммов [83].

Таким образом, проблема рациональной антибиотикотерапии ставит остро вопрос выделения изолятов, обладающих множественной лекарственной устойчивостью, а также определения механизмов резистентности к АМП. Циркуляция подобных изолятов существенно сужает спектр применяемых АМП, и несет в себе угрозу повсеместного распространения. Поэтому одним из путей преодоления антибиотикорезистентности может стать мониторинг устойчивых изолятов, изучение их фенотипических и генотипических свойств, что поможет в выборе адекватной антибактериальной терапии.

РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

ГЛАВА 2. Видовой состав и профиль чувствительности микробиоты у детей в ОРИТ

В настоящем разделе приведены результаты определения видовой принадлежности возбудителей, проведенного в ходе рутинной работы лаборатории с помощью масс-спектрометра MALDI-TOF-MS Biotyper MicroFlex и анализатора VITEK2 Compact. При расчете доли конкретного возбудителя учитывали только недублирующиеся изоляты одного вида, т.е. 1 пациент – 1 изолят одного вида. Помимо общей структуры микробиоты, мы оценили и сравнили распространенность различных возбудителей по локусам выделения.

2.1. Видовой состав микробиоты у детей в ОРИТ

В период с 2012 по 2014 г. было проанализировано 17302 образцов биоматериала, полученных от 935 детей, находившихся в ОРИТ 2-х детских стационаров города Москвы. При сравнении двух педиатрических ОРИТ были выявлены схожие тенденции по структуре микробиоты у детей и ее устойчивости к основным группам АМП. Распространенность возбудителей с долей $\geq 1\%$ представлена в Таблице 5. В структуре микробиоты преобладали грамотрицательные бактерии, относящиеся к двум ключевым группам: бактерии семейства *Enterobacteriaceae* (*K. pneumoniae*, *E. coli*) и неферментирующие грамотрицательные бактерии (*A. baumannii*, *P. aeruginosa*, *Elizabethkingia* spp., *S. maltophilia*, *Burkholderia* spp., *Ralstonia* spp.). Наибольшую распространенность показали *K. pneumoniae* (41%, 387/935), *E. coli* (27%, 254/935), *P. aeruginosa* (24%, 222/935) и *A. baumannii* (14%, 128/935).

Общая структура микробиоты у детей в ОРИТ

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

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

Другие неферментирующие грамотрицательные бактерии суммарно составили 15% в общей структуре микробиоты: *S. maltophilia* – 10% (96/935), *Ralstonia spp.* – 3% (25/935), по 1% – *Elizabethkingia spp.* (13/935) и *Burkholderia spp.* - (12/935). Грамположительные возбудители были представлены преимущественно *Enterococcus faecium* (19%, 177/935) и *Staphylococcus aureus* (9%, 81/935). Грибы рода *Candida* составили 18% (170/935) в общей структуре микробиоты.

Помимо общей структуры микробиоты, мы оценили и сравнили распространенность различных возбудителей в КЗЛ (трахея, стома/рана,

кровь, моча) и ЛМ (зев, анус). Результаты данного анализа показаны в Таблице 6.

Таблица 6

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

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

Примечание.

а) Число не совпадает с числом изолятов в Таблице 5, т.к. возбудитель одного вида мог присутствовать разных локусах у одного и того же пациента.

б) Значимость различий между долями соответствующего микроорганизма в КЗЛ и ЛМ. Жирным шрифтом выделены значимые различия.

Структура микробиоты в КЗЛ и ЛМ различалась статистически значимо ($\chi^2 = 26,4$, $p < 0,001$). Доля *E. coli* и *E. faecium* была больше в ЛМ

(суммарно 31% в ЛМ против 13% в КЗЛ), тогда как большую долю в структуре возбудителей КЗЛ, по сравнению с ЛМ, имели *A. baumannii* (12% против 6%) и другие неферментирующие бактерии (суммарно 13% против 5%).

Частота выделения *E. coli* и *E. faecium* в ЛМ была заметно выше по сравнению с КЗЛ, и составила 85% (244/287) и 77% (157/204), соответственно. В ЛМ также преобладали *K. pneumoniae* (64%), *P. aeruginosa* (56%) и *Candida spp.* (67%). Примерно с одинаковой частотой в ЛМ и КЗЛ обнаруживали *A. baumannii* (47% и 53%), *S. aureus* (45% и 55%). Примечательно, что возбудители из группы неферментирующих бактерий присутствовали преимущественно (*S. maltophilia*, *Burkholderia spp.*) или исключительно (*Elizabethkingia spp.*, *Ralstonia spp.*) в КЗЛ, что свидетельствовало о развитии нозокомиальной инфекции (Таблица 6).

Из числа клинически значимых изолятов *A. baumannii* большинство было выделено из трахеи (70%, 64/91) (Таблица 7), примерно в равных долях они встречались в крови (15%, 14/91) и стоме/ране (12%, 14/91). Реже всего ацинетобактерии выделялись из мочи – 2% (2/91). Изоляты *A. baumannii* из ЛМ чаще выделялись в зеве (70%, 58/ 82), по сравнению с анусом (29%, 24/82). Наибольшее число изолятов *P. aeruginosa* в КЗЛ было выделено из трахеи (45%, 69/151) (Таблица 7). Из стомы/раны было выделено 28% (42/151), из мочи – 16% (25/151) изолятов *P. aeruginosa*. В крови было обнаружено 10% (15/151) штаммов этого возбудителя. *P. aeruginosa* присутствовала примерно в равных долях в обоих ЛМ, включая анус (52%, 101/344) и зев (47%, 92/344).

Изоляты *K. pneumoniae* из КЗЛ чаще обнаруживались в трахее (34%, 71/208) и в моче (28%, 58/208). Из крови было выделено 17% (35/211) штаммов, из стомы/раны – 21% (44/208) клинически значимых изолятов. В ЛМ *K. pneumoniae* чаще выявлялись в анусе (60%, 223/372) по сравнению с зевом (40%, 149/372).

Распространенность штаммов *A. baumannii*, *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae* по локасам выделения

М/О Локус	<i>A. baumannii</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>K. pneumoniae</i>
Всего, n	173	344	580
Из числа КЗЛ всего	91 (100%)	151 (100%)	208 (100%)
В том числе:^{a)}			
Трахея	70% (64)	45% (69)	34% (71)
Стома/рана	12% (11)	28% (42)	21% (44)
Кровь	15% (14)	10% (15)	17% (35)
Моча	2% (2)	16% (25)	28% (58)
Из числа ЛМ всего:	82 (100%)	193 (100%)	372 (100%)
В том числе:^{a)}			
Зев	70% (58)	47% (92)	40% (149)
Анус	29% (24)	52% (101)	60% (223)

Примечание. ^{a)} – в скобках указано абсолютное число изолятов

2.2. Определение чувствительности у штаммов *A. baumannii*, *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae* к основным группам АМП

В настоящем разделе приведены результаты определения чувствительности указанных возбудителей к АМП, проведенного в ходе рутинной работы лаборатории с помощью диско-диффузионного метода или анализатора Vitek2Compact. При расчете доли учитывали только

недублирующиеся изоляты одного вида, т.е. 1 пациент – 1 изолят конкретного вида.

2.2.1. *A. baumannii*

Для штаммов *A. baumannii* определяли чувствительность к карбапенемам (меропенем, имипенем), аминогликозидам (амикацин, гентамицин, нетилмицин), фторхинолонам (ципрофлоксацин) и колистину (Таблица 8).

Таблица 8

Спектр устойчивости у штаммов *A. baumannii* к АМП

АМП	Доля НЧ изолятов ^{а)}			<i>p</i> ^{б)}
	Всего n=131-137	в КЗЛ n=70-74	в ЛМ n=61-63	
Амикацин	83%	89%	75%	0,03
Гентамицин	83%	89%	76%	0,04
Нетилмицин	66%	72%	59%	0,11
Ципрофлоксацин	89%	95%	82%	0,01
Колистин	2%	3%	2%	0,71
Меропенем	68%	75%	60%	0,13
Имипенем	68%	74%	61%	0,11

Примечание. Здесь и в Таблицах 9, 10: АМП, антимикробный препарат; НЧ – нечувствительный; КЗЛ – клинически значимые локусы; ЛМ – локусы мониторинга. ^{а)} Абсолютные числа «n» представлены в виде диапазона, т.к. результаты тестирования устойчивости конкретного АМП были доступны для разного числа изолятов. ^{б)}*p* – значимость различий при сравнении долей изолятов, нечувствительных к соответствующему АМП, в КЗЛ и ЛМ.

Доля резистентных бактерий превышала 60% для всех АМП, за исключением колистина (2%). Особенно высокой была резистентность к ципрофлоксацину (89%) и аминогликозидам (амикацин, гентамицин) (83%). К числу карба-НЧ относились 68% исследованных *A. baumannii*. Анализ спектра устойчивости по локусам выделения показал, что резистентные изоляты чаще встречались в КЗЛ. Так, резистентными к ципрофлоксацину были 95% клинически значимых изолятов против 82% изолятов из ЛМ ($p=0,01$).

2.2.2. *P. aeruginosa*

Для штаммов *P. aeruginosa* определяли чувствительность к карбапенемам (меропенем, имипенем), аминогликозидам (амикацин, гентамицин, нетилмицин), фторхинолонам (ципрофлоксацин), цефалоспорином (цефтазидим, цефепим) и колистину (Таблица 9).

Таблица 9
Спектр устойчивости штаммов *P. aeruginosa* к АМП

АМП	Доля НЧ изолятов			p
	Всего n=220-253	в КЗЛ n=86-98	в ЛМ n=134-155	
Амикацин	48%	54%	44%	0,12
Гентамицин	55%	59%	53%	0,35
Нетилмицин	41%	48%	37%	0,09
Цефтазидим	58%	64%	53%	0,17
Цефепим	51%	58%	46%	0,06
Ципрофлоксацин	51%	55%	32%	0,005
Колистин	1%	3%	0%	0,04
Меропенем	54%	63%	49%	0,03
Имипенем	58%	64%	55%	0,16

В целом, устойчивость штаммов *P. aeruginosa* к различным группам АМП (за исключением колистина) варьировала от 41% до 58%. Доля нечувствительных изолятов *P. aeruginosa* в КЗЛ была значимо выше для ципрофлоксацина и колистина.

2.2.3. *K. pneumoniae*

У изолятов *K. pneumoniae* определяли чувствительность к карбапенемам (меропенем, имипенем), аминогликозидам (амикацин, гентамицин, нетилмицин), цефалоспорином (цефтазидим, цефепим), фторхинолонам (ципрофлоксацин) и колистину (Таблица 10).

Таблица 10

Спектр устойчивости у штаммов *K. pneumoniae* к АМП

АМП	Доля НЧ изолятов			p
	Всего n=407-473	в КЗЛ n=135-166	в ЛМ n=272-307	
Амикацин	46%	53%	42%	0,03
Гентамицин	68%	72%	66%	0,2
Нетилмицин	49%	48%	49%	0,84
Цефтазидим	82%	83%	81%	0,62
Цефепим	86%	90%	84%	0,09
Ципрофлоксацин	59%	64%	56%	0,11
Колистин	19%	20%	18%	0,62
Меропенем	27%	28%	27%	0,82
Имипенем	26%	24%	27%	0,49

Наибольшая устойчивость зафиксирована в отношении цефалоспоринов (82-86%). По сравнению с *A. baumannii* и *P. aeruginosa*, большинство изолятов *K. pneumoniae* сохраняли чувствительность к карбапенемам (доля резистентных штаммов 26-27%). В то же время, многие штаммы *K. pneumoniae* (19%) были устойчивы к колистину, тогда как среди штаммов *A. baumannii* и *P. aeruginosa* лишь единичные изоляты обладали резистентностью к этому АПМ (см. Таблицы 8, 9). В КЗЛ наблюдалась тенденция к большей распространенности устойчивых к АМП штаммов *K. pneumoniae* (например, к амикацину, цефепиму).

В группе аминогликозидов наибольшая устойчивость была выявлена для гентамицина (68%), при этом значимых различий между локусами выделения не обнаружено. Доля устойчивых к амикацину изолятов *K. pneumoniae* в КЗЛ оказалась выше по сравнению с ЛМ (53% против 42%, $p = 0,03$).

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

Для проведения данного этапа работы были отобраны 76 изолятов *A. baumannii*, включая 65 карбапенем-нечувствительных (карба-НЧ) и 11 карба-Ч изолятов. У этих штаммов были определены МПК актуальных групп АМП, оценена распространенность носительства генов 6 карбапенемаз, а также охарактеризована клональная структура.

3.1. МПК АМП у исследованных изолятов *A. baumannii*

МПК определяли методом Е-тестов для меропенема, имипенема, колистина и на анализаторе Vitek 2 Compact для гентамицина и нетилмицина. Спектр устойчивости и диапазоны МПК исследованных групп АМП представлены в таблице 11. Критерием деления на группы карба-Ч и карба-НЧ служила устойчивость к меропенему и имипенему. Все карба-Ч изоляты были чувствительны к исследованным карбапенемам с МПК ≤ 2 мкг/мл (Рисунок 3, А). Все карба-НЧ изоляты были устойчивы к меропенему и имипенему с высокими значениями МПК (>32 мкг/мл) (Рисунок 3, Б).

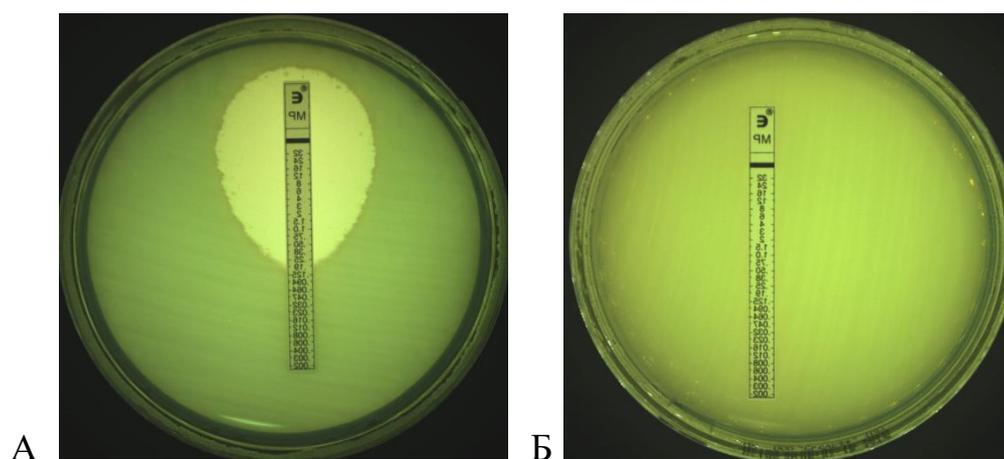


Рисунок 3. Фенотипический тест на определение МПК меропенема методом Е-тестов у изолятов *A. baumannii*. На чашку нанесена бактериальная взвесь *A. baumannii* мутностью 0.5 по МакФарланду; по центру чашки – полоска Е-теста с нанесенными разведениями. А карба-

Ч изолят, заметна зона подавления роста, МПК = 0.19 мкг/мл. Б – карба-НЧ изолят, отсутствует зона подавления роста, МПК > 32мкг/мл.

Все карба-НЧ изоляты были устойчивы к ципрофлоксацину, большинство (78-88%) – к аминогликозидам (гентамицину, нетилмицину) (Таблица 11). Карба-Ч *A. baumannii* были менее устойчивы к ципрофлоксацину (64%) и нетилмицину (45%). Все изоляты, исследованные в данном разделе работы, были чувствительны к колистину.

Таблица 11

Устойчивость к антибиотикам и диапазон МПК у штаммов *A. baumannii*

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

Примечание.

НЧ – нечувствительный; НТ – не тестировали; p – значимость различий при сравнении долей нечувствительных к соответствующему антибиотику карба-Ч и карба-НЧ изолятов.

^а Разделение на группы карба-Ч и карба-НЧ проводили по признаку нечувствительности к меропенему и/или имипенему.

3.2. Распространенность генов карбапенемаз среди карба-НЧ изолятов *A. baumannii*

Все штаммы были протестированы на наличие карбапенемаз групп ОХА-23, ОХА-40, ОХА-58, IMP, NDM, VIM. У карба-Ч изолятов гены всех указанных карбапенемаз отсутствовали. В числе карба-НЧ штаммов *A. baumannii* не было обнаружено ни одного носителя генов МБЛ IMP, NDM, VIM, а наибольшую распространенность (97% изолятов, 63/65) имела карбапенемаза ОХА-40 (Таблица 12). Еще у 3 изолятов (5%) определялся ген ОХА-23. У 1 штамма было обнаружено сочетание ОХА-40 и ОХА-23.

Таблица 12

Носительство карбапенемаз среди карба-НЧ штаммов *A. baumannii*

Тип карбапенемазы	n	% ^{a)}
ОХА-23	3	5
ОХА-40	63	97

Примечание. У исследованных изолятов не выявлены гены карбапенемаз ОХА-58, IMP, NDM, VIM.

^{a)} Сумма превышает 100%, т.к. 1 изолят был носителем ОХА-23 и ОХА-40.

3.3. Клональная характеристика штаммов *A. baumannii* и устойчивость к АМП

Анализ клональной структуры *A. baumannii* был проведен с помощью метода мультилокусного сиквенс-типирования (МЛСТ) по схеме Oxford. Всего было выявлено 14 ST, из них 6 ST были описаны впервые и депонированы в базе данных <http://pubmlst.org/abaumannii>. Новые ST получили следующие номера: 1097, 1098, 1099, 1197, 1103, 1104, 1106. В таблице 13 представлены сводные данные по

распределению исследованных изолятов по клональным комплексам и устойчивости к АМП.

Таблица 13

Распределение по клональным комплексам и устойчивость к АМП штаммов *A. baumannii*

СС	Диапазон МПК (мкг/мл) и доля НЧ изолятов			Доля (%) НЧ изолятов		
	Меропенем	Имипенем	Колистин	Гентамицин	Нетилмицин	Ципрофлоксацин
СС92 (n=51)	0,5 - >32 (86%)	1 - >32 (84%)	0,125 - 0,5 (0%)	90	92	100
СС944 (n=21)	>32 (100%)	>32 (100%)	0,125 – 2 (0%)	62	71	100
Нет ^{a)} (n=4)	0,125-1	0,25-0,5	0,016- 0,064 (0%)	0	0	0

Примечание. СС - клональные комплексы; МПК – минимальная подавляющая концентрация. ^{a)} Синглетоны – изоляты без определенной клональной принадлежности

Десять ST принадлежали к 2 глобальным клональным комплексам (СС) – СС92 и СС944, а оставшиеся 4 ST не имели определенной клональной принадлежности (Таблица 13).

СС92 был наиболее представительным (51/76, 67% от выборки в целом) и включал 7 ST. В его составе преобладали *A. baumannii* с ST348 (n=27), ST450 (n=10) и ST208 (n=8), которые суммарно составляли 59% от выборки в целом.

Состав СС944 (21/76, 28% от выборки в целом) был менее разнообразен, включая 3 ST: ST944 (n=13), ST1104 (n=7) и ST1103 (n=1) (Таблица 14, Рисунок 5).

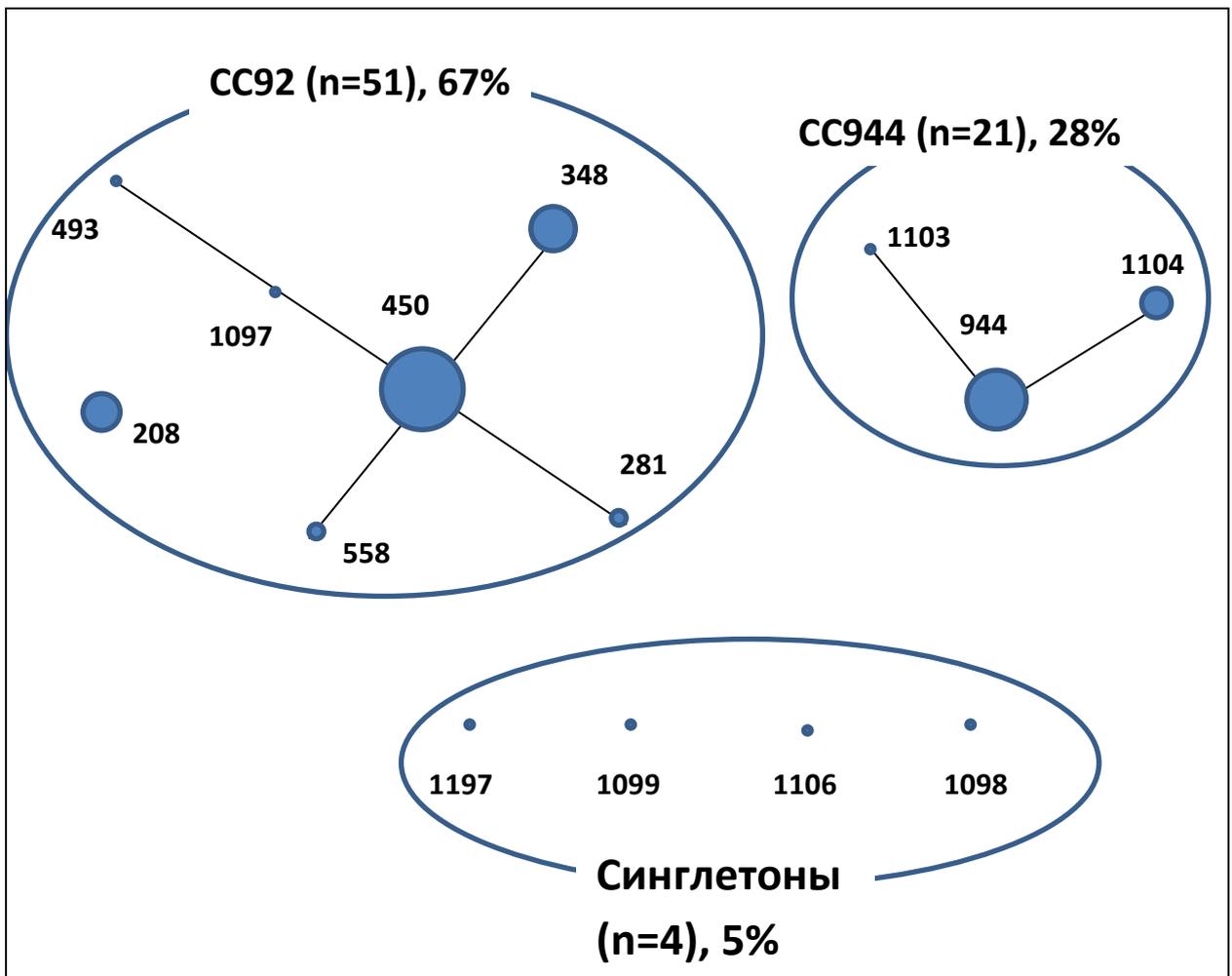


Рисунок 5. Популяционная структура штаммов *A. baumannii*, полученная с помощью МЛСТ-анализа

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

Высокая распространенность устойчивости к различным АМП в изучаемой выборке (см. Таблицу 14) затруднила анализ взаимосвязей между клональной принадлежностью, принадлежностью к определенному ST и антибиотикорезистентностью. В целом, карба-Ч изоляты *A. baumannii* не встречались в CC944, а распределились между ST208, ST450, ST558 и группой из 4 изолятов без определенной клональной принадлежности.

Таблица 14

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

№ изолята	МПК, мкг/мл						ОХА- группа	ST	СС
	меропенем	имипенем	колистин	гентамицин	нетилмицин	ципрофлоксацин			
1	>32	>32	0,125	16	32	4	40	208	92
2	1	1	0,125	16	32	4	Карба-Ч	208	92
3	>32	>32	1,5	16	16	4	40	208	92
4	>32	>32	0,125	16	32	4	40	208	92
5	0,5	0,5	0,125	16	32	4	Карба-Ч	208	92
6	0,5	0,5	0,38	16	32	4	Карба-Ч	208	92
7	0,5	1	0,125	16	32	4	Карба-Ч	208	92
8	0,38	0,5	0,125	16	32	4	Карба-Ч	208	92
9	>32	>32	0,25	16	32	4	40	281	92
10	>32	>32	0,016	16	4	4	40	281	92
11	>32	>32	0,25	16	32	4	40	348	92
12	>32	>32	0,125	16	32	4	40	348	92
13	>32	>32	0,125	16	32	4	40	348	92

Продолжение таблицы 14

№ изолята	МПК, мкг/мл						ОХА- группа	ST	СС
	меропенем	имипенем	колистин	гентамицин	нетилмицин	ципрофлоксацин			
14	>32	>32	0,125	16	16	4	40	348	92
15	>32	>32	0,125	16	32	4	40	348	92
16	>32	>32	0,125	16	32	4	40	348	92
17	>32	>32	0,125	16	32	4	40	348	92
18	>32	>32	0,125	16	32	4	40	348	92
19	>32	>32	0,125	16	32	4	40	348	92
20	>32	>32	0,016	16	32	4	40	348	92
21	>32	>32	0,1	16	32	4	40	348	92
22	>32	>32	0,19	16	32	4	40	348	92
23	>32	>32	0,125	16	32	4	40	348	92
24	>32	>32	0,75	16	32	4	40	348	92
25	>32	>32	0,25	16	32	4	40	348	92
26	>32	>32	0,125	4	32	4	40	348	92
27	>32	>32	0,5	16	32	4	40	348	92

Продолжение таблицы 14

№	МПК, мкг/мл						ОХА- группа	СТ	СС
	меропенем	имипенем	колистин	гентамицин	нетилмицин	ципрофлоксацин			
28	>32	>32	0,5	4	32	4	40	348	92
29	>32	>32	0,125	4	32	4	40	348	92
30	>32	>32	0,125	16	32	4	40	348	92
31	>32	>32	0,125	1	32	4	40	348	92
32	>32	>32	2	16	32	4	40	348	92
33	>32	>32	0,125	16	32	4	40	348	92
34	>32	>32	0,125	16	32	4	40	348	92
35	>32	>32	0,25	4	32	4	40	348	92
36	>32	>32	0,125	16	32	4	40	348	92
37	>32	>32	0,125	16	32	4	40	348	92
38	>32	>32	0,38	16	32	4	40	450	92
39	>32	>32	0,125	16	16	4	40	450	92
40	>32	>32	0,125	16	32	4	40	450	92
41	>32	>32	2		32	4	40	450	92

Продолжение таблицы 14

№ изолята	МПК, мкг/мл						ОХА- группа	СТ	СС
	меропенем	имипенем	колистин	гентамицин	нетилмицин	ципрофлоксацин			
42	>32	>32	0,094	16	16	4	40	450	92
43	>32	>32	0,125	16	16	4	40	450	92
44	>32	>32	2	16	16	4	40	450	92
45	0,5	0,38	0,125	16	4	4	Карба-Ч	450	92
46	>32	>32	0,125	16	16	4	40	450	92
47	>32	>32	0,125	16	16	4	23; 40	450	92
48	>32	>32	0,19	16	32	4	23	493	92
49	>32	>32	0,125	16	4	4	40	558	92
50	0,5	0,5	0,125	16	4	4	Карба-Ч	558	92
51	>32	>32	0,125	16	32	4	23	1097	92
52	>32	>32	0,25	16	32	4	40	944	944
53	>32	>32	0,38	16	32	4	40	944	944
54	>32	>32	0,25	16	32	4	40	944	944
55	>32	>32	0,5	16	32	4	40	944	944

№ изолята	МПК, мкг/мл						ОХА- группа	ST	СС
	меропенем	имипенем	колистин	гентамицин	нетилмицин	ципрофлоксацин			
56	>32	>32	0,75	2	16	4	40	944	944
57	>32	>32	0,5	16	32	4	40	944	944
58	>32	>32	0,5	16	32	4	40	944	944
59	>32	>32	0,125	16	32	4	40	944	944
60	>32	>32	0,19	16	32	4	40	944	944
61	>32	>32	2	16	32	4	40	944	944
62	>32	>32	0,125	4	32	4	40	944	944
63	>32	>32	0,125	16	32	4	40	944	944
64	>32	>32	0,19	16	32	4	40	944	944
65	>32	>32	1,5	16	32	4	40	1103	944
66	>32	>32	0,125	4	2	4	40	1104	944
67	>32	>32	0,125	4	1	4	40	1104	944
68	>32	>32	0,125	1	1	4	40	1104	944
69	>32	>32	0,5	4	4	4	40	1104	944
70	>32	>32	0,125	16	32	4	40	1104	944

Продолжение таблицы 14

№ изолята	МПК, мкг/мл						ОХА- группа	ST	СС
	меропенем	имипенем	колистин	гентамицин	нетилмицин	ципрофлоксацин			
71	>32	>32	0,19	4	2	4	40	1104	944
72	>32	>32	0,5	4	2	4	40	1104	944
70	>32	>32	0,125	16	32	4	40	1104	944
73	0,19	0,25	0,064	1	1	0,25	Карба-Ч	1098	Sing
74	0,125	0,25	0,016	1	1	0,25	Карба-Ч	1099	Sing
75	0,5	0,25	0,064	1	1	0,25	Карба-Ч	1106	Sing
76	0,5	1	0,125	1	1	0,25	Карба-Ч	1197	Sing

Примечание. Изоляты размещены в порядке принадлежности к клональным комплексам (СС). МПК – минимальная подавляющая концентрация; Sing - синглетоны (без определенной клональной принадлежности); НТ – не тестировались, т.к. данные изоляты были карба-Ч.

Отметим, что эти внеклональные изоляты оказались чувствительны ко всем исследованным АМП (Таблица 14). Некоторые изоляты доминирующих СТ, включая ST348 и ST944, сохраняли чувствительность к гентамицину. Большинство представителей впервые описанного ST1104 были чувствительны к аминогликозидам (доля нечувствительных к гентамицину – 2/7, к нетилмицину – 1/7).

Таким образом, основным механизмом, наделяющим исследованные изоляты *A. baumannii* устойчивостью к карбапенемам, является карбапенемаза ОХА-40. Карба-НЧ штаммы *A. baumannii* отличаются также выраженной устойчивостью к аминогликозидам и фторхинолонам, но сохраняют чувствительность к колистину. Устойчивые к АМП изоляты характеризуются высокой клональностью и принадлежат к двум глобально распространенным клональным комплексам CC92 и CC944. При этом внеклональные изоляты не обладают резистентностью.

ГЛАВА 4. Распространенность металло-β-лактамаз (МБЛ) и роль эффлюкс-механизмов в формировании устойчивости к карбапенемам у карбапенем-нечувствительных штаммов *P. aeruginosa*

Для исследования механизмов формирования устойчивости к карбапенемам у штаммов *P. aeruginosa* были отобраны 77 карба-НЧ изолятов этого возбудителя. У отобранных изолятов определили МПК нескольких групп АМП, включая карбапенемы, выполнили фенотипический тест на наличие МБЛ-активности и провели поиск β-карбапенемаз с помощью молекулярно-генетических методов (n=77), а также оценили активность эффлюкса в отношении меропенема путем исследования СССР-зависимого уменьшения МПК этого АМП (n=53).

4.1. МПК исследованных изолятов *P. aeruginosa*

МПК определяли методом E-тестов для меропенема, имипенема, колистина и на анализаторе Vitek 2 Compact для цефтазидима, цефепима, гентамицина и нетилмицина. Спектр устойчивости и диапазоны МПК исследованных групп АМП представлены в таблице 15.

Подавляющее большинство исследованных изолятов обладало высокой МПК к меропенему и имипенему. У 79 % изолятов были отмечены максимальные МПК >32 мкг/мл. Все карба-НЧ штаммы оказались нечувствительны к исследованным цефалоспорином 3-4 поколения с МПК от 8 до > 64 мкг/мл (Таблица 15). Доля штаммов, нечувствительных к аминогликозидам, варьировала от 43% до 61%. Из числа исследуемых аминогликозидов наибольшую активность в отношении карба-НЧ штаммов *P. aeruginosa* проявлял нетилмицин (доля нечувствительных изолятов – 43%). Все карба-НЧ штаммы *P. aeruginosa* были чувствительны к колистину за исключением 1 изолята с МПК колистина=6 мкг/мл.

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

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

Примечание. НЧ – нечувствительный.

^{a)} 1 изолят имел МПК=2 мкг/мл и относился к категории чувствительных.

4.2. Распространенность МБЛ среди изолятов *P. aeruginosa*, устойчивых к карбапенемам

Фенотипический тест на МБЛ-активность с помощью метода двойных дисков (см. Рисунок 1) дал положительный результат у 54 из 77 (70%) карба-НЧ изолятов *P. aeruginosa* (Таблица 16). Для установления молекулярно-генетической природы карбапенемазной активности мы протестировали эти штаммы на наличие генов МБЛ групп IMP, NDM и VIM, а также карбапенемаз из группы OXA методом ПЦР. Единственной выявленной нами детерминантой карбапенемустойчивости стала МБЛ, принадлежащая к группе VIM. Ген *bla_{VIM}* был обнаружен у 50 (65%) карба-НЧ изолятов *P. aeruginosa* (Таблица 16). Все VIM-положительные изоляты обладали также фенотипической МБЛ-активностью.

Следовательно, у 50 из 54 (93%) МБЛ-положительных штаммов *P. aeruginosa* устойчивость к карбапенемам была ассоциирована с МБЛ из группы VIM.

Гены других МБЛ и карбапенемаз, включая IMP, NDM, OXA-23, 40, 58, нам обнаружить не удалось. Как VIM-положительные, так и VIM-отрицательные карба-НЧ *P. aeruginosa* не были носителями генов указанных β -лактамаз.

Таким образом, у 30-35% карба-НЧ штаммов *P. aeruginosa* устойчивость к карбапенемам может быть связана с наличием других механизмов резистентности, не связанным с гидролизом АМП.

Таблица 16

Фенотипическая МБЛ-активность и носительство *bla*_{VIM} у карба-НЧ штаммов *P. aeruginosa*

Носительство <i>bla</i> _{VIM}		Фенотипический тест на МБЛ-активность		Всего
		Положительны й	Отрицательны й	
<i>bla</i> _{VIM}	Положительный а)	50	0	50 (65%)
	Отрицательный а)	4	23	27 (35%)
Всего		54 (70%)	23 (30%)	77 (100%)

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

4.3. Роль эффлюкс-механизмов в формировании устойчивости к карбапенемам у штаммов *P. aeruginosa*

Активное выведение АМП из бактериальной клетки (эффлюкс) может служить одним из механизмов формирования резистентности, в том числе, к карбапенемам. Для определения вклада эффлюксных

механизмов в уменьшение чувствительности к карбапенемам у карба-НЧ штаммов *P. aeruginosa* мы протестировали 53 таких изолята на модели угнетения эффлюкса меропенема в присутствии ионофора СССР. В этой модели МПК меропенема мы определяли методом серийных разведений. Значения МПК у исследованных штаммов варьировали в диапазоне от 8 до 4096 мкг/мл (Рисунок 6). МПК₅₀ составила 512 мкг/мл, МПК₉₀ – 2048 мкг/мл.

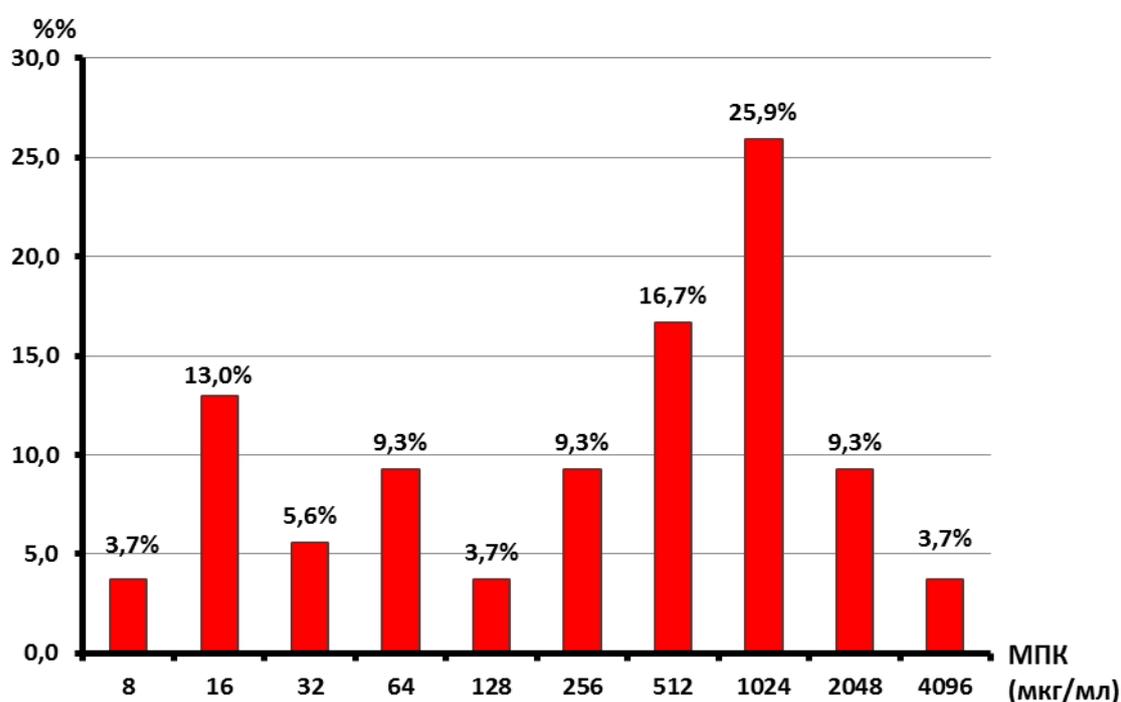


Рисунок 6. Распределение значений МПК меропенема у карба-НЧ штаммов *P. aeruginosa* (n=53)

Примечание. МПК меропенема определяли методом серийных разведений. По оси абсцисс – значения МПК меропенема (мкг/мл), по оси ординат – доля штаммов (%) с конкретным значением МПК.

Таблица 17 иллюстрирует значения МПК меропенема, наличие эффлюкса, наличие МБЛ-активности и карбапенемазы группы VIM у карба-НЧ штаммов *P. aeruginosa*.

Об активности эффлюкса судили по отношению, т.е. кратности уменьшения (КУ) МПК меропенема в культурах без СССР и при его

наличии. При величине КУ МПК < 4 регистрировали отсутствие эффлюкса. КУ МПК меропенема ≥ 4 расценивали как критерий эффлюкса, значимого для формирования карбапенмнечувствительности.

Таблица 17

Эффлюкс-активность и наличие МБЛ у карба-НЧ штаммов *P. aeruginosa*

№ изолята	МПК меропенема (мкг/мл)		КУ МПК Меропенема	Эффлюкс ^{а)}	МБЛ ^{б)}	VIM ^{в)}
	—	+ 25 μ M СССР				
1	4096	64	64	+	+	+
2	4096	8	512	+	-	-
3	2048	512	4	+	-	-
4	2048	1024	2	-	-	-
5	2048	2048	1	-	+	+
6	2048	4	512	+	+	+
7	2048	4	512	+	+	+
8	1024	1024	1	-	-	-
9	1024	1024	1	-	+	+
10	1024	256	4	+	+	-
11	1024	1024	1	-	+	+
12	1024	512	2	-	-	-
13	1024	256	4	+	-	-
14	1024	256	4	+	+	-
15	1024	1024	1	-	+	+
16	1024	128	8	+	+	+
17	1024	512	2	-	+	+
18	1024	256	4	+	-	-
19	1024	64	16	+	-	-
20	1024	512	2	-	+	+
21	512	256	2	-	+	+
22	512	512	1	-	-	-
23	512	512	1	-	-	+
24	512	128	4	+	+	-
25	512	4	128	+	+	+
26	512	512	1	-	-	-
27	512	128	4	+	+	+
28	512	256	2	-	-	-

29	512	256	2	-	-	-
№ изолята	МПК меропенема (мкг/мл)		КУ МПК Меро- пенема	Эффлюкс ^{а)}	МБЛ ^{б)}	VIM ^{в)}
	—	+ 25 μ M СССР				
30	256	128	2	-	+	-
31	256	256	1	-	+	+
32	256	64	4	+	+	+
33	256	16	16	+	+	+
34	256	64	4	+	+	+
35	128	64	2	-	+	+
36	128	8	16	+	+	+
37	64	16	4	+	-	-
38	64	4	16	+	+	+
39	64	64	1	-	-	-
40	64	16	4	+	+	+
41	64	8	8	+	+	+
42	32	32	1	-	+	+
43	32	4	8	+	+	+
44	32	32	1	-	+	+
45	16	8	2	-	+	-
46	16	8	2	-	+	-
47	16	4	4	+	-	-
48	16	4	4	+	+	+
49	16	4	4	+	+	+
50	16	4	4	+	+	+
51	16	8	2	-	+	+
52	8	2	4	+	+	+
53	8	8	1	-	+	+

Примечание. Изоляты размещены в порядке убывания МПК меропенема.

СССР – карбонил-цианид-3-хлорфенилгидразон; КУ – кратность уменьшения МПК (отношение МПК меропенема в отсутствие и при добавлении СССР); МБЛ – фенотипический тест на выявление металло- β -лактамазной активности.

^{а)} (+/-) – наличие/отсутствие эффлюкс-активности в отношении меропенема; активность определяли по КУ МПК меропенема: наличие эффлюкса – КУ > 4 отсутствие эффлюкса – КУ < 4. ^{б)} (+/-) – наличие/отсутствие фенотипической МБЛ-активности. ^{в)} (+) – выявлена карбапенемаза группы VIM; (-) – не выявлены карбапенемазы групп VIM, IMP, NDM, OXA-23, OXA-40, OXA-58.

У 28 (53%) штаммов под влиянием СССР наблюдалось уменьшение МПК в 4 и более раз, что свидетельствовало о наличии активного эффлюкса.

У эффлюкс-положительных штаммов КУ МПК колебался в диапазоне от 4 до 512 с медианой 4. В таблице 18 показаны выраженность активации выведения препарата из клетки во внешнюю среду, значения МПК меропенема и наличие МБЛ у карба-НЧ штаммов *P. aeruginosa*. У 25 штаммов (47%) эффлюкс меропенема отсутствовал; умеренный уровень наблюдался у 23 (43%); 5 штаммов (10%) с КУ МПК >16 были отнесены к группе с высокой активностью эффлюкса, в которой КУ МПК варьировал в диапазоне от 64 до 512. Медианы МПК меропенема в группах с отсутствием эффлюкса или с его низким уровнем отличались между собой статистически незначимо ($p = 0,093$), но были значимо ниже значений МПК меропенема для группы штаммов с высокой активностью эффлюкса ($p = 0,022$).

Таблица 18

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

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

Примечание. МБЛ – фенотипический тест на выявление металло-β-лактамаз; «+» – положительный результат, «-»-отрицательный результат; КУ МПК – коэффициент уменьшения МПК меропенема в присутствии СССР. ^{а)} Доля изолятов в выборке в целом (n=53); ^{б)} Доля изолятов в соответствующей категории активности эффлюкса; ^{в)} – Медиана (P25;P75)

У штаммов обнаружены различные сочетания продукции МБЛ и их эффлюкс-активности (Таблица 18). Самым распространенным оказался вариант сочетания продукции МБЛ и активного эффлюкса: он встречался у 21 (40%) исследованных штаммов. Еще 15 (28%) штаммов обладали МБЛ, но не проявляли эффлюкс-активности. В 7 (13%) случаях регистрировался активный эффлюкс без продукции МБЛ. У 10 (19%) изолятов не было обнаружено ни МБЛ, ни активности эффлюкс-систем. Медианы МПК всех перечисленных групп не отличались между собой (во всех случаях $p > 0,05$); в этих группах не было обнаружено корреляций между значениями МПК и наличием эффлюкса, либо продукцией МБЛ.

Интересно, что доля распространенности МБЛ была связана с уровнем активности эффлюкса: среди бактерий с отсутствием эффлюкс-активности было 60% МБЛ-продуцирующих штаммов, среди изолятов с умеренным эффлюксом - 74%, а в популяции с высокой активностью - 80% (4 из 5 штаммов оказались МБЛ-положительными).

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

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

В настоящей главе мы охарактеризовали спектр антибиотикорезистентности у 67 изолятов *K. pneumoniae* и определили ее молекулярные механизмы в отношении β -лактамных антибиотиков, в том числе карбапенемов. У отобранных изолятов определили МПК нескольких групп АМП, включая карбапенемы, провели поиск 2 групп БЛРС (СТХ-М, ТЕМ) и 6 карбапенемаз с помощью молекулярно-генетических методов, а также оценили варианты их сочетания.

5.1. Профиль чувствительности изолятов *K. pneumoniae*

Для анализа были отобраны 57 карба-НЧ и 10 карба-Ч изолятов *K. pneumoniae*. Спектр устойчивости к антибиотикам и диапазоны МПК исследованных штаммов представлены в Таблице 19. Методом Е-тестов была определена МПК для меропенема, имипенема, колистина и тигециклина; на анализаторе Vitek 2 Compact МПК была определена для цефотаксима, цефтазидима, цефепима, гентамицина, амикацина, нетилмицина, цiproфлоксацина, фосфомицина. Для карба-Ч штаммов чувствительность к меропенему и имипенему являлась критерием отбора в данную категорию, т.е. все изоляты имели МПК ≤ 2 мкг/мл. Все карба-НЧ штаммы имели высокие значения МПК для меропенема и имипенема за исключением 1 изолята, который был чувствителен к имипенему (МПК=1 мкг/мл).

Все изученные штаммы оказались нечувствительны к исследованным цефалоспорином 3-4 поколения с МПК от 4 до > 64 мкг/мл (Таблица 19). Доля штаммов, нечувствительных к аминогликозидам, варьировала от 50% до 84%. Более 90% карба-НЧ изолятов были нечувствительны к цiproфлоксацину и фосфомицину, причем распространенность устойчивых изолятов была значимо выше

среди карба-НЧ штаммов *K. pneumoniae*, по сравнению с карба-Ч бактериями (Таблица 19).

Наибольшую чувствительность исследованные изоляты проявляли в отношении тигециклина и колистина. К тигециклину были чувствительны все карба-Ч изоляты (МПК ≤ 1 мкг/мл).

Таблица 19

Устойчивость к антибиотикам и диапазон МПК АМП у штаммов

K.pneumoniae

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

Примечание. НЧ – нечувствительный; НТ – не тестировали; p – значимость различий при сравнении долей нечувствительных к соответствующему антибиотику карба-Ч и карба-НЧ изолятов.

^а Разделение на группы карба-Ч и карба-НЧ штаммы проводили по признаку нечувствительности к меропенему и/или имипенему.

Среди карба-НЧ бактерий доля нечувствительных к тигециклину не превышала 25% (14/57), причем только 5 (9%) изолятов имели МПК >2 мкг/мл, соответствуя критерию резистентных, остальные имели МПК 1,5-2 мкг/мл (Таблица 20). Распространенность изолятов, резистентных к колистину (МПК >2 мкг/мл), составила 20% (2/10) и 26% (15/57) среди карба-Ч и карба-НЧ штаммов, соответственно (Таблица 19).

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

Все изоляты, включая карба-Ч бактерии, были протестированы на наличие генов БЛРС (СТХ-М, ТЕМ) (Рисунок 7, 8), а карба-НЧ изоляты дополнительно исследовали на гены карбапенемаз IMP, KPC, OXA-48, NDM, VIM. Носителем гена БЛРС $bla_{\text{СТХ-М}}$ были 100% (10/10) карба-Ч изолятов, причем у 6 из них он комбинировался с геном $bla_{\text{ТЕМ}}$ (Таблица 20).

Использованный нами ПЦР-метод не выявил ни у одного штамма *K. pneumoniae* IMP, KPC, NDM, VIM. При этом у 89% (51/57) карба-НЧ изолятов был выявлен ген карбапенемазы $bla_{\text{OXA-48}}$, причем только у 1 штамма этот ген присутствовал в качестве единственной детерминанты резистентности, а в остальных случаях он сочетался с генами $bla_{\text{СТХ-М}}$ и/или $bla_{\text{ТЕМ}}$ (Таблица 20).

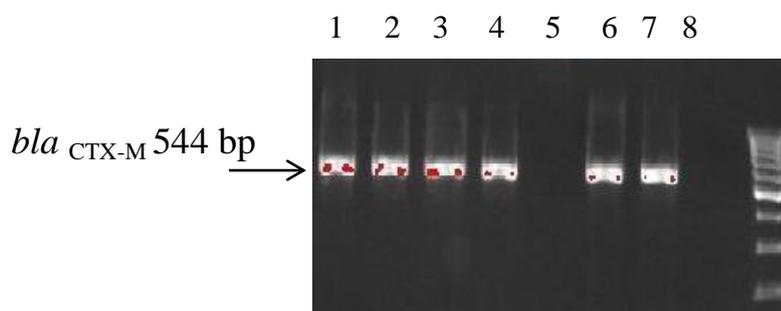


Рисунок 7. Электрофореграмма продуктов ПЦР гена $bla_{\text{СТХ-М}}$

Примечание. 1 - 4 – исследуемые изоляты (все положительные); 5 – дикий тип (отрицательный контроль); 6 – 7 – положительные контроли; 8 – H_2O .

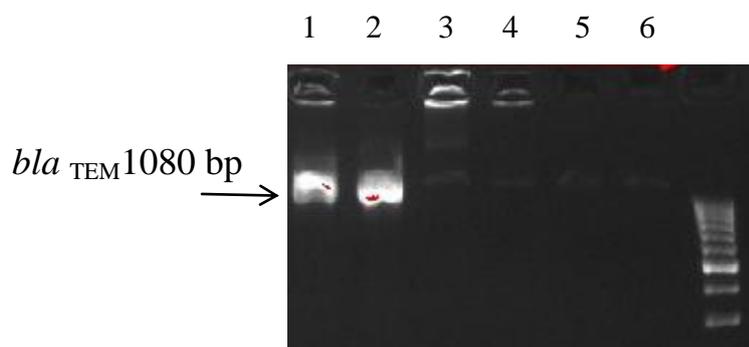


Рисунок 8. Электрофореграмма продуктов ПЦР гена bla_{TEM}

Примечание. 1 - 4 – исследуемые изоляты (1-2 – положительные; 3-4 – отрицательные); 5 – дикий тип (отрицательный контроль); 6 – H_2O

Таблица 20

Распространенность генов резистентности и их комбинаций у штаммов *K. pneumoniae* (n=67)

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

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

Носителями $bla_{СТХ-М}$ были 97% (55/57) карба-НЧ изолятов, ген $bla_{ТЕМ}$ встречался у 81% (46/57) карба-НЧ бактерий. Наиболее распространенной комбинацией детерминант резистентности стало сочетание гена карбапенемазы $bla_{ОХА-48}$ с двумя генами БЛРС $bla_{СТХ-М}$ и $bla_{ТЕМ}$, обнаруженное у 68% (39/57) карба-НЧ изолятов (Таблица 20). У остальных 6 (11%) карба-НЧ изолятов ни один из исследованных генов

карбапенемаз, включая IMP, KPC, NDM, OXA-48, VIM, выявлен не был, при этом все эти изоляты являлись носителями комбинации $bla_{\text{CTX-M}}$ и bla_{TEM} . Три изолята из этой группы имели сниженную чувствительность к меропенему и имипенему (МПК 4-8 мкг/мл), один изолят был чувствителен к имипенему (МПК=1 мкг/мл).

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

Заключение

Результаты, полученные в ходе настоящего исследования, вызывают тревогу. Среди выделенных изолятов *A. baumannii*, *P. aeruginosa* и *K. pneumoniae* лишь около 5% штаммов были чувствительны к АМП всех исследуемых групп, тестирование к которым рекомендуется в клинической практике. Более 95% исследуемых изолятов демонстрировали нечувствительность к представителям одного или более классов антимикробных препаратов.

Феномен множественной резистентности широко распространен среди госпитальных ацинетобактерий, его выявление должно сопровождаться существенной корректировкой лечебно-профилактических мероприятий. Это обусловлено значительным (до 68%) возрастанием смертности при инфекциях, вызванных мультирезистентными штаммами ацинетобактерий [67; 84]. Наши результаты показали значительное нарастание резистентности по сравнению с данными межрегиональных исследований, проведенных в России в 2002-2004 годах, когда количество выявляемых в отделениях реанимации и интенсивной терапии карбапенемустойчивых ацинетобактерий составляло около 2% [20]. Более поздние исследования, проведенные Горбичем Ю.Р. и соавт. в Республике Беларусь в 2010 году, говорят о росте уровня нечувствительности к карбапенемам: устойчивость к имипенему составляла 53,5%, к меропенему – 60,6% [5]. Полученный нами уровень карбапенемустойчивости (около 68%) немного выше приведенных данных. В целом, рост числа карбапенем- и мультирезистентных штаммов *A. baumannii*, выделенных от педиатрических пациентов двух московских ОРИТ, соответствует мировым тенденциям [78]. В ходе исследования не было обнаружено ни одного штамма *A. baumannii*, продуцирующего МБЛ, что было подтверждено молекулярно-генетическими методами. Отсутствие МБЛ-штаммов является

позитивным признаком, потому что VIM-, IMP- и NDM-карбапенемазы обладают более высокой каталитической активностью, расширенным спектром субстратной специфичности, охватывающей практически все β -лактамы, и индифферентностью к ингибиторам β -лактамаз [60]. Все перечисленные свойства говорят о большей клинической и эпидемиологической опасности МБЛ-продуцирующих бактерий. Полученные нами данные о контроле устойчивости к имипенему и меропенему лишь двумя карбапенемазами (ОХА-23 и ОХА-40) не противоречат информации о распространенности генов, определяющих карбапенемустойчивость госпитальных штаммов *A. baumannii*. ОХА-23- и ОХА-40-подобные ферменты являются характерными для нозокомиальных изолятов ацинетобактерий во многих регионах мира, включая Европейские страны [75]. Нами установлены интересные факты наличия у одного штамма одновременно двух генов (*bla*_{ОХА-23} и *bla*_{ОХА-40}). Хотя такие случаи и являются редкими, они были описаны ранее. Исследования, проводившиеся в Мексике, выявили наличие у одного штамма одновременно генов ОХА-58 и ОХА-239 (ОХА-23-подобный ген) [109].

Наше исследование подтвердило высокую степень соответствия между результатами фенотипического тестирования чувствительности к карбапенемам и ПЦР-определением генов карбапенемаз. Был зарегистрирован лишь один случай расхождения между результатами молекулярно-генетического и фенотипического исследования, когда у штамма с промежуточной чувствительностью к имипенему и меропенему отсутствовали гены карбапенемаз. Такие случаи нечасты, но возможны. Они могут быть обусловлены двумя причинами. Первая связана с продукцией карбапенемазы, ген которой не тестировался в настоящем исследовании. Подобные карбапенемазы встречаются нечасто, но их перечень включает достаточное количество разновидностей [97]. Во-вторых, отсутствие гена при наличии

фенотипической нечувствительности может объясняться нелактамазными механизмами, например, эффлюкс-активностью, которая может осуществляться у ацинетобактерий в отношении представителей любых классов антибиотиков [30]. Таким образом, полученные результаты позволяют обосновать перспективность внедрения технологий молекулярно-генетического тестирования антибиотикорезистентности. Конечно, идентификация генов не может рассматриваться как абсолютная альтернатива общепринятым способам. Однако применение этого метода имеет важное достоинство: он существенно ускоряет процесс тестирования резистентности, что может быть крайне важно для выбора антибиотиков в неотложных клинических случаях.

При анализе клонального родства клинических изолятов *A. baumannii* методом МЛСТ было выделено 14 сиквенс-типов, входящих в 2 клональных комплекса. Самым распространенным оказался СС92 или международный клон 2. Согласно данным зарубежных исследований, большинство исследованных клинических изолятов *A. baumannii* в Китае, США относились также к СС92 [35; 72; 75].

Частота встречаемости изолятов *P. aeruginosa* (14%) в педиатрических ОРИТ оказалась несколько ниже, по сравнению с результатами Российского многоцентрового исследования МАРАФОН (20,2%) [28]. Вероятно, данные расхождения могут быть связаны с тем, что исследование проводили среди взрослых пациентов. Более ранние исследования, проведенные в 2004-2006 гг., показали, что в 21% случаев нозокомиальной пневмонии *P. aeruginosa* была этиологически значимым агентом [32]. Другая группа отечественных исследователей показала прирост инфицирования штаммами *P. aeruginosa* почти на 30% за период 2006-2010 гг., при этом более половины (53%) выделенных изолятов были устойчивы к антисинегнойным АМП, в т.ч. карбапенемам [17]. Согласно европейским данным в 2014 году распространенность

изолятов *P. aeruginosa* в ОРИТ составила 15%, что сопоставимо с полученными нами результатами. Полученные данные о доле устойчивых к карбапенемам изолятов (54-58%) близки с результатами российского многоцентрового исследования МАРАФОН (68-88%) [28]. Согласно данным исследования, проведенном в России, Беларуси и Казахстане, доля карбапенемустойчивых штаммов *P. aeruginosa* растет с каждым годом; диапазон значений составил 60% - 75% за периоды 2002-2010 гг. В Европе доля нозокомиальных изолятов *P. aeruginosa* составила 26%, при этом 20 % из них были продуцентами МБЛ [55]. Данные о высоких значениях МПК (до 4096 мкг/мл) для исследованных штаммов *P. aeruginosa* отличаются от результатов, полученных при широкомасштабном изучении госпитальных изолятов синегнойной палочки в России, Беларуси и Казахстане (2002–2010 гг.) [66]. В этом исследовании максимальные значения МПК меропенема для МБЛ-позитивных штаммов составили 128 мкг/мл. Различие результатов может объясняться методикой оценки МПК с использованием метода разведений антибиотиков в агаре, который имеет ряд ограничений [66]. В нашей работе МПК определялась более точным способом серийных разведений в бульоне. Высокие значения МПК нередко выявляются для современных госпитальных штаммов *P. aeruginosa*: в работе W. Zhao и соавт. все госпитальные штаммы, несущие ген *bla*_{IMP-10}, имели МПК 4096 мкг/мл и более [129]. Высокий уровень распространенности штаммов, продуцирующих МБЛ, не является особенным. Полученные в настоящей работе данные сходны с результатами исследования М.А. Al-Kabsi и соавт., которые обнаружили среди госпитальных карбапенемустойчивых изолятов 63% МБЛ-продуцирующих штаммов [36]. Такой большой процент МБЛ-продуцирующих штаммов среди карбапенемустойчивой популяции синегнойной палочки еще раз подтверждает исключительную значимость МБЛ в эволюции устойчивости бактерий к карбапенемам.

Арсенал антикарбапенемных механизмов у штаммов *P. aeruginosa* не исчерпывается только лактамазами, а определяется и другими факторами [112]. В нашем исследовании более чем у 50% исследованных изолятов *P. aeruginosa* было обнаружено значимое (в 4 раза и более) СССР-зависимое снижение МПК меропенема, что свидетельствовало о наличии эффлюкса. Известно, что наиболее активное выведение β -лактамов из цитоплазмы синегнойной палочки реализуется через эффлюкс-системы MexCD-OprJ и MexAB-OprM, работа которых ингибируется в присутствии СССР [88; 93]. Нередко у бактерий одного штамма выявляется сочетание нескольких механизмов карбапенемустойчивости [131]. Прямые доказательства присутствия сочетанных механизмов следуют из анализа комбинаций МБЛ и эффлюкс-активности у конкретных штаммов *P. aeruginosa*, проведенного в ходе настоящего исследования. Около 40% изолятов продуцировали МБЛ и проявляли эффлюкс-активность одновременно. Данные соответствуют результатам, полученным в других лабораториях [126]. Наиболее интригующей выглядела группа карбапенемрезистентных штаммов, у которых не было обнаружено ни МБЛ, ни эффлюкса (19%). Вероятное объяснение этого феномена связано с альтернативными механизмами формирования резистентности, оценка которых не входила в задачи настоящего исследования. Описана возможность развития устойчивости, обусловленной сериновыми карбапенемазами (например, ОХА-группа β -лактамаз), которые не ингибируются в присутствии ЭДТА [107]. Карбапенемустойчивость может быть следствием блокады поринопосредованного поступления карбапенема в цитоплазму бактерии [82]. Отсутствие корреляций между значениями МПК и наличием МБЛ не позволяет оценить вклад, который вносят эти механизмы в количественные показатели устойчивости. Причина отсутствия корреляции может крыться в других, нерасшифрованных в настоящем исследовании механизмах

устойчивости к карбапенемам. Интересной находкой была позитивная корреляция между уровнем эффлюкс-активности и распространенностью МБЛ. Это говорит о том, что два исследованных механизма резистентности могут работать в синергизме, вызывая рост ингибирующих концентраций карбапенемов до недостижимых в организме больших концентраций.

В своей работе мы исследовали профиль антибиотикоустойчивости и определяющие ее механизмы у карбапенем-нечувствительных изолятов *K. pneumoniae*. Доля клебсиелл, устойчивых к карбапенемам, составила 25-27%, что существенно выше по сравнению с данными исследования МАРАФОН (2011-2012 гг.), которое сообщало о 5% нечувствительных к меропенему нозокомиальных изолятов *K. pneumoniae* [26]. Кроме того, распространенность устойчивых к карбапенемам штаммов *K. pneumoniae*, выделенных в 2004-2012 гг. у педиатрических пациентов в Европе, не превышала 1-3% [77]. Таким образом, наши данные указывают на то, что за последние несколько лет частота устойчивости штаммов *K. pneumoniae* к карбапенемам заметно возросла, особенно в детских ОРИТ.

Основным механизмом устойчивости у изолятов *K. pneumoniae* к карбапенемам стала продукция карбапенемазы ОХА-48. Ее носителями были около 90% исследованных карбапенем-нечувствительных штаммов, в подавляющем большинстве – в сочетании с БЛРС СТХ-М и/или ТЕМ. В исследовании МАРАФОН нечувствительность к карбапенемам у штаммов *K. pneumoniae* также была обусловлена наличием ОХА-48 [26]. Географические особенности распространенности различных механизмов устойчивости к карбапенемам демонстрируют данные, полученные в Санкт-Петербурге в 2011-2013 гг. [1]. Здесь формирование устойчивости к карбапенемам у штаммов *K. pneumoniae* было обусловлено преимущественно МБЛ NDM-1.

Все изученные нами изоляты *K. pneumoniae* были нечувствительны к цефалоспорином 3-4 поколения, большинство изолятов обладали устойчивостью к аминогликозидам, фторхинолонам, фосфомицину. Низкая активность β -лактамов в отношении штаммов *K. pneumoniae* отмечается с начала 2000-х гг. [20] и обусловлена продукцией β -лактамаз различных типов, включая CTX-M, TEM, SHV, а также их комбинаций [19; 24; 65], что подтверждают полученные нами результаты.

Сочетание носительства карбапенемаз и БЛРС формирует фенотип множественной устойчивости к антибиотикам и существенно ограничивает выбор препаратов для эффективного лечения клебсиеллезных инфекций. С учетом весомой доли *K. pneumoniae* (41%) в структуре грамотрицательных возбудителей в ОРИТ, это может потребовать пересмотра стандартных схем антимикробной терапии и включения в них альтернативных антибиотиков, чья активность обычно не нарушается механизмами карбапенемустойчивости [76]. Как показало наше исследование, наибольшую активность в отношении карба-НЧ штаммов *K. pneumoniae* проявляли колистин и тигециклин; доля нечувствительных к ним изолятов не превышала 25%, а полностью резистентных к тигециклину клебсиелл (МПК>8 мкг/мл) мы не выявили.

С недавнего времени полимиксины (колистин) все чаще становятся «последней надеждой» для лечения инфекций, связанных с полирезистентными возбудителями, которые сохраняют чувствительность в этой группе препаратов [76]. По данным отечественных и международных многоцентровых исследований, доля колистиннечувствительных представителей семейства *Enterobacteriaceae* не превышает 1-5%, в том числе, *K. pneumoniae* – 2,4-4,5% [26; 44].

Препарат тигециклин, относящийся к группе глицилциклинов, также показал сравнительно высокую активность в отношении карба-НЧ штаммов *K. pneumoniae*, что согласуется с ранее опубликованными

данными [1; 26; 77]. К сожалению, опыт использования колистина и тигециклина в педиатрической практике ограничен [76; 77]. Тигециклин не показан для лечения пациентов моложе 18 лет, хотя может назначаться при отсутствии альтернативных антимикробных препаратов. С учетом его потенциальной эффективности для лечения инфекций, вызванных грамотрицательными полирезистентными возбудителями, в настоящее время проводятся клинические исследования для оценки фармакокинетики, безопасности и эффективности тигециклина у детей 8-11 лет [77].

Таким образом, в последние годы появились и распространились карбапенемнечувствительные изоляты *A. baumannii*, *P. aeruginosa*, и *K. pneumoniae*, обладающие множественной лекарственной устойчивостью и сложными сочетаниями молекулярных механизмов резистентности. Циркуляция подобных штаммов резко сужает спектр эффективных АМП, особенно в ОРИТ, и несет в себе угрозу дальнейшего распространения антибиотикорезистентности. Среди новых АМП для лечения инфекций, вызванных полирезистентными грамотрицательными возбудителями, только один (цефтазидим/авибактам) рекомендован для детей. Это диктует необходимость проведения постоянного мониторинга фенотипических и генотипических свойств возбудителей внутрибольничных инфекций. Полученные результаты будут полезны для планирования и модификации схем эмпирической антимикробной терапии у пациентов педиатрических ОРИТ.

Выводы:

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

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

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

ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШЕЙ РАЗРАБОТКИ ТЕМЫ

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

Список сокращений

АМП – антимикробный препарат

БЛРС – β -лактамаза расширенного спектра

Карба-Ч – карбапенем-чувствительный

Карба-НЧ – карбапенем-нечувствительный

КЗЛ – клинически значимый локус

КУ – кратность уменьшения

ЛМ – локусы мониторинга

МБЛ – металло- β -лактамаза

МЛСТ – мультилокусное сиквенс-типирование

МПК – минимальная подавляющая концентрация

НЧ – нечувствительный;

ОРИТ – отделение реанимации и интенсивной терапии

ПЦР – полимеразная цепная реакция

ПЦР-РВ – полимеразная цепная реакция в режиме реального времени

СС – clonal complex (клональный комплекс)

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

ST – сиквенс-тип (sequence type)

Список литературы

1. Агеевец, В.А. Чувствительность грамотрицательных бактерий, продуцентов карбапенемаз, к антибиотикам различных групп. / В.А. Агеевец, И.В. Партина, Е.С. Лисицына. // Антибиотики и химиотерапия. - 2013. - Т.58. - № 3-4. - С. 10–13.
2. Агеевец, В.А. Проблема устойчивости к карбапенемным антибиотикам: распространение карбапенемаз в мире и России, эпидемиология, диагностика, возможности лечения. / В.А. Агеевец, И.В. Лазарева, С.В. Сидоренко. // Фарматека. - 2015. - №14. - С.9-16.
3. Белобородов, В.Б. Дезэскалационная антибактериальная терапия – концепция повышения эффективности лечения тяжелых инфекций / В.Б. Белобородов. // Российский медицинский журнал. - 2004. - Т12. - №5. - С.3-7.
4. Воробьев, А.А. Атлас по медицинской микробиологии, вирусологии и иммунологии / А.А. Воробьев, В.В. Зверев // М. : Медицинское информационное агентство, 2003. – С. 60.
5. Горбич, Ю.Р. Особенности резистентности *Acinetobacter baumannii* к карбапенемам в Республике Беларусь./ Ю.Р. Горбич, И.А. Карпов, А.А. Мартинович, Н.Н. Левшина // Здоровоохранение. – 2011. - №5. – С. 25-30.
6. Дьячкова, В.С. Механизмы резистентности микроорганизмов к β -лактамным антибиотикам / В.С. Дьячкова, Т.А. Бажукова // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. – 2014. - № 4. С.101-109.
7. Зверев, В.В. Медицинская микробиология, вирусология и иммунология / В.В. Зверев, М.Н. Бойченко // М. : ГЭОТАР-Медиа, 2010. - С.57-59.
8. Ильина, В.Н. К вопросу резистентности *Klebsiella pneumoniae* у детей раннего возраста с врожденными пороками сердца / В.Н. Ильина, О.В.

- Струнин, О.Н. Соловьев, Л.М. Самойлова, Ю.Н. Горбатов // Анестезиология, реаниматология и перфузиология. – 2011. - №1. С.57-60.
9. Козлов, Р.С. Антибиотикорезистентность грамотрицательных возбудителей осложнённых интраабдоминальных инфекций в России / Р.С. Козлов, А.В. Голуб, А.В. Дехнич, М.В. Сухорукова // Клиническая Микробиология Антимикробная Химиотерапия. – 2015. – Т.17. - №3. - С.227-234.
10. Козлов, Р.С. Справочник по антимикробной терапии / Р.С. Козлов, А.В. Дехнич // М. : Смоленск: МАКМАХ, 2010. – С.416.
11. Козлов, Р.С. Современные тенденции антибиотикорезистентности возбудителей нозокомиальных инфекций в ОРИТ России: что нас ждет дальше? / Р.С. Козлов, О.У. Стецюк, И.В. Андреева // Интенсивная терапия. - 2007. - №4. - С. 4
12. Котлукова, Т.В. Лечение синегнойной инфекции у взрослых и детей // Фарматека. - 2004. - №17 (94). - С.6
13. Лабинская, А.С. Частная медицинская микробиология с техникой микробиологических исследований / А.С. Лабинская, Л.П. Блинковая, А.С. Ещина // М.: Издательство «Медицина», 2005. - С.96-100.
14. Марданова, А. М. Эффлюкс-системы *SERRATIA MARCESCENS* / А.М. Марданова, Л.М. Богомольная, Ю.Д. Романова, М.Р. Шарипова // Микробиология. – 2014. – Т.83. - № 1. – С.3–14.
15. Маянский, А.Н. *Pseudomonas aeruginosa*: характеристика биопленочного процесса / А.Н. Маянский, И.В. Чеботарь, Е.И. Руднева, В.П. Чистякова // Молекулярная генетика, микробиология и вирусология. - 2011. - №1. - С.3–8.
16. Методические указания МУК 4.2. 1890-04 «Определение чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препаратам» / Н.А. Семина, С.В.Сидоренко, С.П. Резван, С.А. Грудинина, Л.С. Страчунский, О.У. Стецюк, Р.С. Козлов, М.В.

- Эйдельштейн, Е.А. Ведьмина, Л.Г. Столярова, И.В. Власова, З.С. Середа. Федеральный центр госсанэпиднадзора Минздрава России. 2004. - С. 1-91.
17. Николаева, Н.В. Распространенность и биологические особенности нозокомиальных штаммов *Pseudomonas aeruginosa*: автореферат диссертация к.б.н.2011.030203 / Николаева Нина Владимировна. – Пермь, 2011.
 18. Осипов, В.А. Клональное распространение штаммов *Pseudomonas aeruginosa* – продуцентов метало-бета-лактамаз на территории Беларуси / В.А. Осипов, Д.В. Тапальский, Е.Ю. Склеенова, А.В. Романов, С.В.Жаворонок // Иммунопатология, аллергология, инфектология. – 2012. - №4. – С. 92-97.
 19. Прямчук, С.Д. Генетические детерминанты устойчивости к антибактериальным средствам в нозокомиальных штаммах *Escherichia coli*, *Klebsiella spp.* и *Enterobacter spp.*, выделенных в России в 2003-2007 гг. / С.Д. Прямчук, Н.К. Фурсова, И.В. Абаев, Ю.Н. Ковалев, Н.А. Шишкова, Э.И. Печерских // Антибиотики и химиотерапия. – 2010. - Т. 55. - № 9. – С.3-10.
 20. Решедько, Г.К. Резистентность к антибиотикам грамотрицательных возбудителей нозокомиальных инфекций в ОРИТ многопрофильных стационаров России. / Г.К. Решедько, Е.Л. Рябкова, О.И. Кречикова, М.В. Сухорукова, О.В. Шевченко, М.В. Эйдельштейн, Р.С. Козлов, исследовательская группа РОСНЕТ. // Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. – 2008. - №10. – С. 96-112.
 21. Руднов, В. А. Инфекции в ОРИТ России: результаты национального многоцентрового исследования / В.А. Руднов, Д.В. Бельский, А.В. Дехнич // Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. – 2011. – Т.13. №4. – С.294-304.
 22. Рябкова, Е.Л. Оптимизация антибиотикотерапии нозокомиальных инфекций, вызванных *K.pneumoniae*, в стационарах России :

- автореферат дис. к.м.н. / Рябкова Елена Леонидовна – Смоленск, 2006.
23. Сидоренко, С.В. Молекулярные механизмы устойчивости грамотрицательных бактерий семейства Enterobacteriaceae к цефалоспориновым антибиотикам / С.В. Сидоренко, А.Г. Березин, Д.В. Иванов // Антибиотики и химиотерапия. – 2004. – Т. 49. - №3. – С.3-13.
24. Сидоренко, С.В. Молекулярные основы резистентности к антибиотикам / С.В. Сидоренко, В.И. Тишков // Успехи биологической химии. - 2004. - Т.44. - С.203–306
25. Страчунский, Л.С. Практическое руководство по антиинфекционной химиотерапии / Л.С. Страчунский, Ю.Б. Белоусов, С.Н. Козлов // М. : Смоленск: МАКМАХ, 2007. - С. 1463
26. Сухорукова, М.В. Антибиотикорезистентность нозокомиальных штаммов Enterobacteriaceae в стационарах России: результаты многоцентрового эпидемиологического исследования МАРАФОН в 2011–2012 гг. / М.В. Сухорукова, М.В. Эйдельштейн, Е.Ю. Склеенова, Н.В. Иванчик, А.В. Тимохова, А.В. Дехнич // Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. – 2014. - Т.16. - №4. – С. 254-265.
27. Сухорукова, М.В. Антибиотикорезистентность нозокомиальных штаммов Acinetobacter spp. в стационарах России: результаты многоцентрового эпидемиологического исследования МАРАФОН в 2011–2012 гг. / М.В. Сухорукова, М.В. Эйдельштейн, Е.Ю. Склеенова, Н.В. Иванчик, А.В. Тимохова, А.В. Дехнич // Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. – 2014. - Т.16. - №4. – С. 266-272.
28. Сухорукова, М.В. Антибиотикорезистентность нозокомиальных штаммов Pseudomonas aeruginosa в стационарах России: результаты многоцентрового эпидемиологического исследования МАРАФОН в

- 2011–2012 гг. / М.В. Сухорукова, М.В. Эйдельштейн, Е.Ю. Склеенова, Н.В. Иванчик, А.В. Тимохова, А.В. Дехнич // Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. – 2014. - Т.16. - №4. – С. 273-279.
29. Тапальский, Д.В. Чувствительность госпитальных изолятов *Acinetobacter baumannii* к антибиотикам и их комбинациям / Д.В. Тапальский, А.В. Мозгова, А.И. Козлова // Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. – 2014. – Т.16. - №2. – С. 37.
30. 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 РАМН. – 2014. - № 9-10. – С. 39-50.
31. Шевченко, О.В. Метало-бета-лактамаза: значение и методы выявления у грамотрицательных неферментирующих бактерий / О.В. Шевченко, М.В. Эйдельштейн, М.Н. Степанова // Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия.– 2007. – Т.9. - №3. - С.211-218.
32. Яковлев, С.В. Время для переоценки места карбапенемов при нозокомиальных инфекциях / С.В. Яковлев // Русский медицинский журнал. - 2006. - Т.14. - №5.- С.376-379.
33. Яковлев, С.В. Максимальная (деэскалационная) эмпирическая терапия жизнеопасных инфекций в стационаре / С.В. Яковлев // Антибиотики и химиотерапия. – 2002. – Т.47. - №3. - С.2-8.
34. Abbott, I. Carbapenem Resistance in *Acinetobacter baumannii* / I. Abbott, G.M. Cerqueira, S. Bhuiyan, A.Y. Peleg // Anti-infection Therapy. – 2013. - Vol.11. - №4. – P.395-409.
35. Adams-Haduch, J.M. Molecular Epidemiology of Carbapenem-Nonsusceptible *Acinetobacter baumannii* in the United States / J.M. Adams-Haduch, E.O. Onuoha, T. Bogdanovich, Guo-Bao Tian, J.

- Marschall, C.M. Urban, B.J. Spellberg, D. Rhee, D.C. Halstead, A.W. Pasculle, Y. Doi // *Journal of clinical microbiology*. – 2011. - Vol.49. - №11. - P.3849–3854.
36. Al-Kabsi, A.M. Multidrug efflux pumps over-expression and its association with porin down-regulation and β -lactamase production among nosocomial *P. aeruginosa* isolates from University of Malaya Medical Center, Malaysia/ A.M. Al-Kabsi, M.Y. Yusof, M. Mansor, G.O. SiokYan, R. Manikam, S.D. Sekaran // *International Journal of Chemical, Environmental and Biological Science*. – 2015. – Vol.3 - №2. – P. 125–135.
37. Allen, D.M. *Acinetobacter: a perspective* / D.M. Allen, S.Y. Wong, R. Zarrilli, S. Pournaras, M. Giannouli // *Singapore Medical Journal*. – 1990. - Vol.31. - №6. – P. 511–514.
38. Arhin, A. The outer membrane protein OprQ and adherence of *Pseudomonas aeruginosa* to human fibronectin / A. Arhin, C. Boucher // *Microbiology*. – 2010. – Vol.156. - №5. – P.1415-1423.
39. Azghani, A. O. *Pseudomonas aeruginosa* outer membrane protein F is an adhesin in bacterial binding to lung epithelial cells in culture / A.O. Azghani, S. Idell, M. Bains, R.E. Hancock // *Microbial pathogenesis*. – 2002. – Vol.33. - №3. – P.109-114.
40. Balaban, I. Nosocomial infection in the general pediatric wards of a hospital in Turkey / I. Balaban, G. Tanir, O. Metin Timur, FN. Oz, T. Aydin Teke, GJ. Bayhan, N.Sozak, N. Gol // *Japanes Journal of Infection Disease*. - 2012. - №65. - P.318-321.
41. Benenson, S. Continuous surveillance to reduce extended-spectrum beta-lactamase *Klebsiella pneumoniae* colonization in neonatal intensive care unit / S. Benenson, PD. Levin, C. Block // *Neonatology*. - 2013. - №103. - P. 155-160.
42. Bonnin, R.A. Carbapenem-hydrolyzing GES-type extended-spectrum beta-lactamase in *Acinetobacter baumannii* / R.A. Bonnin P. Nordmann,

- A. Potron, H. Lecuyer, J.R. Zahar, L. Poirel // *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. – 2011. - Vol. 55. - №1. – P. 349–354.
43. Brade, H. Biological activities of the lipopolysaccharide and lipid A from *Acinetobacter calcoaceticus* / H. Brade, C. Galanos // *J. Medical Microbiology*. – 1983. - Vol. 16. - №2. – P. 211–214.
44. Bradford, P.A. Correlation of β -Lactamase Production and Colistin Resistance among Enterobacteriaceae Isolates from a Global Surveillance Program. / P.A. Bradford, K.M. Kazmierczak, D.J. Biedenbach, M.G. Wise, M. Hackel, D.F. Sahn. // *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. – 2016. – Vol.60. - №3. – P.1385-1392.
45. Breidenstein, E.B.M. *Pseudomonas aeruginosa*: all roads lead to resistance / E.B.M. Breidenstein, Cesar dela Fuente-Nunez, E.W. Robert // *Hancock Trends in Microbiology*. – 2011. - Vol.19. - №8. – P.419-426.
46. Brundtland G.H. World health report http://www.who.int/whr/2002/en/whr02_en.pdf // 2001.
47. Bush, K.A. Functional classification scheme for β -lactamases and its correlation with molecular structure / K.A. Bush, G.A. Jacoby, A.A. Medeiros // *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. – 1995. – Vol.39. – P.1211–1233.
48. Bush, K.A. Lactamase inhibitors from laboratory to clinic / K.A. Bush // *Clinical Microbiology*. - 1988. – Vol.1. – P.109–123.
49. Bush, K. Proliferation and significance of clinically relevant beta-lactamases / K. Bush // *Annals of the New York Academy of Science*. – 2013. - Vol.1277. - P.84-90.
50. Bush, K. Updated Functional Classification of β –Lactamases / K. Bush, G.A. Jacoby // *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. – 2010. - P. 969–976.
51. Caballero, A.R. *Pseudomonas aeruginosa* protease IV enzyme assays and comparison to other *Pseudomonas* proteases / A.R.Caballero, J.M.

- Moreau, L.S. Engel, M.E. Marquart, J.M. Hill, R.J. O'Callaghan // Analytical Biochemistry. – 2001. – Vol.290. – P.330–337.
52. Cai, Y. Colistin resistance of *Acinetobacter baumannii*: clinical reports, mechanisms and antimicrobial strategies / Y. Cai, D. Chai, R. Wang, B. Liang, N. Bai // Journal of Antimicrobial Chemotherapy. – 2012. - Vol.67. - №7. – P. 1607–1615.
53. Capone, A. High rate of colistin resistance among patients with carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* infection accounts for an excess of mortality // A. Capone, M. Giannella, D. Fortini, A. Giordano, M. Meledandri, M. Ballardini, M. Venditti, E. Bordi, D. Capozzi, M. P. Balice, A. Tarasi, G. Parisi, A. Lappa, A. Carattoli, N. Petrosillo // Clinical Microbiology and Infection. – 2013. - Vol. 19. – P.23-30.
54. Carnoy, C. *Pseudomonas aeruginosa* outer membrane adhesins for human respiratory mucus glycoproteins / C. Carnoy, A. Scharfman, E. Van Brussel, G. Lamblin, R. Ramphal, P. Roussel // Infection and immunity. – 1994. – Vol.62. - №5. – P.1896-1900.
55. Castanheira, M. Epidemiology and carbapenem resistance mechanisms of carbapenem-non-susceptible *Pseudomonas aeruginosa* collected during 2009–11 in 14 European and Mediterranean countries / M. Castanheira, L.M. Deshpande¹, A. Costello, T.A. Davies, R.N. Jones // Journal of Antimicrobial Chemotherapy. – 2014. – Vol.69. - №7. - P. 1-11.
56. Cerqueira, G.M. Insights into *Acinetobacter baumannii* pathogenicity / G.M. Cerqueira, Peleg A.Y. // Biochemistry and molecular biology for Life Science. – 2011. - Vol. 63. - №12. – P.1055–1060.
57. Cheng, Yi-Hsiang. Colistin Resistance Mechanisms in *Klebsiella pneumoniae* Strains from Taiwan / Yi-Hsiang Cheng, Tzu-Lung Lin, Yi-Jiun Pan, Yu-Ping Wang, Yi-Tsung Lin, Jin-Town Wang^a, //Antimicrobial Agents and Chemotherapy. – 2015. - P. 2909-2913.
58. Choi, C.H. *Acinetobacterbaumannii* invades epithelial cells and outer membrane protein A mediates interactions with epithelial cells / C.H.

- Choi, J.S. Lee, Y.C. Lee, T.I. Park., J.C. Lee // BMC Microbiology. – 2008. - Vol. 8. – P.216.
59. Cigana, C. Pseudomonas aeruginosa exploits lipid A and muropeptides modification as a strategy to lower innate immunity during cystic fibrosis lung infection / C. Cigana, L. Curcurù, M.R. Leone, T. Ieranò, N.I. Lorè, I. Bianconi, A. Silipo, F. Cozzolino, R. Lanzetta, A. Molinaro, M.L. Bernardini, A. Bragonzi // PloS One. – 2009. – Vol.4. - №12. – P.8439.
60. Cornaglia, G. Metallo- β -lactamases: a last frontier for β -lactams? / G. Cornaglia, H. Giamarellou, G. M. Rossolini // The Lancet infectious diseases. - 2011. - Vol.11. - №5. - P. 381-393.
61. Cox, C.D. Use of 2-aminoacetophenone production in identification of Pseudomonas aeruginosa / C.D. Cox, J. Parker // Journal of clinical microbiology. – 1979. – Vol.9. - №4. – P.479-484.
62. Custovic, A. Epidemiological Surveillance of Bacterial Nosocomial Infections in the Surgical Intensive Care Unit / A. Custovic, J. Smajlovic, S. Hadzic, S. Ahmetagic, N. Tihic, H. Hadzagic // Materia socio-medica. – 2014. – Vol.26 - №1. – P. 7-11.
63. Cuzon, G. Outbreak of OXA-48-Positive Carbapenem-Resistant Klebsiella pneumoniae Isolates in France/ G. Cuzon, J. Ouanich, R. Gondret, T. Naas, P. Nordmann // Antimicrobial agents and chemotherapy. - 2011. - Vol.55. - №5. - P. 2420-2423.
64. Dror, M. Outbreak of Colistin-Resistant, Carbapenem-Resistant Klebsiella pneumoniae in Metropolitan Detroit, Michigan / M. Dror, T. Chopra, J.M. Pogue, F. Perez, A.M. Hujer, S. Rudin //Antimicrobial agents and chemotherapy. – 2011. – Vol.55. – №2 – P. 593–599.
65. Edelstein, M. Prevalence and Molecular Epidemiology of CTX-M Extended-Spectrum -Lactamase-Producing Escherichia coli and Klebsiella pneumoniae in Russian Hospitals / M. Edelstein, I. Pimkin , I. Palagin, I.

- Edelstein, L. Stratchounski // Antimicrobial agents and chemotherapy. – 2003. - Vol.47. - №12. - P. 3724 – 3732.
66. Edelstein, M.V. Spread of extensively resistant VIM-2-positive ST235 *Pseudomonas aeruginosa* in Belarus, Kazakhstan, and Russia: a longitudinal epidemiological and clinical study. / M.V. Edelstein, E.Yu. Skleenova, O.V. Shevchenko, J.W. D'souza, D.V. Tapalski, I.S. Azizov, M.V. Sukhorukova, R.A. Pavlukov, R.S. Kozlov, M.A. Toleman, T.R. Walsh // *Lancet Infection Disease*. – 2013. – Vol.13. – №10. – P. 867–876.
67. Falagas, M.E. The diversity of definitions of multidrug-resistant (MDR) and pandrug-resistant (PDR) *Acinetobacter baumannii* and *Pseudomonas aeruginosa* / M.E. Falagas, P.K. Koletsi, I.A. Bliziotis // *Journal of Medical Microbiology* – 2006. – Vol.55. – №12. – P.1619 – 1629.
68. Flemming, H.C. The perfect slime. Colloids and Surfaces / H.C. Flemming // *Colloids and surfaces B: Biointerfaces*. – 2011. – Vol.86. – №2. – P.251–259.
69. Fritsche, T.R. Emerging metallo- β -lactamase-mediated resistances: a summary report from the worldwide SENTRY antimicrobial surveillance program / T.R. Fritsche, H.S. Sader, M.A. Toleman, T.R. Walsh, R.N. Jones // *Clinical Infection Disease*. – 2005. – №41. – Suppl.4. – P.276–278.
70. Gilboa-Garber, N. Bacterial lectins: properties, structure, effects, function and applications / N. Gilboa-Garber, D. Avichezer, N.C. Garber // *Glycosciences: Status and perspectives*. – 1997. - Vol.21. - P.369–396.
71. Hammami, S. Nosocomial outbreak of imipenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* producing VIM-2 metallo-lactamase in a kidney transplantation unit / S. Hammami, I Boutiba-Ben Boubaker, R. Ghozzi,

- M. Saidani¹, S. Amine¹, S. Ben Redjeb // *Diagnostic Pathology*. – 2011. – Vol.6. - №106. - P. 2-5.
72. Hanchun, W. Population Dynamics of an *Acinetobacter baumannii* Clonal Complex during Colonization of Patients / W. Hanchun, K. Wang, Y. Liu, M. Tay, F.M. Lauro, H. Huang, H. Wu, H. Liang, Y. Ding, M. Givskov, Y. Chen, L. Yang // *Journal of Clinical Microbiology*. – 2014. – Vol.52. – P. 3200–3208.
73. Hancock, R. E. W. Outer membrane proteins of *Pseudomonas* / R. Siehnel, N. Martin // *Molecular microbiology*. – 1990. – Vol.4. – №7. – P. 1069–1075.
74. Heiniger, R.W. Infection of human mucosal tissue by *Pseudomonas aeruginosa* requires sequential and mutually dependent virulence factors and a novel pilus-associated adhesion / R.W. Heiniger, H.C. Winther-Larsen, R.J. Pickles, M. Koomey, M.C. Wolfgang // *Cellular microbiology*. – 2010. – Vol.12. – №8. – P. 1158–1173.
75. Higgins, P.G. Global spread of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii*./ P.G. Higgins, C. Dammhayn, M. Hackel, H. Seifert // *J. Antimicrobial agents and chemotherapy*. – 2010. – Vol. 65. – №2. – P. 233–238.
76. Hsu, A.J. Treatment of Multidrug-Resistant Gram-Negative Infections in Children. / A.J. Hsu, P.D. Tamma // *Clinical Infection Disease*. – 2014. – Vol.58. – №10. – P.1439–1448.
77. Kehl, S.C. Global Assessment of Antimicrobial Susceptibility among Gram - Negative Organisms Collected from Pediatric Patients between 2004 and 2012: Results from the Tigecycline Evaluation and Surveillance Trial. / S.C. Kehl, Dowzicky M.J. // *Journal of Clinical Microbiology*. – 2015. – №4. – P. 1286–1293.
78. Kempf, M. Emergence of resistance to carbapenems in *Acinetobacter baumannii* in Europe: clinical impact and therapeutic options / M. Kempf,

- J.M. Rolain // Antimicrobial agents and chemotherapy. – 2012. – Vol.39. – №2. – P.105–114.
79. Knothe, H. Transferable resistance to cefotaxime, ceftazidime, cefamandole and cefuroxime in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* and *Serratia marcescens* / H. Knothe, P. Shah, V. Krcmery, M. Antal, S. Mitsuhashi // Infection. – 1983. – Vol.11. – P. 315–17.
80. Li, H. Structure and function of OprD protein in *Pseudomonas aeruginosa*: from antibiotic resistance to novel therapies. / H. Li, Y.F. Luo, B.W. Williams, T.S. Blackwell, C.M. Xie // Journal of Medical Microbiology. – 2012. – Vol.302. – №2. – P. 63–68.
81. Liang, X. Identification of a genomic island present in the majority of pathogenic isolates of *Pseudomonas aeruginosa* / X. Liang, X.Q.T. Pham, M.V. Olson, S. Lory // Journal of bacteriology. – 2001. – Vol.183. – №3. – P. 843–853.
82. Lister, P.D. Antibacterial-resistance *Pseudomonas aeruginosa*: Clinical impact and complex regulation of chromosomally encoded resistance mechanisms / P.D. Lister, D.J. Wolter, N.D. Hanson // Clinical Microbiology. - 2009. - №4. - P.582–610.
83. Lukac, P.J. Extended-Spectrum β -Lactamase-Producing Enterobacteriaceae in Children: Old Foe, Emerging Threat / P.J. Lukac, R. A. Bonomo, L. K. Logan // Healthcare epidemiology. – 2015. - Vol.60. - №9. - P. 1389–1397.
84. Maragakis, L.L. *Acinetobacter baumannii*: epidemiology, antimicrobial resistance, and treatment options. / L.L. Maragakis, T.M. Perl // Clinical Infection Disease. – 2008. – Vol.46. – №8. – P. 1254–1263.
85. Marchiaro, P. A convenient microbiological assay employing cell-free extracts for the rapid characterization of Gram-negative carbapenemase producers / P. Marchiaro, V. Ballerini, T. Spalding, G. Cera, M.A. Mussi,

- J. Moran-Barrio, A.J. Vila, A.M. Viale, A.S. Limansky // Antimicrobial agents and chemotherapy. – 2008. – Vol.62. – P. 336–344.
86. Masuda, N. Substrate specificities of MexAB-OprM, MexCD-OprJ, and MexXYOprM efflux pumps in *Pseudomonas aeruginosa*. / N. Masuda, E. Sakagawa, S. Ohya, N. Gotoh, H. Tsujimoto, T. Nishino // Antimicrobial agents and chemotherapy. – 2000. - Vol.44. - №12. - P. 3322–3327.
87. May, T. B. Alginate synthesis by *Pseudomonas aeruginosa*: a key pathogenic factor in chronic pulmonary infections of cystic fibrosis patients / T.B. May, D. Shinabarger, R. Maharaj, J. Kato, L. Chu, J. D. DeVault, S. Roychoudhury, N.A. Zielinski, A. Berry, R.K. Rothmel, T.K. Misra, A.M. Chakrabarty / Clinical microbiology reviews. – 1991. – Vol.4. – №2. – P. 191–206.
88. Mihara, K. Identification and transcriptional organization of a gene cluster involved in biosynthesis and transport of acinetobactin, a siderophore produced by *Acinetobacter baumannii* ATCC 19606T / K. Mihara, T. Tanabe, Y. Yamakawa, T. Funahashi, H. Nakao., S. Narimatsu., S. Yamamoto // Microbiology. – 2004. – Vol. 150. – P. 2587–2597.
89. Morill, H.J. Treatment Options for Carbapenem-Resistant Enterobacteriaceae Infections / H.J. Morill, J.M. Pogue, K.S. Kaye, K.L. LaPlante // Open forum infection Dis. - 2015. - №2. - Suppl.2 P.1-15.
90. Nemec, A. Diversity of aminoglycoside-resistance genes and their association with class 1 integrons among strains of pan-European / A. Nemec, L. Dolzani, S. Brisse, P. van den Broek, L. Dijkshoorn // Journal of Medical Microbiology. - 2004. - Vol.53. - №12. - P.1233-1240
91. Nikaido, H. Antibiotic resistance caused by gram-negative multidrug efflux pumps / H. Nikaido // Clinical Infection Disease – 1998. - Vol.27. - Suppl. 1. - P. 32–41.

92. Ostroff, R. M. Identification of a new phospholipase C activity by analysis of an insertional mutation in the hemolytic phospholipase C structural gene of *Pseudomonas aeruginosa* / R. M. Ostroff, M.L. Vasil // *Journal of bacteriology*. – 1987. – Vol.169. – №10. – P.4597–4601.
93. Oteo, J. Extended-spectrum-beta-lactamase-producing *Escherichia coli* as a cause of pediatric infections: report of neonatal intensive care unit outbreak due to a CTX-M-14-producing strain / J. Oteo, E. Cercenado, S. Fernandez-Romero // *Antimicrobial agents and chemotherapy*. - 2012. - №56. - P. 5458.
94. Oteo, J. Outbreak of multidrug-resistant CTX-M-15-producing *Enterobacter cloacae* in neonatal intensive care unit / J. Oteo // *Journal of Medical Microbiology*. - 2013. - №62. - P.571 - 575.
95. Peleg, A.Y. *Acinetobacter baumannii*: emergence of a successful pathogen / A.Y. Peleg, H. Seifert, D.L. Paterson // *Clinical Microbiology*. – 2008. – Vol. 21. – P. 538–582.
96. Pendleton, J.N. Clinical relevance of the ESCAPE Pathogens / J.N. Pendleton, S.P. Gorman, B.F. Gilmore // *Antimicrobial agents and chemotherapy*. – 2013. – Vol. 11(3). – P. 297–308.
97. Perez, F. Global challenge of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. / F. Perez, A. M. Hujer, K.M. Hujer, B.K. Decker, P.N. Rather, R.A. Bonomo // *Antimicrobial agents and chemotherapy*. – 2007. – Vol. 51. – №10. – P. 3471–3484.
98. Podschun, R. *Klebsiella* spp. as Nosocomial Pathogens: Epidemiology, Taxonomy, Typing Methods, and Pathogenicity Factors / R. Podschun, U. Ullmann // *Clinical microbiology*. – 1998. – №4. P. 589–603.
99. Poirel, L. Carbapenem resistance in *Acinetobacter baumannii*: mechanisms and epidemiology / L. Poirel, P. Nordmann // *Clinical microbiology*. – 2006. – Vol. 12. – P. 826–836.

100. Porto, JP. Nosocomial infections in a pediatric intensive care unit of a developing country: NHSN surveillance / JP. Porto, OC. Martines, A. Arantes, C. Freitas, PP. Gontijo Filho, RM. Ribas // The Journal of the Brazilian Society of Tropical Medicine - 2012. - №65. - P. 475-479.
101. Qiu, H. Role of macrophages in early host resistance to respiratory *Acinetobacter baumannii* infection / H. Qiu, R. KuoLee, G. Harris, N. Van Rooijen, G.B. Patel., W.Chen // PLoS One. – 2012. – Vol.7. – P. 40019.
102. Queenan, A.M. Carbapenemases: the versatile β -lactamases / A.M. Queenan, K. Bush // Clinical Microbiology – 2007. – Vol.20. – P.440–458.
103. Rodriguez-Bano, J. Biofilm formation in *Acinetobacter baumannii*: associated features and clinical implications / J. Rodriguez-Bano, S. Marti, S. Soto, F. Fernandez-Cuenca, J.M. Cisneros, J. Pachon, A. Pascual, L. Martinez-Martinez, C. McQueary, L.A. Actis, J. Vila. // Clinical Microbiology. – 2008. – Vol.14. – №3. – P. 276–278.
104. Russo, T.A. The K1 capsular polysaccharide of *Acinetobacter baumannii* strain 307-0294 is a major virulence factor / T.A. Russo, N.R. Luke, J.M. Beanan, R. Olson, S.L. Sauberan, U. Mac-Donald, L.W. Schultz., T.C. Umland., A.A. Campagnari // Infection Immunology. – 2010. – Vol. 78. – №9. – P. 3993–4000.
105. Sacha, P. Identification of plasmid OXA and other β -lactamase genes among carbapenem-resistant isolates of *Pseudomonas aeruginosa* from the Clinical University Hospital in northeastern Poland. / P. Sacha, A. Michalska, D. Ojdana, P. Wieczorek, T. Hauschild, P. Majewski, E. Trynieszewska // New Microbiology. – 2015. – Vol.38. – №2. – P. 271–275.
106. Sato, H. ExoU is a potent intracellular phospholipase / H. Sato, D.W. Frank // Molecular microbiology. – 2004. – Vol.53. – №5. – P. 1279–1290.

107. Sato, H. Role of pili in the pathogenesis of *Pseudomonas aeruginosa* burn infection / H. Sato, K. Okinaga, H. Saito // *Microbiol. Immunol.* – 1988. – Vol.32. – P. 131–139.
108. Singh, G. Rearrangement of a Large Novel *Pseudomonas aeruginosa* Gene Island in Strains Isolated from a Patient Developing Ventilator-Associated Pneumonia / G. Singh, R. Srinivasan, J. Cheng, Z. Peng, K. Fujimura, M.S. Baek, A.R. Panzer, S.G. Tringe, F. Chen, R. Sorek, L. Weng, J. Bristow, J.P. Wiener-Kronish, S.V. Lynch // *Journal of clinical microbiology.* – 2014. – Vol.52. – №7. – P. 2430–2438.
109. Tamayo-Legorreta, E.M. Identification of OXA-23 carbapenemases: novel variant OXA-239 in *Acinetobacter baumannii* ST758 clinical isolates in Mexico./ E.M. Tamayo-Legorreta, U. Garza-Ramos, H. Barrios-Camacho, A. Sanchez-Perez, A. Galicia-Paredes, A. Meza-Chavez, J. Silva-Sanchez // *New Microbes New Infection.* – 2014. – Vol.2. – №6. – P. 173–174.
110. Tenover, F.C. Mechanisms of antimicrobial resistance in bacteria. / F.C. Tenover // *American Journal of Medicine.* – 2006. – Vol.119. – №6. – P. 3–10.
111. Tomaras, A.P. Attachment and biofilm formation on abiotic surfaces by *Acinetobacter baumannii*: involvement of a novel chaperone-usher pili assembly system / A.P. Tomaras, C.W. Dorsey, R.E. Edelman, L.A. Actis // *Microbiology.* – 2003. – Vol. 149. – P. 3473–3484.
112. Turner, J. M. Occurrence, biochemistry and physiology of phenazine pigment production / J. M. Turner, A.J. Messenger // *Advances in microbial physiology.* – 1986. – Vol.27. – P. 211–275.
113. Tzouveleki, L.S. Carbapenemases in *Klebsiella pneumoniae* and Other Enterobacteriaceae: an Evolving Crisis of Global Dimensions / L.S. Tzouveleki, A. A. Markogiannakis, B. M. Psychogiou, P.T. Tassios, A., G.L. Daikos // *Clinical Microbiology.* – 2012. – Vol.25. №4. P. 682–707.

114. Uma Karthika, R. Phenotypic and genotypic assays for detecting the prevalence of metallo- β -lactamases in clinical isolates of *Acinetobacter baumannii* from a South Indian tertiary care hospital / R. Uma Karthika, R. Srinivasa Rao, S. Suchismita, P. Shashikala, R. Kanungo, S. Jayachandran, K. Prashanth // *Journal of Medical Microbiology*. – 2009. – Vol.58. – Suppl.4. – P. 430–435.
115. Veessenmeyer, J.L. *Pseudomonas aeruginosa* virulence and therapy: evolving translational strategies / J.L. Veessenmeyer, A.R. Hauser, T. Lisboa, J. Rello // *Critical care medicine*. – 2009. – Vol.37. – №5. – P. 1777.
116. Veniera, A.G. Risk factors for *Pseudomonas aeruginosa* acquisition in intensive care units: a prospective multicentre study / A.G. Veniera, C. Leroyerc, C. Slekovecd, D. Talond, X. Bertrandd, S. Parere, S. Alfandarif, J.M. Guering, B. Megarbaneh, C. Lawrencei, B. Clairj, A. Lepapek, M. Perraudm, P. Cassierm, D. Triviern, A. Boyerp, V. Duboisq, J. Asselineaus, A.M. Roguesb, R. Thiébauts // *Journal of Hospital Infection*. – 2014. – Vol.88. – №2. – P. 103–108.
117. Vijayakanthi, N. Frequency and characteristics of infections caused by extended-spectrum beta-lactamase-producing organisms in neonates: a prospective cohort study // N. Vijayakanthi, D. Bahl, N. Kaur, A. Maria, NK. Dubey // *Biomed Reseach International*. - 2013. - Vol.2013. - P. 756209
118. Vila, J. Porins efflux pumps and multidrug resistance in *Acinetobacter baumannii* / J. Vila, S. Marti, J. Sanchez-Cespedes // *Antimicrobial agents and Chemotherapy*. – 2007. – Vol.59. – P. 1210–1215.
119. Visca, P. *Acinetobacter* infection — an emerging threat to human health / P. Visca, H. Seifert, K.J. Towner // *Biochemistry and molecular biology for Life Science*. – 2011. – Vol. 63. – №12. – P. 1048–1054.
120. Wahba, A.H. Pyrrobrin-Producing *Pseudomonas aeruginosa* / A.H. Wahba // *Applied microbiology*. – 1965. – Vol.13. – №2. – P. 291–292.

121. Walther-Rasmussen, J. OXA-type carbapenemases / J. Walther-Rasmussen, N. Hoiby // *Antimicrobial agents and Chemotherapy*. – 2006. – Vol.57. – P. 373–383.
122. Weber D.J. Nosocomial infections in the ICU: the growing importance of antibiotic-resistant pathogens / D.J. Weber, R. Raasch, W. Rutala // *Chest Journal*. - 1999. - №115. - P. 34-41.
123. Woerther, PL. Trends in human fecal carriage of extended-spectrum beta-lactamases in the community: toward the globalization of CTX-M / PL Woerther, C. Burdet, E. Charchaty, A. Andremont // *Clinical Microbiology*. - 2013. - №26. - P. 744758.
124. Xavier, D.E. Efflux pumps expression and its association with porin down-regulation and β -lactamase production among *Pseudomonas aeruginosa* causing bloodstream infections in Brazil. / D.E. Xavier, R.C. Picao, R. Girardello, L.C.C. Fehlberg, A.C. Gales // *BMC Microbiology*. – 2010. – №10. – P. 217.
125. Xiaohui, W. Clonal diversity of *Acinetobacter baumannii* clinical isolates revealed by a snapshot study / W. Xiaohui, Fu Qiao, Rujia Yu, Yanyu Gao, Zhiyong Zong // *BMC Microbiology*. – 2013. – Vol.13. – №234. – P. 1–8.
126. Yaowen, Ch. Characterization of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* isolates in a Chinese teaching hospital / Ch. Yaowen, L. Guangxin, X. Ying, W. Yanhong, Sh. Min, Zh. Chi, Zh. Wei, H. Jinwei, Y. Jingni, J. Xu, L. Baodong // *Microbiology*. - 2015. - Vol.6. - article 910.
127. Zarrilli, R. Carbapenem resistance in *Acinetobacter baumannii*: the molecular epidemic features of an emerging problem in health care facilities / R. Zarrilli, M. Giannouli, F. Tomasone, M. Triassi, A. Tsakris // *Journal of Infection in Developing Countries*. – 2009. – Vol. 3. – №5. – P. 335–341.

128. Zarrilli, R., Global evolution of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* clonal lineages / R. Zarrilli, S. Pournaras, M. Giannouli, A. Tsakris // *Antimicrobial agents and chemotherapy*. – 2013. – Vol. 41. – №1. – P. 11–19.
129. Zhao, W.H. Contributions of IMP-10 metallo- β -lactamase, the outer membrane barrier and the MexAB-OprM efflux system to high-level carbapenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa*./ W.H. Zhao, Z. Hu, G. Chen, R. Ito, Z.Q. Hu // *Chemotherapy*. – 2009. – Vol.55. – №3. P. 168–174.
130. <http://www.antibiotic.ru/minzdrav/clinical-recommendations/>
131. http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Breakpoint_tables/v_4.0_Breakpoint_table.pdf
132. <http://pubmlst.org/abaumannii/>