

МУДРАК ДАРЬЯ ЕВГЕНЬЕВНА

**Молекулярно-генетические особенности устойчивости к
бета-лактамам антибиотикам грамотрицательных
микроорганизмов - возбудителей нозокомиальных
инфекций.**

**03.02.03 – Микробиология,
03.01.03 - Молекулярная биология**

Автореферат

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Работа выполнена в государственном образовательном учреждении дополнительного профессионального образования «Российская Медицинская Академия Последипломного Образования» (ГОУ ДПО РМАПО Минздравсоцразвития)

Научные руководители: доктор медицинских наук, профессор
Сидоренко Сергей Владимирович

кандидат биологических наук, доцент
Ильина Елена Николаевна

Официальные оппоненты: доктор биологический наук, профессор
Тартаковский Игорь Семенович

Кандидат биологических наук,
Летаров Андрей Викторович

Ведущая организация: ФГУН Научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии имени Пастера Роспотребнадзора

Защита диссертации состоится "19" февраля 2010 г. в 11 часов на заседании совета Д001.007.01 в НИИЭМ им. Н.Ф. Гамалеи РАМН (г. Москва, 123098, ул. Гамалеи, д.18)

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке НИИЭМ им. Н.Ф. Гамалеи РАМН.

Автореферат разослан "18" января 2010 г.

Ученый секретарь
Диссертационного совета
Д.м.н., проф.

Русакова Е.В.

1. ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы. Широкое применение в медицинской практике антибиотиков привело к значительным изменениям в этиологической структуре и росту антибактериальной резистентности возбудителей инфекционных болезней (Bradford P.A., 2001). Инфекции, вызванные резистентными штаммами, отличаются длительным течением, чаще требуют госпитализации, при этом увеличивается продолжительность пребывания в стационаре и ухудшается прогноз для пациентов (Spanu T., 2002).

Многочисленные негативные социально-экономические последствия распространения антибактериальной резистентности вынудили Всемирную организацию здравоохранения (ВОЗ) разработать и опубликовать в 2001 году «Глобальную стратегию ВОЗ по сдерживанию устойчивости к противомикробным препаратам», в которой рекомендовано рассматривать указанную проблему в качестве одного из приоритетов национальных систем здравоохранения (ВОЗ, 2001). В приведенном документе указывается, что расшифровка молекулярных механизмов резистентности необходима для создания новых препаратов и средств диагностики, а также для оптимизации режимов этиотропной терапии.

Проблема антибактериальной резистентности представляется особо актуальной в лечении нозокомиальных инфекций, распространение которых лишь возрастает по мере совершенствования медицинских технологий, существенно расширяющих круг критических состояний, поддающихся эффективной терапии. Интенсивный селективный прессинг антибиотиков, обуславливает быструю эволюцию и распространение новых механизмов резистентности в медицинских учреждениях и, прежде всего, в отделениях реанимации и интенсивной терапии.

Одними из ведущих возбудителей нозокомиальных инфекций являются грамотрицательные бактерии (семейства *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas*, *Acinetobacter* и некоторые другие) (Бондаренко В.М., 2000).

Традиционно основу лечения, инфекций, вызываемых бактериями этой группы, составляли бета-лактамы антибиотики и, прежде всего, цефалоспорины III поколения. Однако эффективность этой группы антибиотиков в последние годы резко снизилась в связи с распространением среди возбудителей нозокомиальных инфекций бета-лактамаз расширенного спектра класса А (группа 2be по K. Bush, 2009). Альтернативу цефалоспорином III поколения составляют цефалоспорины IV поколения, карбапенемы и ингибитор-защищенные бета-лактамы, применение которых в медицинской практике постоянно расширяется.

В ответ на изменения в стратегии и тактике применения антибиотиков в различных регионах мира происходят изменения в распространении отдельных групп и классов бета-лактамаз – смена лидирующих групп (Сидоренко С.В., 2008). К наиболее важным тенденциям следует отнести увеличение частоты выделения бета-лактамаз класса С (группы 1 и 1e по

К. Bush, 2009) и появление карбапенемаз, прежде всего, относящихся к классу В (группы 3 и 3а по К. Bush, 2009) – металло-бета-лактамаз.

Своевременное выявление изменений в распространении бета-лактамаз имеет важное практическое и теоретическое значение, так как позволяет корректировать рекомендации по антибактериальной терапии нозокомиальных инфекций, разрабатывать экспрессные молекулярные методы детекции антибактериальной резистентности, дает важную информацию для создания новых препаратов, преодолевающих резистентность.

В настоящее время детекция бета-лактамаз основана на микробиологических методах, таких как диско-диффузионный, метод серийных разведений в бульоне, метод двух дисков, а также с применением различных коммерческих тестов, основанных на ферментативных колориметрических реакциях. Перечисленные традиционные микробиологические методы подходят для фенотипической характеристики микроорганизма. Однако, при детекции бета-лактамаз они, в лучшем случае, позволяют оценить факт наличия фермента, но не дают информацию о том, какой именно из нескольких сотен видов фермента присутствует. Ввиду этого одним из перспективных направлений в изучении и диагностики бета-лактамаз является использование молекулярно-генетических подходов: полимеразной цепной реакции (ПЦР), секвенирования, минисеквенирования (Малахова М.А., 2007).

Кроме того, при проведении мониторинга устойчивости микроорганизмов к бета-лактамазам важное место занимает адекватная видовая идентификация патогенов. Классические методы идентификации и типирования бактерий (бактериологический анализ) имеют ряд недостатков: сложность стандартизации, трудоемкость, время выполнения 48-72ч, необходимость поддержания жизнеспособности микроорганизма до проведения анализа и не всегда дают достоверную информацию о микробном агенте. Поэтому все большую популярность получают молекулярные методы идентификации микроорганизмов, в том числе масс-спектрометрический анализ (Wahl K.L., 2002).

В рутинной лабораторной практике из-за недостатка оборудования и отработанных протоколов исследования невозможно точно определить детерминанты устойчивости микроорганизмов к тем или иным antimicrobным препаратам. С момента обнаружения первого фермента бета-лактамазы в 60-е годы эти ферменты эволюционировали, с каждым годом растет их разнообразие, происходит смена лидирующих групп (Сидоренко С.В., 2008). Поэтому изучение молекулярно-генетических механизмов устойчивости к бета-лактамам антибиотикам у грамотрицательных микроорганизмов методами бактериологического и молекулярно-генетического анализа является актуальным как в научном аспекте, так и в плане решения конкретных практических проблем.

Цель исследования: изучение молекулярно-генетических особенностей устойчивости к бета-лактамам антибиотикам у грамотрицательных микроорганизмов – возбудителей нозокомиальных инфекций – с помощью методов бактериологического и молекулярно-генетического анализа.

Для достижения поставленной цели были определены основные задачи:

1. Формирование лабораторной коллекции изолятов грамотрицательных бактерий, полученных из клиник различных городов Российской Федерации (РФ).
2. Видовая идентификация коллекции изолятов методом прямого белкового профилирования и оценка эффективности данного подхода для рутинного определения видовой принадлежности клинических изолятов.
3. Фенотипическая характеристика полученных изолятов и оценка чувствительности и специфичности фенотипических тестов для выявления бета-лактамаз различных классов у грамотрицательных микроорганизмов – возбудителей нозокомиальных инфекций.
4. Характеристика генетического разнообразия различных детерминант устойчивости грамотрицательных микроорганизмов – возбудителей нозокомиальных инфекций - к бета-лактамам антибиотикам.

Научная новизна.

- Показано преимущество метода прямого масс-спектрометрического профилирования для видовой идентификации бактерий семейства Enterobacteriaceae и неферментирующих грамотрицательных бактерий рода *Pseudomonas* или *Acinetobacter*.
- Установлено генетическое разнообразие всей совокупности генов бета-лактамаз, выявляемых среди изолятов семейства Enterobacteriaceae и неферментирующих грамотрицательных бактерий рода *Pseudomonas* и *Acinetobacter*.
- На основании анализа нуклеотидной последовательности геномной ДНК *Enterobacter asburiae* обнаружен ген *bla*_{AmpC}, кодирующий не описанную ранее последовательность бета-лактамазы. Структура данного фермента изучена методом молекулярного моделирования.
- Впервые на территории РФ у представителя семейства Enterobacteriaceae, изолированного из мочи пациента интенсивной терапии Научно-исследовательского института нейрохирургии им. Н.Н. Бурденко РАМН, обнаружен ген *bla*_{VIM-4}, кодирующий металло-бета-лактамазу и описано его генетическое окружение.

Практическая значимость.

Результаты, полученные в ходе исследований по теме диссертационной работы, были использованы в клинической практике лаборатории микробиологии Национального агентства по клинической фармакологии и фармации для идентификации микроорганизмов и скрининга бета-лактамаз.

Результаты диссертационной работы были систематизированы и внедрены в педагогическую практику кафедры микробиологии РМАПО Минздравсоцразвития.

В приложении представлены копии документов, подтверждающих практическую значимость работы (справки от лаборатории микробиологии Национального агентства по клинической фармакологии и от кафедры микробиологии РМАПО Минздравсоцразвития).

Основные положения, выносимые на защиту:

1. Изучены молекулярно-генетические особенности устойчивости к бета-лактамам антибиотикам на основе сформированной коллекции из 145 изолятов грамотрицательных микроорганизмов – возбудителей нозокомиальных инфекций
2. Показана эффективность метода прямого белкового профилирования для видовой идентификации исследуемых грамотрицательных микроорганизмов семейства Enterobacteriaceae и неферментирующих грамотрицательных бактерий рода *Pseudomonas* или *Acinetobacter*.
3. Фенотипическая характеристика полученных изолятов с применением панелей скрининговых и подтверждающих тестов с оценкой их чувствительности и специфичности показала большое разнообразие профилей антибиотикочувствительности у исследуемых возбудителей нозокомиальных инфекций.
4. С использованием оригинальных ПЦР тест-систем установлены генетические детерминанты (гены бета-лактамаз классов А, В, С и D), обуславливающие формирование устойчивости к бета-лактамам антибиотикам.
5. Установлены новые механизмы резистентности к бета-лактамам антибиотикам. На основании анализа нуклеотидной последовательности геномной ДНК изолята *E. asburiae* обнаружен ген *bla*_{AmpC}, кодирующий не описанную ранее аминокислотную последовательность фермента, структура белка изучена методом молекулярного моделирования. Впервые на территории РФ обнаружен клинический изолят *Escherichia coli*, содержащий ген металло-бета-лактамазы VIM-4, что свидетельствует о начавшемся процессе передачи этих генов от *Pseudomonas* spp к представителям семейства Enterobacteriaceae, потенциально приводящему к снижению эффективности карбапенемов в терапии инфекций, вызванных грамотрицательными бактериями.

Апробация работы. Результаты исследований по теме диссертации доложены, обсуждены, опубликованы в материалах научно-практической конференции «Инфекции, вызываемые условно-патогенными микроорганизмами» (Россия, 2007), Международной конференции по антимикробным препаратам и химиотерапии (США, 2008), и одобрены на заседаниях кафедры микробиологии РМАПО Минздравсоцразвития в 2006-2009 гг..

Апробация диссертации состоялась на заседании кафедры микробиологии РМАПО Минздравсоцразвития 14 сентября 2009 года.

Личный вклад соискателя. Диссертационная работа выполнена самостоятельно.

Отдельные этапы работы были выполнены совместно с к.х.н. Икрянниковой Л.Н., к.б.н. Эдельштейном М.В., к.б.н. Фурсовой Н.К. и соискателем Боровской А.Д.

Публикация научных исследований. По теме диссертации опубликовано 6 научных работ, в том числе 3 работы опубликованы в изданиях, рекомендованных ВАК РФ.

Структура и объем работы. Диссертация изложена на 140 листах и включает следующие разделы: введение, обзор литературы, заключение по обзору литературы, результаты собственных исследований и их обсуждение, заключение, выводы и приложения. Работа иллюстрирована 19 таблицами и 25 рисунками. Список использованной литературы включает 189 источник, из них 5 отечественных авторов, 184 – зарубежных авторов.

2. СОБСТВЕННЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1. Материалы и методы.

Бактерии. В работе были использованы 145 изолятов грамотрицательных бактерий, собранных в период с мая 2005 по апрель 2009 из ожоговых, хирургических отделений, отделений интенсивной терапии шести медицинских центров города Москвы, трех центров Пермской области, а также в больницах Санкт-Петербурга, Ярославля, Томска, Иркутска, Владивостока и Саратова.

Критериями включения изолятов в исследование были: принадлежность к семейству Enterobacteriaceae, либо к неферментирующим грамотрицательным бактериям рода *Pseudomonas* или *Acinetobacter*, а также снижение чувствительности хотя бы к одному из цефалоспоринов III поколения до уровня, предлагаемого Национальным комитетом по клиническим лабораторным стандартам США – CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institution, 2007).

Для идентификации бактерий в бактериологических лабораториях лечебных учреждений были использованы микроскопический и культуральный методы, а также коммерческие тест-системы, основанные на биохимических реакциях - MIKRO-LA-TEST (PLIVA-Lachema Diagnostika s.r.o., Чехия), BBL Crystal (BD, США), анализатор ATB-Expression (BioMerieux, Франция).

Также в работе были использованы референтные контрольные штаммы: *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853.

Определение чувствительности к антимикробным препаратам.

Чувствительность изолятов к ампициллину, амоксициллин с добавлением клавулановой кислоты, цефокситину, цефоперазону/сульбактаму (2:1), цефотаксиму, цефепиму, цефепиму/сульбактаму (2:1) цефтазидиму, меропенему, имипенему, а также

гентамицину, амикацину, хлорамфениколу, ципрофлоксацину была определена методом серийных микроразведений в бульоне Мюллера-Хинтона (BBL, США) согласно рекомендациям и критериями, изложенным в Методических указаниях по определению чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препаратам (Методические указания, утвержденные Г.Г. Онищенко, 2004), а также CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institution, 2007) в 96-луночных планшетах для иммунологических исследований.

Фенотипические тесты на наличие бета-лактамаз.

Была использована комбинация цефтазидим/клавуланат для детекции бета-лактамаз расширенного спектра методом серийных микроразведений в бульоне Мюллера-Хинтона (BBL, США) согласно рекомендациям и критериям CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institution, 2007). Для детекции бета-лактамаз AmpC был использован трехмерный AmpC-тест, который являлся адаптацией методов, описанных ранее для детекции бета-лактамаз класса А и С (Р.Е. Coudron, 2000; V. Manchanda, 2003). Изоляты с повышенной устойчивостью к карбапенемам были тестированы на продукцию металло-бета-лактамаз. Для определения присутствия металло-бета-лактамаз был использован метод двойных дисков с этилендиаминтетрауксусной кислотой (ЭДТА) (О.В. Шевченко, 2007).

Идентификация изолятов методом прямого белкового профилирования. Масс-спектрометрический анализ был осуществлен в ФГУ НИИ ФХМ ФМБА России с использованием MALDI-TOF масс-спектрометра Microflex («Bruker Daltonics», Германия). Для записи, обработки и анализа масс-спектров было использовано программное обеспечение фирмы «Bruker Daltonics» (Германия): flexControl 2.4 (Build 38) и flexAnalysis 2.4 (Build 11). Кластерный анализ, сопоставление получаемых масс-спектров с имеющимися базами данных производили с помощью программного пакета Biotyper 2.0 (Bruker Daltonics, Германия).

Генетический анализ исследуемых изолятов.

Изоляты, подозрительные согласно критериям CLSI на продукцию бета-лактамаз, были исследованы методом полимеразной цепной реакции для детекции генов бета-лактамаз 1-ой группы, а также групп 2b (TEM, SHV, CTX), 2d (OXA) и группы 3 (металло- β -лактамазы) по классификации К. Bush (К. Bush, 1995). В исследовании были использованы оригинальные праймеры (Мудрак Д.Е., Сидоренко С.В., Ильина Е.Н., 2007), а также из работ Ellington et al. (M.J. Ellington, 2007), Perez-Perez et al. (F.J. Perez-Perez, 2002).

Для изучения генетического окружения бета-лактамаз у изолята *E. coli* (№ 55) был применен метод ПЦР-картирования и секвенирования. В исследовании были использованы праймеры из работы Степановой М.Н. (Stepanova, 2008).

Выделение ДНК. ДНК из суточной культуры, выращенной на твердом агаре Мюллера-Хинтона (BBL, США), была выделена с помощью набора «ДНК-экспресс» (ООО НПФ «Литех», г. Москва), согласно инструкции.

Полимеразная цепная реакция была проведена в амплификаторе PTC-240 DNA Engine Tetrad2 (MJ Research Bio-Rad, США) с последующим анализом продуктов амплификации в 2%-ном агарозном геле.

Определение нуклеотидной последовательности генов проводили модифицированным методом Сенгера с использованием прибора ABI Prism® 3100 Genetic Analyzer (“Applied Biosystems”, США; “Hitachi” Япония). Полноразмерную последовательность генов получали путем склеивания нуклеотидных фрагментов с использованием программного продукта «Vector NTI® Suite v. 9» (Informax Inc, США).

Для поиска гомологичных нуклеотидных или аминокислотных последовательностей в международных базах данных GenBank и EMBL была использована программа BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>).

Моделирование пространственной структуры новой бета-лактамазы AmpC-new методом предсказания структуры по гомологии.

Поиск пространственного шаблона для построения модели белка был произведен с помощью сервера FASTA (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/fast33/index.html>) в базе структур белков PDB. В качестве пространственного шаблона был выбран белок бета-лактамаза ACT-1, выделенный из штамма *Klebsiella pneumoniae* (A. Shimizu-Ibuka, 2008). Построение выравнивания аминокислотных последовательностей шаблон-модель было проведено с помощью сервера CLUSTALW (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/>). Для моделирования структуры бета-лактамазы AmpC-new был использован веб-сервис SWISS-PROT, (<http://www.swissprot20.org/>).

2.2. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ.

I. Использование метода прямого белкового профилирования для идентификации микроорганизмов, включенных в исследование.

По результатам идентификации методами классической микробиологии, проведенной в местных лабораториях, полученные изоляты относились к видам *K. pneumoniae*, *Proteus* spp, *Klebsiella oxytoca*, *Enterobacter cloacae*, *E. coli*, *Citrobacter freundii*, *Providencia* spp., *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii*, *Serratia marcescens*. После идентификации методом прямого белкового профилирования, показано, что данный массив отличался большим видовым разнообразием и включал помимо представителей рода *Klebsiella* (*K. oxytoca* – 2 изолята, *K. pneumoniae* – 46 изолятов), 14 изолятов *Proteus mirabilis*, 21 изолят *A. baumannii*, 43 изолята *P. aeruginosa*, 1 изолят *Pseudomonas hibiscicola*, 3 изолята *E. cloacae*, 8 изолятов *E. coli*, 3 изолята *S. marcescens*, также изоляты *E. asburiae* (1 изолят), *Providencia rettgeri* (1 изолят), *Providencia stuartii* (2 изолята).

Для подтверждения результатов идентификации методом прямого белкового профилирования проведен анализ нуклеотидной

последовательности амплифицированных фрагментов гена 16S рРНК методом секвенирования. Сравнение результатов видовой идентификации методами классической микробиологии, прямым белковым профилированием и секвенированием гена 16S рРНК представлены в табл. 1.

Таблица 1. Сопоставление результатов видовой идентификации бактерий различными методами

Микроорганизм	Первичная идентификация (n, изолятов)	Прямое белковое профилирование (n, изолятов)		Анализ последовательности гена 16SpРНК
		Совпадения	Различия	
<i>E. cloacae</i>	2	1	<i>A. baumannii</i> - 1	Рез-т белкового профилирования подтвержден
<i>E. coli</i>	6	6	0	
<i>K. oxytoca</i>	2	2	0	
<i>K. pneumoniae</i>	53	45	<i>A. baumannii</i> - 4, <i>E. cloacae</i> - 2, <i>E. asburiae</i> - 1, <i>E. coli</i> - 1	Рез-ты белкового профилирования подтверждены
<i>C. freundii</i>	1	0	<i>E. coli</i> - 1	Рез-т белкового профилирования подтвержден
<i>P. mirabilis</i>	16	14	<i>P. aeruginosa</i> -2	Рез-ты белкового профилирования подтверждены
<i>S. marcescens</i>	3	3	0	
<i>P. aeruginosa</i>	42	41	<i>P. hibiscicola</i> - 1	Рез-т белкового профилирования подтвержден
<i>A. baumannii</i>	17	16	<i>K. pneumoniae</i> - 1	Рез-т белкового профилирования подтвержден
<i>Providencia</i> spp	3	3	0	

Таким образом, в ходе исследования метод прямого белкового профилирования зарекомендовал себя как быстрый и достоверный способ видоспецифической идентификации бактерий. Анализ микроорганизмов позволяет получать с достаточным разрешением и точностью, воспроизводимую в стандартных условиях карту (профиль) белковых масс, которая является уникальной характеристикой для данного микроба по типу “отпечатков пальцев”. Безусловным преимуществом метода прямого белкового профилирования является простой технологический процесс, не требующий затрат времени и средств на пересев микроорганизма на селективные среды, высокая скорость получения результатов (~ 6 мин / образец) и высокая диагностическая чувствительность (98 % по данным клинических испытаний). Данные характеристики метода позволяют предполагать его широкое использование в медицинской практике в будущем.

II. Анализ чувствительности к антибиотикам грамотрицательных микроорганизмов – возбудителей нозокомиальных инфекций.

1. Анализ профилей чувствительности клинических изолятов *K. pneumoniae*.

Согласно измерению МПК к цефотаксиму и цефтазидиму, все изоляты *K. pneumoniae* следует отнести к «не дикому» типу, то есть к обладающим некими механизмами устойчивости. В то же время, по уровню чувствительности к цефепиму часть изолятов следует отнести к «дикому» типу, лишенному механизмов устойчивости. Результаты оценки чувствительности изолятов *K. pneumoniae* с использованием критериев CLSI и EUCAST представлены в таблице 2.

Таблица 2.

Интерпретация результатов оценки чувствительности изолятов *K. pneumoniae* (n=46) с использованием критериев CLSI и EUCAST

Антибиотик	Количество микроорганизмов, %			
	Устойчивые и с пониженной чувствительностью		Чувствительные	
	CLSI	EUCAST	CLSI	EUCAST
Ампициллин	100	100	0	0
Амоксициллин/клавуланат	97,8	97,8	2,2	2,2
Цефокситин	60,9	-	39,1	-
Цефотаксим	89,1	100	10,9	0
Цефепим	78,2	84,8	21,8	15,2
Цефтазидим	97,8	100	2,2	0
Цефоперазон/сульбактам*	41,3	-	58,7	-
Цефепим/сульбактам	26,1	-	73,9	-
Имипенем	4,3	8,7	95,7	91,3
Меропенем	6,5	8,7	93,5	91,3
Гентамицин	91,3	91,3	8,7	8,7
Хлорамфеникол	82,6	-	17,4	-
Ципрофлоксацин	82,6	82,6	17,4	17,4

Примечание: * для оценки чувствительности к цефоперазону/сульбактаму использовали критерии, рекомендованные для цефоперазона.

Среди 46 изолятов *K. pneumoniae* положительный тест с клавулановой кислотой был выявлен в 29 случаях, что с высокой вероятностью свидетельствовало о продукции этими бактериями бета-лактамаз расширенного спектра (БЛРС). Среди 17 изолятов с отрицательными результатами теста с клавулановой кислотой у 14 трехмерный AmpC-тест дал положительный результат, что позволило предположить наличие у них механизма устойчивости связанного с продукцией AmpC бета-лактамаз. У 6 изолятов с положительными результатами теста с клавулановой кислотой также трехмерный AmpC-тест дал положительные результаты. При использовании метода двойных дисков с ЭДТА у всех исследуемых изолятов *K. pneumoniae* синергизм между карбапенемами и ЭДТА не был выявлен.

Таким образом, в отношении проблемных микроорганизмов среди изолятов *K. pneumoniae* наибольшую активность проявляли карбапенемы.

Помимо карбапенемов достаточно эффективным представляется использование цефепима в комбинации с сульбактамом в терапии инфекций, вызванных *K. pneumoniae*.

2. Анализ профилей чувствительности клинических изолятов представителей семейства Enterobacteriaceae (кроме *K. pneumoniae*).

В таблице 3 приведены результаты интерпретации чувствительности остальных представителей семейства Enterobacteriaceae к бета-лактамам и другим антибиотикам с применением критериев CLSI и EUCAST. К их числу относились следующие изоляты: *K. oxytoca* – 2 изолята, *P. mirabilis* - 14 изолятов, *E. cloacae* - 3 изолята, *E. coli* - 8 изолятов, *S. marcescens* - 3 изолята, *E. asburiae* - 1 изолят, *P. rettgeri* - 1 изолят, *P. stuartii* - 2 изолята.

Таблица 3.

Интерпретация результатов оценки чувствительности представителей семейства Enterobacteriaceae (n=34) с использованием критериев CLSI и EUCAST

Антибиотик	Количество микроорганизмов, %			
	Устойчивые и промежуточные		Чувствительные	
	CLSI	EUCAST	CLSI	EUCAST
Ампициллин	100	100	0	0
Амоксициллин/клавуланат	79,4	97,1	20,6	2,9
Цефокситин	35,3	-	64,7	-
Цефотаксим	91,2	94,1	8,8	5,9
Цефепим	55,9	85,3	44,1	14,7
Цефтазидим	44,1	61,8	55,9	38,2
Цефоперазон/сульбактам*	29,4	-	70,6	-
Цефепим/сульбактам	14,7	-	85,3	-
Имипенем	5,9	14,7	94,1	85,3
Меропенем	2,9	14,7	97,1	85,3
Гентамицин	73,5	73,5	26,5	26,5
Хлорамфеникол	79,4	79,4	20,6	20,6
Ципрофлоксацин	67,6	67,6	32,4	32,4

Среди 34 представителей семейства Enterobacteriaceae положительный тест с клавулановой кислотой был выявлен в 13 случаях, что с высокой вероятностью свидетельствовало о продукции этими бактериями БЛРС. Среди 21 изолята с отрицательными результатами теста с клавулановой кислотой у 4 трехмерный AmpC-тест дал положительный результат, что позволило предположить наличие у них механизма устойчивости связанного с продукцией AmpC бета-лактамаз. Лишь у 2 изолятов с положительными результатами теста с клавулановой кислотой также трехмерный AmpC-тест дал положительные результаты. У большинства изолятов тесты на бета-

лактамазы расширенного спектра и AmpC прошли с отрицательным результатом. Однако в ходе исследования был выявлен положительный результат в тесте на металло-бета-лактамазы у изолята *E.coli*, который проявлял чувствительность к карбапенемам в соответствии с критериями EUCAST.

Таким образом, в отношении проблемных микроорганизмов среди представителей семейства Enterobacteriaceae, кроме изолятов *K. pneumoniae*, наибольшую активность проявляли карбапенемы. Помимо карбапенемов, достаточно эффективным представляется использование цефепима в комбинации с сульбактамом в терапии инфекций, вызванных энтеробактериями.

3. Анализ профилей чувствительности клинических изолятов *A. baumannii*.

Оценка и интерпретация результатов изучения антибиотикочувствительности *A. baumannii* представляет собой достаточно сложную задачу, поскольку для многих антибиотиков (включая все цефалоспорины) EUCAST не определил эпидемиологические точки отсечения. Таким образом, на сегодняшний день определить уровень природной чувствительности ацинетобактерий к цефлоспоринам не представляется возможным.

Результаты оценки чувствительности изолятов *A. baumannii* с использованием критериев CLSI и EUCAST представлены в таблице 4.

Таблица 4.

Интерпретация результатов оценки чувствительности изолятов *A. baumannii* (n=21) с использованием критериев CLSI и EUCAST.

Антибиотик	Количество микроорганизмов, %			
	Устойчивые и промежуточные		Чувствительные	
	CLSI	EUCAST	CLSI	EUCAST*
Цефепим	89,5	100*	10,5	0*
Цефтазидим	100	100*	0	0*
Цефоперазон/сульбактам	-	-	-	-
Гентамицин	89,5	89,5	10,5	10,5
Амикацин	78,9	85,7	21,1	14,3
Ципрофлоксацин	100	100	0	0
Имипенем	10,5	10,5	89,5	89,5
Меропенем	5,3	23,8	94,7	76,2

При использовании метода двойных дисков с ЭДТА среди исследуемых изолятов синергизм между карбапенемами и ЭДТА не был выявлен.

Таким образом, в отношении проблемных микроорганизмов среди изолятов *A. baumannii* наибольшую активность проявляли карбапенемы.

4. Анализ профилей чувствительности клинических изолятов *P. aeruginosa*

Результаты оценки чувствительности изолятов *P. aeruginosa* с использованием критериев CLSI и EUCAST представлены в таблице 5.

Таблица 5.

Интерпретация результатов оценки чувствительности изолятов *P. aeruginosa* (n = 44) с использованием критериев CLSI и EUCAST.

Антибиотик	Количество микроорганизмов, %			
	Устойчивые и промежуточные		Чувствительные	
	CLSI	EUCAST	CLSI	EUCAST
Гентамицин	85,4	88,6	14,6	11,4
Амикацин	58,5	70,5	41,5	29,5
Ципрофлоксацин	90,3	95,5	9,7	4,5
Цефепим	65,9	65,9	34,1	34,1
Цефоперазон/сульбактам	78	-	22,0	-
Цефтазидим	73,2	70,5	26,8	29,5
Имипенем	65,9	65,9	34,1	34,1
Меропенем	78,1	79,5	21,9	20,5

При использовании метода двойных дисков с ЭДТА среди 44 исследуемых изолятов синергизм между карбапенемами и ЭДТА был выявлен в 5 случаях (11,4 %), что с высокой степенью вероятности свидетельствовало о продукции металло-бета-лактамаз этими микроорганизмами.

III. Расшифровка механизмов устойчивости к бета-лактамам антибиотикам у грамотрицательных микроорганизмов – возбудителей нозокомиальных инфекций.

1. Расшифровка механизмов устойчивости *K. pneumoniae* к бета-лактамам антибиотикам

Наиболее очевидным результатом детекции основных детерминант резистентности к бета-лактамам антибиотикам у *K. pneumoniae* и анализа полученных данных является большое разнообразие генотипов. Среди 46 изолятов обнаружено 18 различных комбинаций генов бета-лактамаз.

Среди генов *bla_{ampC}* группа CMY оказалась наиболее часто встречающейся (обнаружены у 7 из 46 изолятов (15,2 %) и была распространена на территории всей Российской Федерации от Санкт-Петербурга (северо-западный регион) до Владивостока (Дальний Восток). Изоляты, продуцирующие бета-лактамазы этой группы, проявляли высокий уровень резистентности к цефепиму, цефотаксиму и цефтазидиму. У трех изолятов тест с клавулановой кислотой дал положительный результат. У пяти изолятов был обнаружен низкий уровень чувствительности к меропенему (спектр

минимальной подавляющей концентрации (МПК) от 0,5 до 128,0 мкг/мл), однако генов металло-бета-лактамаз обнаружено не было.

Гены группы DNA были обнаружены у 9 изолятов (19,5 %), при этом 7 из них были получены из 1 центра в Томске. Все изоляты с *bla*_{DNA} были устойчивы к цефтазидиму, но большинство из них проявляли высокие или промежуточные уровни чувствительности к цефепиму и цефотаксиму согласно критериям CLSI. Ни у одного изолята тест с клавулановой кислотой не дал положительный результат. У 2 изолятов был обнаружен низкий уровень чувствительности к меропенему (спектр МПК от 1,0 до 16,0 мкг/мл).

Гены группы MOX были обнаружены у 2 изолятов (4,3 %). Все изоляты с генами группы MOX проявляли высокий уровень устойчивости к цефотаксиму и цефтазидиму. У одного изолята с *bla*_{MOX} тест с клавулановой кислотой дал положительный результат. Уровень устойчивости к меропенему был достаточно высокий у этих групп изолятов (спектр МПК от 0,12 до 2,0 мкг/мл).

Гены группы MIR были обнаружены у 3 изолятов (6,5%), при этом 2 из них были получены из одного города – Санкт-Петербург. Изоляты с генами группы MIR проявляли различные уровни чувствительности к цефепиму, цефтазидиму и цефотаксиму. У двух изолятов тест с клавуланатом был положительный. Уровень устойчивости к карбапенемам был достаточно низкий (спектр МПК от 0,0625 до 0,5 мкг/мл).

Таким образом, в отдельных медицинских учреждениях мы наблюдали клональное распространение определенных генотипов, что позволило предположить о наличии, так называемых, госпитальных изолятов.

2. Расшифровка механизмов устойчивости у представителей семейства Enterobacteriaceae (кроме *K. pneumoniae*) к бета-лактамным антибиотикам.

Среди 34 изолятов остальных представителей семейства Enterobacteriaceae обнаружено 12 различных комбинаций генов бета-лактамаз.

Среди бактерий семейства Enterobacteriaceae преобладали изоляты, несущие одновременно гены двух групп бета-лактамаз (TEM-1, CTX-M1 – 26,5%), другие комбинации встречались с меньшей частотой (CTX-M1, OXA – 14,7%, TEM-1, SHV-1, CTX-M1 – 8,8%, TEM-1 – 8,8%).

2.1. Случаи выявления AmpC у изолятов семейства Enterobacteriaceae.

В ходе исследования был выявлен изолят *Klebsiella oxytoca*, несущий ген бета-лактамазы класса C - *bla*_{MIR-1} в комбинации с *bla*_{SHV-1} и *bla*_{CTX-M1}.

Также в ходе исследования был обнаружен изолят *P. mirabilis*, несущий ген бета-лактамазы DNA-1 в комбинации с генами *bla*_{TEM-1} и *bla*_{SHV-1}. Этот изолят был выделен от пациента из города Томск, где была выявлена подобная комбинация генов у 9 изолятов *K. pneumoniae*.

Помимо локализованных в плазмидной ДНК генов *bla*_{AmpC} в ходе исследования у 2 изолятов (*E. cloacae* и *E. asburiae*) были обнаружены хромосомные гены данной группы. У изолята *E. asburiae* обнаруженный ген *bla*_{AmpC-new} содержал множественные нуклеотидные замены, которые не описывались ранее.

2.1.1. Моделирование пространственной структуры белка AmpC

Построение 3D-модели белка AmpC-new

На основании анализа нуклеотидной последовательности гена *bla*_{AmpC-new} выведена аминокислотная последовательность белка этой бета-лактамазы, которая была использована для построения пространственной модели белка методом предсказания структуры по гомологии (веб-сервис SWISS-PROT, <http://www.swissprot20.org/>). В качестве пространственного шаблона был выбран белок бета-лактамаза АСТ-1, выделенный из штамма *K. pneumoniae*. Структура данной бета-лактамазы была получена Shimizu-Ibuka с соавторами в 2007 году методом рентгеноструктурного анализа с разрешением 2.4 Å (А. Shimizu-Ibuka, 2008).

Анализ пространственной структуры белка AmpC-new.

В ходе анализа пространственной структуры бета-лактамазы AmpC-new (рис. 1) было установлено, что большинство аминокислотных замен, обнаруженных у AmpC-new не должны приводить к серьезным изменениям пространственной структуры белка, по сравнению с изученной ранее бета-лактамазой АСТ-1.

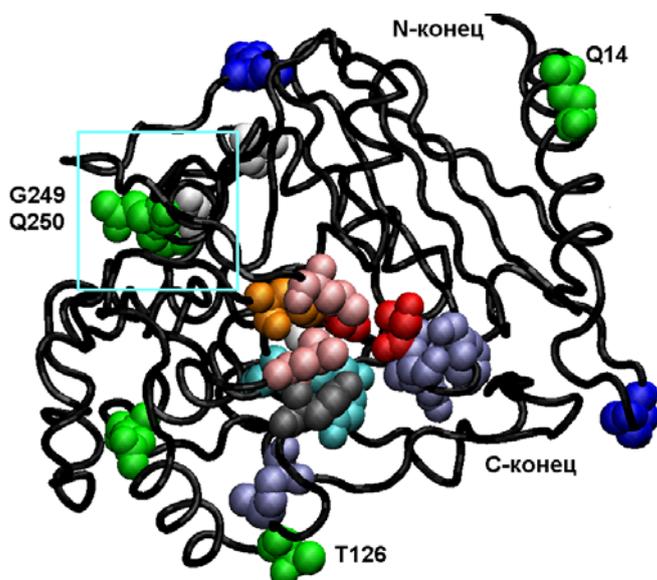


Рисунок 1. Модель белка AmpC-new. Цветом помечены активные центры и аминокислотные замены. Активные центры: сайт карбонилирования/гидроксилирования (Ser77, Ala331) – красный; сайт связывания амида (Asn165, Gln133) – серый; сайт связывания гидроксила

(Tyr163) – оранжевый; гидрофобный центр (Leu132, Leu306) – розовый; арильный центр (Asn165, Tyr234) – бирюзовый; сайты связывания воды (Met228, Tyr247) – светло-синий. Аминокислотные замены: полярные - зеленый, катионные - синий, гидрофобные – белый. 14, 126, 249, 250 – положение значимых аминокислотных замен. Голубой рамкой отмечена петля, где располагаются 2 значимые аминокислотные замены.

Однако были выявлены две аминокислотные замены, которые могут в некоторой степени повлиять на конформацию молекулы. Во-первых, это замена Arg14Gln, вследствие которой утрачивается солевой мостик с глутаминовой кислотой в положении 10 (Glu10). Это, возможно, снижает стабильность N-концевой спирали белка. Другие значимые замены - Arg249Gly и Lys250Gln – располагаются в петле и, по всей видимости, ведут к утрате солевых мостиков с аспарагиновой кислотой в положении 245.

Также важно отметить, что практически все замены расположены далеко от активных центров фермента и, таким образом, мало влияют на гидролитические свойства данного фермента. Лишь одна замена располагается вблизи от одного из сайтов связывания с водой. Это Lys126Thr, которая располагается вблизи сайта связывания воды (Met228), вследствие этой замены теряется заряд в данной области, белок становится менее гидрофильным.

2.2. Случай выявления металло-бета-лактамазы у изолята *E. coli*.

При проведении исследований межлабораторной рабочей группой был обнаружен один изолят *E. coli*, выделенный от пациента интенсивной терапии Научно-исследовательского института нейрохирургии им. Н.Н. Бурденко, продуцирующий металло-бета-лактамазу. Тесты на чувствительность к антибиотикам показали, что данный изолят имеет высокий уровень устойчивости к большинству бета-лактамов: ампициллину, цефотаксиму, цефтазидиму, цефепиму, цефокситину (МПК, 256 мг/л). Особо примечательно было то, что он демонстрировал пониженную чувствительность к карбапенемам, хотя значения МПК имипенема (4 мкг/мл), эртапенема (2 мкг/мл) и меропенема (0,5 мкг/мл), которые были измерены с помощью метода разведений в бульоне, были в пределах чувствительности в соответствии со стандартами CLSI.

Повышение активности оксимино-цефалоспоринов в присутствии клавулановой кислоты свидетельствовало о продукции БЛРС, а синергизм между карбапенемами и ЭДТА свидетельствовал о продукции МБЛ.

При проведении ПЦР и анализе нуклеотидной последовательности методом секвенирования было выявлено присутствие гена *bla_{CTX-M-15}*. Он располагался под элементом *ISEcp1*. Гены *bla_{TEM}* и *bla_{SHV}* обнаружены не были.

Также в ходе исследования было обнаружено наличие гена металло-бета-лактамазы VIM-4. При расшифровке генетического окружения данного гена было выявлено, что он располагается внутри генной кассеты интегрона 1-го класса. После этой кассеты расположена генная кассета *aacA7*, *dhfr1-aadA1* и далее – генная кассета *smr*. В этом интегрене отсутствовала характерная область 3'-CS и вместо этого он содержал ISPa21-like элемент (рис. 2)

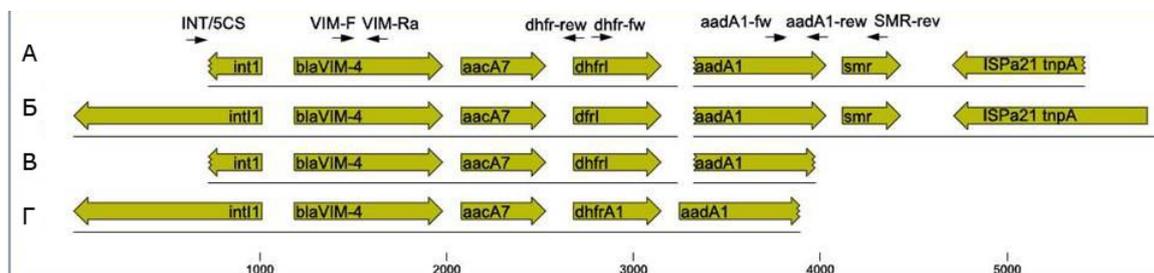


Рисунок 2. Структура интегрона класса 1, несущего генную кассету *bla_{VIM-4}* у *E. coli* (№55) и у других бактерий семейства Enterobacteriaceae в Европе. А - *E. coli* (№55); Б - In416 *K. pneumoniae* (AJ704863, Италия); В - *K. pneumoniae* (AM181293, Тунис); Г - *E. cloacae* (EF467306, Греция).

В ходе проведения сравнительного анализа с литературными данными было выявлено, что строение комплекса генных кассет идентично интегронам, кодирующим VIM-4, обнаруженных у *E. cloacae* из Греции (GB Acc.# EF467306), *K. pneumoniae* из Италии (In416, GB Acc.# AJ704863) и *K. pneumoniae* из Туниса (GB Acc.# AM181293).

3. Расшифровка механизмов устойчивости *A. baumannii* к бета-лактамным антибиотикам.

Среди 21 изолятов *A. baumannii* обнаружено 6 различных комбинаций генов бета-лактамаз.

Среди изолятов *A. baumannii* наибольшее количество было выявлено генов бета-лактамаз семейства OXA, как отдельно (21,1%), так и в комбинациях с другими бета-лактамазами: TEM+CTX+OXA (5,3%), TEM+OXA (52,6%). Среди обнаруженных генов *bla_{TEM}* превалировала подгруппа TEM-1 (80,0%), подгруппа TEM-2 была обнаружена у 3 изолятов *A. baumannii*. Ген *bla_{CTX-M1}* был обнаружен у 1 изолята, также единичные случаи выявления были у генов *bla_{SHV-1}* и *bla_{SHV-5}*.

4. Расшифровка механизмов устойчивости *P. aeruginosa* к бета-лактамным антибиотикам.

Среди 44 изолятов *P. aeruginosa* обнаружено 3 различных комбинаций генов бета-лактамаз (рис. 11). У 35 изолятов *P. aeruginosa* механизмы резистентности расшифрованы не были. Резистентность у них может быть связана с нарушением системы пориновых каналов или активацией механизмов эффлюкса, и как следствие, понижение эффективности транспорта антибиотика.

Гены бета-лактамаз класса В были обнаружены у 5 изолятов *P.aeruginosa* (11,8%). Все эти изоляты проявляли повышенную устойчивость к карбапенемам (спектр МПК от 8,0 до более 32,0 мкг/мл) и демонстрировали синергизм между карбапенемами и ЭДТА. ПЦР с последующим секвенированием показало наличие у всех изолятов гена металло-бета-лактамазы VIM-4.

В ходе исследования у изолятов *P. aeruginosa* в одном случае (2,3 %) был обнаружен ген *bla*_{TEM-1}, в трех случаях (6,8 %) – комбинация генов *bla*_{TEM-1} и *bla*_{CTX-M1}.

IV. Оценка чувствительности и специфичности фенотипических тестов для выявления бета-лактамаз различных классов.

1. Применение теста с клавулановой кислотой для быстрого выявления изолятов, продуцирующих бета-лактамазы расширенного спектра.

Было исследовано 103 изолята, среди них 98 удовлетворяли критериям включения в исследование, то есть проявляли повышенную устойчивость к цефалоспорином расширенного спектра в соответствии с критериями CLSI, а именно к цефотаксиму (спектр МПК от 64 мкг/мл), либо к цефтазидиму (спектр МПК от 32 мкг/мл).

По результатам ПЦР гены бета-лактамаз расширенного спектра содержали 55 из 91 исследуемых изолятов (60,4 %), из них 31 *K. pneumoniae*, 2 *K. oxytoca*, 10 *P. mirabilis*, 8 *E. coli* и 4 *A. baumannii*. Тест с клавулановой кислотой дал положительный результат с 45 изолятами, несущими гены бета-лактамаз расширенного спектра. Отрицательный результат теста был у 30 изолятов, не несущих по данным ПЦР-анализа гены БЛРС. Кроме того, у 10 изолятов, содержащих гены БЛРС, результат фенотипического теста был отрицательный, а у 6 изолятов, у которых не были найдены гены БЛРС, фенотипический тест дал положительный результат. Таким образом, исходя из экспериментальных данных, чувствительность данного теста составила 88,2 %, а специфичность 75 %.

2. Применение трехмерного AmpC-теста для быстрого выявления изолятов, продуцирующих бета-лактамазы класса С.

Было исследовано 79 изолята, среди них 64 удовлетворяли критериям включения в исследование, то есть проявляли повышенную или промежуточную устойчивость к цефокситину в соответствии с критериями CLSI (спектр МПК от 16 до >128 мкг/мл), либо были устойчивы к цефтазидиму или цефотаксиму в соответствии с критериями CLSI (спектр МПК от 16 до >128 мкг/мл), а также показывали отрицательный результат в тесте на наличие БЛРС. В исследование были также включены изоляты, которые проявляли промежуточную резистентность или были устойчивы к цефокситину и, согласно тесту с клавулановой кислотой, продуцировали БЛРС.

По результатам ПЦР гены бета-лактамаз класса С содержали 24 из 72 исследуемых изолятов (33,3 %), из них 21 *K. pneumoniae*, 1 *K. oxytoca*, 1 *P. mirabilis*, 1 *E. cloacae*, 1 *E. asburiae*. Гены БЛРС присутствовали у 49 (68,1%)

исследуемых изолятов, из них 28 *K. pneumoniae*, 2 *K. oxytoca*, 1 *P. mirabilis*, 6 *E. coli*. Трехмерный AmpC-тест дал положительный результат с 27 изолятами, несущими гены бета-лактамаз класса C (рис. 2А). Отрицательный результат теста был у 36 изолятов, не несущих по данным ПЦР-анализа гены AmpC. Кроме того, у 1 изолята, содержащего ген *bla*_{DHA-1}, результат трехмерного AmpC-теста был отрицательный. Таким образом, исходя из экспериментальных данных, чувствительность данного теста составила 97,9 %, а специфичность 100 %.

3. Применение метода двойных дисков с ЭДТА для выявления изолятов, продуцирующих металло-бета-лактамазы.

Было исследовано 145 изолятов, среди них 64 удовлетворяли критериям включения в исследование, то есть проявляли повышенную или промежуточную устойчивость к карбапенемам (имипенему или меропенему) в соответствии с критериями CLSI (спектр МПК от 4 до >32 мкг/мл).

В исследование было включено 31 изолят *P. aeruginosa*, 1 изолят *P. hibiscicola*, 1 изолят *E. coli*, 2 изолята *P. mirabilis*, 6 изолятов *K. pneumoniae*. По результатам ПЦР 6 из этих изолятов несли ген металло-бета-лактамазы VIM-4. При использовании метода двойных дисков с ЭДТА положительный результат был у 6 изолятов с подтвержденным наличием гена металло-бета-лактамазы, у остальных 25 изолятов гены МБЛ не были выявлены. Таким образом, исходя из экспериментальных данных, чувствительность и специфичность данного теста составила 100 %.

Выводы

1. Методом прямого белкового профилирования установлена видовая принадлежность 145 изолятов грамотрицательных микроорганизмов семейства Enterobacteriaceae, рода Pseudomonas и Acinetobacter, полученных из клиник различных городов РФ. Результаты идентификации полностью совпали с данными анализа нуклеотидной последовательности гена *rrs* (16SpPHK) указанных микроорганизмов.
2. Проведена фенотипическая характеристика собранной коллекции изолятов грамотрицательных микроорганизмов семейства Enterobacteriaceae, рода Pseudomonas и Acinetobacter с применением панелей скрининговых и подтверждающих тестов с оценкой их чувствительности и специфичности. Показано большое разнообразие профилей антибиотикочувствительности у исследуемых возбудителей нозокомиальных инфекций.
3. С использованием оригинальных ПЦР тест-систем выявлены разнообразные генетические детерминанты, обуславливающие формирование устойчивости к бета-лактамам антибиотикам исследуемых грамотрицательных микроорганизмов.
4. На основании анализа нуклеотидной последовательности геномной ДНК изолята *E. asburiae* обнаружен ген AmpC, кодирующий не описанную ранее аминокислотную последовательность бета-лактамазы. Изучение структуры данного фермента методом

молекулярного моделирования выявила незначительные изменения в конформации белка, которые могут обуславливать новые свойства фермента.

5. Впервые на территории РФ обнаружен клинический изолят *E. coli*, изолированный из мочи пациента интенсивной терапии Научно-исследовательского института нейрохирургии им. Н.Н. Бурденко, содержащий ген металло-бета-лактамазы VIM-4. Эти данные свидетельствуют о начавшемся процессе передачи генов металло-бета-лактамаз от *Pseudomonas* spp к представителям семейства Enterobacteriaceae, потенциально приводящему к снижению эффективности карбапенемов в терапии грамотрицательных бактерий.

Список опубликованных работ

1. **Мудрак, Д. Е.** Изучение распространенности и молекулярных механизмов антибиотикорезистентности у грамотрицательных возбудителей нозокомиальных инфекций в стационарах Москвы и Перми / **Д. Е. Мудрак, Л. Н. Икрянникова, С. В. Сидоренко, Е. Н. Ильина** // *Антибиотики и химиотерапия*. – 2007. – Т. 52, №7/8. – С.10-16.
2. **Захарова, Ю. А.** Распространенность полирезистентных изолятов условно-патогенной микрофлоры в многопрофильном хирургическом стационаре / **Ю. А. Захарова, Д. Е. Мудрак** // *Вестник Российской военно-медицинской академии*. – 2008. – Приложение 2(22). – часть II. – С.459-460.
3. **Миронов, А. Ю.** Фенотипическое и генетическое изучение антибиотикочувствительности и молекулярных механизмов резистентности к β -лактамам патогенов внутрибольничных инфекций / **А. Ю. Миронов, И. В. Крапивина, Д. В. Иванов, Д. Е. Мудрак** // *Курский научно-практический вестник «Человек и здоровье»*. – 2009. – №2. – С.78 - 88.
4. **Мудрак Д.Е., Икрянникова Л.Н.** Механизмы устойчивости грамотрицательных бактерий возбудителей нозокомиальных инфекций к бета-лактамам антибиотикам // Тезисы Научно-практической конференции «Инфекции, вызываемые условно-патогенными микроорганизмами». – Москва, 2007.
5. **Mudrak D., Ilina E., Kruglov A., Fursova N., Sidorenko S.** Diversity of class C β -lactamases among *Klebsiella* spp. in Russia // Thesis from Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy. – Washington, 2008.
6. **Shevchenko O., Edelstein M., Sidorenko S., Mudrak D., Ikryannikova L., Alexandrova I.** First report of the *Escherichia coli* co-producing CTX-M-15 ESBL and VIM-4 MBL in Russia // Thesis from Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy. – Washington, 2008.