

*На правах рукописи*



**Садеева Зульфия Закиевна**

**Характеристика грамотрицательных бактерий, выделенных из крови и ликвора у детей**

1.5.11. Микробиология

**Автореферат**

диссертации на соискание ученой степени

кандидата медицинских наук

Москва – 2024

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

**Научный руководитель:**

доктор медицинских наук

**Лазарева Анна Валерьевна**

**Официальные оппоненты:**

**Попов Дмитрий Александрович** – доктор медицинских наук, профессор РАН, Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный медицинский исследовательский центр сердечно-сосудистой хирургии имени А. Н. Бакулева» Министерства здравоохранения Российской Федерации, заведующий микробиологической (бактериологической) лабораторией, врач-бактериолог

**Сухорукова Марина Витальевна** – кандидат медицинских наук, Федеральное государственное автономное учреждение «Национальный медицинский исследовательский центр нейрохирургии имени академика Н. Н. Бурденко» Министерства здравоохранения Российской Федерации, заведующий лабораторией микробиологии и антибактериальной терапии

**Ведущая организация:**

федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Смоленский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Защита диссертации состоится « 18 » марта 2025 г. в 14:00 на заседании Диссертационного совета ДСУ 208.001.34 ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет) по адресу: 119991, г. Москва, ул. Трубецкая, д. 8, стр. 2.

С диссертацией можно ознакомиться в Фундаментальной учебной библиотеке ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет) по адресу: 119034, г. Москва, Зубовский бульвар, д.37/1 и на сайте <https://sechenov.ru>

Автореферат разослан « \_\_\_\_\_ » \_\_\_\_\_ 2025 г.

Ученый секретарь диссертационного совета

доктор медицинских наук, профессор  **Калужин Олег Витальевич**

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

### Актуальность темы исследования

Инфекции кровотока и центральной нервной системы (ЦНС), вызванные множественно-резистентными грамотрицательными микроорганизмами, имеют большое значение в педиатрических стационарах. Особенно острой эта проблема является для отделений реанимации и интенсивной терапии (ОРИТ) (Wattal S., 2020). Приобретение отдельными патогенами множественных механизмов устойчивости к антибиотикам различных классов вызывает особую настороженность, поскольку существенно ограничивает или, в некоторых случаях, полностью исключает эффективные варианты лечения (German G.J., 2018).

Это приводит, прежде всего, к высокому уровню летальности, а также к затруднениям в назначении своевременного и подходящего лечения (Amanati A., 2021). Основную роль в антибиотикорезистентности играет ферментативное воздействие на антибиотики. Для грамотрицательных микроорганизмов особенно важна продукция карбапенемаз (Saima S., 2020). Кроме того, патогены, выделенные из образцов крови и ликвора, имеют множество факторов вирулентности, благодаря которым реализуется их способность к адгезии, инвазии, персистенции, формированию биопленок и токсинообразованию (Mokhtari A., 2019). Одним из общих свойств вирулентности для многих микроорганизмов является способность к формированию биопленок на биотических и абиотических поверхностях (Tuncer G., 2022). Формирование биопленок приводит к увеличению резистентности к различным классам антимикробных препаратов (АМП). Это осуществляется несколькими путями: протективное действие полимера, высокая плотность бактериальных клеток в составе биопленки, дифференциальная экспрессия генов, связанных с устойчивостью к АМП (Torres R., 2023).

Среди бактериальных причин инфекции кровотока и ЦНС стоит отметить представителей порядка *Enterobacterales* и неферментирующие грамотрицательные бактерии (НГОб), таких как *Klebsiella pneumoniae*, *Serratia marcescens*, *Acinetobacter baumannii* и *Pseudomonas aeruginosa* (Alcántar-Curiel M.D., 2023). Всемирной организацией здравоохранения (ВОЗ) в 2017 году эти патогены были отнесены к наиболее критическим из всех микроорганизмов с множественной лекарственной устойчивостью (МЛУ), представляющих особую угрозу в лечебных учреждениях (WHO, 2017).

### Степень разработанности темы исследования

Грамотрицательные микроорганизмы при инфекциях кровотока и ЦНС способны к формированию множественной резистентности к различным АМП. Сочетание МЛУ с вирулентностью в последние годы описывается все чаще. В базе данных PubMed за последние пять лет представлено более 1000 публикаций, посвященных грамотрицательным инфекциям

кровотока и ЦНС, в которых проводится анализ устойчивости к антимикробным препаратам (АМП), популяционной принадлежности, исследуются предикторы резистентности и вирулентности, а также изучаются факторы риска усиления тяжести этих состояний и особенности при неблагоприятных исходах инфекции. В отечественной литературе описаны исследования, изучающие отдельные аспекты инфекции кровотока у взрослого населения: диагностика бактериемии (Белобородов В.Б., 2022), идентификация возбудителей (Халиулин А.В., 2023), этиологическая структура и чувствительность к АМП (Быков А.О., 2023; Старовойтова В.О., 2023), антимикробная терапия (Дехнич А.В., 2023), инфекции кровотока у отдельных категорий пациентов (Ахмедов М.И., 2021; Саьдулаев Д.Ш., 2023; Соснин Д.Ю., 2023). Отдельно стоит выделить публикации, в которых изучены особенности бактериемии у детей, в частности, диагностика (Боронина Л.Г., 2019; Кирилочев О.К., 2022), микробный спектр (Сергиенко Е.Н., 2022), бактериемии у детей до года (Самойлова Л.М., 2011), инфекции кровотока у отдельных категорий педиатрических пациентов (Панина М.В., 2014). Имеются работы по изучению роли некоторых грамотрицательных патогенов в инфекции ЦНС у детей, они посвящены антибиотикорезистентности и клиническим аспектам инфекции (Агаева Э.М., 2023; Ермоленко К.Ю., 2023). В настоящее время возрастает интерес зарубежного научного сообщества к вопросу вирулентности грамотрицательных МЛУ микроорганизмов (Amanati A., 2021; Barcellini L., 2022; Hua Y., 2022; Wang G., 2020). Среди работ отечественных коллег также наблюдается интерес к вопросам вирулентности и резистентности различных бактерий (Антонова Т.С., 2023; Смирнова С.С., 2023). Однако молекулярно-генетические особенности грамотрицательных возбудителей и их связь с клиническими аспектами инфекции кровотока и ЦНС у детей в отечественной литературе описаны недостаточно.

#### **Цель и задачи исследования**

Цель исследования: охарактеризовать популяционную структуру и молекулярно-генетические предикторы антибиотикорезистентности и вирулентности у грамотрицательных бактерий, выделенных из крови и ликвора у детей.

Задачи исследования:

1. Охарактеризовать спектр микроорганизмов, выделенных из крови и ликвора у детей.
2. Изучить антибиотикорезистентность изолятов *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa*, *A. baumannii*, *S. marcescens*.
3. Описать клональное разнообразие и молекулярно-генетические механизмы антибиотикорезистентности *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa*, *A. baumannii*, *S. marcescens*.
4. Оценить вирулентные свойства и наличие их сочетания с резистентностью к антибиотикам у изолятов *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa*, *A. baumannii*.

5. Охарактеризовать способность к образованию биопленок у изолятов *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa*, *A. baumannii*, *S. marcescens* и изучить их чувствительность к антимикробным препаратам в составе биопленок.
6. Оценить клинические исходы бактериемии и инфекции центральной нервной системы в зависимости от вирулентности и резистентности микроорганизмов.

### Научная новизна

Получены новые данные о популяционной структуре *A. baumannii*, *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa* и *S. marcescens*, выделенных из проб крови и ликвора у детей. Показано преобладание сиквенс-типов ST (Sequence Type) высокого эпидемического риска: ST1104<sup>Oxf</sup>, ST450<sup>Oxf</sup> у *A. baumannii*, ST307, ST395, ST48 у *K. pneumoniae*, ST654 и ST235 у *P. aeruginosa*. Впервые был успешно применен метод мультилокусного сиквенсового анализа для изучения генотипического состава *S. marcescens*, выделенной из биоматериала пациентов педиатрического профиля. Были описаны и внесены в международную базу данных <http://pubmlst.org> ранее не встречавшиеся сиквенс-типы *A. baumannii* – ST2419<sup>Oxf</sup> и *P. aeruginosa* – ST3819, ST3821, ST3822, ST3823, ST3824, ST3825 и ST3826.

Дополнены данные о механизме устойчивости к карбапенемам: основными детерминантами устойчивости *A. baumannii* являются карбапенемазы OXA-40 (41%), *K. pneumoniae* – OXA-48 (33%), *P. aeruginosa* – VIM (56%), *S. marcescens* – комбинация OXA-48 и NDM – 16%. Были дополнены данные о биопленкообразовании бактерий. Было показано, что у изолятов *K. pneumoniae* и *S. marcescens* чаще всего определялась умеренная способность к образованию биопленок – 61% и 68%, соответственно. Для изолятов *P. aeruginosa* была наиболее характерна способность к формированию биопленок высокой интенсивности (48%). Изоляты *A. baumannii* чаще образовывали биопленки слабой интенсивности – 59%.

Были получены новые данные о вирулентных свойствах бактерий. Установлено, что все изоляты *A. baumannii* имели гены вирулентности биопленкообразования (*bfmR*, *bab*) и каталазы (*katE*). Ген белка наружной мембраны (*ompA*) был обнаружен у 94% штаммов, а ген пилей (*csuA/B*) – у 88%. Все штаммы *K. pneumoniae* имели гены сидерофора энтеробактина (*entB*) и фимбрий (*mrkD*). Ген сидерофора иерсиниебактина (*ybtS*) – 78%. Сидерофор азробактин (*iutA*) – у 18%. Ген системы утилизации железа (*kfu*) был характерен для 3%. Капсульный серотип K2 был определен у 10% изолятов. У всех изолятов *P. aeruginosa* были обнаружены гены гидролазы (*lasB*, *plcH* и *aprA*). Гены альгината (*algD*) и пиоционина (*phzM*) были выявлены у 96% и 92% изолятов, соответственно. Гены нейраминидазы *nan1* – у 4% и *nan2* – 60% штаммов. Гены пилей (*pilA* и *pilB*) были выявлены 12% и 48% штаммов, соответственно. Полногеномный анализ позволил определить дополнительные детерминанты устойчивости к АМП и вирулентности у изолятов *K. pneumoniae*, выделенных из проб крови и ликвора. Изучение

механизмов устойчивости к полимиксинам у изолятов *K. pneumoniae* из крови и ликвора показало, что характерными являются изменения в гене *PhoP\_26Q*.

Впервые были получены данные о молекулярно-генетических характеристиках *A. baumannii*, *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa* и *S. marcescens* при неблагоприятных исходах бактериемии и инфекции ЦНС. Было выявлено, что при данных инфекциях уровень смертности составляет от 5 до 25% случаев. При этом этиологические агенты инфекции кровотока/ЦНС относятся к категории МЛУ и широко-лекарственно устойчивые (ШЛУ), обладают множеством генетических детерминант резистентности и вирулентности.

### **Теоретическая и практическая значимость работы**

Полученные результаты позволили определить генетические механизмы устойчивости к  $\beta$ -лактамам у основных грамотрицательных возбудителей инфекции кровотока/ЦНС у детей. Эти данные будут востребованы для оптимального подбора АМП и преодоления антибиотикорезистентности. Данные об эпидемиологической структуре основных грамотрицательных патогенов, выделенных из проб крови и ликвора позволяют сформировать представления о популяционном разнообразии, распространенности международных клонов высокого эпидемического риска и определить наличие генотип-ассоциированных механизмов резистентности и вирулентности. Полученные данные о генетических конформациях, приводящих к устойчивости к колистину, позволяют совершенствовать знания о механизмах колистинрезистентности в популяции *K. pneumoniae*. Проведенный полногеномный анализ наиболее резистентных изолятов *K. pneumoniae*, выделенных из проб крови и ликвора, характеризует генетические детерминанты резистентности к широкому спектру АМП, типичные факторы вирулентности и клональную принадлежность. В базе данных GenBank размещены полные геномы семи штаммов *K. pneumoniae*. Сформирована коллекция штаммов и дезоксирибонуклеиновых кислот (ДНК) *A. baumannii*, *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa* и *S. marcescens*, выделенных из проб крови и ликвора, которая может быть использована в дальнейших исследованиях для изучения эволюционных изменений данных грамотрицательных патогенов. Создана электронная база данных, содержащая сведения о резистентности к АМП, носительстве  $\beta$ -лактамаз, сиквенстипе, наличии плазмид резистентности.

### **Методология и методы исследования**

Методология настоящего исследования спланирована в соответствии с целью. Объектами исследования являлись изоляты *A. baumannii*, *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa*, *S. marcescens*, выделенные из проб крови и ликвора у детей. Минимальные подавляющие концентрации (МПК) антибактериальных препаратов определяли при помощи метода микроразведений в бульоне. Наличие генов карбапенемаз определяли полимеразной цепной реакцией (ПЦР) в

реальном времени. Определение способности к образованию биопленок проводили в полистироловых микропланшетах с последующей фиксацией, окраской и измерением оптической плотности. Наличие генов вирулентности выявляли с помощью ПЦР и детекцией в агарозном геле. Популяционный состав определяли с помощью секвенирования по Сэнгеру. Определение дополнительных детерминант резистентности и вирулентности у наиболее резистентных изолятов *K. pneumoniae* проводили методом полногеномного секвенирования. Статистическую обработку данных проводили при помощи программы SPSS 20.0 (SPSS Statistics) и Microsoft Excel.

### **Личный вклад автора**

Личное участие соискателя в получении результатов, изложенных в диссертации, заключалось в проведении микробиологической части исследования (культуральные исследования, идентификация микроорганизмов, определение резистентности к АМП методом микроразведений в бульоне, определение способности к формированию биопленок микроорганизмов) в лаборатории микробиологии ФГАУ «НМИЦ здоровья детей Минздрава России. А также молекулярно-генетической части исследования (выделение ДНК, постановка ПЦР, учет и интерпретация результатов ПЦР, подготовка образцов для секвенирования, интерпретация результатов секвенирования) в лаборатории молекулярной микробиологии ФГАУ «НМИЦ здоровья детей Минздрава России. Выбор материала для исследования проводился совместно с зав. лабораторией микробиологии ФГАУ «НМИЦ здоровья детей» д.м.н., гл.н.с. Лазаревой А.В. Определение генов системы секреции III типа и GES у *P. aeruginosa* проводилось соискателем совместно с д.б.н., ст.н.с. Михайловичем В.М. в лаборатории биологических микрочипов ФГБУН Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН. Изучение популяционной структуры методами мультилокусного сиквенс-типирования изолятов *A. baumannii*, *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa*, многолокусного сиквенсового анализа *S. marcescens* и секвенирование генов по методу Сэнгера проводилось соискателем совместно с к.б.н., в.н.с. Пушковым А.А., научным сотрудником Пахомовым А.В. в лаборатории медицинской геномики и к.м.н., в.н.с. Алябьевой Н.М., м.н.с. Комягиной Т.М. в лаборатории экспериментальной иммунологии и вирусологии ФГАУ «НМИЦ здоровья детей» Минздрава России. Полногеномное секвенирование и биоинформатическая обработка результатов проводились совместно с к.б.н., доцентом, зав. лабораторией Ворониной О.Л. к.б.н., ст.н.с. Кунда М.С., к.б.н., ст.н.с. Рыжовой Н.Н., к.б.н., ст.н.с. Аксеновой Е.И. в лаборатории анализа геномов ФГБУ НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи Минздрава России.

### **Положения, выносимые на защиту**

1. Среди грамотрицательных бактерий, выделенных из крови и ликвора у детей, преобладали *A. baumannii*, *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa* и *S. marcescens*.

1. Устойчивость к карбапенемам обусловлена выработкой карбапенемаз: *A. baumannii* – OXA-40, *K. pneumoniae* – OXA-48, *P. aeruginosa* – VIM, *S. marcescens* – комбинацией OXA-48 и NDM.
2. В популяционной структуре преобладают генотипы высокого эпидемического риска: *A. baumannii* – ST1104<sup>Oxf</sup>, ST450<sup>Oxf</sup>, *K. pneumoniae* – ST307, ST395, ST48, *P. aeruginosa* – ST654 и ST235.
3. Все изоляты *A. baumannii* имели гены вирулентности, биопленкообразования: *bfmR*, *bar* и каталазы *kate*. Все изоляты *K. pneumoniae* имели гены сидерофора энтеробактина *entB* и фимбрий *mrkD*. У всех изолятов *P. aeruginosa* были обнаружены гены гидролаз *lasB*, *plcH* и *aprA*, большинство изолятов имели гены альгината *algD* и пиоционина *phzM* (96% и 92%).
4. При бактериемии и инфекции ЦНС, ассоциированной с *A. baumannii*, *K. pneumoniae* и *P. aeruginosa*, летальность достигает 25%. При этом изоляты относятся к МЛУ и ШЛУ, обладают карбапенемазами (до 80%) и различными факторами вирулентности (биопленки - до 100%, токсины - 60%, сидерофоры - до 88% изолятов).

#### **Соответствие диссертации паспорту научной специальности**

Научные результаты и положения диссертации соответствуют паспорту научной специальности 1.5.11. Микробиология п. 1. Систематика и филогения микроорганизмов, п. 7. Ферменты микроорганизмов, п. 11 Геномный и метагеномный анализ микроорганизмов и их сообществ, п. 15. Структурированные сообщества микроорганизмов, в том числе биопленки.

#### **Степень достоверности и апробация результатов исследования**

Достоверность результатов работы подтверждается использованием современных методов исследования, в соответствии с международными рекомендациями, которые характеризуются высокой чувствительностью, специфичностью и объективностью. Результаты микробиологических методов сопоставимы с данными молекулярно-генетических исследований, что свидетельствует о достоверности полученных результатов. В работе использовались микробиологические, молекулярно-генетические, спектрофотометрические и масс-спектрометрические методы. Всё оборудование, на котором проводились исследования, проходило регулярную метрологическую поверку.

Диссертация апробирована на заседании проблемной комиссии по Педиатрии совместно с сотрудниками лабораторного отдела Федерального государственного автономного учреждения «Национальный медицинский исследовательский центр здоровья детей» Минздрава России (протокол № 74 от «04» июня 2024 года).

#### **Публикации по теме диссертации**

По результатам исследования автором опубликована 21 работа, в том числе 4 научных статьи в журналах, включенных в Перечень рецензируемых научных изданий Сеченовского

Университета/ Перечень ВАК при Минобрнауки России, в которых должны быть опубликованы основные научные результаты диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук, в том числе, индексируемых в международных базах Web of Science, Scopus, PubMed, MathSciNet, zbMATH, Chemical Abstracts, Springer, 2 иные публикации по результатам исследования, 15 публикаций в сборниках материалов международных и всероссийских научных конференций (из них 2 зарубежных конференций).

### **Структура и объем диссертации**

Диссертация изложена на 196 страницах машинописного текста и состоит из введения, основной части (обзора литературы, описания материалов и методов исследования и шести глав, отражающих результаты собственных исследований), заключения, выводов, практических рекомендаций, описания перспектив дальнейшей разработки темы, списка сокращений и условных обозначений, списка литературы. Диссертация иллюстрирована 42 таблицами и 23 рисунками. Библиографический указатель включает 342 источника литературы, в том числе 53 ссылки на отечественных авторов и 289 ссылок на зарубежных авторов.

## **СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ**

### **Материалы и методы исследования**

В период с 2014 по 2021 гг. были отобраны 67 изолятов *K. pneumoniae*, 25 – *P. aeruginosa*, 17 – *A. baumannii* и 19 – *S. marcescens* из положительных гемокультур и проб ликвора пациентов из двух московских детских учреждений: ФГАУ «НМИЦ здоровья детей» Минздрава России (С1), НИИ неотложной детской хирургии и травматологии Департамента здравоохранения г. Москвы (С2). Минимальные подавляющие концентрации (МПК) антибиотиков определяли методом серийных микроразведений в бульоне Мюллера-Хинтон Sensititre™ (ThermoScientific, Великобритания). Результаты интерпретировали в соответствии с критериями Европейского комитета по тестированию чувствительности к антибиотикам (EUCAST) версия 10.0. Все изоляты были разделены на штаммы с МЛУ и ШЛУ в соответствии с рекомендациями (German G.J., 2018).

Анализ формирования биопленок на абиотической поверхности проводили с использованием сердечно-мозгового бульона (ВНВ; Becton Dickinson, США) по ранее описанной методике с модификациями (Hu P., 2017). Результаты интерпретировали согласно рекомендациям (Stapanović, S., 2007). Бактериальную ДНК выделяли согласно инструкции производителя с использованием коммерческих наборов «ГК-экспресс» (ЦНИИ эпидемиологии Роспотребнадзора). Выявление генов, отвечающих за продукцию цефалоспоринов и карбапенемаз, проводили с использованием коммерческих наборов с гибридационно-флуоресцентной детекцией производства ЦНИИ эпидемиологии Роспотребнадзора. ПЦР для

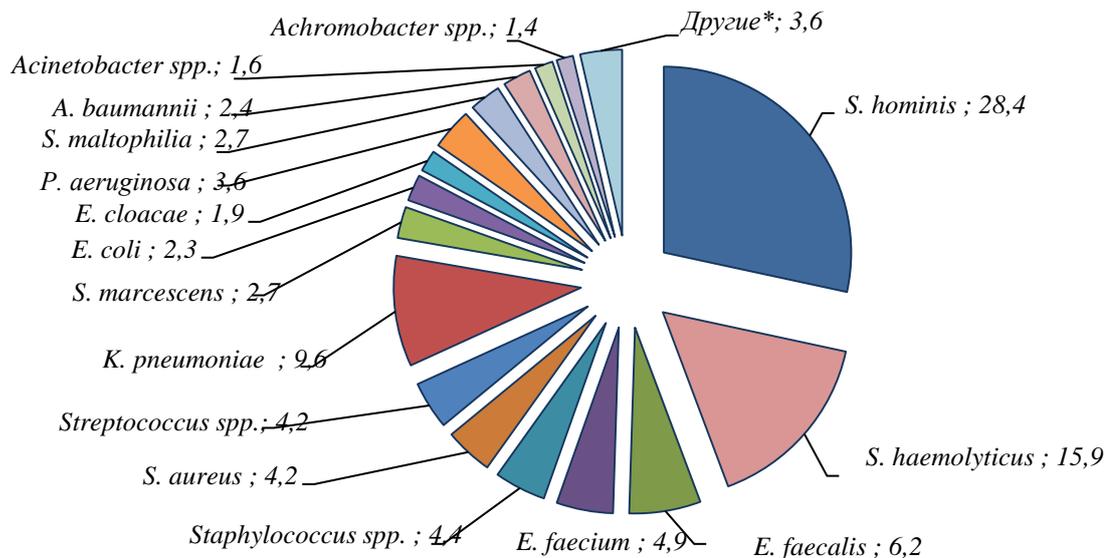
детекции генов *bla<sub>GES</sub>*, *exoS*, *exoT*, *exoU* и *exoY* были разработаны в рамках настоящей работы. Гены *A. baumannii*, отвечающие за чувство кворума и процесс образования биопленок, определяли методом ПЦР с детекцией в 2% агарозном геле (Kodori M., 2017; Vijayakumar K., 2021). Гены вирулентности *K. pneumoniae* определяли методом мультиплексной ПЦР (Compain F., 2014). Определение генов вирулентности *P. aeruginosa* проводили с помощью ПЦР и визуализировали методом электрофореза (Bogiel T., 2022; Mitov I., 2010). Для сиквенстипирования изолятов использовали метод мультилокусного сиквенстипирования (МЛСТ). Были использованы праймеры из общепринятых схем МЛСТ (Bartual S.G., 2007; Curran, B., 2004; Diancourt L., 2005). Для типирования изолятов *S. marcescens* использовали метод мультилокусного сиквенсового анализа (МЛСА) (Besler, K.R., 2017). Секвенирование проводили с использованием наборов реагентов и оборудования фирмы Applied Biosystems (США) в соответствии с рекомендациями производителя.

Библиотеки ДНК готовили по протоколу Nextera DNA Flex Library Prep (Illumina, San Diego, CA, USA) и секвенировали на приборе NextSeq 500/550 (Illumina, San Diego, CA, USA), используя картридж Mid Output 300 cycles. Для сборки геномов применяли CLC Genomic Workbench v.21.0.1 (QIAGEN, Germantown, MD, USA) and SPAdes v.3.13.0 (St. Petersburg genome assembler, Russia, URL: <http://cab.spbu.ru/software/spades/>). Статистическую обработку данных проводили с помощью программ SPSS 20.0 (SPSS Statistics, США) и Microsoft Excel 2010. Различия считались статистически значимыми при  $p \leq 0,05$ .

### Результаты и их обсуждение

#### 1. Спектр микроорганизмов, выделенных из положительных гемокультур и проб ликвора, и чувствительность основных грамотрицательных патогенов к антибиотикам

В период 2014 - 2021 гг. были проанализированы 697 образцов положительных проб гемокультур (n=655) и ликвора (n=42), полученных от детей с симптомами бактериальной инфекции. Лидирующее место по частоте выделения занимали коагулазо-негативные стафилококки (КНС): *Staphylococcus hominis* и *Staphylococcus haemolyticus* – 198 (28,4%) и 111 (15,9%), соответственно (Рисунок 1). Частота выделения грамотрицательных микроорганизмов составила 30,4%. Из представителей порядка *Enterobacterales* преобладала *K. pneumoniae* – 67 (9,6%). Среди неферментирующих грамотрицательных патогенов преобладала *P. aeruginosa* – 25 (3,6%) случаев.



Примечание – Другие\* - *Corynebacterium spp.*, *Enterobacter spp.*, *Burkholderia spp.*, *Citrobacter gillenii*, *Proteus mirabilis* и *Haemophilus influenzae*.

Рисунок 1 – Спектр микроорганизмов, выделенных из гемокультур и проб ликвора (n=697, %)

Анализ антибиотикорезистентности изолятов *A. baumannii* к АМП показал высокий уровень устойчивости к аминогликозидам, карбапенемам и фторхинолонам (до 88%). При этом карбапенемрезистентные *A. baumannii* чаще выделялись из С2 ( $p = 0,02269$ ). К колистину были устойчивы 24% исследованных штаммов. Изоляты *K. pneumoniae* наибольшую резистентность проявляли к азтреонаму, цефтазидиму и тикарциллин/клавуланату (до 94%). Наименьшая устойчивость была определена к карбапенемам (34%) и колистину (31%). К аминогликозидам были резистентны до 88% штаммов. К цiproфлоксацину и триметоприм/сульфаметоксазолу проявили устойчивость до 75% изолятов. Изоляты *P. aeruginosa* имели высокий процент устойчивости к карбапенемам (80%), цефалоспорином (80%) и фторхинолонам (76%). Резистентность к защищенным цефалоспорином достигала 80%. По отношению к азтреонаму было определено преобладание изолятов, проявляющих чувствительность при повышенной экспозиции препарата (72%). Штаммы *S. marcescens* проявляли наибольшую резистентность к аминогликозидам, тикарциллин/клавуланату, азтреонаму и цефепиму (до 74%).

## 2. Фенотипы, генотипы антибиотикорезистентности и вирулентности, популяционная структура и клинические параметры при бактериемии и инфекции ЦНС, ассоциированной с *A. baumannii*

Карбапенемазы группы ОХА-23 были выявлены у 24% (n=4) штаммов. При этом в период с 2018 по 2021 годы (n=4) эта группа карбапенемаз выявлялась значительно чаще, чем с 2014 по 2017 годы (не определялись) ( $p=0,0294$ ). Карбапенемазы группы ОХА-40 были выявлены у 41% (n=7) штаммов. В С1 (n=7) эта группа карбапенемаз выявлялась значительно

чаще, чем в С2 (не определялись) ( $p=0,02098$ ). Фенотипы резистентности и наличие карбапенемаз отображено на Рисунке 2.

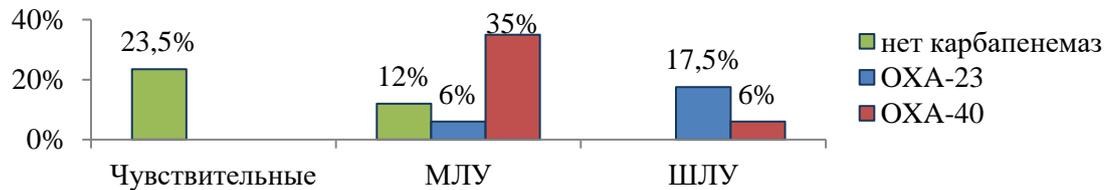
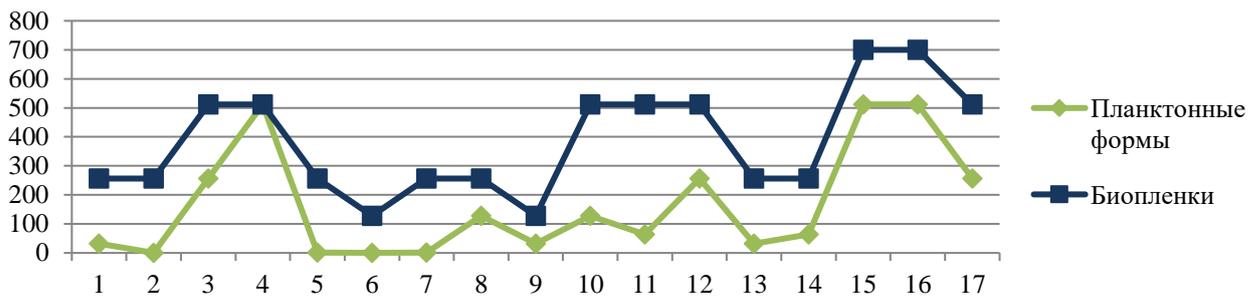


Рисунок 2 – Фенотипические группы и продукция ОХА-40 и ОХА-23 у *A. baumannii*

Изучение продукции биопленок показало, что изоляты *A. baumannii* проявляли способность к формированию биопленок различной интенсивности: слабые биопленки 10 (59%) изолятов, умеренные – 6 (35%) и сильные – 1 (6%). Для биопленочных культур была определена чувствительность к меропенему. Результаты сравнения МПК меропенема планктонных и биопленочных культур отражены на Рисунке 3.



#### Примечания

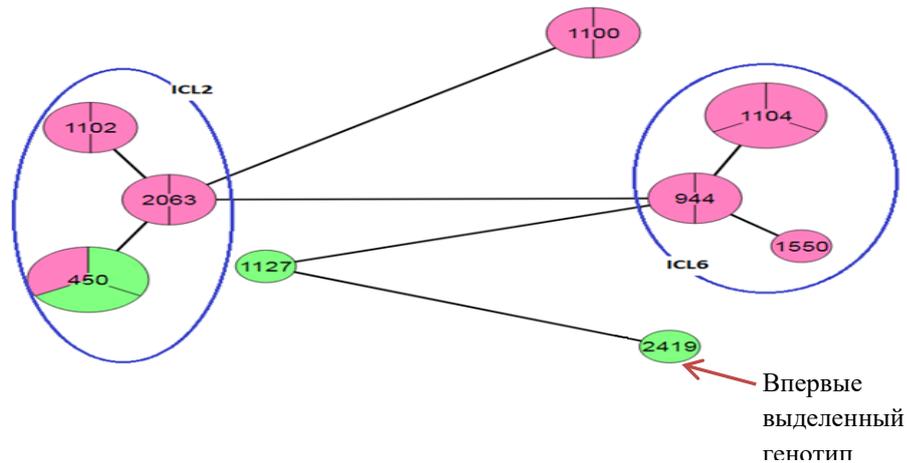
- 1 – Для двух изолятов под номерами 15 и 16 МПК меропенема была определена более 512 мг/л;
- 2 – Ось абсцисс – порядковый номер изолята *A. baumannii*;
- 3 – Ось ординат – МПК меропенема (мг/л).

Рисунок 3 – Сравнение МПК меропенема для планктонных и биопленочных культур *A. baumannii*

Было определено, что у штаммов, образующих умеренные и сильные биопленки, МПК меропенема для бактериальных клеток в составе биопленок превышали МПК для планктонных клеток до 512 раз (0,5 мг/л для планктонных к 256 мг/л для клеток в составе биопленок).

Для всех штаммов было проведено определение генов *bfmR*, *csuA/B*, *ompA*, *bar* и *katE*, ответственных за регуляцию биопленкообразования и вирулентности. Все изоляты имели гены *bfmR*, *bar* и *katE*. Ген *ompA* был обнаружен у 94% ( $n=16$ ) штаммов, а ген *csuA/B* – у 88% ( $n=15$ ). При оценке вирулентных свойств изолятов *A. baumannii*, устойчивых к АМП, было выявлено, что большинство изолятов, формирующих слабые биопленки, проявляет устойчивость к карбапенемам, аминогликозидам, триметоприм/сульфаметоксазолу и фторхинолонам.

Популяционная структура изолятов *A. baumannii*, выделенных из крови и ликвора у детей, представлена девятью различными сиквенстипами (Рисунок 4).



#### Примечания

- 1 – Розовый цвет – изоляты, резистентные к карбапенемам;
- 2 – Зеленый – чувствительные;
- 3 – Секторами обозначено количество изолятов в генотипе;
- 4 – Овалами обведены клональные группы.

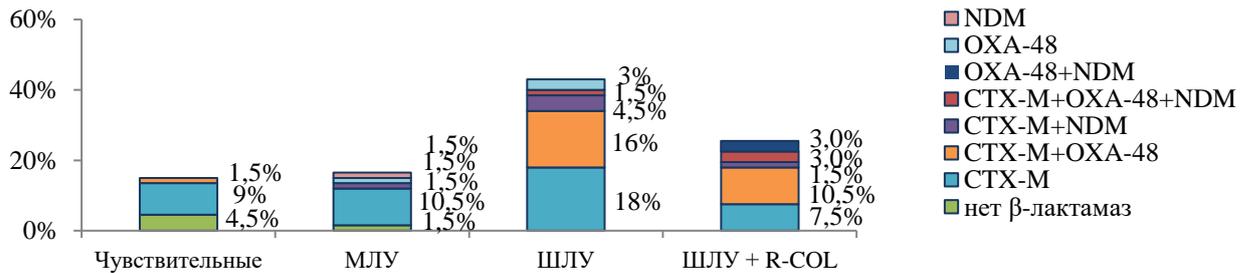
Рисунок 4 – Генотипическая структура изолятов *A. baumannii*, выделенных из крови и ликвора у детей

Сиквенстипы ST944<sup>Oxf</sup>, ST1550<sup>Oxf</sup> и ST1104<sup>Oxf</sup> входят в клональную группу CC944<sup>Oxf</sup>/CC78<sup>Pas</sup> – международной клональной линии ICL6. А сиквенстипы ST450<sup>Oxf</sup>, ST2063<sup>Oxf</sup> и ST1102<sup>Oxf</sup> – в клональную группу CC92/CC208<sup>Oxf</sup>/CC2<sup>Pas</sup>, относящуюся к международной клональной линии ICL2.

Из 14 пациентов с положительной гемокультурой диагноз «Сепсис» был у четверых (29%), из них трое имели летальный исход. В трех случаях положительные высевы *A. baumannii* были получены из образцов ликвора, у 2 пациентов был диагноз «Вентрикуломенингит». Один из них имел летальный исход. В трех эпизодах бактериемии с неблагоприятным исходом изоляты *A. baumannii* проявляли множественную лекарственную устойчивость (карбапенемы, аминогликозиды и фторхинолоны) и обладали карбапенемазой группы OXA-40. Один из штаммов проявлял устойчивость ко всем исследованным антимикробным препаратам (в том числе к колистину и триметоприм/сульфаметоксазолу). В одном из случаев с летальным исходом *A. baumannii* определялся из пробы ликвора у пациента 17 лет с хирургической патологией и диагнозом «Вентрикуломенингит». Выделенный при этом изолят проявлял устойчивость к карбапенемам, аминогликозидам, фторхинолонам и триметоприм/сульфаметоксазолу, не имел карбапенемаз. В эпизодах с неблагоприятным исходом у *A. baumannii* были определены разные сиквенс-типы: ST1104<sup>Oxf</sup>, ST1100<sup>Oxf</sup>, ST944<sup>Oxf</sup>, ST450<sup>Oxf</sup>.

**3. Фенотипы, генотипы устойчивости к антибиотикам и вирулентности, клональное разнообразие и клинические особенности инфекций кровотока и ЦНС, ассоциированных с *K. pneumoniae***

Ген цефалоспорины СТХ-М был обнаружен у 57 (85%) изолятов. Основной детерминантой устойчивости к карбапенемам был ген OXA-48 – у 22 (33%) изолятов. Ген металло-β-лактамазы (МБЛ) NDM обнаруживался значительно реже – у шести (9%) изолятов. Комбинацию карбапенемаз OXA-48 и NDM имели пять (7%) штаммов. NDM достоверно чаще определялся в период с 2018 по 2021 годы ( $p=0,003$ ). Распространенность β-лактамаз среди изолятов *K. pneumoniae* в зависимости от их фенотипа резистентности представлена на Рисунке 5.



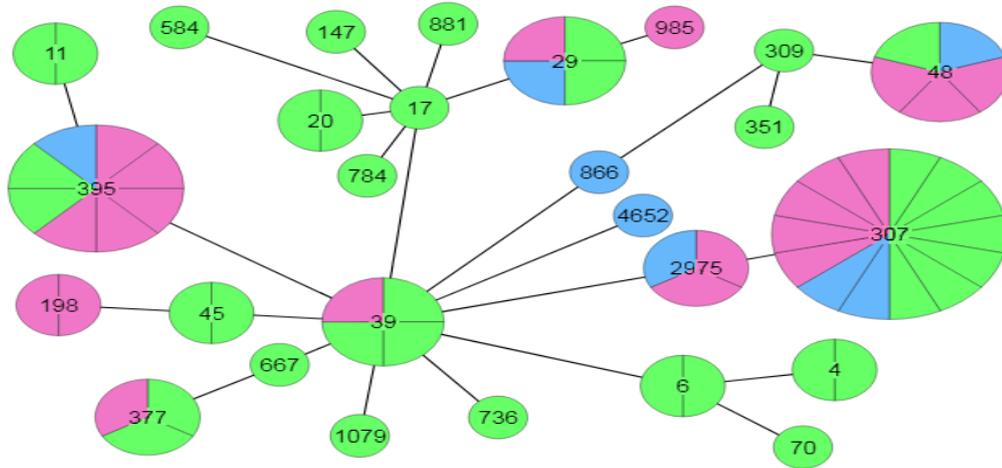
*Примечание* – ШЛУ + R-COL – широкая лекарственная устойчивость в сочетании с резистентностью к колистину.

Рисунок 5 – Фенотипические группы и продукция β-лактамаз у *K. pneumoniae*

Основная масса изолятов *K. pneumoniae* была способна к образованию биопленок. Два изолята (3%) не образовывали биопленок. Умеренную способность к образованию биопленок проявляли 41(61%) изолят, сильную – 14 (21%) штаммов и слабую – десять (15%) изолятов. Было определено, что в период с 2014 по 2017 годы чаще выявлялись изоляты, образующие сильные биопленки ( $p=0,0005$ ), а в период с 2018 по 2021 годы преобладали изоляты с умеренной способностью к образованию биопленок ( $p=0,002$ ).

Все штаммы *K. pneumoniae* имели гены *entB* и *mrkD*. В значительной доле случаев определялся ген *ybtS* – 52 (78%). Аэробактин *iutA* был обнаружен у 12 (18%) штаммов. Способность к связыванию трехвалентного железа, кодируемая геном *kfu*, была характерна всего для двух изолятов (3%). Ген *wzi*, кодирующий капсульный серотип K2, был определен у семи (10%) изолятов *K. pneumoniae*. Более 50% изолятов *K. pneumoniae*, формирующих биопленки сильной и умеренной интенсивности, были устойчивы к аминогликозидам, цефалоспорином, азтреонаму, защищенным пенициллинам и цефалоспорином, триметоприм/сульфаметоксазолу, ципрофлоксацину. Иерсиниабактин определялся у 76-95% резистентных изолятов. Более 75% изолятов, у которых был обнаружен аэробактин, проявляли устойчивость к тобрамицину, гентамицину, азтреонаму, цефалоспорином, защищенным пенициллинам и цефалоспорином, триметоприм/сульфаметоксазолу, ципрофлоксацину. Более 86% изолятов K2 серотипа были резистентны к колистину, азтреонаму, тобрамицину, цефалоспорином, защищенным пенициллинам и цефалоспорином, триметоприм/сульфаметоксазолу, ципрофлоксацину.

У изученных нами изолятов *K. pneumoniae* было обнаружено 27 различных генотипов. Наиболее часто встречающимися были: ST307 – 14 (21%), ST395 – 8 (12%), ST48 – 5 (7%), ST39 – 4 (6%) и ST29 – 4 (6%) (Рисунок 6).

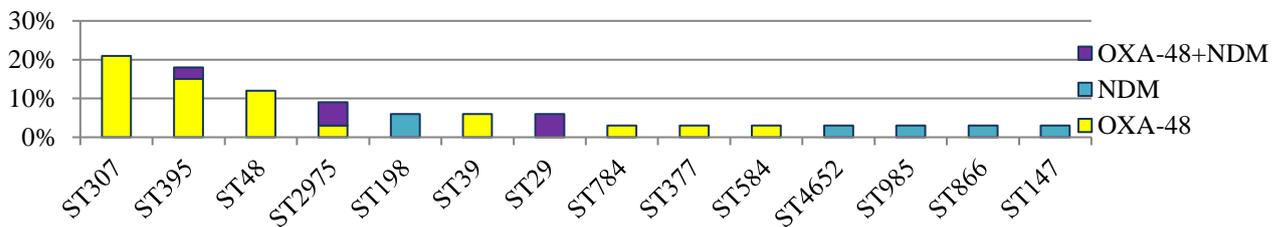


#### Примечания

- 1 – Розовый цвет – изоляты, резистентные к карбапенемам;
- 2 – Зеленый – чувствительные;
- 3 – Синий – чувствительные при повышенной экспозиции препарата;
- 4 – Секторами обозначено количество изолятов в генотипе.

Рисунок 6 – Генотиповой состав *K. pneumoniae* при бактериемии и инфекции ЦНС

Основная масса резистентных к карбапенемам изолятов принадлежала к генотипам: ST307, ST395, ST48 (Рисунок 6). Среди резистентных к колистину изолятов чаще всего встречались генотипы: ST395 (5), ST307 (5), ST2975 (3). На Рисунке 7. представлены генотипы изолятов, обладающих карбапенемазами.



#### Примечания

- 1 – Ось абсцисс – генотипы;
- 2 – Ось ординат – число изолятов.

Рисунок 6 – Распространенность карбапенемаз среди представителей различных генотипов *K. pneumoniae*

Сидерофор аэробактин (*iutA*) в 10/12 случаев определялся у представителей ST307 ( $p < 0,05$ ). Гипермукоидный гипервирулентный капсульный K2 серотип в шести из семи случаев был определен у изолятов ST395 ( $p < 0,05$ ). Система утилизации  $Fe^{3+}$  *kfu* была определена у

двух штаммов с ST736 и ST4652. Представители ST307 были способны к формированию биопленок разной интенсивности: половина изолятов формировала умеренные биопленки, четыре изолята – сильные и три – слабые.

В четырех случаях положительные высевы *K. pneumoniae* были получены из образцов ликвора. При этом у двух пациентов был диагноз «Менингит». Из 60 пациентов с положительной гемокультурой диагноз «Сепсис» был у 19 (32%). Летальный исход был в 16 эпизодах бактериемии. При летальных исходах бактериемии были выделены изоляты *K. pneumoniae* с высоким уровнем устойчивости к АМП: карбапенемы – 38% (n=6); колистин/фосфомицин – 50% (n=8); триметоприм/сульфаметоксазол/аминогликозиды – 81% (n=13); азтреонам – 94% (n=15); цефалоспорины/фторхинолоны – 100% (n=16).

При сравнении характеристик *K. pneumoniae*, полученных при бактериемиях с благоприятными и неблагоприятными исходами, мы выявили, что достоверно чаще МЛУ изоляты были определены у пациентов с благоприятными исходами (n=10, p=0.04318). ШЛУ изоляты в сочетании с устойчивостью к колистину чаще определялись при бактериемиях с летальными исходами (n=8, p=0.02284).

#### 4.Фенотипы, генотипы антибиотикорезистентности и вирулентности, популяционное разнообразие *P. aeruginosa* и клинические характеристики случаев инфекции кровотока и ЦНС, ассоциированных с *P. aeruginosa*

У изолятов *P. aeruginosa* были определены фенотипы резистентности. Среди изолятов *P. aeruginosa* частота выявления МБЛ VIM составила 56%. Сериновая карбапенемаза GES была определена у пяти изолятов (20%). Все ШЛУ штаммы имели карбапенемазы: VIM – 7 (28%) и GES – 4 (16%), см. (Рисунок 8).

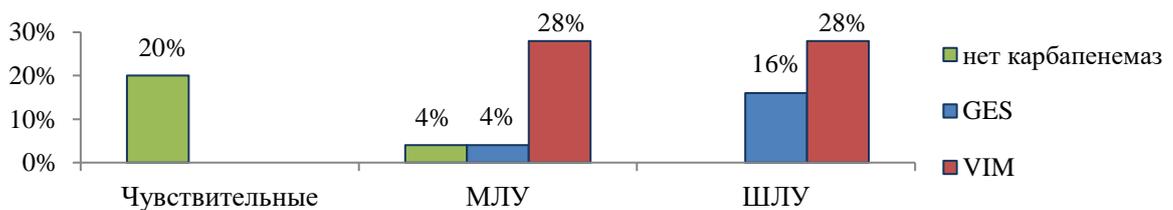


Рисунок 8 – Фенотипические группы и продукция VIM и GES у *P. aeruginosa*

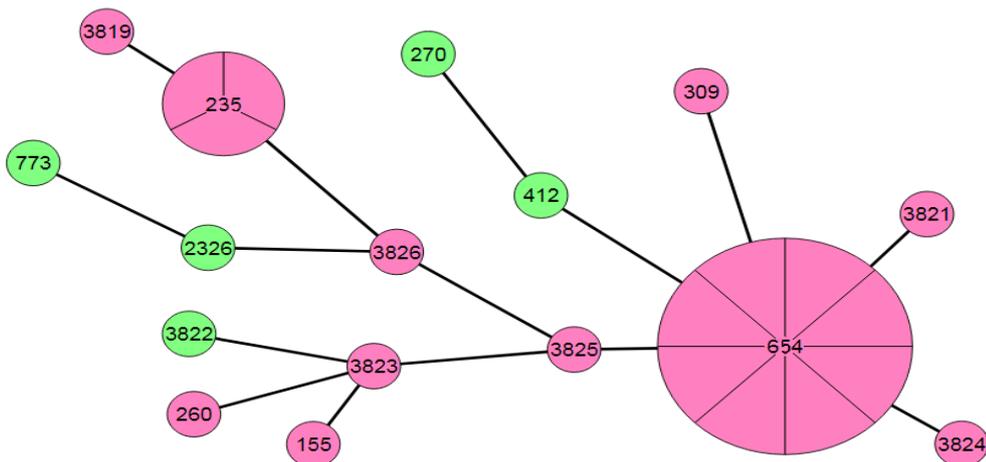
Все изоляты *P. aeruginosa* были способны к образованию биопленок на абиотической поверхности. По результатам измерения оптической плотности 12 (48%) штаммов формировали сильные биопленки, девять (36%) – умеренные и четыре (16%) – слабые. Изоляты, имеющие ген *pilA*, формировали сильные и умеренные биопленки.

Изоляты с геном *pilB* чаще формировали сильные биопленки, чем штаммы, у которых не было определено наличие этого гена. В образцах ДНК у всех 25 изолятов были обнаружены гены, кодирующие эластазу (*lasB*), фосфолипазу С (*plcH*) и щелочную протеазу

(алкалинпротеазу, *aprA*). Гены, регулирующие синтез альгината (*algD*) и пиоцианина (*phzM*), были выявлены у 24 (96%) и 23 (92%) изолятов, соответственно. Определены гены, кодирующие нейраминидазу: *nan1* – у одного штамма (4%) и *nan2* – у 15 (60%) штаммов. Гены, ответственные за продукцию пилей *pilA* и *pilB*, были выявлены у 3 (12%) и 12 (48%) штаммов, соответственно. Гены эффекторы системы секреции III типа *exoS*, *exoT*, *exoU* и *exoY* были найдены у 16 (64%), 22 (88%), 8 (32%) и 23 (92%) изолятов, соответственно. Наиболее частое сочетание трех генов, а именно *exoS*, *exoT* и *exoY*, было обнаружено у 15 штаммов (60%).

Более 50% изолятов *P. aeruginosa*, формирующих сильные биопленки, были резистентны к нескольким АМП и имели МБЛ VIM. Все изоляты, имеющие ген *pilB*, были устойчивы к карбапенемам, тобрамицину, цефтазидиму, цефтазидим/авибактаму, цефтолозан/тазобактаму и ципрофлоксацину. Изоляты *exoU*<sup>+</sup> в большинстве своем были резистентны к карбапенемам, аминогликозидам, пиперациллин/тазобактаму, цефтазидиму, цефтолозан/тазобактаму и ципрофлоксацину. Значительная часть устойчивых к АМП штаммов имела ген *exoS* и ген *nan2*.

Популяционная структура изолятов *P. aeruginosa* представлена 16 различными сиквенс-типами (Рисунок 9). В структуре лидировали представители двух сиквенс-типов ST654 (32%) и ST235 (12%). Впервые были описаны семь сиквенс-типов. ST3819 – новая аллель *mutL* (однолокусный вариант ST235). Однолокусные варианты ST654: с новой аллелью *ppsA* – ST3821 и с новыми аллелями *mutL* – сиквенс-типы 3824 и 3825. Однолокусный вариант ST155 – сиквенс-тип 3823 (новая аллель *mutL*). Также впервые описаны сиквенс-типы, представленные синглтонами: 3822, 3826 (Рисунок 9).



#### Примечания

- 1 – Розовый цвет – изоляты, резистентные к карбапенемам;  
2 – Зеленый – чувствительные.

Рисунок 6.4 – Популяционная структура *P. aeruginosa*

Из 25 случаев бактериемии и инфекции ЦНС, связанных с *P. aeruginosa*, 20% (n=5) имели неблагоприятный исход. В четырех случаях летальный исход (ЛИ) наступил в течение первых суток после выявления бактериемии, у одного пациента – в отдаленном периоде (более

30 дней). В трех эпизодах бактериемия с летальным исходом (ЛИ) была ассоциирована с изолятами *P. aeruginosa* ST654, имеющими гены вирулентности *lasB*, *plcH*, *aprA*, *algD*, *phzM*, *pilB*, *exoS*, *exoT*, *exoY* и карбапенемазу VIM; у одного из них также определялся *nan2*. Один случай ЛИ сопровождался бактериемией, вызванной изолятом *P. aeruginosa* ST235 с генами: *lasB*, *plcH*, *aprA*, *algD*, *phzM*, *exoU*, *exoY* и карбапенемазой GES. В другом случае ЛИ при бактериемии выделена *P. aeruginosa* ST309 с генами: *lasB*, *plcH*, *aprA*, *algD*, *phzM*, *pilA*, *exoU*, *exoT* и карбапенемазой VIM. Все изоляты при ЛИ имели гены вирулентности *lasB*, *plcH*, *aprA*, *algD*, *phzM*.

### 5. Фенотипы и генотипы антибиотикорезистентности, биопленкообразование, популяционная структура *S. marcescens* и клинические параметры при бактериемии и инфекции ЦНС, ассоциированных с *S. marcescens*

Среди изученных изолятов было определено пять (26%) МЛУ штаммов и четыре (21%) – ШЛУ. Цефалоспориноаза CTX-M была определена у 9 (47%) изолятов. Сериновая карбапенемаза OXA-48 – у 2 (11%), МБЛ NDM – у 1 (5%) штамма. Наличие одновременно двух карбапенемаз OXA-48 и NDM определялось наиболее часто – 3 (16%). Большая часть изолятов, имеющих гены β-лактамаз, относились к МЛУ и ШЛУ фенотипам (Рисунок 10).

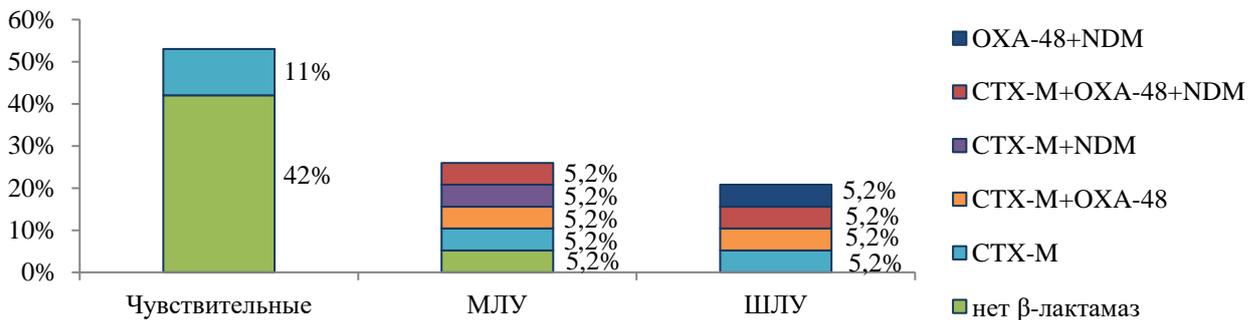
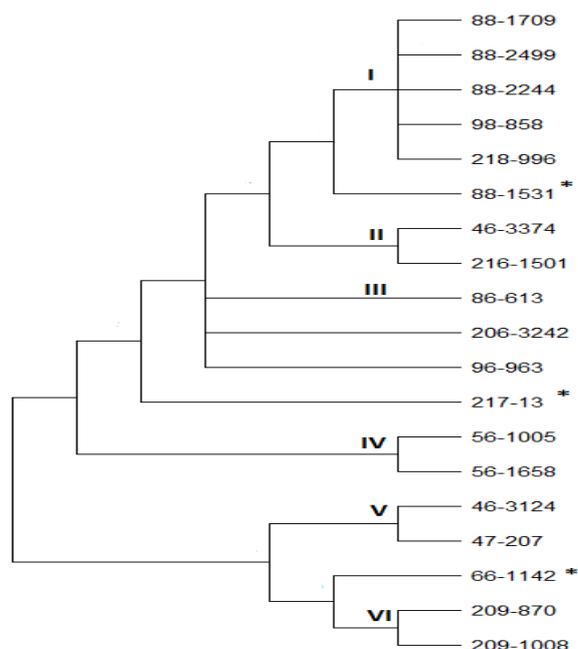


Рисунок 10 – Фенотипические группы и продукция β-лактамаз у *S. marcescens*

При изучении образования биопленок на абиотических поверхностях у изолятов *S. marcescens* было обнаружено, что 13 (68%) образуют биопленки умеренной интенсивности, шесть (32%) – слабые биопленки. При оценке интенсивности формирования биопленок у изолятов *S. marcescens*, устойчивых к АМП, было определено, что изоляты, образующие биопленки умеренной интенсивности, более чувствительны к меропенему и имипенему относительно изолятов, образующих слабые биопленки ( $p = 0,02$ ).

При изучении генотипического состава *S. marcescens*, было выявлено шесть основных генотипических групп и три отдельных изолята, не входящих ни в одну из них (Рисунок 11). Можно предположить, что изоляты, выделенные в отделении реанимации и интенсивной терапии новорожденных, представляют собой генетически однородную группу – I и отдельный изолят 88-1531\*(Рисунок 11).



Примечание –\*Отдельные изоляты, не входящие в генотипические группы.

Рисунок 11 – Популяционная структура *S. marcescens*

В трех наблюдениях у пациентов был диагностирован сепсис, один из них имел неблагоприятный исход, при котором *S. marcescens* выделялась из крови, трахеи, зева, ануса и брюшной полости. Бактериемия возникла на третьи сутки после первичного выделения из трахеи. Летальный исход наступил на 10-е сутки выявления бактериемии. *S. marcescens* в этом случае обладала множественной резистентностью и комбинацией генов резистентности, а также принадлежала к генотипической группе I.

### 6. Полногеномное секвенирование изолятов, имеющих наиболее неблагоприятные профили устойчивости к антибиотикам

Для анализа полных геномов были отобраны 7 изолятов *K. pneumoniae*, проявляющих устойчивость к большинству исследованных АМП. Все изученные изоляты были устойчивы к  $\beta$ -лактамам. В результате полногеномного секвенирования у них были найдены различные  $\beta$ -лактамазы (Таблица 1).

Таблица 1 –  $\beta$ -лактамазы *K. pneumoniae*, определенные в ходе полногеномного секвенирования

Класс $\beta$ -лактамаз	Ген	ST395 (1)	ST395 (2)	ST307	ST2975	ST985	ST29	ST866
Класс А	CTX-M-15	+		+	+	+	+	
	CTX-M-3							+
	TEM-1	+	+	+	+	+	+	+
	SHV-11	+	+	+				+
	SHV-28				+			
	SHV-187					+	+	
Класс В	NDM-1		+		+	+	+	+
Класс С	CMY-6		+		+		+	+
Класс D	OXA-1	+		+		+		
	OXA-10						+	
	OXA-48	+	+	+	+			
	OXA-244						+	

Кроме того были определены гены устойчивости к другим группам АМП (Таблица 2).

Таблица 2 – Гены резистентности *K. pneumoniae* к не β-лактамным АМП

Группа АМП	Ген	ST395(1)	ST395(2)	ST307	ST2975	ST985	ST29	ST866
Аминогликозиды	<i>armA</i>	+				+		
	<i>rmtC</i>		+		+		+	+
	<i>ant(2'')-Ia</i>	+			+	+		
	<i>strB</i>				+	+	+	
	<i>strA</i>			+	+		+	
	<i>aph(3')</i>		+	+				
	<i>aadA2</i>	+		+			+	+
	<i>aac(6')-Ib</i>	+	+	+		+	+	+
	<i>aac(3)-IIId</i>		+	+		+		+
Колистин	<i>PhoP_26Q</i>	+	+	+	+	+	+	+
Фторхинолоны	<i>ParC_80I</i>	+	+	+	+			
	<i>GyrA_83I</i>	+	+	+	+			
	<i>qnrS1</i>	+	+	+	+	+	+	
	<i>sul1</i>	+	+		+	+	+	+
Триметоприм	<i>dfrA14,17</i>	+		+	+	+	+	
	<i>dfrA1</i>	+	+					

Максимальное число генов резистентности было определено у ST395 (1) – 13. У всех изолятов обнаруживались гены устойчивости к колистину (*PhoP\_26Q*).

В геномах изолятов *K. pneumoniae* присутствовали гены, кодирующие фимбрии I типа (*fimA – fimK*), фимбрии III типа (*mrkA – mrkJ*), а также ген пилей IV типа (*pilW*). Также все изоляты имели ген сидерофора иерсиниабактина: *ybt10*, *ybt14*, *ybt16* и *ybt18*. У изолята ST395 (1) был выявлен наиболее высокий уровень вирулентности, что выражалось наличием гена, кодирующего сидерофор аэробактин (*iuc*), и гена *peg-344*, ответственного за пермеазу транспортера лекарственных препаратов и метаболитов.

## ВЫВОДЫ

1. В спектре микроорганизмов, выделенных из крови и ликвора у детей, среди грамотрицательных бактерий преобладали *K. pneumoniae* 9,6% и *P. aeruginosa* – 3,6%.
2. Большинство изученных изолятов бактерий показали высокий уровень резистентности к антибиотикам различных групп, в том числе к карбапенемам и полимиксинам. При этом преобладали штаммы с фенотипами множественной и широкой лекарственной устойчивости. Широкая лекарственная устойчивость сочеталась с устойчивостью к колистину у 25% изолятов *K. pneumoniae*. Среди *A. baumannii* было определено 24% колистин-резистентных изолятов.
3. Популяционная структура изолятов *A. baumannii* включала 9 сиквенс-типов (ST). Продуцентами карбапенемаз группы OXA-40 были представители ST944<sup>Oxf</sup>, ST1104<sup>Oxf</sup>, ST1550<sup>Oxf</sup>, ST450<sup>Oxf</sup>, а группы OXA-23 – ST1102<sup>Oxf</sup> и ST2063<sup>Oxf</sup>. Среди изолятов *K. pneumoniae* было обнаружено 27 сиквенс-типов. Наиболее часто встречающимися были: ST307, ST395. Основной детерминантой устойчивости к карбапенемам была карбапенемаза OXA-48. Популяционная структура изолятов *P. aeruginosa* представлена 16 сиквенс-типами, среди

которых лидировали ST654 и ST235. Металло-бета лактамаза VIM была определена у 56%. При изучении генотипического состава *S. marcescens* было выявлено 6 основных генотипических групп. Наиболее часто определялось сочетание двух карбапенемаз OXA-48 и NDM.

4. Все изоляты *A. baumannii* имели гены вирулентности *bfmR*, *bar* и *katE*. Ген *ompA* был обнаружен у 94%. Все штаммы *K. pneumoniae* имели гены *entB* и *mrkD*, ген *ybtS* – 78%, аэробактин *iutA* – у 18%. Капсульный серотип K2 определен у 10%. Все изоляты *P. aeruginosa* имели гены *lasB*, *plcH* и *aprA*. Гены *exoS* и *exoU* были определены у 64% и 32%. Гены *nan2* и *pilB* были выявлены у 60% и 48% штаммов. Изоляты *K. pneumoniae iutA+* в 75% проявляли устойчивость к пяти и более антибиотикам. Изоляты K2 серотипа в 80% были резистентны к восьми антимикробным препаратам. Изоляты *P. aeruginosa exoU+* в основном проявляли широкую лекарственную устойчивость. Значительная часть лекарственно-устойчивых штаммов имела гены *exoS* и *nan2*.

5. Изоляты *A. baumannii* формировали преимущественно биопленки слабой интенсивности, *P. aeruginosa* – сильной, *K. pneumoniae* и *S. marcescens* – умеренной. МПК меропенема для биопленочных форм *A. baumannii* значимо выше, чем МПК меропенема для планктонных форм ( $p < 0,05$ ). Значительная часть изолятов *A. baumannii* с умеренными биопленками были устойчивы к аминогликозидам и фторхинолонам. Более 50% изолятов *K. pneumoniae*, формирующих биопленки сильной и умеренной интенсивности, обладали широкой лекарственной устойчивостью. Изоляты *S. marcescens*, образующие умеренные биопленки, были устойчивы к аминогликозидам и защищенным цефалоспорином.

6. Летальный исход при инфекциях кровотока и ЦНС, ассоциированных с *A. baumannii* и *K. pneumoniae*, был констатирован в 24% и 25% случаев, соответственно; при инфекциях, связанных с *P. aeruginosa*, – 20% и 1 случай при *S. marcescens*-инфекции.

## ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. В целях обеспечения своевременной и адекватной антибактериальной терапии рекомендуется регулярное проведение мониторинга распространения микроорганизмов и определение устойчивости к различным АМП для наиболее распространенных патогенов.

2. Для выявления детерминант резистентности к карбапенемам у грамотрицательных изолятов бактерий, выделенных из образцов крови и ликвора, рекомендовано использование ПЦР.

3. Проведение мультилокусного сиквенс-типирования и сиквенсового анализа рекомендуется для анализа распространения генотипов, ассоциированных с генами резистентности и гипервирулентности.

4. В качестве маркера устойчивости *K. pneumoniae* к колистину может использоваться ген PhoP<sub>26Q</sub>.

### СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Молекулярно-генетическая характеристика вирулентных свойств штаммов *Klebsiella pneumoniae*, выделенных из крови и ликвора у детей / **З.З. Садеева**, И.Е. Новикова, О.В. Карасева, М.С. Мелков, А.В. Лазарева // Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. – 2021. – Т. 23. – № S1. – С. 37.
2. Characteristics of antibiotic resistance of *Klebsiella pneumoniae* strains isolated from blood and cerebrospinal fluid of children / **Z. Sadeeva**, I. Novikova, N. Alyabyeva, [et al.] // Materials of 31st European Congress of Clinical Microbiology & Infectious Diseases. – 2021.
3. Эпидемиология и молекулярно-генетическая характеристика *Pseudomonas aeruginosa* и *Acinetobacter baumannii*, выделенных из крови и ликвора у детей / **З.З. Садеева**, Т.М. Комягина, Н.М. Алябьева, И.Е. Новикова, Р.А. Шакирзянова, А.В. Лазарева, М.Г. Вершинина. – Текст : непосредственный // 3-й Российский микробиологический конгресс (2021). Материалы конгресса. – Псков: Псковский государственный университет, 2021. – С.116-117.
4. Характеристика карбапенемаз грамотрицательных микроорганизмов, выделенных из крови и ликвора у детей в ОРИТ / **З.З. Садеева**, И.Е. Новикова, А.С. Тряпочкина, Р.А. Шакирзянова, Н.М. Алябьева, А.В. Лазарева, М.Г. Вершинина. – Текст : непосредственный // Контроль и профилактика инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи (ИСМП-2021). Сборник тезисов IX конгресса с международным участием. – Москва: ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, 2021. – С. 96.
5. Клинико-микробиологическая характеристика бактериемии у детей, вызванной *Pseudomonas aeruginosa* и *Acinetobacter baumannii* / **З.З. Садеева**, И.Е. Новикова, Т.М. Комягина, Н.М. Алябьева, Р.А. Шакирзянова, А.В. Лазарева, М.Г. Вершинина // Российский педиатрический журнал. – 2021. – Т. 24. – № S. – С. 54.
6. Molecular genetic characteristics of *K. pneumoniae* strains isolated from different sites of the same patients in the intensive care unit / I. Novikova, N. Alyabieva, **Z. Sadeeva**, [et al.] // Materials of 32nd European Congress of Clinical Microbiology & Infectious Diseases. – Lisbon, Portugal. – 2022.
7. Распространённость генов резистентности у штаммов *Klebsiella pneumoniae*, выделенных из крови и ликвора у детей / **З.З. Садеева**, И.Е. Новикова, Н.М. Алябьева, А.В. Лазарева. – Текст : непосредственный // Молекулярная диагностика и биобезопасность-2022. Сборник

- материалов конгресса с международным участием. – Москва: ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, 2022. – С. 181.
8. Образование биопленок, фенотипическая и генотипическая характеристика *Pseudomonas aeruginosa* и *Acinetobacter baumannii*, выделенных из крови и ликвора у детей в отделениях реанимации / **З.З. Садеева**, И.Е. Новикова, Н.М. Алябьева, А.В. Лазарева // Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. – 2022. – Т. 24. – № S1. – С. 32-33.
  9. Характеристика *Pseudomonas aeruginosa*, выделенных из положительных проб гемокультур и ликвора у детей / **З.З. Садеева**, И.Е. Новикова, Н.М. Алябьева, А.В. Лазарева, О.В. Карасева, А.П. Фисенко // **Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии.** – 2022. – Т. 99, № 3. – С. 309-321. [Scopus].
  10. Молекулярно-генетическая характеристика штаммов *Serratia marcescens*, выделенных из крови и ликвора у детей в отделениях реанимации / **З.З. Садеева**, И.Е. Новикова, Н.М. Алябьева, А.В. Лазарева, М.Г. Вершинина. – Текст : непосредственный // Материалы научно-практических конференций в рамках VIII Российского конгресса лабораторной медицины (РКЛМ 2022). Сборник тезисов. – Москва: У Никитских ворот, 2022. – С. 77-78.
  11. Чувствительность *Acinetobacter baumannii* к антимикробным препаратам в планктонной форме и в составе биоплёнок / **З.З. Садеева**, Н.М. Алябьева, И.Е. Новикова, А.С. Тряпочкина, А.В. Лазарева. – Текст : непосредственный // Контроль и профилактика инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи (ИСМП-2022). Сборник тезисов X Конгресса с международным участием. – Москва: Федеральное бюджетное учреждение науки "Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии" Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, 2022. – С. 93-94.
  12. *Pseudomonas aeruginosa*: колонизация и оценка клинических исходов при бактериемии / **З.З. Садеева**, И.Е. Новикова, А.С. Тряпочкина, Н.М. Алябьева // Российский педиатрический журнал. – 2022. – Т. 25. – № 6. – С. 432.
  13. *Klebsiella pneumoniae* из крови и ликвора у детей: молекулярно-генетическая характеристика резистентности, вирулентности и генотипического состава штаммов / **З.З. Садеева**, И.Е. Новикова, Н.М. Алябьева, О.А. Крыжановская, А.В. Лазарева, М.Г. Вершинина. – Текст : непосредственный // Научно-практические лабораторные технологии для клинической медицины. Материалы XXVIII Всероссийской научно-практической конференции с международным участием. – Москва: Блок-Принт, 2023. – С. 165-166.
  14. *Acinetobacter baumannii* при инфекциях кровотока и центральной нервной системы у детей в отделениях реанимации и интенсивной терапии: молекулярно-генетическая характеристика и клиническая значимость / **З.З. Садеева**, И.Е. Новикова, Н.М. Алябьева, А.В. Лазарева,

- Т.М. Комягина, О.В. Карасева, М.Г. Вершинина, А.П. Фисенко // **Инфекция и иммунитет.** – 2023. – Т. 13, № 2. – С. 289-301. [**Web of Science, Scopus**].
15. Характеристика и свойства *Serratia marcescens*, выделенной при бактериемии у детей / **З.З. Садеева**, И.Е. Новикова, Н.М. Алябьева, А.В. Лазарева, Е.А. Самойлова, О.В. Карасева, О.Г. Янушкина, М.Г. Вершинина, А.П. Фисенко // **Российский педиатрический журнал.** – 2023. – Т. 26, № 2. – С. 118-124.
16. Факторы вирулентности и устойчивость к антибиотикам *Pseudomonas aeruginosa*, выделенной из крови и ликвора у детей в отделениях реанимации / **З.З. Садеева**, И.Е. Новикова, Е.А. Самойлова, Н.М. Алябьева, А.В. Лазарева // **Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия.** – 2023. – Т. 25. – № S1. – С. 50.
17. *Serratia marcescens*: микробиологическая характеристика, резистентные свойства, вирулентность и клиническая значимость / **З.З. Садеева**, И.Е. Новикова, Н.М. Алябьева, А.В. Лазарева // **Российский педиатрический журнал.** – 2023. – Т. 26, № 3. – С. 222-226.
18. Характеристика *Klebsiella pneumoniae*, выделенных из крови и ликвора у детей / **З.З. Садеева**, И.Е. Новикова, Е.А. Самойлова, Н.М. Алябьева, А.В. Лазарева. – Текст : непосредственный // 4-й Российский микробиологический конгресс. 24-29 сентября 2023. – Томск: ТГУ, 2023. – С. 210.
19. *K. pneumoniae* при бактериемии и инфекции ЦНС: колонизация и оценка клинических исходов / **З.З. Садеева**, И.Е. Новикова, Н.М. Алябьева, А.В. Лазарева, М.Г. Вершинина. – Текст : непосредственный // **Материалы научно-практических конференций в рамках IX Российского конгресса лабораторной медицины (РКЛМ 2023).** Сборник тезисов. – Москва: Общество с ограниченной ответственностью "Издательско-полиграфическое объединение "У Никитских ворот", 2023. – С. 93-94.
20. Бактериемии и инфекции ЦНС у детей, ассоциированные с *Klebsiella pneumoniae*: молекулярно-генетическая характеристика и клинические особенности / **З.З. Садеева**, И.Е. Новикова, А.В. Лазарева, Н.М. Алябьева, О.В. Карасева, О.Г. Янушкина, М.Г. Вершинина, А.П. Фисенко // **Инфекция и иммунитет.** – 2023. – Т. 13, № 6. – С. 1117-1128. [**Web of Science, Scopus**].
21. Геномные особенности резистентных изолятов *Klebsiella pneumoniae*, выделенных из кровяного русла и ликвора пациентов детского стационара / О.Л. Воронина, М.С. Кунда, Н.Н. Рыжова, Е.И. Аксенова, **З.З. Садеева**, И.Е. Новикова, А.В. Лазарева, О.В. Карасева, А.П. Фисенко, А.Л. Гинцбург // **Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии.** – 2023. – Т. 100, № 6. – С. 399-409. [**Scopus**].

**СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ**

АМП – антимикробный препарат

ВОЗ – всемирная организация здравоохранения

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота

КНС – коагулазо-негативный стафилокок

ЛИ – летальный исход

МБЛ – металло-β-лактамаза

МВ – муковисцидоз

МЛСА – мультилокусный сиквенсовый анализ

МЛСТ – мультилокусное сиквенс-типирование

МЛУ – множественная лекарственная устойчивость

МПК – минимальная подавляющая концентрация

НГОб – неферментирующая грамотрицательная бактерия

ОРИТ – отделение реанимации и интенсивной терапии

ПЦР – полимеразная цепная реакция

ЦНС – центральная нервная система

ШЛУ – широкая лекарственная устойчивость

ВНВ – brain heart broth, сердечно-мозговой бульон

COL – colistin, колистин

ICL – international clonal lineage, международная клональная линия

ST – sequence type, сиквенс-тип

VFDB – virulence factor database, база данных факторов вирулентности