

Ворошилова Татьяна Михайловна

**КЛИНИКО-ЛАБОРАТОРНАЯ ОЦЕНКА  
ВЛИЯНИЯ БИСФОСФОНАТОВ И АНТИСЕПТИКА НА РЕЗИСТЕНТНОСТЬ  
ГРАМОТРИЦАТЕЛЬНЫХ БАКТЕРИЙ К КАРБАПЕНЕМАМ**

14.03.10 – клиническая лабораторная диагностика

03.02.03 – микробиология

Автореферат

диссертации на соискание ученой степени

кандидата медицинских наук

Санкт-Петербург – 2017

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном учреждении «Всероссийский центр экстренной и радиационной медицины имени А.М. Никифорова» МЧС России

Научные руководители:

доктор медицинских наук доцент Родионов Геннадий Георгиевич

доктор биологических наук Афиногенова Анна Геннадьевна

Официальные оппоненты:

**Гайковая Лариса Борисовна** – доктор медицинских наук, доцент, заведующая кафедрой биологической и общей химии, заведующая центральной клинико-диагностической лабораторией ФГБОУ ВО «Северо-Западный государственный медицинского университет имени И.И.Мечникова» Министерства здравоохранения Российской Федерации

**Чеботкевич Виталий Николаевич** – доктор медицинских наук, профессор, руководитель лаборатории бактериологии ФГБУ «Российский научно-исследовательский институт гематологии и трансфузиологии ФМБА России»

Ведущая организация: ФГБОУ ВО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П.Павлова» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Защита диссертации состоится «\_\_\_\_\_» \_\_\_\_\_ 2017 г. в \_\_\_\_\_ часов на заседании диссертационного совета Д. 205.001.01 на базе ФГБУ «Всероссийский центр экстренной и радиационной медицины имени А.М. Никифорова» МЧС России по адресу: 194044, Санкт-Петербург, ул.Академика Лебедева, д.4/2

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГБУ «Всероссийский центр экстренной и радиационной медицины имени А.М. Никифорова» МЧС России по адресу: 197374, Санкт-Петербург, ул. Оптиков, д.54 и на сайте: [www.arcerm.spb.ru](http://www.arcerm.spb.ru)

Автореферат разослан «\_\_\_\_\_» \_\_\_\_\_ 2017 года

Ученый секретарь  
диссертационного совета  
кандидат медицинских наук

Санников М.В.

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

### Актуальность темы

В настоящее время серьезной проблемой здравоохранения всех стран мира являются нозокомиальные инфекции (НИ), или инфекционные осложнения, связанные с оказанием медицинской помощи (Б.Р.Гельфанд и др. 2013; ВОЗ, 2013; М.Н.Агибалова и др., 2015). Частота их возникновения, летальность от них и стоимость лечения продолжают расти. У пациентов с нозокомиальными инфекциями отмечено быстрое нарастание уровня интоксикации, что подтверждается клинически и лабораторно (общий клинический и биохимический анализ крови, микробиологический посев крови и другого биоматериала), а также развитие полиорганной недостаточности, которые приводят к инвалидизации, а нередко и к смерти пациентов. (Icardi M. et al., 2009; Хирургические инфекции под ред. Ерюхина Е.А., Шляпников С.А. с соавт., 2015). Антимикробная терапия таких инфекций стандартными схемами оказывается неэффективной ввиду высокой резистентности возбудителей. Критериями оценки достаточности антибактериального лечения могут быть нормализация температуры, а также положительная динамика клинико-лабораторных показателей (снижение лейкоцитоза, улучшение лейкоцитарной формулы, нормальная концентрация прокальцитонина, отсутствие системной воспалительной реакции, отрицательные посевы из очагов инфекции) (Гельфанд Б.Р., 2007; Савельев В.С. с соавт., 2011; Вельков В.В., 2015).

Одной из причин развития внутрибольничных инфекций является рост числа антибиотикорезистентных возбудителей инфекции на фоне нерационального применения антибиотиков (Мешаков Д.П., 2005; Dutton R., 2005; Родина Н.А., 2008; Самохвалов И.М., 2008; Полушин Ю.С., 2009; Шурупов Р.А., 2014; Шляпников С.А., 2015;). Всемирная организация здравоохранения (ВОЗ) в 2001 г. разработала стратегии и опубликовала рекомендации по сдерживанию антимикробной резистентности (АМР). Согласно данным по Европейскому региону НИ приводят к значительному увеличению нагрузки на экономику и здравоохранение европейских стран: число пациентов, погибших в результате резистентных бактериальных внутрибольничных инфекций, ежегодно превышает 25 тыс. человек. Помимо роста уровня заболеваемости и смертности среди пациентов следует принимать во внимание и такие факторы, как увеличение сопутствующих расходов на здравоохранение, которые ежегодно составляют более 1,5 млрд. евро. (Antimicrobial resistance surveillance in Europe 2012, 2015). Возбудителями НИ являются полирезистентные, а в ряде случаев и панрезистентные микроорганизмы, которые вызывают трудности при подборе схем лечения

пациентов, создают угрозу развития неизлечимых осложнений (Европейский стратегический план действий по проблеме устойчивости к антибиотикам 2011г., С.А.Шляпников с соавт., 2013, Гординская Н.А., 2013). Эпидемиологический надзор за НИ, включающий изучение распространенности и структуры возбудителей, исследование резистентности микробных популяций в очагах инфекции, является важным звеном в борьбе с этими инфекциями. В результате мониторинга микрофлоры лечебно-профилактических организаций, в т.ч. отделений реанимации и интенсивной терапии (ОРИТ), в странах Европы и в России были определены наиболее проблемные микроорганизмы – так называемая группа ESKAPE - это *Escherichia coli*, *ESBL(+)*, *Staphylococcus aureus MRSA*, *Klebsiella pneumoniae ESBL(+)*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, *MBL(+)*, Enterococci (VRE) (Шагинян И.А., 2005; Juan C., 2008; Canton R., 2012; Серегина Н.В., 2013; Шляпников С.А., 2013; Первухин С.А., 2014; Перьянова О.В., 2014; Gastanherira M., 2014; Biedenbach D., 2015). Долгое время наиболее эффективными антибактериальными препаратами считались карбапенемы, однако, в последние годы повсеместно в многопрофильных стационарах выявлено нарастание количества резистентных к ним грамотрицательных бактерий, от 20% до 90% среди выделенных изолятов, несмотря на то, что антибиотики этой группы все еще остаются препаратами выбора при лечении гнойно-воспалительных заболеваний любой этиологии (Гельфанд Б.Р., 2013; Шляпников С.А. с соавт., 2013; Biedenbach D. et al., 2015). Создание новых антибактериальных препаратов, способных воздействовать на панрезистентные грамотрицательные бактерии, представляет определенные трудности, связанные с большими финансовыми затратами и значительными временными промежутками, необходимыми на проведение клинических испытаний. За последнее десятилетие появилось всего несколько антибиотиков, но на микроорганизмы, продуцирующие МБЛ, они не действуют.

До сих пор не существует эффективных схем терапии инфекционных осложнений, вызванных полирезистентными грамотрицательными бактериями, продуцирующими металло-бета-лактамазы (МБЛ). Ферменты этого класса разрушают все бета-лактамы антибиотики – пенициллины, цефалоспорины, карбапенемы (Агеевец В.А. с соавт., 2015.). В настоящее время ведется интенсивный поиск эффективных ингибиторов МБЛ карбапенемрезистентных микроорганизмов (Егорова С.А. с соавт., 2013; Тренин А.С., 2015) среди препаратов, разрешенных к применению в клинике и усиливающих действие карбапенемов, что представляет собой актуальную задачу в борьбе с распространением резистентности микроорганизмов. Разработка на основании клинико-лабораторных исследований теоретической базы для оценки использования обнаруженных ингибиторов

МБЛ у пациентов является основой проводимых поисковых диагностических программ, что и послужило поводом для выполнения данного исследования.

### **Степень разработанности темы исследования**

Одним из механизмов развития резистентности к бета-лактамам антибиотикам является ферментативный гидролиз бета-лактамазами. Известно несколько классов бета-лактамаз. Особого внимания заслуживают ферменты, обуславливающие резистентность грамотрицательных бактерий к карбапенемам, относящиеся к карбапенемазам (Walsh T.R., 2005, Poirel L., 2000, 2010). Особую тревогу вызывают микроорганизмы, обладающие металло-бета-лактамазами, поскольку они способны инактивировать все бета-лактамы антибиотики, в т.ч. карбапенемы, и в последнее время стремительно распространяются во всем мире. Карбапенемы – сильнейшие из антибиотиков широкого спектра действия – оказались неэффективны для лечения инфекций, вызванных грамотрицательными бактериями, продуцирующими МБЛ. Для назначения адекватной антимикробной терапии пациентам с инфекциями, вызванными грамотрицательными бактериями, необходимо знать о наличии основного механизма резистентности, поэтому выявление МБЛ у клинических изолятов является важным диагностическим тестом.

Выбор антибиотиков для лечения инфекций, вызванных резистентными грамотрицательными бактериями, весьма ограничен. Известно, что различные антисептики повышают проницаемость клеточных мембран стафилококков и ингибируют их бета-лактамазы, а также ферменты-инактиваторы грамотрицательных бактерий, разрушающие аминокликозиды и хлорамфеникол (Афиногенов Г.Е. с соавт., 1993; Красильников А.П., 1995; Крамер 2005; Lim T.-P., 2015).

В настоящее время для лечения пациентов с нозокомиальными инфекциями используют защищенные антибиотики из класса пенициллинов (ампициллин/сульбактам, амоксициллин/клавулановая кислота, пиперациллин/тазобактам) (Поляк М.С., 2015), кроме того, применяют фосфомицин, полимиксины, а также сочетания из 2-4 антимикробных препаратов, синергидное действие которых оценивают методом «шахматной доски» (Eliopoulos G.M. & Moellering R.C., 1996; Drawz S., 2010; Paul M., 2014; Lim T.-P., 2015; Ni W., 2015; Falagas M., 2015; Bowers D.R. 2015).

В связи с возросшей частотой выделения изолятов грамотрицательных микроорганизмов, резистентных к карбапенемам, актуальным остается поиск способов усиления действия антибиотиков этого класса, например, разработка их комбинаций с препаратами – эффективными ингибиторами МБЛ. К сожалению, в настоящее время

ингибиторов МБЛ карбапенемрезистентных грамотрицательных микроорганизмов, разрешенных для применения в клинике, нет. Как правило, лечение пациентов с НИ, вызванными такими возбудителями, неэффективно традиционными схемами, и для терапии подбирают комбинации антибиотиков из 2-3, а иногда и 4-х препаратов (Тапальский Д.В., 2014, Paul M., 2014, Bowers D.R., 2015, Falagas M.E., 2015, Lim T.-P., 2015).

Поиск эффективных ингибиторов МБЛ карбапенемрезистентных грамотрицательных микроорганизмов, разрешенных к применению в клинике и усиливающих действие карбапенемов, послужил основанием для выполнения данного исследования.

### **Цель исследования**

Разработать лабораторную модельную систему для оценки влияния бисфосфонатов и антисептика на резистентность грамотрицательных бактерий к карбапенемам, а также антимикробную комбинацию для преодоления резистентности у клинических штаммов, продуцирующих металло-бета-лактамазы, и оценить ее эффективность методами клинической лабораторной диагностики.

### **Задачи исследования**

1. Провести мониторинг микрофлоры пациентов многопрофильного стационара и выявить роль грамотрицательных бактерий, резистентных к карбапенемам, в развитии инфекционно-септических осложнений у пациентов хирургического профиля.

2. На основе метода «шахматной доски» создать экспериментальную лабораторную модельную систему для поиска перспективных ингибиторов металло-бета-лактамаз грамотрицательных бактерий среди известных лекарственных препаратов в присутствии стандартного реактива фермента металло-бета-лактамазы *P. aeruginosa*, экспрессированной в *E.coli*, *in vitro*, и изучить возможность бисфосфонатов (клодроновой и этидроновой кислот) ингибировать стандартный реактив металло-бета-лактамазы.

3. В созданной лабораторной модельной системе оценить ингибирующий эффект бисфосфонатов в отношении металло-бета-лактамаз клинических изолятов грамотрицательных бактерий, выделенных от пациентов с инфекционно-септическими осложнениями, а также оценить бактерицидную активность антисептика из группы полигексанидов в отношении таких микроорганизмов, и его способность усиливать действие карбапенемов в небактерицидных концентрациях.

4. Разработать антимикробную комбинацию бисфосфонатов, полигексанида и карбапенемов для местного и системного применения для лечения пациентов с инфекционными осложнениями, вызванными грамотрицательными бактериями, продуцирующими металло-бета-лактамазы.

5. Методами клинической лабораторной диагностики (гематологическими, биохимическими, иммунологическими, микробиологическими) оценить эффективность разработанной антимикробной комбинации при лечении пациентов с инфекционно-септическими осложнениями, вызванными грамотрицательными микроорганизмами, продуцирующими металло-бета-лактамазы.

#### **Научная новизна исследования**

Создана экспериментальная лабораторная модельная система на основе «шахматной доски» для поиска ингибиторов металло-бета-лактамазы грамотрицательных бактерий среди известных лекарственных средств.

Впервые модифицированным методом «шахматной доски» выявлено повышение уровня минимальных подавляющих концентраций (МПК) карбапенемов в отношении ранее чувствительных к ним тест-штаммов грамотрицательных бактерий в зависимости от дозы фермента металло-бета-лактамазы *P. aeruginosa*, экспрессированной в *E.coli* и показана способность бисфосфонатов ингибировать стандартный реактив фермента металло-бета-лактамазы.

Впервые модифицированный метод «шахматной доски» использован для выявления синергидного и бактерицидного эффекта сочетания антибиотика и бисфосфонатов – ингибиторов металло-бета-лактамазы клинических штаммов грамотрицательных бактерий.

Впервые разработана антимикробная комбинация карбапенемов, бисфосфонатов и антисептика из группы полигексанидов для местного и системного применения.

Методы клинической лабораторной диагностики (гематологические, биохимические, иммунологические, микробиологические) подтвердили эффективность разработанной комбинации при использовании у пациентов с инфекционно-септическими осложнениями, вызванными полирезистентными грамотрицательными бактериями.

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

С помощью созданной лабораторной модельной системы с использованием модификации метода «шахматной доски» доказана возможность воспроизведения «резистентности» грамотрицательных бактерий к карбапенемам.

Разработанная лабораторная модельная система позволяет оценить эффективность перспективных ингибиторов МБЛ при тестировании стандартного реактива фермента, что совпадает с данными при использовании клинических карбапенемрезистентных изолятов грамотрицательных бактерий, продуцирующих МБЛ.

Предложенная комбинация карбапенемов, бисфосфонатов и антисептика позволит клиницистам рационально использовать антимикробные препараты с соответствующим механизмом действия.

Создана лабораторная модельная система для поиска эффективных ингибиторов металло-бета-лактамазы среди известных лекарственных средств.

Данная система эффективна при оценке синергидного действия сочетанного использования антибиотика и бисфосфонатов – ингибиторов МБЛ грамотрицательных бактерий.

Метод оценки зависимости «время – летальное действие» дает возможность выявить бактерицидное действие сочетанного использования антибиотика и бисфосфоната – ингибитора МБЛ грамотрицательных бактерий при различных экспозициях (через 4-8-12-24 часа).

Созданная антимикробная композиция карбапенемов, бисфосфонатов и антисептика усиливает действие антибиотиков в отношении резистентных грамотрицательных бактерий, что повышает эффективность антимикробной терапии пациентов с инфекционно-септическими осложнениями.

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

1. Экспериментальная лабораторная модельная система на основе модифицированного метода «шахматной доски» позволяет тестировать потенциальные ингибиторы МБЛ грамотрицательных бактерий в присутствии стандартного реактива фермента металло-бета-лактамазы *P. aeruginosa*, экспрессированной в *E.coli*, in vitro.

2. Антимикробная комбинация карбапенемов, бисфосфонатов и антисептика из класса полигексанидов эффективна в отношении устойчивых к этим антибиотикам клинических изолятов грамотрицательных бактерий, продуцирующих металло-бета-лактамазы, выделенных у пациентов с инфекционно-септическими осложнениями.

3. Комплекс методов клинической лабораторной диагностики для мониторинга эффективности антимикробной комбинации, используемой для лечения пациентов с инфекционно-септическими осложнениями, должен включать определение следующих показателей: СОЭ, общее количество лейкоцитов, билирубин, креатинин, АСТ, АЛТ, прокальцитонин, уровень экспрессии CD64 на нейтрофилах периферической крови, посев крови и другого биологического материала пациента по показателю колониеобразующих единиц (КОЕ).

### **Методология и методы исследования**

В работе использованы методы научного познания: аналитический, статистический, современные методы клинической лабораторной диагностики (гематологический, биохимический, молекулярно-генетический, иммунологический, микробиологический).

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

Достоверность и обоснованность полученных результатов научной работы обеспечена детальным теоретическим анализом проблемы, достаточным количеством проведенных лабораторных исследований и репрезентативным объемом изученного биологического материала пациентов, адекватным статистическим анализом полученных данных, которые были сопоставимы с поставленными задачами.

Результаты работы представлены и обсуждены на XVI Международном конгрессе МАКМАХ (Москва, 2014), Российско-Китайской научно-практической конференции «Кашкинские чтения» (Санкт-Петербург, 2014, 2015, 2016), Международном научном форуме «Многопрофильная клиника XXI века. Экстремальная медицина» (Санкт-Петербург, 2015), на заседании отделения ВНПОЭМП в Санкт-Петербурге и Ленинградской области (ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, 2016).

Организация и проведение диссертационного исследования одобрены независимым этическим комитетом ФГБУ ВЦЭРМ им. А.М. Никифорова МЧС России (Протокол №10 от 26.11.13 г.).

Результаты диссертационной работы внедрены и реализованы в клинике ФГБУ ВЦЭРМ им. А.М. Никифорова МЧС России, ФГБУ Российский научный центр радиологии и хирургических технологий МЗ РФ (акт внедрения от 22.08.16г.).

### **Личный вклад автора**

Автором лично проведено планирование и организация микробиологических анализов биоматериала в клинике ВЦЭРМ им. А.М. Никифорова, выполнены исследования по идентификации и изучению чувствительности выделенных микроорганизмов, а также выявлен основной механизм резистентности у карбапенемустойчивых грамотрицательных бактерий (наличие МБЛ) фенотипическими методами. Автор провела анализ сформированных баз данных бактериологических исследований клиники для мониторинга ведущей микробиоты в соответствии с компьютерной программой qMS. Лично автором предложена и апробирована модификация метода «шахматной доски» и метода оценки зависимости «время – летальное действие» для определения эффективности ингибиторов МБЛ, разрешенных к применению в клинической практике. На основании анализа микробиологических и клинико-лабораторных показателей пациентов сделано заключение

об эффективности и обоснование перспективности применения разработанной антимикробной комбинации карбапенемов, бисфосфонатов и антисептика полигексанида для лечения больных с гнойно-септическими осложнениями. Автором проведен сбор, обобщение, статистическая обработка полученных результатов, написание и оформление диссертации.

### **Публикации результатов исследования**

По материалам диссертации опубликовано 24 печатных работы, в том числе 7 статей в рецензируемых научных изданиях и журналах. Зарегистрирована Заявка № 2015133469 от 10.08.2015 на выдачу патента РФ на изобретение «Антимикробная комбинация сочетанного применения карбапенемов и бисфосфонатов в отношении устойчивых к карбапенемам грамотрицательных микроорганизмов».

### **Объем и структура диссертации**

Диссертация изложена на 144 страницах текста и состоит из введения, обзора литературы, главы материалов и методов исследования, результатов собственных исследований и их обсуждения, заключения, выводов, практических рекомендаций и списка литературы, включающего 206 источника, из них 112 отечественных и 94 зарубежных. Работа содержит 39 таблиц, 25 рисунков.

## **ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ**

### **Материалы и методы исследования**

Работа выполнена на базе отдела лабораторной диагностики ФГБУ ВЦЭРМ им. А.М. Никифорова МЧС России в период с 2012 по 2015гг.

Материалом для проведения настоящего исследования послужили изоляты грамотрицательных бактерий, резистентных к карбапенемам за счет продукции МБЛ, выделенных от пациентов с инфекционными осложнениями.

Сбор биоматериала от пациентов хирургического профиля клиники ВЦЭРМ им. А.М. Никифорова МЧС России проводили в соответствии с МУ 4.2.2039-05. Было обследовано 3 485 пациентов. Нами отобраны 549 штаммов полирезистентных грамотрицательных бактерий, выделенных от пациентов с нозокомиальной пневмонией, инфицированными ранами и ожогами, сепсисом. Микроорганизмы представлены следующими видами: *A. baumannii* – 190 штаммов, *P. aeruginosa* – 334 штамма, *K. pneumoniae* – 25 штаммов.

Посев биологического материала, идентификацию микроорганизмов и оценку их чувствительности к антимикробным препаратам проводили стандартными методами в соответствии с действующей документацией (МУК 4.2.1890-04, Приказ МЗ СССР №535 от 22.04.1985). Использовали бактериологические анализаторы БактАлерт (флаконы

ВасТ/ALERT FA Plus, FN Plus, PF Plus) и VITEK2 (карты VITEK2 GN,GP, VITEK2 AST-N102) фирмы Биомерье, Франция.

Уровни резистентности антимикробных препаратов оценивали Е-тестом (Биомерье, Франция), М.І.С.Е-полосками (Оксоид, Великобритания), методом серийных разведений. Интерпретацию результатов тестирования проводили согласно критериям EUCAST-2012-2016 (The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing). Для выявления МБЛ фенотипическим методом использовали Е-тесты имипенем/имипенем+ЭДТА фирмы Биомерье, Франция.

Методом ПЦР с гибридизационно-флуоресцентной детекцией продуктов амплификации в режиме «реального времени» на приборах Rotor-Gene 6000 (Corbett Research, Австралия) и CFX96 (Bio-Rad, США) определяли генотипы 176 культур из всех выделенных изолятов (наборы реагентов предоставлены ФГБУ ЦНИИЭ Роспотребнадзора).

Тестировали антибиотики меропенем (AstraZeneca, Великобритания), тиенам /имипенем+циластин/ (Мерк Шарп и Доум Б.В., Нидерланды) для внутривенных введений, а также субстанции имипенема и меропенема (Sigma, США). Использовали стандартный реактив – фермент карбапенемазу (металло-бета-лактамазу) *P. aeruginosa*, рекомбинантную, экспрессированную в *E. coli* (Sigma, США).

Для оценки уровня МПК карбапенемов в присутствии стандартного реактива МБЛ использовали чувствительные к этому классу антибиотиков референс-штаммы *P. aeruginosa* ATCC 27853, *A. baumannii* ATCC ВАА-747, *K. pneumoniae* ATCC 70603.

В работе изучали лекарственные препараты, относящиеся к бисфосфонатам и разрешенные к применению в клинической практике для внутривенного и перорального введения, – этидроновую кислоту (препарат «Ксидифон» фирмы ОАО «МОСХИМФАРМПРЕПАРАТЫ» им. Н.А.Семашко), клодроновую кислоту (препарат «Бонефос» фирмы Байер Ой, Финляндия), а также комплексон ЭДТК (Sigma, США) – этилендиаминтетрауксусная кислота (или этилендиаминотетраацетат, ЭДТА).

Препарат «Пронтосан®» из группы полигексанидов (фирмы В. Braun Medical AG, Швейцария) – антисептик местного действия для обработки раневых поверхностей кожи и слизистых.

Для титрования антибиотиков, бисфосфонатов, антисептика, а также их сочетаний использовали полистирольные иммунологические планшеты («Медполимер» Россия); каждый опыт проводили в пяти повторностях одновременно.

Фазы роста тест-культур (логарифмическую и стационарную) выявляли, проводя бихроматические измерения оптической плотности в среде Мюллера-Хинтона на ридере

ELx800 Universal Microplate Reader (фирмы Bio-Tek Instruments Inc., США) при двух длинах волн (490 нм и 630 нм) при экспозициях от 4 до 24 часов.

В работе использованы показатели клинической лабораторной диагностики пациентов, полученные в лабораториях клинической гематологии, иммунологии, биохимии на гематологическом анализаторе «LN 500» (Beckman-Coulter, США), биохимическом анализаторе «DXC 600» (Beckman-Coulter, США); определение уровня и плотности экспрессии CD64 на нейтрофилах периферической крови проводили с использованием проточного цитофлуориметра Navios (Beckman-Coulter, США).

Статистическую обработку полученных результатов исследования проводили с использованием пакетов прикладных программ «Microsoft Excel 2007», «Statistica 6.0» с применением методов параметрической и непараметрической статистики.

## **РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ**

### **Этиологическая структура инфекционно-септических осложнений у пациентов хирургического профиля**

Исследованы 8 194 образца клинического материала от 3 485 пациентов, находящихся на стационарном лечении в отделениях хирургического профиля и реанимации.

При диагностике инфекционных осложнений выявлено, что грамотрицательные бактерии в спектре ведущей микрофлоры занимали лидирующее положение – 65,7 % и отличались резистентностью к большинству известных антимикробных препаратов, стафилококки составляли 21,1 %.

На рисунке 1 представлены данные оценки количества (в процентах к общему числу выделенных микроорганизмов) резистентных штаммов грамотрицательных бактерий к основным антибиотикам представлены.

При анализе чувствительности грамотрицательных бактерий к антимикробным препаратам *in vitro* показано, что 20 % штаммов *K. pneumoniae* продуцировали карбапенемазы. Ацинетобактеры были устойчивы к карбапенемам: в 94 % случаев – к меропенему и в 90 % случаев – к имипенему. Штаммы *P. aeruginosa* были резистентны к карбапенемам: в 77,7 % случаев – к меропенему и в 78 % случаев – к имипенему, и также обладали повышенной резистентностью к остальным классам антибиотиков.

Таким образом, при выборе тактики антибиотикотерапии пациентов с инфекционными осложнениями, вызванными резистентными к карбапенемам грамотрицательными бактериями, продуцирующими МБЛ, следует учитывать, что стандартные схемы применения антимикробных препаратов могут быть неэффективны.

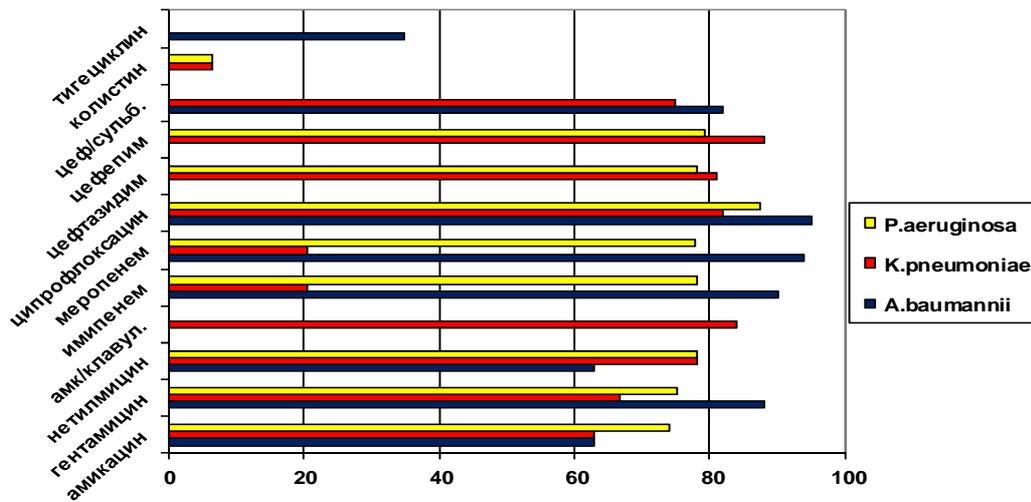


Рис. 1. Результаты оценки количества резистентных штаммов грамотрицательных бактерий к основным антибиотикам (в %).

Выявление металло-бета-лактамазы у грамотрицательных бактерий фенотипическим и генотипическим методами.

Фенотипическим методом E-тестов выявили наличие МБЛ у выделенных клинических изолятов грамотрицательных бактерий. В результате генотипирования 176 выделенных клинических штаммов грамотрицательных бактерий выявлены следующие генотипы: VIM – 19 штаммов *P. aeruginosa*, NDM – 17 штаммов *K. pneumoniae*, OXA-48 – 8 штаммов *K. pneumoniae*, OXA-40 – 32 штамма *A. baumannii*, OXA-23 – 19 штаммов *A. baumannii*. Все микроорганизмы отличались высоким уровнем резистентности к карбапенемам, МПК составили от 16 мкг/мл до 512 мкг/мл.

#### **Оценка возможности бисфосфонатов (клодроновой и этидроновой кислот) ингибировать стандартный реактив фермента металло-бета-лактамазы *P.aeruginosa* in vitro**

Задачей исследования явилось получение антимикробных комбинаций карбапенемов и бисфосфонатов, эффективность которых оценивают количественно в отношении высоких доз стандартного реактива МБЛ, а также в отношении ранее чувствительных к карбапенемам штаммов грамотрицательных микроорганизмов при моделировании приобретения ими различных уровней резистентности к карбапенемам.

Для оценки повышения уровня МПК карбапенемов в отношении чувствительных к ним грамотрицательных бактерий в зависимости от дозы стандартного реактива фермента МБЛ нами создана лабораторная модельная система с использованием модификации метода

«шахматной доски» в микроразведениях. Имипенем или меропенем разводили стандартным титрованием в бульоне Мюллера-Хинтона в концентрациях от 512 мкг/мл до 2 мкг/мл.

В опыты брали реактив МБЛ в объеме 5 мкл с дозой 0,56 единиц активности, из которой на среде Мюллера-Хинтона раститровывали фермент до дозы 0,0022 ед. акт.

Исходная микробная нагрузка референс-штаммов *P. aeruginosa* ATCC 27853, *A. baumannii* ATCC ВАА-747, *K. pneumoniae* ATCC 70603 составила  $5 \times 10^6$  КОЕ в 1 мл; конечная микробная нагрузка соответствующего тест-штамма составила  $5 \times 10^4$  КОЕ в 200 мкл.

В таблице 1 представлены результаты инактивации меропенема в присутствии реактива МБЛ в отношении *P. aeruginosa* ATCC 27853. Фермент в рядах 1-3 полностью инактивировал антибиотик, при этом наблюдали рост тест-штамма. Начиная с 4-го ряда, интенсивность инактивации антибиотика ферментом снижалась, и в 8-ом ряду отмечали отсутствие роста тест-культуры до уровня референтного значения чувствительности по EUCAST-2012-2016. Эти показатели были одинаковые в пяти повторностях опыта.

Таблица 1. Показатели инактивации меропенема в присутствии разных доз стандартного реактива фермента МБЛ в отношении тест-культуры *P. aeruginosa* ATCC 27853

№ ряда	Количество фермента МБЛ, ед. акт. в ячейке	Количество меропенема, мкг/мл									
		512	256	128	64	32	16	8	4	2	1
		Наличие роста тест-культуры *, экспозиция 24 часа при 37 <sup>0</sup> С									
0	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1	0,28	Р	Р	Р	Р	Р	Р	Р	Р	Р	Р
2	0,14	Р	Р	Р	Р	Р	Р	Р	Р	Р	Р
3	0,07	Р	Р	Р	Р	Р	Р	Р	Р	Р	Р
4	0,035	-	-	Р	Р	Р	Р	Р	Р	Р	Р
5	0,0175	-	-	-	Р	Р	Р	Р	Р	Р	Р
6	0,0088	-	-	-	-	Р	Р	Р	Р	Р	Р
7	0,0044	-	-	-	-	-	-	Р	Р	Р	Р
8	0,0022	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Р
		А	Б	В	Г	Д	Е	Ж	З	И	К

Примечание: \* «Р» – рост чувствительной к меропенему тест-культуры *P. aeruginosa* ATCC 27853; «-» – отсутствие роста.

Результаты исследования показали возможность моделирования повышения МПК карбапенемов в отношении ранее чувствительных к ним штаммов грамотрицательных микроорганизмов в зависимости «доза-эффект» в присутствии разных концентраций реактива фермента МБЛ.

Разработанную лабораторную модельную систему применяли для оценки эффективности сочетанного применения карбапенема и потенциального ингибитора МБЛ из группы бисфосфонатов. Использовали дозу реактива фермента МБЛ 0,28 ед. акт., которая

инактивирует максимальную концентрацию меропенема 512 мкг/мл и имипенема 64-128 мкг/мл.

В таблице 2 представлены результаты ингибирования реактива фермента МБЛ клодроновой кислотой в комбинации с меропенемом в отношении *P.aeruginosa* ATCC 27853. В 1-ом ряду в ячейках, где отсутствовал бисфосфонат, выявляли рост тест-штамма за счет инактивации антибиотика ферментом МБЛ. Начиная со 2-го ряда (с содержанием бисфосфоната 469 мкг/мл) и далее наблюдали отсутствие роста тест-штамма в тех ячейках, где выявлен эффект ингибирования МБЛ бисфосфонатом до 8 ряда, в ячейках которого отмечено восстановление действия меропенема до уровня референтного значения чувствительности тест-штамма. Эти показатели были одинаковые в 5 повторностях опыта.

Таблица 2. Результаты ингибирования МБЛ клодроновой кислотой в комбинации с меропенемом в отношении тест-культуры *P. aeruginosa* ATCC 27853

№ ряда	Количество клодроновой кислоты, мкг/мл	Количество меропенема, мкг/мл									
		0	512	256	128	64	32	16	8	4	2
		Наличие роста тест-культуры * в присутствии МБЛ, экспозиция 24 часа при 37 <sup>0</sup> С									
1	0	Р	Р	Р	Р	Р	Р	Р	Р	Р	Р
2	469	Р	-	-	-	Р	Р	Р	Р	Р	Р
3	938	Р	-	-	-	-	Р	Р	Р	Р	Р
4	1875	Р	-	-	-	-	-	Р	Р	Р	Р
5	3750	Р	-	-	-	-	-	-	-	Р	Р
6	7500	Р	-	-	-	-	-	-	-	-	-
7	15000	Р	-	-	-	-	-	-	-	-	-
8	30000	Р	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		А	Б	В	Г	Д	Е	Ж	З	И	К

Примечание: \* Р – рост чувствительной к меропенему тест-культуры *P. aeruginosa* ATCC 27853 в присутствии реактива фермента МБЛ; «-» – отсутствие роста.

В аналогичных опытах при различных сочетаниях имипенема или меропенема с бисфосфонатами в отношении референс-штаммов *P. aeruginosa* ATCC 27853, *A. baumannii* ATCC ВАА-747 или *K. pneumoniae* ATCC 70603 так же получен эффект ингибирования стандартного реактива фермента МБЛ клодроновой или этидроновой кислотами в зависимости «доза-эффект».

### **Оценка эффективности бисфосфонатов как ингибиторов металло-бета-лактамазы резистентных к карбапенемам клинических изолятов грамотрицательных бактерий методом «шахматной доски»**

Для оценки способности выявленных ингибиторов МБЛ – бисфосфонатов – усиливать действие карбапенемов в отношении грамотрицательных бактерий, продуцирующих МБЛ,

использовали резистентные клинические изоляты *P. aeruginosa*, *A. baumannii*, *K. pneumoniae*, у которых фенотипически (методом E-теста) и генотипически (методом ПЦР) подтвердили наличие МБЛ. Для примера были взяты штаммы с максимальными значениями МПК карбапенемов: *P. aeruginosa* 532/14 (МПК меропенема и имипенема 512 мкг/мл), *A. baumannii* 346/14 (МПК меропенема 128 мкг/мл, имипенема – 256 мкг/мл), *K. pneumoniae* 4058/13 (МПК меропенема и имипенема 128 мкг/мл). В отношении всех исследованных штаммов МПК этидроновой кислоты составила 200 000 мкг/мл, клодроновой кислоты – 30 000 мкг/мл.

При оценке сочетанного действия карбапенемов и бисфосфонатов модифицированным методом «шахматной доски» оценивали индекс фракционной ингибирующей концентрации ( $\Sigma$ ФИК). Авторами классического метода, предназначенного для тестирования двух антибиотиков (Eliopoulos G.M., Moellering R.C., 1996), предложена следующая трактовка индекса: синергизм – индекс до 0,5; индифферентность – индекс от 0,51 до 4; антагонизм – индекс более 4.

При использовании сочетаний этидроновой или клодроновой кислот с карбапенемами (меропенемом или имипенемом) в отношении резистентных тест-штаммов во всех случаях получен синергидный эффект, при этом наблюдали усиление действия антибиотиков в 8-1024 раза.

#### **Лабораторная оценка влияния бисфосфонатов и антисептика на резистентность грамотрицательных бактерий к карбапенемам**

Методом серийных разведений определяли МПК антисептика «Пронтосан®» в отношении трех изолятов грамотрицательных бактерий с высоким уровнем резистентности к карбапенемам: *A. baumannii* 346/14 – 3,9 мкг/мл, *P. aeruginosa* 532/14 – 7,8 мкг/мл, *K. pneumoniae* 4058/13 – 1,95 мкг/мл. Микробная нагрузка каждого тест-штамма составила  $10^7$  КОЕ/мл. Далее в отношении тест-микроорганизмов использовали суббактерицидную ( $1/2$  МПК) концентрацию Пронтосана®. В опытах методом серийных разведений оценивали величины МПК карбапенемов в их сочетаниях с антисептиком. Контролем служила исходная величина МПК соответствующего антибиотика (табл. 3).

Данные таблицы 3 свидетельствуют о том, что в отношении штамма *A. baumannii* 346/14 действие меропенема в присутствии суббактерицидной концентрации Пронтосана® достоверно усиливается в 8 раз, имипенема – в 3,3 раза ( $P < 0,05$ ). В отношении штамма *P. aeruginosa* 532/14 – соответственно в 26,7 и в 6,7 раза ( $P < 0,05$ ). В отношении штамма *K. pneumoniae* 4058/13 – соответственно в 2,2 и в 6,7 раза ( $P < 0,05$ ).

На ридере ELx 800 выявляли время появления логарифмической фазы роста тест-культур и уровень стационарной фазы при сочетанном применении карбапенема и Пронтосана® в суббактерицидной концентрации.

Таблица 3. Значения МПК бисфосфонатов и антисептика в отношении высоко резистентных штаммов грамотрицательных бактерий с характерным генотипом карбапенемаз

№ п\п	Тест-микроорганизм	Антибиотик	МПК антибиотика, мкг/мл (n=5)	МПК антибиотика (мкг/мл) в присутствии ½ МПК Пронтосана® (n=5)	Усиление действия антибиотика
1	<i>A. baumannii</i> штамм 346/14	меропенем	128	16,0 ±0	в 8 раз
		имипенем	256	76,8 ±12,3	в 3,3 раза
2	<i>P. aeruginosa</i> штамм 532/14	меропенем	512	19,2 ±3,08	в 26,7 раза
		имипенем	512	76,8 ±12,3	в 6,7 раза
3	<i>K. pneumoniae</i> штамм 4058/13	меропенем	128	57,6 ±6,2	в 2,2 раза
		имипенем	128	19,2 ±3,08	в 6,7 раза

Таким образом, антисептик «Пронтосан®» в суббактерицидной концентрации усиливает действие карбапенемов, при этом в антимикробной комбинации их с суббактерицидными концентрациями бисфосфонатов этот эффект не препятствовал усилению активности антибиотиков препаратами клодроновой и этидроновой кислот. Антисептики из группы полигексанидов перспективны для местного применения в сочетании с системным или местным использованием карбапенемов и бисфосфонатов.

Полученные *in vitro* данные достоверно свидетельствуют о перспективности разработанной антимикробной комбинации лекарственных препаратов, разрешенных для применения в клинике, – карбапенемов, бисфосфонатов и полигексанида – для терапии пациентов с гнойно-септическими заболеваниями, вызванными карбапенемрезистентными грамотрицательными бактериями, продуцирующими МБЛ. Теоретическое обоснование эффективности предложенной комбинации для системного и местного применения позволило клиницистам использовать ее для лечения тяжелых больных клиники ВЦЭРМ им. А.М. Никифорова МЧС России с выраженным течением гнойно-септических процессов в случаях, когда стандартные схемы антимикробной терапии оказались малоэффективны. При местном применении разработанной комбинации на фоне снижения количества микробной контаминации не наблюдали появления в ране новых видов микроорганизмов и селекции карбапенемрезистентных изолятов грамотрицательных бактерий.

**Оценка эффективности антимикробной комбинации карбапенемов, бисфосфонатов и антисептика – полигексанида в комплексной терапии пациентов с инфекционно-септическими осложнениями, вызванными грамотрицательными бактериями, продуцирующими металло-бета-лактамазы, по анализу показателей клинической лабораторной диагностики**

Многочисленные положительные результаты исследований *in vitro* в отношении клинических изолятов грамотрицательных бактерий, продуцирующих МБЛ, использование в предложенной комбинации препаратов, разрешенных к применению в клинике, а также одобрение данного исследования этическим комитетом позволило применить разработанную комбинацию для лечения тяжелых больных с инфекционными осложнениями. В исследование были включены 2 группы пациентов: 1-я группа - 14 пациентов с диагнозом сепсис - получали системную комбинированную терапию предложенной комбинацией карбапенемов и бисфосфоната, 2-я группа - 16 пациентов с раневой инфекцией – применяли местную сочетанную терапию карбапенемами, бисфосфонатами и антисептиком из группы полигексанида. Для контроля использовали клинико-лабораторные показатели 5 пациентов, не получавших комбинированную антибактериальную терапию, лечение у которых проводилось по стандартной схеме. Возбудителями гнойно-септических осложнений у всех пациентов являлись *P. aeruginosa*, *A. baumannii*, *K. pneumoniae*, продуцирующие МБЛ, которые выделялись в монокультуре или в ассоциациях.

Пациенты 1-ой группы находились в ОРИТ на искусственной вентиляции легких, септическое состояние явилось осложнением ожоговой болезни, перитонита, панкреонекроза, внебольничной пневмонии. Пациенты 2-ой группы лечились в ожоговом отделении, отделении травматологии с диагнозами: ожоги, остеомиелит, трофические язвы, пролежни, инфицированные раны. Следует отметить, что тяжесть состояния была обусловлена обширностью поражения (раневые поверхности составляли от 10 до 55% площади тела), а также высокой степенью микробной контаминации полирезистентными штаммами грамотрицательных бактерий, продуцирующих МБЛ, и наличием сопутствующих заболеваний сердечно-сосудистой системы, диабета, хронических заболеваний печени и почек. В ряде случаев комбинированная терапия была предпринята как «терапия отчаяния». Адекватность избранного лечебного подхода оценивалась клинической динамикой конкретного пациента. Для оценки эффективности проводимой терапии анализировали клинико-лабораторные показатели: количество лейкоцитов, СОЭ, АСТ, АЛТ, креатинин, билирубин прямой, лактат, Са<sup>++</sup>, прокальцитонин, уровень экспрессии CD64 на нейтрофилах, а также микробную обсемененность крови и раневых поверхностей. Исходные

данные клинико-лабораторных показателей у пациентов трех групп отличались незначительно, значимые отличия были выявлены по показателю лейкоцитоза и АСТ в группах 1 и 2. Пациенты 1-ой группы получали системную комбинированную терапию карбапенемами в сочетании с клодроновой кислотой в течение 5-10 дней. У пациентов 2-ой группы антибактериальная терапия предложенной комбинацией карбапенемов, бисфосфонатов и антисептика проводилась местно для обработки ран. В группах пациентов, получавших системную или местную комбинированную терапию предложенной комбинацией, отмечали значимую динамику клинико-лабораторных показателей в сторону снижения системной воспалительной реакции, что соответствовало улучшению клинического состояния. В 3-ей группе пациентов для лечения сепсиса применяли стандартные схемы антибактериальной терапии, выявлялось нарастание всех клинико-лабораторных показателей, нарастание полиорганной недостаточности, смерть наступала от септического шока.

Таблица 4. Динамика клинико-лабораторных показателей у пациентов с гнойно-септическими осложнениями, вызванными грамотрицательными бактериями, продуцирующими МБЛ

Исследуемые показатели		Группа 1 n=14	p<0.05	Группа 2 n=16	p<0.05	Группа 3 n=5	p<0.05
Кол-во лейкоцитов, 10 <sup>9</sup> /л	До лечения	20,9		12,9		17,1	
	После лечения	8,0	0,001	8,1	0,01	18,2	-
СОЭ, мм/час	До лечения	68,4		64,8		68,6	
	После лечения	31,1	0,001	35,1	0,01	86,4	-
Прокальцитонин, нг/мл	До лечения	2,5		1,7		3,4	
	После лечения	1,0	0,001	1,3	-	3,6	-
АСТ, Е/л	До лечения	80,0		46,4		82,6	
	После лечения	27,2	0,001	18,6	0,01	924,6	-
АЛТ, Е/л	До лечения	76,5		63,1		41,2	
	После лечения	36,6	0,01	30,3	0,05	297,4	-
Креатинин, мкмоль/л	До лечения	151,4		107,5		394,5	
	После лечения	77,8	0,001	66,5	0,01	269,6	-
Билирубин прямой, мкмоль/л	До лечения	6,6		6,9		7,0	
	После лечения	3,0	0,01	5,0	-	19,8	-
Лактат, ммоль/л	До лечения	2,9		3,6		1,7	
	После лечения	1,2	0,01	1,4	-	8,2	-
pCD64, %	До лечения	87,1		-		89,9	
	После лечения	38,6	0,001	-	-	94,8	-
Плотность экспрессии CD64, РИ	До лечения	4,6		-		6,5	
	После лечения	2,1	0,001	-	-	7,1	-
Са++, ммоль/л	До лечения	1,2		1,2		1,2	
	После лечения	1,2	-	1,2	-	1,0	-
Обсемененность, КОЕ/мл	До лечения	6,0		6,1		6,0	
	После лечения	1,0	0,001	1,2	0,001	6,0	-
СРБ, мг/мл	До лечения			58,0		278,9	
	После лечения			17,7	0,02	141,6	-

Примечание: p- достоверность различий – p<0,05 ( по сравнению с исходным значением)

Статистическая обработка данных показателей клинической лабораторной диагностики показала значимую динамику снижения лейкоцитоза, СОЭ, АСТ, АЛТ, лактата, креатинина, обсемененности у пациентов в группе 1 на фоне проводимой комбинированной антибактериальной терапии карбапенемами в сочетании с бисфосфонатами, в группе 2 наблюдалась достоверно значимая динамика снижения лейкоцитов, СОЭ, креатинина и обсемененности. Группы отличались по динамике АСТ, по остальным показателям значимых отличий в этих группах до проведения лечения и после лечения не обнаружено. В группе 3 выявлена отрицательная динамика клинико-лабораторных показателей, что соответствовало ухудшению состояния пациентов.

Таким образом, сочетанное применение карбапенемов и бисфосфонатов, а в случаях местного применения и с антисептиком из группы полигексанидов, позволяет эффективно бороться с инфекционно-септическими осложнениями, вызванными грамотрицательными бактериями, продуцирующими МБЛ, а комплекс клинико-лабораторных показателей для оценки состояния пациентов должен включать определение общего количества лейкоцитов, СОЭ, АЛТ, АСТ, прямого билирубина, креатинина, прокальцитонина, лактата, уровень и плотность экспрессии CD64 на нейтрофилах.

Необходимо отметить, что по нашим данным определение уровня и плотности экспрессии CD64 у пациентов с обширными инфицированными раневыми поверхностями может служить прогностическим тестом для раннего выявления сепсиса и быть использован для оценки эффективности проводимой комбинированной антибактериальной терапии.

## ВЫВОДЫ

1. В многопрофильной клинике количество изолятов основных возбудителей инфекций, устойчивых к карбапенемам, составило от 3 % у *K. pneumoniae* до 93 % у *P. aeruginosa*, *A. baumannii*; у 20 % из них генотипически подтверждено наличие металло-бета-лактамаз.

2. Создана лабораторная модельная система с использованием модификации метода «шахматной доски», с помощью которой получен эффект повышения уровня минимальных подавляющих концентраций карбапенемов в отношении чувствительных к ним ранее грамотрицательных бактерий в зависимости от дозы стандартного реактива фермента металло-бета-лактамазы *P.aeruginosa*, экспрессированной в *E.coli*, а также получена прямая зависимость «доза – эффект» способности бисфосфонатов ингибировать стандартный реактив фермента металло-бета-лактамазы.

3. Сочетанное применение бисфосфонатов с карбапенемами усиливает действие антибиотиков по принципу синергидного эффекта в отношении клинических изолятов грамотрицательных бактерий, продуцирующих металло-бета-лактамазу, выделенных от пациентов с сепсисом и раневой инфекцией, а антисептик из группы полигексанидов обладает высокой бактерицидной активностью в отношении карбапенемрезистентных грамотрицательных бактерий и в суббактерицидных концентрациях в комбинациях с карбапенемами усиливает действие последних.

4. Антимикробная комбинация бисфосфонатов, полигексанида и карбапенемов для местного и системного применения эффективна для лечения пациентов с инфекционно-септическими осложнениями, вызванными грамотрицательными бактериями, продуцирующими металло-бета-лактамазы.

5. Комплекс показателей клинической лабораторной диагностики, включающий гематологические, биохимические, иммунологические (количество лейкоцитов, СОЭ, прокальцитонин прямой билирубин, креатинин, АСТ, АЛТ, уровень экспрессии CD64 на нейтрофилах) и микробиологические (обсемененность очагов инфекции – посев крови, раневого отделяемого, отделяемого нижних дыхательных путей, мочи) показатели, подтверждает эффективность разработанной антимикробной комбинации при ее системном и местном использовании в терапии пациентов с инфекционными осложнениями, вызванными грамотрицательными бактериями, продуцирующими металло-бета-лактамазы.

## **ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ**

### **1. Администрации:**

- внедрить комбинированную антибактериальную терапию с использованием карбапенемов, бисфосфонатов и антисептика полигексанида в клиническую практику лечения пациентов с инфекционно-септическими осложнениями, вызванными грамотрицательными бактериями, продуцирующими МБЛ.

### **2. Лечащим врачам и врачам клинической лабораторной диагностики:**

- для оценки эффективности проводимой комбинированной антибактериальной терапии использовать комплекс клинико-лабораторных показателей, включающий гематологические, биохимические, иммунологические (количество лейкоцитов, СОЭ, прокальцитонин прямой билирубин, креатинин, АСТ, АЛТ, уровень экспрессии CD64 на нейтрофилах) и микробиологические (обсемененность очагов инфекции – посев крови, раневого отделяемого, отделяемого нижних дыхательных путей, мочи) показатели.

### 3. Врачам-бактериологам:

- использовать модификацию метода «шахматной доски» для оценки эффективности комбинации карбапенемов и бисфосфонатов в случае выделения у пациентов грамотрицательных микроорганизмов, продуцирующих металло-бета-лактамазы.

### ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШЕЙ РАЗРАБОТКИ ТЕМЫ

Разработанные методические подходы позволяют осуществлять поиск и оценку перспективных ингибиторов МБЛ и других антимикробных препаратов для повышения эффективности терапии карбапенемами в отношении полирезистентных грамотрицательных бактерий, продуцирующих МБЛ.

### СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

**Статьи в научных журналах и изданиях, входящий в перечень рецензируемых научных изданий, рекомендованных ВАК Минобрнауки РФ для опубликования основных результатов диссертационных работ**

1. Божкова С.А. Микробиологические аспекты антибактериальной терапии парапротезной инфекции, вызванной грамположительными возбудителями / С.А. Божкова, Р.М. Тихилов, В.Г. Чуприс, Т.М. Петрова (Ворошилова) // Инфекции в хирургии. - 2011. - Т.9. - №3. - С.31-36.

2. Афиногенова А.Г. Влияние бисуанидинов и бифосфонатов на факторы антибиотикорезистентности грамотрицательных бактерий / А.Г. Афиногенова, Д.Ю. Мадай, Г.Е. Афиногенов, И.К. Лебедева, Т.М. Петрова (Ворошилова) // Инфекции в хирургии. – 2013. – Т.11. - №3. - С. 15-18.

3. Гостев В.В. Оценка чувствительности MRSA к оксациллину, цефокситину, ванкомицину и даптомицину / В.В. Гостев, Л.Н. Попенко, Т.В. Черненькая, З.С. Науменко, Т.М. Ворошилова, Ю.А. Захарова, О.Е. Хохлова, А.Н. Круглов, М.Г. Ершова, С.Н. Ангелова, Е.Д. Полетаева, И.В. Молчанова, С.В. Сидоренко // Антибиотики и химиотерапия. – 2013. – Т.58. - №9-10. - С.13-20.

4. Афиногенова А.Г. «Метод шахматной доски» как тест для оценки снижения уровня резистентности грамотрицательных микроорганизмов к карбапенемам в присутствии бисфосфоната / А.Г. Афиногенова, Т.М. Ворошилова, Г.Е. Афиногенов, Г.Г. Родионов // Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. – 2015. – Т.17. - №1. - С. 24-32.

5. Ворошилова Т.М. Разработка способа лечения пациентов с ожогами, инфицированными полирезистентными грамотрицательными микроорганизмами / Т.М. Ворошилова, Г.Г. Родионов, Ю.Н. Филиппова, А.Г. Афиногенова // Медико-биологические и социально-психологические проблемы безопасности в чрезвычайных ситуациях. – 2015. - №1. - С. 71-77.

6. Гостев В.В. Антибиотикорезистентность метициллинрезистентных *S.aureus*, циркулирующих в Российской Федерации / В.В. Гостев, О.С. Калиногорская, Л.Н. Попенко, Т.В. Черненькая, З.С. Науменко, Т.М. Ворошилова, Ю.А. Захарова, О.Е. Хохлова, С.В. Сидоренко // Антибиотики и химиотерапия. – 2015. - Т.60. - №1-2. - С.3-9.

7. Афиногенова А.Г. Оценка эффективности нового ингибитора металло-бета-лактамазы в условиях модельной системы *in vitro* / А.Г. Афиногенова, Т.М. Ворошилова, Г.Е. Афиногенов, Д.Ю.Мадай // Инфекции и иммунитет. – 2016. – Т.6. – №4. – С.335-344.

**Статьи в научных журналах, тезисы докладов в материалах конференций и симпозиумов**

8. Божкова С.А. Мониторинг микробного пейзажа в отделении гнойной хирургии - основа для разработки рациональной антибактериальной терапии / С.А. Божкова, Г.Е. Афиногенов, В.Л. Разоренов, Т.М. Петрова (Ворошилова) // Клинико-лабораторный консилиум. – 2009. - №3. - С.50-56.

9. Божкова С.А. Состояние антибиотикорезистентности стафилококков, выделенных у пациентов с инфекцией области хирургического вмешательства после больших ортопедических операций / С.А. Божкова, О.В. Шнейдер, Т.М. Петрова (Ворошилова), Н.Э. Мирзоев, М.В. Краснова, А.М. Борисов // Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. – 2012. - Т.14. - №2. - Приложение 1. – С. 18.

10. Ворошилова Т.М. Снижение уровня резистентности к карбапенемам у грамотрицательных микроорганизмов в присутствии антисептика и бисфосфонатов в зависимости от генотипа карбапенемаз / Т.М. Ворошилова, Г.Г. Родионов, Ю.Н. Филиппова, Ю.А. Савочкина, А.Г. Афиногенова, Г.Е. Афиногенов // Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. – 2014. – Т.16. - №2. - Приложение 1. – С. 17.

11. Ворошилова Т.М. Преодоление устойчивости к карбапенемам грамотрицательных микроорганизмов с помощью антисептика и бисфосфонатов / Т.М. Ворошилова, Ю.Н. Филиппова, Н.Н. Зыбина, Ю.А. Савочкина, А.Г. Афиногенова, Г.Е. Афиногенов // Проблемы медицинской микологии. – 2014. - Т.16. - №2. С. 54.

12. Ворошилова Т.М. Обоснование эффективности безопасного способа лечения обожженных, инфицированных полирезистентными микроорганизмами / Т.М. Ворошилова, А.Г. Афиногенова, Г.Е. Афиногенов, Г.Г. Родионов, Ю.Н. Филиппова // Никифоровские чтения 2014: СПб. Сборник тез. докл. – СПб, 2014. - С.11.

13. Ворошилова Т.М. Оценка усиления действия карбапенемов в отношении полирезистентных грамотрицательных микроорганизмов с помощью бисфосфонатов методом «шахматной доски» / Т.М. Ворошилова, А.Г. Афиногенова, Г.Е. Афиногенов, Г.Г. Родионов // Материалы Всероссийской научной конференции, посвященной 110-летию со дня рождения И.И.Иванова – СПб.: ВМедА, 2014. - С. 24.

14. Voroshilova Tatyana. The influence of biphosphonates and biguanides on the factors of gramnegative bacteria' resistance to carbapenemes // T. Voroshilova, A. Afinogenova, D. Maday, G. Afinogenov // The 24th Conference of European Wound Management Association EWMA – GNEAUPP, 2014. - P257. - P. 159.

15. Ворошилова Т.М. Клинический опыт применения бисфосфонатов для преодоления резистентности к карбапенемам у возбудителей внутригоспитальных инфекций / Т.М. Ворошилова, А.Г. Афиногенова, Г.Е. Афиногенов, С.Г. Шаповалов, А.В. Панов, А.С. Плешков // Материалы международного научного форума «Многопрофильная клиника XXI века. Экстремальная медицина» - СПб., 2015. - С. 72.

16. Ворошилова Т.М. Определение механизма резистентности *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii*, *Klebsiella pneumoniae*, выделенных у пациентов отделений реанимации клиники ВЦЭРМ им. А.М.Никифорова МЧС России / Т.М. Ворошилова, Ю.Н. Филиппова, Е.С. Юренкова // Материалы международного научного форума «Многопрофильная клиника XXI века. Экстремальная медицина» - СПб., 2015. - С. 72.

17. Ворошилова Т.М. Результаты микробиологических исследований у больных с гнойно-септическими осложнениями после операций на органах брюшной полости / Т.М. Ворошилова, М.С. Гудиллов, Г.Г. Родионов, А.В. Кочетков // Материалы международного научного форума «Многопрофильная клиника XXI века. Экстремальная медицина» - СПб., 2015. - С. 94.

18. Афиногенова А.Г. Выявление ингибиторов металло- $\beta$ -лактамаз грамотрицательных микроорганизмов, резистентных к карбапенемам, методом «шахматной доски» / А.Г. Афиногенова, Т.М. Ворошилова, Г.Е. Афиногенов // Проблемы медицинской микологии. - 2015. – Т. 17. - №2. – С. 40.
19. Ворошилова Т.М. «Время–летальное действие» у карбапенемов в комбинации с бисфосфонатом в отношении резистентных грамотрицательных микроорганизмов / . Т.М. Ворошилова, А.Г. Афиногенова, Г.Е. Афиногенов // Проблемы медицинской микологии. - 2015. – Т.17. - №2. – С. 54.
20. Voroshilova T. Bisphosphonates in overcoming bacterial resistance to carbapenems - clinical experience. / T. Voroshilova, A. Pleshkov, A. Afinogenova, G. Afinogenov, S. Shapovalov, A. Panov // Мат. Европейского конгресса по вопросам оказания помощи при ожогах European Burns Association Congress (EBA). – 2015. - v.XXVIII, number 3. – P.341
21. Ворошилова Т.М. Применение бисфосфонатов для преодоления резистентности к карбапенемам возбудителей внутригоспитальных инфекций у пациентов ожоговой реанимации / Т.М. Ворошилова, А.С. Плешков, А.Г. Афиногенова, Г.Е. Афиногенов, С.Г. Шаповалов, А.В. Панов // Материалы Конгресса «Многопрофильная клиника XXI века. Передовые медицинские технологии», СПб. – 2016. - С. 50.
22. Ворошилова Т.М. Мониторинг микрофлоры многопрофильного стационара / Т.М. Ворошилова, Е.М. Чурикова, Ю.Н. Филиппова, Е.С. Юренкова // Материалы Конгресса «Многопрофильная клиника XXI века. Передовые медицинские технологии», СПб. – 2016. - С. 52.
23. Калашникова А.А. CD64 на нейтрофилах как маркер сепсиса в зависимости от этиологии возбудителя / А.А. Калашникова, Т.М. Ворошилова // Материалы Конгресса «Многопрофильная клиника XXI века. Передовые медицинские технологии», СПб. – 2016. - С. 81.
24. Калашникова А.А. Оценка экспрессии CD64 нейтрофилами крови в диагностике бактериальных инфекций и сепсиса / А.А. Калашникова, Т.М. Ворошилова // Справочник заведующего КДЛ. - 2016. -№5. – С.44-54.

## СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

АМР	антимикробная резистентность
ВОЗ	Всемирная организация здравоохранения
КОЕ	колониеобразующая единица
МБЛ	металло-бета-лактамаза
НИ	нозокомиальные инфекции