

УЧРЕЖДЕНИЕ ОБРАЗОВАНИЯ  
«БЕЛОРУССКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ»

УДК 579.84:615.281.9+579.252.55

**ТАПАЛЬСКИЙ**  
**Дмитрий Викторович**

**ЭКСТРЕМАЛЬНО-АНТИБИОТИКОРЕЗИСТЕНТНЫЕ  
ГРАМОТРИЦАТЕЛЬНЫЕ БАКТЕРИИ: РАСПРОСТРАНЕНИЕ  
И СТРАТЕГИИ АНТИМИКРОБНОГО ВОЗДЕЙСТВИЯ**

Автореферат диссертации на соискание ученой степени  
доктора медицинских наук

по специальности 03.02.03 – микробиология

Минск 2019

Научная работа выполнена в учреждении образования «Белорусский государственный медицинский университет»

**Научный консультант:** **Карпов Игорь Александрович**, доктор медицинских наук, профессор, заведующий кафедрой инфекционных болезней учреждения образования «Белорусский государственный медицинский университет»

**Официальные оппоненты:** **Полещук Николай Николаевич**, доктор медицинских наук, профессор, главный научный сотрудник лаборатории диагностики сочетанных бактериально-вирусных инфекций государственного учреждения «Республиканский научно-практический центр эпидемиологии и микробиологии»;

**Генералов Игорь Иванович**, доктор медицинских наук, профессор, заведующий кафедрой клинической микробиологии учреждения образования «Витебский государственный ордена Дружбы народов медицинский университет»;

**Прокулевич Владимир Антонович**, доктор биологических наук, профессор, заведующий кафедрой микробиологии Белорусского государственного университета

**Оппонирующая организация:** государственное учреждение образования «Белорусская медицинская академия последипломного образования»

Защита состоится 15 марта 2019 года в 12.00 на заседании совета по защите диссертаций Д 03.18.04 при учреждении образования «Белорусский государственный медицинский университет» по адресу: 220116, г. Минск, пр-т Дзержинского, 83, e-mail: uchsovets@bsmu.by, тел. (+375 17) 277 16 21.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке учреждения образования «Белорусский государственный медицинский университет».

Автореферат разослан «\_\_\_\_\_» февраля 2019 года.

Ученый секретарь совета  
по защите диссертаций Д 03.18.04,  
кандидат медицинских наук, доцент



А.П.Музыченко

## ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время инфекции, связанные с оказанием медицинской помощи (ИСМП), вызываемые антибиотикорезистентными штаммами энтеробактерий и грамотрицательных неферментирующих бактерий, представляют серьезную угрозу для госпитализированных пациентов (Pendleton J. N., 2013; Tacconelli E., 2018). Большинство грамотрицательных возбудителей ИСМП характеризуются множественной (MDR), экстремальной (XDR) и даже полной (PDR) устойчивостью к антибиотикам (Magiorakos A. P., 2012). Особую значимость имеет устойчивость грамотрицательных патогенов к карбапенемам, обусловленная продукцией приобретенных карбапенемаз. Сцепление генов карбапенемаз с другими детерминантами резистентности во многих случаях сопровождается развитием XDR (Queenan A. M., 2007; Pitout J. D., 2015). До настоящего времени только полимиксины сохраняют приемлемую микробиологическую активность в отношении многих карбапенеморезистентных госпитальных штаммов. Имеется ряд сообщений о PDR штаммах *P.aeruginosa* и *A.baumannii*, устойчивых к колистину (Gottig S., 2014; Alipour N., 2017). Показано, что отдельные «успешные» эпидемически значимые клоны XDR микроорганизмов способны быстро распространяться на обширных территориях и вызывать серьезные инфекции, трудно поддающиеся терапии (Woodford N., 2011; Wright L. L., 2015).

В 2008 году в организациях здравоохранения Беларуси впервые выделены карбапенемазопродуцирующие штаммы *P.aeruginosa*, принадлежащие к международному комплексу CC235. На протяжении последующих лет отмечено распространение данной клональной группы во многих организациях здравоохранения республики и практически на всей территории Российской Федерации (Тапальский Д. В., 2012; Edelstein M. V., 2013). Наблюдаемое с середины 2000-х годов распространение в Беларуси XDR штаммов *Acinetobacter spp.* приняло характер аллодемии (Sheck E., 2016). Важными детерминантами антибиотикорезистентности *A.baumannii* являются ОХА-карбапенемазы, продукция которых ассоциирована с устойчивостью к антибиотикам различных групп – цефалоспорином, фторхинолонам, аминогликозидам (Горбич Ю. Л., 2011). В 2013–2014 гг. у XDR штаммов *K.pneumoniae*, выделенных в трех регионах республики, выявлено наличие метало- $\beta$ -лактамазы (МБЛ) NDM-1 (Тапальский Д. В., 2015). Для раннего выявления карбапенемазопродуцирующих бактерий – возбудителей ИСМП – необходима разработка фенотипических и молекулярно-генетических методов их обнаружения в клиническом материале.

Использование комбинаций антибиотиков является перспективным направлением антибактериальной терапии инфекций, вызванных XDR

микроорганизмами (Zavascki A. P., 2013; Karaiskos I., 2017). Однако в ходе многочисленных исследований было показано, что эффект сочетанного использования антибиотиков трудно прогнозируем (Timurkaynak F., 2006; Ni W., 2015; Safarika A., 2015). С исследовательской целью для определения антимикробного эффекта комбинаций антибиотиков *in vitro* используются различные методы – метод «шахматной доски», time-kill тест, методы градиентной диффузии (Sopirala M. M., 2010; Laishram S., 2017). Все они достаточно трудоемки и мало пригодны для проведения рутинной диагностики (Doern C. D., 2014).

Использование бактериофагов может стать альтернативой антибиотикотерапии в условиях быстрого распространения антибиотикорезистентности среди бактерий (Асланов Б. И., 2015; Lin D. M., 2017). При этом формирование фагорезистентности является основной причиной неудач проводимой фаготерапии (Labrie S. J., 2010; Dennehy J. J., 2012). Поиск литических фагов в объектах окружающей среды может стать возможным путем преодоления фагорезистентности (Mattila S., 2015).

Возможность применения фитотерапии для лечения инфекций, вызванных XDR грамотрицательными бактериями, активно изучается (Abdallah E. M., 2011, Fallah F., 2013). Представляют значительный практический интерес экспериментальные данные об антибактериальной активности растений и лишайников, произрастающих на территории Беларуси.

Одним из достижений современных нанотехнологий является разработка сверхтонких функциональных антибактериальных покрытий, способных значительно модифицировать свойства поверхности (Рогачев А. В., 2009). Разработанный вакуумно-плазменный метод формирования покрытий из продуктов электронно-лучевого диспергирования полимеров и антибактериальных веществ позволил осаждать на поверхности медицинских изделий сверхтонкие композиционные слои с антибактериальной активностью (Ярмоленко М. А., 2007; Liu Z., 2012). Использованный подход модификации поверхностей оказался пригодным для формирования полимерных серебросодержащих слоев (Рогачев А. А., 2006). Необходима оценка антибактериального эффекта покрытий в отношении клинически значимых XDR микроорганизмов, а также выраженности антибактериального эффекта во времени.

Таким образом, требуется оценка распространенности экстремальной антибиотикорезистентности среди клинически значимых грамотрицательных бактерий и обоснование подходов преодоления антибиотикорезистентности с использованием комбинированной антибиотикотерапии, фаготерапии, фитотерапии и композиционных нанопленок.

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

### Связь работы с крупными научными программами, темами

Тема диссертационного исследования соответствует п. 4 и п. 6 «Перечня приоритетных направлений научно-технической деятельности в Республике Беларусь на 2016–2020 годы», утвержденного указом Президента Республики Беларусь 22 апреля 2015 г. № 166, направления – «Технологии профилактики, диагностики и лечения заболеваний» и «Нанотехнологии».

Работа выполнялась в рамках следующих финансирувавшихся крупных научных проектов и тем, научным руководителем которых являлся автор настоящего диссертационного исследования:

– тема Белорусского республиканского фонда фундаментальных исследований «Значение металло- $\beta$ -лактамаз различных генетических групп в формировании и распространении устойчивости *Pseudomonas aeruginosa* к карбапенемам», № госрегистрации 20082147, договор Б08М-129, срок выполнения 01.04.2008–31.03.2010 гг.;

– задание 03.03 «Разработать и внедрить технологию создания биосовместимых тонкопленочных антибактериальных покрытий с программируемым высвобождением наночастиц» подпрограммы «Инфекции и микробиологические нанотехнологии» Государственной научно-технической программы «Новые технологии диагностики, лечения и профилактики», № госрегистрации 20114106, договор № 03.03/11, срок выполнения 01.04.2011–31.12.2016 гг.;

– тема НИР «Определение фагочувствительности клинических изолятов энтеробактерий и грамотрицательных неферментирующих бактерий», выполняемая по договору № 767/14 с Федеральным государственным унитарным предприятием «Научно-производственное объединение по медицинским иммунобиологическим препаратам «Микроген» Минздрава России, № госрегистрации 20142463, срок выполнения 19.05.2014–14.11.2014 г.;

– задание «Внедрить в практику здравоохранения Гомельской области систему микробиологического тестирования комбинаций антибиотиков в отношении экстремально-антибиотикорезистентных возбудителей бактериальных инфекций», заказчик – Гомельский областной исполнительный комитет, договор № 30/08, № госрегистрации 20164463, срок выполнения 01.09.2016–31.12.2018 гг.

**Цель исследования:** обосновать методы антимикробного воздействия на экстремально-антибиотикорезистентные микроорганизмы на основании оценки механизмов формирования и распространения устойчивости к антибиотикам.

**Задачи исследования:**

1. Оценить современное значение XDR штаммов *A.baumannii*, *P.aeruginosa*, *K.pneumoniae* в этиологии бактериальных инфекций у госпитализированных пациентов.

2. Выявить продуцентов карбапенемаз среди штаммов *A.baumannii*, *P.aeruginosa*, *K.pneumoniae*, выделенных от госпитализированных пациентов в различных регионах Беларуси, и с использованием методов молекулярного типирования определить механизмы распространения экстремальной антибиотикорезистентности в бактериальных популяциях.

3. Разработать эффективный микробиологический метод тестирования чувствительности микроорганизмов к комбинациям из 2 или 3 антибиотиков, пригодный для рутинного использования, и оценить с его помощью чувствительность XDR-штаммов *A.baumannii*, *P.aeruginosa*, *K.pneumoniae*.

4. Определить чувствительность XDR-штаммов *A.baumannii*, *P.aeruginosa*, *K.pneumoniae* к экстрактам официальных лекарственных растений и лишайников. Провести поиск и выделение литических бактериофагов, активных в отношении XDR-штаммов.

5. Разработать технологию создания композиционных покрытий с пролонгированным бактерицидным эффектом для защиты медицинских имплантатов от колонизации антибиотикочувствительными и XDR бактериальными патогенами. Провести изучение безопасности, биологической совместимости, микробиологической и клинической эффективности имплантатов с антибактериальными покрытиями и освоить их производство.

**Объект исследования:** штаммы *A.baumannii*, *P.aeruginosa*, *K.pneumoniae* с различными уровнями устойчивости к антибиотикам, лекарственные средства для фаготерапии, композиционные антибактериальные покрытия.

**Предмет исследования:** экстремальная антибиотикорезистентность и молекулярно-биологические механизмы ее формирования; методы антимикробного воздействия на экстремально-антибиотикорезистентные микроорганизмы (использование комбинаций антибиотиков, бактериофагов, растительных экстрактов, антибактериальных покрытий).

**Научная новизна**

Впервые показано, что устойчивость к карбапенемам у госпитальных штаммов грамотрицательных бактерий в Беларуси связана с продукцией различных карбапенемаз: OXA-23 и OXA-40 – у *A.baumannii*, МБЛ VIM – у *P.aeruginosa*, OXA-48, KPC и МБЛ NDM – у *K.pneumoniae*. Впервые обнаружены отдельные штаммы, являющиеся ко-продуцентами карбапенемаз одновременно нескольких типов (OXA-23 совместно с OXA-40 у *A.baumannii*, OXA-48 совместно с МБЛ NDM у *K.pneumoniae*).

Установлено, что наблюдаемое увеличение XDR среди грамотрицательных микроорганизмов связано главным образом с распространением отдельных «клонов высокого эпидемического риска» (*P.aeruginosa* CC 235; *A.baumannii* CC92<sup>OXF</sup>/CC2<sup>PAS</sup>, CC109<sup>OXF</sup>/CC1<sup>PAS</sup>, CC944<sup>OXF</sup>/ST78<sup>PAS</sup>), и в меньшей степени с горизонтальной передачей генов карбапенемаз между представителями различных клональных комплексов.

Выявлены отличия в кинетике микробного роста (снижение максимальной скорости экспоненциального роста, увеличение времени удвоения популяции) XDR штаммов *K.pneumoniae* в сравнении с антибиотикочувствительными штаммами, а также низкая конкурентоспособность XDR штаммов.

Разработан метод определения чувствительности микроорганизмов к комбинациям антибиотиков, позволивший подобрать бактерицидные сочетания для более 99,0% выделенных XDR штаммов. Тестирование проводится для фиксированных концентраций антибиотиков, аналогичных фармакокинетическим/фармакодинамическим (ФК/ФД) концентрациям, создаваемым в организме при назначении стандартных терапевтических доз. Показана возможность подбора бактерицидных комбинаций для колистинорезистентных PDR штаммов *K.pneumoniae* и *P.aeruginosa* с высокими значениями МПК антибиотиков.

Впервые выполнено выделение из внешней среды и тестирование активности бактериофагов, эффективных в отношении XDR-штаммов *K.pneumoniae* и *P.aeruginosa*, циркулирующих в Республике Беларусь. Показана различная степень чувствительности XDR-микроорганизмов к имеющимся лекарственным средствам для фаготерапии.

Синтезированы биосовместимые композиционные покрытия с универсальным пролонгированным бактерицидным эффектом для защиты имплантатов от микробной колонизации.

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

1. В этиологии бактериальных инфекций у госпитализированных пациентов отмечается увеличение доли штаммов *A.baumannii* и *P.aeruginosa*, устойчивых к аминогликозидам, фторхинолонам и карбапенемам, а также преобладание штаммов с XDR-фенотипом. Устойчивость к карбапенемам у XDR штаммов в Беларуси обусловлена продукцией карбапенемаз OXA-23 и OXA-40 у *A.baumannii*, МБЛ VIM – у *P.aeruginosa*, OXA-48, NDM и KPC – у *K.pneumoniae*. Продуценты карбапенемаз имеют ассоциированную устойчивость к большинству не β-лактамных антибиотиков.

2. Наблюдаемое в Беларуси увеличение резистентности к карбапенемам в бактериальных популяциях *A.baumannii* и *P.aeruginosa* связано с распространением штаммов, аналогичных международным «клонам высокого эпидемического риска». Штаммы *P.aeruginosa* – продуценты МБЛ VIM –

являются родственными и относятся к клональному комплексу CC235, также широко распространенному на территории Российской Федерации. Карбапенемазопродуцирующие штаммы *A.baumannii* относятся к международным «клонам высокого эпидемического риска» CC92<sup>OXF</sup>/CC2<sup>PAS</sup>, CC109<sup>OXF</sup>/CC1<sup>PAS</sup>, CC944<sup>OXF</sup>/ST78<sup>PAS</sup>. Возможна горизонтальная передача генов ОХА-карбапенемаз между представителями различных клональных комплексов. Карбапенемазопродуцирующие штаммы *K.pneumoniae* обладают низкой конкурентоспособностью (fitness) по отношению к антибиотикочувствительным штаммам.

3. Разработанный модифицированный метод тестирования бактерицидности различных комбинаций (Multiple combination bactericidal testing, MCBT) позволяет подобрать бактерицидные комбинации антибиотиков для большинства XDR-штаммов. Выявлен бактерицидный эффект комбинаций меропенема с амикацином и амикацина с левофлоксацином в отношении карбапенемазопродуцирующих штаммов *K.pneumoniae*, комбинаций меропенема с колистином и имипенема с колистином в отношении карбапенемазопродуцирующих штаммов *P.aeruginosa*, комбинаций с включением колистина в отношении карбапенемазопродуцирующих штаммов *A.baumannii*. Имеется видовая и штаммовая специфичность проявления бактерицидной активности комбинаций антибиотиков, связанная с различиями индивидуальных значений МПК, что обосновывает необходимость определения чувствительности к комбинациям антибиотиков для XDR-штаммов микроорганизмов, выделенных от конкретных пациентов.

4. Показана различная активность лекарственных средств для фаготерапии в отношении *P.aeruginosa* и *K.pneumoniae*, циркулирующих в Беларуси. При этом доля фагочувствительных изолятов ниже среди XDR штаммов по сравнению с антибиотикочувствительными штаммами. Источником новых литических фагов, активных в отношении XDR штаммов *P.aeruginosa* и *K.pneumoniae*, могут быть объекты водной среды. Выделенные из них бактериофаги способны лизировать XDR штаммы *P.aeruginosa* и *K.pneumoniae*, которые устойчивы к действию доступных лекарственных средств для фаготерапии.

5. Экстракты из официальных лекарственных растений *in vitro* проявляют антибактериальную активность (МПК ≤ 1 мг/мл) в отношении как антибиотикочувствительных, так и XDR штаммов *P.aeruginosa* и *A.baumannii*. Выявлен синергидный антибактериальный эффект комбинации водного экстракта эвкалипта прутовидного с цефтазидимом в отношении XDR штаммов *A.baumannii*, продуцирующих ОХА-карбапенемазы. Экстракты из лишайников *Evernia prunastri*, *Hypogymnia physodes*, *Cladonia arbuscula* проявляют выраженную антибактериальную активность (МПК 0,125–0,5 мг/мл) в отношении штаммов *Stenotrophomonas maltophilia*.



6. Антибактериальное покрытие на основе полиуретана, полилактида, ципрофлоксацина и хлорида серебра является биологически совместимым и обладает универсальной пролонгированной бактерицидной активностью, проявляющейся в том числе и в отношении XDR-штаммов. Длительный бактерицидный эффект обусловлен пролонгированной диссоциацией входящего в состав покрытия полилактида.

#### **Личный вклад соискателя ученой степени**

Совместно с научным консультантом обозначена проблема, определена идея исследования, поставлены цели и задачи. Автор принял непосредственное участие в анализе и обобщении литературных данных, организации и проведении микробиологических, молекулярно-генетических, физико-химических исследований, разработке и внедрении новых микробиологических методов. Отбор MDR- и XDR-штаммов микроорганизмов выполнен самостоятельно автором или при его участии. Определение чувствительности микроорганизмов к антибиотикам и их комбинациям, выявление продукции карбапенемаз, определение чувствительности к лекарственным средствам для фаготерапии и растительным экстрактам, выделение бактериофагов из внешней среды, микробиологические исследования антибактериальных покрытий выполнены самостоятельно автором. Изучение морфологии, состава и физико-химических свойств антибактериальных покрытий, определение изменений молекулярной структуры ПЛ при различных режимах стерилизации, определение адгезионной способности и токсичности антибактериальных покрытий в отношении клеточных культур, выявление генов карбапенемаз, молекулярно-генетические исследования по эпидемиологическому маркированию XDR-штаммов *P.aeruginosa* и *A.baumannii*, реидентификация XDR-штаммов методом времяпролетной масс-спектрометрии, эксперименты по изучению конкурентоспособности XDR-микроорганизмов выполнены при непосредственном участии автора.

При изложении результатов экспериментов, полученных совместно со специалистами НИИ антимикробной химиотерапии Смоленского государственного медицинского университета, Гомельского государственного университета им. Франциска Скорины, Белорусского государственного университета и других научно-исследовательских учреждений, указание на соавторов дано в соответствующих разделах диссертации и публикациях.

По материалам диссертационного исследования в соавторстве подготовлены и утверждены в Министерстве здравоохранения Республики Беларусь 3 инструкции на метод. В соавторстве получено 2 патента Республики Беларусь. Личный вклад соискателя в опубликованные научные работы составляет 80%.

## **Апробация диссертации и информация об использовании ее результатов**

Результаты исследования и основные положения диссертации были доложены и обсуждены на: республиканской научно-практической конференции «Современные молекулярно-генетические методы диагностики в медицине» (Гомель, 2010); Молодежном инновационном форуме «ИНТРИ-2010» (Минск, 2010); республиканской научно-практической конференции, посвященной 20-летию Гомельского государственного медицинского университета (Гомель, 2011); республиканской научно-практической конференции с международным участием «Актуальные вопросы клинической лабораторной диагностики» (Минск, 2013); международной конференции «Теории оболочек и мембран в механике и биологии: от макро- до наноразмерных структур» (Минск, 2013); республиканском семинаре «Перспективы создания nanoиндустрии в Республике Беларусь», (Минск, 2013); научно-практических семинарах «Резистентность бактерий к антибактериальным средствам и внедрение программы WHONET в практическом здравоохранении Республики Беларусь» (Минск, 2014, 2015, 2016); XIV Международном конгрессе МАКМАХ по антимикробной терапии (Москва, 2014); V Дальневосточной конференции МАКМАХ по антимикробной терапии (Владивосток, 2014); республиканской научно-практической конференции с международным участием «Современные проблемы инфекционной патологии человека» (Минск, 2014); III Южно-российской конференции по антимикробной терапии (Ростов-на-Дону, 2015); XVII Международном конгрессе МАКМАХ/ESCMID по антимикробной терапии (Москва, 2015); Международной научно-технической конференции «ПОЛИКОМТРИБ-2015» (Гомель, 2015); IX Международной научной конференции «Микробные биотехнологии: фундаментальные и прикладные аспекты», посвященной 50-летию юбилею Института (Отдела) микробиологии НАН Беларуси (Минск, 2015); республиканском учебном семинаре с международным участием «Профилактика и контроль инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи: внедрение в практическое здравоохранение» (Минск, 2015); VIII съезде врачей клиничко-лабораторной службы Республики Беларусь (Минск, 2016); Российско-китайском конгрессе по медицинской микробиологии, эпидемиологии и клинической микологии (Санкт-Петербург, 2016); семинаре для врачей-бактериологов учреждений здравоохранения г. Минска «Актуальные вопросы клинической микробиологии и антимикробной химиотерапии» (Минск, 2016); Международной научно-практической конференции «Здоровье и окружающая среда», посвященной 90-летию санитарно-эпидемиологической службы Республики Беларусь (Минск, 2016); республиканском дне специалиста «Актуальные вопросы обеспечения государственного санитарного надзора за организациями

здравоохранения и профилактики инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи» (Витебск, 2016); областном семинаре «Об актуальных вопросах профилактики инфекционных заболеваний» (Гомель, 2017); областном обучающем семинаре «О профилактике внутрибольничных инфекций в стационарах. Профилактика антибиотикорезистентности госпитальной микрофлоры» (Гомель, 2017); республиканской научно-практической конференции с международным участием «Новые концепции и методы в микробиологии, вирусологии и иммунологии» (Минск, 2017); областном семинаре «Проблемы инфекционного контроля в стационаре» (Могилев, 2017); X Международной научной конференции «Микробные биотехнологии: фундаментальные и прикладные аспекты» (Минск, 2017); I съезде травматологов-ортопедов Центрального федерального округа (Смоленск, 2017); V Южно-российской конференции по антимикробной терапии и клинической микробиологии (Сочи, 2017); научно-практической конференции «Актуальные вопросы микробиологии, иммунологии и инфектологии» (Гродно, 2017); III Уральской конференции МАКМАХ по антимикробной терапии и клинической микробиологии (Челябинск, 2018), Международной научно-практической конференции «Молекулярная диагностика 2018» (Минск, 2018).

Результаты исследования внедрены в работу микробиологической лаборатории ГУ «Минский городской центр гигиены и эпидемиологии», микробиологической лаборатории № 2 УЗ «Могилевский областной центр гигиены, эпидемиологии и общественного здоровья», в научно-исследовательский процесс лаборатории эндокринологии и биохимии ГУ «Институт радиобиологии Национальной академии наук Беларуси», научно-исследовательской лаборатории УО «Гомельский государственный медицинский университет», в учебный процесс на кафедре микробиологии, вирусологии и иммунологии УО «Гомельский государственный медицинский университет», на кафедре клинической микробиологии УО «Витебский государственный медицинский университет». Совместно с НП ООО «Медбиотех» освоено серийное производство винтов, пластин и фиксаторов интрамедуллярных с антибактериальными покрытиями (ТУ ВУ 100070211.044-2015). Депонировано в Специализированную коллекцию вирусов и бактерий, патогенных для человека, ГУ «Республиканский научно-практический центр эпидемиологии и микробиологии» 32 экстремально-антибиотикорезистентных клинических изолята *A.baumannii*, *P.aeruginosa* и *K.pneumoniae* с различными механизмами антибиотикорезистентности. Передано ФГУП НПО «Микроген», Российская Федерация, 4 образца очищенных фаголизатов, содержащих бактериофаги *A.baumannii*, *P.aeruginosa* и *K.pneumoniae*.

### **Опубликование результатов диссертации**

По теме диссертации опубликовано: 26 статей в рецензируемых журналах, соответствующих пункту 18 «Положения о присуждении ученых степеней и присвоении ученых званий в Республике Беларусь» (общий объем – 18,5 авторских листа), включая 3 статьи в странах дальнего зарубежья и 8 статей в Российской Федерации; 38 других публикаций (19 статей и 19 тезисов в сборниках научных трудов, общий объем – 7,1 авторских листа). По результатам диссертации Министерством здравоохранения Республики Беларусь утверждены 3 инструкции по применению (1,1 авторских листа). Получено 2 патента. Разработаны и утверждены 1 технические условия. Общий объем опубликованных материалов – 26,7 авторских листа.

### **Структура и объем диссертации**

Диссертация изложена на 336 страницах компьютерного текста, состоит из введения, общей характеристики работы, 7 глав (обзор литературы, материал и методы, 5 глав результатов собственных исследований), заключения, библиографического списка и 6 приложений. Объем содержательной части диссертации составил 244 страницы, включая 56 таблиц (объем – 31 страница) и 78 рисунков (объем – 41 страница). Библиографический список включает 406 источников, из которых 32 русскоязычных и 374 иностранных, а также 70 собственных публикаций соискателя.

## **ОСНОВНАЯ ЧАСТЬ**

### **Материал и методы исследования**

В исследование включено 1119 штаммов *P.aeruginosa*, 502 штамма *A.baumannii* и 757 штаммов *K.pneumoniae*, выделенных из клинического материала пациентов в 2007–2017 гг. в 5 регионах Республики Беларусь и 4 городах Российской Федерации, а также 13 контрольных штаммов из Американской коллекции типовых культур микроорганизмов (АТСС) и 8 контрольных штаммов из коллекции НИИ антимикробной химиотерапии (г. Смоленск). В исследование включено 5 лекарственных средств для фаготерапии, активных в отношении *P.aeruginosa* и *K.pneumoniae*, 17 наименований официальных лекарственных растений в виде сухого измельченного растительного сырья, ацетоновые экстракты из 5 видов лишайников, 14 типов монокомпонентных и композиционных антибактериальных покрытий.

Чувствительность микроорганизмов к антибиотикам определяли диско-диффузионным методом на агаре Мюллера–Хинтона (МХА), автоматизированными методами с использованием микробиологических анализаторов АТВ Expression и VITEK 2 Compact (bioMérieux, Франция),

а также методом последовательных микроразведений в бульоне Мюллера–Хинтона (МХБ). Качество исследований контролировали штаммами *E.coli* ATCC 25922 и *P.aeruginosa* ATCC 27853. Результаты интерпретировали в соответствии с критериями Европейского комитета по определению чувствительности к антибиотикам (EUCAST).

Первичный фенотипический скрининг продукции метало- $\beta$ -лактамаз (МБЛ) выполнен методом двойных дисков с этилен-диамин-тетраацетатом (ЭДТА). Карбапенемазную активность выявляли в модифицированном Ходж-тесте и методом инактивации карбапенемов. Выявление генов карбапенемаз выполняли методом ПЦР в режиме «реального времени» с использованием диагностических наборов производства ФБУН ЦНИИ эпидемиологии Роспотребнадзора, г. Москва: АмплиСенс MDR KPC/OXA-48-FL (*bla*<sub>KPC</sub> и *bla*<sub>OXA-48</sub>), АмплиСенс MDR MBL-FL (*bla*<sub>VIM</sub>, *bla*<sub>IMP</sub>, *bla*<sub>NDM</sub>), АмплиСенс MDR Ab-OXA-FL (*bla*<sub>OXA-23</sub>, *bla*<sub>OXA-40</sub>, *bla*<sub>OXA-58</sub>).

Определение вариабельности мультилокусных tandemных повторов (MLVA-типирование) МБЛ-продуцирующих изолятов *P.aeruginosa* выполнено по схеме L. Onteniente et al., выполнена оценка количества tandemных повторов в шести VNTR-локусах. Размер продуктов амплификации определен методом капиллярного электрофореза с флуоресцентной детекцией (фрагментный анализ) на автоматическом секвенаторе ABI-310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems). Мультилокусное секвенирование-типирование (MLST) *P.aeruginosa* выполнено в соответствии со стандартным протоколом (<http://pubmlst.org/paeruginosa/info/primers.shtml>), определена структура нуклеотидных последовательностей внутренних участков генов *acsA*, *aroE*, *guaA*, *mutL*, *nuoD*, *ppsA* и *trpE*. Для оценки генетического разнообразия штаммов *A. baumannii* использовали метод SNP-типирования, основанный на анализе однонуклеотидных полиморфизмов (SNP) в десяти хромосомных локусах (*gltA*, *recA*, *cpn60*, *gyrB*, *gdhB*, *rpoD*, *fusA*, *pyrG*, *rplB* и *rpoB*), используемых в существующих схемах MLST *A. baumannii*. Детекцию SNP в указанных локусах проводили с помощью аллель-специфичной ПЦР в режиме реального времени с универсальными флуорогенными праймерами (AmpliFluor). Кластерный анализ SNP профилей осуществляли с помощью онлайн ресурса SNPTAb (<http://snptab.antibiotic.ru>) и программы PHYLOViZ 2 (<http://www.phyloviz.net>).

Кинетику микробного роста *K.pneumoniae* оценивали при инкубации культур в микропланшетном ридере Infinite M200 (TECAN, Австрия) с измерением оптической плотности в ячейках на длине волны 600 нм (OD<sub>600</sub>). Конкурентные взаимоотношения между антибиотикорезистентными и антибиотикочувствительными (wild type – WT) штаммами *K.pneumoniae* оценивали в парном эксперименте с одномоментным внесением в бульонную питательную среду двух конкурирующих штаммов. Индекс конкуренции (КИ)

рассчитывали как соотношение финальных концентраций штамма-продуцента карбапенемазы и WT-штамма. Определение чувствительности *K.pneumoniae* к дезинфицирующим средствам (ДС) выполнено суспензионным методом.

Определение чувствительности *P.aeruginosa*, *A.baumannii* и *K.pneumoniae* к комбинациям антибиотиков выполнено методом «шахматной доски» и методом градиентной диффузии (кросс-тест), рассчитывали индекс фракционной подавляющей концентрации ( $\Sigma$ ФПК). Для определения бактерицидности комбинаций антибиотиков использовали модифицированный метод МСВТ (Multiple combination bactericidal testing, тестирование бактерицидности различных комбинаций). Для каждого штамма выполняли тестирование бактерицидности 11 комбинаций из двух антибиотиков, взятых в фиксированных ФК/ФД концентрациях, для панрезистентных штаммов *P.aeruginosa* и *K.pneumoniae* дополнительно определена бактерицидность комбинаций из 3 антибиотиков.

Определение чувствительности микроорганизмов к лекарственным средствам для фаготерапии выполняли капельным методом (спот-тест). Для обнаружения бактериофагов, активных в отношении XDR изолятов *P.aeruginosa* и *K.pneumoniae*, выполняли совместную инкубацию в триптон-соевом бульоне XDR-штаммов и образцов воды, взятых из рек Беларуси, с последующим центрифугированием и стерилизующей фильтрацией супернатантов. Спектр активности полученных фаголизатов определяли в спот-тесте. Антибактериальную активность растительных экстрактов и экстрактов из лишайников определяли методом последовательных микроразведений в МХБ. Эффекты сочетанного действия растительных экстрактов с антибиотиками оценивали модифицированным диско-диффузионным методом, сравнивая диаметры зон подавления вокруг дисков с антибиотиками на МХА и МХА с добавлением 1/4 и 1/8 от МПК растительных экстрактов, а также методом «шахматной доски».

Изучение поверхностной бактерицидной активности монокомпонентных и композиционных антибактериальных покрытий проводили в соответствии с Японским промышленным стандартом JIS Z 2801: 2000. Для определения устойчивости покрытий к механическим воздействиям выполняли отмывку титановых пластин с нанесенными покрытиями в присутствии абразива, с последующей стерилизацией образцов и определением поверхностной бактерицидной активности. Кинетические особенности вымывания наночастиц серебра из покрытий изучали методом плазменной масс-спектрометрии (масс-спектрометр ELAN 9000, PerkinElmer, США), определяли изменения концентраций серебра в отмывочных растворах. Для оценки интенсивности формирования микробных биопленок на поверхности антибактериальных покрытий выполняли инкубацию пластин с покрытиями в питательном

бульоне, содержащем антибиотикочувствительные и XDR штаммы. Сформированные биопленки окрашивали водным раствором кристаллического фиолетового, обесцвечивали 96%-ным этанолом и определяли концентрацию красителя в отмывочных растворах. Считали, что биомасса биопленки прямо пропорциональна концентрации красителя.

Для выбора оптимального режима стерилизации изделий с антибактериальными покрытиями вискозиметрическим методом определяли средневязкостную молекулярную массу ( $M_v$ ) поли-L-лактида, стерилизованного паровым, воздушным и радиационным методами в различных режимах.

Цитотоксичность покрытий изучали в отношении первичной культуры фибробластов кожи, клеточной линии кератиноцитов HaCaT и клеточной культуры HEp-2 (Cincinnati). Оценивали морфологию сформированного монослоя в планшетах с покрытиями и в контрольных планшетах, а также метаболическую активность клеток по образованию флуоресцентного соединения резорфина при восстановлении резазурина. Исследования местного действия имплантатов с антибактериальными покрытиями выполнено в соответствии с ГОСТ ИСО 10993-6:2007. Титановые стержни с покрытиями и контрольные стержни имплантировали нелинейным лабораторным крысам. Для оценки патоморфологических изменений тканей в месте имплантации использовалась полуколичественная оценка местного биологического действия.

Полученные результаты проанализированы с помощью программного обеспечения WHONET v.5.6 (ВОЗ, Женева) – оценка результатов антибиотикорезистентности, формирование и анализ профилей антибиотикорезистентности; Microsoft Excel 2007 – составление баз данных; Prism 6.04 (GraphPad Software Inc.) – графическая обработка результатов кинетических экспериментов; BioNumerics v.6 (Applied Maths) – кластерный анализ MLVA профилей; PHYLOViZ 2.0 (GitHub Inc.) – кластерный анализ SNP профилей. Статистическая обработка выполнена с использованием статистического модуля программы Microsoft Excel 2007 и программы Prism 6.04. Используются параметрические и непараметрические статистические критерии в зависимости от цели исследования и параметров распределения данных. Статистически значимыми считали различия при уровне  $p \leq 0,05$ .

## Результаты исследования

### **Распространенность штаммов *P.aeruginosa*, *A.baumannii*, *K.pneumoniae* и их антибиотикорезистентность**

Из 6186 этиологически значимых штаммов микроорганизмов, выделенных в 2012–2015 гг. от госпитализированных пациентов в г. Гомеле, 1417 штаммов (22,9%; 95% ДИ 21,9–24,0) относились к видам *A.baumannii*, *P.aeruginosa* и *K.pneumoniae*. Доля штаммов *P.aeruginosa* среди всех бактериальных

возбудителей изменялась с 13,2% (95% ДИ 11,2–15,3) в 2012 г. до 10,7% (95% ДИ 9,4–12,2) в 2015 г. Отмечено увеличение частоты выделения *A.baumannii* от госпитализированных пациентов: в 2012 году было выделено 43 штамма (или 4,0% от всех положительных клинических образцов; 95% ДИ 2,8–5,2), в 2013 – 69 штаммов (4,5%; 95% ДИ 3,5–5,5), в 2014 – 78 штаммов (5,0%; 95% ДИ 3,9–6,1), в 2015 – 115 штаммов (5,7%; 95% ДИ 4,7–6,8). Частота выделения *K.pneumoniae* существенно не изменялась и находилась на уровне 7,0% (95% ДИ 5,7–8,2) – 7,8% (95% ДИ 6,2–9,5).

В период с 2012 г. по 2015 г. отмечается увеличение доли устойчивых штаммов *P.aeruginosa*: к гентамицину с 62,0% до 89,4% ( $\chi^2=38,04$ ;  $p<0,001$ ), к амикацину с 62,7% до 90,3% ( $\chi^2=39,81$ ;  $p<0,001$ ), к ципрофлоксацину с 75,4% до 93,5% ( $\chi^2=23,93$ ;  $p<0,001$ ). В период с 2012 г. по 2015 г. отмечается увеличение доли устойчивых штаммов *A.baumannii*: к имипенему с 79,1% до 95,7% ( $\chi^2=10,66$ ;  $p=0,002$ ), к меропенему с 79,1% до 96,5% ( $\chi^2=12,62$ ;  $p<0,001$ ), к гентамицину с 67,4% до 83,5% ( $\chi^2=4,87$ ;  $p=0,028$ ), к амикацину с 72,1% до 92,2% ( $\chi^2=10,95$ ;  $p<0,001$ ), к ципрофлоксацину с 76,7% до 92,2% ( $\chi^2=7,04$ ;  $p=0,008$ ). В период с 2012 г. по 2015 г. устойчивыми к цефотаксиму были более 60% штаммов *K.pneumoniae*, к цефепиму – более 80%. Отмечено появление и увеличение устойчивости *K.pneumoniae* к карбапенемам (12,5% нечувствительных к имипенему и 17,5% нечувствительных к меропенему штаммов в 2015 году), а также снижение уровней резистентности к гентамицину с 65,8% до 43,8% ( $\chi^2=9,06$ ;  $p=0,003$ ) и ципрофлоксацину с 78,5% до 61,8% ( $\chi^2=5,94$ ;  $p=0,015$ ).

Показано увеличение доли штаммов *P.aeruginosa* с возможным XDR-фенотипом с 0% в 2012 г. до 20,4% в 2015 г. ( $\chi^2=32,98$ ;  $p<0,001$ ). Отмечена выраженная динамика среднего многолетнего темпа прироста доли штаммов *P.aeruginosa* с MDR и возможным XDR фенотипом ( $R^2=0,884$ ), а также выраженная динамика среднего многолетнего темпа убыли доли штаммов *K.pneumoniae* с MDR и возможным XDR фенотипом ( $R^2=0,999$ ). Для *A.baumannii* отмечено двукратное увеличение доли штаммов с возможным XDR фенотипом с 32,6% в 2012 г. до 64,3% в 2015 г. ( $\chi^2=12,82$ ;  $p<0,001$ ) и уменьшение доли штаммов с MDR фенотипом с 53,5% в 2012 г. до 31,3% в 2015 г. ( $\chi^2=6,58$ ;  $p=0,011$ ), динамика среднего многолетнего темпа прироста доли штаммов с MDR и возможным XDR фенотипом отсутствовала ( $R^2=0,184$ ).

### **Карбапенемазы *P.aeruginosa***

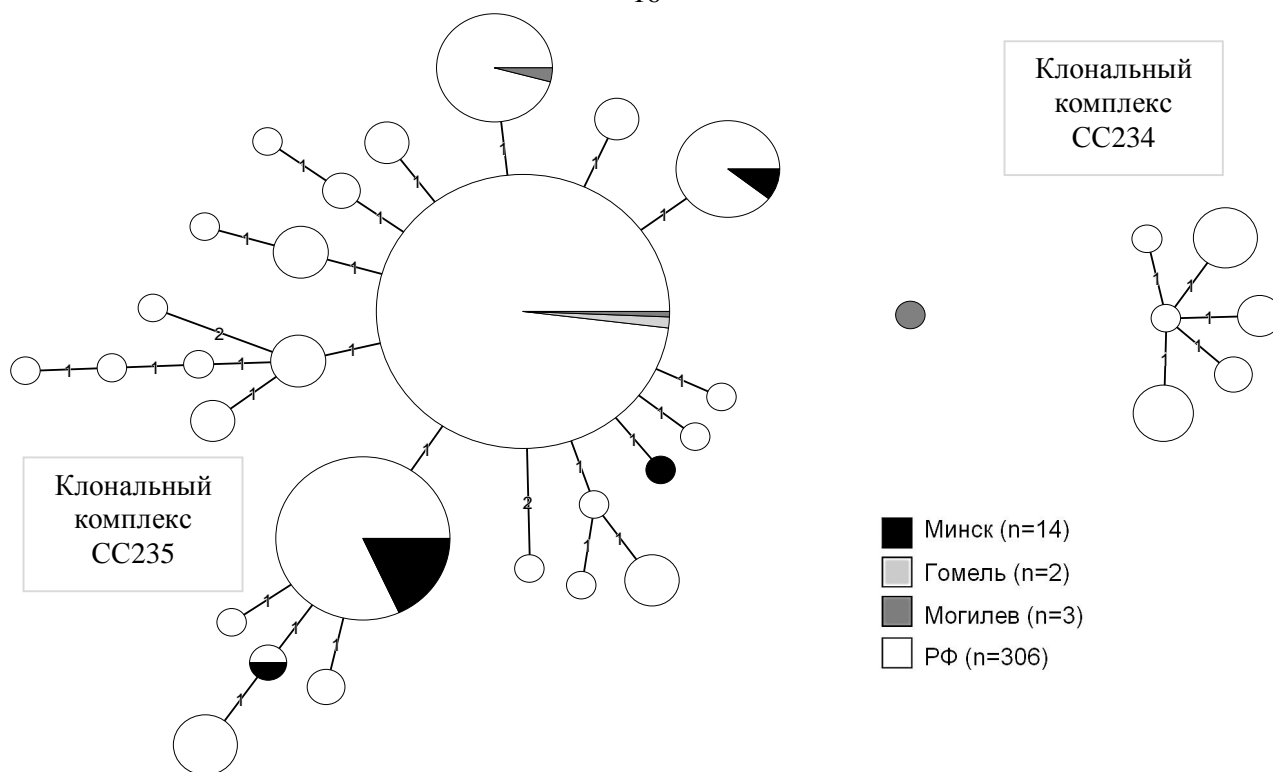
Среди 107 карбапенеморезистентных штаммов *P.aeruginosa*, выделенных в 2007–2009 гг. в 18 организациях здравоохранения 5 городов Беларуси с помощью метода «двойных дисков с ЭДТА», выявлено 19 (17,8%) МБЛ-позитивных штаммов. Продуценты МБЛ выделены в Гомеле (2 штамма), Могилеве (3 штамма) и Минске (14 штаммов). Не выявлено МБЛ-продуцентов



среди штаммов *P.aeruginosa* из организаций здравоохранения Гродно и Витебска. Все МБЛ-продуцирующие штаммы являлись XDR и имели сходные фенотипы антибиотикорезистентности (устойчивость к тикарциллину, тикарциллин/клавуланату, пиперациллину, пиперациллин-тазобактаму, цефепиму, имипенему, меропенему, цефтазидиму, амикацину, гентамицину, тобрамицину, ципрофлоксацину). У всех 19 МБЛ-продуцирующих штаммов в ПЦР амплифицировался участок *bla<sub>VIM</sub>*-гена. По результатам MLVA-типирования показана принадлежность 18 из 19 МБЛ-позитивных штаммов *P.aeruginosa* к единому клональному комплексу, о чем свидетельствует совпадение числа tandemных повторов по 5–6 VNTR-локусам. Так, 10 из 19 МБЛ-позитивных штаммов *P.aeruginosa* имели общий MLVA-паттерн 109-225-392-826-180-191 (последовательно представлены размеры ампликонов для локусов ms061-ms127-ms077-ms172-ms142-ms010), другие проанализированные штаммы отличались от доминирующего MLVA-паттерна количеством tandemных повторов в одном или двух из шести анализируемых VNTR-локусов (в ms061 или ms010). Штамм *P.aeruginosa* 2950 (Могилев) с MLVA-паттерном 139-210-392-826-961-233 отличался от преобладающего MLVA-паттерна по четырем VNTR-локусам. Проведен кластерный анализ MLVA-паттернов с использованием алгоритма UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic mean) для 19 МБЛ-позитивных штаммов *P.aeruginosa*, выделенных в Беларуси, и 306 МБЛ-позитивных штаммов *P.aeruginosa*, выделенных в Российской Федерации (рисунок 1).

Выявлена принадлежность 18 МБЛ-позитивных штаммов *P.aeruginosa*, выделенных на территории Беларуси, к клональному комплексу (кластер CC235 по результатам мультилокусного сиквенс-типирования), также широко представленному в Российской Федерации. Методом ПЦР-ПДРФ (анализ полиморфизма длины рестриционных фрагментов) изучена структура МБЛ-кодирующих интегров для *P.aeruginosa* 2950 и других МБЛ-продуцирующих штаммов *P.aeruginosa*, выделенных в Беларуси и Российской Федерации.

Показано, что гены *bla<sub>VIM</sub>* у всех МБЛ-продуцирующих штаммов, выделенных на территории Беларуси, и у большей части МБЛ-VIM-продуцирующих штаммов, выделенных в Российской Федерации, входили в состав интегрона I класса, имеющего нуклеотидную последовательность, соответствующую GenBank Acc. No. DQ522233. Штамм *P.aeruginosa* 2950 не является частью CC235, но имеет идентичную с представителями CC235 структуру МБЛ-кодирующего интегрона, что свидетельствует о его горизонтальном переносе.



Узлы дендрограммы соответствуют различным профилям MLVA; размер каждого узла пропорционален числу изолятов. Линии связывают родственные типы, отличающиеся минимальным числом VNTR локусов, количество отличающихся локусов указано на линиях.

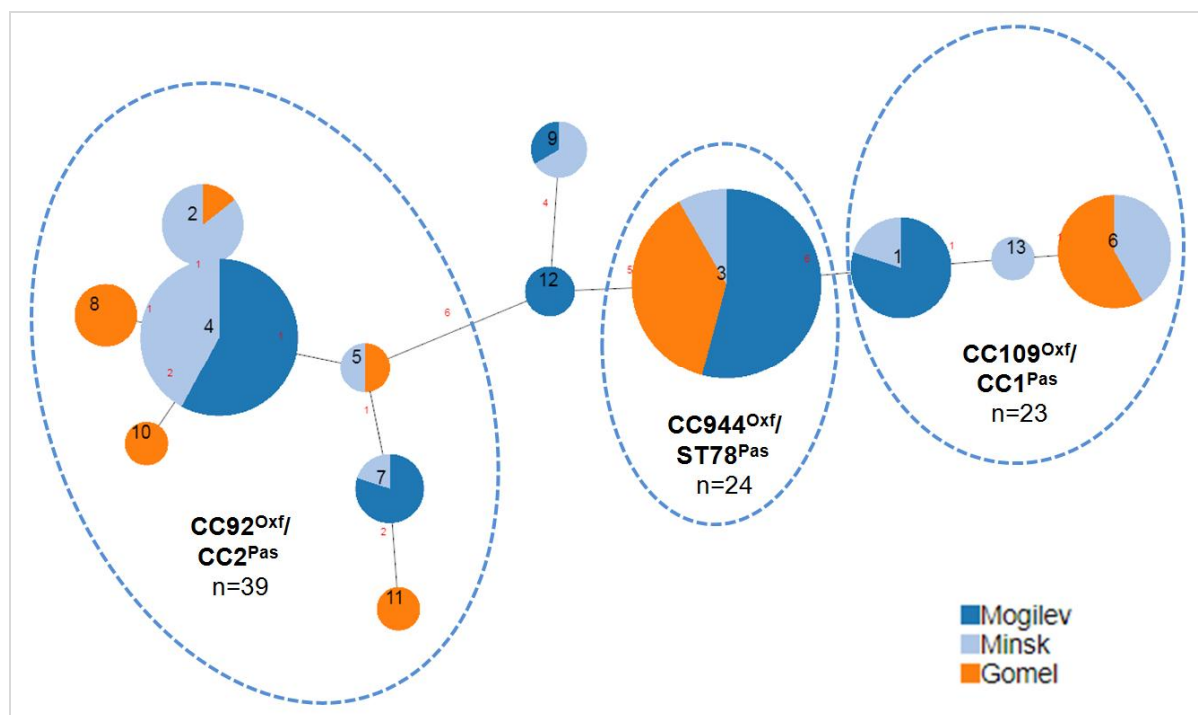
**Рисунок 1. – Дендрограмма минимальных дистанций, построенная по результатам кластерного анализа MLVA профилей МБЛ-продуцирующих штаммов *P.aeruginosa*, выделенных в Беларуси и Российской Федерации**

### Карбапенемазы *A.baumannii*

Среди 107 карбапенеморезистентных штаммов *A.baumannii*, выделенных в 2014–2015 гг. от госпитализированных пациентов в 3 городах Беларуси (Гомель – 23 штамма, Могилев – 44 штамма, Минск – 40 штаммов), с использованием ПЦР выявлено присутствие генов OXA-карбапенемаз у 76 штаммов (71,0%): *bla*<sub>OXA-23</sub> – у 3 штаммов (2,8%), *bla*<sub>OXA-40</sub> – у 71 штамма (67,0%), сочетание *bla*<sub>OXA-23</sub> и *bla*<sub>OXA-40</sub> – у 2 штаммов (1,9%). Все продуценты карбапенемаз были устойчивыми к цефтазидиму, цефепиму, имипенему, меропенему, ципрофлоксацину. Устойчивыми к амикацину были 98,7% карбапенемазопродуцирующих штаммов, к доксициклину – 43,4%, к ампициллину/сульбактаму – 57,9%.

К категории XDR было отнесено 14,5% карбапенемазопродуцирующих штаммов *A.baumannii*, еще 71,1% штаммов отнесены к категории «возможная XDR». По результатам SNP-типирования карбапенемазопродуцирующие штаммы *A.baumannii* отнесены к 13 различным генотипам, входящим в 5 клональных комплексов. Установлено преобладание штаммов трех групп, относящихся к международным клональным комплексам: CC92<sup>OXF</sup>/CC2<sup>PAS</sup> –

39 штаммов (42,9%), представленных 7 родственными генотипами, CC109<sup>OXF</sup>/CC1<sup>PAS</sup> – 23 штамма (25,3%), представленных родственными генотипами, CC944<sup>OXF</sup>/ST78<sup>PAS</sup> – 24 штамма (26,4%), представленных 1 генотипом (рисунок 2). Гены карбапенемазы OXA-23 были выявлены у штаммов, принадлежащих к 3 различным генотипам, в том числе к входящим в международные клональные комплексы CC92<sup>OXF</sup>/CC2<sup>PAS</sup> и CC109<sup>OXF</sup>/CC1<sup>PAS</sup>.



Точки соответствуют различным генотипам. Размеры точек пропорциональны числу штаммов. Группы, относящиеся к доминирующим международным клональным комплексам, выделены пунктирными линиями.

**Рисунок 2. – Генетическое разнообразие карбапенемазопродуцирующих штаммов *A.baumannii* в Беларуси по данным SNP-типирования, кластерный анализ SNP-профилей (PHYLOViZ 2.0)**

Гены карбапенемазы OXA-40 выявлены у штаммов, принадлежащих к 11 генотипам, в том числе к входящим в международные клональные комплексы CC92<sup>OXF</sup>/CC2<sup>PAS</sup> (38 штаммов), CC109<sup>OXF</sup>/CC1<sup>PAS</sup> (20 штаммов) и CC944<sup>OXF</sup>/ST78<sup>PAS</sup> (24 штамма). Два штамма, несущие одновременно гены двух различных карбапенемаз (OXA-23 и OXA-40), были отнесены к одному генотипу, принадлежащему к CC109<sup>OXF</sup>/CC1<sup>PAS</sup>.

### **Карбапенемазы *K.pneumoniae***

Среди 208 штаммов *K.pneumoniae*, выделенных в 2014–2016 гг. от госпитализированных пациентов в 4 городах Беларуси (Гомель – 90 штаммов, Могилев – 72 штамма, Минск – 32 штамма, Витебск – 14 штаммов), *bla*<sub>NDM</sub>-гены выявлены у 16 штаммов (7,7%), *bla*<sub>OXA-48</sub> – у 27 штаммов (13,0%), *bla*<sub>KPC</sub> – у 13 штаммов (6,3%). Продуценты NDM были выделены

в 8 организациях здравоохранения трех городов, продуценты карбапенемазы ОХА-48 – в 7 организациях здравоохранения трех городов, продуценты карбапенемазы КРС – в единственной организации здравоохранения (г. Витебск).

### **Кинетика микробного роста и конкурентоспособность *K.pneumoniae* – продуцентов карбапенемаз**

Максимальная экспоненциальная скорость роста штаммов дикого типа (WT) была статистически значимо выше ( $p=0,008$ ), чем у продуцентов карбапенемаз. Средние значения показателя по группам составили: WT ( $n=14$ ) –  $1,814\pm 0,067$ ; ОХА-48 ( $n=13$ ) –  $1,599\pm 0,034$ ,  $p=0,021$ ; NDM ( $n=6$ ) –  $1,471\pm 0,151$ ,  $p=0,005$ ; КРС ( $n=14$ ) –  $1,633\pm 0,040$ ,  $p=0,027$ . Среднее значение продолжительности индуктивной фазы ( $T_{lag}$ ) у WT-штаммов *K.pneumoniae* составило  $1,211\pm 0,037$  ч, продуценты карбапенемаз, за исключением продуцентов NDM, демонстрировали тенденцию ( $p=0,070$ , ANOVA) к снижению этого показателя (ОХА-48:  $1,101\pm 0,066$ ,  $p=0,381$ ; NDM:  $1,177\pm 0,108$ ,  $p=0,762$ ; КРС:  $0,985\pm 0,072$ ,  $p=0,034$ ). В экспериментах с парными культурами для 10 из 11 пар финальные концентрации WT-штаммов в смеси превышали концентрации продуцентов карбапенемаз, константы скорости отбора  $s$  для пар с продуцентами NDM ( $n=4$ ) составили  $(-0,048)\pm 0,028$ , для пар с продуцентами ОХА-48 ( $n=3$ ) –  $(-0,082)\pm 0,029$ , для пар с продуцентами КРС ( $n=4$ ) –  $(-0,075)\pm 0,029$ . Отрицательные значения константы  $s$  указывают на низкую конкурентоспособность большинства карбапенеморезистентных штаммов при их совместном культивировании со штаммами, сохраняющими чувствительность к антибиотикам.

### **Распространенность карбапенемазопродуцирующих бактерий в Гомельской области**

В 2016–2017 гг. в рамках функционирования системы микробиологического мониторинга отобрано 343 MDR или XDR штамма *P.aeruginosa*, *A.baumannii*, *K.pneumoniae*, выделенных от госпитализированных пациентов. Наличие генов карбапенемаз выявлено у 14 штаммов *P.aeruginosa* (у всех МБЛ VIM), 61 штамма *A.baumannii* (ОХА-23 – 1 штамм, ОХА-40 – 60 штаммов) и 36 штаммов *K.pneumoniae* (ОХА-48 – 24 штамма, КРС – 1 штамм, МБЛ NDM – 11 штаммов), выделенных в 9 организациях здравоохранения Гомеля и 7 центральных районных больницах. В 5 организациях здравоохранения отмечена одновременная циркуляция продуцентов карбапенемаз 3–4 различных групп, в 4 организациях здравоохранения – продуцентов карбапенемаз 2 различных групп. Продуценты карбапенемаз были выделены из раневого отделяемого и интраоперационного материала – 37,8% штаммов, материалов из дыхательной системы (мокроты, промывных вод бронхов, браш-биоптатов) – 35,1%, мочи – 11,7%. Из крови было выделено 8 штаммов (7,2%), в том числе 5 штаммов *A.baumannii*

с продукцией карбапенемазы ОХА-40 и 3 штамма *K.pneumoniae* с продукцией карбапенемаз NDM (2 штамма) и ОХА-48 (1 штамм). От пациентов отделений реанимации и интенсивной терапии выделено 45,9% продуцентов карбапенемаз, от пациентов отделений хирургического профиля и ожогового отделения – соответственно 35,1% и 13,5%. Нечувствительными к колистину были 14,3% карбапенемазопродуцирующих *P.aeruginosa* (2 штамма), 3,3% *A.baumannii* (2 штамма) и 11,1% *K.pneumoniae* (4 штамма). Фенотип MDR имели 32 (28,8%) карбапенемазопродуцирующих штамма, фенотип XDR – 77 (69,4%) штаммов, фенотип PDR – 2 (1,8%) штамма.

#### **Чувствительность карбапенемазопродуцирующих штаммов *K.pneumoniae* к дезинфицирующим средствам**

Определения чувствительности к 7 ДС («Виродез», «Гексадекон», «Гликодез», «Дуацид», «Оксидез», «Хлороцид», «Диайсид») выполнено для 22 карбапенемазопродуцирующих клинических изолятов *K.pneumoniae*, выделенных в 2016–2017 гг. в Гомельской области. Не обнаружено штаммов, устойчивых к рабочей концентрации какого-либо из включенных в исследование ДС. В концентрации 1/4 от рабочей оказывали бактерицидное действие на все штаммы 5 из 7 ДС («Гексадекон», «Дуацид», «Оксидез», «Хлороцид», «Диайсид»), при этом 4 из них («Дуацид», «Оксидез», «Хлороцид», «Диайсид») также проявляли бактерицидную активность в концентрации 1/16 от рабочей в отношении 95,5–100% исследуемых штаммов.

#### **Чувствительность XDR штаммов *P.aeruginosa* к комбинациям антибиотиков, определенная методом градиентной диффузии**

Оценка эффективности комбинаций антибиотиков методом градиентной диффузии (кросс-тест) проведена для 8 XDR штаммов *P.aeruginosa*, выделенных в организациях здравоохранения Республики Беларусь (Гомель, Минск, Могилев) и Российской Федерации (Москва, Казань, Новосибирск, Якутск). Все штаммы имели генную кассету *bla<sub>VIM-2</sub>*, кодирующую МБЛ VIM-2, и принадлежали к ST235. Для комбинаций с включением колистина (колистин+азтреонам, колистин+цефтазидим, колистин+амикацин, колистин+меропенем, колистин+левофлоксацин) отмечен нейтральный эффект (ΣФПК от 1,18 до 2,0). Комбинация азтреонам+амикацин проявляла аддитивный эффект в отношении двух штаммов (ΣФПК 0,875 и 1,0), комбинация цефтазидим+амикацин была аддитивной для трех штаммов (ΣФПК 0,56; 0,875; 1,0), для остальных штаммов эффект данных комбинаций нейтральный. Комбинация меропенем+амикацин была аддитивной для одного штамма (ΣФПК 0,875). Не обнаружено комбинаций антибиотиков как с синергидным, так и с антагонистическим эффектом. Ограничением метода явилась невозможность тестирования в составе комбинаций антибиотиков, для которых у микроорганизмов сформированы высокие значения МПК.

### **Чувствительность XDR штаммов *A.baumannii* к комбинациям антибиотиков, определенная методом «шахматной доски»**

Оценка эффективности комбинаций антибиотиков методом «шахматной доски» выполнена для 4 XDR штаммов *A.baumannii*. Все штаммы были устойчивы к цефтазидиму (МПК 96–256 мкг/мл), карбапенемам (МПК имипенема >32 мкг/мл, МПК меропенема >32 мкг/мл), аминогликозидам (МПК амикацина >256 мкг/мл, МПК нетилмицина >256 мкг/мл), левофлоксацину (МПК >32 мкг/мл), но сохраняли чувствительность к полимиксину Б (МПК 0,19–0,5 мкг/мл). МПК сульбактама – от 16 до 64 мкг/мл, МПК рифампицина – от 4 до 16 мкг/мл. В соответствии с полученными значениями МПК для тестирования в составе комбинаций были выбраны полимиксин, рифампицин и сульбактам. Наилучшая микробиологическая эффективность отмечена для комбинации полимиксин+рифампицин ( $\Sigma\text{ФПК} \leq 0,5$  для всех штаммов, синергизм). Комбинация полимиксин+сульбактам была синергидной для трех из четырех штаммов ( $\Sigma\text{ФПК} = 0,5$ ), комбинация рифампицин+сульбактам была синергидной только для двух из четырех штаммов ( $\Sigma\text{ФПК} = 0,5$ ), в остальных случаях отмечен аддитивный эффект ( $\Sigma\text{ФПК} = 1$ ).

### **Бактерицидная активность комбинаций антибиотиков, определенная методом МСВТ**

Чувствительность к комбинациям антибиотиков определена для 63 карбапенемазопродуцирующих штаммов *K.pneumoniae* (продуценты карбапенемазы NDM – 5 штаммов, ОХА-48 – 41 штамм, NDM+ОХА-48 – 2 штамма, КРС – 15 штаммов) выделенных в 8 городах Беларуси. Чувствительными к тигециклину были 88,9% штаммов (МПК<sub>50</sub> – 1 мкг/мл, МПК<sub>90</sub> – 2 мкг/мл), чувствительными к колистину – 57,1% штаммов (МПК<sub>50</sub> – 2 мкг/мл, МПК<sub>90</sub> – 8 мкг/мл). Результаты определения чувствительности *K.pneumoniae* к комбинациям антибиотиков проанализированы отдельно для колистин-чувствительных штаммов (n=36, МПК колистина  $\leq 2$  мкг/мл) и колистин-нечувствительных штаммов (n=27, МПК колистина 4–32 мкг/мл). Бактерицидный эффект комбинации меропенем+амикацин был отмечен в отношении 51,9% колистин-чувствительных и 44,4%, колистин-нечувствительных штаммов, комбинации меропенем+левофлоксацин – соответственно 7,4% и 11,1%, меропенем+фосфомицин – 3,7% и 16,7%, меропенем+тигециклин – 3,7% и 8,3%, меропенем+колистин – 7,4% и 80,6%, амикацин+колистин – 44,4% и 88,9%, левофлоксацин+колистин – 7,4% и 80,6%, тигециклин+колистин – 11,1% и 100,0%, фосфомицин+колистин – 11,1% и 88,9%, амикацин+левофлоксацин – 51,9% и 35,1%, амикацин+тигециклин – 7,4% и 38,9%. Бактерицидная активность комбинаций меропенем+амикацин и амикацин+левофлоксацин в отношении 51,9% колистин-нечувствительных штаммов *K.pneumoniae* может быть проявлением синергидного эффекта.

В отношении 11 штаммов *K.pneumoniae* (17,5%) ни одна из двойных комбинаций не проявляла бактерицидного действия. Все они были устойчивы к колистину (МПК 8–16 мкг/мл) и меропенему (МПК 64–1024 мкг/мл) и являлись продуцентами карбапенемаз ОХА-48 (9 штаммов) и КРС (2 штамма).

Выполнено определение чувствительности к 11 комбинациям антибиотиков для 31 штамма *P.aeruginosa* – продуцентов МБЛ VIM, выделенных в 4 городах Беларуси. Чувствительными к колистину были 48,4% штаммов (МПК<sub>50</sub> – 4 мкг/мл, МПК<sub>90</sub> – 8 мкг/мл). Все штаммы имели устойчивость к карбапенемам (меропенем: МПК<sub>50</sub> – 256 мкг/мл, МПК<sub>90</sub> – 512 мкг/мл; имипенем: МПК<sub>50</sub> – 512 мкг/мл, МПК<sub>90</sub> – 512 мкг/мл) и цефтазидиму (МПК<sub>50</sub> – 64 мкг/мл, МПК<sub>90</sub> – 128 мкг/мл). Бактерицидный эффект комбинации меропенем+амикацин был отмечен в отношении 12,9% штаммов, комбинации меропенем+левофлоксацин – 0,0%, меропенем+колистин – 71,0%, имипенем+амикацин – 12,9%, имипенем+левофлоксацин – 0,0%, имипенем+колистин – 67,7%, цефтазидим+амикацин – 41,9%, цефтазидим+левофлоксацин – 0,0%, цефтазидим+колистин – 38,7%, амикацин+колистин – 45,2%, левофлоксацин+колистин – 58,1%. Только в отношении 3 штаммов (9,7%) МБЛ-продуцирующих *P.aeruginosa* не проявляла бактерицидной активности ни одна из 11 комбинаций, еще 3 штамма были чувствительны только к одной из 11 комбинаций (меропенем+колистин или имипенем+колистин).

Для 11 карбапенемазопродуцирующих штаммов *K.pneumoniae*, устойчивых ко всем двойным комбинациям антибиотиков, а также для 6 МБЛ-продуцирующих штаммов *P.aeruginosa*, устойчивых к 10–11 двойным комбинациям антибиотиков, модифицированным методом МСВТ проведено определение чувствительности к дополнительным 11 двойным и тройным комбинациям антибиотиков, включающим ФК/ФД концентрации ванкомицина или рифампицина. Комбинации ванкомицин+имипенем, ванкомицин+амикацин, рифампицин+амикацин не проявляли бактерицидной активности. Комбинации ванкомицин+колистин+меропенем, рифампицин+колистин+меропенем и рифампицин+колистин+амикацин были бактерицидными в отношении 100,0% включенных в дополнительное тестирование штаммов *P.aeruginosa*. Комбинация рифампицин+колистин+амикацин оказывала бактерицидное действие на 90,9% штаммов *K.pneumoniae*, устойчивых к действию всех двойных комбинаций антибиотиков из основного набора, комбинации рифампицин+колистин и рифампицин+колистин+меропенем были бактерицидными соответственно для 45,5% и 54,5% штаммов *K.pneumoniae*. Только для 1 штамма *K.pneumoniae* не было обнаружено ни одной комбинации антибиотиков с бактерицидной активностью (продуцент карбапенемазы ОХА-48 с МПК меропенема 128 мкг/мл, МПК колистина 16 мкг/мл).

Выполнено определение чувствительности к 11 комбинациям антибиотиков для 84 штаммов *A.baumannii* – продуцентов ОХА-карбапенемаз, выделенных в 8 городах Беларуси. Чувствительными к колистину были 97,6% штаммов (МПК<sub>50</sub> – 0,5 мкг/мл, МПК<sub>90</sub> – 2 мкг/мл). Все штаммы были устойчивыми к меропенему (МПК<sub>50</sub> – 128 мкг/мл, МПК<sub>90</sub> – 256 мкг/мл). Чувствительными к сульбактаму были 14,3% штаммов (МПК<sub>50</sub> – 16 мкг/мл, МПК<sub>90</sub> – 64 мкг/мл), к тигециклину – 97,6% штаммов (МПК<sub>50</sub> – 0,5 мкг/мл, МПК<sub>90</sub> – 1 мкг/мл). Бактерицидный эффект комбинации меропенем+амикацин был отмечен в отношении 8,3% штаммов, комбинации меропенем+левофлоксацин – 0,0%, меропенем+сульбактам – 8,3%, меропенем+тигециклин – 3,6%, меропенем+колистин – 98,8%, амикацин+ колистин – 98,8%, левофлоксацин+колистин – 96,4%, сульбактам+колистин – 97,6%, тигециклин+колистин – 94,0%, тигециклин+сульбактам – 25,0%, амикацин+сульбактам – 27,45.

Таким образом, с использованием модифицированного метода МСВТ удалось обнаружить бактерицидные комбинации антибиотиков для 177 (99,4%) включенных в исследование штаммов *P.aeruginosa*, *A.baumannii* и *K.pneumoniae*. Выявлена видовая и штаммовая специфичность проявления бактерицидной активности комбинаций антибиотиков, связанная с различиями индивидуальных значений МПК антибиотиков для разных штаммов и сочетанием у них различных механизмов антибиотикорезистентности.

#### **Литическая активность бактериофагов в отношении *P.aeruginosa* и *K.pneumoniae***

Достаточный уровень литической активности (3+ или 4+) «Бактериофага синегнойного» (г. Пермь) выявлен в отношении 25,3% штаммов *P.aeruginosa*, «Бактериофага синегнойного» (г. Н.Новгород) – 22,2% штаммов, «Секстафага» (г. Пермь) – 24,1% штаммов, «Пиобактериофага» (г. Уфа) – 15,4% штаммов. «Бактериофаг клебсиелл» (г. Уфа) лизировал с интенсивностью 3+ или 4+ только 22,0% штаммов *K.pneumoniae*, «Пиобактериофага» (г. Уфа) – 16,5% штаммов, «Секстафага» (г. Пермь) – 28,4% штаммов. Отмечено значительное снижение (в 1,5–7 раза) доли фагочувствительных штаммов среди XDR микроорганизмов по сравнению со штаммами, сохраняющим чувствительность к антибиотикам четырех и более классов. Выявлены значимые отличия для «Бактериофага клебсиелл» (г. Уфа) в отношении антибиотикочувствительных и XDR штаммов *K.pneumoniae* (29,6% и 4,2% фагочувствительных штаммов;  $\chi^2=5,67$ ;  $p=0,018$ ) и «Пиобактериофага поливалентного очищенного» в отношении антибиотикочувствительных и XDR штаммов *P.aeruginosa* (31,4% и 11,9% фагочувствительных штаммов;  $\chi^2=4,42$ ;  $p=0,036$ ).

Из речной воды выделен бактериофаг FP-33, который с интенсивностью «4+» лизировал 47,2% XDR штаммов *P.aeruginosa*, устойчивых ко всем из



включенных в исследование лекарственным средствам для фаготерапии. Полученные фаголизаты «Бактериофаг *K.pneumoniae* №1» и «Бактериофаг *K.pneumoniae* №2» проявляли литическую активность в отношении всех протестированных карбапенеморезистентных штаммов *K.pneumoniae*.

#### **Литическая активность бактериофагов в отношении XDR карбапенемазопродуцирующих штаммов *P.aeruginosa* CC235**

Из 53 XDR карбапенемазопродуцирующих штаммов *P.aeruginosa*, выделенных в 3 городах Беларуси и 14 городах Российской Федерации и относящихся к CC235, чувствительными к «Бактериофагу синегнойному» (г. Пермь) были 17 штаммов (32,1%), к «Бактериофагу синегнойному» (г. Н. Новгород) – 11 штаммов (20,8%), «Секстафагу» (г. Пермь) – 16 штаммов (30,2%), «Пиобактериофагу» (г. Уфа) – 9 штаммов (17,0%). Даже в случае приемлемой литической активности бактериофагов отмечалось развитие вторичной устойчивости *P.aeruginosa* к ним в ходе эксперимента (наличие отдельных микроколоний вторично-резистентных мутантов в зоне стерильного пятна). Наиболее широким спектром литической активности обладал бактериофаг FP-33, который с интенсивностью не менее «3+» лизировал 31 штамм (58,5%) *P.aeruginosa*, в том числе 17 штаммов (32,1%), которые не лизировались ни одним из доступных лекарственных средств для фаготерапии. Низкий уровень активности лекарственных средств для фаготерапии может быть связан с быстрым клональным распространением *P.aeruginosa* CC235 на территории Беларуси и Российской Федерации и отсутствием в производственных коллекциях предприятий актуальных бактериофагов, эффективных в отношении штаммов клонального комплекса CC235.

#### **Антибактериальная активность водных растительных экстрактов**

Выраженная антибактериальная активность (МПК 0,38–0,75 мг/мл) в отношении как XDR, так и антибиотикочувствительных штаммов *P.aeruginosa* и *A.baumannii*, выявлена для экстракта брусники обыкновенной. Экстракты эвкалипта прутовидного и дуба обыкновенного были активны в отношении штаммов *P.aeruginosa* – продуцентов карбапенемаз (МПК 0,38–0,75 мг/мл). Экстракт толокнянки обыкновенной проявлял активность в отношении всех включенных в исследование штаммов *A.baumannii* (МПК 0,35–0,78 мг/мл). Все перечисленные растительные экстракты также оказывали антибактериальное действие на референсный штамм *E.coli* ATCC 25922 (МПК 0,38–0,75 мг/мл). В тестируемых диапазонах концентраций ни один из включенных в исследование водных экстрактов не проявлял антибактериальную активность в отношении штаммов *K.pneumoniae*. Не выявлено значимой антибактериальной активности в отношении всех исследуемых культур микроорганизмов у водных экстрактов зверобоя продырявленного, календулы лекарственной, ромашки аптечной, шалфея

лекарственного (МПК > 5 мг/мл). МПК растительных экстрактов в отношении XDR и антибиотикочувствительных штаммов одного вида значительно не отличались между собой, что указывает на универсальное бактерицидное действие растительных антисептиков, не зависящее от сопутствующей антибиотикорезистентности микроорганизмов.

Исследование сочетанного воздействия в комбинациях с антибиотиками выполнено для 4 растительных экстрактов с выявленной антибактериальной активностью (экстракты брусники обыкновенной, эвкалипта прутовидного, дуба обыкновенного, толокнянки обыкновенной). Указанные экстракты в концентрациях 1/4 и 1/8 от МПК не оказывали значимого влияния на активность аминогликозидов (амикацин, тобрамицин), карбапенемов (имипенем, меропенем) и фторхинолонов (ципрофлоксацин) в отношении XDR штаммов *P.aeruginosa* и *A.baumannii*. Выявлен синергидный антибактериальный эффект ( $\Sigma$ ФПК 0,25–0,50) комбинации экстракта эвкалипта прутовидного с цефтазидимом в отношении 29,2% XDR штаммов *A.baumannii*, продуцирующих ОХА-карбапенемазы. Отсутствие аналогичного влияния на активность карбапенемов позволяет предположить, что механизм обнаруженного синергидного эффекта не связан с блокированием ферментативной активности карбапенемаз, а вызван восстановлением проницаемости клеточной стенки для антибиотика либо блокированием эффлюксных систем компонентами растительного экстракта.

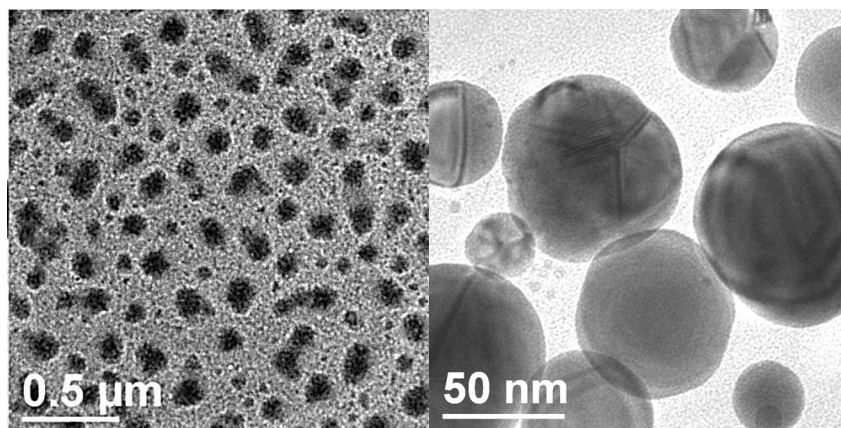
#### **Антибактериальная активность экстрактов лишайников**

Отмечена выраженная антибактериальная активность экстрактов *H.physodes* и *C.arbuscula* в отношении стафилококков и энтерококков (*Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *S.aureus* ATCC 6538, *S.saprophyticus* ATCC ВАА-750, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *E.casseliflavus* ATCC 700327), МПК 0,031–0,062 мг/мл, экстракт *Ramalina pollinaria* был активен против них в концентрациях 0,125–0,25 мг/мл. Антимикробная активность в отношении штаммов *E.coli* ATCC 25922 и *P.aeruginosa* ATCC 27853 отсутствовала в тестируемом диапазоне концентраций у всех экстрактов. Выявлена активность экстрактов *E.prunastri*, *H.physodes* и *C.arbuscula* (МПК 0,25–0,5 мг/мл) в отношении референсного штамма *S.maltophilia* ATCC 17666, а также всех включенных в исследование клинических изолятов *S.maltophilia*.

#### **Морфология и структура антибактериальных покрытий**

При электронно-лучевом распылении в вакууме смеси порошков полимеров с ципрофлоксацином (ЦФ), нитратом серебра (НС) или хлоридом серебра (ХС) образуется наноразмерное композиционное покрытие, содержащее ЦФ и наночастицы серебра. По данным проведенных АСМ-исследований, композиционные покрытия, синтезированные на основе полимеров и НС, представляют собой систему, состоящую из полимерной

матрицы и равномерно распределенных в ней наночастиц металла. С помощью просвечивающей электронной микроскопии (ПЭМ) показано присутствие сферических и эллиптических наночастиц серебра радиусом до 60 нм в матрице полиуретана (ПУ). Для покрытий на основе полилактида (ПЛ) выявлено присутствие кластерных систем серебра, представляющие собой икосаэдр (рисунок 3).



а – ПУ–НС, б – ПЛ–НС

**Рисунок 3. – Результаты ПЭМ наночастиц серебра в покрытиях**

Анализ УФ-спектров позволил установить отсутствие существенных различий в УФ-спектрах покрытий, содержащих ЦФ, и водного раствора ЦФ, наличие которых могло бы свидетельствовать о деструкции антибиотика в процессе диспергирования и осаждения покрытия.

На скорость высвобождения антибактериальных компонентов из сформированных полимерных композиционных слоев оказывает влияние стойкость полимерной матрицы к действию водной среды. В кинетических экспериментах показано, что включение в состав полимерной матрицы биодеструктируемого ПЛ приводит к существенному ускорению высвобождения серебра из покрытия. Количество серебра, выделившегося в воду из трехкомпонентного покрытия ПУ–ПЛ–НС за 19–240 ч, в 2 раза превышает количество серебра, выделившегося из двухкомпонентных покрытий ПУ–НС и ПЛ–НС.

#### **Микробиологическая активность антибактериальных покрытий**

В исследовании по определению поверхностной бактерицидной активности, выполненном в соответствии с JIS Z 2801: 2000, двухкомпонентные покрытия ПУ–НС, ПЛ–НС, ПЛ–ЦФ, ПУ–ЦФ, ПУ–ПЛ–ЦФ–ХС обладали бактерицидной активностью (отсутствие роста тест-культуры *E.coli* ATCC 25922 в посевах на МХА, lg редукции >2,6; % редукции >99,8%). Выявлена способность полного предотвращения формирования микробных биопленок для композиционного покрытия ПУ–ПЛ–ХС–ЦФ, как для антибиотикочувствительных, так и для XDR штаммов. На поверхности

образцов, содержащих покрытия ПУ–ХС и ПЛ–ХС, толщина биопленок тест-культур составила от 4,8% до 22,3% по отношению к толщине биопленок на поверхности контрольных образцов.

При выполнении отмывки покрытий в модельной среде в присутствии абразива максимальная устойчивость к механическим воздействиям обнаружена у двухкомпонентных покрытий ПЛ–ЦФ, ПУ–ЦФ, а также четырехкомпонентного покрытия ЦФ–ХС–ПУ–ПЛ, которые сохраняли поверхностную бактерицидную активность не менее 95% от исходного уровня через 7 и 14 суток отмывки.

#### **Влияние метода и режима стерилизации на величину средневязкостной молекулярной массы ( $M_v$ ) полилактида**

Воздействие гамма-излучения приводила к заметной деструкции ПЛ. Так, при дозе 182 кГр  $M_v$  снижается в 8 раз, при дозе в 52 кГр – в 2,8 раза, при дозе в 26 кГр – в 1,7 раза. Воздушная стерилизация 60 мин при 160 °С не приводила к изменению  $M_v$ , однако наблюдалась агломерация порошка ПЛ в результате плавления. При выполнении паровой стерилизации молекулярная масса полимера уменьшилась на 7% (110 °С; 0,5 атм.; 15 мин), 13% (121 °С; 1,0 атм.; 30 мин) и 24% (127 °С; 1,5 атм.; 30 мин), что значительно меньше, чем при радиационной стерилизации, при этом не наблюдалось признаков плавления порошка. Таким образом, для ортопедических устройств, содержащих ПЛ в составе антибактериального покрытия, оптимальным является использование паровой стерилизации.

#### **Цитотоксичность покрытий в отношении клеточных культур**

Через 48 часов инкубации монослой клеток НEr-2 с плотностью заполнения поверхности не менее 60–95% формировался как в лунках контрольного планшета, так и в планшетах с различными типами покрытий. Наиболее выраженные изменения монослоя клеток НEr-2 по сравнению с контролем (изменение морфологии или отслаивание от поверхности планшета до 50% клеточной популяции) выявлено для монокомпонентного покрытия на основе ПЛ и двухкомпонентных покрытий на основе ПЛ (ПЛ–ЦФ, ПЛ–ХС, ПЛ–НС), что может быть обусловлено быстрой биодеструкцией полилактидной полимерной матрицы с образованием кислых продуктов. В планшетах с четырехкомпонентным покрытием ЦФ–ХС–ПУ–ПЛ цитопатические изменения имели слабо выраженный характер и заключались в округлении и отслаивании отдельных клеток при сохранении типичной морфологии основной массы клеточной популяции. Измерение метаболической активности клеток по образованию флуоресцентного соединения резорфина при восстановлении резазурина выявило незначительное снижение уровня метаболической активности: в культуре НEr-2 в лунках планшета с композиционным покрытием метаболическая активность составила

92,4±7,4%, в культуре кератиноцитов человека NaCaT – 85,7±4,5 %, в культуре фибробластов – 87,6±3,4% относительно соответствующего контроля. Анализ морфологических характеристик клеток показал, что покрытие не оказывало выраженного воздействия на их способность распластываться на поверхности и формировать монослой.

### **Местное действие имплантатов с четырехкомпонентным композиционным покрытием *in vivo***

На 21-е сутки имплантации репаративные процессы в тканях протекали с незначительными различиями (для имплантатов экспериментальной группы с покрытием ЦФ–ХС–ПУ–ПЛ – 10 баллов, для имплантатов контрольной группы – 12 баллов (в соответствии с полуколичественной гистологической системой оценки, приведенной в ГОСТ Р ИСО 10993-6-2009), что может являться признаком умеренно выраженной реакции раздражения имплантатами обеих групп, как воспалительного ответа на наличие инородного тела. На 84-е сутки имплантации вокруг имплантатов контрольной группы имелись выраженные фиброзные изменения с наличием гиалиноза и единичными сосудами (4 балла – легкий раздражитель). Патоморфологические изменения при имплантации экспериментальных образцов с антибактериальным покрытием проявлялись минимальными фиброзными изменениями в капсуле имплантата с наличием единичных капилляров (2 балла – нераздражающий материал).

Проведенное патогистологическое исследование показало, что при имплантации нелинейным крысам титановые имплантаты с композиционным антибактериальным покрытием обладают большей биосовместимостью и лучшей биоинтеграцией в окружающую соединительную ткань по сравнению с контрольными имплантатами.

На основании результатов выполненных экспериментов разработаны ТУ ВУ 100070211.044 «Винты, пластина и фиксатор интрамедуллярный с антибактериальным покрытием». Выполнены технические, санитарно-гигиенические, клинические испытания имплантатов, получено регистрационное удостоверение, освоено серийное производство.

## **ЗАКЛЮЧЕНИЕ**

### **Основные научные результаты диссертации**

1. *A.baumannii*, *P.aeruginosa* и *K.pneumoniae* играют важную роль в этиологии инфекций у госпитализированных пациентов, на их долю суммарно приходится 22,9% (95% ДИ 21,9–24,0) от всех выделенных в 2012–2015 гг. этиологически значимых культур микроорганизмов в г. Гомеле. В период с 2012 г. по 2015 г. отмечено статистически значимое увеличение резистентности *P.aeruginosa* к гентамицину, амикацину, ципрофлоксацину;

*A.baumannii* к имипенему, меропенему, гентамицину, амикацину, ципрофлоксацину. Показано увеличение доли штаммов *P.aeruginosa* с возможным XDR-фенотипом с 0% в 2012 г. до 20,4% в 2015 г. Для *A.baumannii* отмечено двукратное увеличение доли штаммов с возможным XDR фенотипом, с 32,6% в 2012 г. до 64,3% в 2015 г. Выявлено снижение доли штаммов *K.pneumoniae* с MDR фенотипом с 59,5% в 2012 г. до 31,4% в 2015 г. Показано, что одним из механизмов устойчивости *P.aeruginosa* к карбапенемам в Беларуси является продукция МБЛ VIM. Продукция ОХА-карбапенемаз (ОХА-23 и ОХА-40) является основным механизмом устойчивости *A.baumannii* к карбапенемам в Беларуси. Более 85% карбапенемазопродуцирующих штаммов *A.baumannii* имеют XDR-фенотип. Устойчивость *K.pneumoniae* к карбапенемам в Беларуси связана с продукцией карбапенемаз NDM, ОХА-48, КРС. Карбапенемазопродуцирующие штаммы *K.pneumoniae* имеют XDR-фенотип и сохраняют чувствительность только к полимиксинам и тигециклину [2, 3, 4, 6, 10, 15, 17, 19, 24, 26, 27, 32, 33, 35, 36, 41, 47, 48, 53, 64, 67, 68].

2. Штаммы *P.aeruginosa* – продуценты МБЛ VIM – являются клонально родственными и относятся к CC235, также широко распространенному на территории Российской Федерации. Показана возможность горизонтальной передачи гена *bla<sub>VIM</sub>* в составе интегрона I класса. Наблюдаемое увеличение резистентности к карбапенемам в бактериальной популяции *A.baumannii* в Беларуси связано с распространением штаммов, относящихся к международным «клонам высокого эпидемического риска» (CC92<sup>OXF</sup>/CC2<sup>PAS</sup>, CC109<sup>OXF</sup>/CC1<sup>PAS</sup>, CC944<sup>OXF</sup>/ST78<sup>PAS</sup>), а также с горизонтальной передачей генов ОХА-карбапенемаз между представителями различных клональных комплексов. Отличия в кинетике микробного роста (снижение максимальной скорости экспоненциального роста и увеличение времени удвоения популяции XDR штаммов *K.pneumoniae* в сравнении с антибиотикочувствительными штаммами) указывают на значительную биологическую стоимость экстремальной антибиотикорезистентности. При совместном культивировании антибиотикочувствительных и карбапенемазопродуцирующих XDR штаммов *K.pneumoniae* константы скорости отбора  $s$  принимали отрицательные значения и отличались от нуля ( $p=0,003$ ), что свидетельствует о низкой конкурентоспособности XDR штаммов [2, 5, 10, 17, 23, 33, 35, 44, 50, 63].

3. С использованием модифицированного метода МСВТ обнаружена бактерицидная активность комбинаций меропенема с амикацином и амикацина с левофлоксацином в отношении 51,9% колистин-нечувствительных карбапенемазопродуцирующих штаммов *K.pneumoniae*, что является проявлением синергидного эффекта данных комбинаций. Комбинации меропенема с колистином и имипенема с колистином проявляли бактерицидную активность в отношении соответственно 71,0% и 67,7%

карбапенемазопродуцирующих штаммов *P.aeruginosa*. Отмечена бактерицидная активность, близкая к 100%, для всех комбинаций с включением колистина в отношении карбапенемазопродуцирующих штаммов *A.baumannii*. Использование модифицированного метода МСВТ позволило подобрать бактерицидные комбинации антибиотиков для 99,4% штаммов *P.aeruginosa*, *A.baumannii* и *K.pneumoniae*. Показана видовая и штаммовая специфичность проявления бактерицидной активности для всех комбинаций антибиотиков, связанная с различиями индивидуальных значений МПК антибиотиков для разных штаммов и сочетанием у них различных механизмов антибиотикорезистентности [18, 19, 25, 39, 54, 69].

4. Лекарственные средства для фаготерапии обладают в целом невысокой антибактериальной активностью (от 15,4 до 25,3% фагочувствительных штаммов *P.aeruginosa* и от 16,5 до 28,4% фагочувствительных штаммов *K.pneumoniae*), при этом доля фагочувствительных изолятов ниже среди XDR штаммов по сравнению с антибиотикочувствительными штаммами (соответственно 29,6 и 4,2% чувствительных штаммов *K.pneumoniae* к «Бактериофагу клебсиелл поливалентному очищенному»,  $p=0,026$ ; 31,4 и 11,9% чувствительных штаммов *P.aeruginosa* к «Пиобактериофагу поливалентному очищенному»,  $p=0,049$ ). Из объектов внешней среды выделены бактериофаги и получены фаголизаты, способные с интенсивностью не менее «3+» лизировать 47,2% XDR штаммов *P.aeruginosa*, устойчивых к действию доступных лекарственных средств для фаготерапии [13, 20, 22, 42, 43, 56, 62].

5. Обнаружена выраженная антибактериальная активность ( $\text{МПК} \leq 1$  мг/мл) водных экстрактов эвкалипта прутовидного, дуба обыкновенного, брусники обыкновенной, толокнянки обыкновенной в отношении антибиотикочувствительных и XDR штаммов *P.aeruginosa* и *A.baumannii*. Показан синергидный антибактериальный эффект ( $\Sigma\text{ФПК}$  0,25–0,50) комбинации водного экстракта из эвкалипта прутовидного с цефтазидимом в отношении 29,2% XDR штаммов *A.baumannii*, продуцирующих ОХА-карбапенемазы. Обнаружена выраженная антибактериальная активность ( $\text{МПК}$  0,125–0,5 мг/мл) экстрактов из лишайников *E.prunastri*, *H.physodes*, *C.arbuscula* в отношении штаммов *S.maltophilia* [11, 16, 21, 45, 61].

6. Разработаны и оптимизированы составы многокомпонентных антибактериальных покрытий, в которых в качестве полимерной матрицы выступают ПУ и ПЛ, а в качестве биоцидных компонентов – ципрофлоксацин и наночастицы серебра. Синтезированные методом электронно-лучевого осаждения из активной газовой фазы металл-полимерные композиционные слои представляют собой полимерную матрицу с распределенными внутри нее наночастицами серебра сферической или эллиптической формы радиусом до

60 нм. Отсутствие существенных различий в ИК- и УФ-спектрах ципрофлоксацин-содержащих покрытий и водного раствора ципрофлоксацина указывает на отсутствие изменений молекулярной структуры антибиотика в процессе электронно-лучевого диспергирования и осаждения покрытия [1, 7, 8, 9, 12, 14, 29, 30, 34, 46, 59, 65, 66, 70].

7. Композиционное покрытие ПУ–ПЛ–ЦФ–ХС обладает выраженной поверхностной бактерицидной активностью, не зависящей от сопутствующей устойчивости микроорганизмов к антибиотикам, и предотвращает образование микробных биопленок на поверхностях металлических имплантатов. Пролонгированный антибактериальный эффект покрытия обеспечивается включением в его состав биodeградируемого полимера – поли-L-лактида. С использованием клеточных культур НEr-2, HaCaT и первичной культуры фибробластов сделано заключение о биосовместимости композиционного покрытия ПУ–ПЛ–ЦФ–ХС и отсутствии у него цитотоксичности. Исследования местного действия после имплантации нелинейным крысам показало, что титановые имплантаты с композиционным антибактериальным покрытием обладают большей биосовместимостью и лучшей биоинтеграцией в окружающую соединительную ткань по сравнению с имплантатами без покрытий [1, 7, 9, 14, 28, 30, 31, 37, 38, 40, 49, 51, 52, 55, 57, 58, 60].

### **Рекомендации по практическому использованию результатов**

1. При выявлении и определении механизмов экстремальной антибиотикорезистентности в качестве референсных могут быть использованы карбапенемазопродуцирующие штаммы *A.baumannii*, *P.aeruginosa*, *K.pneumoniae*, депонированные в Специализированную коллекцию вирусов и бактерий, патогенных для человека, Государственного учреждения «Республиканский научно-практический центр эпидемиологии и микробиологии».

2. Предложенный фенотипический метод выявления продукции карбапенемаз грамотрицательными бактериями является простым, надежным, экономичным, что делает возможным его широкое внедрение в практику микробиологических лабораторий республики для выполнения исследований в рамках программ инфекционного контроля по сдерживанию распространения экстремальной антибиотикорезистентности.

3. Необходимо планирование и проведение противоэпидемических мероприятий в организациях здравоохранения Беларуси, направленных на сдерживание в госпитальной среде диссеминации XDR штаммов *A.baumannii*, *P.aeruginosa*, *K.pneumoniae*, являющихся продуцентами карбапенемаз OXA-23, OXA-40, OXA-48, KPC, МБЛ NDM и VIM.



4. Для проведения эмпирической комбинированной антибиотикотерапии могут использоваться результаты определения чувствительности к комбинациям антибиотиков XDR штаммов *A.baumannii*, *P.aeruginosa*, *K.pneumoniae*, выделенных в различных регионах Беларуси. Бактерицидная активность комбинаций меропенема с амикацином и амикацина с левофлоксацином проявляется в отношении 51,9% колистин-нечувствительных карбапенемазопродуцирующих штаммов *K.pneumoniae*. Комбинации меропенема с колистином и имипенема с колистином бактерицидны в отношении соответственно 71,0% и 67,7% карбапенемазопродуцирующих штаммов *P.aeruginosa*. Отмечена бактерицидная активность комбинаций меропенема с колистином, амикацина с колистином, левофлоксацина с колистином, сульбактама с колистином, тигециклина с колистином в отношении 94,0–98,8% карбапенемазопродуцирующих штаммов *A.baumannii*.

5. Разработанный метод, основанный на тестировании бактерицидности комбинаций из двух или трех антибиотиков, взятых в фиксированных ФК/ФД-концентрациях, адаптирован для внедрения в рутинную практику микробиологических лабораторий республики. Перечень комбинаций антибиотиков, рекомендуемых для тестирования, создан с учетом их доступности на фармацевтическом рынке. Рекомендуется определение чувствительности к комбинациям антибиотиков для всех этиологически значимых XDR и PDR штаммов грамотрицательных бактерий, выделенных от госпитализированных пациентов.

6. Фаготерапия может использоваться в качестве дополнения к комбинированной антибиотикотерапии для лечения инфекций, вызванных XDR возбудителями. Бактериофаги *P.aeruginosa* и *K.pneumoniae*, выделенные из объектов внешней среды, активные в отношении XDR карбапенемазопродуцирующих штаммов *P.aeruginosa* и *K.pneumoniae*, перспективны для фаготерапии.

7. Разработанная технология нанесения антибактериальных покрытий рекомендуется для широкого перечня имплантируемых изделий медицинского назначения, производимых в республике. Получено регистрационное удостоверение № ИМ-7.102251, разрешающее производство, реализацию и медицинское применение винтов, пластин и фиксаторов интрамедуллярных с антибактериальным покрытием на территории Республики Беларусь. Антибактериальный эффект покрытий является универсальным и проявляется в отношении как антибиотикочувствительных, так и XDR штаммов микроорганизмов.

**СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ СОИСКАТЕЛЯ****Статьи в научных журналах**

1. Биосовместимые полимерные антибактериальные покрытия с пролонгированным высвобождением ципрофлоксацина / М. А. Ярмоленко, Д. В. Тапальский, А. В. Рогачев, А. А. Рогачев, А. И. Козлова // Антибиотики и химиотерапия. – 2007. – Т. 52, № 11–12. – С. 3–7.
2. Распространенность и молекулярная эпидемиология грамотрицательных бактерий, продуцирующих металло-бета-лактамазы, в России, Беларуси и Казахстане / М. В. Эйдельштейн, Е. Ю. Склеенова, О. В. Шевченко, Д. В. Тапальский, И. С. Азизов, Дж. В. Д'соуза, А. В. Тимохова, М. В. Сухорукова, В. К. Козырева, Е. В. Сафронова, М. В. Астахова, И. А. Карпов, С. Х. Шамаева, Н. В. Абрамова, Н. А. Гординская, Р. С. Козлов // Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. – 2012. – Т. 14, № 2. – С. 132–152.
3. Тапальский, Д. В. Карбапенемазы грамотрицательных бактерий: распространение и методы детекции / Д. В. Тапальский, В. А. Осипов, С. В. Жаворонок // Медицинский журнал. – 2012. – № 2. – С. 10–15.
4. Осипов, В. А. Локальные особенности и фенотипы антибиотикорезистентности *Pseudomonas aeruginosa* / В. А. Осипов, Д. В. Тапальский // Проблемы здоровья и экологии. – 2012. – № 3. – С. 102–107.
5. Клональное распространение штаммов *Pseudomonas aeruginosa* – продуцентов металло-бета-лактамаз на территории Беларуси / В. А. Осипов, Д. В. Тапальский, Е. Ю. Склеенова, А. В. Романов, С. В. Жаворонок // Иммунопатология, аллергология, инфектология. – 2012. – № 4. – С. 92–97.
6. Металло-бета-лактамазы грамотрицательных бактерий: растущая проблема в мире и в Беларуси / В. А. Осипов, Д. В. Тапальский, Е. Ю. Склеенова, М. В. Эйдельштейн // Медицинские новости. – 2013. – № 2. – С. 84–88.
7. Биосовместимые композиционные антибактериальные покрытия для защиты имплантатов от микробных биопленок / Д. В. Тапальский, В. А. Осипов, Г. Н. Сухая, М. А. Ярмоленко, А. А. Рогачев, А. В. Рогачев // Проблемы здоровья и экологии. – 2013. – № 2. – С. 129–134.
8. Morphology and structure of antibacterial nanocomposite organic–polymer and metal–polymer coatings deposited from active gas phase / A. A. Rogachev, M. A. Yarmolenko, A. V. Rogachou, D. V. Tapalski, L. Xiaoheng, D. L. Gorbachev // RSC Advances. – 2013. – Vol. 3, № 28. – P. 11226–11233.
9. Новое антибактериальное покрытие на основе смеси полиуретана с поли-L-лактидом / Д. В. Тапальский, Н. Ю. Бойцова, В. А. Осипов, А. А. Рогачев, М. А. Ярмоленко, А. В. Рогачев, Л. А. Марченко, Г. В. Бутовская,

Л. П. Круль // Доклады Национальной академии наук Беларуси. – 2013. – Т. 57, № 4. – С. 89–95.

10. Spread of extensively resistant VIM-2-positive ST235 *Pseudomonas aeruginosa* in Belarus, Kazakhstan, and Russia: a longitudinal epidemiological and clinical study / M. V. Edelstein, E. N. Skleenova, O. V. Shevchenko, J. W. D'souza, D. V. Tapalski, I. S. Azizov, M. V. Sukhorukova, R. A. Pavlukov, R. S. Kozlov, M. A. Toleman, T. R. Walsh // *The Lancet Infectious Diseases*. – 2013. – Vol. 13, № 10. – P. 867–876.

11. Тапальский, Д. В. Антибактериальная активность официальных лекарственных растений в отношении экстремально-антибиотикорезистентных грамотрицательных бактерий / Д. В. Тапальский, Ф. Д. Тапальский // *Проблемы здоровья и экологии*. – 2015. – № 4. – С. 69–74.

12. Механизм формирования полилактидных покрытий из активной газовой фазы / Л. П. Круль, Г. В. Бутовская, О. В. Шахно, А. А. Рогачев, А. В. Рогачев, Д. В. Тапальский, Е. Д. Скаковский, Л. Ю. Тычинская // Доклады Национальной академии наук Беларуси. – 2016. – Т. 60, № 3. – С. 72–78.

13. Тапальский, Д. В. Препараты бактериофагов и комбинации антибиотиков: *in vitro* активность в отношении изолятов *Pseudomonas aeruginosa* ST235 с экстремальной антибиотикорезистентностью / Д. В. Тапальский // *Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия*. – 2016. – Т. 18, № 4. – С. 242–248.

14. Nanocomposite coatings for implants protection from microbial colonization: formation features, structure, and properties / C. Qia, A. V. Rogachev, D. V. Tapal'skii, M. A. Yarmolenko, A. A. Rogachev, X. Xiaohong Jianga, E. V. Koshanskaya, A. S. Vorontsov // *Surface and Coatings Technology*. – 2017. – Vol. 15. – P. 350–358.

15. Металло-бета-лактамазы и карбапенемазы экстремально-антибиотикорезистентных энтеробактерий: распространение в Беларуси / Д. В. Тапальский, В. А. Осипов, Е. О. Евсеенко, А. К. Савельева, И. В. Козловская, А. П. Козик, Н. Н. Левшина, О. В. Осипкина, Н. В. Соловей, И. А. Карпов // *Здравоохранение*. – 2017. – № 3. – С. 40–47.

16. Антимикробная и противогрибковая активность лишайников, распространенных на территории Беларуси / Д. В. Тапальский, Д. Р. Петренев, О. М. Храменкова, А. С. Дорошкевич // *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. – 2017. – № 2. – С. 60–65.

17. Тапальский, Д. В. Распространенность *Klebsiella pneumoniae* – продуцентов карбапенемаз в Беларуси и их конкурентоспособность / Д. В. Тапальский, Д. Р. Петренев // *Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия*. – 2017. – Т. 19, № 2. – С. 139–144.

18. Тапальский, Д. В. Определение чувствительности к антибиотикам методом микроразведений в бульоне: модификация, доступная для всех / Д. В. Тапальский, И. А. Бильский // Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. – 2018. – Т. 20, № 1. – С. 62–67.

19. Тапальский, Д. В. Система микробиологического мониторинга экстремально-антибиотикорезистентных и панрезистентных бактериальных патогенов с определением чувствительности к комбинациям антибиотиков / Д. В. Тапальский, Н. А. Бонда, Л. В. Лагун // Вестник Витебского государственного медицинского университета. – 2018. – Т. 17, № 1. – С. 50–58.

20. Тапальский, Д. В. Чувствительность к препаратам бактериофагов клинических изолятов *Klebsiella pneumoniae* с различными уровнями антибиотикорезистентности / Д. В. Тапальский, А. И. Козлова // Проблемы здоровья и экологии. – 2018. – № 1. – С. 56–62.

21. Тапальский, Д. В. Антибактериальные свойства растительных экстрактов и их комбинаций с антибиотиками в отношении экстремально-антибиотикорезистентных микроорганизмов / Д. В. Тапальский, Ф. Д. Тапальский // Курский научно-практический вестник «Человек и его здоровье». – 2018. – № 1. – С. 78–83.

22. Тапальский, Д. В. Чувствительность госпитальных изолятов *Pseudomonas aeruginosa* к препаратам для фаготерапии / Д. В. Тапальский // Вестник Витебского государственного медицинского университета. – 2018. – Т. 17, № 2. – С. 47–54.

23. Генетическое разнообразие штаммов *Acinetobacter baumannii*, продуцирующих карбапенемазы, в Беларуси: роль «международных клонов высокого риска» в распространении устойчивости к карбапенемам / Е. А. Шек, Д. В. Тапальский, Е. Ю. Склеенова, М. В. Сухорукова, И. А. Карпов, М. В. Эйдельштейн // Иммунопатология, аллергология, инфектология. – 2018. – № 2. – С. 59–64.

24. Тапальский, Д. В. *Acinetobacter baumannii*: распространенность, спектр и динамика антибиотикорезистентности, чувствительность к комбинациям антибиотиков / Д. В. Тапальский, Н. А. Бонда // Журнал Гродненского государственного медицинского университета. – 2018. – Т. 16, № 3. – С. 286–291.

25. Тапальский, Д. В. Чувствительность к комбинациям антибиотиков продуцирующих карбапенемазы нозокомиальных штаммов грамотрицательных бактерий, выделенных в Беларуси / Д. В. Тапальский // Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. – 2018. – Т. 20, № 3. – С. 182–191.

26. Распространенность карбапенемаза-продуцирующих грамотрицательных бактерий в Гомельской области / Д. В. Тапальский, Н. А. Бонда, О. В. Осипкина, И. А. Карпов // Медицинский журнал. – 2018. – № 3. – С. 129–135.

**Статьи в сборниках научных трудов**

27. Тапальский, Д. В. Мониторинг устойчивости клинических изолятов *P.aeruginosa* к антисинегнойным антибактериальным препаратам / Д. В. Тапальский, А. Ф. Ларионова, А. И. Козлова // Современные проблемы инфекционной патологии человека: сб. науч. тр. / под ред. Л. П. Титова [и др.]. – Минск: Белпринт, 2008. – Вып. 1. – С. 206–210.

28. Антибактериальный эффект покрытий, содержащих наночастицы серебра, в отношении полиантибиотикорезистентных микроорганизмов / Д. В. Тапальский, А. И. Козлова, Т. А. Петровская, М. А. Ярмоленко, А. А. Рогачев // Актуальные проблемы медицины: сб. науч. ст. Респ. науч.-практ. конф. и 19-й итоговой науч. сессии Гомел. гос. мед. ун-та, Гомель, 23–24 февр. 2010 г. : в 4 т. / редкол : А. Н. Лызиков [и др.]. – Гомель : ГомГМУ, 2010. – Т. 4 – С. 112–115.

29. Особенности формирования в плазме нанокмпозиционных биосовместимых антибактериальных покрытий / М. А. Ярмоленко, А. А. Рогачев, А. В. Рогачев, Д. В. Тапальский, Д. Л. Горбачев, П. А. Лучников // INTERMATIC-2010: материалы Междунар. науч.-техн. конф. «Фундаментальные проблемы радиоэлектронного приборостроения», Москва, 23–27 ноября 2010 г. / под ред. чл.-корр. РАН А. С. Сигова. – Москва: Энергоатомиздат, 2010. – Ч. 2. – С. 244–249.

30. Серебросодержащие антибактериальные покрытия, формируемые из активной газовой фазы / Д. В. Тапальский, А. В. Рогачев, А. А. Рогачев, М. А. Ярмоленко, Д. Л. Горбачев // Материалы секционных заседаний. Молодежный инновационный форум «ИНТРИ-2010», Минск, 29–30 ноября 2010 г. / ГУ «БелИСА»; под ред. И. В. Войтова. – Минск: ГУ «БелИСА», 2010. – С. 184–186.

31. Тонкопленочные антибактериальные покрытия с пролонгированным высвобождением наночастиц серебра / Д. В. Тапальский, А. В. Рогачев, А. А. Рогачев, М. А. Ярмоленко, Д. Л. Горбачев // Современные проблемы инфекционной патологии человека: сб. науч. тр. / М-во здравоохран. Респ. Беларусь. РНПЦ эпидемиологии и микробиологии; под ред. проф. Г. М. Игнатьева. – Минск: Изд. В. Хурсик, 2010. – Вып. 3. – С. 483–487.

32. Карбапенемрезистентные штаммы синегнойной палочки – продуценты метало-бета-лактамаз: распространение в различных регионах Беларуси / Д. В. Тапальский, В. А. Осипов, Н. Н. Левшина, А. А. Славинская, В. К. Окулич, А. Н. Копычко, Л. Н. Ребеко, О. Е. Кузнецов, А. В. Дысько, Е. Ю. Склеенова, А. В. Романов, М. В. Эйдельштейн // Современные проблемы инфекционной патологии человека: сб. науч. тр. / М-во здравоохран. Респ. Беларусь. РНПЦ эпидемиологии и микробиологии; под ред. проф. Г. М. Игнатьева. – Минск: Изд. В. Хурсик, 2010. – Вып. 3. – С. 658–662.

33. Значение металло- $\beta$ -лактамаз в формировании и распространении устойчивости *Pseudomonas aeruginosa* к карбапенемам / Д. В. Тапальский, В. А. Осипов, Е. Ю. Склеенова, А. В. Романов, М. В. Эйдельштейн // Достижения медицинской науки Беларуси: рецензируемый научно-практический ежегодник. – Минск: ГУ РНМБ, 2010. – Вып. XV. – С. 146–147.

34. Плазмохимический синтез антибактериальных серебросодержащих покрытий / А. В. Рогачев, Д. В. Тапальский, А. А. Рогачев, М. А. Ярмоленко, Д. Л. Горбачев // Актуальные проблемы медицины: сб. науч. ст. Респ. науч.-практ. конф., посвящ. 20-летию Гомел. гос. мед. ун-та, Гомель, 23–24 февр. 2011 г. : в 4 т. / Гомел. гос. мед. ун-т; редкол. : А. Н. Лызиков [и др.]. – Гомель: ГомГМУ, 2011. – Т. 3. – С. 206–210.

35. Значение металло- $\beta$ -лактамаз в формировании и распространении устойчивости синегнойной палочки к карбапенемам в Беларуси: результаты многоцентрового исследования / Д. В. Тапальский, В. А. Осипов, Н. Н. Левшина, А. А. Славинская, В. К. Окулич, А. Н. Копычко, Л. Н. Ребеко, О. Е. Кузнецов, А. В. Дысько, Е. Ю. Склеенова, А. В. Романов, М. В. Эйдельштейн // Актуальные проблемы медицины: сб. науч. ст. Респ. науч.-практ. конф., посвящ. 20-летию Гомел. гос. мед. ун-та, Гомель, 23–24 февр. 2011 г.: в 4 т. / Гомел. гос. мед. ун-т; редкол.: А. Н. Лызиков [и др.]. – Гомель: ГомГМУ, 2011. – Т. 4. – С. 86–89.

36. Карбапенемрезистентные штаммы *Pseudomonas aeruginosa* – продуценты метало-бета-лактамаз: распространение в различных регионах Беларуси / В. А. Осипов, Д. В. Тапальский, Н. Н. Левшина, А. А. Славинская, В. К. Окулич, А. Н. Копычко, Л. Н. Ребеко, О. Е. Кузнецов, А. В. Дысько, Е. Ю. Склеенова, А. В. Тимохова, М. В. Эйдельштейн // Молекулярно-генетические методы исследования в медицине и биологии: материалы Междунар. науч.-практ. конф., Караганда, 23–24 октября 2012 г. / КГМУ; под ред. Р. С. Досмагамбетовой. – Караганда, 2012. – С. 127–132.

37. Биосовместимые композиционные антибактериальные покрытия с пролонгированным высвобождением наночастиц серебра / Д. В. Тапальский, Н. Ю. Бойцова, М. А. Ярмоленко, А. А. Рогачев, А. А. Ситник // Современные проблемы инфекционной патологии человека: сб. науч. тр. / под ред. Л. П. Титова [и др.]. – Минск: РНМБ, 2012. – Вып. 5. – С. 246–253.

38. Пленочные композиционные покрытия для защиты имплантатов от микробной колонизации / Д. В. Тапальский, В. А. Осипов, Г. Н. Сухая, М. А. Ярмоленко, А. А. Рогачев, А. В. Рогачев, Л. П. Круль // Теории оболочек и мембран в механике и биологии: от макро- до наноразмерных структур: материалы Междунар. науч. конф., 16–20 сент. 2013 г., Минск, Беларусь / под общ. ред. Г. И. Михасева, Х. Альтенбаха. – Минск: Изд. центр БГУ, 2013. – С. 156–158.

39. Тестирование комбинаций антибиотиков в отношении суперрезистентных изолятов *Acinetobacter baumannii* с целью установления их антимикробной и терапевтической эффективности / Д. В. Тапальский, А. В. Мозгова, А. И. Козлова, Е. Ю. Склеенова // Современные проблемы инфекционной патологии человека: сб. науч. тр. Вып. 7 / М-во здравоохран. Респ. Беларусь. РНПЦ эпидемиологии и микробиологии; под ред. Л. П. Титова. – Минск: ГУ РНМБ, 2014. – С. 304–308.

40. Винты, пластина и фиксатор интрамедуллярный с антибактериальным покрытием / Д. В. Тапальский, В. А. Осипов, М. А. Ярмоленко, А. А. Рогачев, А. В. Рогачев // Достижения медицинской науки Беларуси: рецензируемый научно-практический ежегодник. – Минск: ГУ РНМБ, 2014. – Вып. XIX. – С. 139–141.

41. Распространение антибиотикорезистентности среди штаммов *Acinetobacter baumannii*, выделенных от госпитализированных пациентов / Д. В. Тапальский, Н. А. Бонда, С. В. Осмоловский, И. Ф. Салажкова, А. А. Тарасенко // Санитарно-эпидемиологическая служба Республики Беларусь: история, актуальные проблемы на современном этапе и перспективы развития: сб. науч. тр. Междунар. науч.-практ. конф. «Здоровье и окружающая среда», посвящ. 90-летию санитарно-эпидемиологической службы Республики Беларусь, Минск, 28 октября 2016 г. В 2 т. Т. 2 / редкол.: Н. П. Жукова [и др.]. – Минск: БГМУ, 2016. – С. 301–305.

42. Эффективность бактериофагов и комбинаций антибиотиков в отношении полиантибиотикорезистентных штаммов синегнойной палочки / Д. В. Тапальский, В. А. Осипов, В. В. Важинская, А. О. Прядко // Актуальные проблемы медицины: сб. науч. ст. Республиканской науч.-практ. конф. с международным участием, посвящ. 25-летию основания учреждения образования «Гомельский государственный медицинский университет», Гомель, 5–6 ноября 2015 г. / редкол. А. Н. Лызиков [и др.]. – Гомель: ГомГМУ, 2016. – С. 972–975.

43. Важинская, В. В. Поиск и адаптация бактериофагов, эффективных в отношении суперантибиотикорезистентных штаммов *Klebsiella pneumoniae* – продуцентов карбапенемаз / В. В. Важинская, А. О. Прядко, Д. В. Тапальский // Актуальные проблемы медицины : сб. науч. ст. Респ. науч.-практ. конф. с международным участием, посвящ. 25-летию основания учреждения образования «Гомельский государственный медицинский университет», Гомель, 5–6 ноября 2015 г. / редкол.: А. Н. Лызиков [и др.]. – Гомель: ГомГМУ, 2016. – С. 133–135.

44. Кинетика роста антибиотикочувствительных и экстремально-антибиотикорезистентных штаммов *Klebsiella pneumoniae* / Д. В. Тапальский, Д. Р. Петренев, А. Р. Чернышева, В. А. Филиппова // Актуальные проблемы

медицины [Электронный ресурс]: сб. науч. ст. Респ. науч.-практ. конф. и 26-й итоговой науч. сессии Гомел. гос. мед. ун-та, Гомель, 3–4 нояб. 2016 г. / Гомел. гос. мед. ун-т; редкол.: А. Н. Лызиков [и др.]. – Гомель: ГомГМУ, 2017. – С. 759–761.

45. Антибактериальная и противогрибковая активность экстрактов из лишайников / Д. В. Тапальский, Д. Р. Петренев, О. М. Храмченкова, А. С. Дорошкевич, П. В. Подоляко // Актуальные проблемы медицины [Электронный ресурс]: сб. науч. ст. Респ. науч.-практ. конф. и 26-й итоговой науч. сессии Гомел. гос. мед. ун-та, Гомель, 3–4 нояб. 2016 г. / Гомел. гос. мед. ун-т ; редкол.: А. Н. Лызиков [и др.]. – Гомель: ГомГМУ, 2017. – С. 762–764.

### **Материалы конференций и тезисы докладов**

46. Морфология биосовместимых полимерных покрытий / Д. Л. Горбачев, Д. В. Тапальский, А. И. Козлова, М. А. Ярмоленко // Современные достижения бионаноскопии: сб. тез. 2-й Междунар. конф., Москва, 17–19 июня 2008 г. – Москва: МГУ им. М.В. Ломоносова, 2008. – С. 17.

47. Полиантибиотикорезистентные карбапенеморезистентные *P.aeruginosa* в лечебных учреждениях Минска / Н. Н. Левшина, А. А. Славинская, В. А. Осипов, Д. В. Тапальский // Тезисы XI Междунар. конгресса МАКМАХ по антимикробной химиотерапии, Москва, 27–29 мая 2009 г. // Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. – 2009. – Т. 11, № 2. – Приложение 1. – С. 23.

48. Продукция метало-бета-лактамаз клиническими изолятами *P.aeruginosae* в Беларуси / Д. В. Тапальский, В. А. Осипов, Т. А. Петровская, В.К. Окулич, А. Н. Копычко, Л. Н. Ребеко, О. Е. Кузнецов, А. В. Дысько, А. В. Романов // Тезисы XI Междунар. конгресса МАКМАХ по антимикробной химиотерапии, Москва, 27–29 мая 2009 г. // Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. – 2009. – Т. 11, № 2. – Приложение 1. – С. 35.

49. Antimicrobial effect of coatings containing silver nanoparticles against multiresistant microorganisms / D. Tapalski, A. Kazlova, T. Petrovskaya, M. Yarmolenko, A. Rogachev // 20th European Student's Conference: Abstract Book, Berlin, 4–7 October 2009 // European Journal of Medical Research. – 2009. – Vol. 14. – Suppl. 2. – P. 145.

50. Популяционная структура *Pseudomonas aeruginosa* – продуцентов метало-бета-лактамаз, выделенных в Беларуси / Д. В. Тапальский, В. А. Осипов, Е. Ю. Склеенова, М. В. Эйдельштейн // Тезисы XIV Междунар. конгресса МАКМАХ по антимикробной химиотерапии, Москва, 23–25 мая 2012 г. // Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. – 2012. – Т. 14, № 2. – Приложение 1. – С. 50–51.



51. Композиционные наноразмерные антибактериальные покрытия для защиты имплантатов от микробной колонизации / Д. В. Тапальский, В. А. Осипов, Н. Ю. Бойцова, Г. Н. Сухая, М. А. Ярмоленко, А. А. Рогачев, А. В. Рогачев // Тезисы XV Междунар. конгресса МАКМАХ по антимикробной химиотерапии, Москва, 22–24 мая 2013 г. // Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. – 2013. – Т. 15, № 2. – Приложение 1. – С. 43.

52. О механизме высвобождения антибактериальных препаратов из композиционных покрытий на основе полиуретана с добавками поли-L-лактида / Л. А. Марченко, Г. А. Бутовская, Л. П. Круль, А. А. Рогачев, М. А. Ярмоленко, А. В. Рогачев, Д. В. Тапальский, Н. Ю. Бойцова, В. А. Осипов // ПОЛИКОМТРИБ–2013: тез. докл. Междунар. науч.-техн. конф., Гомель, 24–27 июня 2013 г. / ИММС НАНБ; редкол.: В. Н. Адериха [и др.]. – Гомель: ИММС НАНБ, 2013. – С. 101.

53. Тапальский, Д. В. Чувствительность госпитальных изолятов *Acinetobacter baumannii* к антибиотикам и их комбинациям / Д. В. Тапальский, А. В. Мозгова, А. И. Козлова // Тезисы XVI Междунар. конгресса МАКМАХ по антимикробной химиотерапии, Москва, 21–23 мая 2014 г. // Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. – 2014. – Т. 16, № 2. – Приложение 1. – С. 37–38.

54. Эффективность комбинаций антибиотиков в отношении карбапенемрезистентных изолятов *Pseudomonas aeruginosa* – продуцентов метало-бета-лактамаз / Д. В. Тапальский, В. А. Осипов, Е. Ю. Склеенова, М. В. Эйдельштейн // Тезисы XVI Междунар. конгресса МАКМАХ по антимикробной химиотерапии, Москва, 21–23 мая 2014 г. // Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. – 2014. – Т. 16, № 2. – Приложение 1. – С. 38.

55. Антибактериальные покрытия для имплантатов, применяемых в травматологии и ортопедии / Д. В. Тапальский, В. А. Осипов, А. А. Рогачев, М. А. Ярмоленко, А. В. Рогачев, А. А. Ситник, С. И. Павлов, Г. В. Бутовская, Л. П. Круль // Тезисы XVII Междунар. конгресса МАКМАХ по антимикробной химиотерапии, Москва, 20–22 мая 2015 г. // Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. – 2015. – Т. 17, № 2. – Приложение 1. – С. 47.

56. Чувствительность суперантибиотикорезистентных госпитальных изолятов клебсиелл – продуцентов карбапенемаз к препаратам бактериофагов / Д. В. Тапальский, В. А. Осипов, В. В. Важинская, А. О. Прядко, Н. Н. Левшина, Е. О. Евсеенко, Ю. А. Савочкина, А. М. Николаева, К. А. Лыско // Тезисы XVII Междунар. конгресса МАКМАХ по антимикробной химиотерапии, Москва, 20–22 мая 2015 г. // Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. – 2015. – Т. 17, № 2. – Приложение 1. – С. 46.

57. Композиционное наноразмерное антибактериальное покрытие для защиты имплантатов от микробной колонизации / Д. В. Тапальский, В. А. Осипов, А. А. Рогачев, М. А. Ярмоленко, А. В. Рогачев, А. А. Ситник, Г. В. Бутовская, Л. П. Круль // ПОЛИКОМТРИБ–2015: тез. докл. Междунар. науч.-техн. конф., Гомель, 23–26 июня 2015 г. / ИММС НАНБ; редкол.: В. Н. Адериха [и др.]. – Гомель: ИММС НАНБ, 2015. – С. 267.

58. Антибактериальное покрытие для защиты имплантатов от микробной колонизации / Д. В. Тапальский, В. А. Осипов, А. А. Рогачев, М. А. Ярмоленко, А. В. Рогачев, А. А. Ситник, С. И. Павлов, Г. В. Бутовская, Л. П. Круль // Микробные биотехнологии: фундаментальные и прикладные аспекты: тез. докл. IX Междунар. науч. конф., Минск, 7–11 сентября 2015 г. – Минск: Беларуская навука, 2015. – С. 168–169.

59. Structure and properties of biocompatible antimicrobial polymers-based coatings deposited from the active gas phase / A. A. Rogachev, M. A. Yarmolenko, D. V. Tapalski, G. V. Butovskaya, L. P. Krul // The 14th International conference on global research and education Inter-Academia 2015: Abstracts, September 28–30, 2015. – Namamatsy, Japan: Shizuoka University, 2015 – P. 52–53.

60. Антибактериальное покрытие для травматологических имплантатов / Д. В. Тапальский, М. А. Ярмоленко, Д. Р. Петренев, Е. В. Кошанская, А. А. Ситник, П. А. Вологовский // Тезисы XVIII Междунар. конгресса МАКМАХ по антимикробной химиотерапии, Москва, 25–27 мая 2016 г. // Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. – 2016. – Т. 18, № 2. – Приложение 1. – С. 42.

61. Тапальский, Д. В. Антибактериальная активность официальных лекарственных растений в отношении экстремально-антибиотикорезистентных грамотрицательных бактерий / Д. В. Тапальский // Тезисы XVIII Междунар. конгресса МАКМАХ по антимикробной химиотерапии, Москва, 25–27 мая 2016 г. // Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. – 2016. – Т. 18, № 2. – Приложение 1. – С. 42.

62. Тапальский, Д. В. Активность препаратов бактериофагов и комбинаций антибиотиков в отношении экстремально-антибиотикоустойчивых штаммов *Pseudomonas aeruginosa* / Д. В. Тапальский // Микробные биотехнологии: фундаментальные и прикладные аспекты: тез. докл. X Междунар. науч. конф., Минск, 5–9 июня 2017 г. / Нац. акад. наук Беларуси [и др.]. – Минск: Беларуская навука, 2017. – С. 269–271.

63. Тапальский, Д. В. Кинетика роста и конкурентоспособность экстремально-антибиотикорезистентных штаммов *Klebsiella pneumoniae* / Д. В. Тапальский, Д. Р. Петренев / Российско-китайский конгресс по медицинской микробиологии, эпидемиологии и клинической микологии

(XX Кашкинские чтения): тез. докл., Санкт-Петербург, 14–16 июня 2017 г. // Проблемы медицинской микологии. – 2017. – Т. 19, № 2. – С. 142.

64. Карбапенемазопродуцирующие грамотрицательные бактерии в организациях здравоохранения Гомельской области / Д. В. Тапальский, Н. А. Бонда, О. В. Осипкина, И. А. Карпов // Молекулярная диагностика 2018: сб. тр. Междунар. науч.-практ. конф., Минск, 27–28 сентября 2018 г. – Минск: СтройМедиаПроект, 2018. – С. 56–57.

### **Патенты**

65. Способ нанесения покрытия с антибактериальным действием на медицинское изделие на основе высокомолекулярного соединения: пат. ВУ 13256 / А. В. Рогачев, Д. В. Тапальский, М. А. Ярмоленко, А. А. Рогачев, А. И. Козлова. – Оpubл. 30.06.2010.

66. Способ придания антибактериальных свойств изделию медицинского назначения: пат. ВУ 17017 / А. В. Рогачев, Д. В. Тапальский, М. А. Ярмоленко, А. А. Рогачев, О. А. Ярмоленко, Н. Ю. Бойцова. – Оpubл. 30.04.2013.

### **Инструкции по применению**

67. Метод выявления множественной лекарственной устойчивости синегнойной палочки: инструкция по применению: утв. М-вом здравоохранения Респ. Беларусь 22.03.2013 / В. А. Осипов, Д. В. Тапальский, С. В. Жаворонок. – Минск, 2013. – 12 с.

68. Фенотипический метод выявления продукции карбапенемаз грамотрицательными бактериями: инструкция по применению: утв. М-вом здравоохранения Респ. Беларусь 31.08.2017 / Д. В. Тапальский, А. И. Козлова. – Гомель, 2017. – 11 с.

69. Методы определения чувствительности к комбинациям антибиотиков грамотрицательных бактерий с экстремальной и полной антибиотикорезистентностью: инструкция по применению: утв. М-вом здравоохранения Респ. Беларусь 31.08.2017 / Д. В. Тапальский, Л. В. Лагун. – Гомель, 2017. – 27 с.

### **Технические условия**

70. Винты, пластина и фиксатор интрамедуллярный с антибактериальным покрытием: ТУ ВУ 100070211.044-2015: введ.: 28.11.2015, № 043033 / разраб.: Д. В. Тапальский, А. С. Амелечня. – Минск: Госстандарт, 2015. – 12 с.

**Тапальскі Дзмітрый Віктаравіч**  
**Экстрэмальна-антыбіётыкарэзістэнтныя грамадмоўныя бактэрыі:**  
**распаўсюджванне і стратэгіі антымікробнага ўздзеяння**

**Ключавыя словы:** *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii*, *Klebsiella pneumoniae*, антыбіётыкарэзістэнтнасць, карбапенемазы, бактэрыяфагі, камбінацыі антыбіётыкаў, антыбактэрыяльныя пакрыцці.

**Мэта даследавання:** абгрунтаваць метады антымікробнага ўздзеяння на экстрэмальна-антыбіётыкарэзістэнтныя мікраарганізмы на падставе ацэнкі механізмаў фарміравання і распаўсюджвання ўстойлівасці да антыбіётыкаў.

**Метады даследавання:** мікрабіялагічныя (ідэнтыфікацыя і вызначэнне адчувальнасці мікраарганізмаў да антыбіётыкаў і іх камбінацый, вылучэнне бактэрыяфагаў, вызначэнне павярхоўнай бактэрыцыднай актыўнасці); малекулярна-генетычныя (дэтэкцыя генаў карбапенемаз, эпідэміялагічнае маркіраванне XDR-штамаў), фізіка-хімічныя (вывучэнне ультраструктуры антыбактэрыяльных пакрыццяў).

**Атрыманыя вынікі і іх навізна.** XDR асацыявана з прадукцыяй карбапенемаз (VIM у *P.aeruginosa*; OXA-23 і OXA-40 у *A.baumannii*; OXA-48, NDM і KPC у *K.pneumoniae*). Павелічэнне рэзістэнтнасці да карбапенемаў звязана з распаўсюджваннем штамаў, якія адносяцца да міжнародных «клонаў высокай эпідэмічнай рызыкі» (*P.aeruginosa* CC235; *A.baumannii* CC92<sup>OXF</sup>/CC2<sup>PAS</sup>, CC109<sup>OXF</sup>/CC1<sup>PAS</sup>, CC944<sup>OXF</sup>/ST78<sup>PAS</sup>). Карбапенемазапрадуцыруючыя штамы *K.pneumoniae* валодаюць нізкай канкурэнтаздольнасцю. Мадэфікаваны метады тэставання бактэрыцыднасці розных камбінацый дазваляе падабраць бактэрыцыдныя камбінацыі антыбіётыкаў для 99,4% XDR-штамаў. Выяўлена антыбактэрыяльная актыўнасць экстрактаў з лішайнікаў і афіцынальных лекавых раслін у дачыненні да XDR-штамаў, вылучаны бактэрыяфагі *P.aeruginosa*, здольныя лізіраваць XDR-штамы. Сінтэзаваны кампазіцыйныя пакрыцці, якія надаюць працяглую антыбактэрыяльную актыўнасць імплантатам для траўматалогіі і артапедыі.

**Рэкамендацыі па выкарыстанні:** правядзенне эмпірычнай камбінаванай антыбіётыкатэрапіі інфекцый, выкліканых экстрэмальна-антыбіётыкарэзістэнтнымі ўзбуджальнікамі; выкарыстанне імплантатаў з антыбактэрыяльнымі пакрыццямі ў траўматалогіі і артапедыі.

**Галіна прымянення:** клінічная мікрабіялогія, эпідэміялогія, антымікробная хіміятэрапія, траўматалогія і артапедыя.

## РЕЗЮМЕ

**Тапальский Дмитрий Викторович**

### **Экстремально-антибиотикорезистентные грамотрицательные бактерии: распространение и стратегии антимикробного воздействия**

**Ключевые слова:** *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii*, *Klebsiella pneumoniae*, антибиотикорезистентность, карбапенемазы, бактериофаги, комбинации антибиотиков, антибактериальные покрытия.

**Цель исследования:** обосновать методы антимикробного воздействия на экстремально-антибиотикорезистентные микроорганизмы на основании оценки механизмов формирования и распространения устойчивости к антибиотикам.

**Методы исследования:** микробиологические (идентификация и определение чувствительности микроорганизмов к антибиотикам и их комбинациям, выделение бактериофагов, определение поверхностной бактерицидной активности); молекулярно-генетические (детекция генов карбапенемаз, эпидемиологическое маркирование XDR-штаммов), физико-химические (изучение ультраструктуры антибактериальных покрытий).

**Полученные результаты и их новизна.** XDR ассоциирована с продукцией карбапенемаз (VIM у *P.aeruginosa*; OXA-23 и OXA-40 у *A.baumannii*; OXA-48, NDM и KPC у *K.pneumoniae*). Увеличение резистентности к карбапенемам связано с распространением штаммов, относящихся к международным «клонам высокого эпидемического риска» (*P.aeruginosa* CC235; *A.baumannii* CC92<sup>OXF</sup>/CC2<sup>PAS</sup>, CC109<sup>OXF</sup>/CC1<sup>PAS</sup>, CC944<sup>OXF</sup>/ST78<sup>PAS</sup>). Карбапенемазопродуцирующие штаммы *K.pneumoniae* обладают низкой конкурентоспособностью. Модифицированный метод тестирования бактерицидности различных комбинаций позволяет подобрать бактерицидные комбинации антибиотиков для 99,4% XDR-штаммов. Обнаружена антибактериальная активность экстрактов из лишайников и официальных лекарственных растений в отношении XDR-штаммов, выделены бактериофаги *P.aeruginosa*, способные лизировать XDR-штаммы. Синтезированы композиционные покрытия, придающие длительную антибактериальную активность имплантатам для травматологии и ортопедии.

**Рекомендации по использованию:** проведение эмпирической комбинированной антибиотикотерапии инфекций, вызванных экстремально-антибиотикорезистентными возбудителями; использование имплантатов с антибактериальными покрытиями в травматологии и ортопедии.

**Область применения:** клиническая микробиология, эпидемиология, антимикробная химиотерапия, травматология и ортопедия.

## SUMMARY

**Tapalski Dzmitry Viktaravich**

### **Extensively drug-resistant Gram-negative bacteria: distribution and strategies for antimicrobial impacts**

**Key words:** *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii*, *Klebsiella pneumoniae*, antimicrobial resistance, carbapenemases, bacteriophages, combinations of antibiotics, antibacterial coatings.

**Aim of research:** to substantiate the methods of antimicrobial impact on extensively drug-resistant microorganisms on the basis of an assessment of mechanisms of formation and distribution of antibiotic resistance.

**Methods of the study:** microbiological (microbial identification, evaluation of susceptibility to single and combinations of antimicrobial drugs, isolation of bacteriophages, evaluation of surface bactericidal activity); molecular genetics (carbapenemases genes detection, epidemiological tagging of XDR-strain); physical-chemical (evaluation of structure of antibacterial coatings).

**Obtained results and their novelty:** XDR is associated with carbapenemases production (VIM in *P.aeruginosa*; OXA-23 and OXA-40 in *A.baumannii*; OXA-48, NDM and KPC in *K.pneumoniae*). Rise of resistance to carbapenems is associated with spreading of global “high epidemiological risk strains” (*P.aeruginosa* CC235; *A.baumannii* CC92<sup>OXF</sup>/CC2<sup>PAS</sup>, CC109<sup>OXF</sup>/CC1<sup>PAS</sup>, CC944<sup>OXF</sup>/ST78<sup>PAS</sup>). It was revealed that carbapenemase-producing *K.pneumoniae* strains have low competitive ability. Modification of method of evaluation of bactericidal activity of different antibacterial drugs combinations made possible to reveal bactericidal combinations for 99.4% of XDR-strains. We detected antibacterial activity of lichen and officinal plants extracts against XDR-strains. *P.aeruginosa* bacteriophages able to lyse XDR-strains were isolated. Novel composed coatings of traumatological and orthopedic implants with long-lasting antibacterial activity were synthesized.

**Recommendations for use:** empiric treatment of infections caused by extremely antimicrobial drug resistant bacteria with combinations of antibacterial drugs; use of implants with composed coatings in traumatology and orthopedics.

**Field of application:** clinical microbiology, epidemiology, antibacterial chemotherapy, traumatology and orthopedics.

Подписано в печать 23.01.19. Формат 60×84/16. Бумага писчая «Хероx office».  
Ризография. Гарнитура «Times».  
Усл. печ. л. 2,56. Уч.-изд. л. 2,81. Тираж 60 экз. Заказ 51.

Издатель и полиграфическое исполнение: учреждение образования  
«Белорусский государственный медицинский университет».  
Свидетельство о государственной регистрации издателя, изготовителя,  
распространителя печатных изданий № 1/187 от 18.02.2014.  
Ул. Ленинградская, 6, 220006, Минск.