

Федеральное бюджетное учреждение науки
Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии
Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и
благополучия человека

На правах рукописи

Скачкова Татьяна Сергеевна

**СОВЕРШЕНСТВОВАНИЕ СИСТЕМЫ ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКОГО МОНИТОРИНГА
ЗА ИНФЕКЦИЯМИ, ОБУСЛОВЛЕННЫМИ МЕТИЦИЛЛИНРЕЗИСТЕНТНЫМИ
ШТАММАМИ СТАФИЛОКОККА, НА ОСНОВЕ МОЛЕКУЛЯРНО-БИОЛОГИЧЕСКИХ
МЕТОДОВ**

3.2.2. Эпидемиология

Диссертация
на соискание учёной степени
кандидата медицинских наук

Научный руководитель:
доктор медицинских наук,
академик РАН, профессор
Акимкин Василий Геннадьевич

Москва – 2023

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	4
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	18
1.1 Особенности эпидемиологии заболеваний, вызванных метициллинрезистентными штаммами стафилококка.....	18
1.1.1 Эпидемиологическое значение и распространенность	18
1.1.2 Источники и пути передачи метициллинрезистентных стафилококков. .	23
1.1.3 Профилактические и противоэпидемические мероприятия.....	25
1.2 Лабораторные методы идентификации и типирования стафилококков	34
1.3 Молекулярно-биологические методы в системе эпидемиологического мониторинга за антибиотикорезистентными штаммами стафилококков.....	38
РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ	46
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	46
ГЛАВА 3. УРОВЕНЬ И СТРУКТУРА ЗАБОЛЕВАЕМОСТИ ИНФЕКЦИЯМИ, СВЯЗАННЫМИ С ОКАЗАНИЕМ МЕДИЦИНСКОЙ ПОМОЩИ, ОБУСЛОВЛЕННЫМИ СТАФИЛОКОККАМИ	60
3.1 Динамика уровня и структуры заболеваемости инфекциями, связанными с оказанием медицинской помощи, вызванными стафилококками, на территории Российской Федерации.....	60
3.2 Вклад метициллинрезистентных стафилококков в уровень и структуру заболеваемости инфекциями, связанными с оказанием медицинской помощи, в Российской Федерации.....	70
ГЛАВА 4. СРАВНЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ БАКТЕРИОЛОГИЧЕСКИХ И МОЛЕКУЛЯРНО-БИОЛОГИЧЕСКИХ МЕТОДОВ ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ МЕТИЦИЛЛИНРЕЗИСТЕНТНЫХ ШТАММОВ СТАФИЛОКОККОВ	80
ГЛАВА 5. РАЗРАБОТКА НАБОРА РЕАГЕНТОВ НА ОСНОВЕ ПОЛИМЕРАЗНОЙ ЦЕПНОЙ РЕАКЦИИ В РЕЖИМЕ РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ И КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ ДНК МЕТИЦИЛЛИНРЕЗИСТЕНТНЫХ СТАФИЛОКОККОВ	86

ГЛАВА 6. ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКИЙ МОНИТОРИНГ ЗА ИНФЕКЦИЯМИ, ОБУСЛОВЛЕННЫМИ МЕТИЦИЛЛИНРЕЗИСТЕНТНЫМИ ШТАММАМИ СТАФИЛОКОККОВ С ПОМОЩЬЮ МОЛЕКУЛЯРНО-БИОЛОГИЧЕСКИХ МЕТОДОВ	95
6.1 Мониторинг метициллинрезистентных штаммов стафилококка в многопрофильных стационарах города Москвы.....	95
6.2 Проведение смывов на наличие метициллинрезистентных стафилококков в стационарах города Москвы с помощью молекулярно-биологических методов.....	109
6.3 Обследование пациентов в отделениях реанимации и интенсивной терапии.....	114
6.4 Обследование пациентов с муковисцидозом.....	117
ГЛАВА 7. СОВЕРШЕНСТВОВАНИЕ СИСТЕМЫ ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКОГО МОНИТОРИНГА НА ОСНОВЕ МОЛЕКУЛЯРНО-БИОЛОГИЧЕСКИХ МЕТОДОВ ЗА ИНФЕКЦИЯМИ, ОБУСЛОВЛЕННЫМИ МЕТИЦИЛЛИНРЕЗИСТЕНТНЫМИ ШТАММАМИ СТАФИЛОКОККА.....	124
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	131
ВЫВОДЫ	140
ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ.....	142
ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШЕЙ РАЗРАБОТКИ ТЕМЫ	143
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	144
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	145

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования

Инфекции, связанные с оказанием медицинской помощи (ИСМП), являются важнейшей проблемой системы современного здравоохранения, наносящей серьезный социальный и экономический ущерб и имеющей повсеместное распространение. В ряду причин смертности населения ИСМП занимают десятое место и поражают до 10% пациентов, находящихся в учреждениях медицинской помощи [2]. В Российской Федерации (РФ) по данным референс-центра по мониторингу за ИСМП ЦНИИ Эпидемиологии в 2021 году абсолютное число случаев ИСМП составило 33913. Реальная заболеваемость госпитальными инфекциями, согласно экспертным оценкам российских эпидемиологов, гораздо выше, а экономический ущерб от случаев ИСМП по примерным подсчётам составляет около 300 млрд рублей в год [2,11].

Особую обеспокоенность вызывает рост устойчивости возбудителей заболеваний к антибактериальным препаратам. По последним данным Центра по контролю и профилактике заболеваний (CDC) только в США резистентными штаммами ежегодно инфицируется около 2,8 млн человек, из которых умирают более 35000 [47,117]. По прогнозам к 2050 году смертность от инфекционных заболеваний, не поддающихся лечению в связи с устойчивостью возбудителей к антибактериальным препаратам, составит 10 млн человек в год и выйдет на одно из лидирующих мест наряду с сердечно-сосудистыми и онкологическими заболеваниями [104].

Распоряжением Правительства Российской Федерации от 25 сентября 2017 года утвержден документ «О Стратегии предупреждения распространения антимикробной резистентности в РФ на период до 2030 года» [25], целью которой является разработка мер по предупреждению и ограничению распространения

антимикробной резистентности на территории Российской Федерации. А 30 марта 2019 года принято распоряжение Правительства РФ N 604-р «Об утверждении Плана мероприятий на 2019-2024 годы по реализации Стратегии предупреждения распространения антимикробной резистентности в Российской Федерации на период до 2030 года» [26]. В 2023 году Министерством здравоохранения Российской Федерации подготовлено информационное письмо «Об организации системы локального мониторинга антимикробной резистентности» от 25.05.2023 N 30-5/И/2-9190, ключевым пунктом которого является утверждение требований к обязательному проведению мониторинга антимикробной резистентности в многопрофильных медицинских организациях (стационарах) с коечным фондом более 500 коек [20].

В 2017 году Всемирная Организация Здравоохранения (ВОЗ) опубликовала список приоритетных патогенов, являющихся устойчивыми к антибактериальным препаратам, и представляющих наибольшую опасность для здоровья человека. *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*), устойчивый к метициллину, вошел во вторую группу списка микроорганизмов, с высоким уровнем приоритетности, включающую бактерии с растущей лекарственной устойчивостью [122]. Под буквой «S» входит он и в известный список «ESKAPE-патогенов» [42].

Выделение *S. aureus*, устойчивого к метициллину (оксациллину), подразумевает его устойчивость и к другим β -лактамам: пенициллинам, цефалоспорином, карбапенемам. Наблюдается также ассоциированная устойчивость к аминогликозидам, макролидам, линкозамидам и тетрациклинам. Заболевания, вызванные MRSA (метициллин-устойчивые бактерии *S. aureus*), могут начинаться на фоне терапии антибиотиками, в частности на фоне терапии аминогликозидами и цефалоспорином. В случае тяжелых внутрибольничных инфекций назначение антибиотиков, к которым возбудитель является устойчивым, может значительно ухудшить прогноз заболевания. Смертность от осложнений, вызванных MRSA, значительно варьирует в зависимости от возраста пациента, сопутствующих заболеваний, присоединения дополнительной микрофлоры. Смертность пациентов, инфицированных MRSA, на 60% выше по сравнению с

пациентами, инфицированными метициллинчувствительными штаммами [38]. Осложнения, вызванные MRSA, приводят не только к увеличению показателей летальности, но и к более длительным срокам госпитализации и, соответственно, к большим экономическим потерям. Среди вторичных проявлений инфекций, вызванных MRSA, наиболее распространенными являются эндокардиты, гематогенный остеомиелит и септический артрит.

Согласно данным референс-центра по мониторингу за ИСМП ЦНИИ Эпидемиологии суммарно золотистый и эпидермальный стафилококки выходят на первое место по вкладу в заболеваемость ИСМП среди бактериальных возбудителей [11]. В этих условиях совершенствование системы эпидемиологического мониторинга за метициллинрезистентными штаммами стафилококка приобретает все более актуальное значение.

В целях совершенствования системы эпидемиологического мониторинга необходимо внедрение молекулярно-биологических методов не только для выявления, но и для внутривидового типирования стафилококков. Полногеномное секвенирование позволяет получить наиболее полную информацию о генетических особенностях изучаемых штаммов, включая наличие отдельных генов и мобильных генетических элементов, определяющих патогенный и эпидемический потенциал изучаемого штамма. Необходимость типирования и наблюдения за молекулярно-биологическими свойствами (включая локусы антибиотикорезистентности и патогенности штаммов) метициллинрезистентных стафилококков обусловлена важностью быстрого реагирования на эпидемические вспышки, вызванные проблемными внутрибольничными штаммами, и принятия профилактических мер. Применение молекулярно-биологических методов позволит сократить время, затрачиваемое на идентификацию эпидемически значимых штаммов микроорганизмов, позволит улучшить эпидемиологический мониторинг за заболеваниями, обусловленными метициллинрезистентными стафилококками в структуре заболеваемости ИСМП, обеспечит координацию планирования и осуществления профилактических и противоэпидемических

мероприятий, что обуславливает необходимость проведения научных исследований в данной области.

Степень разработанности темы исследования

Впервые устойчивость к антибиотику метициллину у золотистого стафилококка была выявлена ещё в 1961 году в Англии, через год после введения антибиотика в широкую клиническую практику [43]. На сегодня известно о широко распространенной циркуляции в госпитальных условиях эпидемических штаммов золотистого стафилококка. Установлен факт клонального распространения метициллинрезистентных штаммов в стационарах. Принадлежность большинства клинических изолятов метициллинрезистентных стафилококков к ограниченному числу генетических линий или клонов установлена с помощью молекулярно-биологических методов [107].

На генетическом уровне метициллинрезистентность обусловлена наличием стафилококковой хромосомной кассеты SCC_{mec} и mec комплекса в её составе. Компонентами SCC_{mec} являются – структурные гены mecA или mecC, (кодирующие синтез дополнительного пенициллинсвязывающего белка); регуляторные элементы – mecI и mecR1 (контролирующие транскрипцию mecA или mecC); дополнительные mec ассоциированные последовательности ДНК, которые могут включать транспозоны и инсерционные элементы и гены резистентности к другим антибиотикам. На сегодня описано 12 типов стафилококковых хромосомных кассет, которые отличаются между собой размером, расположением и наличием некоторых структурных элементов [118].

В настоящее время для идентификации стафилококков широко используются традиционные микробиологические методы. На выделение, идентификацию и определение лекарственной устойчивости у метициллинрезистентных стафилококков требуется не менее 3 дней с помощью бактериологических методов, а метод ПЦР в режиме реального времени позволяет решить эти задачи в течение всего нескольких часов. Также используется MALDI-TOF – протеомный анализ,

выполняемый методом масс-спектрометрии, позволяющий выявлять белки, специфичные для конкретного возбудителя и идентифицировать их с помощью существующих баз данных. Недостатками этого метода является все та же зависимость от стадии культивирования, что увеличивает время идентификации. Также остается высокой стоимость оборудования. С помощью масс-спектрометрии, вследствие ограниченной чувствительности (величины динамического диапазона) масс-спектрометров, проблематична идентификация микроорганизма при наличии сразу нескольких возбудителей в одном образце, при микст-инфекции [61]. Необходимо изучение возможностей молекулярно-биологических методов для выявления госпитальных штаммов и внедрение новых методов для совершенствования системы эпидемиологического мониторинга.

В 2014 году Национальной ассоциацией специалистов по контролю инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи, были утверждены клинические рекомендации «Молекулярно-генетический мониторинг в системе эпидемиологического надзора за инфекциями, связанными с оказанием медицинской помощи», в которых изложены основные принципы проведения молекулярно-генетического мониторинга возбудителей инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи. Использование молекулярно-биологических методов постепенно начинает находить применение в эпидемиологическом анализе бактериальных патогенов.

Изучению аспектов эпидемиологии инфекций, вызванных представителями рода *Staphylococcus*, посвящены работы российских ученых Дмитриенко О.А., Гончарова А.Е., Хохловой О.Е., Ефимовой Т.В., Павловой Т.Ю., Чанышевой Р.Ф., Широковой И.Ю., Сидоровского Ю.И., Бушуевой В.В., Ковалишеной О. В., Ковалевой Е.П, Семиной Н.А., Акатова А.К., Зуевой В.С., Чистович Г.Н., Покровского В.И. и ряда других.

Однако, опыт применения молекулярно-биологических методов, в том числе полимеразной цепной реакции (ПЦР) и полногеномного секвенирования, для совершенствования эпидемиологического мониторинга за

метициллинрезистентными штаммами стафилококка в нашей стране, невелик, о чем свидетельствует ограниченное количество публикаций на эту тему.

Цель исследования

Совершенствование эпидемиологического мониторинга за инфекциями, обусловленными метициллинрезистентными штаммами стафилококка, на основе разработки и внедрения молекулярно-биологических методов.

Задачи исследования

1. Изучить динамику уровня и структуры заболеваемости ИСМП, обусловленными стафилококками, в Российской Федерации.
2. Провести сравнение результатов бактериологических и молекулярно-биологических методов для выявления метициллинрезистентных штаммов в биологическом материале.
3. Разработать набор реагентов на основе ПЦР для выявления и количественного определения ДНК метициллинрезистентных стафилококков в биологическом материале и смывах с медицинского оборудования, инструментария и инвентаря.
4. Организовать и провести эпидемиологический мониторинг за инфекциями, обусловленными метициллинрезистентными штаммами стафилококка, с помощью молекулярно-биологических методов в стационарах города Москвы.
5. Обосновать и предложить направления совершенствования эпидемиологического мониторинга за инфекциями, обусловленными метициллинрезистентными штаммами стафилококка, с помощью молекулярно-биологических методов.

Научная новизна исследования

Проведенное исследование позволило определить уровень и структуру

заболеваемости ИСМП, обусловленными стафилококками, на территории Российской Федерации и выявить тенденцию к снижению заболеваемости. Заболеваемость ИСМП стафилококковой этиологии в расчете на 1000 госпитализированных пациентов, в 2018 и 2019 году составила 0,15; в 2020 – 0,1; в 2021 – 0,07. Произошло снижение заболеваемости в РФ на 0,08 в расчете на 1000 госпитализированных пациентов в 2021 году по сравнению с 2018 годом. Определена доля заболеваний, обусловленных метициллинрезистентными стафилококками, в общей структуре ИСМП, которая составила 2,18% (95% ДИ: 2,04 – 2,33). Показано, что фактический уровень ИСМП, обусловленных метициллинрезистентными стафилококками превышает регистрируемый. Так, по данным онлайн-платформы анализа данных резистентности к антимикробным препаратам в России в 2018-2020 годах, количество случаев нозокомиальных инфекций кровотока в РФ, вызванных метициллинрезистентными стафилококками, в среднем, в 7 раз выше официальных данных. Определен вклад метициллинрезистентных стафилококков в этиологию при инфекциях кровотока с использованием молекулярно-биологических методов – 8,23% (95% ДИ: 6,33-10,63).

Сравнительный анализ результатов бактериологических и молекулярно-биологических методов выявления метициллинрезистентных стафилококков в крови и мазках из ран показал высокую чувствительность и специфичность метода ПЦР в режиме реального времени. Методом ПЦР метициллинрезистентные стафилококки были выявлены в 27,7% образцов биологического материала, что на 7,9% больше по сравнению с бактериологическим методом.

Впервые разработана и зарегистрирована ПЦР-методика для количественного определения метициллинрезистентных стафилококков в клиническом материале.

Показано, что у детей, больных муковисцидозом, статистически значимо чаще выявляли ДНК метициллинрезистентных стафилококков ($p=0,035$) по сравнению с детьми из контрольной группы. Шансы встречаемости

метициллинрезистентных штаммов в отделяемом ротоглотки детей, больных муковисцидозом, в 8,6 раз выше, чем у здоровых детей.

Проведено полногеномное секвенирование метициллинрезистентных штаммов стафилококков, выделенных из биологического материала и смывов в многопрофильном стационаре города Москвы и идентифицирован новый сиквенс-тип *Staphylococcus aureus* (номер ST5555).

Научно обоснован подход по совершенствованию эпидемиологического мониторинга за метициллинрезистентными штаммами *Staphylococcus spp.* с помощью молекулярно-биологических методов.

Теоретическая и практическая значимость исследования

Теоретическая значимость диссертационной работы заключается в получении актуальных научных данных об уровне и структуре заболеваемости ИСМП, обусловленными стафилококками, на территории Российской Федерации. Представлены современные научные сведения о доле заболеваний, обусловленных метициллинрезистентными стафилококками, в общей структуре ИСМП, определен вклад метициллинрезистентных стафилококков в этиологию инфекций кровотока.

Показано, что дети, больные муковисцидозом, относятся к группе высокого риска инфицирования метициллинрезистентными штаммами стафилококка.

Разработаны правила взятия, транспортировки и хранения смывов с поверхностей медицинского оборудования, инструментария, инвентаря и других объектов внутрибольничной среды для последующей ПЦР-диагностики в интересах деятельности специалистов клинко-диагностических лабораторий и центров гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора.

Разработанный набор реагентов на основе ПЦР для выявления и количественного определения ДНК метициллинрезистентных стафилококков «АмплиСенс® MRSA-скрин-титр-FL» в настоящее время широко применяется в клинко-диагностических лабораториях учреждений здравоохранения России и за рубежом.

Научно обоснованы направления практического совершенствования эпидемиологического мониторинга за метициллинрезистентными штаммами стафилококка на основе молекулярно-биологических методов.

Методология и методы исследования

Методологическая основа диссертационной работы построена в соответствии с поставленной целью и задачами исследования. При разработке дизайна исследования использованы общенаучные подходы и методы классической эпидемиологии – эпидемиологический метод с применением комплекса методических подходов, включая описательный и аналитический приемы, а также лабораторные исследования (молекулярно-биологические, бактериологические) и статистические методы исследования.

Положения, выносимые на защиту

1. В 2018-2021 годах наблюдалось снижение заболеваемости ИСМП, вызванными стафилококками в РФ. Удельный вес заболеваний, обусловленных метициллинрезистентными стафилококками, по официальным данным в общей структуре ИСМП составлял в среднем 2,18% (95% ДИ: 2,04 – 2,33), однако реальное количество инфекций, вызванных метициллинрезистентными стафилококками, выше данных официальной статистики.

2. Метод ПЦР в режиме реального времени статистически значимо чаще выявляет метициллинрезистентные стафилококки по сравнению с традиционным бактериологическим исследованием ($p=0,0071$).

3. Разработан набор реагентов, позволяющий выявлять и количественно определять ДНК метициллинрезистентных стафилококков в биологическом материале методом ПЦР с гибридационно-флуоресцентной детекцией «АмплиСенс® MRSA-скрин-титр-FL».

4. Во время мониторинга за инфекциями, обусловленными метициллинрезистентными стафилококками, ДНК метициллинрезистентных коагулазонегативных стафилококков выявлялась чаще, чем ДНК метициллинрезистентного золотистого стафилококка ($p < 0,0001$). Частота выявления метициллинрезистентных стафилококков в крови у пациентов ОРИТ с признаками инфекции составила 8,23% (95% ДИ: 6,33-10,63). В смывах с объектов внутрибольничной среды ДНК метициллинрезистентных стафилококков в среднем была выявлена в более чем трети (37,9%) забранных образцов.

5. В целях совершенствования системы эпидемиологического мониторинга за метициллинрезистентными штаммами стафилококка, необходимо внедрение современных молекулярно-биологических методов для мониторинга внутрибольничной среды и выявления метициллинрезистентных стафилококков у пациентов по показаниям и из групп риска.

Личное участие автора в получении результатов

Вклад автора во все этапы диссертационного исследования, включая планирование, организацию, сбор и систематизацию данных, статистическую обработку данных и анализ, является определяющим. Автор принимал непосредственное участие в формулировании цели, задач и выводов настоящей работы; определении методологии исследования, разработке и апробации нового молекулярно-биологического метода детекции метициллинрезистентных стафилококков; эпидемиологических и молекулярно-биологических исследований; обработке полученных экспериментальных данных и публикации полученных результатов.

Внедрение результатов исследования

1. Получено регистрационное удостоверение на набор реагентов для выявления и количественного определения ДНК метициллинчувствительного и

метициллинрезистентного *Staphylococcus aureus*, метициллинрезистентных коагулазонегативных *Staphylococcus spp.* в биологическом материале методом ПЦР с гибридизационно-флуоресцентной детекцией «АмплиСенс® MRSA-скрин-титр-FL» (№ ФСР 2012/13998 от 04.03.19).

2. Методические рекомендации. «Взятие, транспортировка, хранение биологического материала для ПЦР-диагностики». – М.: ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, 2021. – 112 с. DOI: <https://doi.org/10.36233/978-5-6045286-6-2>

3. База данных «Взятие, транспортировка, хранение биологического материала для ПЦР-диагностики». Свидетельство о государственной регистрации базы данных № 2022620002. Заявка номер 2021623223, дата поступления 22 декабря 2021 г. Дата государственной регистрации в Реестре баз данных 10 января 2022 г.

4. База данных «Эпидемиологический мониторинг за инфекциями, обусловленными метициллинрезистентными штаммами *Staphylococcus spp.*». Свидетельство о государственной регистрации базы данных № 2022620579. Заявка номер 2022620260, дата поступления 21 февраля 2022 г. Дата государственной регистрации в Реестре баз данных 17 марта 2022 г.

5. Свидетельство о государственной регистрации программы для ЭВМ 2023661976 «AmpliSens® MRSA-screen-titre Soft». Дата государственной регистрации в Реестре программ для ЭВМ 5 июня 2023 г. Заявка № 2023660554 от 25 мая 2023 г.

6. Результаты работы используются в лекционном материале сертификационных курсов усовершенствования «ПЦР – диагностика инфекционных заболеваний», проводимых на базе ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора; на семинарах, проводимых для специалистов республик Армения, Белоруссия, Казахстан, Киргизия, Таджикистан; на курсах практических занятий для специалистов из стран-членов АСЕАН.

Степень достоверности и апробация результатов работы

Достоверность полученных результатов определяется репрезентативным объемом проанализированных данных, их статистическим анализом и использованием современных методов исследования, соответствующим поставленной цели и задачам.

В ходе выполнения работы материалы диссертационного исследования были представлены на следующих научно-практических мероприятиях:

- научно-практическая конференция «Молекулярная диагностика инфекционных болезней» (25 мая 2010 года);
- Российско-китайская научно-практическая конференция по медицинской микробиологии и клинической микологии (XVIII Кашкинские чтения) (10 июня 2015 года);
- XIX Форум «Национальные дни лабораторной медицины России – 2015» (24 сентября 2015 года);
- научно-образовательная конференция «Перипротезная инфекция в травматологии и ортопедии» (23 ноября 2017 года);
- IX Всероссийская научно-практическая конференция с международным участием «Молекулярная диагностика-2017» (20 апреля 2017 года);
- III Российский конгресс лабораторной медицины (12 октября 2017 года);
- областная научно-практическая конференция «Современные возможности лабораторной медицины в диагностике нозокомиальных инфекций» (7 декабря 2017 года);
- Всероссийская научно-практическая интернет-конференция с международным участием «Молекулярная диагностика и биобезопасность – 2020» (6 октября 2020 года);
- XXIII Конгресс педиатров России с международным участием «Актуальные проблемы педиатрии» (7 марта 2021 года);

– Конгресс с международным участием «Контроль и профилактика инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи (ИСМП-2021)» (26 ноября 2021 года);

– Конгресс с международным участием «Молекулярная диагностика и биобезопасность 2022» (27 апреля 2022 года);

– III Съезд детских врачей Московской области с международным участием «Инновации в педиатрии: междисциплинарное сотрудничество» (7 сентября 2022 года);

– XII Съезд Всероссийского научно-практического Общества эпидемиологов, микробиологов и паразитологов (28 октября 2022 года);

– конференция с международным участием "Пищевая безопасность и совместные усилия по снижению устойчивости к противомикробным препаратам" (8 декабря 2022 года);

– XVI Национальный конгресс с международным участием «Муковисцидоз и наследственные заболевания легких» (27 апреля 2023 года);

– Конгресс с международным участием «Молекулярная диагностика и биобезопасность — 2023» (28 апреля 2023 года);

– XXV международный конгресс МАКМАХ по антимикробной терапии и клинической микробиологии (24 мая 2023 года);

– Международный симпозиум - научная конференция «100 лет с именем Пастера» (6 июня 2023 года).

Диссертационная работа была представлена и рекомендована к защите на заседании апробационного совета Федерального бюджетного учреждения науки «Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека Роспотребнадзора от 29 июня 2023 года, протокол №68.

Соответствие диссертации паспорту научной специальности

Научные положения диссертации соответствуют паспорту специальности 3.2.2. Эпидемиология. Результаты проведенного исследования соответствуют областям исследований: пунктам 2, 4 и 5 паспорта специальности 3.2.2. Эпидемиология.

Публикации

По теме диссертации опубликовано 22 печатных работы, в том числе 4 статьи в изданиях, рекомендованных ВАК РФ для публикации основных результатов диссертации по специальности «Эпидемиология».

Структура и объём диссертации

Диссертация состоит из введения, семи глав (обзора литературы; главы, описывающей материалы и методы исследования; 5 глав собственных исследований), заключения, выводов и практических рекомендаций. Объём работы – 159 страниц. Диссертация иллюстрирована 32 таблицами и 25 рисунками. Список литературы содержит 126 источников, в том числе 36 – на русском языке и 90 – на английском языке.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Особенности эпидемиологии заболеваний, вызванных метициллинрезистентными штаммами стафилококка

1.1.1 Эпидемиологическое значение и распространенность

Стафилококки – это бактерии размером от 0,6 до 1,2 мкм, относящиеся к семейству *Staphylococcaceae*, роду *Staphylococcus*. Род *Staphylococcus* в настоящее время насчитывает не менее 50 видов, повсеместно распространенных в окружающей среде. Коагулозонегативные виды, которые наиболее часто выделяются из клинического материала: *S. capitis*, *S. cohnii*, *S. epidermidis*, *S. haemolyticus*, *S. hominis*, *S. hyicus*, *S. lugdunensis*, *S. saprophyticus*, *S. schleiferi* подвид *schleiferi*, *S. sciuri*, *S. simulans*, *S. warneri* и *S. xylosus*. Заболевания, вызываемые стафилококками, нередко возникают в больницах, особенно у пациентов, страдающих другими серьезными заболеваниями. В этих случаях стафилококки являются возбудителями внутрибольничных инфекций (ВБИ). Значение стафилококков как возбудителей ВБИ чрезвычайно велико в хирургии, кардиохирургии, травматологии, ортопедии, неонатологии, акушерстве, гинекологии и гериатрии. Трудности в лечении связаны с высокой встречаемостью метициллинрезистентных штаммов.

Золотистый стафилококк (*S. aureus*) является наиболее патогенным для человека среди всех видов рода *Staphylococcus*, при этом может присутствовать бессимптомно на различных частях тела человека – коже, слизистых, включая нос и кишечник здоровых людей. Инфицирование возбудителем золотистого стафилококка клинически может проявляться в различных формах – от локализованных кожных поражений до септических генерализованных процессов, порой заканчивающихся летально. *S. aureus* может быть одной из причин пневмонии, гнойного плеврита, остеомиелита, эндокардита, менингита, мастита, абсцессов, послеродовой лихорадки, флебита, цистита, пиелонефрита, и других

очаговых гнойных процессов. Наиболее часто встречаются гнойно-воспалительные поражения кожи и подкожной клетчатки. Однако эти локализованные процессы могут переходить в генерализованные и завершаться сепсисом. Хорошо известны стафилококковые инфекции кожи и поверхностных тканей тела – пиодермии, фурункулы, абсцессы, карбункулы, паронихии, импетиго, тонзиллиты, гаймориты, отиты, а также инфекционные осложнения хирургических ран [12]. Коагулазонегативные стафилококки – гетерогенная группа стафилококков, исторически классифицируемая, как менее патогенная или не патогенная по сравнению с золотистым стафилококком. Однако на сегодня показано, что некоторые представители коагулазонегативных стафилококков (*S. epidermidis*, *S. haemolyticus*) также могут вызывать внутрибольничные инфекции и чаще всего это именно метициллинрезистентные штаммы. Метициллинрезистентный золотистый стафилококк (MRSA) может вызывать различные инфекции, в частности инфекции кожи, мягких тканей, костей и кровотока, а также является самой распространенной причиной послеоперационных раневых инфекций; и вырабатывает токсины (некоторые штаммы), которые могут вызывать различные специфические симптомы, включая синдром токсического шока и пищевое отравление. Осложнения, вызванные метициллинрезистентными штаммами стафилококка, могут приводить к увеличению смертности, сроков госпитализации, и значительным экономическим потерям. Стафилококки могут являться причиной мастита у молочных животных и поражений костей и суставов у домашней птицы, а также причиной инфекций кожи у поголовья домашнего скота.

Устойчивость к метицилину обусловлена наличием гена *mecA* или *mecC*, которые кодируют пенициллинсвязывающий белок с низким сродством β -лактамам. В 2011 году в Великобритании и Дании в биологическом материале от быка и от человека были обнаружены штаммы *S. aureus*, устойчивые к метицилину, но не содержащие ген *mecA*. Оказалось, что штаммы содержат гомолог гена *mecA*, обозначенный *mecALGA251* (*mecC*) [92].

Инфекции, вызываемые устойчивыми к антибиотикам штаммами, проходят периодическими эпидемическими вспышками, которые инициируются одним или несколькими успешными клонами. Новые штаммы появляются, широко распространяются, а затем снова исчезают [115]. В XX веке было несколько основных вспышек лекарственно-устойчивого *S. aureus* [48]. Первая вспышка началась в середине 1940-х годов с увеличением доли инфекций, вызванных устойчивыми к пенициллину штаммами *S. aureus*. Устойчивые к пенициллину штаммы распространились повсеместно. К началу 1950-х годов эпидемия переросла в пандемию [112]. Появление метициллина знаменовало собой начало второго этапа. Первые сообщения о появлении штамма *S. aureus*, который был устойчив к метициллину, были опубликованы в 1961 году [43], хотя ген, отвечающий за устойчивость к метициллину, был идентифицирован только 20 лет спустя. Архаичные штаммы MRSA циркулировали в больницах по всей Европе до 1970-х годов.

На сегодня несколько успешных клонов *S. aureus* ответственны за большинство случаев международного распространения и вспышек в сфере здравоохранения. Недавнее структурированное исследование показало, что наиболее распространенными клонами среди метициллинрезистентных *S. aureus* в странах ЕС являются ST22 (EMRSA15), ST225 (Нью-Йорк / Япония), ST8 (US300), ST5 (Нью-Йорк / Япония) и ST8 (южная Германия) [52].

На сайте Европейского регионального офиса Всемирной Организации Здравоохранения (ВОЗ) доступны данные по распространенности MRSA в 19 странах, полученные в рамках проекта по эпиднадзору за устойчивостью к противомикробным препаратам в Центральной Азии и Восточной Европе (CAESAR) и данные в 30 странах, полученные в рамках Европейской сети по надзору за устойчивостью к антимикробным средствам (EARS-Net) (рисунок 1).

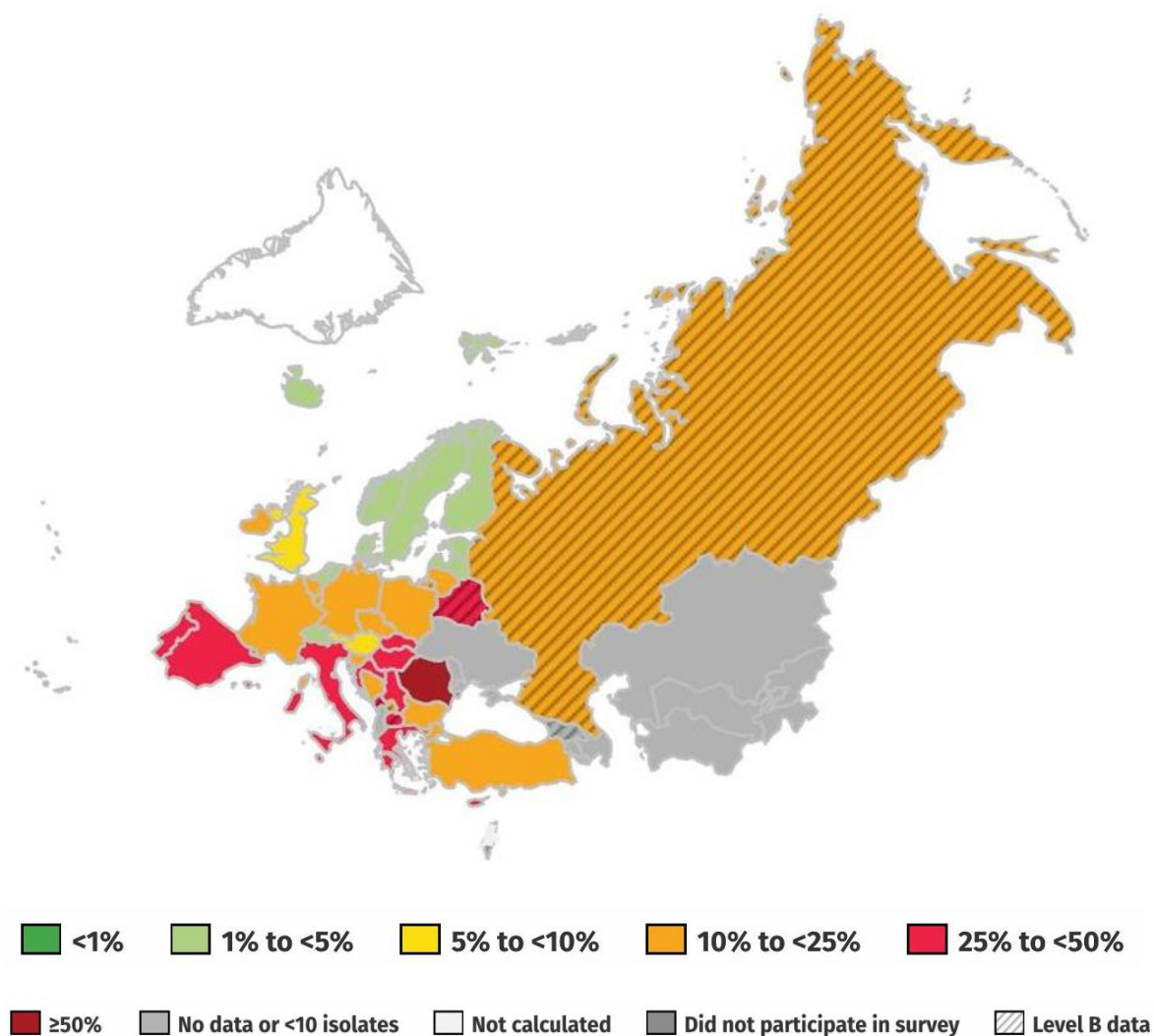


Рисунок 1 – Распространенность инвазивных изолятов золотистого стафилококка с резистентностью к метициллину (MRSA).

В Скандинавских странах, Эстонии, Нидерландах и Швейцарии самая низкая доля (<5%) инвазивных инфекций, вызванных MRSA. Доля метициллинрезистентного золотистого стафилококка, превышающая 25% среди всех стафилококков, обнаружена во многих странах в южной и восточной частях Европейского региона.

Метициллинрезистентный золотистый стафилококк может вызывать различные инфекции, в частности инфекции кожи, мягких тканей, костей и кровотока, а также является самой распространенной причиной послеоперационных раневых инфекций; и вырабатывает токсины (некоторые штаммы), которые могут вызывать различные специфические симптомы, включая синдром токсического шока и пищевое отравление. MRSA является причиной 42%

от всех зарегистрированных стафилококковых бактериемий в Великобритании [62]. В одном из опубликованных исследований, проведенных в Бельгии показано, что смертность пациентов от бактериемии, вызванной MRSA - 23,4%. Это сильно выше смертности от бактериемии, вызванной чувствительным к метициллину *S. aureus* 1,3% [105]. В доантибиотическую эру бактериемия даже от обычного *S. aureus* обычно заканчивалась смертельным исходом. В обзоре случаев начала 1940-х годов смертность среди пациентов составляла 82%, а у пациентов в возрасте старше 50 лет - 98% [116].

Рост доли метициллинрезистентных штаммов, наблюдающийся с конца двадцатого века в медицинских учреждениях России, делает неэффективным использование большинства антибиотиков и существенно ухудшает качество оказания медицинской помощи населению [13]. По результатам исследования МАРАФОН, которое проводилось НИИ антимикробной химиотерапии г. Смоленска в 2011 и 2012 годах, доля *Staphylococcus aureus* в структуре бактериальных возбудителей нозокомиальных инфекций составляет 16,7%.

Многоцентровые исследования, проводившиеся в России, показывают, что доля устойчивых к антибактериальным препаратам изолятов стабильно высокая. Доля MRSA, составлявшая 33,4% в 2001–2002 годах и 54,4% в 2006–2008 годах, в 2011–2012 году достигла 66,9% (рисунок 2) [3,4].

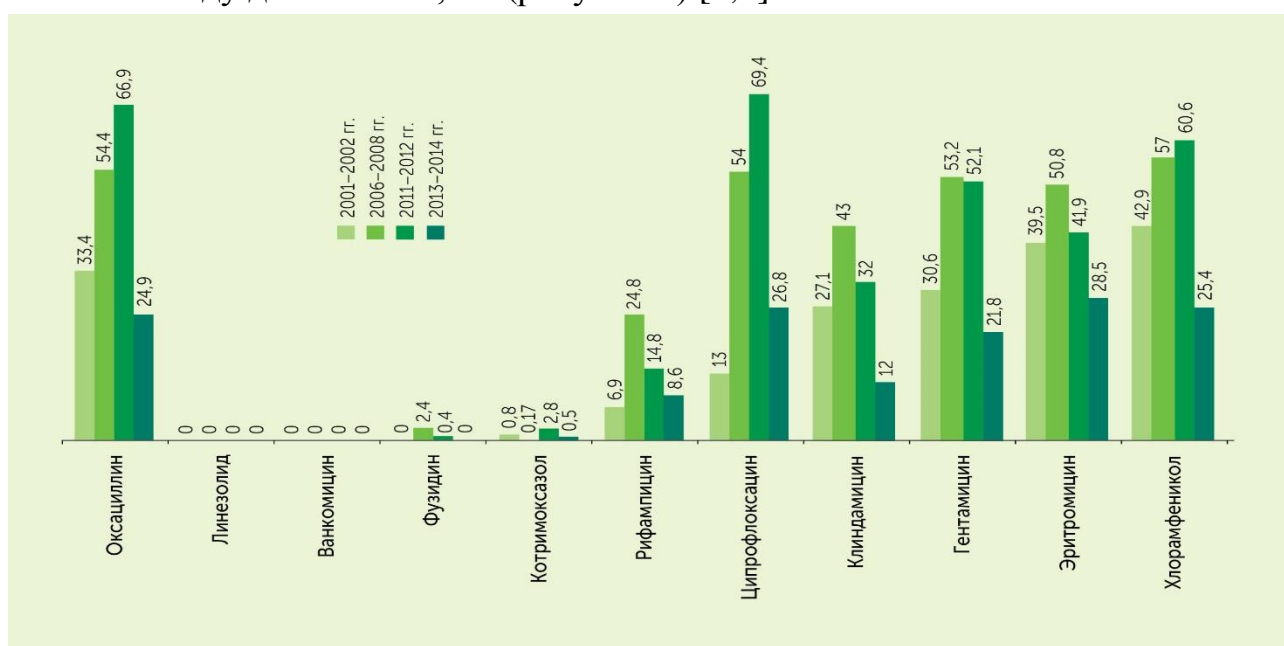


Рисунок 2 – Резистентность нозокомиальных изолятов *S. aureus* в России, % [3,4]

1.1.2 Источники и пути передачи метициллинрезистентных стафилококков

Основной путь передачи *S. aureus* - контактный, обычно при кожном контакте с колонизированным или инфицированным человеком, хотя контакт с загрязненными предметами и поверхностями также играет роль [94,114]. Основными предрасполагающим фактором инфицирования является нарушение кожного барьера. Хотя большинство серьезных стафилококковых инфекций обусловлено коагулазопозитивными стафилококками (*Staphylococcus aureus*), инфекции, вызванные коагулазонегативными стафилококками (например, *Staphylococcus epidermidis*), также могут представлять угрозу для жизни. *Staphylococcus aureus* является высокоинвазивным патогеном, способным гематогенно распространяться на многие органы. Коагулазонегативные стафилококки обычно требуют наличия протезного материала, чтобы закрепиться и вызвать инфекцию.

Исследования показали, что около 20% людей являются носителями *S. aureus* на слизистой носа и имеют повышенный риск заражения этим патогеном. Нос является основной экологической нишей, в которой *S. aureus* находится у людей [123]. Хотя самый большой резервуар человеческих штаммов *S. aureus* - человеческий нос, тем не менее, кожа, волосы и слизистые оболочки также могут быть колонизированы [119].

Стафилококк очень неприхотлив и может расти практически в любой среде, способен адаптироваться к среде обитания с минимальным количеством питательных веществ. Основным биологическим свойством *S. aureus* является его способность бессимптомно колонизировать здоровых людей. С одной стороны, золотистый стафилококк – явный патоген, а с другой оппортунистический микроорганизм, который может являться частью нормальной флоры здорового человека.

Домашние животные: собаки, кошки и лошади могут играть роль в передаче *S. aureus*. Они также уязвимы к инфекциям *S. aureus* [45]. Здоровье людей и животных тесно взаимосвязаны. Согласно современным исследованиям, *S. aureus*

предположительно чаще передавался от человека к домашнему скоту, чем от скота к людям [74]. Первая передача стафилококка от людей к животным произошла около 5500 лет назад, совпав с одомашниванием скота по всему Старому Свету. Первая передача к птице предположительно произошла 275 лет назад [97]. Предположительно было совершено не менее 13 передач от людей к животным и две передачи от популяций животных обратно к людям [74].

S. aureus является причиной ряда вспышек и случаев пищевого отравления. В XXI веке новый штамм MRSA был идентифицирован у свиней, а затем и в сыром мясе у других сельскохозяйственных животных [55]. Штаммы MRSA находят в различных продуктах, включая бычье молоко и сыр [88], мясные продукты [64,109], сырое куриное мясо и мясо индейки [39,49,50] и мясо дикого кабана [85]. Основной причиной пищевых отравлений, связанных со стафилококком, являются энтеротоксины, присутствующие в пищевых продуктах, загрязненных этими бактериями [58]. *S. aureus* является одной из причин мастита и кожных заболеваний у животных на молочных фермах [70,84]. Пища животного происхождения, сыр и другие молочные продукты являются потенциальным источником инфицирования человека, хотя большинство случаев заболевания человека связано с передачей стафилококка от человека к человеку, а не с животными или продуктами питания.

Выделяют ряд факторов, связанных с колонизацией внебольничными штаммами MRSA. К группам риска по колонизации метициллинрезистентным золотистым стафилококком относят спортсменов контактных видов спорта, детей в организованных коллективах, наркоманов, заключенных, служащих в армии. Повышенный риск колонизации MRSA у спортсменов связан с возможным нарушением целостности кожных покровов и контактом открытых участков кожи во время занятия спортом [57]. Основной фактор риска, с точки зрения колонизации внутрибольничными штаммами MRSA, это конечно же предшествующие госпитализации. Частыми факторами риска являются также сахарный диабет и предшествующая терапия антибактериальными препаратами [27]. С повышенным риском колонизацией MRSA связывают и отдельные сопутствующие заболевания: сердечную недостаточность, заболевания легких,

иммуносупрессию и почечную недостаточность. По литературным данным колонизация MRSA была чаще у пациентов с одновременным носительством ванкомицин-резистентных энтерококков и инфекцией *C. difficile* [41].

1.1.3 Профилактические и противоэпидемические мероприятия

Устойчивый к метициллину золотистый стафилококк на протяжении многих лет представляет проблему для клиницистов в условиях стационара, являясь одной из самых частых внутрибольничных инфекций. Чтобы справиться с этой проблемой на сегодня уже разработан и опробован ряд процедур для контроля и профилактики распространения MRSA. Это профилактические меры: деколонизация и изоляция пациентов с подтвержденным MRSA; традиционное мытье рук, использование перчаток и сокращение времени нахождения в больнице.

Споры о том, необходим ли рутинный скрининг пациентов на MRSA и изоляция MRSA-положительных пациентов, идут до сих пор. Рутинный скрининг в рамках первичной медицинской помощи считается неэффективным. Исследования показали, что у колонизированных пациентов через некоторое время возможна элиминация MRSA без какого-либо лечения [56]. Однако большинство исследователей придерживаются мнения, что скрининг необходим в стационарах, особенно в отделениях с высоким риском инфицирования MRSA и/или для пациентов с высоким риском инфицирования.

Скрининг и изолирование всех пациентов до получения их результатов анализа по MRSA, а также строгий инфекционный контроль позволили ликвидировать два основных эпидемических штамма и восемь дополнительных штаммов во время вспышки в 1991–1992 годах в Финляндии. С августа 1991 года по октябрь 1992 года в одной из больниц в Финляндии произошли две последовательные вспышки, связанные с MRSA. Во время и после этих вспышек MRSA был диагностирован у 202 человек в медицинском округе. В течение 6–8 недель все контактные пациенты, связанные с MRSA-положительными пациентами (получавшие лечение в отделении интенсивной терапии после

госпитализации), были обследованы один раз с помощью забора мазков из носа. Если в палате был обнаружен новый случай, соседям пациента по комнате проводили скрининг. Первоначально скрининг включал в себя только мазок из носа, но начиная с первой половины июня 1992 года культуры были взяты также из промежности, паха и подмышечных впадин, а также из всех открытых ран, поражений кожи и из ротоглотки. После получения двух отрицательных результатов по MRSA, у контактных пациентов больше не забирали мазки. К концу года все пациенты, идентифицированные как MRSA-положительные, были выписаны или переведены в инфекционное отделение. После этого в хирургических отделениях не было зарегистрировано новых случаев инфицирования MRSA. Внутрибольничное распространение удалось предотвратить благодаря систематическому скринингу и изоляционным процедурам [63]. Благодаря такому контролю в скандинавских странах долгие годы и до сих пор доля внутрибольничных изолятов *S. aureus*, устойчивых к метициллину, остается очень низкой по сравнению с другими Европейскими странами и США.

Количество работ, посвященных подавляющему распространению MRSA, увеличивается, в то время как те, в которых показаны успешные усилия по элиминации возбудителя или те, которые утверждают, что внутрибольничное распространение MRSA можно и нужно контролировать, немногочисленны. Ряд исследователей, обсуждающих вопрос о контроле MRSA, вообще подвергает сомнению необходимость и оправданность контроля за MRSA [44]. Однако опыт скандинавских стран показывает, что контроль и снижение распространенности MRSA возможны. Сводная информация о эффективных мерах борьбы с распространением метициллинрезистентного стафилококка представлена в таблице 1 [46].

Таблица 1 – Рекомендуемые меры [46].

Мера	Наиболее целесообразное решение
Скрининг и изоляция в зоне высокого риска	Изоляция необходима до момента, пока не станут известны результаты скрининга. Это снижает риск инфекции
Скрининг и изоляция в зонах среднего и низкого риска	Выявление колонизированных или инфицированных пациентов необходимо при поступлении для размещения в палате. Использование изолированного или совместного ухода должно оцениваться с учетом риска.
Разделение пациентов	Пациенты, колонизированные или инфицированные MRSA, не должны размещаться рядом с пациентами с инвазивными устройствами, с ожогами, или рядом с иммунокомпрометированными пациентами
Гигиена рук	Необходима до и после каждого контакта с пациентом.
Личная гигиена	Медицинская одежда персонала должна меняться ежедневно. Колонизированные или инфицированные пациенты должны ежедневно менять свою одежду.
Средства индивидуальной защиты (СИЗ), такие как перчатки и фартуки	СИЗ предназначены только для одноразового использования и должны использоваться при риске загрязнения кровью или биологическими жидкостями, или при работе с колонизированными или инфицированными пациентами. СИЗ должны быть утилизированы после каждого контакта с пациентом

Продолжение таблицы 1

Мера	Наиболее целесообразное решение
Безопасная обработка и утилизация белья	Белье MRSA-колонизированных или MRSA-инфицированных пациентов следует менять ежедневно и помещать непосредственно в корзину для белья у кровати в соответствии с местными правилами. Белье должно быть аккуратно, не встряхивая, сложено в центр.
Очистка окружающей среды	График уборки должен быть составлен так, чтобы обеспечивать регулярную уборку всех помещений. Необходимы доступные руководства по уборке помещений, где присутствует инфекция. Внутренний персонал должен быть осведомлен о наличии инфекции, чтобы уборка производилась в соответствии с согласованными местными правилами. Обслуживающий персонал должен иметь доступ к СИЗ при работе в местах присутствия инфекции.
Обучение персонала	Все новые сотрудники должны изучать тему инфекционного контроля как часть плана введения в должность. Весь медицинский персонал в зонах ухода за пациентами должен иметь доступ к ежегодным учебным обновлениям по вопросам инфекционного контроля.

В исследовании, опубликованном в 2019 году в журнале «Infection Control & Hospital Epidemiology» было показано, что необходимы комплексные профилактические меры. Только выявление и деколонизация пациентов не приводят к значительному снижению MRSA. Однако применение этих мер одновременно с усиленной обработкой многоразового оборудования приводят к успеху. Очистка медицинского оборудования может быть сложным процессом,

требующим дополнительного, специально обученного персонала. Выделение персонала для очистки медицинского оборудования может быть экономически эффективной стратегией и смягчить риск передачи MRSA в отделениях интенсивной терапии [77]. Исследование, проведенное в 2009 году в Великобритании, показало, что работа техника, занимающегося очисткой клинического оборудования, позволила значительно снизить риск заражения MRSA и получить экономическую выгоду в 51000 долларов США в год [86].

Американским обществом эпидемиологии здравоохранения и Американским обществом специалистов по инфекционным болезням были разработаны практические рекомендации по стратегиям профилактики метициллин-резистентного золотистого стафилококка [121]. Они предложили схему подхода к профилактике метициллинрезистентной инфекции (рисунок 3).

Ввести основные требования



Провести оценку риска

Обучение медицинского персонала по теме MRSA

Обеспечить соблюдение рекомендаций по гигиене рук

Обеспечить необходимую дезинфекцию оборудования и окружающей среды.

Обеспечить соблюдение мер предосторожности при контакте с инфицированными и колонизированными MRSA пациентами

Внедрить программу мониторинга MRSA

- ✓ Внедрить список рассылок MRSA
- ✓ Внедрить лабораторную систему оповещения для немедленного уведомления медицинского персонала о новых случаях MRSA
- ✓ Внедрить систему оповещения, которая идентифицирует повторно-госпитализированных пациентов с MRSA



Продолжать мониторинг за MRSA

Разработать систему регулярного представления данных, связанных с MRSA, соответствующим заинтересованным сторонам, врачам, медсестрам, персоналу и другим руководителям больниц

Привлекать соответствующих лиц к выполнению и соблюдению основных профилактических мер



Установить, эффективен ли контроль за MRSA



Контроль за MRSA неэффективен



Обеспечить соблюдение основных требований



Контроль за MRSA эффективен



Продолжать мониторинг
Продолжать отслеживать показатели MRSA
Продолжать отчетность



Контроль за MRSA неэффективен



Ввести один или несколько специальных подходов

- Проведение активного эпиднадзора за колонизацией MRSA среди пациентов.
- Обеспечить соблюдение программы активного надзора
- Провести деколонизационную терапию MRSA
- Провести таргетную терапию (мупируцин +/- хлоргексидин глюконат) с активным наблюдением
- Универсальная терапия среди пациентов с высоким риском (хлоргексидин глюконат +/- мупируцин)
- Внедрение защитной одежды и перчаток
- Продолжать мониторинг



Рисунок 3 – Схема подхода к профилактике метициллинрезистентной инфекции [121]

В России Национальной ассоциацией специалистов по контролю инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи (НП «НАСКИ») в 2014 году были опубликованы Федеральные клинические рекомендации «Эпидемиология и эпидемиологический мониторинг инфекций, вызванных метициллинрезистентными штаммами золотистого стафилококка» [34]. В документе описываются обязательные мероприятия при выявлении пациентов, инфицированных или колонизованных MRSA. Обязательными мерами в очаге являются:

- изоляционно-ограничительные меры (изоляция пациентов с инфекцией в отдельной палате или в палате, где находятся другие пациенты с такой же инфекцией; проведение всех процедур и манипуляций, а также прием пищи в палате);
- лечебные мероприятия;
- соблюдение барьерных мер (смена халата при входе и выходе из палаты; наличие отдельного фонендоскопа; обязательное информирование персонала о наличии MRSA у пациента);
- дезинфекционные мероприятия (гигиена рук медицинского персонала; проведение регулярной и заключительной дезинфекции с последующим бактериологическим контролем объектов внешней среды [34]).

Уровень распространенности возбудителя – является основным критерием для определения объемов и типов противоэпидемических мероприятий и определяется по результатам эпидемиологического мониторинга за MRSA (рисунок 4).

Низким уровнем распространенности считается доля MRSA в этиологической структуре возбудителей ИСМП менее 10,0% от общего количества штаммов *S. aureus*. Средним уровнем распространенности от 10 до 30,0%. Высоким уровнем – более 30,1% от общего количества штаммов золотистого стафилококка.

Вспышкой инфекции, вызванной MRSA, согласно рекомендациям, считается случай группового заболевания (от 3 и более), при выявлении одного источника, общих путей и факторов передачи [34].



Рисунок 4 – Эпидемиологический мониторинг за MRSA [34]

При низком уровне распространенности MRSA оценивается риск возникновения эпидемической ситуации; выявляются группы и факторы риска, прогнозируется эпидемиологическая ситуация [34].

Комплекс дополнительных мер при высоком уровне распространенности MRSA включает: молекулярно-генетический мониторинг (выявление эпидемически значимых штаммов, расшифровку механизмов их циркуляции и распространения в стационаре); анализ количества применяемых дезинфицирующих средств и определение чувствительности к используемым дезинфектантам; анализ количества антисептиков; обучение медицинского персонала; контроль использования антибиотиков, качества обработки рук, соблюдения барьерных мер, изоляционно-ограничительных мероприятий; оценку эффективности противоэпидемических мероприятий [34].

1.2 Лабораторные методы идентификации и типирования стафилококков

Усиленный мониторинг, в том числе скрининг пациентов на метициллинрезистентные стафилококки признается важным компонентом для предотвращения дальнейшего распространения MRSA. Быстрое и точное обнаружение MRSA имеет решающее значение. Для идентификации MRSA можно использовать фенотипические и молекулярно-генетические методы.

К фенотипическим методам относится диско-диффузионный метод. Рекомендуемая среда – агар Мюллера-Хинтон. Толщина агара должна быть примерно 4 мм, поверхность агара – сухой (не должно быть видимых капель на поверхности агара и внутренней поверхности крышки). Колонии, выросшие на агаре в течение 16-20 ч, собираются стерильной бактериологической петлей или хлопковым тампоном. Собираются морфологически схожие колонии. Полученный материал ресуспендируют в стерильном изотоническом растворе и тщательно перемешивают до однородной мутности (до 0,5 по стандарту МакФарлан). Равномерно наносят инокулом на поверхность агара вручную или с помощью

автоматического устройства для инокуляции. Диск с антибиотиком наносится в течение 15 минут после инокуляции. Условия инкубации для *Staphylococcus spp.*: $35\pm 1^\circ\text{C}$, при обычном давлении, время 18 ± 2 ч. Измерение зон подавления роста проводится при помощи линейки, штангенциркуля или автоматических приборов для измерения зон подавления роста. Автоматические устройства должны быть калиброваны по отношению к визуальному учету. Согласно требованиям европейского комитета по определению чувствительности к антимикробным препаратам (EUCAST): «При оценке результатов выявления резистентности к метициллину у изолятов *Staphylococcus aureus* следует измерить видимую зону подавления роста и тщательно при хорошем освещении осмотреть зону с целью возможно обнаружения изолированных колоний внутри зоны. Эти колонии могут быть как следствием контаминации другим видом, так и проявлением гетерогенной метициллинрезистентности» [18]. Клиническую категорию чувствительности определяют в соответствии с таблицами пограничных значений диаметров зон подавления роста EUCAST (<http://www.eucast.org>). Большинство стафилококков продуцируют пеницилиназу, не все из них являются метициллинрезистентными. Изоляты, чувствительные к антибиотикам бензилпенициллин и цефокситин, чувствительны ко всем пеницилинам. Стафилококки, устойчивые к бензилпенициллину, но чувствительные к антибиотику цефокситину, являются чувствительными к ингибиторозащищенным бета-лактамам, изоксазолилпеницилинам (оксациллин, клоксацillin, диклоксацillin и флуклоксацillin) и нафциллину. Изоляты стафилококка, устойчивые к цефокситину, оцениваются как устойчивые ко всем пеницилинам [18].

Еще одним фенотипическим методом является метод микроразведений в бульоне. Используется стандартная методика ISO 20776-1 [82]. Если МПК цефокситина >4 мг/л, изолят оценивается как метициллинрезистентный. Согласно ГОСТ Р ИСО 20776-1-2010: «Микроразведение в бульоне не может надежно обнаружить резистентность, присущую гену *mecA*. Детекция гена *mecA* является референтным методом для обнаружения резистентности к Methicillin/Oxacillin».

На сегодня широкое распространение для идентификации метициллинрезистентных штаммов получают и молекулярно-генетические методы: ПЦР, ПЦР в режиме реального времени, ДНК-гибридизация и идентификация на основе секвенирования последовательности ДНК.

Для внутривидового типирования, например, при расследовании вспышек внутрибольничных инфекций и пищевых отравлений, используют методы молекулярного типирования: мультилокусное секвенирование-типирование, сп-типирование, молекулярное типирование с использованием гель-электрофореза в пульсирующем поле (пульс-электрофорез, PFGE-типирование), полногеномное секвенирование.

Мультилокусное секвенирование-типирование (MLST) стафилококков – это метод генетического типирования, основанный на определении последовательности нуклеотидов определенного набора генов (локусов). MLST выявляет вариации, которые медленно накапливаются с течением времени. Полученные результаты высоко воспроизводимы [83]. Для *Staphylococcus aureus* это набор из фрагментов семи генов: *arcC* (карбаматкиназа), *aroE* (шикиматдегидрогеназа), *glpF* (глицеролкиназа), *gmk* (гуанилаткиназа), *pta* (фосфотацетилтрансфераза), *tpi* (триозофосфатизомераза), *yqi* (ацетилкоэнзим А ацетилтрансфераза) (<https://pubmlst.org/saureus/>). Для *Staphylococcus epidermidis* это определение последовательности нуклеотидов набора из фрагментов семи следующих генов: *arcC* (карбаматкиназа); *aroE* (шикиматдегидрогеназа); ABC transporter (*gtr*); DNA mismatch repair protein (*mutS*); Pyrimidine operon regulatory protein (*pyrR*); Triosephosphate isomerase (*tpiA*); Acetyl coenzyme A acetyltransferase (*yqiL*) (<https://pubmlst.org/sepidermidis/>). Для *Staphylococcus haemolyticus* определяется последовательность фрагментов следующих генов: *arcC* carbamate kinase; SH_1200 D-3-phosphoglycerate dehydrogenase; *hemH* ferrochelatase; *leuB* 3-isopropylmalate dehydrogenase; SH1431 cell surface elastin binding protein; *cfxE* ribulose 5-phosphate epimerase; Ribose_ABC ribose ABC transporter (<https://pubmlst.org/shaemolyticus/>). Для *Staphylococcus hominis* определяется последовательность фрагментов 6 генов: *arcC*; *glpK*; *gtr*; *pta*; *tpiA*; *tuf*

(<https://pubmlst.org/shominis/>). Для *Staphylococcus pseudintermedius* определяется последовательность фрагментов следующих генов: *tuf*; *crn60*; *pta*; *purA*; *fdh*; *ack*; *sar* (<https://pubmlst.org/spseudintermedius/>).

Молекулярное типирование с использованием электрофореза в пульсирующем поле имеет большее разрешение по сравнению с MLST [110]. Метод основан на разделении расщепленных эндонуклеазой фрагментов геномной ДНК *S. aureus* в агарозном геле в зависимости от размера и сравнении рестрикционных паттернов между собой и с базой данных.

Spa-типирование основано на анализе повторов в гене, кодирующем белок A. Spa-типирование учитывает точечные мутации в области повтора, а также количество повторов. Этот метод подходит для исследования и локальных, и глобальных вспышек *S. aureus*. Анализ одного целевого локуса является недорогим способом получения надежных данных, которые могут использоваться для определения как эпидемиологических, так и филогенетических взаимосвязей. База известных на сегодня spa-типов насчитывает 20321 вариант на сайте <http://www.ridom.de/spaserver/> (дата обращения 24.01.2022).

Еще одна методика типирования метициллинрезистентных стафилококков основана на определении типа стафилококковой кассеты (SCCmec) [81]. На сегодня описано 15 типов стафилококковых кассет: SCCmecI; SCCmecII, SCCmecIII, SCCmecIV, SCCmecV, SCCmecVI, SCCmecVII, SCCmecVIII, SCCmecIX, SCCmecX, SCCmecXI, SCCmecXII, SCCmecXIII, SCCmecXIV и SCCmecXV [102,103]. Подтипы определяются полиморфизмами в комбинации *mec* и *scg* комплексах. Считается, что определенные типы SCCmec преобладают в больничной среде, а другие в основном преобладают во внебольничной.

Появление высокопроизводительного секвенирования произвело революцию в исследованиях. Полногеномное секвенирование имеет максимальную разрешающую способность при использовании для типирования путем определения и сравнения полной геномной последовательности изолятов.

1.3 Молекулярно-биологические методы в системе эпидемиологического мониторинга за антибиотикорезистентными штаммами стафилококков

Молекулярно-биологические методы являются эффективным инструментом для проведения эпидемиологических исследований, позволяют документировать возникновение определенных штаммов *S. aureus* во времени и циркуляцию клонов. Методика типирования *S. aureus* с помощью MLST была опубликована в 2000 году [101]. А уже через год было проведено первое полногеномное секвенирование метициллинрезистентного *S. aureus*. Со временем молекулярно-биологические методы начали использовать, как один из инструментов в эпидемиологических исследованиях.

В зарубежной литературе штаммы метициллинрезистентного стафилококка чаще всего относят к одной из трех групп. Первая – штаммы, связанные с оказанием медицинской помощи – HA-MRSA. Вторую группу выделяют среди пациентов без предшествующей госпитализации – CA-MRSA. И к третьей – LA-MRSA относят инфекции, вызванные метициллинрезистентным стафилококком в животноводстве. И если на сегодня LA-MRSA распространены в определенных группах высокого риска, а именно у работников, находящихся в непосредственном контакте с сельскохозяйственными животными, то эпидемиология HA-MRSA и CA-MRSA тесно взаимосвязана. CA-MRSA быстро проникают в здравоохранение, а HA-MRSA наоборот появляются во внебольничной среде.

Изоляты золотистого стафилококка подразделяют на клональные комплексы (CC), которые определяются как группы сиквенс-типов (ST), в которых каждый ST имеет по меньшей мере пять из семи идентичных аллелей и по меньшей мере один отличный от остальных. В исследовании 2003 года Edward J. Feil выделил «предков» восьми основных клональных комплексов: ST9, ST15, ST22, ST25, ST30/39, ST45, ST1 и ST51. Эти клональные комплексы были названы на основе этих «предков», но с приставкой «CC» (например, CC9). В случае CC30/39 были

идентифицированы два тесно связанных «предка», поэтому клональный комплекс имеет двойное название (рисунок 5) [75].

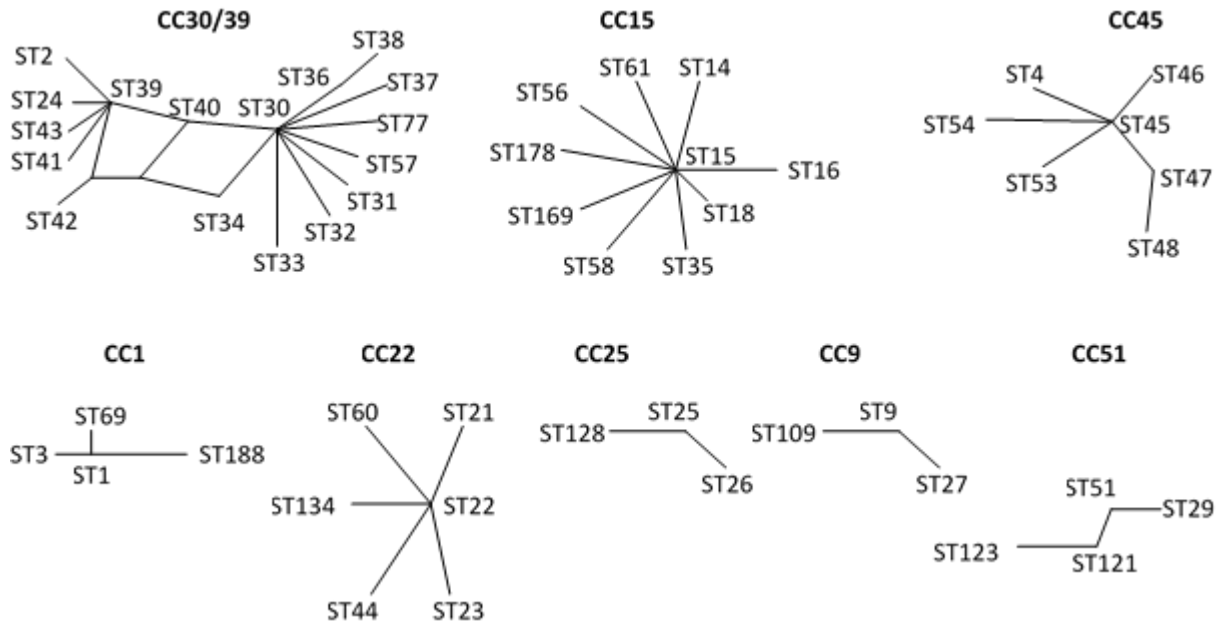


Рисунок 5 – Идентификация клональных комплексов [75]

Изучение изменений последовательностей в локусах MLST для *Staphylococcus aureus* показало, что точечные мутации приводят к появлению новых аллелей по меньшей мере в 15 раз чаще, чем рекомбинация. Это контрастирует с данными о таких видах, как *Neisseria meningitidis* и *Streptococcus pneumoniae*, в которых аллели изменяются в 5–10 раз чаще путем рекомбинации, чем путем мутации. Тем не менее, филогенетический анализ предполагает, что гомологичная рекомбинация действительно способствует эволюции этого вида в долгосрочной перспективе [75].

Благодаря молекулярно-биологическим методам были выделены наиболее часто регистрируемые в мире клональные комплексы и сиквенс-типы MRSA (таблица 2) [91]. Наиболее часто регистрируемые CC MRSA, собранные со всех континентов между 1961 и 2008 годами были CC5, CC8, CC22, CC30 и CC45 [48,75,90].

Таблица 2 – Наиболее часто регистрируемые в мире клональные комплексы MRSA [91].

СС	ST	Эпидемические клоны	Распространение
CC5	ST5-HA-MRSA-II	New York/Japan, USA100	США, Япония, Канада, Южная Корея, Австралия, Европа
	ST5-HA-MRSA-IV	Paediatric clone/USA800	США, Южная Америка, Европа
	ST5-HA-MRSA-I	UK-EMRSA-3	Европа, Южная Америка
	ST228-HA-MRSA-I	Italian/Southern German	Европа
	ST5 (HDE288/ paediatric clone, SCCmec type VI)		Европа, Португалия
	ST5-MRSA-I/IV		Африка
CC8	ST8-HA-MRSA-IV	UK-EMRSA-2/6, USA500	Канада, США, Европа, Австралия
	ST247-HA-MRSA-I	Iberian or UK-EMRSA-5, Rome	США, Европа
	ST239-HA-MRSA-III	Brazilian, Hungarian	Азия, Австралия, Южная Африка, Южная Америка, Европа
	ST612-MRSA-IV		Южная Африка, Австралия
CC22	ST22-HA-MRSA-IV	UK-EMRSA-15	Европа, Австралия, Канада

Продолжение таблицы 2

СС	ST	Эпидемические клоны	Распространение
СС30	ST36-NA-MRSA-IV	UK-EMRSA-16, USA200	США, Великобритания, Австралия, Канада
	ST36-MRSA-II		Южная Африка
СС45	ST45-NA-MRSA-IV	Berlin, USA600	США, Европа

СС5 и СС8 являются наиболее распространенными клональными комплексами во всем мире. СС22 также распространен повсеместно. СС30-ST36 распространен в США и Великобритании, а СС45 в США и Европе. Наиболее часто встречающиеся азиатские клоны: СС8 (ST239), СС5 (ST5) и СС22 (ST22) [59,96].

Одно из крупнейших молекулярно-эпидемиологических исследований инвазивного *S. aureus* в Европе показало, что клональные линии MRSA и метициллин-чувствительного *S. aureus* (MSSA) отличались. В одном из исследований 2006-2007 года было проанализировано почти три тысячи изолятов MSSA и MRSA от пациентов с инвазивными заболеваниями из более чем трёхстах лабораторий, обслуживающих больницы в 26 разных странах. Некоторые изоляты были распространены во всех европейских странах. MSSA генетически были более разнообразными, чем MRSA. За инвазивные инфекции в основном были ответственны NA-MRSA [72].

Проведенные исследования в США показали, что 97% собранных изолятов CA-MRSA относились к USA300 (СС8-ST8), SCCmec тип IV, PVL +, чувствительные к рифампицину, триметоприм / сульфаметоксазолу, клиндамицину и тетрациклину [79,87]. Этот фенотип типичен для изолятов CA-MRSA, которые в основном ответственны за инфекции кожи и мягких тканей [89], но также могут вызывать более тяжелые инфекции, такие как некротическая пневмония [67,120]. Популяционное исследование, проведенное в Сан-Франциско и Калифорнии в

2004–2005 годах продемонстрировало в 10 раз более высокую заболеваемость СА-MRSA по сравнению с HA-MRSA (316 против 31 на 100 000 населения) [40].

В США и некоторых европейских странах исследования по молекулярной эпидемиологии антибиотикорезистентных штаммов стафилококка проводятся регулярно, а молекулярное типирование штаммов в ряде крупных стационаров осуществляется на рутинной основе. В России на сегодня данные о молекулярной эпидемиологии метициллинрезистентных стафилококков ограничиваются единичными исследованиями и не являются рутинными. Проведенные в России исследования по молекулярной эпидемиологии метициллинрезистентных стафилококков, показали, что наиболее часто встречающимся сиквенс-типом был ST8, а наиболее часто обнаруживаемым типом SCCmec кассеты была кассета SCCmec IV (таблица 3).

Таблица 3 – Сиквенс-типы *S. aureus*, обнаруженные в России

Год обнаружения	Обнаруженные сиквенс-типы (тип SCCmec кассеты)	Место обнаружения	Публикация
2004	ST8 (SCCmec IV) ST239 (SCCmec III) ST426 (SCCmec IV) ST1097 (SCCmec III)	г. Архангельск	Vorobieva V., 2008 [51]
2004 – 2005	ST8 (SCCmec IV) ST239 (untypable)	город не указан	Goering R.V., 2008 [99]
2006 – 2007	ST8 (SCCmec IV) ST30 (SCCmec IV) ST239 (SCCmec III)	г. Владивосток	Baranovich T., 2010 [95]
2006 – 2008	ST8 (SCCmec IV) ST72 (SCCmec IV) ST239 (SCCmec III)	г. Владивосток	Yamamoto T., 2012 [53]

Продолжение таблицы 3

Год обнаружения	Обнаруженные сиквенс-типы (тип SCCmec кассеты)	Место обнаружения	Публикация
1997-2008	ST1 (SCCmec IV) ST8 (SCCmec IV) ST154 (SCCmec IV) ST239 (SCCmec III)	24 города России	Романов А.В., 2012 [28]
2008 – 2009	ST239 (SCCmec III)	г. Красноярск	Iwao Y., 2012 [69]
2007-2011	ST8 (SCCmec IV) ST12 (untypable) ST239 (SCCmec III)	г. Красноярск	Khokhlova O.E., 2015 [73]
2013	ST30	г. Санкт-Петербург	Онищенко Г.Г., 2014 [15]
2013	ST30	г. Санкт-Петербург	Абаев И.В., 2017 [9]
2014	ST28 ST30 ST60	Тверская область (Селигер)	Абаев И.В., 2017 [9]
2011 – 2014	ST5 (SCCmec III) ST8 (SCCmec IV) ST22 (SCCmec IV) ST97 (SCCmec IV, V) ST121 (SCCmec V) ST228 (SCCmec I) ST239 (SCCmec III) ST398 (SCCmec IV) ST569 (SCCmec IV)	12 городов (Сегежа, Петрозаводск, Санкт-Петербург, Мурманск, Москва, Ярославль, Самара, Пермь, Челябинск, Курган, Ханты-Мансийск, Красноярск)	Gostev V., 2017 [98]

Продолжение таблицы 3

Год обнаружения	Обнаруженные сиквенс-типы (тип SCCmec кассеты)	Место обнаружения	Публикация
	ST764 (SCCmec II) ST1497 (SCCmec IV) ST2235 (SCCmec IV)		
2015	ST1	г. Якутск	Abaev I., 2018 [60]
не указан	ST1 (SCCmec IV) ST5 ST8 (SCCmec IV) ST30 ST45 ST97	г. Москва	Avetisyan L., 2019 [106]
2010 – 2016	ST8 (SCCmec IV) ST12 (untypable) ST239 (SCCmec III)	г. Красноярск	Хохлова О.Е., 2017 [14] Хохлова О.Е., 2019 [8]
2018	ST21 ST97 ST497	Московская область	Fursova K, 2020 [124]
	ST20	Тульская область; г. Пермь	
	ST97	Саратовская область; Кировская область	
	ST97 ST737	Удмуртия	
	ST15	г. Новосибирск	

Исследований, посвященных молекулярной эпидемиологии коагулазонегативных стафилококков в России крайне мало. В одном из последних исследований, проведенном в Новосибирске, среди госпитальных штаммов были обнаружены *S. epidermidis* сиквенс-типов 17, 20, 23, 210 и 786. Сиквенс-тип ST 42 *S. haemolyticus* был обнаружен в мокроте пациента, находящегося на лечении в медицинском учреждении. Сиквенс-типы ST1, ST3 и ST42 *S. haemolyticus* были идентифицированы в материале, забранном от пациентов, находящихся на амбулаторном лечении [37].

Таким образом, согласно литературным данным, инфекции, вызванные метициллинрезистентными стафилококками, могут приводить к увеличению сроков госпитализации, смертности и экономическим потерям. Метициллинрезистентные стафилококки распространены повсеместно, а их высокая доля в медицинских учреждениях делает неэффективным использование большинства применяемых антибиотиков. Опыт скандинавских стран показывает необходимость и оправданность контроля за метициллинрезистентными штаммами, а усиленный мониторинг признается важным компонентом для предотвращения их дальнейшего распространения. Внедрение молекулярно-биологических методов в эпидемиологический мониторинг для совершенствования профилактических и противоэпидемических мероприятий является актуальной задачей современной эпидемиологии.

РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследование выполнялось на базе ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора в рамках темы НИР «Совершенствование методов эпидемиологического мониторинга за внутриутробными, оппортунистическими и папилломавирусной инфекциями с использованием новых комплексных диагностических схем выявления их возбудителей» (номер государственного учета НИОКТР АААА-А21-121011990055-2).

В диссертационной работе был использован комплекс эпидемиологического, статистических и лабораторных (бактериологический и молекулярно-биологических) методов, кратко представленных в таблице 4.

Таблица 4 - Материалы и методы исследования

Направление исследования	Характеристика материалов, количество	Типы и методы исследования
Уровень и структура заболеваемости ИСМП, обусловленными стафилококками	9468 случаев заболеваний Анализ статистических форм, разработанных референс-центром по мониторингу за ИСМП в дополнение к данным раздела 3 «Внутрибольничные инфекции» федерального статистического наблюдения № 2 «Сведения об инфекционных и паразитарных заболеваниях». Данные о количестве госпитализированных пациентов по регионам РФ – формы федерального статистического наблюдения №30 «Сведения о медицинской организации».	Эпидемиологический (ретроспективное описательное эпидемиологическое исследование); статистические (Microsoft Excel, MedCalc [®] statistical software)

Продолжение таблицы 4

Направление исследования	Характеристика материалов, количество	Типы и методы исследования
Сравнение результатов бактериологических и молекулярно-биологических методов для выявления метициллинрезистентных штаммов стафилококка	Биологический материал – кровь из периферической вены от 240 пациентов с признаками инфекции; мазки из ран от 175 пациентов. 830 лабораторных анализов (415 ПЦР-исследований, 415 культуральных исследований)	Бактериологический Молекулярно-биологический (ПЦР в режиме реального времени) Статистический (ROC-анализ)
Разработка набора реагентов для выявления и количественного определения ДНК метициллинрезистентных стафилококков	Более 100 экспериментов (для выбора оптимальной программа амплификации, проверки и подтверждения чувствительности, специфичности, воспроизводимости) с использованием количественно охарактеризованных стандартных образцов предприятия, коллекции штаммов <i>Staphylococcus spp.</i> , контрольных штаммов из коллекции типовых культур АТСС	Молекулярно-биологические (ПЦР в режиме реального времени)
Эпидемиологический мониторинг за инфекциями, обусловленными метициллинрезистентными штаммами стафилококками	Клинический материал от более, чем 600 пациентов с признаками инфекции; смывы с медицинского оборудования, инструментария, инвентаря и объектов внутрибольничной среды (n=430); отделяемое слизистой оболочки ротоглотки от детей, больных муковисцидозом и детей из контрольной (условно здоровой) группы (n=200); результаты полногеномного секвенирования 35 изолятов <i>Staphylococcus spp.</i>	Эпидемиологический (описательный и аналитический методические приемы); бактериологический; молекулярно-биологический (ПЦР в режиме реального времени, полногеномное секвенирование); статистический (Microsoft Excel, IBM SPSS Statistics, MedCalc® statistical software)

Эпидемиологический метод. В работе использован эпидемиологический метод с применением комплекса методических подходов, включая описательный и аналитический приемы.

Методологической основой исследования послужили труды отечественных авторов в области эпидемиологии: Черкасского Б.Л. [33], Белякова В.Д. [6,10] и Покровского В.И. [19,21,22,23].

Учёт показателей заболеваемости ИСМП, обусловленными метициллинрезистентными стафилококками в регионах РФ, осуществлялся в рамках анализа статистических форм для проведения углубленного эпидемиологического анализа заболеваемости ИСМП, разработанных в дополнение к данным раздела 3 «Внутрибольничные инфекции» федерального статистического наблюдения №2 «Сведения об инфекционных и паразитарных заболеваниях». Статистические формы для проведения анализа заболеваемости ИСМП были разработаны референс-центром по мониторингу за ИСМП ФБУН ЦНИИ эпидемиологии Роспотребнадзора во исполнение решения коллегии Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека от 22.12.2017 «Актуальные вопросы надзора за инфекциями, связанными с оказанием медицинской помощи (ИСМП), и совершенствование мер профилактики» и приказа Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека от 26.01.2018 № 37.

Были изучены данные по заболеваемости ИСМП, обусловленными стафилококками, за период 2018-2021 годы, предоставленные территориальными органами Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека в 52 субъектах РФ (61% от всех субъектов) в 2018 году; в 68 субъектах РФ (80% от всех субъектов) в 2019 и 2020 годах; в 62 субъектах РФ (72,9% от всех субъектов) в 2021 году (таблица 5).

Заболеваемость рассчитывали, как относительную частоту случаев ИСМП, вызванных стафилококками, на 1000 госпитализированных пациентов по формуле:

$$\text{Заболеваемость ИСМП, вызванными стафилококками} = \frac{\text{Число пациентов с ИСМП, вызванными стафилококками}}{\text{Число госпитализированных пациентов}} \times 1000 \quad (1)$$

В знаменателе формулы учитывали число госпитализированных пациентов только по тем субъектам РФ, которые подали сведения о заболеваемости ИСМП в каждом конкретном году. Данные о числе госпитализированных пациентов по регионам РФ были предоставлены Федеральной службой государственной статистики (РОССТАТ) по форме федерального статистического наблюдения №30 «Сведения о медицинской организации», сбор и обработка данных по которой осуществляется Министерством здравоохранения РФ.

Таблица 5 – Представленность данных по заболеваемости ИСМП, обусловленными стафилококками, за период 2018-2021 годы по субъектам РФ

Субъекты РФ	Наличие статистических форм (+ данные предоставлены; - данные не предоставлены)			
	2018 год	2019 год	2020 год	2021 год
Центральный федеральный округ				
Белгородская область	+	+	+	+
Брянская область	-	+	+	+
Владимирская область	-	+	+	+
Воронежская область	+	+	+	-
Ивановская область	+	+	+	+
Калужская область	+	+	+	+
Костромская область	+	-	+	-
Курская область	+	+	+	+
Липецкая область	+	-	+	-
Московская область	-	-	-	+
Орловская область	+	+	+	+
Рязанская область	+	+	+	+
Смоленская область	+	+	+	+
Тамбовская область	+	+	+	+
Тверская область	+	+	+	+
Тульская область	+	+	+	-
Ярославская область	+	+	+	+
г. Москва	+	+	+	+
Северо-Западный федеральный округ				
Республика Карелия	-	+	+	+

Продолжение таблицы 5

Субъекты РФ	Наличие статистических форм (+ данные предоставлены; - данные не предоставлены)			
	2018 год	2019 год	2020 год	2021 год
Республика Коми	+	+	+	+
Архангельская область без Ненецкого автономного округа	+	+	-	+
Ненецкий автономный округ	-	+	-	-
Вологодская область	+	+	+	+
Калининградская область	-	-	+	-
Ленинградская область	-	-	-	-
Мурманская область	+	+	+	-
Новгородская область	+	+	+	+
Псковская область	-	+	+	+
г. Санкт-Петербург	+	-	-	-
Южный федеральный округ				
Республика Адыгея	+	+	+	+
Республика Калмыкия	-	+	+	+
Республика Крым	+	+	+	+
Краснодарский край	+	+	+	+
Астраханская область	-	+	-	-
Волгоградская область	+	+	+	-
Ростовская область	+	-	+	+
г. Севастополь	+	+	+	+
Северо-Кавказский федеральный округ				
Республика Дагестан	-	+	+	+
Республика Ингушетия	+	+	+	+
Кабардино-Балкарская Республика	+	+	+	+
Карачаево-Черкесская Республика	-	+	+	+
Республика Северная Осетия-Алания	-	-	-	+
Чеченская Республика	-	+	+	+
Ставропольский край	-	+	-	-
Приволжский федеральный округ				
Республика Башкортостан	-	-	-	-

Продолжение таблицы 5

Субъекты РФ	Наличие статистических форм (+ данные предоставлены; - данные не предоставлены)			
	2018 год	2019 год	2020 год	2021 год
Республика Марий Эл	+	+	+	+
Республика Мордовия	+	+	+	+
Республика Татарстан	+	+	+	+
Удмуртская Республика	+	+	+	+
Чувашская Республика	+	+	+	+
Пермский край	+	+	+	-
Кировская область	+	+	+	+
Нижегородская область	-	+	+	+
Оренбургская область	+	+	-	-
Пензенская область	+	+	+	+
Самарская область	+	-	+	+
Саратовская область	-	-	-	-
Ульяновская область	-	+	+	+
Уральский федеральный округ				
Курганская область	-	+	+	+
Свердловская область	-	+	+	+
Тюменская область без автономных округов	-	-	-	-
Ханты-Мансийский автономный округ-Югра	-	+	+	-
Ямало-Ненецкий автономный округ	+	+	+	+
Челябинская область	+	+	+	+
Сибирский федеральный округ				
Республика Алтай	-	+	+	-
Республика Тыва	-	-	-	-
Республика Хакасия	+	+	+	+
Алтайский край	+	+	+	+
Красноярский край	+	+	+	+
Иркутская область	+	+	+	+
Кемеровская область	+	+	+	+
Новосибирская область	-	-	+	+

Продолжение таблицы 5

Субъекты РФ	Наличие статистических форм (+ данные предоставлены; - данные не предоставлены)			
	2018 год	2019 год	2020 год	2021 год
Омская область	+	+	+	+
Томская область	-	+	+	+
Дальневосточный федеральный округ				
Республика Бурятия	-	-	+	+
Республика Саха (Якутия)	+	-	+	+
Забайкальский край	-	-	-	-
Камчатский край	-	+	-	-
Приморский край	+	+	+	+
Хабаровский край	-	+	-	-
Амурская область	+	+	+	+
Магаданская область	-	+	+	+
Сахалинская область	+	+	+	+
Еврейская автономная область	-	+	+	+
Чукотский автономный округ	+	+	-	+

Для построения линии тренда использовали Excel. Линия тренда была построена на основании расчета теоретических показателей заболеваемости в соответствии с линейным уравнением

$$y=ax+b, \quad (2)$$

где x – нумерация временных отрезков наблюдения; b – ожидаемый, согласно уравнению аппроксимации, показатель заболеваемости при x равном нулю; a – коэффициент наклона линии аппроксимации.

Абсолютное снижение заболеваемости рассчитывали, как разность между последующим и предыдущим уровнем. Показатель снижения – как отношение каждого последующего уровня к предыдущему, принятому за 100%. Показатель снижения отражает какую долю от предыдущего уровня составляет последующий уровень. Темп прироста (снижения) показывает, на сколько % увеличился (снизился) последующий уровень по сравнению с предыдущим и рассчитывается,

как отношение абсолютного прироста (снижения) каждого последующего уровня к предыдущему, принятому за 100%.

Для оценки эпидемиологической ситуации по инфекциям, обусловленным метициллинрезистентными штаммами стафилококка, проводились наблюдательные исследования с применением молекулярно-биологических методов в пяти медицинских учреждениях города Москвы.

В ФГБУ НМХЦ им. Н.И. Пирогова Минздрава России проводилось наблюдательное исследование с периодом наблюдения три года (2017–2019) в отделениях реанимации и интенсивной терапии, гематологии и хирургических отделениях. Было проведено исследование смывов ($n=250$) с объектов внутрибольничной среды стационара (63 смыва из отделений гематологии, 99 смывов из отделений реанимации и интенсивной терапии, 88 – из хирургических отделений). В Городской клинической больнице имени С.П. Боткина и Городской клинической больнице № 15 имени О.М. Филатова было обследовано 27 пациентов в динамике (при поступлении в отделение реанимации и интенсивной терапии, через 5-7 дней после поступления, на 10-12 день). В ФГБУ Главный военный клинический госпиталь имени академика Н.Н. Бурденко Министерства обороны РФ забор смывов с объектов внутрибольничной среды стационара проводили в четырех отделениях реанимации и интенсивной терапии ($n=80$). В городской клинической больнице имени С. С. Юдина смывы забирали в четырех отделениях реанимации и интенсивной терапии ($n=100$). Штаммы для исследования с помощью полногеномного секвенирования были собраны в ФГБУ НМХЦ им. Н.И. Пирогова и городской клинической больнице имени С. С. Юдина.

Аналитический методический прием (исследование типа «случай-контроль») был использован при изучении пациентов из групп риска. Было обследовано 100 пациентов с муковисцидозом в периоды обострения и вне периодов обострения бронхолегочного процесса, наблюдающихся в Государственном Бюджетном Учреждении Здравоохранения Московской области «Детский Консультативный Медицинский Центр Московской области» и 100 детей из контрольной (условно

здоровой) группы. Материал для ПЦР-исследования – мокрота и мазки из ротоглотки.

Молекулярно-биологические методы исследования. Разработка и оптимизация ПЦР-методики в режиме реального времени для выявления и количественного определения метициллинрезистентных стафилококков проводилась автором в ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора. Разработка проводилась по плану, включающему описание входных данных проектирования и разработки, выбор специфичных праймеров, планирование экспериментов (подбор состава реагентов и их соотношений), проведение экспериментов, лабораторных испытаний, учёт и оформление результатов разработки (лабораторно-экспериментальный отчет), оформление и передачу в научно-производственную лабораторию пакета научно-технической документации.

Специфичные праймеры и зонды для выявления искомым генов были подобраны на основе анализа нуклеотидных последовательностей. Выбор праймеров и анализ нуклеотидных последовательностей проводили с помощью программного пакета «Vector NTI». Экстракцию ДНК из образцов биоматериала и смывов с внутрибольничной среды проводили с помощью набора реагентов «РИБО-преп» (ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, Россия) в соответствии с инструкцией. ПЦР-амплификацию проводили с использованием реактивов для амплификации производства ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора. Количественное определение ДНК метициллинрезистентных штаммов в биологическом материале выполняли с использованием разработанного набора реагентов «АмплиСенс® MRSA-скрин-титр-FL» (№ ФСР 2012/13998) (ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, Россия). Для внутрилабораторного контроля методов идентификации стафилококков и определения чувствительности к метициллину использовали референс-штаммы из Американской коллекции типовых культур (ATCC): *Staphylococcus aureus* ATCC®29213, *Staphylococcus aureus* ATCC®25923, *Staphylococcus aureus* ATCC®33862, *Staphylococcus aureus* ATCC®33591, *Staphylococcus aureus*

ATCC®12600, *Staphylococcus aureus* Rosenbach ATCC-BAA-2313, *Staphylococcus epidermidis* ATCC®12228. Определение аналитических и диагностических параметров разработанной методики для выявления метициллинрезистентных стафилококков проводилось согласно ГОСТ Р 53079.1-2008 и ГОСТ Р 53022.2-2008. Амплификацию осуществляли на приборах с системой детекции флуоресцентного сигнала в режиме реального времени Rotor-Gene 3000/6000 (Corbett Research, Австралия), Rotor-Gene Q («Qiagen», Германия), iCycler iQ5 (Bio-Rad Laboratories, Inc., США), CFX96 (Bio-Rad Laboratories, Inc.), США), «ДТ-96» (ООО «НПО ДНК-Технология», Россия).

Чувствительность и специфичность метода ПЦР относительно бактериологического метода рассчитывали по формулам:

$$\text{Чувствительность} = \frac{\text{ИП}}{\text{ИП} + \text{ЛО}}, \quad (3)$$

$$\text{Специфичность} = \frac{\text{ИО}}{\text{ИО} + \text{ЛП}}, \quad \text{где} \quad (4)$$

ИП – число истинно положительных результатов метода ПЦР (число образцов, определенных как положительные и с помощью ПЦР, и с помощью бактериологического метода),

ЛО – число ложноотрицательных результатов метода ПЦР (число образцов, определенных как отрицательные с помощью метода ПЦР, но положительные с помощью бактериологического метода),

ИО – число истинно отрицательных результатов (число образцов, определенных как отрицательные и с помощью ПЦР, и с помощью бактериологического метода),

ЛП – число ложноположительных результатов (число образцов, определенных как положительные с помощью метода ПЦР, но отрицательные с помощью бактериологического метода).

Взятие и подготовка биологического материала для ПЦР-исследования.
Сбор, транспортирование, хранение и подготовка образцов материала

осуществлялись в строгом соответствии с требованиями СП 1.2.036-95 «Порядок учета, хранения, передачи и транспортирования микроорганизмов I-IV групп патогенности» и методическими рекомендациями «Взятие, транспортировка, хранение клинического материала для ПЦР-диагностики» (Москва, 2012).

Для исследования методом ПЦР забор крови проводился в вакуумные пробирки для взятия венозной крови с K2/K3 ЭДТА «Vacuette® Premium K2 EDTA» («Greiner Bio-One GmbH», Австрия). Плазму получали путем отстаивания цельной крови или центрифугированием пробирок с цельной кровью при 800 g в течение 10 мин при комнатной температуре. Отбирали плазму в количестве 1 мл отдельными наконечниками с фильтром в стерильные пробирки типа «Эппендорф» объемом 1,5-2,0 мл. Центрифугировали при 12 тыс. об/мин в течении 10-20 мин. Проводили экстракцию из осадка и 100 мкл надосадочной жидкости. Отделяемое ротоглотки и мазки из ран забирали с помощью стерильного зонда-тампона с рисккой для излома (ООО «Медицинские изделия», Россия, РУ №РЗН 2018/7058). Рабочую часть зонда-тампона, содержащую исследуемый материал, обламывали и оставляли в пробирке с транспортной средой («Транспортная среда для хранения и транспортировки респираторных мазков», ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, Россия, РУ № ФСР 2009/05011). Смывы с объектов внутрибольничной среды стационара забирали с помощью стерильного ватного тампона на пластиковой основе и стерильных одноразовых пробирок с транспортной средой производства ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора. Рабочую часть зонда-тампона погружали в пробирку с транспортной средой, выдерживали 3–5 с до пропитывания. Брали смыв с участка площадью 10 на 10 см. Для объектов меньшего размера смыв брали со всей поверхности. После взятия материала рабочую часть зонда с ватным тампоном помещали в стерильную одноразовую пробирку с защелкивающейся крышкой и аккуратно обламывали, оставляя рабочую часть зонда с материалом в транспортной среде. Пробирку плотно закрывали крышкой. Во избежание контаминации не допускалось обрезание зонда ножницами.

Полногеномное секвенирование и анализ результатов NGS. Геномная ДНК бактерий выделялась с использованием набора QiagenDNeasyBlood&TissueKits согласно протоколу производителя. Приготовление образцов ДНК для дальнейшего секвенирования осуществлялось с использованием IlluminaNextera DNA LibraryPrepKit и IlluminaNexteraIndexKit. Секвенирование проводилось на приборе IlluminaHiSeq1500 с использованием наборов IlluminaHiSeq PE RapidClusterKit v2 и IlluminaHiSeqRapid SBS Kit v2.

Определение принадлежности штамма к сиквенс-типу осуществлялось путем сравнения результатов секвенирования с последовательностями, приведенными в международной базе данных (<https://pubmlst.org/saureus>; <https://pubmlst.org/sepidermidis>). Сравнивались нуклеотидные последовательности семи фрагментов генов золотистого стафилококка: *arc*, *aro*, *glp*, *gmk*, *pta*, *tpi*, *yqi* и семи генов эпидермального стафилококка: *arc*, *aro*, *gtr*, *mut*, *pyr*, *tpi*, *yqi*.

Поиск детерминант антибиотикорезистентности проводился с помощью ресурса ResFinder 3.0 [76]. Поиск плазмид выполнялся с помощью ресурса PlasmidFinder 1.3 [108]. Поиск генов, ассоциированных с факторами патогенности стафилококков, проводили с помощью ресурса VirulenceFinder 2.0 (<https://cge.cbs.dtu.dk/services/VirulenceFinder/>). Анализ последовательностей переменного участка гена стафилококкового белка А (*spa*) проводился с помощью существующей международной базы данных (<http://spaServer.ridom.de>) и ресурса spaTyper 1.0 [54].

Бактериологический метод. Бактериологическое исследование крови выполнялись в ФГБУ НМХЦ им. Н.И. Пирогова и Городской клинической больнице имени С.С. Юдина. Взятие крови для бактериологического исследования проводилось в стандартные флаконы с питательной аэробной и анаэробной средой (ВАСТЕС™ Plus Aerobic/F Medium и ВАСТЕС™ Plus Anaerobic/F Medium). Флаконы культивировали в анализаторе ВАСТЕС 9050 (Becton Dickinson). В случае выявления роста микроорганизмов проводили их идентификацию и определение чувствительности на бактериологическом автоматизированном анализаторе VITEK 2 Compact (bioMérieux, Франция) с применением

международных критериев EUCAST. Для сравнения метода ПЦР и бактериологического метода проводился параллельный забор крови из периферической вены одновременно и для бактериологического, и для ПЦР-исследования. Показаниями к бактериологическому и ПЦР исследованию крови были катетер-ассоциированный тромбофлебит, фебрильная нейтропения (у пациентов с онкологическими заболеваниями), наличие у пациента 2 или более симптомов (гипотермия или лихорадка, лейкоцитоз, тахикардия, гипотензия).

Выделение чистой культуры для полногеномного секвенирования проводилось методом посева на твердые питательные среды с последующей видовой идентификацией и определением чувствительности к антибиотикам в автоматических бактериологических анализаторах с применением международных критериев EUCAST. Выделение чистой культуры микроорганизма выполнялись в ФГБУ НМХЦ им. Н.И. Пирогова и городской клинической больнице имени С.С. Юдина.

Статистическая обработка результатов исследований. Оценка данных, полученных в ходе исследования, была выполнена с использованием методов параметрического и непараметрического анализа. Данные накапливались и хранились в базе Excel. Для статистической обработки база экспортировалась в программу IBM SPSS Statistics. Расчет показателей проводился также с помощью пакета MedCalc® statistical software и «Эпидемиологических калькуляторов EpiTools»: <https://epitools.ausvet.com.au/>.

Сравнение номинальных данных, с целью оценки значимости их различия проводилось при помощи критерия χ^2 Пирсона или точного критерия Фишера. Полученное значение p более 0,05 свидетельствовало об отсутствии статистически значимых различий, значение p менее 0,05 – об их наличии. В частности, была выполнена оценка фактического количества исходов, попадающих в каждую категорию, и теоретического количества, ожидаемого в изучаемых группах при справедливости нулевой гипотезы. Вначале было рассчитано ожидаемое количество исходов при условии справедливости нулевой гипотезы об отсутствии взаимосвязи. Затем рассчитывалось значение критерия χ^2 Пирсона. Значение

критерия сравнивалось с табличным значением при данном числе степеней свободы (количестве данных, которые можно задавать или изменять независимо друг от друга). В том случае, если полученное значение критерия χ^2 превышало критическое, делался вывод о наличии статистической взаимосвязи между изучаемым фактором риска и исходом при соответствующем уровне значимости.

В качестве количественной меры эффекта при сравнении относительных показателей нами использовался показатель отношения шансов, определяемый как отношение вероятности наступления события в группе, подвергнутой воздействию фактора риска, к вероятности наступления события в контрольной группе. С целью проецирования полученных значений отношения шансов на генеральную совокупность нами рассчитывались границы 95% доверительного интервала (95% ДИ). Исходя из полученных данных, значимость взаимосвязи исхода и фактора считалась доказанной в случае нахождения доверительного интервала за пределами границы отсутствия эффекта, принимаемой за 1. Расчет показателя отношения шансов проводили с помощью программы IBM SPSS Statistics.

Выбор порогового значения концентрации ДНК для наилучшей чувствительности и специфичности теста определяли путём ROC-анализа с использованием ресурса «Эпидемиологические калькуляторы Epitools»: <https://epitools.ausvet.com.au/>.

ГЛАВА 3. УРОВЕНЬ И СТРУКТУРА ЗАБОЛЕВАЕМОСТИ ИНФЕКЦИЯМИ, СВЯЗАННЫМИ С ОКАЗАНИЕМ МЕДИЦИНСКОЙ ПОМОЩИ, ОБУСЛОВЛЕННЫМИ СТАФИЛОКОККАМИ

3.1 Динамика уровня и структуры заболеваемости инфекциями, связанными с оказанием медицинской помощи, вызванными стафилококками, на территории Российской Федерации

В РФ заболевания ИСМП, вызванными стафилококками, в период с 2018 по 2021 год регистрировали ежегодно. За анализируемый период было зарегистрировано 9468 случаев ИСМП, вызванных стафилококками. В 2018 году зарегистрировано 2946 случаев, в 2019 – 3105 случая, в 2020 – 1844 случая, в 2021 – 1573 случая. За исследованный период зарегистрировано 5980 случаев ИСМП, вызванных золотистым стафилококком (в 2018 году – 1836, в 2019 – 2004, в 2020 – 1155, в 2021 – 985) и 3488 случаев ИСМП, вызванных эпидермальным стафилококком (в 2018 году – 1110, в 2019 – 1101, в 2020 – 689, в 2021 – 588).

Заболеваемость ИСМП, вызванными золотистым стафилококком (*Staphylococcus aureus*) в расчете на 1000 госпитализированных пациентов, в 2018 и 2019 годах находилась примерно на одном уровне и составляла 0,09, со снижением на 0,001 в 2019 году (рисунок 6). В 2020 наблюдалось снижение показателя заболеваемости до 0,06 (таблица 6). Абсолютное снижение составило 0,033 на 1000 госпитализированных пациентов. В 2021 году заболеваемость ИСМП, вызванными золотистым стафилококком в расчете на 1000 госпитализированных пациентов, составила 0,05.

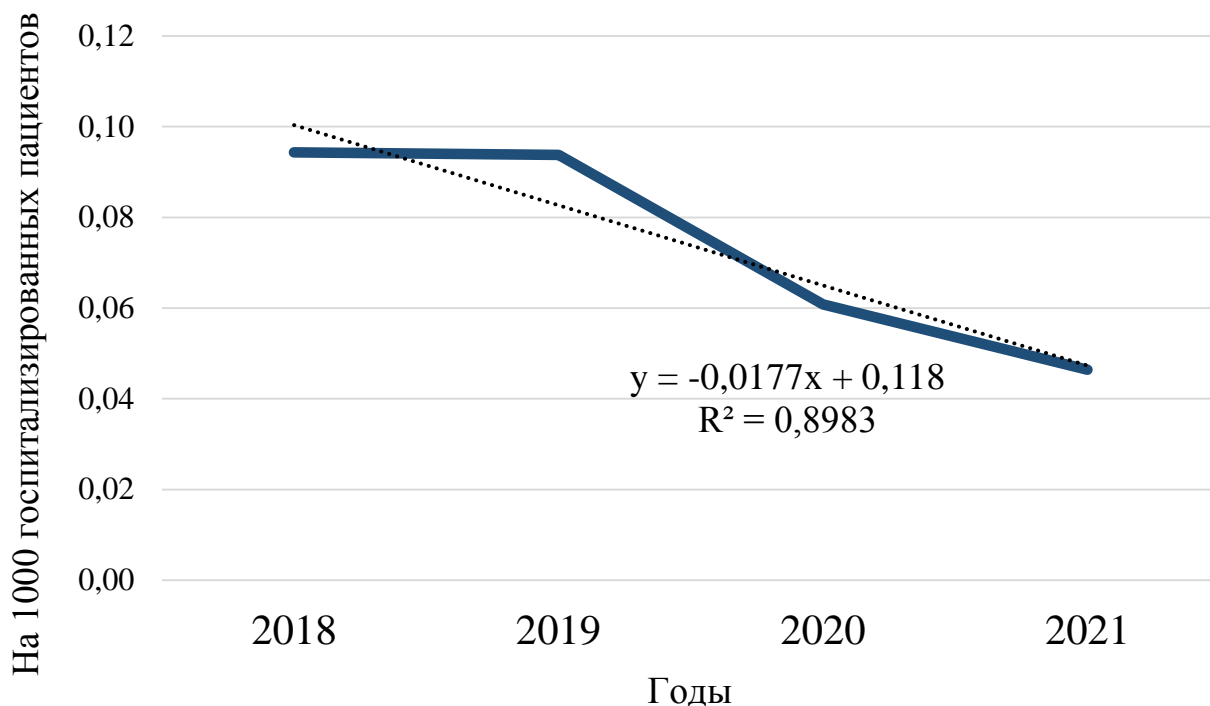


Рисунок 6 – Заболеваемость ИСМП на 1000 госпитализированных пациентов, вызванными *Staphylococcus aureus*, на территории РФ в 2018-2021 годах

Таблица 6 – Заболеваемость ИСМП, вызванными *Staphylococcus aureus*, на 1000 госпитализированных пациентов, в 2018-2021 годах на территории РФ

Годы	Заболеваемость ИСМП, вызванными <i>Staphylococcus aureus</i> в расчете на 1000 госпитализированных пациентов	Абсолютный прирост/снижение, на 1000 госпитализированных пациентов	Показатель роста (снижения), %	Темп прироста/снижения, %
2018	0,09	-	-	-
2019	0,09	-0,001	99,4	-0,6
2020	0,06	-0,033	64,9	-35,1
2021	0,05	-0,014	76,3	-23,7

Показатель заболеваемости ИСМП, вызванными эпидермальным стафилококком (*Staphylococcus epidermidis*) в расчете на 1000 госпитализированных пациентов, в 2018 году составил 0,06; в 2019 – 0,05; в 2020 – 0,04; в 2021 – 0,03 (рисунок 7). Наблюдалось постепенное снижение

заболеваемости. Темп снижения составил 9,7%; 29,5% и 23,7% в 2019, 2020 и 2021 году соответственно (таблица 7).

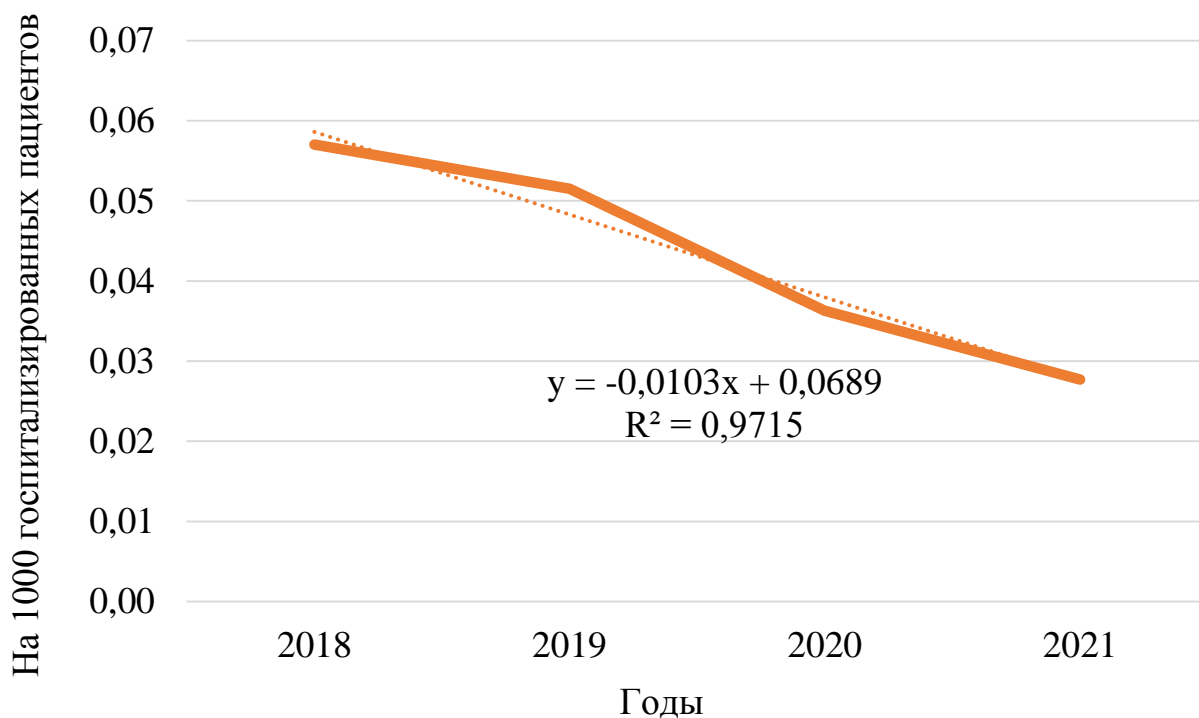


Рисунок 7 – Заболеваемость ИСМП на 1000 госпитализированных пациентов, вызванными *Staphylococcus epidermidis*, на территории РФ в 2018-2021 годах

Таблица 7 – Заболеваемость ИСМП, вызванными *Staphylococcus epidermidis*, на 1000 госпитализированных пациентов, в 2018-2021 годах на территории РФ

Годы	Заболеваемость ИСМП, вызванными <i>Staphylococcus epidermidis</i> в расчете на 1000 госпитализированных пациентов	Абсолютный прирост/снижение, на 1000 госпитализированных пациентов	Показатель роста (снижения), %	Темп прироста/снижения, %
2018	0,06	-	-	-
2019	0,05	-0,01	90,3	-9,7
2020	0,04	-0,02	70,5	-29,5
2021	0,03	-0,01	76,3	-23,7

Заболеваемость ИСМП, вызванными суммарно золотистым и эпидермальным стафилококком в расчете на 1000 госпитализированных пациентов, в 2018 году составила 0,15; в 2019 – 0,15; в 2020 – 0,1; в 2021 – 0,07

(рисунок 8). Темп снижения составил 4,1%; 33,1% и 23,7% в 2019, 2020 и 2021 году соответственно (таблица 8). Абсолютное снижение заболеваемости в 2021 году относительно 2018 года составило 0,08 на 1000 госпитализированных пациентов.

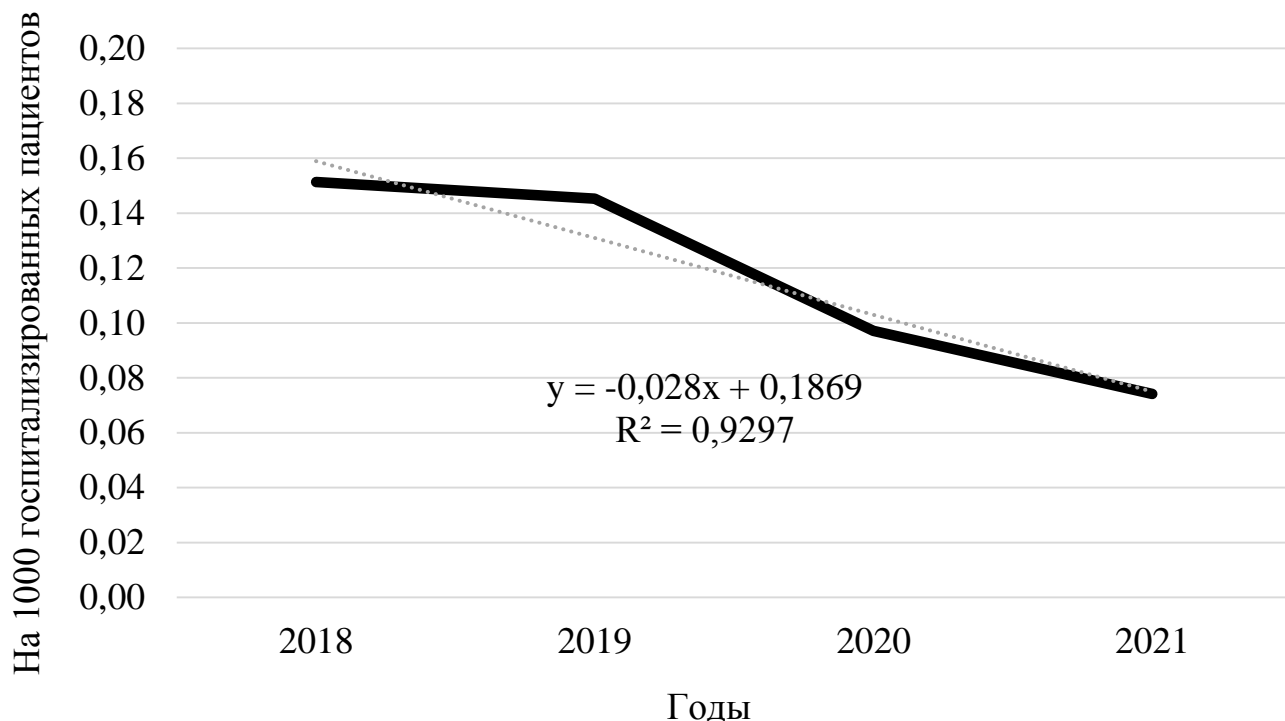


Рисунок 8 –Заболеваемость ИСМП на 1000 госпитализированных пациентов, вызванными суммарно *Staphylococcus aureus* и *Staphylococcus epidermidis*, на территории РФ в 2018-2021 годах

Таблица 8 – Заболеваемость ИСМП, вызванными суммарно *Staphylococcus aureus* и *Staphylococcus epidermidis*, на 1000 госпитализированных пациентов, в 2018-2021 годах на территории РФ

Годы	Заболеваемость ИСМП, вызванными суммарно <i>Staphylococcus aureus</i> и <i>Staphylococcus epidermidis</i> в расчете на 1000 госпитализированных пациентов	Абсолютный прирост/снижение, на 1000 госпитализированных пациентов	Показатель роста (снижения), %	Темп прироста/снижения, %
2018	0,15	-	-	-
2019	0,15	-0,01	95,94	-4,1
2020	0,10	-0,05	66,87	-33,1
2021	0,07	-0,02	76,31	-23,7

Средний показатель заболеваемости ИСМП, вызванными стафилококками, за четыре года составил 0,12 на 1000 госпитализированных пациентов. Произошло снижение заболеваемости в РФ на 0,08 в расчете на 1000 госпитализированных пациентов в 2021 году по сравнению с 2018 годом. Средний многолетний темп снижения составил 21,2%.

Анализ данных учётно-отчетных форм, разработанных референс-центром по мониторингу за ИСМП ФБУН ЦНИИ эпидемиологии Роспотребнадзора, показал, что в изучаемый период в РФ наблюдалось снижение заболеваемости ИСМП, вызванными стафилококками. Снижение заболеваемости ИСМП, вызванными стафилококками в 2020 и 2021 годах, предположительно связано со значительным сокращением плановых хирургических операций в связи с пандемией, вызванной распространением коронавируса SARS-CoV-2. В 2020 году зафиксировано сокращение плановых операций на 40,8% [31]. А количество основных плановых операций в 2021 году составляло только 62% от показателя 2019 года [32].

Микроорганизмы рода *Staphylococcus* вносят значительный вклад в заболеваемость ИСМП. В этиологической структуре возбудителей ИСМП за 2018 год в регионах РФ вклад золотистого стафилококка составил 16,3%, а эпидермального стафилококка – 9,9%; в 2019 году вклад золотистого стафилококка в этиологическую структуру заболеваемости ИСМП – 19,9%, эпидермального стафилококка – 10,9%; в 2020 году вклад золотистого стафилококка – 11,4%, эпидермального стафилококка – 6,8%; в 2021 году вклад золотистого стафилококка – 15,3%, эпидермального стафилококка – 9,1% (рисунок 9).

В этиологической структуре возбудителей ИСМП суммарно золотистый и эпидермальный стафилококки находились на первом месте по вкладу в заболеваемость в 2018, 2019 и 2021 годах. Только в 2020 году стафилококки уступили первенство и заняли второе место в этиологической структуре возбудителей ИСМП в связи с пандемией COVID-19.

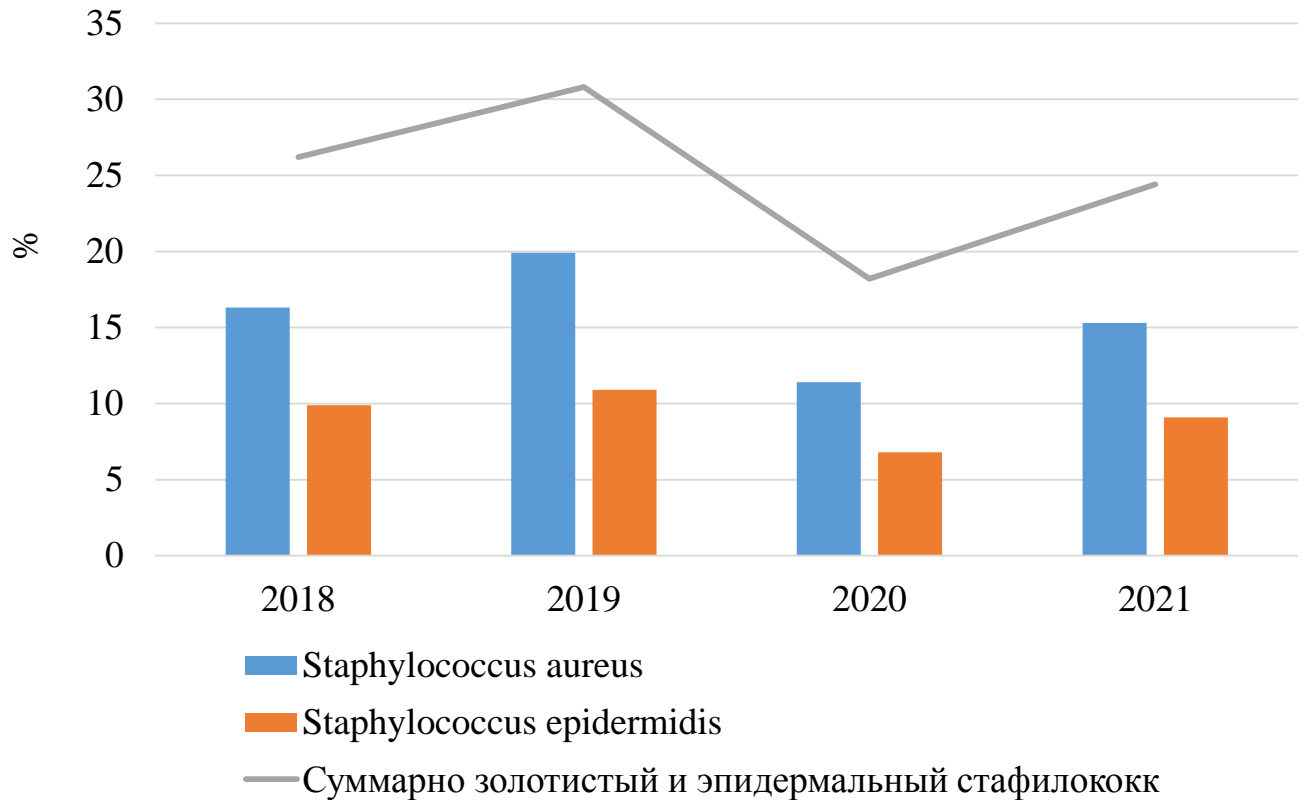


Рисунок 9 – Вклад стафилококков в этиологическую структуру заболеваемости ИСМП в 2018-2021 годах, %

В структуре различных форм ИСМП наибольшее количество случаев, вызванных стафилококками, в течение наблюдаемого периода было зарегистрировано среди инфекций в области хирургического вмешательства (таблицы 9-12). Также стафилококки вносили значительный вклад в этиологическую структуру инфекций кровотока, постинъекционных инфекций, ИСМП родильниц и новорожденных.

В 2018 году в РФ наибольшее количество случаев ИСМП, обусловленных *Staphylococcus aureus* было зарегистрировано среди инфекций в области хирургического вмешательства, ИСМП новорожденных и инфекций нижних дыхательных путей. Для ИСМП, обусловленных *Staphylococcus epidermidis*, тройка лидеров по количеству случаев аналогична предыдущему возбудителю, но на первое место выходят ИСМП новорожденных (таблица 9).

Таблица 9 – Доля стафилококков в этиологической структуре различных форм ИСМП в 2018 году в РФ

Формы ИСМП	<i>Staphylococcus aureus</i>		<i>Staphylococcus epidermidis</i>	
	количество	%	количество	%
Инфекции в области хирургического вмешательства	552	19,3	297	10,4
Инфекции нижних дыхательных путей	403	9,6	209	4,9
Инфекции кровотока	108	21,9	42	8,5
ИСМП, связанные с применением эндоскопических методов исследования	6	31,6	0	-
Инфекции мочевыводящих путей	15	1,8	19	2,3
Постинъекционные инфекции	167	47,2	91	25,7
ИСМП родильниц	163	18,8	104	11,9
ИСМП новорожденных	422	26,1	348	21,6
Всего	1836	16,3	1 110	9,9

В 2018 году наибольшую долю *Staphylococcus aureus* занимал в этиологической структуре постинъекционных инфекций (47,2%) и ИСМП, связанных с применением эндоскопических методов исследования (31,6%), а *Staphylococcus epidermidis* в этиологической структуре постинъекционных инфекций (25,7%) и ИСМП новорожденных (21,6%).

В 2019 году в РФ наибольшее количество случаев ИСМП, обусловленных *Staphylococcus aureus* и *Staphylococcus epidermidis* было зарегистрировано среди инфекций в области хирургического вмешательства, ИСМП новорожденных и инфекций нижних дыхательных путей, а наибольшую долю возбудители занимали

в этиологической структуре постинъекционных инфекций и ИСМП новорожденных (таблица 10).

Таблица 10 – Доля стафилококков в этиологической структуре различных форм ИСМП в 2019 году в РФ

Формы ИСМП	<i>Staphylococcus aureus</i>		<i>Staphylococcus epidermidis</i>	
	количество	%	количество	%
Инфекции в области хирургического вмешательства	735	21,4	379	11,0
Инфекции нижних дыхательных путей	346	10,9	168	5,3
Инфекции кровотока	64	24,1	30	11,3
ИСМП, связанные с применением эндоскопических методов исследования	2	25,0	0	-
Инфекции мочевыводящих путей	7	2,6	2	0,8
Постинъекционные инфекции	233	49,1	83	17,5
ИСМП родильниц	216	18,6	154	13,3
ИСМП новорожденных	401	30,4	285	21,6
Всего	2004	19,9	1101	10,9

В 2020 и 2021 годах в РФ наибольшее количество случаев ИСМП, обусловленных *Staphylococcus aureus* и *Staphylococcus epidermidis* было зарегистрировано среди инфекций в области хирургического вмешательства, ИСМП новорожденных и инфекций нижних дыхательных путей, а наибольшую долю возбудители занимали в этиологической структуре постинъекционных инфекций, ИСМП новорожденных и инфекциях кровотока (таблицы 11 и 12).

Таблица 11 – Доля стафилококков в этиологической структуре различных форм ИСМП в 2020 году в РФ

Формы ИСМП	<i>Staphylococcus aureus</i>		<i>Staphylococcus epidermidis</i>	
	количество	%	количество	%
Инфекции в области хирургического вмешательства	368	19,5	212	11,2
Инфекции нижних дыхательных путей	315	4,9	163	2,6
Инфекции кровотока	30	25,6	41	35,0
Инфекции мочевыводящих путей	8	8,2	1	1,0
Постинъекционные инфекции	60	43,8	31	22,6
ИСМП родильниц	117	18,9	62	10,0
ИСМП новорожденных	257	27,9	179	19,5
Всего	1 155	11,4	689	6,8

Таблица 12 – Доля стафилококков в этиологической структуре различных форм ИСМП в 2021 году в РФ

Формы ИСМП	<i>Staphylococcus aureus</i>		<i>Staphylococcus epidermidis</i>	
	количество	%	количество	%
Инфекции в области хирургического вмешательства	337	20,2	161	9,6
Инфекции нижних дыхательных путей	204	7,5	103	3,8
Инфекции кровотока	55	26,2	28	13,3

Продолжение таблицы 12

Формы ИСМП	<i>Staphylococcus aureus</i>		<i>Staphylococcus epidermidis</i>	
	количество	%	количество	%
Инфекции мочевыводящих путей	3	1,6	4	2,2
Постинъекционные инфекции	61	39,9	30	19,6
ИСМП родильниц	104	15,4	95	14,1
ИСМП новорожденных	221	26,9	167	20,3
Всего	985	15,3	588	9,1

Таким образом, в изучаемый период в РФ суммарно золотистый и эпидермальный стафилококки находились на первом месте по вкладу в этиологическую структуру заболеваемости ИСМП среди бактериальных возбудителей. В общей этиологической структуре ИСМП доля заболеваний, обусловленных стафилококками, составляла в среднем 24,9% (минимальное значение наблюдалось в 2020 году – 18,2%; максимальное в 2019 – 30,8%). Наибольшее количество случаев ИСМП, обусловленных *Staphylococcus aureus* и *Staphylococcus epidermidis* было зарегистрировано среди инфекций в области хирургического вмешательства, ИСМП новорожденных и инфекций нижних дыхательных путей. При этом наибольшую долю возбудители занимали в этиологической структуре таких форм ИСМП, как постинъекционные инфекции и ИСМП новорожденных.

3.2 Вклад метициллинрезистентных стафилококков в уровень и структуру заболеваемости инфекциями, связанными с оказанием медицинской помощи, в Российской Федерации

Официальное количество ИСМП, вызванных метициллинрезистентными стафилококками невелико и составляет всего 859 случаев за наблюдаемый период (2018 – 2021): 363 зарегистрированных случая в 2018 году, 267 случаев в 2019 году, 134 случая в 2020 году и 95 случаев в 2021.

Удельный вес заболеваний, обусловленных метициллинрезистентными стафилококками, в общей структуре ИСМП составляет в среднем 2,18% (95% ДИ: 2,04 – 2,33). В наблюдаемый период наибольший удельный вес ИСМП, обусловленные метициллинрезистентными стафилококками, занимали в 2018 году – 3,22% (95% ДИ: 2,91 – 3,56), наименьший в 2021 году – 1,19% (95% ДИ: 0,98 – 1,45) (таблица 13).

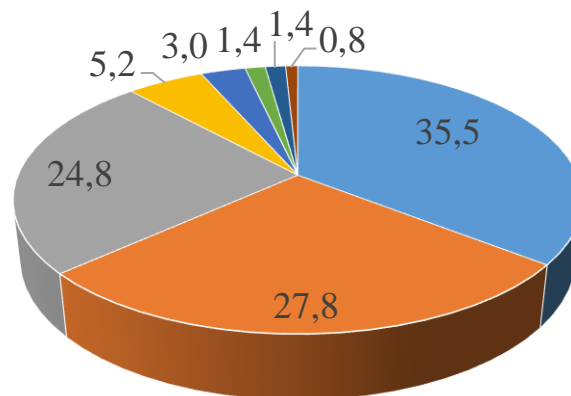
Таблица 13 – Доля метициллинрезистентных стафилококков в этиологической структуре ИСМП в РФ

Год	Доля метициллинрезистентных стафилококков в структуре ИСМП	
	% (абс.знач.)	95% ДИ
2018	3,22 (363/11284)	2,91 – 3,56
2019	2,64 (267/10107)	2,35 – 2,97
2020	1,31 (134/10194)	1,11 – 1,55
2021	1,19 (95/7970)	0,98 – 1,45
2018-2021	2,18 (859/39455)	2,04 – 2,33

Среди всех зарегистрированных форм ИСМП максимальное количество случаев, связанных с метициллинрезистентными стафилококками, выявлено среди инфекций в области хирургического вмешательства. Лидирующие позиции этой

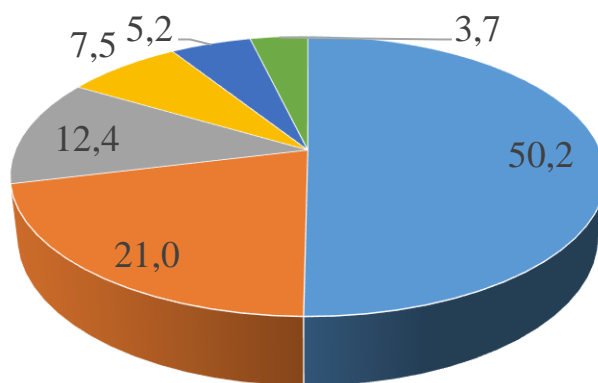
формы ИСМП мы видим в 2018 году (35,5% от всех случаев ИСМП, вызванных метициллинрезистентными стафилококками) (рисунок 10), в 2019 году (50,2%) (рисунок 11) и в 2021 году (41,1%) (рисунок 13).

В 2020 году на первое место среди ИСМП, вызванных метициллинрезистентными стафилококками, выходят инфекции нижних дыхательных путей (34,3%) (рисунок 12). Изменения в структуре ИСМП, вызванных метициллинрезистентными стафилококками, в 2020 году по всей видимости связаны с пандемией COVID-19. Во время пандемии гораздо большее количество пациентов с острой респираторной патологией были госпитализированы и подвергались риску развития госпитальной пневмонии. На вторичную бактериальную пневмонию приходится подавляющее большинство смертей у COVID-19-положительных пациентов с пневмонией [113].



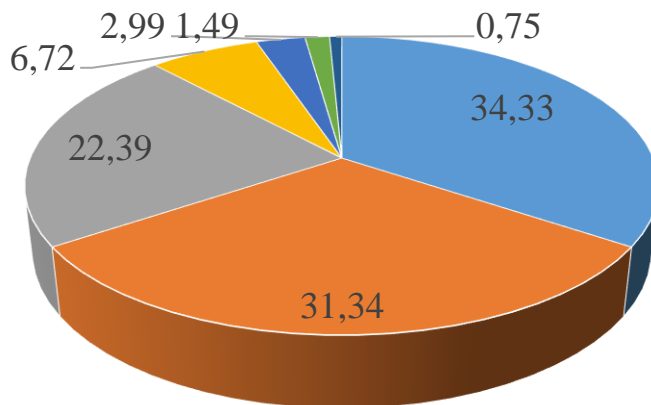
- Инфекции в области хирургического вмешательства
- Инфекции нижних дыхательных путей
- ИСМП новорожденных
- ИСМП родильниц
- Инфекции мочевыводящих путей
- Инфекции кровотока
- ИСМП, связанные с применением эндоскопических методов исследования
- Постинъекционные инфекции

Рисунок 10 – Структура форм ИСМП среди зарегистрированных случаев, вызванных метициллинрезистентными стафилококками в 2018 году (%)



- Инфекции в области хирургического вмешательства
- Инфекции нижних дыхательных путей
- ИСМП новорожденных
- ИСМП родильниц
- Постинъекционные инфекции
- Инфекции кровотока

Рисунок 11 – Структура форм ИСМП среди зарегистрированных случаев, вызванных метициллинрезистентными стафилококками в 2019 году (%)



- Инфекции нижних дыхательных путей
- Инфекции в области хирургического вмешательства
- ИСМП новорожденных
- ИСМП родильниц
- Постинъекционные инфекции
- Инфекции кровотока
- Инфекции мочевыводящих путей

Рисунок 12 – Структура форм ИСМП среди зарегистрированных случаев, вызванных метициллинрезистентными стафилококками в 2020 году (%)



Рисунок 13 – Структура форм ИСМП среди зарегистрированных случаев, вызванных метициллинрезистентными стафилококками в 2021 году (%)

За изучаемый период времени в структуре форм ИСМП среди зарегистрированных случаев, вызванных метициллинрезистентными стафилококками, вне пандемии, вызванной распространением коронавируса SARS-CoV-2, первое место занимали инфекции в области хирургического вмешательства. В 2020 году инфекции в области хирургического вмешательства составили 31,3% от всех случаев ИСМП, вызванных метициллинрезистентными стафилококками, что, по всей вероятности, связано с сокращением плановых хирургических операций в связи с пандемией. Это подтверждает и тот факт, что в 2021 году инфекции в области хирургического вмешательства, вызванные метициллинрезистентными стафилококками, снова выходят на лидирующие позиции (рисунок 14).

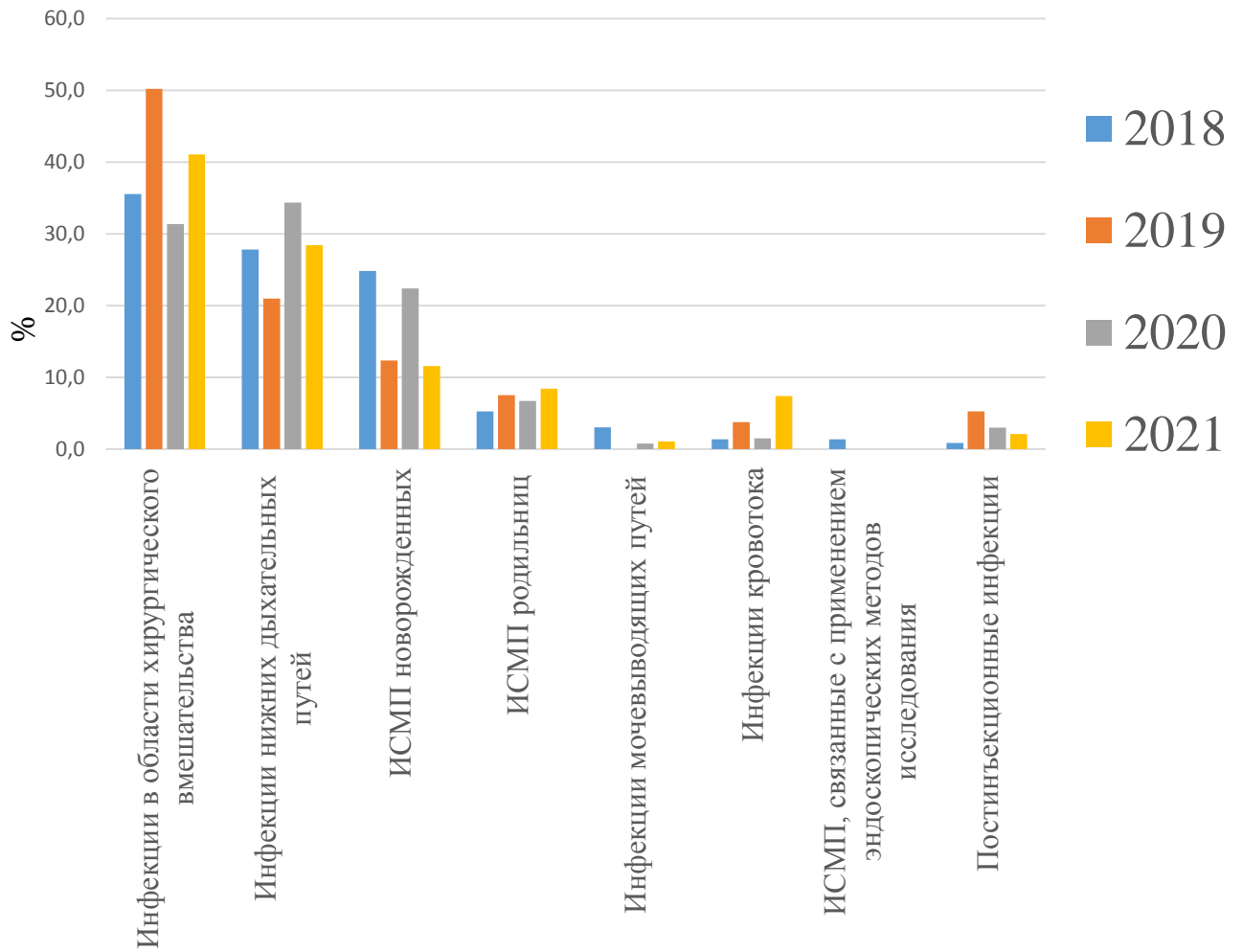
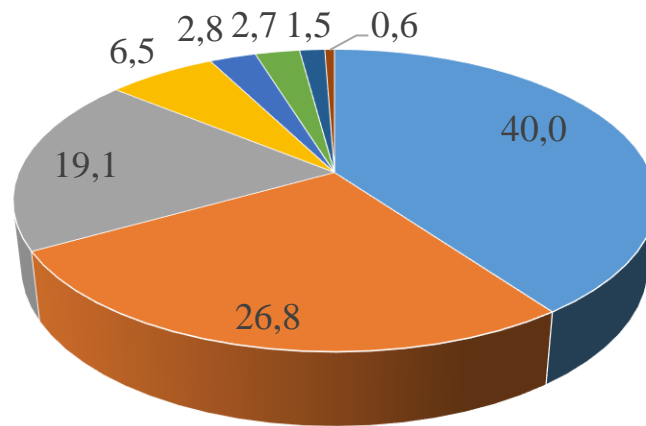


Рисунок 14 – Сравнение структуры форм ИСМП среди зарегистрированных случаев, вызванных метициллинрезистентными стафилококками в 2018-2021 годах (%)

В структуре форм ИСМП среди зарегистрированных случаев, вызванных метициллинрезистентными стафилококками суммарно за 2018-2021 год, на первом месте инфекции в области хирургического вмешательства – 40,1%, на втором – инфекции нижних дыхательных путей – 26,8%, на третьем – ИСМП новорожденных – 19,1% (рисунок 15).



- Инфекции в области хирургического вмешательства
- Инфекции нижних дыхательных путей
- ИСМП новорожденных
- ИСМП родильниц
- Инфекции кровотока
- Постинъекционные инфекции
- Инфекции мочевыводящих путей
- ИСМП, связанные с применением эндоскопических методов исследования

Рисунок 15 – Структура форм ИСМП среди зарегистрированных случаев, вызванных метициллинрезистентными стафилококками в 2018-2021 годах (%)

Снижение распространенности инфекций кровотока, вызванных метициллинрезистентным золотистым стафилококком включено ВОЗ в основной перечень рекомендованных показателей достижения цели сокращения распространенности и снижения темпов формирования устойчивости в документе «Мониторинг и оценка выполнения глобального плана действий по борьбе с устойчивостью к противомикробным препаратам». Количество официально зарегистрированных случаев инфекций кровотока, вызванных метициллинрезистентными штаммами стафилококка, очень невелико. В 2018 году число официальных случаев таких инфекций – 5, в 2019 году – 10 случаев, в 2020 году всего 2 случая, в 2021 - 7. Есть предположение, что реальная заболеваемость госпитальными инфекциями, вызванными метициллинрезистентными стафилококками, и, в частности, инфекциями кровотока, гораздо выше. Так, ДНК метициллинрезистентных штаммов была обнаружена нами в образцах крови от 21 пациента с признаками инфекции только лишь в одном из медицинских

учреждений Москвы в 2018 году и в крови 16 пациентов в 2019 году (подробнее в главе 6). В связи с чем можно предположить, что реальная заболеваемость госпитальными инфекциями, вызванными метициллинрезистентными стафилококками, выше официальной статистики. Мы проанализировали открытые данные по нозокомиальным инфекциям на ресурсе <https://amrmap.ru/> (онлайн-платформа анализа данных резистентности к антимикробным препаратам в России, пополняемая и обновляемая в рамках многоцентровых эпидемиологических исследований антибиотикорезистентности, проводимых НИИ антимикробной химиотерапии и Межрегиональной ассоциацией по клинической микробиологии и антимикробной химиотерапии) [1]. Данные по выявлению изолятов стафилококка, устойчивых к оксациллину, которые были выделены при нозокомиальных инфекциях в клиническом материале кровь по данным AMRmap сравнили с официальными данными, предоставленные территориальными органами Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, по инфекциям кровотока, вызванными метициллинрезистентными стафилококками в 2018-2020 году (таблица 14). В 2018 году по официальным данным, предоставленным территориальными органами Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, было зарегистрировано 5 случаев инфекций кровотока, вызванных метициллинрезистентными стафилококками. В этом же году на AMRmap загружены данные по 35 случаям обнаружения метициллинрезистентных стафилококков в крови при нозокомиальных инфекциях. Официальные данные по нозокомиальным инфекциям кровотока, вызванными метициллинрезистентными стафилококками в 7 раз меньше, по сравнению с данными AMRmap, несмотря на то что данные на AMRmap в 2018 году были загружены участниками только лишь из 18 городов РФ. То есть реальная заболеваемость нозокомиальными инфекциями кровотока, вызванными метициллинрезистентными стафилококками, ещё выше.

Таблица 14 – Сравнение доли метициллинрезистентных стафилококков, выявляемых в крови при нозокомиальных инфекциях кровотока по официальным данным и по данным AMRmap

Год	Данные AMRmap, % (абс.знач.)	Официальные данные, предоставленные территориальными органами Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, % (абс.знач.)	p
2018	35,35% (35/99)	3,33% (5/150)	< 0,001*
2019	43,36% (49/113)	10,64% (10/94)	< 0,001*
2020	38,46% (30/78)	2,82% (2/71)	< 0,001*

* - различия показателей статистически значимы ($p < 0,05$)

В 2019 году абсолютное количество официальных случаев нозокомиальных инфекций кровотока, вызванных метициллинрезистентными стафилококками, почти в 5 раз ниже, чем по данным AMRmap; в 2020 году официальная статистика в 15 раз ниже. В среднем за три года официальные данные по нозокомиальным инфекциям кровотока, предоставленные территориальными органами Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, в 6,7 раз ниже, чем по данным онлайн-платформы анализа данных резистентности к антимикробным препаратам в России. Учитывая, что данные на онлайн-платформе были загружены только участниками из 12 городов (в 2020 году) и 18 городов (в 2018 и 2019 годах), реальное количество случаев нозокомиальных инфекций кровотока в РФ, вызванных метициллинрезистентными стафилококками, гораздо выше.

Доля метициллинрезистентных стафилококков среди возбудителей стафилококка, выявляемых в крови при нозокомиальных инфекциях по официальным данным и по данным AMRmap статистически значимо отличается ($p < 0,001$) (таблица 14). Так в 2018 году по данным AMRmap доля метициллинрезистентных стафилококков, выявляемых в крови при стафилококковых нозокомиальных инфекциях, составила 35,4%, а по официальным данным – 3,3%. В 2019 году по данным AMRmap – 43,4%, а по официальным данным – 10,6%. В 2020 году по данным AMRmap – 38,5%, а по

официальным данным – 2,8%. В среднем за 2018-2020 годы, доля метициллинрезистентных штаммов среди стафилококков, выявляемых в крови при нозокомиальных инфекциях, по официальным данным, составляет 5,4%, а по данным AMRmap – 39,3%.

Таким образом, в течение наблюдаемого периода наблюдалось снижение заболеваемости ИСМП, вызванными стафилококками в РФ. Средний многолетний темп снижения составил 21,2%. Средний показатель заболеваемости ИСМП, вызванными стафилококками, за четыре года составил 0,12 на 1000 госпитализированных пациентов. Заболеваемость ИСМП, вызванными стафилококками, в 2018 и 2019 годах оставалась примерно на одном уровне в расчете на 1000 госпитализируемых пациентов. В 2020 и 2021 году наблюдалось снижение показателя заболеваемости на 1000 госпитализированных пациентов и абсолютного количества случаев ИСМП, вызванных стафилококками, что по нашим предположениям было связано с сокращением плановых хирургических операций в этот период. Удельный вес заболеваний, обусловленных метициллинрезистентными стафилококками, в общей структуре ИСМП составляет в среднем 2,18% (95% ДИ: 2,04 – 2,33). За изучаемый период времени в структуре форм ИСМП среди зарегистрированных случаев, вызванных метициллинрезистентными стафилококками, вне пандемии, вызванной распространением коронавируса SARS-CoV-2, первое место занимали инфекции в области хирургического вмешательства. В 2020 году лидирующее место заняли инфекции нижних дыхательных путей. Официальные данные по абсолютному количеству случаев нозокомиальных инфекций кровотока, предоставленные территориальными органами Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, как минимум в 7 раз ниже реального количества инфекций кровотока в РФ в 2018-2020 годах. Регистрируемые показатели, к сожалению, не отражают истинные уровни заболеваемости.

Несмотря на тенденцию к снижению заболеваемости ИСМП, обусловленными стафилококками, эти микроорганизмы остаются на первом ранговом месте в этиологической структуре ИСМП среди бактериальных

возбудителей (18,2% – 30,8%). Фактический уровень ИСМП превышает регистрируемый, что не позволяет проводить качественный анализ заболеваемости ИСМП, обусловленными стафилококками. Официальные данные по заболеваемости могут значительно отличаться от истинного количества ИСМП, что требует регулярных эпидемиологических исследований и создания условий для оптимизации выявления и учета внутрибольничных инфекций.

ГЛАВА 4. СРАВНЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ БАКТЕРИОЛОГИЧЕСКИХ И МОЛЕКУЛЯРНО-БИОЛОГИЧЕСКИХ МЕТОДОВ ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ МЕТИЦИЛЛИНРЕЗИСТЕНТНЫХ ШТАММОВ СТАФИЛОКОККОВ

Высокая встречаемость метициллинрезистентных штаммов приводит к неэффективности лечения большинством антибактериальных препаратов, что существенно ухудшает качество медицинской помощи. В этих условиях совершенствование методов мониторинга за метициллинрезистентными штаммами, проводимого в стационарах, становится особенно актуальным. Наиболее широко применяемый для данных целей бактериологический метод, направленный на выделение возбудителя и его идентификацию в культуре клеток с последующим определением чувствительности к ряду антимикробных препаратов, к сожалению, имеет ряд ограничений. Это длительность в исполнении, жесткие требования к процедуре взятия, хранения, транспортировки и срокам доставки биологического материала, а также отсутствие условий для проведения исследований в ряде клиничко-диагностических лабораторий лечебно-профилактических учреждений здравоохранения РФ. В связи с этим особую важность приобретает внедрение в клиническую практику молекулярно-биологических методов диагностики, имеющих высокую чувствительность, специфичность и быстроту исполнения, позволяющих проводить идентификацию возбудителя с определением его антибиотикорезистентности без предварительного культивирования. Одной из задач нашего исследования было сравнить результаты молекулярно-биологического и бактериологического метода для выявления метициллинрезистентных стафилококков.

Было проведено сравнение результатов параллельного бактериологического и молекулярно-биологического (ПЦР) исследования на наличие метициллинрезистентных стафилококков в крови и в мазках из ран. Параллельное бактериологическое и молекулярно-биологическое (ПЦР) исследование на наличие метициллинрезистентных стафилококков в крови было проведено для 240

пациентов с признаками инфекции. Методом ПЦР метициллинрезистентные стафилококки были выявлены в крови у 15 (6,3%) пациентов с признаками инфекции, а с помощью бактериологических методов – у 8 (3,3%) пациентов.

Проведенные молекулярно–биологические исследования подтвердили наличие ДНК гена *tesA* в образцах крови от 15 пациентов (6,3%), ДНК гена *tesC* ни в одном из образцов обнаружена не была. В 7 (3%) из 15 случаев, подтвержденных методом ПЦР, посеvy роста не дали. По отрицательным образцам полное совпадение двух методов наблюдалось для биоматериала от 225 пациентов (93,7%) (таблица 15).

Таблица 15 – Сравнение результатов молекулярно-биологического и бактериологического исследования на наличие ДНК метициллин-резистентных стафилококков в крови

Результаты	Обнаружено, %	Не обнаружено, %
Результаты молекулярно-биологического исследования	6,3	93,7
Результаты бактериологического исследования	3,3	96,7

Чувствительность метода ПЦР относительно бактериологического метода в нашем исследовании составила 100%, специфичность – 97%.

Одним из средств оценки эффективности диагностического теста является метод, основанный на анализе так называемой операционной характеристической кривой (ROC-анализ) [93]. Для оценки качества метода ПЦР для выявления ДНК МР стафилококков в крови был проведен ROC-анализ. При построении ROC-кривой получен график, изображенный на рисунке 16. Площадь под кривой AUC (которая располагается в интервале от 0 до 1, где 1 – идеальная модель) в нашем случае составила 0,98, что максимально приближено к идеальному случаю.

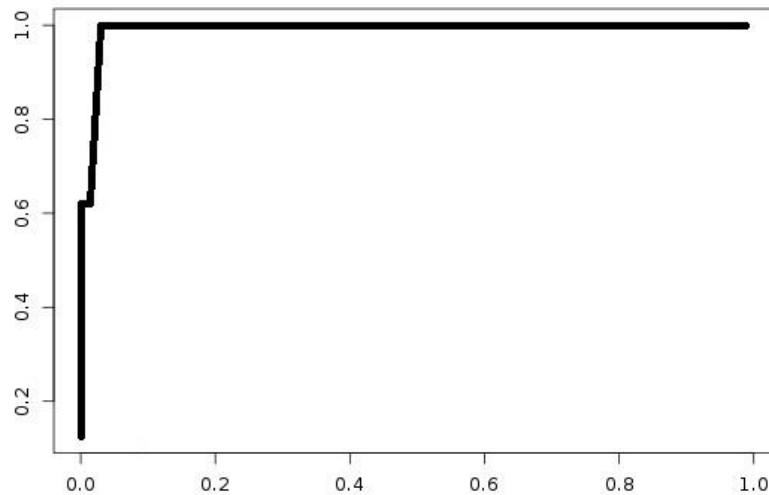


Рисунок 16 – ROC-кривая

Результаты ПЦР и бактериологического метода совпали в 97% проб (для 233 пациентов). Для 7 (3%) проб были получены дискордантные результаты. ROC-анализ показал, что 100% специфичности метода ПЦР относительно бактериологического метода можно добиться, если порогом положительного результата будет концентрация ДНК метициллинрезистентных стафилококков 1200 копий/мл и выше. Но учитывая, что концентрация стафилококков в крови обычно невысока, повышая порог, можно получить ложноотрицательные результаты. Поэтому оптимальным порогом положительного результата для выявления ДНК метициллинрезистентных стафилококков в крови считаем значение 100 копий/мл и выше. В этом случае чувствительность составляет 100%, а специфичность – 97%.

Наличие дискордантных результатов можно объяснить, как ложноположительным результатом теста ПЦР, так и, возможно, большей чувствительностью метода ПЦР по сравнению с бактериологическим методом. Для пациентов с дискордантными результатами, бактериологический посев был отрицательным по всем возбудителям (роста культуры не было). При этом в 100% случаев имели место признаки инфекции различной локализации, подтвержденные клиническими, лабораторными и инструментальными данными: в 2 случаях диагностирована пневмония, в 2 – инфекция кожи и мягких тканей, у 1 пациента

была мочевиная инфекция, еще 2 больных гематологического профиля страдали фебрильной нейтропенией после перенесенной высокодозной химиотерапии. Для 5 из 7 пациентов с дискордантными результатами известны данные по биомаркеру сепсиса – пресепсину (данные по пресепсину были получены при анализе выписок из медицинских карт стационарных больных). Уровень пресепсина, при котором инфекционный процесс маловероятен, – 200 пг/мл [7]. У всех 5 пациентов уровень пресепсина превышал этот порог и составлял от 303 до 1107 пг/мл (медиана – 558 пг/мл). Показатель пресепсина выше 1000 пг/мл трактуется как высокий риск развития системной инфекции (сепсис, септический шок) [7]. У 1 из пациентов с пневмонией, отрицательными результатами бактериологического исследования крови и положительными результатами ПЦР имели место клинические проявления сепсиса, оценка по SOFA составила 6 баллов, показатель пресепсина были на уровне 1107 пг/мл, а прокальцитонина – 7,5 нг/мл. Это дает основания предполагать, что данные, полученные с помощью бактериологического метода, могли быть ложноотрицательными. Наблюдений, когда с помощью метода ПЦР в крови были выявлены гены метициллинрезистентных стафилококков, а с помощью бактериологического какие-либо другие микроорганизмы, в нашем исследовании не отмечено [30].

Параллельное бактериологическое и молекулярно-биологическое (ПЦР) исследование на наличие метициллинрезистентных стафилококков в мазках из ран было проведено для 175 пациентов с клиническими признаками инфекции области хирургического вмешательства. Методом ПЦР метициллинрезистентные стафилококки были обнаружены в 57,1% образцов, а с помощью бактериологического метода в 42,3% образцов. Учитывая, что положительные результаты ПЦР-исследования были получены при тестировании образцов биологического материала пациентов с установленными ранее результатами выявления роста бактерий *Staphylococcus spp.*, возможные расхождения можно объяснить более высокой чувствительностью метода ПЦР по сравнению с традиционным бактериологическим исследованием.

Суммируя данные по двум биоматериалам (кровь и мазки из ран), мы видим, что метод ПЦР статистически значимо чаще выявлял метициллинрезистентные стафилококки по сравнению с традиционным бактериологическим исследованием ($p=0,0071$). Методом ПЦР метициллинрезистентные стафилококки были выявлены в 27,7% по сравнению с 19,8% с помощью бактериологического метода (таблица 16).

Таблица 16 – Сравнение результатов молекулярно-биологического и бактериологического исследования на наличие метициллинрезистентных стафилококков

Результаты	Обнаружено		Не обнаружено	
	% (абсолютное значение)	95% ДИ	% (абсолютное значение)	95% ДИ
Результаты молекулярно-биологического исследования	27,7% (115)	23,6% – 32,2%	72,29 (300)	67,8% – 76,4%
Результаты бактериологического исследования	19,8 (82)	16,2% – 23,9%	80,24 (333)	76,1% – 83,8%

Различия между результатами, полученными с помощью бактериологического метода и ПЦР, демонстрируют, что использование только посева может упустить важную информацию о присутствующих метициллинрезистентных стафилококках в крови. Использование молекулярно-биологических методов для выявления и идентификации микроорганизмов в крови не может быть альтернативой традиционным бактериологическим исследованиям, так как выявляет ограниченный спектр микроорганизмов. Молекулярные методы могут быть использованы для получения ускоренного результата. При этом,

учитывая более высокую чувствительность метода ПЦР, крайне важно соблюдать все правила асептики при заборе биологического материала, чтобы не допустить получения ложноположительных результатов.

Таким образом, проведенное исследование показало, что метод ПЦР в режиме реального времени обладает высокой чувствительностью и специфичностью. Проведенный ROC-анализ показал, что оптимальным порогом положительного результата для выявления ДНК метициллинрезистентных стафилококков в крови методом ПЦР является значение 100 копий/мл и выше. Чувствительность метода ПЦР относительно бактериологических методов составляет 100%, а специфичность – 97%. Метод ПЦР статистически значимо чаще выявляет метициллинрезистентные стафилококки по сравнению с традиционным бактериологическим исследованием ($p=0,0071$). Внедрение метода ПЦР необходимо для проведения оперативной диагностики осложнений, ассоциированных с метициллинрезистентными штаммами стафилококка. Это позволит увеличить возможность идентификации этиологического агента при бактериемии и сепсисе, значительно сократить срок диагностического исследования, а значит своевременно назначить адекватную антимикробную терапию.

ГЛАВА 5. РАЗРАБОТКА НАБОРА РЕАГЕНТОВ НА ОСНОВЕ ПОЛИМЕРАЗНОЙ ЦЕПНОЙ РЕАКЦИИ В РЕЖИМЕ РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ И КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ ДНК МЕТИЦИЛЛИНРЕЗИСТЕНТНЫХ СТАФИЛОКОККОВ

В целях улучшения эффективности мониторинга за метициллинрезистентными штаммами стафилококка необходимо разработать набор реагентов, позволяющий быстро и эффективно выявлять метициллинрезистентный золотистый стафилококк и метициллинрезистентные штаммы других видов рода *Staphylococcus*.

В рамках данного исследования был разработан набор реагентов, предназначенный для выявления и количественного определения ДНК метициллинрезистентных стафилококков в клиническом материале и смывах с медицинского оборудования и инвентаря с использованием гибридационно-флуоресцентной детекции продуктов амплификации в режиме реального времени. Набор реагентов предназначен для флуоресцентных детекторов, имеющих 3 и более каналов детекции. Для дифференцировки метициллинрезистентного *Staphylococcus aureus* (MRSA) от метициллинрезистентных коагулазонегативных стафилококков (MRCoNS) по одному из каналов регистрируется детекция флуоресцентного сигнала фрагмента ДНК, специфичного только для золотистого стафилококка (*Staphylococcus aureus*). По другому каналу детектируется фрагмент ДНК, обнаруживаемый только у метициллинрезистентных штаммов стафилококков. По третьему каналу происходит выявление внутреннего контрольного образца (рисунок 17). Внутренний контрольный образец добавляется на этапе выделения ДНК в каждый образец. Это позволяет контролировать процедуру анализа проб биологических образцов и учитывать потери во время экстракции нуклеиновых кислот при количественных расчетах. В состав набора реагентов входят стандартные образцы с заданной концентрацией (калибраторы). Результат интерпретируются как положительный на основании наличия

пересечения кривой флюоресценции с установленной на заданном уровне пороговой линией. Расчет концентрации в исследуемых образцах производится относительно положительных контролей этапа амплификации (калибраторов). Калибраторы являются смесью плазмид с клонированными в них участками необходимой ДНК, охарактеризованные количественно. Точность измерения калибраторов подтверждалась референтным методом – системой капельной цифровой ПЦР QX100 droplet digital PCR (ddPCR), производства "Био-Рад Лабораториз, Инк." (Bio-Rad Laboratories, Inc.), США, РУ № ФСЗ 2012/13278 от 20.11.2012 г. (в соответствии с инструкцией к системе QX100 для проведения капельной цифровой ПЦР (QX100 droplet digital PCR)).

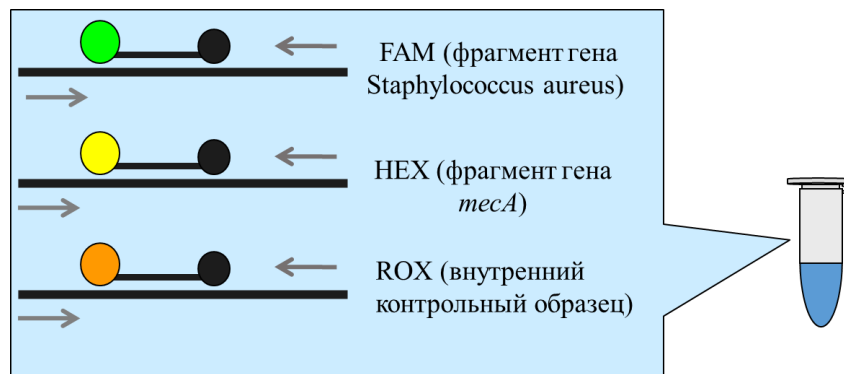


Рисунок 17 – Схематический дизайн создания набора реагентов

Праймеры и зонды для выявления гена *mecA* были подобраны на основе анализа нуклеотидных последовательностей генетического элемента *mec* (*SCCmec*) бактерий рода *Staphylococcus*, обнаруживаемого только у метициллинрезистентных штаммов. Гены *mecA* или *mecC* кодируют дополнительный пенициллинсвязывающий белок, отсутствующий у чувствительных микроорганизмов и обеспечивающий устойчивость к бета-лактамам антибиотикам.

Интерпретация результата при тестировании биологического материала основана на количественном расчете. Пример интерпретации представлен в таблице 17 (жирным шрифтом в таблице выделены метициллинрезистентные штаммы). У штаммов метициллинчувствительного золотистого стафилококка

(образцы номер 5, 6, 14, 18, 21 и 30) положительного сигнал детектируется только по каналу "FAM/Green". У штаммов метициллинрезистентных коагулазонегативных стафилококков (образцы номер 1-3; 7-13; 15-17; 20; 22; 25-29 и 32-35) положительный сигнал детектируется только по каналу "JOE/HEX/Yellow" (специфичному для гена *mecA*). У метициллинрезистентного золотистого стафилококка (образцы 4; 19; 23; 24; 36-38) положительный сигнал детектируется одновременно по двум каналам.

Таблица 17 – пример интерпретации ПЦР-исследования коллекции стафилококков

№ п/п	Имя	<i>S. aureus</i> (FAM/ Green)	<i>mec A</i> (JOE/ HEX/ Yellow)	lg S.a.	lg <i>mec</i> A	lg S.a.- lg <i>mec</i> A	Результат
1	<i>S. simulans</i>	-	664987	-	5,8	-	MRCoNS
2	<i>S. epidermidis</i>	-	5218280	-	6,7	-	MRCoNS
3	<i>S. cohnii</i>	-	2250539	-	6,4	-	MRCoNS
4	<i>S. aureus</i>	1480122	1266458	6,2	6,1	0,07	MRSA
5	<i>S. aureus</i>	5916276	-	6,8	-	-	MSSA
6	<i>S. aureus</i>	1796363	-	6,3	-	-	MSSA
7	<i>S. epidermidis</i>	-	845727	-	5,9	-	MRCoNS
8	<i>S. epidermidis</i>	-	2563294	-	6,4	-	MRCoNS
9	<i>S. haemolyticus</i>	-	300972	-	5,5	-	MRCoNS
10	<i>S. haemolyticus</i>	-	2408572	-	6,4	-	MRCoNS
11	<i>S. haemolyticus</i>	-	1484050	-	6,2	-	MRCoNS
12	<i>S. haemolyticus</i>	-	736320	-	5,9	-	MRCoNS
13	<i>S. epidermidis</i>	-	1106161	-	6,0	-	MRCoNS
14	<i>S. aureus</i>	885168	-	5,9	-	-	MSSA
15	<i>S. epidermidis</i>	-	3196008	-	6,5	-	MRCoNS
16	<i>S. epidermidis</i>	-	2225005	-	6,3	-	MRCoNS
17	<i>S. epidermidis</i>	-	2676029	-	6,4	-	MRCoNS
18	<i>S. aureus</i>	4813809	-	6,7	-	-	MSSA
19	<i>S. aureus</i>	1614367	1682185	6,2	6,2	-0,02	MRSA
20	<i>S. simulans</i>	-	1532968	-	6,2	-	MRCoNS
21	<i>S. aureus</i>	9186892	-	7,0	-	-	MSSA
22	<i>S. epidermidis</i>	-	4648098	-	6,7	-	MRCoNS
23	<i>S. aureus</i>	523393	599244	5,7	5,8	-0,06	MRSA
24	<i>S. aureus</i>	1973482	1877231	6,3	6,3	0,02	MRSA
25	<i>S. haemolyticus</i>	-	741646	-	5,9	-	MRCoNS
26	<i>S. haemolyticus</i>	-	617264	-	5,8	-	MRCoNS
27	<i>S. saprophyticus</i>	-	725638	-	5,9	-	MRCoNS

Продолжение таблицы 17

№ п/п	Имя	<i>S. aureus</i> (FAM/ Green)	mec A (JOE/ HEX/ Yellow)	lg S.a.	lg mec A	lg S.a.- lg mec A	Результат
28	<i>S. haemolyticus</i>	-	639400	-	5,8	-	MRCoNS
29	<i>S. haemolyticus</i>	-	2285042	-	6,4	-	MRCoNS
30	<i>S. aureus</i>	378712	-	5,6	-	-	MSSA
31	<i>S. aureus</i>	10222579	8381422	7,0	6,9	0,09	MRSA
32	<i>S. simulans</i>	-	731179	-	5,9	-	MRCoNS
33	<i>S. simulans</i>	-	333590	-	5,5	-	MRCoNS
34	<i>S. haemolyticus</i>	-	230942	-	5,4	-	MRCoNS
35	<i>S. haemolyticus</i>	-	662861	-	5,8	-	MRCoNS
36	<i>S. aureus</i>	3665144	2726863	6,6	6,4	0,13	MRSA
37	<i>S. aureus</i>	1212033	1224573	6,1	6,1	0,00	MRSA
38	<i>S. aureus</i>	1775737	1896115	6,2	6,3	-0,03	MRSA

Исследование более двухсот изолятов *Staphylococcus spp.* показало, что средняя величина различия количества фрагмента ДНК гена *S.aureus* по отношению к количеству фрагмента ДНК гена *mecA Staphylococcus spp.* при анализе метициллинрезистентных *S.aureus* составила $0,06 + 0,086$ lg, при этом максимальное значение - $0,26$ lg. Таким образом, если выявляемое количество фрагмента ДНК гена *S.aureus* отличается от количества фрагмента ДНК гена *mec A Staphylococcus spp.* не более чем на $0,3$ lg, результат означает: обнаружена ДНК метициллинрезистентного *S.aureus*. Если количество фрагмента ДНК гена *S.aureus* отличается от количества фрагмента ДНК гена *mecA Staphylococcus spp.* более, чем на $0,3$ lg, мы не можем дифференцировать метициллинрезистентный *S.aureus* от метициллинрезистентных коагулазонегативных *Staphylococcus spp.* В этом случае результат трактуется как смесь ДНК метициллинрезистентных штаммов *Staphylococcus spp.* [24].

Условия проведения ПЦР и оптимальная температура подбирались стандартным образом. Оптимальная программа амплификации была подобрана экспериментально (таблица 18).

Таблица 18 – Программа амплификации

Этап	Температура, °С	Продолжительность этапа	Измерение флуоресценции	Кол-во циклов
Удерж. температуры	95	15 мин	–	1
Циклирование 1	95	15 с	–	5
	60	30 с	–	
	72	15 с	–	
Циклирование 2	95	15 с	–	40
	55	30 с	FAM/Green, JOE/Yellow, ROX/Orange	
	72	15 с	–	

Для проверки специфичности теста были использованы эталонные контрольные штаммы *S.aureus*, полученных из американской коллекции типовых культур ATCC: № 6538P, 43300, 29213, 25923, 33862, 33591, 12600, ВАА-2313; штаммы, полученные из коллекций ЦНИИ эпидемиологии и 196 клинических изолятов *Staphylococcus spp.* Специфичность теста для выявления *Staphylococcus aureus* проверялась на штаммах *Listeria monocytogenes*, *Moraxella catarrhalis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus mirabilis*, *Neisseria meningitidis*, *N. cinerea*, *N. elongata*, *N. flavescens*, *N. gonorrhoeae*, *N. mucosa*, *N. sicca*, *N. subflava*, *Streptococcus pneumoniae*, *S. agalactiae*, *S. milleri*, *S. mitis*, *S. mutans*, *S. pyogenes*, *S. salivarius*, *S. sanguis*, *S. suis*, *S. viridans*, *Haemophilus influenzae*, *H. parainfluenzae*, *H. haemolyticus*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *K. oxytoca* и др. Неспецифических реакций при тестировании штаммов разработанным набором реагентов выявлено не было (рисунок 18, 19). По каналу, на котором регистрируется ген, специфичный для *S. aureus*, наблюдается разгорание для штамма метициллинрезистентного золотистого стафилококка (цифра 1 на рисунке 18) и метициллинчувствительного золотистого стафилококка (цифра 2 на рисунке 18). Неспецифического разгорания у не стафилококковых штаммов не наблюдается (цифра 4 на рисунке 18). Цифрой 3 на рисунке 18 и 19 обозначены калибраторы.

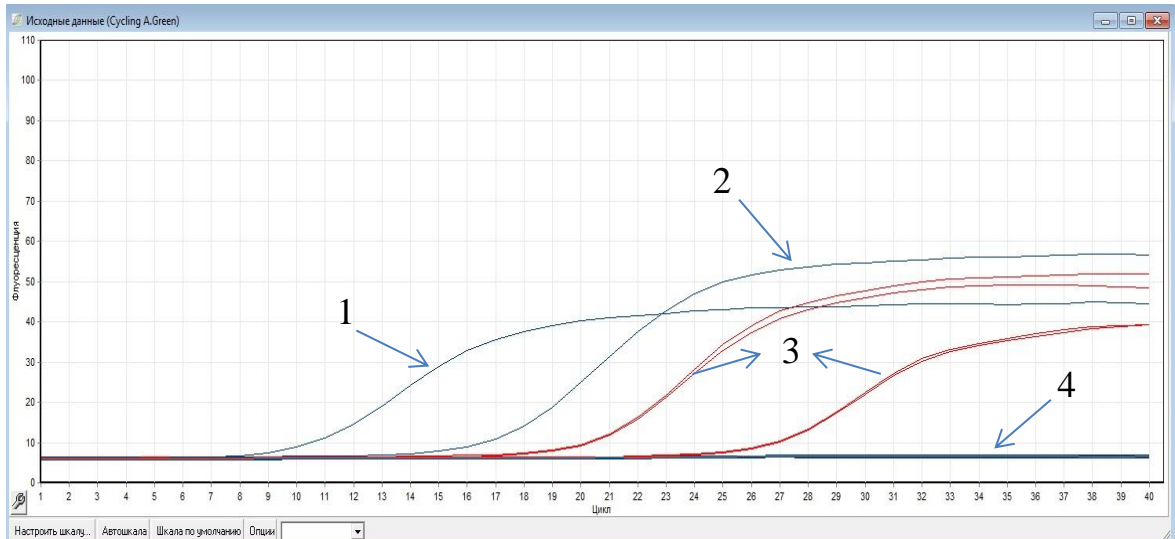


Рисунок 18 – Проверка специфичности набора реагентов для выявления метициллинрезистентных стафилококков по каналу FAM/Green на приборе «RotorGeneQ» («Qiagen», Германия)

По каналу, на котором регистрируется ген *mecA*, наблюдается положительный сигнал только для метициллинрезистентного штамма стафилококка (цифра 1 на рисунке 19). Неспецифического разгорания у стафилококков, чувствительных к метициллину, по каналу «JOE/HEX/Yellow» не наблюдается (рисунок 19).

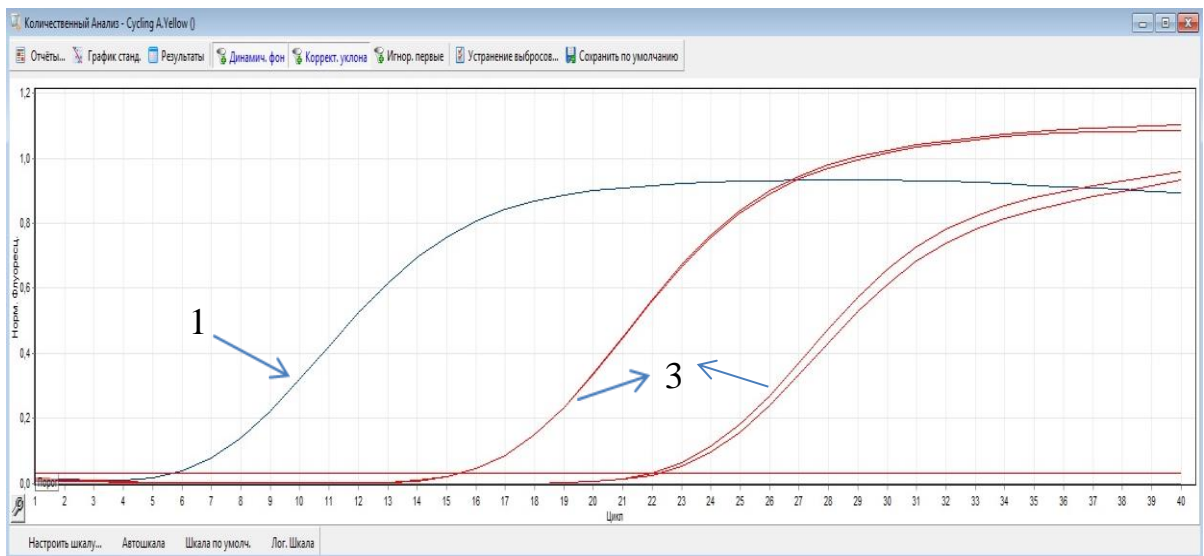


Рисунок 19 – Проверка специфичности набора реагентов для выявления метициллинрезистентных стафилококков по каналу JOE/HEX/Yellow на приборе «RotorGeneQ» («Qiagen», Германия)

Оценка аналитической чувствительности путем проведения серии экспериментов с разведениями с концентрацией равной, выше и ниже предполагаемого предела обнаружения (не менее пяти повторов каждой концентрации) показала, что разработанный набор позволяет выявлять не менее 400 копий ДНК метициллинрезистентных стафилококков на один миллилитр. Линейный диапазон измерения составляет от 800 до $1 \cdot 10^7$ копий выявляемой ДНК на миллилитр образца.

Повторяемость оценивали тестированием повторов положительных образцов двух различных концентраций и повторов отрицательных образцов в течение дня, на одном приборе, в одной лаборатории, на одной серии набора реагентов. Воспроизводимость оценивали тестированием повторов положительных образцов двух различных концентраций и повторов отрицательных образцов в течение другого дня, на другом приборе, на другой серии набора реагентов. Повторяемость и воспроизводимость качественного определения оценивалась по проценту совпадения результатов «обнаружено» и «не обнаружено» (таблица 19).

Таблица 19 – Повторяемость и воспроизводимость качественного определения метициллинрезистентных стафилококков

Тип образцов	Повторяемость		Воспроизводимость	
	Количество образцов	Совпадение результатов %	Количество образцов	Совпадение результатов %
Положительные	10	100	40	100
Отрицательные	10	100	40	100
Положительные	10	100	40	100
Отрицательные	10	100	40	100

Повторяемость и воспроизводимость количественного определения метициллинрезистентных стафилококков оценивалась по коэффициенту вариации. Коэффициент вариации (CV, %) количественного определения не превышал 3,5% для условий повторяемости и воспроизводимости (таблица 20).

Таблица 20 – Повторяемость и воспроизводимость количественного определения метициллинрезистентных стафилококков

Ожидаемая концентрация, копии/реакцию	Количество повторов	Среднее значение концентрации, Ig	Суммарное стандартное отклонение (SD)	Коэффициент вариации (CV), %
10000	30	4,0	0,06	1,6
100	30	2,0	0,06	3,1

Валидация тест-системы проводилась на 56 штаммах *Staphylococcus aureus*, выделенных лабораторией клинической микробиологии Кемеровской областной клинической больницы от пациентов хирургического стационара и ожогового центра (53 штамма были выделены из раневого отделяемого, 3 из крови пациентов). Было проведено сравнение метода ПЦР с фенотипическим методом идентификации. Диско-диффузионным методом с использованием дисков, содержащих 1 мкг/мл оксациллина было выявлено 8 метициллинчувствительных и 48 метициллинрезистентных штаммов. Для всех метициллинрезистентных штаммов наличие гена *mecA* подтверждено секвенированием. Совпадение результатов, полученных с помощью разработанного комплекта реагентов и фенотипического метода, составило 100%.

Для удобства пользователей набора разработано программное обеспечение, предназначенное для автоматической обработки и интерпретации результатов ПЦР-исследования. Подана заявка № 2023660554 от 25 мая 2023 года на регистрацию программы для ЭВМ. По заявке получено свидетельство о государственной регистрации № 2023661976 «AmpliSens® MRSA-screen-titre Soft». Дата государственной регистрации в Реестре программ для ЭВМ – 5 июня 2023 года.

Таким образом, разработан набор реагентов для выявления и количественного определения ДНК метициллинчувствительных и метициллинрезистентных *S. aureus*, метициллинрезистентных коагулазонегативных *Staphylococcus spp.* в биологическом материале методом ПЦР

с гибридационно-флюоресцентной детекцией, обладающий высокими аналитическими и диагностическими характеристиками. Получено регистрационное удостоверение № ФСР 2012/13998 на набор с коммерческим названием «АмплиСенс®MRSA-скрин-титр-FL» и зарегистрирована программа для ЭВМ 2023661976 «AmpliSens® MRSA-screen-titre Soft» от 5 июня 2023. Анализ отличается простотой и воспроизводимостью при сохранении высоких диагностических характеристик, что открывает перспективы его широкого применения в лабораториях и медицинских учреждениях. Внедрение данного набора реагентов даст эпидемиологам новый высокоэффективный инструмент для мониторинга за антибиотикорезистентными штаммами.

ГЛАВА 6. ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКИЙ МОНИТОРИНГ ЗА ИНФЕКЦИЯМИ, ОБУСЛОВЛЕННЫМИ МЕТИЦИЛЛИНРЕЗИСТЕНТНЫМИ ШТАММАМИ СТАФИЛОКОККОВ С ПОМОЩЬЮ МОЛЕКУЛЯРНО-БИОЛОГИЧЕСКИХ МЕТОДОВ

6.1 Мониторинг метициллинрезистентных штаммов стафилококка в многопрофильных стационарах города Москвы

Мониторинг метициллинрезистентных штаммов стафилококка проводился в многопрофильных стационарах города Москвы в течение трех лет в отделениях реанимации и интенсивной терапии, гематологии и хирургических отделениях. Обследование пациентов с признаками инфекции было направлено на выявление инфекций кровотока, вызванных метициллинрезистентными штаммами стафилококка. Показаниями к ПЦР исследованию крови были: катетер-ассоциированный тромбофлебит; фебрильная нейтропения (у больных онкологическими заболеваниями); наличие у пациента двух или более признаков из следующих: гипотермия или лихорадка, лейкоцитоз, тахикардия, гипотензия.

Для выявления инфекций кровотока, вызванных метициллинрезистентными штаммами стафилококка, в 2017-2019 годах было обследовано 632 пациента с признаками инфекции. В течение первого года было обследовано 240 пациентов с признаками инфекции. Среди них женщин – 95 (40%), мужчин – 145 (60%). Возраст больных от 18 до 96 лет (медиана 56). Методом ПЦР ДНК стафилококков была выявлена в крови 30 пациентов (12,5%) в возрасте от 18 до 89 лет (медиана 54,5). Данные молекулярно-биологического исследования показали, что в половине (50%) выявленных в образцах крови ДНК стафилококков была обнаружена ДНК гена *mecA*, ген *mecC* ни в одном из образцов обнаружен не был. ДНК метициллинрезистентных штаммов была обнаружена в 15 образцах (6,25%) пациентов в возрасте от 18 до 89 лет (медиана 58). Среди пациентов, в крови

которых были обнаружены метициллинрезистентные стафилококки, у 66,7% были установлены внутрисосудистые катетеры; 26,7% находились на искусственной вентиляции легких.

В 2017 году ДНК метициллинрезистентных стафилококков была обнаружена в крови у 15 (6,25%) из 240 пациентов с признаками инфекции [17]. В 2018 году ДНК метициллинрезистентных стафилококков была обнаружена у 21 (10,0%) пациента из 210 обследованных с признаками инфекции, в течение третьего года у 16 (8,8%) из 182 (таблица 21).

Таблица 21 – Частота выявления ДНК метициллинрезистентных стафилококков в крови у пациентов ОРИТ с признаками инфекции в 2017-2019 годах

Год	Частота выявления ДНК метициллинрезистентных стафилококков в крови, %	95% ДИ
2017	6,25	3,82-10,05
2018	10,00	6,63-14,80
2019	8,79	5,48-13,80
2017-2019	8,23	6,33-10,63

Частота выявления ДНК метициллинрезистентных стафилококков в крови в течение трех лет статистически значимо не отличалась. В среднем за три года частота выявления метициллинрезистентных стафилококков среди пациентов с признаками инфекции составила 8,23% (95% ДИ: 6,33-10,63).

Среди пациентов, в крови которых были обнаружены метициллинрезистентные стафилококки, в 2017 году в 26,7% случаев была обнаружена ДНК метициллинрезистентного *S. aureus* (MRSA), в 73,3% случаев была обнаружена ДНК метициллинрезистентных коагулазонегативных стафилококков (MRCoNS); в 2018 году в 14,3% - MRSA, в 85,7% - MRCoNS; в 2019 году в 12,5% - MRSA, в 87,45% - MRCoNS. ДНК MRCoNS статистически значимо чаще выявлялась в крови пациентов по сравнению с ДНК MRSA ($p < 0,0001$). В среднем за три года, среди пациентов, в крови которых были обнаружены метициллинрезистентные стафилококки, ДНК метициллинрезистентного

Staphylococcus aureus была обнаружена в 17,3% случаев, а ДНК метициллинрезистентных коагулазонегативных стафилококков в 82,7% случаев.

В рамках мониторинга было проведено полногеномное секвенирование 35 изолятов стафилококков, выделенных от больных с разными формами стафилококковой инфекции и из смыва с объекта внутрибольничной среды: 20 изолятов *Staphylococcus aureus* и 15 изолятов *Staphylococcus epidermidis*. Изоляты были получены при посевах из различных очагов инфекции в бактериологической лаборатории.

20 изолятов *Staphylococcus aureus* были выделены из одного медицинского учреждения города Москвы (19 изолятов *Staphylococcus aureus* были выделены от пациентов стационара, а один оставшийся – из смыва с объекта внутрибольничной среды). Сопоставление аллельных профилей, исследуемых изолятов с известными профилями из международной базы данных показало, что штаммы *Staphylococcus aureus* относились к шести различным сиквенс-типам (ST-5, ST-7, ST-8, ST-22, ST-30 и ST-5555) (таблица 22). Один из штаммов имел новый аллельный профиль. На сегодня ему присвоен номер ST5555. Новый сиквенс-тип был выделен из раневого содержимого от пациента хирургического отделения с флегмоной и не содержал ген *mecA*.

Таблица 22 – Характеристики изолятов *Staphylococcus aureus*

Сиквенс-тип	Биологический материал/ источник	Кол-во образцов	Spa-типирование	Гены, ассоциированные с факторами патогенности стафилококков
ST-8	раневоe отделяемое	2	t008	aur, hlgA, hlgB, hlgC, lukD, lukE, sak, scn, sea, splA, splB, splE
	содержимое абсцесса мягких тканей	1		

Продолжение таблицы 22

Сиквенс-тип	Биологический материал/ источник	Кол-во образцов	Сра-типирование	Гены, ассоциированные с факторами патогенности стафилококков
ST-8	кровь из периферической вены	3	t008	aur, hlgA, hlgB, hlgC, lukD, lukE, sak, scn, sea, splA, splB, splE
	центральный венозный катетер	1		
	смыв с дверцы шкафа с расходным материалом	1		
	мазок с эндопротеза тазобедренного сустава	1		
ST22	кровь из периферической вены	1	t223	aur, hlgA, hlgB, hlgC, sak, scn, seg, sei, sem, sen, seo, seu, tst
	содержимое абсцесса мягких тканей	1	t4573	aur, hlgA, hlgB, hlgC, lukF-PV, lukS-PV, sak, scn, seg, sei, sem, sen, seo, seu
	кровь	1	t12437	aur, hlgA, hlgB, hlgC, sak, scn, seg, sei, sem, sen, seo, seu, tst
	отделяемое послеоперационной раны мягких тканей	1	t12437	
	мазок из носа	1	t223	aur, hlgA, hlgB, hlgC, lukD, lukE, sak, scn, sea, seg, sei, sem, sen, seo, seu, splA, splB, splE, tst

Продолжение таблицы 22

Сиквенс-тип	Биологический материал/ источник	Кол-во образцов	Спа-типирование	Гены, ассоциированные с факторами патогенности стафилококков
	мазок из зева	1	t223	aur, hlgA, hlgB, hlgC, lukD, lukE, sak, scn, sea, seg, sei, sem, sen, seo, seu, splA, splB, splE, tst
ST-30	содержимое абсцесса кожи	1	t021	aur, hlgA, hlgB, hlgC, lukF-PV, lukS-PV, sak, scn, seg, sei, sem, sen, seo, seu, splE
	кал	1	t021	aur, hlgA, hlgB, hlgC, sak, scn, sea, seg, sei, sem, sen, seo, seu, splE, tst
ST-5	отделяемое послеоперационной раны мягких тканей	1	t1062	aur, hlgA, hlgB, hlgC, lukD, lukE, sak, scn, seg, sei, sem, sen, seo, sep, seu, splA, splB, tst
ST7	протез клапана митральный	1	t091	aur, hlgA, hlgB, hlgC, lukD, lukE, sak, scn, sep, splA, splB, splE
ST-5555	содержимое флегмоны	1	t1544	aur, hlgA, hlgB, hlgC, lukD, lukE, sak, scn, seb, seg, sei, sem, sen, seo, seu, splA, splE

Среди изученных нами MRSA-штаммов были обнаружено 8 spa-типов: t008, t021, t091, t1062, t1544, t223, t4573, t12437. Spa-типирование обладает большей

разрешающей способностью по сравнению с MLST. В январе 2022 года международная база MLST насчитывает 7377 сиквенс-типов, а в базе spa-типов уже 20321 вариант. Внутри одного сиквенс-типа может быть несколько spa-типов. В нашей выборке из 20 изолятов *Staphylococcus aureus*, 6 относились к одному сиквенс-типу ST-22. Если ориентироваться только на результаты MLST, то можно предположить наличие эпидемиологической связи между образцами. Однако эти 6 изолятов относились к трем различным spa-типам (t223, t4573 и t12437). Кроме того, эти изоляты имеют разный профиль генов, ассоциированных с факторами патогенности стафилококков (рисунок 20) и разный плазмидный профиль (таблица 23). Таким образом, при изучении эпидемиологии стафилококков в пределах одного стационара ориентироваться только на данные MLST недостаточно. Необходимо использовать полногеномное секвенирование или комбинацию типизирующих методов. При этом MLST остается прекрасным инструментом для мониторинга стафилококковой инфекции в рамках глобального эпидемиологического надзора за данной инфекцией.

	aur	hlgA	hlgB	hlgC	sak	scn	seg	sei	sem	sen	seo	seu	tst	lukD	lukE	sea	splA	splB	spIE	lukF-PV	lukS-PV		
1	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■										
2	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■										
3	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■		
4	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■		
5	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■										
6	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■								■	■	

Рисунок 20 – профиль генов, ассоциированных с факторами патогенности стафилококков в образцах, относящихся к сиквенс-типу 22 (ST-22)

Наибольшее количество изученных изолятов *Staphylococcus aureus* (45%) относилось к 8 сиквенс-типу, spa типу t008 с SCCmec-кассетой IV типа. Определяющим признаком MRSA является стафилококковая кассета mec (SCCmec), расположенная на хромосоме. Это мобильный генетический элемент, содержащий детерминанту устойчивости к β -лактамам, - ген *tesA*. Появление

устойчивых к метициллину стафилококковых линий происходит из-за приобретения и вставки элемента SCCmec в хромосому восприимчивых штаммов. Элементы SCCmec систематизированы по типам в соответствии со структурной организацией и генетическому содержанию. Для всех секвенированных MRSA-штаммов была определена SCCmec-кассета IV типа, за исключением одного изолята, выделенного из содержимого абсцесса кожи. В этом случае была идентифицирована SCCmec-кассета V типа.

Таблица 23 – Плазмидный профиль и spa-типы образцов, относящихся к сиквенс-типу 22 (ST-22)

№ п/п	spa- тип	Плазмидный профиль
1	t12437	rep20_repA(SAP102A), rep5_rep(pMW2)
2	t12437	rep20_repA(SAP102A), rep5_rep(pMW2)
3	t223	rep20_repA(SAP102A), rep5_rep(pMW2), rep7_rep(MSSA476)
4	t223	rep20_repA(SAP102A), rep5_rep(pMW2), rep7_rep(MSSA476)
5	t223	-
6	t4573	rep21_rep(SAP101A)(94%), rep22_repB(pUB110)(99%), repUS5_CDS 20(pETB)

Важной мишенью для молекулярно-биологического мониторинга являются гены, ассоциированные с факторами патогенности стафилококков. Появление штаммов возбудителя, имеющих определенные острова патогенности, может быть ассоциировано с более тяжелыми эпидемиологическими последствиями. Возможно, некоторые клоны золотистого стафилококка более склонны вызывать инвазивное заболевание, чем другие, из-за наличия факторов патогенности стафилококков. Выявленный в нашем исследовании спектр генов, ассоциированных с факторами патогенности стафилококков, представлен в последнем столбце таблицы 22. Обнаружены изоляты с различными генами токсинов, в том числе 7 образцов с геном белка токсического шока (tst). Выявлено

2 изолята с геном, кодирующим цитотоксин – лейкоцидин Пантона – Валентайна (PVL). Оба обнаруженных изолята были метициллинрезистентными.

Особое эпидемиологическое значение имеют механизмы резистентности, кодируемые генами, которые расположены на мобильных генетических элементах. Было показано, что передача генов антибиотикорезистентности возможна не только внутри штаммов одного вида, но и между микроорганизмами разных видов [125]. Расположение генов антибиотикорезистентности на мобильных генетических элементах способствует их быстрому внутри- и межвидовому распространению. В связи с этим в первую очередь необходимо отслеживать наличие локусов антибиотикорезистентности, расположенных на мобильных генетических элементах. Выделенные изоляты золотистого стафилококка содержали различный плазмидный профиль и различный спектр локусов антибиотикорезистентности, представленный в таблице 24.

Таблица 24 – Плазмидный профиль изолятов *Staphylococcus aureus* и обнаруженные локусы антибиотикорезистентности

№ п/п	Обнаруженные плазмиды	Обнаруженные локусы антибиотикорезистентности
1	rep16_rep(Saa6159), rep5_rep(pMW2)	blaZ; mecA; dfrG
2	rep10_repL(pDLK1), rep13_rep(pKH13), rep7_ORF(pKH1), repUS21_rep(pWBG764)	erm(C); cat(pC194); tet(K)
3	rep10_repL(pDLK1), rep20_repA(pWBG753), rep7_rep(MSSA476), rep7_repD(pTZ4)	blaZ; mecA
4	rep10_repL(pDLK1), rep20_repA(pWBG753), rep7_rep(MSSA476), rep7_repD(pTZ4)	aac(6')-aph(2''); blaZ; mecA; erm(C); cat(pC221)

Продолжение таблицы 24

№ п/п	Обнаруженные плазмиды	Обнаруженные локусы антибиотикорезистентности
5	rep16_CDS6(pSJH101), rep16_unknown(pWBG759), rep19_repA(SAP019A), rep5_rep(pMW2)	blaZ
6	rep20_repA(SAP102A), rep5_rep(pMW2)	blaZ; mecA; lnu(A)
7	rep20_repA(SAP102A), rep5_rep(pMW2)	blaZ; mecA; lnu(A)
8	rep7_rep(MSSA476)	mecA
9	rep16_CDS6(pSJH101), rep16_unknown(pWBG759), rep19_repA(pWBG759)	blaZ
10	rep20_repA(SAP102A), rep5_rep(pMW2), rep7_rep(MSSA476)	blaZ; mecA
11	rep20_repA(SAP102A), rep5_rep(pMW2), rep7_rep(MSSA476)	blaZ; mecA
12	rep13_rep(pKH13), rep20_repA(pWBG753), rep7_rep(MSSA476)	aac(6')-aph(2''); blaZ; mecA; cat(pC194)
13	rep10_repL(pDLK1), rep20_repA(pWBG753), rep7_rep(MSSA476)	aac(6')-aph(2''); blaZ; mecA; erm(C)
14	rep10_repL(pDLK1), rep13_rep(pMC524/MBM), rep20_repA(pWBG753), rep7_rep(MSSA476)	aac(6')-aph(2''); blaZ; mecA; erm(C); cat(pC194)
15	rep10_repL(pDLK1), rep13_rep(pKH13), rep20_repA(pWBG753), rep7_rep(MSSA476)	aac(6')-aph(2''); blaZ, mecA; erm(C); cat(pC194)

Продолжение таблицы 24

№ п/п	Обнаруженные плазмиды	Обнаруженные локусы антибиотикорезистентности
16	rep10_repL(pDLK1), rep13_rep(pKH13), rep20_repA(pWBG753), rep7_rep(MSSA476)	aac(6')-aph(2"); blaZ; mecA; erm(C); cat(pC194)
17	rep10_repL(pDLK1), rep16_rep(Saa6159), rep5_rep(pMW2)	blaZ; erm(C)
18	-	blaZ; mecA
19	rep21_rep(SAP101A), rep22_repB(pUB110), repUS5_CDS20(pETB)	aac(6')-aph(2"); aadD; blaZ; mecA
20	rep15_repA(pLW043), rep7_rep(MSSA476)	mecA

15 метициллинрезистентных изолятов *Staphylococcus epidermidis* были выделены в двух медицинских учреждениях города Москвы (5 изолятов в многопрофильном стационаре и 10 в городской клинической больнице). Изоляты относились к семи различным сиквенс-типам: ST-2, ST-5, ST-22, ST-23, ST-59, ST-87 и ST-786.

Полногеномное секвенирование 5 изолятов *Staphylococcus epidermidis*, выделенных от пациентов многопрофильного стационара, показало, что изоляты относились к четырем различным сиквенс-типам: ST-2, ST-22, ST-59 и ST-786. Во всех изолятах был обнаружен ген *mecA* и ряд других локусов антибиотикорезистентности (таблица 25).

Таблица 25 – Характеристики изолятов *Staphylococcus epidermidis*, выделенных в многопрофильном стационаре города Москвы

Сиквенс-тип	Биологический материал/ источник	Локусы антибиотикорезистентности
ST-2	центральный венозный катетер	blaZ; mecA; fosB; aadD; cat(pC221)
ST-22	кровь из периферической вены	blaZ; mecA; fusB; mph(C); msr(A); aac(6')-aph(2"); ant(6)-Ia; aph(3')-III; fosB
ST-22	отделяемое послеоперационной раны мягких тканей	fusB; mph(C); msr(A); blaZ; mecA; aac(6')-aph(2"); ant(6)-Ia; aph(3')-III; fosB.
ST-786	кровь из периферической вены	blaZ; mecA; aac(6')-aph(2"); aadD; fosB; erm(C); lnu(A); cat(pC194); tet(K);
ST-59	Раневое отделяемое	aac(6')-aph(2"); aph(3')-III; cat(pC221); mph(C); msr(A); mecA; fosB

Все 10 изолятов *Staphylococcus epidermidis*, полученных из городской клинической больницы, были выделены из крови пациентов. Характеристики изолятов представлены в таблице 26.

Изучение эпидемиологии стафилококков необходимо не только для эффективного эпидемиологического надзора, но и для наблюдения за эволюцией вида. Молекулярное типирование незаменимо в контроле распространения потенциально высокопатогенных и устойчивых клонов. С появлением секвенирования нового поколения, повышенный интерес в клинической микробиологии вызывает типирование на основе полногеномного секвенирования.

Таблица 26 – Характеристики изолятов *Staphylococcus epidermidis*, выделенных из крови пациентов, в городской клинической больнице города Москвы

Сиквенс-тип	Обнаруженные плазмиды	Локусы антибиотикорезистентности
ST-5	rep20; rep21	erm(A), aac(6')-aph(2''), fosB, ant(9)-Ia, blaZ, mecA, erm(A), qacB
ST-5	rep10; rep20; rep21	aac(6')-aph(2''); erm(C); blaZ; qacB; fosB; mecA
ST-5	rep7a; rep22	mupA; aac(6')-aph(2''); msr(A); blaZ; mecA; dfrG; ant(9)-Ia; mph(C); aadD; qacB; fosD; fosB4; fosB; cat(pC221)
ST-5	rep7a; rep13; rep19c	aac(6')-aph(2''); msr(A); blaZ; mecA; fosB; fosD; mph(C); qacB; cat(pC221); lnu(A)
ST-87	rep21	erm(A), aac(6')-aph(2''), vga(A)V, fosB, ant(9)-Ia, blaZ, mecA, erm(A), fusB
ST-87	rep5d; rep7a; rep19c; rep21	msr(A); erm(A); fosD; fosB; vga(B); vga(A)V; vat(B); aac(6')-aph(2''); ant(9)-Ia; blaZ; mecA; mph(C); cat(pC221); fusB
ST-87	rep5d; rep19c; rep21	aac(6')-aph(2''); erm(A); msr(A); blaZ; mecA; fexA; cfr; qacA; fosB; fosD; vga(A)V; vga(B); mph(C); vat(B); ant(9)-Ia; fusB
ST-2	rep10; rep22; repUS23; repUS46	aac(6')-aph(2''); erm(C); blaZ; mecA; qacA4; fosB; qacA4; bleO; erm(C); aadD

Продолжение таблицы 26

Сиквенс-тип	Обнаруженные плазмиды	Локусы антибиотикорезистентности
ST-22	rep5d; rep13; rep15; rep19c	msr(A); ant(6)-Ia; aac(6')-aph(2"); aph(3')-III; fosB; fosD; msr(A); mph(C); blaZ; mecA; fusB; qacA
ST-23	rep7a; rep21; rep22; rep39	aadD; mecA; msr(A); mph(C); tet(K); qacB; ant(9)-Ia; bleO; erm(A); fosB; aac(6')-aph(2"); cat(pC221)

В нашем исследовании наибольшее количество изученных изолятов *Staphylococcus aureus* (45%) относилось к 8 сиквенс-типу, spa типу t008 с SCCmec-кассетой IV типа. Это согласуется с литературными данными. *Staphylococcus aureus* ST-8, spa тип t008 широко распространен в России и во всем мире [28]. Исследование 62 MRSA-изолятов в 2002-2006 году, выделенных от хирургических больных клиник г. Москвы, показало, что более 80% изолятов относились к ST-8 с IV типом SCCmec кассеты [16]. Зарегистрирован случай смерти от внебольничного метициллинрезистентного *S. aureus* ST8/SCCmecIV [68].

Особое внимание вызывает анализ течения инфекционных осложнений, связанных с определенными сиквенс-типами, или наличием того или иного гена, ассоциированного с факторами патогенности. Известно, что PVL способен вызывать тканевый некроз и тяжелую некротизирующую пневмонию [100,120]. В нашем исследовании были обнаружены 2 изолята с геном, кодирующим PVL. Особое опасение вызывает тот факт, что эти штаммы являлись метициллинрезистентными. Учитывая данные об ассоциации штаммов PVL с некротизирующей пневмонией, необходимо проведение мероприятий, направленных на ограничение распространения подобных форм метициллинрезистентных стафилококков. Данных, полученных в результате наших экспериментов на сегодня, недостаточно для связи определенных сиквенс-типов метициллинрезистентных штаммов стафилококков или наличия

определенных генов факторов патогенности с тяжестью течения инфекционных осложнений. Однако созданная база с данными по молекулярно-биологическим характеристикам выделенных штаммов может служить вспомогательным инструментом для проведения дальнейших эпидемиологических исследований.

На основании мониторинга метициллинрезистентных штаммов стафилококка можно сделать следующие выводы:

1. ДНК метициллинрезистентных стафилококков была выявлена в 8,23% образцов крови от пациентов с признаками инфекции (95% ДИ: 6,33-10,63).
2. Изученные изоляты *Staphylococcus aureus* относились к 6 различным сиквенс-типам (ST-5 (5%), ST-7 (5%), ST-8 (45%), ST-22 (30%), ST-30 (10%) и ST-5555 (5%)) и 8 spa-типам (t008 (45%), t021 (10%), t091 (5%), t1062 (5%), t12437 (10%), t1544 (5%), t223 (15%), t4573 (5%)). В результате мониторинга обнаружен изолят с новым аллельным профилем. На сегодня ему присвоен номер ST5555. Преобладающим типом стафилококковой кассеты mec была SCCmec-кассета IV типа (75%).
3. Обнаружены изоляты с различным профилем генов стафилококковых энтеротоксинов, в том числе с генами белков, ассоциированных с синдромом токсического шока и некротизирующей пневмонией.
4. Изученные изоляты *Staphylococcus epidermidis* относились к 7 сиквенс-типам (ST-2 (13,3%), ST-5 (26,7%), ST-22 (20%), ST-23 (6,7%), ST-59 (6,7%), ST-87 (20%), и ST-786 (6,7%)).
5. При изучении эпидемиологии стафилококков в пределах одного стационара ориентироваться только на данные MLST недостаточно. Необходимо использовать полногеномное секвенирование или комбинацию методов для типирования.

Таким образом, в период мониторинга метициллинрезистентных штаммов стафилококка с помощью молекулярно-биологических методов, ДНК метициллинрезистентных коагулазонегативных стафилококков выявлялась чаще, чем ДНК MRSA. В течение года в одном из стационаров циркулировали как минимум 6 различных сиквенс-типов и 8 spa-типов *Staphylococcus aureus* и 4 сиквенс-типа *Staphylococcus epidermidis*, в другом как минимум 5 сиквенс-типов *Staphylococcus epidermidis* что говорит о гетерогенной эпидемиологической

картине. Обнаружены метициллинрезистентные золотистые стафилококки с генетическими детерминантами, являющимися маркером патогенности клинических изолятов. В связи с высокой частотой обнаружения ДНК метициллинрезистентных штаммов и выявлением эпидемиологически значимых генетических линий стафилококков, необходимо проведение регулярного мониторинга и внедрение современных молекулярно-биологических методов для быстрой и точной идентификации устойчивых к антибактериальным препаратам микроорганизмов.

6.2 Проведение смывов на наличие метициллинрезистентных стафилококков в стационарах города Москвы с помощью молекулярно-биологических методов

При проведении смывов с объектов внутрибольничной среды классическим бактериологическим методом эпидемиологическая обстановка кажется относительно благополучной, однако при использовании молекулярно-биологических методов выявляются признаки колонизации микроорганизмами объектов внутрибольничной среды.

Было проведено исследование смывов (n=330) с медицинского оборудования, инструментария, инвентаря и объектов внутрибольничной среды в трех медицинских учреждениях города Москвы – многопрофильном стационаре (далее стационар) (n=250), военном клиническом госпитале (далее госпиталь) (n=80) и городской клинической больнице (далее больница) (n=100).

В стационаре было проведено исследование смывов (n=250) с медицинского оборудования, инструментария, инвентаря и объектов внутрибольничной среды отделений реанимации и интенсивной терапии (99 смывов), гематологии (63 смыва) и хирургических отделений (88 смывов) (таблица 27).

Таблица 27 – Результаты ПЦР-исследования смывов в стационаре

Отделение	Кол-во забранных образцов	Обнаружена ДНК MRSA, %	Обнаружена ДНК MRCoNS, %	Всего ДНК mecA, %
Гематология	63	1,6	36,5	38,1
ОРИТ	99	7,1	49,5	56,6
Хирургическое отделение	88	1,1	28,4	29,5
Всего	250	3,6	38,8	42,4

ДНК MRSA была обнаружена на мембране фонендоскопа, клавиатуре компьютера, на телефонном аппарате, на ручке крана, на смывах с выключателя, кушетки и прикроватной тумбочки.

Результаты ПЦР-исследования показали, что ДНК метициллинрезистентных коагулазонегативных стафилококков в образцах смывов выявлялись гораздо чаще, чем ДНК MRSA ($p < 0,001$). ДНК метициллинрезистентных стафилококков была выявлена в 106 (42,4%) образцах смывов из 250 (из них только в 9 (3,6%) – ДНК MRSA, в 97 (38,8%) – ДНК метициллинрезистентных коагулазонегативных стафилококков). ДНК метициллинрезистентных стафилококков в смывах с объектов внутрибольничной среды выявляли чаще ($p < 0,001$) в отделениях реанимации и интенсивной терапии (в 56,6% образцов смывов) по сравнению с отделением гематологии (в 38,1% образцов смывов) и хирургическими отделениями (в 29,5% образцов смывов).

В госпитале было проведено исследование смывов с медицинского оборудования, инструментария, инвентаря и других объектов внутрибольничной среды ($n=64$) в четырех отделениях ОРИТ (таблица 28).

Таблица 28 – Результаты ПЦР-исследования смывов в госпитале

Отделение	Кол-во забранных образцов	Обнаружена ДНК MRSA, %	Обнаружена ДНК MRCoNS, %	Обнаружена ДНК mecA, %
ОРИТ 1	20	20,0	50,0	70,0
ОРИТ 2	20	15,0	65,0	80,0
ОРИТ 3	24	0,0	54,2	54,2
ОРИТ 4	16	6,3	62,5	68,8
Всего	80	10,0	57,5	67,5

ДНК MRSA была обнаружена в 10% смывов (на смывах с кушетки, подлокотнике стула, балканской раме и колесах кушеток). ДНК метициллинрезистентных коагулазонегативных стафилококков обнаруживалась в 57,5% образцов, включая смывы с кнопок аппарата ИВЛ, матрасов, полок холодильника и ручки лотка для шприцов. Таким образом метициллинрезистентные стафилококки обнаруживались в 67,5% смывов, забранных в госпитале.

В больнице было проведено исследование смывов с медицинского оборудования, инструментария, инвентаря и других объектов внутрибольничной среды (n=100) в четырех отделениях ОРИТ (таблица 29).

Таблица 29 – Результаты ПЦР-исследования смывов в больнице

Отделение	Кол-во забранных образцов	Обнаружена ДНК MRSA	Обнаружена ДНК MRCoNS	Обнаружена ДНК mecA
ОРИТ 1	10	0,0	0,0	0,0
ОРИТ 2	40	0,0	5,0	5,0
ОРИТ 3	35	2,9	0,0	2,9
ОРИТ 4	15	0,0	0,0	0,0
Всего	100	1,0	2,0	3,0

В результате проведенных смывов в больнице ДНК метициллинрезистентных штаммов была обнаружена в 3% образцов. ДНК метициллинрезистентных стафилококков обнаружена на кнопках управления

аппаратом ИВЛ, на манжете для измерения артериального давления и смыве с силиконового шланга для санации.

Суммируя данные по смывам, забранным в трех медицинских учреждениях города Москвы, оказалось, что метициллинрезистентные стафилококки в среднем выявляются в 37,9% смывов с объектов внутрибольничной среды (таблица 30).

Таблица 30 – Результаты ПЦР-исследования смывов с объектов внутрибольничной среды в трех медицинских учреждениях города Москвы

Результаты ПЦР-исследования смывов с объектов внутрибольничной среды (n=430)		95% ДИ
Обнаружена ДНК MRSA, %	4,2	2,66-6,52
Обнаружена ДНК MRCoNS, %	33,7	29,41-38,32
Обнаружено всего метициллинрезистентных стафилококков, %	37,9	33,45-42,58

ДНК MRSA была обнаружена в 4,2% смывов на подлокотнике стула, балканской раме, колесах кушеток, мембране фонендоскопа, клавиатуре компьютера, телефонном аппарате, ручке крана, на смывах с выключателя, кушетки и прикроватной тумбочки (рисунок 21).

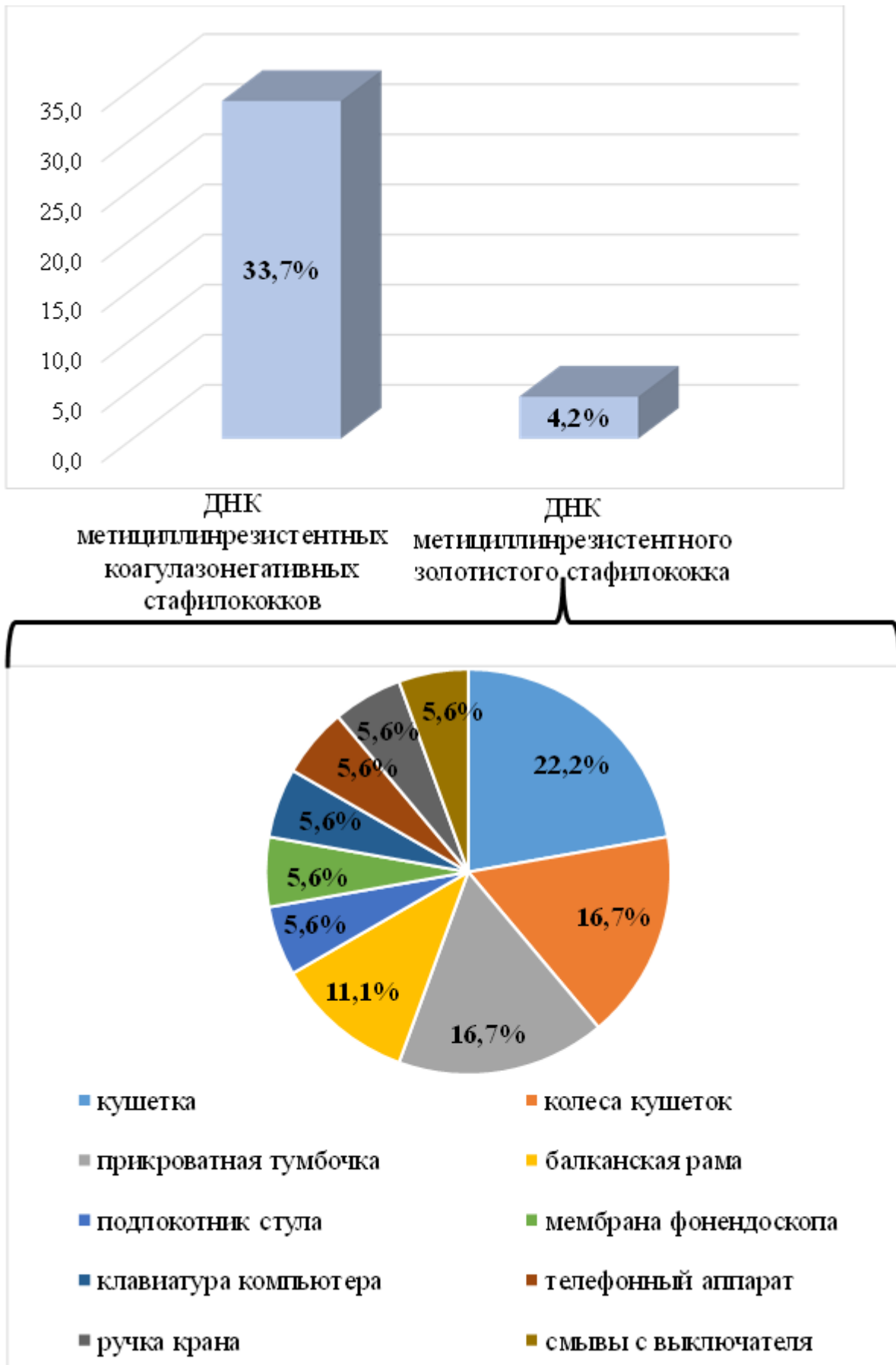


Рисунок 21 – Результаты ПЦР-исследования смывов с объектов внутрибольничной среды в трех медицинских учреждениях города Москвы

Таким образом, проведение смывов с объектов внутрибольничной среды с помощью метода ПЦР является быстрым и удобным способом выявления метициллинрезистентных стафилококков, позволяющим получить эпидемиологически значимую информацию для планирования профилактических мероприятий и контроля их эффективности. На основании проведенных смывов на наличие метициллинрезистентных стафилококков в трех медицинских учреждениях города Москвы с помощью молекулярно-биологических методов можно сделать следующие выводы:

1. ДНК метициллинрезистентных стафилококков в среднем была выявлена в более чем трети (37,9%) из всех забранных смывов с объектов внутрибольничной среды. Из них ДНК MRSA только в 4,2% образцов смывов, а ДНК метициллинрезистентных коагулазонегативных стафилококков в 33,7% смывов.
2. Результаты ПЦР-исследования образцов смывов в стационаре показали, что ДНК метициллинрезистентных стафилококков выявляли чаще в отделениях реанимации и интенсивной терапии по сравнению с отделением гематологии и хирургическими отделениями ($p < 0,001$).
3. ДНК метициллинрезистентных коагулазонегативных стафилококков в образцах смывов выявлялись гораздо чаще, чем ДНК метициллинрезистентного золотистого стафилококка ($p < 0,0001$)

6.3 Обследование пациентов в отделениях реанимации и интенсивной терапии

Для изучения процесса колонизации пациентов метициллинрезистентными штаммами во внутрибольничной среде было проведено небольшое исследование в отделениях реанимации двух клинических больниц города Москвы.

Было обследовано 27 пациентов в динамике (при поступлении в отделение реанимации и интенсивной терапии, через 5-7 дней после поступления и на 10-12 день). Возраст пациентов: от 22 до 81 года. Выделение ДНК и последующая ПЦР

проводилась из образцов крови, мочи и мазков из ротоглотки. Результаты обследования представлены в таблице 31.

Таблица 31 – Выявление ДНК метициллинрезистентных штаммов в клиническом материале методом ПЦР в разные периоды обследования пациентов

Исследуемый материал	Количество ДНК метициллинрезистентных штаммов, %		
	1-3 день	5-7 день	10-12 день
плазма крови	0	8,3	0
клетки крови	0	8,3	0
моча	11,1	25	60
мазок из ротоглотки	48	100	100

Оказалось, что уже на 5-7 день у всех пациентов выявлялась ДНК метициллинрезистентных штаммов в мазках из ротоглотки, а у 25% пациентов ДНК метициллинрезистентных штаммов выявлялась в моче. На 10-12 день ДНК метициллинрезистентных штаммов выявлялась в 100% в мазках из ротоглотки и в 60% образцов мочи. Кроме того, наблюдалось увеличение концентрации метициллинрезистентных стафилококков в мазках из ротоглотки.

В качестве примера мы решили привести данные результатов ПЦР по выявлению ДНК метициллинрезистентных стафилококков в мазках из ротоглотки у двух пациентов (рисунок 22 и рисунок 23).

Пример 1. Больной, 72 года. Политравма. Обстоятельства: автотравма лоб в лоб. На ИВЛ с 4-го дня. На 5-й день пребывания в стационаре на рентгене признаки пневмонии. Назначаемые антибиотики: зинацеф, максипим и сульперазон. Во время первого забора в отделяемом ротоглотки ДНК метициллинрезистентных

стафилококков не определялась. Но уже на пятый день концентрация ДНК метициллинрезистентных стафилококков составляла 6,1 lg копий/мл (рисунок 22).

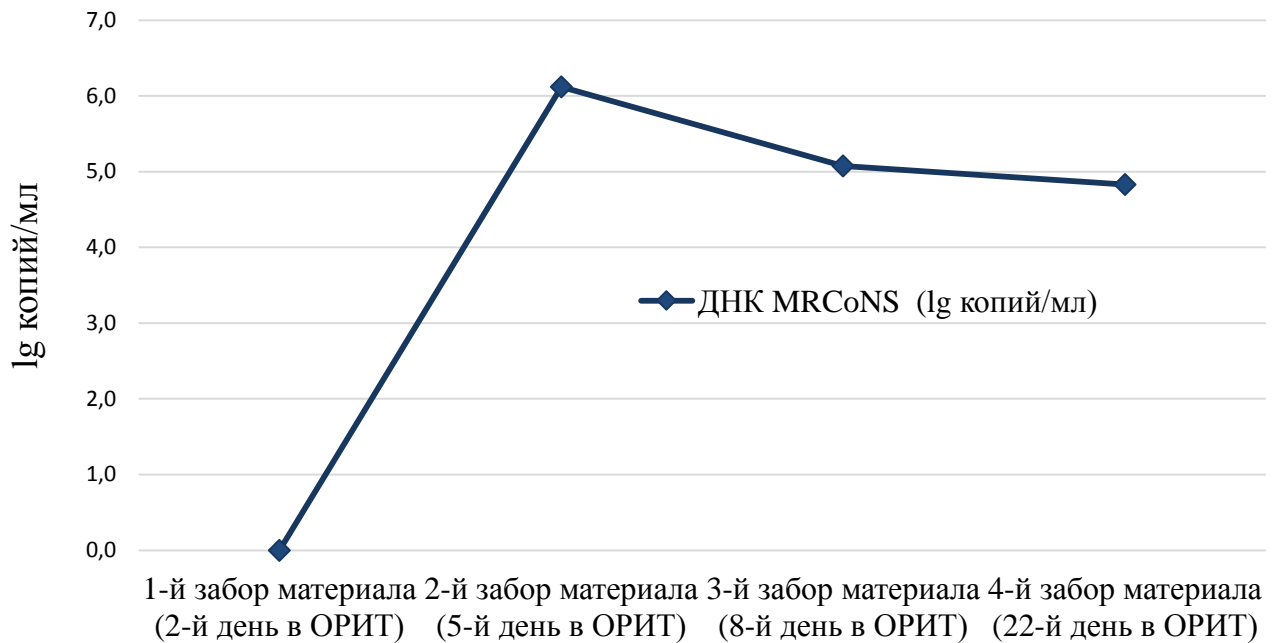


Рисунок 22 – Динамические лабораторные исследования от одного пациента.

Пример 1

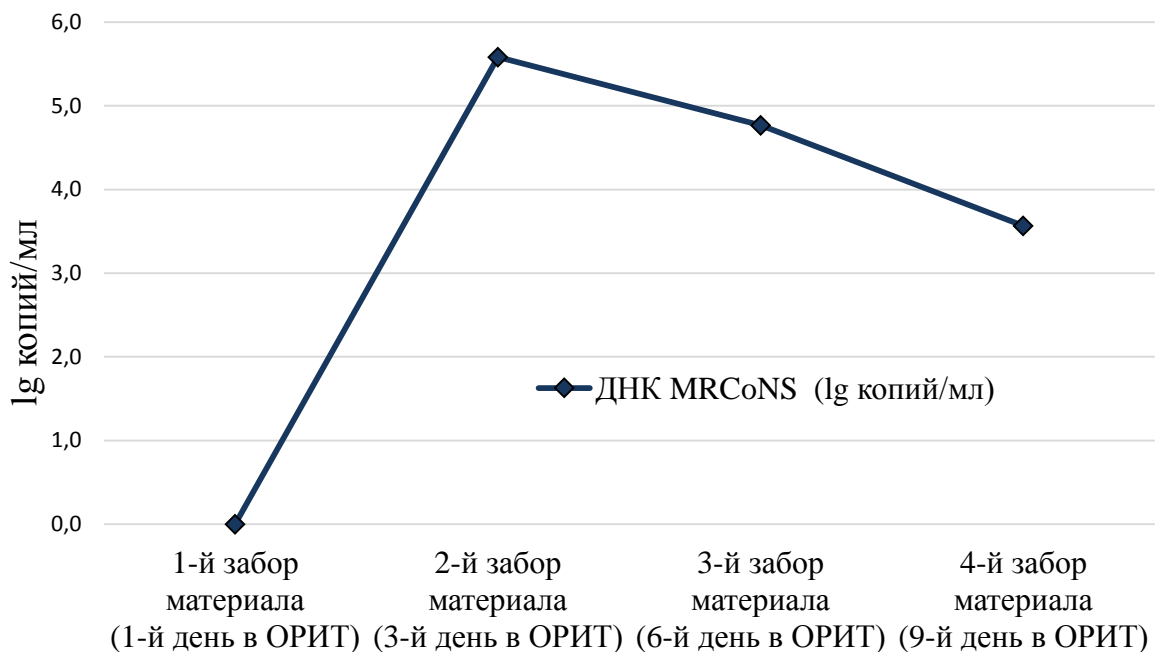


Рисунок 23 – Динамические лабораторные исследования от одного пациента

Пример 2

Пример 2. Больная, 22 года. Диагноз: тяжелая сочетанная травма. Ушиб головного мозга тяжелой степени. Обстоятельства: упала с мотоцикла. ИВЛ с первого дня. Антибиотики: ципрофлоксацин/цефотаксим. Во время первого забора в отделяемом ротоглотки ДНК метициллинрезистентных стафилококков не определялась. Но уже на третий день концентрация ДНК метициллинрезистентных стафилококков в отделяемом ротоглотки составляла 5,6 lg копий/мл (рисунок 23).

На примере этих двух пациентов мы видим, что в момент поступления в отделение реанимации и интенсивной терапии, в отделяемом ротоглотки метициллинрезистентные коагулазонегативные стафилококки не обнаруживаются. Но уже ко второму забору материала концентрация ДНК метициллинрезистентных стафилококков составляет более 5 lg копий/мл.

Таким образом, при широком применении антибактериальных препаратов на ограниченном пространстве стационаров реальные преимущества для размножения получают микроорганизмы, обладающие природной или приобретенной резистентностью, в частности метициллинрезистентные стафилококки. В результате повышение уровня ДНК «проблемных» микроорганизмов усугубляет и так тяжелое состояние пациентов. Пациенты с госпитальными штаммами, выписанные из реанимации домой, могут являться источником вторичного заражения при контакте со своими близкими.

6.4 Обследование пациентов с муковисцидозом

Общеизвестно, что одним из наиболее частых обнаруживаемых при муковисцидозе микроорганизмов, кроме *Pseudomonas aeruginosa*, является *Staphylococcus aureus*. Пациентам с муковисцидозом постоянно требуется врачебный контроль, обращения в медицинские учреждения, в связи с чем высок риск инфицирования метициллинрезистентными штаммами. Кроме того, прием антибактериальных препаратов при обострении бронхолегочного процесса, с целью профилактики при вирусных инфекциях респираторного тракта и для постоянного контроля за хронической грамотрицательной инфекцией, дает

преимущество для размножения устойчивых микроорганизмов [29]. В нашем исследовании была проведена оценка распространенности генетических локусов антибиотикорезистентности в микробиоме отделяемого ротоглотки у детей с муковисцидозом. В соответствии с руководством EUCAST по выявлению механизмов резистентности и резистентности, имеющей особое клиническое и/или эпидемиологическое значение, наличие некоторых механизмов устойчивости не всегда автоматически предполагает его клиническую устойчивость. Это может быть связано с отсутствием экспрессии механизма или экспрессией низкого уровня, который не приводит к фенотипическому проявлению резистентности [65]. Поэтому выявление генетических локусов антибиотикорезистентности имеет эпидемиологическое значение, но не всегда является обязательным для клинических целей. Однако, показана высокая согласованность между фенотипической и прогнозируемой чувствительностью к противомикробным препаратам, определяемой по результатам секвенирования [71].

Целью нашего исследования было сравнение частоты выявления детерминант антибиотикорезистентности в отделяемом ротоглотки у детей, больных муковисцидозом, и условно-здоровых детей, с помощью молекулярно-биологических методов.

Проведено ПЦР-исследование мазков со слизистой оболочки ротоглотки от 100 детей, больных муковисцидозом в возрасте от 4 до 18 лет (средний возраст $12,0 \pm 4,2$ года, медиана - 12) и 100 детей из контрольной группы возрастом от 3 до 17 лет (средний возраст $13,4 \pm 2,9$ лет, медиана - 14). Контрольная группа обладала сходными возрастными характеристиками с группой детей, больных муковисцидозом. Забор биоматериала проводился в период с ноября 2021 по август 2022 года.

Методом ПЦР в режиме реального времени проводился анализ на наличие генов металло- β -лактамаз групп VIM, IMP и NDM, генов карбапенемаз групп KPC и OXA-48, генов БЛРС группы CTX-M и гена *tesA*. В результате было обнаружено 33 локуса антибиотикорезистентности у 28 детей, больных муковисцидозом (у 3 детей было обнаружено по 2 локуса антибиотикорезистентности, у 1 ребенка – 3

локуса антибиотикорезистентности) и 1 locus антибиотикорезистентности в отделяемом ротоглотки у 1 ребенка из контрольной группы (таблица 32).

Таблица 32 – Сравнение результатов ПЦР по выявлению локусов антибиотикорезистентности в отделяемом ротоглотки у детей, больных муковисцидозом, и условно-здоровых детей (контрольная группа)

Результаты выявления локусов антибиотикорезистентности в отделяемом ротоглотки	Дети, больные муковисцидозом	Контрольная группа	p
ДНК генов металло-β-лактамаз группы VIM, %	5	0	0,059
ДНК генов металло-β-лактамаз группы NDM, %	2	0	0,497
ДНК генов карбапенемаз группы ОХА-48-подобных, %	3	0	0,246
ДНК генов бета-лактамаз расширенного спектра группы СТХ-М, %	15	0	<0,001*
ДНК генов <i>tesA</i> , %	8	1	0,035*

* - различия показателей статистически значимы ($p < 0,05$)

В группе условно-здоровых детей в отделяемом ротоглотки не было обнаружено генов металло-β-лактамаз групп VIM, IMP и NDM, генов карбапенемаз групп KPC и ОХА-48 и генов БЛРС группы СТХ-М. Только у одного ребенка из контрольной группы (1%) был обнаружен ген *tesA*, причем в низкой концентрации – 700 копий/мл. Для сравнения средняя концентрация ДНК гена *tesA*, обнаруженного в отделяемом ротоглотки в группе детей, больных муковисцидозом, составила 172113 копий ДНК на мл образца, а медиана – 25600 копий/мл.

В группе детей, больных муковисцидозом, в отделяемом ротоглотки не было обнаружено генов металло-β-лактамаз групп IMP и генов карбапенемаз групп KPC.

ДНК генов металло- β -лактамаз группы VIM была обнаружена у 5% детей, больных муковисцидозом, ДНК генов металло- β -лактамаз группы NDM – у 2% детей, ДНК генов карбапенемаз группы OXA-48-подобных – у 3% детей, ДНК генов бета-лактамаз расширенного спектра группы CTX-M – у 15% детей, а ДНК гена *tesA* – у 8% детей, больных муковисцидозом. У детей, больных муковисцидозом, статистически значимо чаще выявляли ДНК генов бета-лактамаз расширенного спектра группы CTX-M ($p < 0,001$) и ДНК генов *tesA* ($p = 0,035$) по сравнению с детьми из условно-здоровой группы. Шансы встречаемости бета-лактамаз расширенного спектра группы CTX-M в отделяемом ротоглотки среди детей, больных муковисцидозом, в 36,4 раза выше, чем среди здоровых детей (95% ДИ: 2,1-618,1). Шансы встречаемости метициллинрезистентных штаммов в отделяемом ротоглотки среди детей, больных муковисцидозом, в 8,6 раз выше, чем среди здоровых детей (95% ДИ: 1,1-70,2). Дети, больные муковисцидозом, относятся к группе высокого риска инфицирования метициллинрезистентными штаммами стафилококка и микроорганизмами с бета-лактамазами расширенного спектра действия группы CTX-M.

У детей, больных муковисцидозом, статистически значимо чаще выявлялись детерминанты антибиотикорезистентности в отделяемом ротоглотки по сравнению со здоровыми детьми ($p < 0,001$). Шансы наличия локусов антибиотикорезистентности в отделяемом ротоглотки среди детей, больных муковисцидозом, в 38,5 раз выше, чем среди здоровых детей

ДНК метициллинрезистентных стафилококков в отделяемом ротоглотки была обнаружена у 8 детей больных муковисцидозом (8%) в концентрации от 2,3 до 5,9 Ig копий ДНК на мл образца (рисунок 24). Средняя концентрация ДНК метициллинрезистентных стафилококков в отделяемом ротоглотки у больных муковисцидозом составляла 172113 копий ДНК на мл образца, медиана – 25600. Данная выборка пациентов – это больные, находящиеся на амбулаторном лечении. Поэтому наличие ДНК метициллинрезистентных стафилококков аж у 8% обследуемых является тревожным фактором. Такой высокий процент метициллинрезистентных стафилококков у детей с муковисцидозом может быть

причиной неэффективности антибактериальной терапии. Кроме того, существует высокий риск распространения метициллинрезистентных штаммов вне медицинских учреждений. ДНК метициллинрезистентных стафилококков в отделяемом ротоглотки в контрольной группе была обнаружена только у одного ребенка в концентрации 700 копий ДНК на мл образца. У детей, больных муковисцидозом, статистически значимо чаще выявлялась ДНК метициллинрезистентных стафилококков в отделяемом ротоглотки по сравнению со здоровыми детьми ($p < 0,035$). Шансы встречаемости метициллинрезистентных штаммов в отделяемом ротоглотки среди детей, больных муковисцидозом, в 8,6 раз выше, чем у здоровых детей.

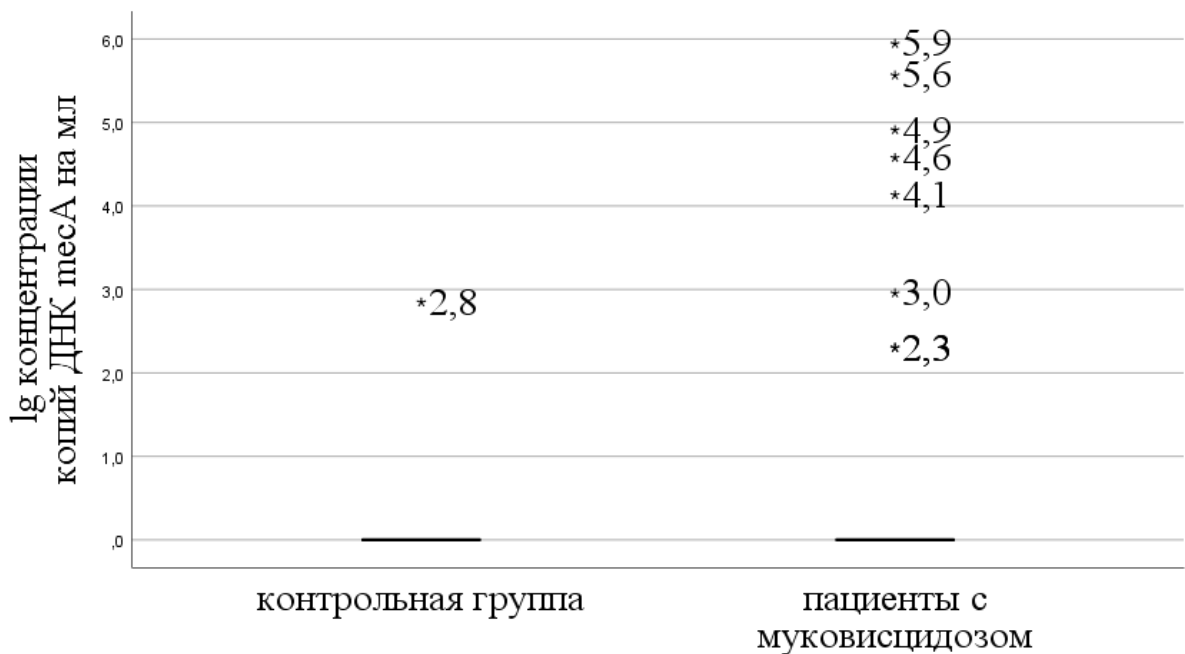


Рисунок 24 – Концентрация ДНК метициллинрезистентных стафилококков в отделяемом ротоглотки (lg копий ДНК на мл)

У детей, больных муковисцидозом, статистически значимо чаще выявлялась ДНК метициллинрезистентных стафилококков в отделяемом ротоглотки по сравнению со здоровыми детьми ($p < 0,035$). Шансы встречаемости метициллинрезистентных штаммов в отделяемом ротоглотки среди детей, больных муковисцидозом, в 8,6 раз выше, чем среди здоровых детей. В связи с опасностью широкого распространения антибиотикорезистентных микроорганизмов,

необходимо внедрение новых методов для быстрого и эффективного выявления наиболее значимых маркеров антибиотикорезистентности. Молекулярно-биологические и традиционные бактериологические методы должны дополнять друг друга. Дети, больные муковисцидозом, относятся к группе высокого риска инфицирования метициллинрезистентными штаммами стафилококка. В связи с высокой встречаемостью в микробиоме отделяемого ротоглотки больных муковисцидозом генетических локусов, обуславливающих механизмы резистентности, которые имеют особое клиническое и/или эпидемиологическое значение, и высоким риском распространения антибиотикорезистентных штаммов вне медицинских учреждений, необходимо включение этой группы пациентов в регулярный эпидемиологический мониторинг.

Таким образом, с помощью разработанного набора реагентов для выявления метициллинрезистентных стафилококков был проведен эпидемиологический мониторинг в нескольких медицинских учреждениях города Москвы. Частота выявления ДНК метициллинрезистентных стафилококков в крови пациентов с признаками инфекции в течение трех лет статистически значимо не отличалась и в среднем составила 8,23% (95% ДИ: 6,33-10,63). При этом ДНК метициллинрезистентного *Staphylococcus aureus* была обнаружена в 17,3% случаев, а ДНК метициллинрезистентных коагулазонегативных стафилококков в 82,7% случаев. ДНК метициллинрезистентных коагулазонегативных стафилококков выявлялась статистически значимо чаще по сравнению с ДНК MRSA и в крови пациентов ($p < 0,0001$), и в смывах с объектов внутрибольничной среды ($p < 0,0001$).

В смывах с объектов внутрибольничной среды ДНК MRSA была обнаружена в 4,2% образцов, в то время как ДНК метициллинрезистентных коагулазонегативных стафилококков в 33,7% смывов. При этом ДНК метициллинрезистентных стафилококков выявляли чаще в отделениях реанимации и интенсивной терапии по сравнению с отделением гематологии и хирургическими отделениями ($p < 0,001$).

Преобладающим типом стафилококковой кассеты mec была SCCmec-кассета IV типа (75%). В период мониторинга были обнаружены изоляты с различными

генами токсинов, в том числе с геном белка токсического шока (tst) и с геном, кодирующим лейкоцидин Пантона – Валентайна (PVL). Обнаружен изолят с новым аллельным профилем (ST5555).

Было показано, что дети, больные муковисцидозом, относятся к группе высокого риска инфицирования метициллинрезистентными штаммами стафилококка. У детей, больных муковисцидозом, статистически значимо чаще выявляли ДНК генов *mecA* ($p=0,035$) по сравнению с детьми из условно-здоровой группы.

В результате проведенного эпидемиологического мониторинга за инфекциями, обусловленными метициллинрезистентными штаммами стафилококков с помощью молекулярно-биологических методов была создана база данных «Эпидемиологический мониторинг за инфекциями, обусловленными метициллинрезистентными штаммами *Staphylococcus spp.*». Была подана заявка № 2022620260 от 21 февраля 2022 года на государственную регистрацию базы данных. По заявке получено свидетельство о государственной регистрации базы данных № 2022620579. Дата государственной регистрации в Реестре баз данных – 17 марта 2022 года.

ГЛАВА 7. СОВЕРШЕНСТВОВАНИЕ СИСТЕМЫ ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКОГО МОНИТОРИНГА НА ОСНОВЕ МОЛЕКУЛЯРНО-БИОЛОГИЧЕСКИХ МЕТОДОВ ЗА ИНФЕКЦИЯМИ, ОБУСЛОВЛЕННЫМИ МЕТИЦИЛЛИНРЕЗИСТЕНТНЫМИ ШТАММАМИ СТАФИЛОКОККА

ВОЗ включила проблему резистентности к антибиотикам в одну из десяти угроз общественному здравоохранению. Эта проблема была сформулирована, как одна из основных в пятилетней (13-ой по счету) глобальной программе в области здравоохранения, рассчитанной на 2019-2023 годы. В момент принятия программы было еще неизвестно, что человечество столкнется с новой коронавирусной инфекцией (COVID-19). Однако проблема антибиотикорезистентности не потеряла первостепенной актуальности в этот период. Во время пандемии госпитализированные пациенты подвергались риску инфицирования антибиотикорезистентными внутрибольничными штаммами и связанными с ними возможными осложнениями. Массовое нерациональное использование антибиотиков в домашних условиях и в условиях медицинских учреждений, усугубившееся вследствие пандемии COVID-19, привело к ускоренному распространению устойчивости к противомикробным препаратам. В связи с этим особенно актуальным становится совершенствование системы эпидемиологического мониторинга за антибиотикорезистентными штаммами с использованием молекулярно-биологических методов. Мониторинг за метициллинрезистентными штаммами стафилококка необходим для получения информации, необходимой для планирования и проведения профилактических мероприятий и стратегий на любом уровне.

Снижение распространенности инфекций кровотока, вызванных метициллинрезистентным золотистым стафилококком, включено ВОЗ в основной перечень рекомендованных показателей достижения цели сокращения распространенности и снижения темпов формирования устойчивости в документе

«Мониторинг и оценка выполнения глобального плана действий по борьбе с устойчивостью к противомикробным препаратам» [126]. Использование ПЦР в режиме реального времени даст возможность существенно повысить выявляемость метициллинрезистентных штаммов стафилококка по сравнению с обнаруживаемостью традиционными микробиологическими методами и, таким образом, увеличить эффективность эпидемиологического мониторинга. Поскольку одной из задач эпидемиологического надзора является элиминация метициллинрезистентного золотистого стафилококка, его своевременная идентификация в перспективе позволит снизить заболеваемость за счет направленной профилактики и оптимизации применения противомикробных препаратов. Поскольку различия между результатами, полученными с помощью бактериологического метода и метода ПЦР, демонстрируют, что использование только посева может упустить наличие метициллинрезистентных стафилококков в биологическом материале, то необходимо внедрение метода ПЦР.

Эпидемиологический мониторинг является важнейшей составляющей надзора за ИСМП, позволяющий проводить целенаправленные профилактические мероприятия и диагностику ИСМП. Результаты мониторинга служат основой для разработки рациональной стратегии и тактики применения антимикробных и дезинфицирующих препаратов в каждой медицинской организации, а также проведения санитарно-эпидемиологических мероприятий. Целью проведения микробиологического мониторинга является получение информации, необходимой для разработки и внедрения более эффективных подходов к лечению и профилактике ИСМП, сдерживанию появления и распространения устойчивости микроорганизмов к антимикробным препаратам. В целях повышения информативности мониторинга необходимо использование молекулярно-биологических методов исследования в дополнение к культуральным методам. На основе молекулярно-биологического мониторинга будет усовершенствована информационная подсистема эпидемиологического надзора за стафилококковыми инфекциями.

Для совершенствования системы эпидемиологического мониторинга за

инфекциями, обусловленными метициллинрезистентными штаммами стафилококка, на основе молекулярно-биологических методов, необходимо:

1. внедрение молекулярно-биологических методов для мониторинга инфекций пациентов (обследование пациентов по клиническим показаниям и из групп риска);
2. мониторинг внутрибольничной среды с помощью молекулярно-биологических методов (плановое обследование объектов окружающей среды и внеплановое при проведении локальных эпидемиологических расследований);
3. создание референс-лабораторий для проведения полногеномного секвенирования и контроля за распространением потенциально высокопатогенных и устойчивых клонов (рисунок 25).

Категории пациентов, относящихся к группам высокого риска по присоединению метициллинрезистентной стафилококковой инфекции:

- пациенты отделений реанимации и интенсивной терапии;
- пациенты ожоговых и хирургических отделений;
- пациенты с длительной госпитализацией;
- пациенты с травмами и ранами (открытые повреждённые участки);
- пациенты с установленными центральными венозными катетерами;
- находящиеся на длительной антибиотикотерапии или после множественных курсов антибактериальных препаратов;
- находившиеся в близком контакте с пациентами, инфицированными MRSA;
- на гемодиализе;
- с иммунодефицитными состояниями.

К группе высокого риска необходимо отнести и больных муковисцидозом. В связи с высокой встречаемостью метициллинрезистентной стафилококков у больных муковисцидозом (8% в нашем исследовании), мы считаем необходимым включение этой группы пациентов в регулярный эпидемиологический мониторинг за инфекциями, обусловленными метициллинрезистентными штаммами.



Рисунок 25 – Совершенствование системы эпидемиологического мониторинга за инфекциями, обусловленными метициллинрезистентными штаммами стафилококка на основе молекулярно-биологических методов

При обработке результатов в рамках годового мониторинга (один календарный год) необходимо удалять дублирующие данные (повторные результаты исследования биологического материала одного вида микроорганизма от одного и того же больного). Однако в результаты мониторинга могут включаться результаты от одного и того же пациента при условии разного вида биологического материала (например, при выявлении метициллинрезистентного золотистого

стафилококка в крови и мокроте). Результаты исследования образцов, собранных у больных, находящихся на лечении в медицинском учреждении, используются для анализа результатов мониторинга внутрибольничных инфекций, вызванных метициллинрезистентным стафилококком. Результаты исследования образцов, собранных у пациентов, находящихся на амбулаторном лечении, — для оценки внебольничных инфекций, вызванных метициллинрезистентными стафилококками.

При проведении профилактических мер, в частности обработки поверхностей внутрибольничной среды, не всегда происходит обработка всех возможных и необходимых поверхностей. В качестве рекомендаций по проведению смывов и дальнейшей дезинфекции внутрибольничных помещений и, особенно отделений реанимации и интенсивной терапии, следует обращать внимание на все поверхности, соприкасающиеся с пациентом, в частности поверхность кровати, прикроватные тумбочки и столики, матрасы, балканские рамы, фонендоскопы, аппараты ИВЛ, манжеты для измерения артериального давления и т.д. Для повышения качества мониторинга, необходимо также обратить внимание на смывы и дезинфекцию дверных ручек, полок и ручек холодильников, всех кнопок и включателей, телефонных аппаратов и прочего. Для предотвращения распространения метициллинрезистентных штаммов за пределы отделения, необходимо тщательно следить за обработкой перемещаемого оборудования, кроватей и колёс. Важно регулярно менять точки для смывов. Составление списка общеизвестных точек для смывов приводит в итоге к обработке только этих точек непосредственно перед плановым проведением смывов, игнорируя другие поверхности.

Правила взятия, транспортировки и хранения смывов с поверхностей медицинского оборудования, инструментария, инвентаря и других объектов внутрибольничной среды для последующего анализа с помощью молекулярно-биологических методов были впервые прописаны нами в методических рекомендациях «Взятие, транспортировка, хранение биологического материала для ПЦР-диагностики», 2021». Была подана заявка № 2021623223 от 22 декабря 2021 г

года на государственную регистрацию базы данных «Взятие, транспортировка, хранение биологического материала для ПЦР-диагностики». По заявке получено свидетельство о государственной регистрации базы данных № 2022620002. Дата государственной регистрации в Реестре баз данных – 10 января 2022 года.

Важность создания референс-лабораторий для проведения полногеномного секвенирования и контроля за распространением потенциально высокопатогенных и устойчивых клонов обусловлена в первую очередь необходимостью оценки текущей эпидемиологической ситуации и, при необходимости, планирования профилактических мероприятий. Главное достоинство полногеномного секвенирования – высокая разрешающая способность метода для типирования метициллинрезистентных стафилококков, что позволяет достовернее определять источники, пути передачи и проводить расследование вспышек. Референс-лаборатории должны иметь эпидемиологическую и лабораторную поддержку. В постоянно действующей непрерывной системе мониторинга эпидемиологической обстановки должны участвовать специалисты различного профиля, обученные получению и анализу лабораторных, клинических и эпидемиологических данных. Одной из важнейших составляющих такого мониторинга должна быть деятельность молекулярно-биологической лаборатории. Количество референс-лабораторий должно быть сбалансированно, учитывая географические и социально-экономические условия.

Накопление и анализ данных о внутривидовых свойствах метициллинрезистентных стафилококков является важным элементом эпидемиологического мониторинга. Первым шагом в этом направлении с нашей стороны стало создание базы данных «Эпидемиологический мониторинг за инфекциями, обусловленными метициллинрезистентными штаммами *Staphylococcus spp.*» (свидетельство о государственной регистрации базы данных № 2022620579 от 17 марта 2022 года). База данных предназначена для обработки и хранения систематизированной информации по распространенности метициллинрезистентных штаммов *Staphylococcus spp.* в различных медицинских учреждениях. База данных содержит информацию о выделенных клинических

изолятах, штаммах; источниках (в том числе деперсонализированная информация о пациентах, инфицированных метициллинрезистентными стафилококками, с указанием возраста, пола, диагноза, вида исследованного биологического материала), дата и регион обнаружения с географическими координатами; генетические характеристики. База данных может быть использована для изучения генетического разнообразия и лекарственной устойчивости метициллинрезистентных штаммов *Staphylococcus spp.* в целях совершенствования эпидемиологического мониторинга за антибиотикорезистентными микроорганизмами и прогноза развития эпидемиологической ситуации.

Таким образом, мы считаем необходимым внедрение молекулярно-биологических методов в систему эпидемиологического мониторинга за инфекциями, обусловленными метициллинрезистентными штаммами стафилококка. В частности, необходимо внедрение метода ПЦР для быстрого выявления метициллинрезистентных стафилококков у пациентов по показаниям и из групп риска, для мониторинга внутрибольничной среды, а также использование полногеномного секвенирования для типирования метициллинрезистентных стафилококков и проведения эпидемиологических исследований. Молекулярно-биологические методы должны дополнять традиционные методы, используемые в эпидемиологии.

На основе проведенного исследования обоснованы направления оптимизации системы эпидемиологического надзора за стафилококковыми инфекциями, предполагающие усовершенствование информационной подсистемы эпидемиологического надзора мониторингом с помощью молекулярно-биологических методов. Научно-обоснованы подходы по совершенствованию мониторинга за инфекциями, обусловленными метициллинрезистентными штаммами стафилококка, в системе эпидемиологического надзора.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

ИСМП остаются одной из актуальнейших проблем современности. Увеличение частоты инвазивных лечебных и диагностических процедур, распространение в лечебно-профилактических учреждениях антибиотикорезистентных штаммов ведет к росту заболеваемости внутрибольничными инфекциями. В выявлении случаев ИСМП важна точная идентификация возбудителя и типирование. Молекулярно-биологические методы могут быть мощным инструментом эпидемиологов и клинических врачей в борьбе с внутрибольничными инфекциями в частности и с ИСМП в целом. Постоянно действующая система эпидемиологического мониторинга с помощью молекулярно-биологических методов может стать одним из существенных звеньев в борьбе с инфекциями, вызванными антибиотикорезистентными штаммами, в том числе метициллинрезистентными штаммами стафилококка.

Актуальность проблемы позволила определить цель и задачи исследования. Цель исследования заключалась в разработке и совершенствовании эпидемиологического мониторинга за инфекциями, обусловленными метициллинрезистентными штаммами стафилококка, на основе внедрения молекулярно-биологических методов. Для достижения поставленной цели были решены следующие задачи:

1. Изучен уровень и структура заболеваемости ИСМП, обусловленными метициллинрезистентными штаммами стафилококками, в регионах РФ.
2. Проведено сравнение результатов бактериологических и молекулярно-биологических методов для выявления метициллинрезистентных штаммов в биологическом материале.
3. Разработан набор реагентов на основе ПЦР для выявления и количественного определения ДНК метициллинрезистентных стафилококков в биологическом материале и смывах с медицинского оборудования, инструментария и инвентаря.

4. Организован и проведен эпидемиологический мониторинг за метициллинрезистентными штаммами с помощью молекулярно-биологических методов.

5. Обоснованы и предложены направления совершенствования эпидемиологического мониторинга за инфекциями, обусловленными метициллинрезистентными штаммами стафилококка, с помощью молекулярно-биологических методов.

В теоретической части работы были проанализированы особенности эпидемиологии ИСМП, вызванных метициллинрезистентными штаммами стафилококка, описаны существующие на сегодня лабораторные методы идентификации и типирования стафилококков и возможности применения молекулярно-биологических методов в системе эпидемиологического мониторинга за антибиотикорезистентными штаммами.

В третьей главе были проанализированы уровень и структура заболеваемости ИСМП, обусловленными метициллинрезистентными стафилококками. Стафилококки вносят значительный вклад в заболеваемость ИСМП (первое место в этиологической структуре ИСМП в 2018, 2019 и 2021 годах и второе место в 2020 году). Однако официальное количество ИСМП, вызванных метициллинрезистентными стафилококками невелико и составляет всего 363 зарегистрированных случая за весь 2018 год, 267 случаев за 2019 год, 134 случая за 2020 год и 95 случаев в 2021 году. В 2018, 2019 и 2021 годах среди всех зарегистрированных форм ИСМП максимальное количество случаев, связанных с метициллинрезистентными стафилококками, выявлено среди инфекций в области хирургического вмешательства. В 2020 году на первое место предсказуемо выходят инфекции нижних дыхательных путей. Количество официально зарегистрированных случаев инфекций кровотока, вызванных метициллинрезистентными штаммами стафилококка в 2018 году – 5 случаев, в 2019 году – 10, в 2020 году всего 2 случая, в 2021 – 7 случаев. Учитывая, что во время мониторинга за метициллинрезистентными штаммами в течении одного года, ДНК метициллинрезистентных штаммов была обнаружена нами в образцах

крови только лишь в одном из медицинских учреждений Москвы у 21 пациента с признаками инфекции в 2018 году и у 16 пациентов в 2019 году, можно предположить, что реальная заболеваемость госпитальными инфекциями, вызванными метициллинрезистентными стафилококками, выше официальной статистики. Подтверждают это и более ранние исследования российских ученых. В работах Т.В. Ефимовой, Л.С. Глазовской и Е.Б. Брусиной было показано, что заболеваемость стафилококковыми инфекциями у пациентов медицинских организаций Кемеровской области составила 66,84 на 1000 обследованных, MRSA – 11,31 на 1000 [35]. Для сравнения, средний показатель заболеваемости ИСМП, вызванными стафилококками, который должен быть выше заболеваемости MRSA (так как кроме MRSA в этом показателе учитываются и чувствительные штаммы стафилококка, и другие виды стафилококка, кроме золотистого) по официальным данным за четыре года составил всего 0,12 на 1000 госпитализированных пациентов.

Учеными Квашнина Д.В., Ковалишена О.В. и группой соавторов была описана групповая заболеваемость катетер-ассоциированными инфекциями кровотока стафилококковой этиологии в 2016 году. Заболеваемость составила 33,01 на 1000 катетеризированных пациентов (95% ДИ: 21,31–44,71) [36]. Исследователями Белошицким Г.В., Королевой И.С. и Королевой М.А. была изучена заболеваемость стафилококковым менингитом в структуре гнойных бактериальных менингитов в Российской Федерации в 2010–2019 годах. Заболеваемость стафилококковым менингитом в РФ находилась в пределах 0,04–0,07 на 100 тысяч человек. А заболеваемость менингитами, обусловленными золотистым стафилококком, составляла 0,04–0,05 на 100 тысяч человек [5].

В нашем исследовании мы сравнили сведения по количеству инфекций кровотока, вызванных метициллинрезистентными стафилококками, и их долю среди возбудителей стафилококка по данным AMRmap [1] и по официальным данным, предоставленным территориальными органами Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека за 2018–2020 год. Официальные данные по нозокомиальным инфекциям кровотока, вызванными

метициллинрезистентными стафилококками оказались в 7 раз меньше, по сравнению с данными AMRmap несмотря на то, что данные на AMRmap были загружены участниками всего из 12 городов (в 2020 году) и 18 городов (в 2018 и 2019 годах). То есть реальная заболеваемость нозокомиальными инфекциями кровотока, вызванными метициллинрезистентными стафилококками, ещё выше. Доля метициллинрезистентных стафилококков среди возбудителей стафилококка, выявляемых в крови при нозокомиальных инфекциях по данным AMRmap, была статистически значимо выше по сравнению с официальными данными. Таким образом, более высокую заболеваемость госпитальными инфекциями, вызванными метициллинрезистентными стафилококками по сравнению с официальной статистикой, подтвердили и данные AMRmap.

В четвертой главе было описано сравнение результатов бактериологических и молекулярно-биологических методов для выявления метициллинрезистентных штаммов. Чувствительность метода ПЦР относительно бактериологического метода в нашем исследовании составила 100%, специфичность – 97%. Исследование показало, что метод ПЦР чувствительнее бактериологического метода при выявлении метициллинрезистентных стафилококков в крови и мазках из ран. По литературным данным зарубежный аналог американской компании Serheid – «Xpert MRSA» показал сходные с нашими результаты по специфичности – 97%, но при этом гораздо более низкую чувствительность – 90% [66].

Сравнение результатов бактериологических и молекулярно-биологических методов для выявления метициллинрезистентных штаммов проводилось ранее рядом зарубежных исследователей. Так, учеными из Великобритании было показано, что в ходе исследования с помощью молекулярно-биологического метода было правильно выявлено 96% изолятов *Staphylococcus aureus*, включая все штаммы, устойчивые к метициллину. А клинические данные, собранные в ходе их исследования, показали, что без использования ПЦР 28% пациентов с бактериемией, вызванной *Staphylococcus aureus*, не получают своевременного и надлежащего лечения, а 10% изначально могут получать неподходящее лечение гликопептидами [111].

В пятой главе рассказывается о разработке набора реагентов, позволяющего быстро и эффективно выявлять метициллинрезистентный золотистый стафилококк и метициллинрезистентные штаммы других видов рода *Staphylococcus*. Набор реагентов зарегистрирован в Федеральной службе по надзору в сфере здравоохранения (№ ФСР 2012/13998 от 29 октября 2012 г.) и в настоящее время применяется в клиничко-диагностических лабораториях учреждений здравоохранения России и за рубежом. Это единственный зарегистрированный на территории России набор реагентов, позволяющий количественно выявлять метициллинрезистентные стафилококки. Учитывая, что стафилококки относятся к условно-патогенным возбудителям, количественный формат набора позволяет в ряде случаев дифференцировать носительство и заболевание, вызванное стафилококками. Применение разработанного набора реагентов позволит быстро получать результаты тестирования чувствительности к антибиотикам, что в перспективе поможет снизить частоту эмпирического использования ванкомицина и цефалоспоринов, и соответственно уменьшить побочные эффекты от применения ванкомицина или затраты на нерациональное использование цефалоспоринов.

В шестой главе описано применение молекулярно-биологических методов для эпидемиологического мониторинга метициллинрезистентных штаммов в стационарах города Москвы. Показана гетерогенная эпидемиологическая картина в одном из стационаров. Впервые было проведено исследование смывов в медицинских учреждениях города Москвы с помощью молекулярно-биологических методов. ДНК метициллинрезистентных штаммов была обнаружена на более чем трети поверхностей, с которых были забраны смывы. Особенно часто ДНК метициллинрезистентных штаммов выявлялась в отделениях реанимации и интенсивной терапии. Было показано, что уже на 5-7 день нахождения в отделениях реанимации и интенсивной терапии наблюдается колонизация пациентов коагулазонегативными метициллинрезистентными стафилококками. Частота выявления ДНК метициллинрезистентных стафилококков в крови в течение трех лет статистически значимо не отличалась и в среднем составила 8,23% (95% ДИ: 6,33-10,63). При этом ДНК

метициллинрезистентного золотистого стафилококка была обнаружена в 17,3% случаев, а ДНК метициллинрезистентных коагулазонегативных стафилококков в 82,7% случаев.

Ранее эпидемиологический мониторинг за метициллинрезистентными штаммами стафилококка проводился в многопрофильных медицинских организациях Кемеровской области учеными Ефимовой Т.В., Глазовской Л.С. и Брусиной Е.Б. [35]. Авторы показали циклические колебания интенсивности циркуляции MRSA. По результатам эпидемиологического мониторинга за период 2005–2012 доля MRSA в структуре популяции золотистых стафилококков на территории Кемеровской области составила 25,44%. Как и в нашем исследовании, *Staphylococcus aureus* был выделен с объектов, связанных с медицинскими технологиями и предметами, непосредственно окружающими самого пациента. Аналогично нашему исследованию, циркулирующие на территории Кемеровской области MRSA обладали существенным патогенным потенциалом за счет генов, детерминирующих синтез факторов патогенности. Были обнаружены штаммы с геном *tst*, кодирующим выработку токсина токсического шока. Однако в Кемеровской области авторами не было обнаружено изолятов, несущих гены, детерминирующие синтез лейкоцидина Пантона-Валентайна, в то время как в нашем исследовании было выявлено 2 метициллинрезистентных изолята *Staphylococcus aureus* с этими генами.

Мультилокусное секвенирование-типирование (MLST) стафилококков – это метод генетического типирования, основанный на определении последовательности нуклеотидов определенного набора генов (локусов), который позволяет выявлять вариации, которые медленно накапливаются с течением времени. Метод является удобным инструментом для мониторинга стафилококковой инфекции в рамках глобального эпидемиологического надзора за данной инфекцией. Однако, при изучении эпидемиологии стафилококков в пределах одного стационара ориентироваться только на данные MLST недостаточно. Например, в нашем исследовании ряд изолятов *Staphylococcus aureus*, выделенных в одном медицинском учреждении, принадлежали к сиквенс-

типу ST-22. И если ориентироваться только на результаты MLST, то можно было бы предположить наличие эпидемиологической связи между образцами. Однако эти изоляты относились к различным spa-типам и имели разный профиль генов, ассоциированных с факторами патогенности стафилококков, а также разный плазмидный профиль. В связи с чем, мы рекомендуем опираться на полногеномное секвенирование при локальных эпидемиологических расследованиях.

В нашем исследовании наибольшее количество изученных изолятов *Staphylococcus aureus* (45%) относилось к 8 сиквенс-типу, spa типу t008 с SCCmec-кассетой IV типа, что согласуется с литературными данными [16,28]. Что касается *Staphylococcus epidermidis*, то в нашем исследовании было выявлено 7 сиквенс-типов (ST-2, ST-5, ST-22, ST-23, ST-59, ST-87 и ST-786). К сожалению, исследований по молекулярной эпидемиологии *Staphylococcus epidermidis* в России крайне мало. В исследовании, проведенном в Новосибирске, среди госпитальных штаммов были обнаружены *Staphylococcus epidermidis* следующих сиквенс-типов: ST-17, ST-20, ST-23, ST-210 и ST-786 [37].

В итоговой седьмой главе мы предлагаем совершенствования системы эпидемиологического мониторинга за инфекциями, обусловленными метициллинрезистентными штаммами стафилококка, путем внедрения молекулярно-биологических методов для быстрого выявления метициллинрезистентных стафилококков у пациентов по показаниям и из групп риска, для мониторинга внутрибольничной среды и для контроля за распространением потенциально высокопатогенных и устойчивых клонов. Использование наборов реагентов на основе ПЦР в режиме реального времени для идентификации метициллинрезистентных стафилококков у пациентов из групп риска важно не только с точки зрения совершенствования эпидемиологического мониторинга, но и в связи с повышенным риском неэффективности антибактериальной терапии в этих группах. Исследование, проведенное в США в 2018-2019 годах, показало, что использование метода ПЦР значительно сократило время до назначения оптимальной антимикробной терапии (на 1,7 дня (2,5 против 44 часов, $p < 0,0001$)), а затраты, сэкономленные за счет применения молекулярно-

биологических методов у 65 пациентов, составили 4121 доллара США [78]. Кроме того, зарубежными исследователями было показано, что применение метода ПЦР для детекции метициллинрезистентных стафилококков в крови оказывает положительное влияние на меры рационального использования антибиотиков. Частота оптимальной антибактериальной терапии была значительно выше в группе, где применяли метод ПЦР, а использование ванкомицина было значительно снижено (80,6% против 53,6%, $P < 0,01$) [80].

К группе высокого риска инфицирования метициллинрезистентными штаммами стафилококка, кроме ранее известных групп, таких как пациенты отделений реанимации и интенсивной терапии, ожоговых и хирургических отделений, пациентов с длительной госпитализацией и т.д., необходимо также отнести и больных муковисцидозом. В нашем исследовании мы показали, что у детей, больных муковисцидозом, статистически значимо чаще выявлялась ДНК метициллинрезистентных стафилококков в отделяемом ротоглотки по сравнению со здоровыми детьми ($p < 0,035$), а шансы встречаемости метициллинрезистентных штаммов в отделяемом ротоглотки у детей, больных муковисцидозом, в 8,6 раз выше, чем у здоровых детей.

На основании наших экспериментов по проведению смывов была впервые прописана методика забора, условия транспортировки и хранение для смывов с медицинского оборудования, инструментария, инвентаря и объектов внутрибольничной среды в методических рекомендациях «Взятие, транспортировка, хранение биологического материала для ПЦР-диагностики». Была создана база данных «Эпидемиологический мониторинг за инфекциями, обусловленными метициллинрезистентными штаммами *Staphylococcus spp.*», предназначенная для обработки и хранения систематизированной информации по распространенности метициллинрезистентных штаммов *Staphylococcus spp.* в различных медицинских учреждениях.

В 2023 году Министерством здравоохранения Российской Федерации подготовлено информационное письмо «Об организации системы локального мониторинга антимикробной резистентности» от 25.05.2023 N 30-5/И/2-9190,

ключевым пунктом которого является утверждение требований к обязательному проведению мониторинга антимикробной резистентности в многопрофильных медицинских организациях (стационарах) с коечным фондом более 500 коек [20]. В данной работе мы научно обосновываем подходы по совершенствованию мониторинга за инфекциями, обусловленными метициллинрезистентными штаммами стафилококка, в системе эпидемиологического надзора. Мониторинг за метициллинрезистентными стафилококками крайне необходим ввиду ограниченных возможностей лечения подобных штаммов. Полученные в данном исследовании результаты показывают, что в целях совершенствования системы эпидемиологического мониторинга за метициллинрезистентными штаммами, необходимо внедрение современных молекулярно-биологических методов.

ВЫВОДЫ

1. В анализируемый период наблюдалась тенденция к снижению заболеваемости ИСМП, обусловленными стафилококками в РФ. Показатель заболеваемости в расчете на 1000 госпитализируемых пациентов в 2018 и 2019 году составил 0,09; в 2020 – 0,06; в 2021 – 0,05. В общей этиологической структуре ИСМП доля заболеваний, обусловленных стафилококками, составляла 24,9%, а доля заболеваний, обусловленных метициллинрезистентными стафилококками – 2,2%. Первое ранговое место среди зарегистрированных случаев ИСМП, вызванных метициллинрезистентными стафилококками, занимали инфекции в области хирургического вмешательства (40,1%), второе – инфекции нижних дыхательных путей (26,8%), третье – ИСМП новорожденных (19,1%).

2. Показано, что чувствительность метода ПЦР для выявления метициллинрезистентных стафилококков относительно бактериологических методов составляет 100%, а специфичность – 97%, что свидетельствует о возможности его эффективного использования.

3. Разработан набор реагентов для выявления и количественного определения ДНК метициллинрезистентных стафилококков в биологическом материале методом ПЦР с гибридационно-флуоресцентной детекцией «АмплиСенс® MRSA-скрин-титр-FL». Набор позволяет выявлять не менее 400 копий/мл ДНК метициллинрезистентных стафилококков, линейный диапазон измерения составляет от 800 до $1 \cdot 10^7$ копий/мл.

4. Установлено, что в период мониторинга в реанимационных и хирургических отделениях стационаров города Москвы ДНК метициллинрезистентных коагулазонегативных стафилококков выявлялась чаще, чем ДНК MRSA ($p < 0,0001$). ДНК метициллинрезистентных стафилококков была выявлена в крови у 8,23% пациентов с признаками инфекции. Среди пациентов, в крови которых были обнаружены метициллинрезистентные стафилококки, ДНК метициллинрезистентного *Staphylococcus aureus* была обнаружена в 17,3% случаев,

а ДНК метициллинрезистентных коагулазонегативных стафилококков в 82,7% случаев. ДНК метициллинрезистентных стафилококков в среднем была выявлена в более чем трети (37,9%) из всех забранных смывов с объектов внутрибольничной среды. Из них ДНК MRSA в 4,2% образцов, а ДНК метициллинрезистентных коагулазонегативных стафилококков в 33,7% образцов смывов.

5. Изоляты *Staphylococcus aureus*, выделенные в процессе мониторинга в отделениях реанимации и интенсивной терапии, относились к 6 различным сиквенс-типам (ST-5 (5%), ST-7 (5%), ST-8 (45%), ST-22 (6%), ST-30 (10%) и ST-5555 (5%)) и 8 spa-типам (t008 (45%), t021 (10%), t091 (5%), t1062 (5%), t12437 (10%), t1544 (5%), t223 (15%), t4573 (5%)). Преобладающим типом стафилококковой кассеты mec была SCCmec-кассета IV типа (75%).

6. У детей, больных муковисцидозом, статистически значимо чаще выявлялась ДНК метициллинрезистентных стафилококков в отделяемом ротоглотки по сравнению со здоровыми детьми ($p < 0,035$). Шансы встречаемости метициллинрезистентных штаммов в отделяемом ротоглотки среди детей, больных муковисцидозом, в 8,6 раз выше, чем среди здоровых детей, в связи с чем необходимо включение этой группы пациентов в регулярный эпидемиологический мониторинг.

7. Для совершенствования системы эпидемиологического мониторинга за инфекциями, обусловленными метициллинрезистентными штаммами стафилококка, на основе молекулярно-биологических методов, необходимо: внедрение метода ПЦР для быстрого выявления метициллинрезистентных стафилококков у пациентов по показаниям и из групп риска; мониторинг внутрибольничной среды с помощью молекулярно-биологических методов и использование полногеномного секвенирования для контроля за распространением потенциально высокопатогенных и устойчивых клонов.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. С целью обеспечения максимальной эффективности эпидемиологического мониторинга за инфекциями, обусловленными метициллинрезистентными штаммами стафилококка, рекомендуется использовать метод ПЦР в режиме реального времени, как метод, обладающий наибольшей чувствительностью и специфичностью.
2. Для типирования метициллинрезистентных стафилококков и расследования вспышек, вызванных стафилококками, необходимо внедрение метода полногеномного секвенирования, как метода, обладающего наибольшей разрешающей способностью.
3. Рекомендуется учитывать данные по резистентности стафилококков для оценки актуальности и целесообразности применения антимикробных препаратов, используемых для лечения инфекций, обусловленных стафилококками, и формирования больничного формуляра антимикробных средств.
4. Включить в группу риска по инфицированию метициллинрезистентными стафилококками пациентов, больных муковисцидозом.

ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШЕЙ РАЗРАБОТКИ ТЕМЫ

1. Изучение заболеваемости инфекциями, обусловленными метициллинрезистентными штаммами стафилококка, в последующие годы, ее распределение по территориям, возрастным и социальным группам населения.
2. Продолжение исследований и проведение мониторинга с использованием молекулярно-биологических методов на территории других субъектов Российской Федерации.
3. Оценка экономической эффективности внедрения молекулярно-биологических методов для проведения мониторинга за инфекциями, обусловленными метициллинрезистентными штаммами стафилококка в медицинских организациях.
4. Изучение генетических характеристик штаммов стафилококков, циркулирующих в Российской Федерации, и их взаимосвязь с развитием и тяжестью течения заболевания.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

ВОЗ – Всемирная Организация Здравоохранения

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота

ДИ – доверительный интервал

ИВЛ – искусственная вентиляция легких

ИСМП – инфекции, связанные с оказанием медицинской помощи

МПК – минимальная подавляющая концентрация

ПЦР – полимеразная цепная реакция

СИЗ – средства индивидуальной защиты

ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии – Федеральное бюджетное учреждение науки «Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека

EUCAST – Европейский комитет по определению чувствительности к антибиотикам

MLST – мультилокусное секвенирование-типирование

MRSA – метициллин-резистентный *Staphylococcus aureus*

MSSA – метициллин-чувствительный *Staphylococcus aureus*

MRCoNS – метициллин-резистентные коагулазонегативные *Staphylococcus spp.*

NGS - секвенирование нового поколения

S. aureus – *Staphylococcus aureus*

S. epidermidis – *Staphylococcus epidermidis*

S. haemolyticus – *Staphylococcus haemolyticus*

SCCmec – стафилококковая хромосомная кассета mec

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. AMRmap – система мониторинга антибиотикорезистентности в России / А. Ю. Кузьменков, А. Г. Виноградова, И. В. Трушин [и др.] // Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. – 2021. – Т.23. – №2. – С. 198-204.
2. Акимкин, В. Г. Актуальные направления научных исследований в области неспецифической профилактики инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи/ В. Г. Акимкин // Поликлиника. – 2014. – №. 6. – С. 6-9.
3. Антибиотикорезистентность нозокомиальных штаммов *Staphylococcus aureus* в стационарах России: результаты многоцентрового эпидемиологического исследования МАРАФОН в 2011-2012 гг / М. В. Сухорукова, Е. Ю. Склеенова, Н. В. Иванчик [и др.] // Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. – 2014. – Т. 16. – №. 4. – С. 280-286.
4. Антибиотикорезистентность нозокомиальных штаммов *Staphylococcus aureus* в стационарах России: результаты многоцентрового эпидемиологического исследования" МАРАФОН" в 2013-2014 / А. В. Романов, А. В. Дехнич, М. В. Сухорукова [и др.] // Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. – 2017. – Т. 19. – №. 1.– С. 57-62.
5. Белошицкий, Г.В. Эпидемиологическая характеристика стафилококкового менингита в Российской Федерации / Г.В. Белошицкий, И. С. Королева, М. А. Королева // Медицинский алфавит – 2021. – №. 18. – С. 51-54.
6. Беляков, В.Д. Избранные лекции по общей эпидемиологии инфекционных и неинфекционных заболеваний. – Москва: «Медицина», 1995. – 176 с.
7. Вельков, В. В. Использование биомаркера Пресепсин для ранней высокоспецифичной диагностики сепсиса / В. В. Вельков // Раны и раневые инфекции. Журнал имени профессора Б.М. Костюченка. – 2015. – №. 1. - С. 53-82.
8. Выявление роли метициллинрезистентных *Staphylococcus aureus* и их молекулярно-генетических особенностей в развитии гнойно-некротических форм синдрома диабетической стопы / О. Е. Хохлова, Я. Ивао, В. В. Камшилова [и др.] // Инфекция и иммунитет. – 2019. – Т. 9. – №. 1. – С. 95-106.

9. Геномный анализ штаммов *Staphylococcus aureus* клональной линии 30-возбудителей пищевой инфекции в Российской Федерации / И. В. Абаев, Ю. П. Скрябин, А. А. Кисличкина [и др.] // Вестник Российской академии медицинских наук. – 2017. – Т. 72. – №. 5. – С. 346-354.
10. Госпитальная инфекция / В. Д. Беляков, А. П. Колесов, П. Б. Остроумов, В. И. Немченко– Ленинград: Медицина, 1976– 231 с.
11. Инфекции, связанные с оказанием медицинской помощи (ИСМП): Информационный бюллетень за 2018 г. / В. Г. Акимкин, А. В. Тутельян, О. А. Орлова [и др.]. – 2019. – 51 с.
12. Лабинская, А. С. Частная медицинская микробиология и этиологическая диагностика инфекций: методические рекомендации / А. С. Лабинская, Н. Н. Костюкова, С. М. Иванова – Москва: Бином. – 2012. – С. 49-73.
13. Лазикова, Г. Ф. Метициллинрезистентные *Staphylococcus aureus*-возбудители внутрибольничных инфекций: идентификация и генотипирование: Методические рекомендации //Под редакцией Г. Ф. Лазиковой, А. А. Мельниковой, Н. В. Фроловой – М.: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора. – 2006. – 43 с.
14. Микробиологический мониторинг гнойных осложнений у ожоговых больных и молекулярно-генетические особенности метициллинрезистентных *Staphylococcus aureus* (MRSA) / О. Е. Хохлова, О. В. Перьянова, И. В. Владимиров [и др.] // Антибиотики и химиотерапия. – 2017. – Т. 62. – №. 9-10. – С. 27-33.
15. Молекулярно-генетическая идентификация штамма *Staphylococcus aureus*-возбудителя пищевой токсикоинфекции при вспышке в Санкт-Петербурге в 2013 г / Г. Г. Онищенко, И. В. Абаев, И. А. Дятлов [и др.] // Вестник Российской академии медицинских наук. – 2014. – Т. 69. – №. 9-10. – С. 33-38.
16. Молекулярно-генетическая характеристика метициллин-устойчивых штаммов *Staphylococcus aureus*, выделенных в стационарах г. Москвы / М. В. Афанасьев, С. В. Каракашев, Е. Н. Ильина [и др.] // Молекулярная генетика, микробиология и вирусология. – 2010. – №. 2. – С. 20-24.

17. Мониторинг метициллинрезистентных штаммов стафилококка в многопрофильном стационаре Москвы с помощью молекулярно-биологических методов / Т. С. Скачкова, М. Н. Замятин, О. А. Орлова [и др.] // Эпидемиология и вакцинопрофилактика. – 2021. – Т. 20. – №. 1. – С. 44-50
18. Определение чувствительности к антимикробным препаратам Диско-диффузионный метод EUCAST – Версия 8.0 (Январь 2020). [Электронный ресурс]. URL: <https://iacmac.ru/ru/docs/eucast/eucast-disk-diffusion-manual-8.0-rus.pdf>
19. Основы современной классификации инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи / В. И. Покровский, В. Г. Акимкин, Н. И. Брико [и др.] // Эпидемиология и вакцинопрофилактика. – 2011. – №. 6 (61). – С. 55-61.
20. Письмо Минздрава России от 25.05.2023 N 30-5/И/2-9190 «Об организации системы локального мониторинга антимикробной резистентности»
21. Покровский, В. И. Описательное эпидемиологическое исследование: (ретроспективный эпидемиологический анализ) / В. И. Покровский, Н. Н. Филатов, И. П. Палтышев. – Москва: Санэпидмедиа, 2005. – 239 с.
22. Покровский, В.И. Инфекционные болезни и эпидемиология: Учебник / В. И. Покровский, С. Г. Пак. - 2 изд., исправленное. - М.: ГЭОТАР-Медиа, 2007. - 816 с.
23. Проблемы и перспективы борьбы с внутрибольничными инфекциями в России / В. И. Покровский, Н. А. Семина, Е. П. Ковалева [и др.] // Эпидемиология и вакцинопрофилактика. – 2007. – №. 1 (32). – С. 5-9.
24. Разработка и апробация набора реагентов для выявления и количественного определения ДНК метициллинчувствительного и метициллинрезистентного *Staphylococcus aureus*, а также метициллинрезистентных коагулазонегативных *Staphylococcus spp.* Методом полимеразной цепной реакции в режиме "реального времени" / Т. С. Скачкова, О. Ю. Шипулина, Э. А. Домонова [и др.] // Клиническая лабораторная диагностика. – 2013. – №. 6. – С. 42-45.
25. Распоряжение Правительства РФ от 25.09. 2017 N 2045-р «Об утверждении Стратегии предупреждения распространения антимикробной резистентности в Российской Федерации».

26. Распоряжение Правительства РФ от 30 марта 2019 г. № 604-р «Об утверждении плана мероприятий на 2019 - 2024 гг. по реализации Стратегии предупреждения распространения антимикробной резистентности в РФ на период до 2030 г.»
27. Роль скрининга назофарингеального носительства MRSA в профилактике инфекционных осложнений у пациентов, поступающих для оказания высокотехнологичной медицинской помощи по профилю травматология-ортопедия / М. В. Хроменкова, С. А. Гузюкина, В. М. Мищенко [и др.] // Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. – 2018. – Т. 20. – №. S1. – С. 44-45.
28. Романов, А. В. Молекулярная эпидемиология штаммов *Staphylococcus aureus* в детских стационарах России / А. В. Романов, А. В. Дехнич, М. В. Эйдельштейн // Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. – 2012. – Т. 14. – №. 3. – С. 201-208.
29. Современные подходы к ведению детей с муковисцидозом / А. А. Баранов, Л. С. Намазова-Баранова, С. И. Куцев [и др.] // Педиатрическая фармакология. – 2022. – 19. – №. 2. – С. 153-195.
30. Сравнение результатов молекулярно-биологических и бактериологических методов для выявления метициллин-резистентных штаммов стафилококка при бактериемии / Т. С. Скачкова, Н. Н. Лашенкова, В. С. Фомина [и др.] // Эпидемиология и инфекционные болезни. Актуальные вопросы. – 2021. – Т. 11. – №. 1. – С. 48-51.
31. Хирургическая помощь в Российской Федерации в период пандемии— основные итоги 2020 года / А. Ш. Ревিশвили, В. Е. Оловянный, В. П. Сажин [и др.] // Хирургия. Журнал им. НИ Пирогова. – 2021. – Т. 12. – С. 5-14.
32. Хирургическая помощь в Российской Федерации. Информационно-аналитический сборник за 2021 год. - М., 2022. – 200 с.
33. Черкасский, Б. Л. Руководство по общей эпидемиологии. – 2001. – 560 с.
34. Эпидемиология и эпидемиологический мониторинг инфекций, вызванных метициллинрезистентными штаммами золотистого стафилококка / Е. Б. Брусина,

О. А. Дмитренко, Л. С. Глазовская [и др.] // Федеральные клинические рекомендации. Москва. – 2014. – 50 с.

35. Эпидемический процесс инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи, вызванных метициллинрезистентными стафилококками: реальность и перспективы / Т. В. Ефимова, Л. С. Глазовская, Е. Б. Брусина [и др.] // Медицинский альманах. – 2014. – №. 4 (34). – С. 22-27.

36. Эпидемическое неблагополучие по катетер-ассоциированным инфекциям кровотока среди пациентов, получающих заместительную почечную терапию / Д. В. Квашнина, О. В. Ковалишена, О. М. Сутырина [и др.] // Эпидемиология и Вакцинопрофилактика – 2019. – Т. 18. – №. 2. – С. 52-61.

37. Antibiotic Resistance and Pathogenomics of Staphylococci Circulating in Novosibirsk, Russia / A. Bardasheva, A. Tikunov, Y. Kozlova [et al.] // Microorganisms. – 2021. – 9. – №. 12. – P. 2487.

38. Antimicrobial resistance. World Health Organization. 17 November 2021 [Электронный ресурс] URL: <https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/antimicrobial-resistance>

39. Antimicrobial resistances and virulence markers in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* from broiler and turkey: a molecular view from farm to fork / B. Kraushaar, B. Ballhausen, D. Leeser [et al.] // Veterinary microbiology. – 2017. – 200. – P. 25-32.

40. A population-based study of the incidence and molecular epidemiology of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* disease in San Francisco, 2004–2005 / C. Liu, C. J. Graber, M. Karr [et al.] // Clinical Infectious Diseases. – 2008. – 46. – №. 11. – P. 1637-1646.

41. A systematic literature review and meta-analysis of factors associated with methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* colonization at time of hospital or intensive care unit admission / J. A. McKinnell, L. G. Miller, S. J. Eells [et al.] // Infection Control & Hospital Epidemiology. – 2013. – 34. – №. 10. – P. 1077-1086.

42. Bad bugs, no drugs: no ESKAPE! An update from the Infectious Diseases Society of America / H. W. Boucher, G. H. Talbot, J. S. Bradley [et al.] // *Clinical infectious diseases*. – 2009. – 48. – №. 1. – P. 1-12.
43. Barber, M. Methicillin-resistant staphylococci / M. Barber // *Journal of clinical pathology*. – 1961. – 14. – №. 4. – P. 385.
44. Barrett, S. P. Trying to control MRSA causes more problems than it solves / S. P. Barrett, R. V. Mummery, B. Chattopadhyay // *Journal of Hospital Infection*. – 1998. – 39. – №. 2. – P. 85-93.
45. Bierowiec, K. Is the colonisation of *Staphylococcus aureus* in pets associated with their close contact with owners? / K. Bierowiec, K. Płoneczka-Janeczko, K. Rypuła // *PLoS One*. – 2016. – 11. – №. 5. – P. e0156052.
46. Bissett, L. Controlling the risk of MRSA infection: screening and isolating patients / L. Bissett // *British Journal of Nursing*. – 2005. – 14. – №. 7. – P. 386-390.
47. Centers for Disease Control and Prevention. Antibiotic resistance threats in the United States, 2019. – US Department of Health and Human Services, Centres for Disease Control and Prevention, 2019. – 140 p.
48. Chambers, H. F. Waves of resistance: *Staphylococcus aureus* in the antibiotic era / H. F. Chambers, F. R. DeLeo // *Nature Reviews Microbiology*. – 2009. – 7. – №. 9. – P. 629-641.
49. Characteristics of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* isolated from chicken meat and hospitalized dogs in Korea and their epidemiological relatedness / N. H. Kwon, K. T. Park, W. K. Jung [et al.] // *Veterinary microbiology*. – 2006. – 117. – №. 2-4. – P. 304-312.
50. Characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolated from retail raw chicken meat in Japan / S. Kitai, A. Shimizu, J. Kawano [et al.] // *Journal of Veterinary Medical Science*. – 2005. – 67. – №. 1. – P. 107-110.
51. Clinical isolates of *Staphylococcus aureus* from the Arkhangelsk region, Russia: antimicrobial susceptibility, molecular epidemiology, and distribution of Panton-Valentine leucocidin genes / V Vorobieva, T. Bazhukova, A. M. Hanssen [et al.] // *Apmis*. – 2008. – 116. – №. 10. – P. 877-887.

52. Clonal replacement of epidemic methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains in a German university hospital over a period of eleven years / N. Albrecht, L. Jatzwauk, P. Slickers [et al.] // PLoS One. – 2011. – 6. – №. 11. – P. e28189.
53. Comparative genomics and drug resistance of a geographic variant of ST239 methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* emerged in Russia / T. Yamamoto, T. Takano, W. Higuchi [et al.] // PLoS One. – 2012. – 7. – №. 1. – P. e29187.
54. Comparing whole-genome sequencing with Sanger sequencing for spa typing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* / M. D. Bartels, A. Petersen, P. Worning [et al.] // Journal of clinical microbiology. – 2014. – 52. – №. 12. – P. 4305-4308.
55. Cuny, C. Livestock-associated MRSA: the impact on humans / C. Cuny, L. H. Wieler, W. Witte // Antibiotics. – 2015. – 4. – №. 4. – P. 521-543.
56. Damani, N. N. Manual of infection control procedures / N. N. Damani – Cambridge University Press, 2003. – 4. – 343 p.
57. Deurenberg, R. H. The evolution of *Staphylococcus aureus* / R. H. Deurenberg, E. E. Stobberingh // Infection, genetics and evolution. – 2008. – 8. – №. 6. – P. 747-763.
58. Dinges, M. M. Exotoxins of *Staphylococcus aureus* / M. M. Dinges, P. M. Orwin, P. M. Schlievert // Clinical microbiology reviews. – 2000. – 13. – №. 1. – P. 16-34.
59. Distribution of major genotypes among methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clones in Asian countries / K. S. Ko, J. Y. Lee, J. Y. Suh [et al.] // Journal of clinical microbiology. – 2005. – 43. – №. 1. – P. 421-426.
60. Draft genome sequences of eight *Staphylococcus aureus* strains isolated during foodborne outbreaks / I. Abaev, Y. Skryabin, A. Kislichkina [et al.] // Genome announcements. – 2018. – 6. – №. 5. – P. e01557-17.
61. Drancourt, M. Detection of microorganisms in blood specimens using matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry: a review / M. Drancourt // Clinical Microbiology and Infection. – 2010. – T. 16. – №. 11. – P. 1620-1625.
62. Duckworth, G. Controlling methicillin resistant *Staphylococcus aureus* / G. Duckworth // Bmj. – 2003. – 327. – №. 7425. – P. 1177-1178.

63. Elimination of epidemic methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* from a university hospital and district institutions, Finland / P. Kotilainen, M. Routamaa, R. Peltonen [et al.] // Emerging infectious diseases. – 2003. – 9. – №. 2. – P. 169.
64. Emergence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* of animal origin in humans / I. Van Loo, X. Huijsdens, E. Tiemersma [et al.] // Emerging infectious diseases. – 2007. – 13. – №. 12. – P. 1834.
65. EUCAST Guidelines for the identification of resistance and resistance mechanisms of particular clinical and / or epidemiological significance. Version 2.0, 2017
66. Evaluation of the Xpert methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) assay using the GeneXpert real-time PCR platform for rapid detection of MRSA from screening specimens / A. S. Rossney, C. M. Herra, G. I. Brennan // Journal of clinical microbiology. – 2008. – 46. – №. 10. – P. 3285-3290.
67. Factors predicting mortality in necrotizing community-acquired pneumonia caused by *Staphylococcus aureus* containing Panton-Valentine leukocidin / Y. Gillet, P. Vanhems, G. Lina [et al.] // Clinical Infectious Diseases. – 2007. – 45. – №. 3. – P. 315-321.
68. Fatal case of ST8/SCCmecIV1 community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection in Japan / N. Ishitobi, T. W. Wan, O. E. Khokhlova [et al.] // New microbes and new infections. – 2018. – 26. – P. 30-36.
69. Fatal pneumonia in HIV-infected patients from a novel ST239 methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* carrying the toxic shock syndrome toxin-1 gene in Krasnoyarsk, Siberian Russia / Y. Iwao, O. E. Khokhlova, T. Takano [et al.] // Jpn. J. Infect. Dis. – 2012. – 65. – №. 2. – P. 184-186.
70. Foster, A. P. Staphylococcal skin disease in livestock / A. P. Foster // Veterinary dermatology. – 2012. – 23. – №. 4. – P. 342-51.
71. Genotyping using whole-genome sequencing is a realistic alternative to surveillance based on phenotypic antimicrobial susceptibility testing / E. Zankari, H. Hasman, R. S. Kaas [et al.] // Journal of antimicrobial chemotherapy. – 2013. – 68. – №. 4. – P. 771-777.

72. Geographic distribution of *Staphylococcus aureus* causing invasive infections in Europe: a molecular-epidemiological analysis / H. Grundmann, D. M. Aanensen, C. C. Van Den Wijngaard [et al.] // PLoS medicine. – 2010. – 7. – №. 1. – P. e1000215.
73. Healthcare-and community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) and fatal pneumonia with pediatric deaths in Krasnoyarsk, Siberian Russia: unique MRSA's multiple virulence factors, genome, and stepwise evolution / O. E. Khokhlova, W. C. Hung, T. W. Wan [et al.] // PLoS One. – 2015. – 10. – №. 6. – P. e0128017.
74. Historical zoonoses and other changes in host tropism of *Staphylococcus aureus*, identified by phylogenetic analysis of a population dataset / M. A. Shepherd, V. M. Fleming, T. R. Connor [et al.] // PloS one. – 2013. – 8. – №. 5. – P. e62369.
75. How clonal is *Staphylococcus aureus*? / E. J. Feil, J. E. Cooper, H. Grundmann [et al.] // Journal of bacteriology. – 2003. – 185. – №. 11. – P. 3307-3316.
76. Identification of acquired antimicrobial resistance genes / E. Zankari, H. Hasman, S. Cosentino [et al.] // Journal of antimicrobial chemotherapy. – 2012. – 67. – №. 11. – P. 2640-2644.
77. Impact of decolonization on methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* transmission and infection in a neonatal intensive care unit / M. J. Bozzella, L. Soghier, T. Harris [et al.] // Infection Control & Hospital Epidemiology. – 2019. – 40. – №. 10. – P. 1123-1127.
78. Impact of rapid identification of *Staphylococcus* species in positive blood culture using GeneXpert methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*/*Staphylococcus aureus* blood culture assay combined with antibiotic stewardship / H. AlQahtani, F. Y. Alqahtani, F. S. Aleanizy [et al.] // Microbial Drug Resistance. – 2021. – 27. – №. 8. – P. 1037-1043.
79. Increased US emergency department visits for skin and soft tissue infections, and changes in antibiotic choices, during the emergence of community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* / D. J. Pallin, D. J. Egan, A. J. Pelletier [et al.] // Annals of emergency medicine. – 2008. – 51. – №. 3. – P. 291-298.
80. Influence of GeneXpert MRSA/SA test implementation on clinical outcomes of *Staphylococcus aureus* bacteremia—a before–after retrospective study / H. Ben-Zvi, G.

Drozdinsky, S. Kushnir [et al.] // Diagnostic Microbiology and Infectious Disease. – 2019. – 93. – №. 2. – P. 120-124.

81. International Working Group on the Classification of Staphylococcal Cassette Chromosome Elements. Classification of staphylococcal cassette chromosome mec (SCCmec): guidelines for reporting novel SCCmec elements // Antimicrobial agents and chemotherapy. – 2009. – 53. – №. 12. – P. 4961-4967.

82. ISO (International Organization for Standardization). ISO 20776-1: 2006 Clinical laboratory testing and in vitro diagnostic test systems–Susceptibility testing of infectious agents and evaluation of performance of antimicrobial susceptibility test devices–Part 1: Reference method for testing the in vitro activity of antimicrobial agents against rapidly growing aerobic bacteria involved in infectious diseases // International Organization for Standardization. – 2006. – P. 19.

83. Jolley, K. A. Open-access bacterial population genomics: BIGSdb software, the PubMLST.org website and their applications / K. A. Jolley, J. E. Bray, M. C. Maiden // Wellcome open research. – 2018. – 3. – P. 124.

84. Keefe, G. Update on control of *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus agalactiae* for management of mastitis / G. Keefe // Veterinary Clinics: Food Animal Practice. – 2012. – 28. – №. 2. – P. 203-216.

85. Kraushaar, B. First description of PVL-positive methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in wild boar meat / B. Kraushaar, A. Fetsch // International journal of food microbiology. – 2014. – 186. – P. 68-73.

86. Measuring the effect of enhanced cleaning in a UK hospital: a prospective cross-over study / S. J. Dancer, L. F. White, J. Lamb [et al.] // BMC medicine. – 2009. – 7. – №. 1. – P. 1-12.

87. Methicillin-resistant *S. aureus* infections among patients in the emergency department / G. J. Moran, A. Krishnadasan, R. J. Gorwitz [et al.] // New England Journal of Medicine. – 2006. – 355. – №. 7. – P. 666-674.

88. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in foods of animal origin product in Italy / G. Normanno, M. Corrente, G. La Salandra [et al.] // International journal of food microbiology. – 2007. – 117. – №. 2. – P. 219-222.

89. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* disease in three communities / S. K. Fridkin, J. C. Hageman, M. Morrison [et al.] // New England Journal of Medicine. – 2005. – 352. – №. 14. – P. 1436-1444.
90. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* evolution: the multiple facets of an old pathogen / F. Campanile, D. Bongiorno, S. Borbone [et al.] // Eur Infect Dis. – 2010. – 4. – №. 1. – P. 70-6.
91. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA): global epidemiology and harmonisation of typing methods / S. Stefani, D. R. Chung, J. A. Lindsay [et al.] // International journal of antimicrobial agents. – 2012. – 39. – №. 4. – P. 273-282.
92. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* with a novel mecA homologue in human and bovine populations in the UK and Denmark: a descriptive study / L. García-Álvarez, M. T. Holden, H. Lindsay [et al.] // The Lancet infectious diseases. – 2011. – 11. – №. 8. – P. 595-603.
93. Metz, C. E. Fundamental ROC analysis / C. E. Metz // Handbook of medical imaging. – 2000. – 1. – №. 15. – P. 751.
94. Miller, L. G. Colonization, fomites, and virulence: rethinking the pathogenesis of community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection / L. G. Miller, B. A. Diep // Clinical infectious diseases. – 2008. – 46. – №. 5. – P. 752-760.
95. Molecular characterization and susceptibility of methicillin-resistant and methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* isolates from hospitals and the community in Vladivostok, Russia / T. Baranovich, H. Zaraket, I. Shabana [et al.] // Clinical Microbiology and Infection. – 2010. – 16. – №. 6. – P. 575-582.
96. Molecular characterization of clinical methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates in South Africa / A. Moodley, W. F. Oosthuysen, A. G. Duse [et al.] // Journal of clinical microbiology. – 2010. – T. 48. – №. 12. – P. 4608-4611.
97. Molecular dating of human-to-bovid host jumps by *Staphylococcus aureus* reveals an association with the spread of domestication / L. A. Weinert, J. J. Welch, M. A. Suchard [et al.] // Biology Letters. – 2012. – 8. – №. 5. – P. 829-832.

98. Molecular epidemiology and antibiotic resistance of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* circulating in the Russian Federation / V. Gostev, A. Kruglov, O. Kalinogorskaya [et al.] // *Infection, Genetics and Evolution*. – 2017. – 53. – P. 189-194.
99. Molecular epidemiology of methicillin-resistant and methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* isolates from global clinical trials / R. V. Goering, R. M. Shawar, N. E. Scangarella [et al.] // *Journal of clinical microbiology*. – 2008. – 46. – №. 9. – P. 2842-2847.
100. Morgan, M. S. Diagnosis and treatment of Panton–Valentine leukocidin (PVL)-associated staphylococcal pneumonia / M. S. Morgan // *International journal of antimicrobial agents*. – 2007. – 30. – №. 4. – P. 289-296.
101. Multilocus sequence typing for characterization of methicillin-resistant and methicillin-susceptible clones of *Staphylococcus aureus* / M. C. Enright, N. P. Day, C. E. Davies [et al.] // *Journal of clinical microbiology*. – 2000. – 38. – №. 3. – P. 1008-1015.
102. Novel SCCmec type XV (7A) and two pseudo-SCCmec variants in foodborne MRSA in China / W. Wang, Y. Hu., M. Baker [et al.] // *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. – 2022. – 77. – №. 4. – P. 903-909.
103. Novel staphylococcal cassette chromosome mec (SCC mec) type XIV (5A) and a truncated SCC mec element in SCC composite islands carrying speG in ST5 MRSA in Japan / N. Urushibara, M. S. Aung, M. Kawaguchiya [et al.] // *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. – 2020. – 75. – №. 1. – P. 46-50.
104. O'Neill, J. Tackling drug-resistant infections globally: final report and recommendations / J. O'Neill, 2016. – 81 p.
105. Outcome and attributable mortality in critically ill patients with bacteremia involving methicillin-susceptible and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* / S. I. Blot, K. H. Vandewoude, E. A. Hoste [et al.] // *Archives of internal medicine*. – 2002. – 162. – №. 19. – P. 2229-2235.
106. P151 Diversity of *Staphylococcus aureus* clones among cystic fibrosis patients in the Russian Federation / L. Avetisyan, M. Chernukha, O. Medvedeva [et al.] // *Journal of Cystic Fibrosis*. – 2019. – 18. – P. S100.

107. Pichereau, S. Invasive community-associated MRSA infections: epidemiology and antimicrobial management / S. Pichereau, W. E. Rose // Expert opinion on pharmacotherapy. – 2010. – 11. – №. 18. – P. 3009-3025.
108. PlasmidFinder and pMLST: in silico detection and typing of plasmids / A. Carattoli, E. Zankari, A. García-Fernández [et al.] // Antimicrobial agents and chemotherapy. – 2014. – 58. – №. 7. – P. 3895-3903.
109. Prevalence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in meat / E. de Boer, J. T. M. Zwartkruis-Nahuis, B. Wit [et al.] // International journal of food microbiology. – 2009. – 134. – №. 1-2. – P. 52-56.
110. Pulsed-field gel electrophoresis typing of oxacillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates from the United States: establishing a national database / L. K. McDougal, C. D. Steward, G. E. Killgore [et al.] // Journal of clinical microbiology. – 2003. – 41. – №. 11. – P. 5113-5120.
111. Rapid identification of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* from positive blood cultures by real-time fluorescence PCR / T. Y. Tan, S. Corden, R. Barnes [et al.] // Journal of Clinical Microbiology. – 2001. – T. 39. – №. 12. – P. 4529-4531.
112. Rountree, P. M. Infections caused by a particular phage type of *Staphylococcus aureus* / P. M. Rountree, B. Freeman // Medical Journal of Australia. – 1955. – 2. – №. 5. – P. 157-61.
113. Sharov, K. S. SARS-CoV-2-related pneumonia cases in pneumonia picture in Russia in March-May 2020: Secondary bacterial pneumonia and viral co-infections / K. S. Sharov // Journal of Global Health. – 2020. – 10. – №. 2.
114. SHEA guideline for preventing nosocomial transmission of multidrug-resistant strains of *Staphylococcus aureus* and *Enterococcus* / C. A. Muto, J. A. Jernigan, B. E. Ostrowsky [et al.] // Infection Control & Hospital Epidemiology. – 2003. – 24. – №. 5. – P. 362-386.
115. Shinefield, H. R. Staphylococcal infections: a historical perspective / H. R. Shinefield, N. L. Ruff // Infectious disease clinics of North America. – 2009. – 23. – №. 1. – P. 1-15.

116. Skinner, D. Significance of bacteremia caused by *Staphylococcus aureus*: a study of one hundred and twenty-two cases and a review of the literature concerned with experimental infection in animals / D. Skinner, C. S. Keefer // Archives of Internal Medicine. – 1941. – 68. – №. 5. – P. 851-875.
117. Solomon, S. L. Antibiotic resistance threats in the United States: stepping back from the brink / S. L. Solomon, K. B. Oliver // American family physician. – 2014. – 89. – №. 12. – P. 938-941.
118. Staphylococcal chromosomal cassettes mec (SCCmec): A mobile genetic element in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* / J. Liu, D. Chen, B. M. Peters [et al.] // Microbial pathogenesis. – 2016. – 101. – P. 56-67.
119. *Staphylococcus aureus* colonization: modulation of host immune response and impact on human vaccine design / A. F. Brown, J. M. Leech, T. R. Rogers [et al.] // Frontiers in immunology. – 2014. – 4. – P. 507.
120. *Staphylococcus aureus* Panton-Valentine leukocidin causes necrotizing pneumonia / M. Labandeira-Rey, F. Couzon, S. Boisset [et al.] // Science. – 2007. – 315. – №. 5815. – P. 1130-1133.
121. Strategies to prevent methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* transmission and infection in acute care hospitals: 2014 update / D. P. Calfee, C. D. Salgado, A. M. Milstone [et al.] // Infection Control & Hospital Epidemiology. – 2014. – 35. – №. 7. – P. 772-796.
122. Tacconelli, E. Global priority list of antibiotic-resistant bacteria to guide research, discovery, and development of new antibiotics / E. Tacconelli // World Health Organization. – 2017. – 27. – P. 318-327.
123. The role of nasal carriage in *Staphylococcus aureus* infections / H. F. Wertheim, D. C. Melles, M. C. Vos [et al.] // The Lancet infectious diseases. – 2005. – 5. – №. 12. – P. 751-762.
124. Virulence factors and phylogeny of *Staphylococcus aureus* associated with bovine mastitis in Russia based on genome sequences / K. Fursova, A. Sorokin, S. Sokolov [at al.] // Frontiers in veterinary science. – 2020. – 7. – P. 135.

125. Whole-genome sequencing identifies in vivo acquisition of a bla CTX-M-27-carrying IncFII transmissible plasmid as the cause of ceftriaxone treatment failure for an invasive *Salmonella enterica* serovar typhimurium infection / B. McCollister, C. V. Kotter, D. N. Frank [et al.] // *Antimicrobial agents and chemotherapy*. – 2016. – 60. – №. 12. – P. 7224-7235.
126. World Health Organization. Monitoring and evaluation of the global action plan on antimicrobial resistance: framework and recommended indicators. – 2019.