

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

Автореферат
диссертации на соискание учёной степени
кандидата медицинских наук

Москва – 2023

Работа выполнена в Федеральном бюджетном учреждении науки «Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека

Научный руководитель

Акимкин Василий Геннадьевич – академик РАН, доктор медицинских наук, профессор

Официальные оппоненты:

Асланов Батырбек Исмелович – доктор медицинских наук, доцент, заведующий кафедрой эпидемиологии, паразитологии и дезинфектологии ФГБОУ ВО «Северо-Западный государственный медицинский университет имени И.И. Мечникова»

Захарова Юлия Александровна – доктор медицинских наук, доцент, заместитель директора Института дезинфектологии Федерального бюджетного учреждения науки «Федеральный научный центр гигиены имени Ф.Ф. Эрисмана» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека

Ведущая организация – Военно-медицинская академия имени С. М. Кирова Министерства обороны Российской Федерации

Защита состоится « _____ » _____ 2023 г. в _____ на заседании диссертационного совета Д 64.1.010.01 в Федеральном бюджетном учреждении науки «Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека по адресу: 111123, Москва, ул. Новогиреевская, д. 3а

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке в Федеральном бюджетном учреждении науки «Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека и на сайте института www.cric.ru

Автореферат разослан « _____ » _____ 2023 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
доктор медицинских наук

Николаева Светлана Викторовна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

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. В Российской Федерации (РФ) по данным референс-центра по мониторингу за ИСМП ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора 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 [Акимкин В.Г., 2014, 2019].

Особую обеспокоенность вызывает рост устойчивости возбудителей заболеваний к антибактериальным препаратам. По 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 [Antibiotic resistance threats in the United States, 2019; Solomon S.L., 2014]. 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 [O'Neill J., 2016].

В 2017 году Всемирная Организация Здравоохранения 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 [Taccsonelli E., 2017]. Под буквой «S» входит он и в известный список «ESKAPE-патогенов» [Boucher H. W., 2009].

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 метициллин-устойчивыми бактериями *S.aureus* (MRSA), 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. 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 ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии суммарно золотистый и эпидермальный стафилококки выходят на первое ранговое место по вкладу в заболеваемость ИСМП среди бактериальных возбудителей [Инфекции, связанные с оказанием медицинской помощи. Информационный бюллетень за 2018 г., 2019]. 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 [Barber M., 1961]. 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 [Pichereau S., 2010].

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 [Liu J., 2016].

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 [Drancourt M., 2010]. 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 заболеваемости, обусловленной бактериальными патогенами.

Изучению аспектов эпидемиологии инфекций, вызванных представителями рода *Staphylococcus*, посвящены работы российских ученых Акатова А.К., Брико Н.И., Брусиной Е.Б., Глазвской Л.С., Гончарова А.Е., Дмитриенко О.А., Ефимовой Т.В., Зуевой Л.П., Квашниной Д.В., Ковалевой Е.П., Ковалишеной О. В., Павловой Т.Ю., Покровского В.И., Семиной Н.А., Хохловой О.Е., Чанышевой Р.Ф., Чистович Г.Н., Широковой И.Ю. 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, что подчеркивает важность проводимого исследования.

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 гибридизационно-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.

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. Объем 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.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материалы и методы исследования

Исследование выполнялось на базе ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора. В диссертационной работе был использован комплекс эпидемиологического, статистических и лабораторных (бактериологический и молекулярно-биологических) методов, кратко представленных в таблице 1.

Таблица 1 - Материалы и методы исследования

Направление исследования	Характеристика материалов, количество	Типы и методы исследования
Уровень и структура заболеваемости ИСМП, обусловленных 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
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).	Молекулярно-биологический (ПЦР в режиме реального времени)
Эпидемиологический мониторинг за метициллинрезистентными штаммами стафилококка	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-биологические (ПЦР в режиме реального времени, полногеномное секвенирование); статистические

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. (2001), Белякова В.Д. (1976, 1995) и Покровского В.И. (2005, 2007, 2011).

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.

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

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

В знаменателе формулы учитывали число госпитализированных пациентов только по тем субъектам РФ, которые подали сведения о заболеваемости ИСМП в каждом конкретном году.

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

Показаниями к бактериологическому и ПЦР исследованию крови у пациентов были катетер-ассоциированный тромбофлебит, фебрильная нейтропения (у пациентов с онкологическими заболеваниями), наличие у пациента 2 или более симптомов (гипотермия или лихорадка, лейкоцитоз, тахикардия, гипотензия).

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.

Молекулярно-биологические методы исследования. 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. Для внутрिलाбораторного 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-ВАА-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 Q («Qiagen», Германия), CFX96 (Bio-Rad Laboratories, Inc.), США), «ДТ-96» (ООО «НПО ДНК-Технология», Россия).

Для полногеномного секвенирования ДНК бактерий выделяли 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>). Поиск детерминант антибиотикорезистентности проводился с помощью ресурса ResFinder 3.0. Поиск плазмид выполнялся с помощью ресурса PlasmidFinder 1.3. Поиск генов, ассоциированных с факторами патогенности стафилококков, проводили с помощью ресурса VirulenceFinder 2.0 (<https://cge.cbs.dtu.dk/services/VirulenceFinder/>). Анализ последовательностей варибельного участка гена стафилококкового белка А (spa) проводился с помощью существующей международной базы данных (<http://spaServer.ridom.de>) и ресурса spaTyper 1.0.

Бактериологический метод. 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. Выделение чистой культуры микроорганизма для полногеномного секвенирования выполнялось 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 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.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ОБСУЖДЕНИЕ

Уровень и структура заболеваемости инфекциями, связанными с оказанием медицинской помощи, обусловленными стафилококками

В течение изучаемого периода наблюдалось снижение заболеваемости ИСМП, вызванными стафилококками в РФ. 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 1). Средний многолетний темп снижения составил 21,2%. Абсолютное снижение заболеваемости в 2021 году относительно 2018 года составило 0,08 на 1000 госпитализированных пациентов.

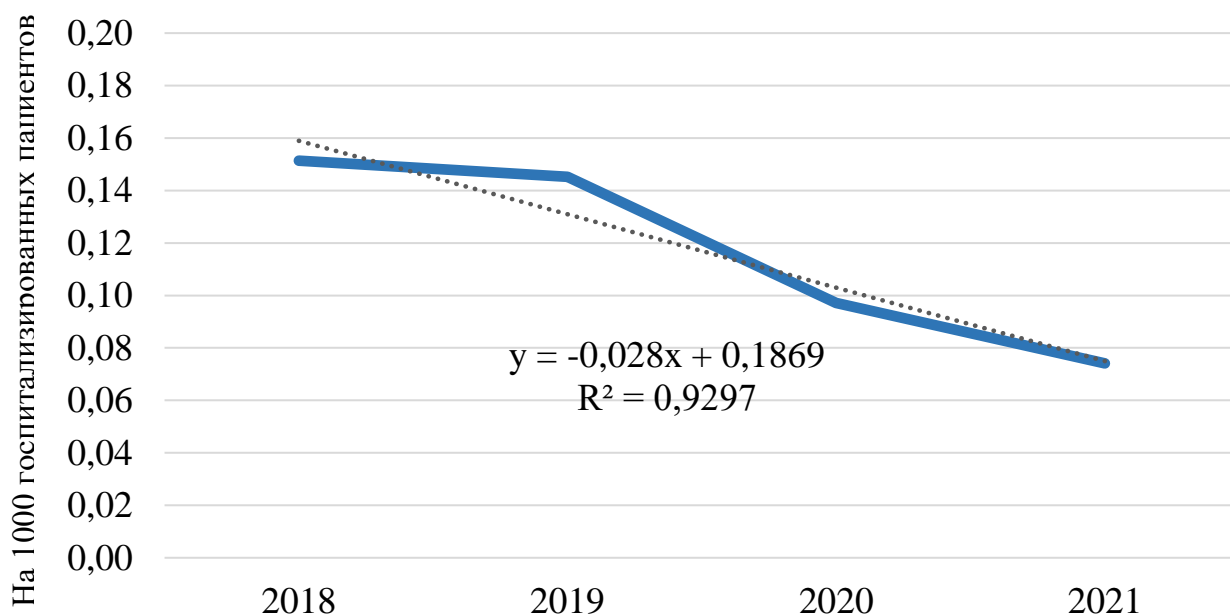


Рисунок 1 – Заболеваемость ИСМП на 1000 госпитализированных пациентов, вызванными суммарно *Staphylococcus aureus* и *Staphylococcus epidermidis*, на территории РФ в 2018-2021 годах

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

Удельный вес заболеваний, обусловленных метициллинрезистентными стафилококками, в общей структуре ИСМП составлял 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 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%) (рисунок 2). В 2020 году на первое место среди ИСМП, вызванных метициллинрезистентными стафилококками, выходили инфекции нижних дыхательных путей (34,3%). 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 приходилось подавляющее большинство смертей у COVID-19-положительных пациентов с пневмонией.

Таблица 2 – 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

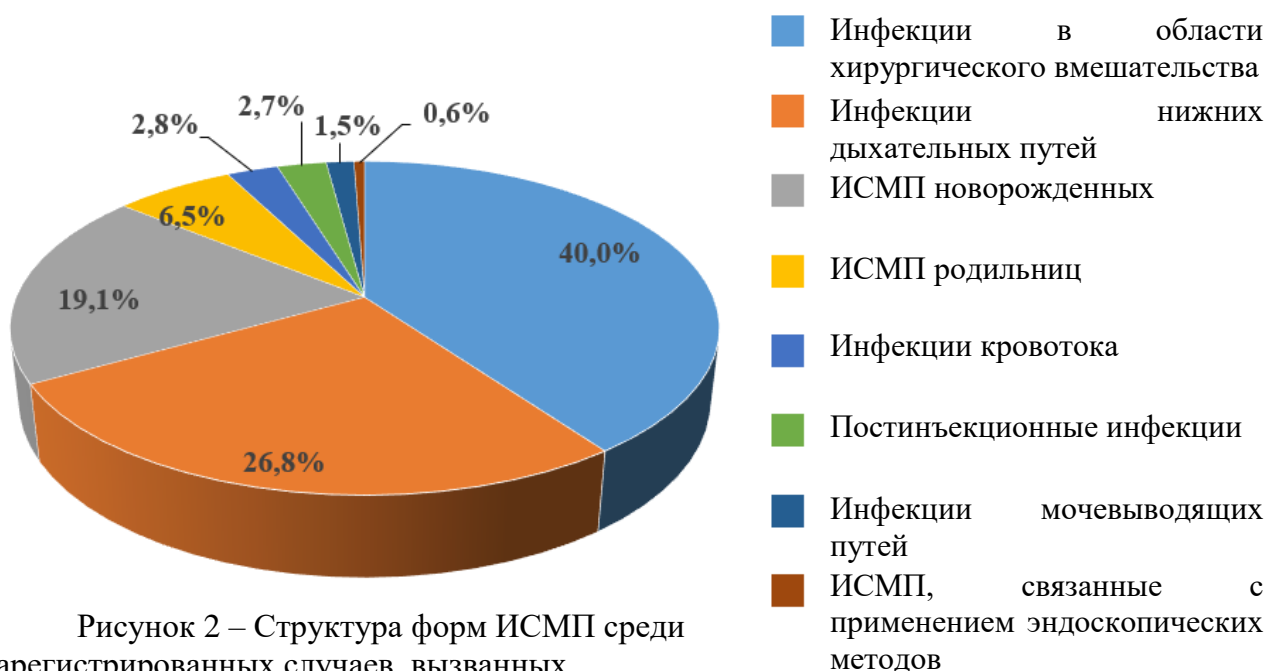


Рисунок 2 – Структура форм ИСМП среди зарегистрированных случаев, вызванных метициллинрезистентными стафилококками в 2018-2021 годах (%)

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.

Сравнение результатов бактериологических и молекулярно-биологических методов для выявления метициллинрезистентных штаммов стафилококков

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

метициллинрезистентных стафилококков в крови был проведен ROC-анализ. При построении ROC-кривой получен график, изображенный на рисунке 3. 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 3). 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.

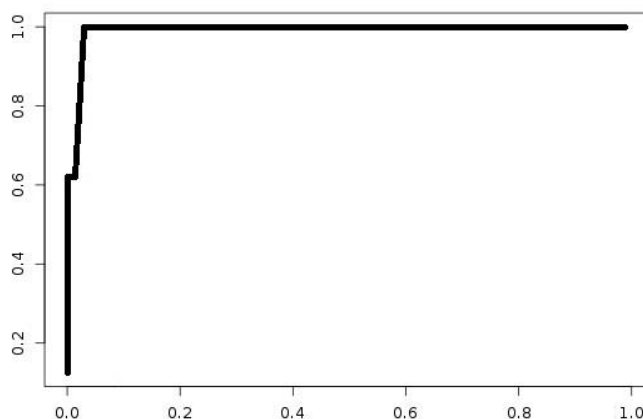


Рисунок 3 – ROC-кривая

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 3).

Таблица 3 – 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%

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.

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 разработан набор реагентов для выявления и количественного определения ДНК метициллинрезистентных *S.aureus* и коагулазонегативных

Staphylococcus spp. в биологическом материале методом ПЦР с гибридизационно-флюоресцентной детекцией, обладающий высокими аналитическими и диагностическими характеристиками. Коэффициент вариации (CV, %) количественного определения не превышал 3,5% для условий повторяемости и воспроизводимости (таблица 4).

Таблица 4 – Повторяемость и воспроизводимость количественного определения метициллинрезистентных стафилококков

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

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. Набор позволяет выявлять не менее 400 копий/мл ДНК метициллинрезистентных стафилококков, линейный диапазон измерения составляет от 800 до $1 \cdot 10^7$ копий/мл. Анализ отличается простотой и воспроизводимостью при сохранении высоких диагностических характеристик, что открывает перспективы его широкого применения в лабораториях и медицинских учреждениях.

Эпидемиологический мониторинг за инфекциями, обусловленными метициллинрезистентными штаммами стафилококков с помощью молекулярно-биологических методов

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. ДНК метициллинрезистентных стафилококков была выявлена в 8,23% образцов крови от пациентов с признаками инфекции (95% ДИ: 6,33-10,63) (таблица 5). 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.

Таблица 5 – 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

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 мес была SCCмес-кассета IV типа (75%). Обнаружены изоляты с различным профилем генов стафилококковых энтеротоксинов, в том числе с генами белков, ассоциированных с синдромом токсического шока и некротизирующей пневмонией. 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%)).

Было проведено исследование смывов (n=330) с медицинского оборудования, инструментария, инвентаря и объектов внутрибольничной среды в трех медицинских учреждениях города Москвы (таблица 6). 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. ДНК метициллинрезистентных коагулазонегативных стафилококков в образцах смывов выявлялись гораздо чаще, чем ДНК метициллинрезистентного золотистого стафилококка (p<0,0001). 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).

Таблица 6 – 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

Правила взятия, транспортировки и хранения смывов с поверхностей медицинского оборудования, инструментария, инвентаря и других объектов внутрибольничной среды для последующего анализа с помощью ПЦР были впервые прописаны нами в методических рекомендациях «Взятие, транспортировка, хранение биологического материала для ПЦР-диагностики» (получено свидетельство о государственной регистрации базы данных с аналогичным названием № 2022620002 от 10 января 2022 года).

Было проведено сравнение частоты выявления ДНК метициллинрезистентных стафилококков в отделяемом ротоглотки у детей, больных муковисцидозом, и условно-здоровых детей, с помощью молекулярно-биологических методов. Показано, что дети, больные муковисцидозом, относятся к группе высокого риска инфицирования метициллинрезистентными штаммами стафилококка. У детей, больных муковисцидозом, статистически значимо чаще выявляли ДНК генов месА (p=0,035) по сравнению с детьми из условно-здоровой группы. Шансы встречаемости метициллинрезистентных штаммов в отделяемом ротоглотки среди детей, больных муковисцидозом, в 8,6 раз выше, чем среди здоровых детей. 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.

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.*». Получено свидетельство о государственной регистрации базы данных № 2022620579. Дата государственной регистрации в Реестре баз данных – 17 марта 2022 года.

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

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 3).



Рисунок 3 – Совершенствование системы эпидемиологического мониторинга за инфекциями, обусловленными метициллинрезистентными штаммами стафилококка на основе молекулярно-биологических методов

Категории пациентов, относящихся к группам высокого риска по присоединению метициллинрезистентной стафилококковой инфекции, это пациенты отделений реанимации и интенсивной терапии, ожоговых и хирургических отделений, с длительной госпитализацией, с травмами и ранами (открытые повреждённые участки), 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. Также мы считаем необходимым отнесение больных муковисцидозом к группе высокого риска в связи с высокой встречаемостью метициллинрезистентных стафилококков у этих пациентов.

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.

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». 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. 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.

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 гибридизационно-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 ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. **Скачкова Т.С.** Разработка и апробация методики выявления и количественного определения метициллинрезистентного *Staphylococcus aureus* методом ПЦР с гибридизационно-флуоресцентной детекцией продуктов амплификации / Т.С. Скачкова, Е.А. Черневская, И.Б. Дмитриева, Н.В. Белобородова, Т.В. Ефимова, Е.Б. Брусина, Л.С. Глазовская, О.Ю. Шипулина, Г.А. Шипулин // Молекулярная диагностика-2010. – 2010. – С. 424-430.
2. Ильина В.Н. Применение молекулярно–биологических методов исследования для диагностики инфекции области хирургического вмешательства, вызванной бактериями рода *Staphylococcus* / В.Н. Ильина, А.И. Субботовская, Л.Г. Князькова, В.С. Козырева, **Т.С. Скачкова**, О.Ю. Шипулина, Д.С. Сергеевичев, А.П. Субботовский // Патология кровообращения и кардиохирургия. – 2011. – № 4. – С. 45-48.
3. **Скачкова Т.С.** 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, А.И. Субботовская, В. С. Козырева, В. Н. Ильина, Г. А. Шипулин // Клиническая лабораторная диагностика. – 2013. – №. 6. – С. 42-45.

4. Саршор Ю.Н. Оценка целесообразности применения современных биомаркеров для мониторинга пациентов с различной степенью и механизмом повреждения головного мозга (ГМ), находящихся в критическом состоянии / Ю.Н. Саршор, Н.М. Гаглоева, Н.В. Белобородова, Е.А. Черневская, **Т.С. Скачкова** В книге: Гнойно-септические заболевания и инфекционные осложнения при критических состояниях: сборник публикаций. – 2013. – С. 92-103.
5. Гаврилов С.Н. Современные молекулярно-генетические методы, используемые для этиологической диагностики сепсиса / С.Н. Гаврилов, **Т.С. Скачкова**, О.Ю. Шипулина, Ю.А. Савочкина, Г.А. Шипулин, В.В. Малеев // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. – 2016. – N 2. – С. 91-99.
6. **Скачкова Т.С.** Частота выявления метициллинрезистентных штаммов стафилококка при инфекционном эндокардите / Т.С. Скачкова, О.Ю. Сильвестрова, Э.А. Домонова, О.Ю. Шипулина, Е.О. Котова, А.С. Писарюк // Материалы III Российского конгресса лабораторной медицины. Лабораторная служба. – 2017. – N 3. – С. 99.
7. Путков С.Б. Разработка и использование алгоритмов ускоренной диагностики инфекции кровотока, вызванные нозокомиальными возбудителями, у пациентов с синдромом системного воспалительного ответа / С.Б. Путков, С.В. Акимова, Н.Б. Эсауленко Г.И. Заболотная, **Т.С. Скачкова**, С.П. Казаков // Материалы III Российского конгресса лабораторной медицины. Лабораторная служба. – 2017. – N 3. – С. 143-144.
8. **Скачкова Т.С.** Обзор молекулярно-биологических методов для выявления ESKAPE-патогенов / Т.С. Скачкова, О.Ю. Шипулина // Клиническая патофизиология. – 2018. – Т. 24, № 1. – С. 25-28.
9. Орлова О.А. Методы молекулярно-генетической диагностики в системе эпидемиологического надзора в стационаре. О.А. Орлова, М.Н. Замятин, Н.А. Юмцунова, Н.Н. Лашенкова, В.Г. Акимкин, Ю.А. Савочкина, **Т.С. Скачкова** Вестник Национального медико-хирургического центра им. Н.И. Пирогова. – 2018. – Т. 13, № 4. – С. 96-99.
10. **Скачкова Т. С.** *Staphylococcus aureus*. / Т. С. Скачкова, О. Ю. Шипулина // В книге: Молекулярная диагностика инфекционных болезней. – 2018. – С. 346-351.
11. Путков С.Б. Разработка и использование алгоритма ускоренной диагностики возбудителей кровотока при синдроме системного воспалительного ответа / Путков С.Б., Акимова С.В., Эсауленко Н.Б., Заболотная Г.И., **Скачкова Т.С.**, Казаков С.П. // Сборник «Инфекционная иммунология в многопрофильном учреждении: традиции и новации». Материалы конференции. – 2018. – С. 30-31.
12. Акимкин В. Г. Инфекции, связанные с оказанием медицинской помощи (ИСМП): Информационный бюллетень за 2018 г. / В. Г. Акимкин, А. В. Тутельян, О. А. Орлова, А.А. Голубкова, О.А. Квасова, Н.В. Сычева, **Т.С. Скачкова**. – 2019. – 51 с.
13. **Скачкова Т.С.** Молекулярно-биологические методы в системе эпидемиологического надзора за метициллинрезистентными штаммами стафилококка / Т.С. Скачкова, В.С. Фомина, М.Н. Замятин, А.А. Шеленков, В.Г. Акимкин // Молекулярная диагностика и биобезопасность-2020. Сборник материалов. – 2020. – С. 137.
14. **Скачкова Т.С.** Сравнение результатов молекулярно-биологических и бактериологических методов для выявления метициллин-резистентных штаммов стафилококка при бактериемии / Т.С. Скачкова, Н.Н. Лашенкова, В.С. Фомина, М.Н. Замятин, В.Г. Гусаров, М.В. Дементенко, О.Ю. Шипулина, Е.Н. Головешкина, В.Г. Акимкин // Эпидемиология и инфекционные болезни. Актуальные вопросы. - М. : Бионика Медиа, 2021. - № 1. - С. 48-51. DOI: 10.18565/epidem.2021.11.1.48-51*
15. Взятие, транспортировка, хранение биологического материала для ПЦР-диагностики. Методические рекомендации. Домонова Э.А., Творогова М.Г., Подколзин А.Т., Шипулина О.Ю., Карань Л.С., Яцышина С.Б., Альварес Фигероа М.В., Головешкина Е.Н., Киреев

Д.Е., Елькина М.А., Сильвейстрова О.Ю., Веселова О.А., Григорьева Я.Е., Паркина Н.В., Скачкова Т.С., Коновалова Т.А. / Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека Федеральное бюджетное учреждение науки «Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии». Москва, 2021. – 112 с.

16. Скачкова Т.С. Мониторинг метициллинрезистентных штаммов стафилококка в многопрофильном стационаре Москвы с помощью молекулярно-биологических методов / Т.С. Скачкова, М.Н. Замятин, О.А. Орлова, Н.А. Юмцунова, Н.Н. Лашенкова, В.С. Фомина, В.Г. Гусаров, А.А. Шеленков, Ю.В. Михайлова, Е.Н. Головешкина, В.Г. Акимкин // Эпидемиология и вакцинопрофилактика. - 2021. - № 1. - С. 44-50. DOI: 10.31631/2073-3046-2021-20-1-44-50*

17. Князева Е.В. Выявление генетических детерминант антибиотикорезистентности при значимой бактериурии у детей в 2022 году / Е. В. Князева, Т. С. Скачкова, Е. Н. Головешкина, А.В. Громова, Н.Д. Гатцаева, Т.И. Махова, А.В. Лазарева, И.Е. Новикова, А.П. Фисенко, В.Г. Акимкин // Контроль и профилактика инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи (ИСМП-2022): Сборник тезисов X Конгресса с международным участием, Москва. – 2022. – С. 54.

18. Князева Е.В. Сравнение частоты встречаемости локусов антибиотикорезистентности в отделяемом ротоглотки у больных муковисцидозом и условно здоровых детей / Е.В. Князева, Т.С. Скачкова, Е.Н. Головешкина, Т.В. Тронза, Е.И. Кондратьева, А.Ю. Воронкова, В.Г. Акимкин // Молекулярная диагностика и биобезопасность - 2023. Сборник материалов. – 2023. - С. 191-192.

19. Скачкова Т.С., Головешкина Е.Н., Акимкин В.Г. Уровень и структура заболеваемости инфекциями, связанными с оказанием медицинской помощи, обусловленными стафилококками // Материалы XII съезда Всероссийского научно-практического общества эпидемиологов, микробиологов и паразитологов. Москва, 26–28 октября 2022 года. – 2022. - С. 491-491.

20. Скачкова Т.С. Уровень и структура заболеваемости инфекциями, связанными с оказанием медицинской помощи, обусловленными стафилококками, в 2018–2021 гг. / Т.С. Скачкова, Е.Н. Головешкина, О.А. Абросимова, А.В. Тутельян, В.Г. Акимкин // Эпидемиология и инфекционные болезни. Актуальные вопросы. – 2023. - № 2. - С.28-33. DOI: <https://dx.doi.org/10.18565/epidem.2023.13.2.28-33>*

21. Скачкова Т.С., Головешкина Е.Н., Акимкин В.Г. Вклад метициллинорезистентных стафилококков в уровень и структуру заболеваемости инфекциями, связанными с оказанием медицинской помощи, в Российской Федерации в 2018–2021 гг. Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия, Т.25. Приложение 1. – 2023. С.53-54.

22. Скачкова Т.С. Распространенность генетических детерминант антибиотикорезистентности, имеющих особое эпидемиологическое значение, в микробиоте мазков со слизистой оболочки ротоглотки больных муковисцидозом / Т.С. Скачкова, Е.В. Князева, Е.Н. Головешкина, Т.В. Тронза, Е.И. Кондратьева, А.Ю. Воронкова, В.Г. Акимкин // Эпидемиология и Вакцинопрофилактика. – 2023. –22(4). – С.44-48. DOI:<https://doi:10.31631/2073-3046-2023-22-4-44-48>*

* опубликованы в журналах, рекомендованных Высшей аттестационной комиссией (ВАК) при Министерстве науки и высшего образования Российской Федерации для публикации основных результатов диссертации по специальности «Эпидемиология»

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ СОКРАЩЕНИЙ

ВОЗ - Всемирная Организация Здравоохранения

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота

ДИ – доверительный интервал

ИСМП – инфекции, связанные с оказанием медицинской помощи

ПЦР – полимеразная цепная реакция

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

MRSA – метициллин-резистентный *Staphylococcus aureus*

MRCoNS – метициллин-резистентные коагулазонегативные *Staphylococcus spp.*

S.aureus – *Staphylococcus aureus*

SCCmec – стафилококковая хромосомная кассета mec