

НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ОТДЕЛ МИКРОБИОЛОГИИ И ВНУТРИБОЛЬНИЧНЫХ ИНФЕКЦИЙ

Направления научных исследований

- Эпидемиология и молекулярная эпидемиология резистентных микроорганизмов, вызывающих инфекции, связанные с оказанием медицинской помощи
- Молекулярно-генетические исследования филогении микроорганизмов и генов антимикробной резистентности.
- Исследование микробиоты различных биотопов.

Участие в выполнении государственного задания

Разработка тест-системы для выявления генов резистентности энтерококков к гликопептидам (vanA/vanB/vanC) (121031100290-8)

Впервые за время наблюдения частота вызываемых им этих крайне тяжелых вариантов энтерококковых инфекций превысила 50,0%. Для этого возбудителя была характерна антимикробная резистентность к широкому кругу антибиотиков.

Среди последовательных штаммов энтерококков, выделенных из биосубстратов госпитализированных в клиники НМИЦ им. В. А. Алмазова в 2021 году больных, резистентны к ампициллину были 887 (39,7%), линезолиду 8 (0,4%), имипенему 843 (37,7%), норфлоксацину 1196 (53,5%), ванкомицину 350 (17,7%) изолятов, высокий уровень устойчивости к гентамицину был у 593 (26,5%) штаммов. Резистентность к тигециклину исследовали у 552 штаммов, резистентными были 54 (9,8%) изолята, как показано на рисунке.

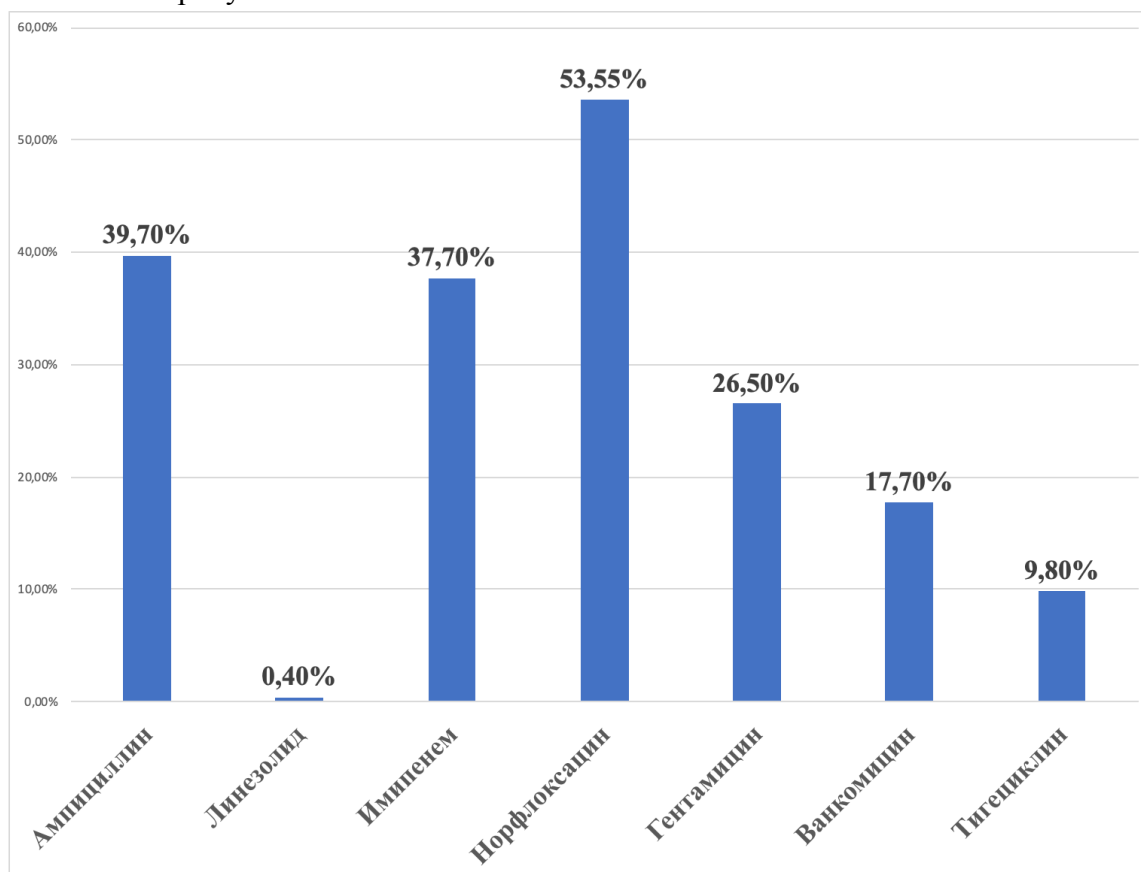


Рисунок - Антимикробная резистентность *Enterococcus* spp., выделенных из биосубстратов госпитализированных пациентов

Оценили распространенность резистентности к антибиотикам среди видов энтерококков, которые с наибольшей частотой выделяли у госпитализированных пациентов - *E. faecalis* и *E. faecium*.

Для каждой тест-системы синтезировали свой уникальный набор праймеров.

Таблица - Праймеры, использованные для выявления гена *vanA*

Последовательности олигонуклеотидов	Длина фрагмента, п.н.
<i>vanA</i> -F: 5'-CATGAATAGAATAAAAGTTGCAATA-3' <i>vanA</i> -R: 5'-CCCCTTTAACGCTAATACGATCAA-3'	1030
<i>vanA</i> -F: 5'-GGGAAAACGACAATTGC-3' <i>vanA</i> -R: 5'-GTACAATGCGGCCGTTA-3'	732
<i>vanA</i> -F: 5'-TCTGCAATAGAGATAGCCGC-3' <i>vanA</i> -R: 5'-GGAGTAGCTATCCCAGCATT-3'	400

ДНК выделяли с помощью набора PrepMan Ultra (Applied Biosystems). Приготовление смеси для ПЦР проводили с использованием набора AmpliTaq Gold Master Mix (Applied Biosystems). Электрофорез проводили в мини-кювете BioRad в 1,8 %-ном агарозном геле с бромидом этидия в буфере TBE при напряжении 100 В в течение 40 мин. Учет и документирование результатов электрофоретического разделения ПЦР - продуктов проводили на приборе Molecular Imager Gel Doc XP System (BioRad) с соответствующим программным обеспечением.

Молекулярные методы (MALDI-TOF масс-спектрометрия и секвенирование гена 16 S рРНК показали сходные результаты при видовой идентификации госпитальных штаммов энтерококков, что позволяет использовать оба метода в качестве референтных при проведении эпидемиологических исследований. Разработаны 3 тест-системы, направленные на выявление гена *vanA* в культурах энтерококков.

Применение трех различных тест-систем обеспечило получение продуктов полимеразной цепной реакции разной длины. Все тест-системы показали 100% эффективность в выявлении гена *vanA* у штаммов, демонстрирующих фенотипические признаки его присутствия, и могут быть основой для разработки мультиплексной тест-системы по выявлению генов резистентности энтерококков к гликопептидам.

Разработка методов диагностики и терапии новой нозокомиальной инфекции, обусловленной *Candida auris* (AAAA-A20-120093090054-1)

Определены минимальные ингибирующие концентрации (МИК) системных противогрибковых препаратов определили для 42 изолятов *C. auris*, выделенных из крови

пациентов в трех регионах Российской Федерации (Центральном, Северо-Западном, Сибирском), как представлено в таблице.

Таблица - Минимальные ингибирующие концентрации антимикотиков для изолятов *C. auris*, выделенных из крови

Антифунгальный препарат	МИК, диапазон (мг/ л)	МИК ₉₀ (мг/ л)	МИК ₅₀ (мг/ л)
Амфотерицин В	<0,12->8	4	2
5-фторцитозин	<0,06-0,5	0,25	0,12
Флуконазол	4->256	>256	>256
Вориконазол	0,12-8	4	2
Итраконазол	0,06-2	0,5	0,5
Позаконазол	0,03-1	0,5	0,25
Анидулафунгин	0,03-1	0,5	0,25
Микафунгин	0,03-1	0,25	0,12
Каспофунгин	0,06-1	0,5	0,5

Высокий уровень устойчивости к флуконазолу (МПК>256 мг/л) был выявлен у 41 (97,6%) штамма, устойчивость к амфотерицину В с МПК> 2 мг/л - у 32 (76,2%) изолятов. Все исследованные штаммы были чувствительны к эхинокандинам.

Разработаны праймеры как для предварительной амплификации фрагментов гена, так и для последующего секвенирования по Сэнгеру. Всего для амплификации и секвенирования гена *ERG11* изолятов *C.auris* использовали 3 набора праймеров.

Таблица - Конструкция праймеров для определения мутаций в гене *ERG11* микромицета *C. auris*

Ген	Праймеры	Олигонуклеотиды
ERG11	1F	TCTCAGAAAAGACAGAGCTC
ERG11	1R	CTTCACGCCATCTTTATACG
ERG11	2F	GTTAGGAAAAGTTATGACGG
ERG11	2R	TTGGTGACTTTACCAAACCC
ERG11	3F	AGATCTCTGCTACCTACATG
ERG11	3R	GATTTCTGCTGGCTCCATTG

Разработанная тест-система по идентификации *C. auris* молекулярно-генетическими методами показала высокую эффективность наряду с молекулярным

методом идентификации MALDI-TOF масс спектрометрией по сравнению с классическими микробиологическими методами идентификации микромицетов, основанными на биохимических тестах с применением автоматических микробиологических анализаторов VITEK 2, MicroScan.

Разработанная тест-система по определению последовательностей нуклеотидов гена ERG11, кодирующем фермент 14- α -деметилазу у *Candida auris*, показала высокую эффективность в выявлении мутации, ассоциированной с резистентностью к азолам.

Основные публикации:

1. Баранцевич Н.Е., Баранцевич Е.П. Diagnosis and Treatment of Invasive Candidiasis // Antibiotics. — 2022. — Vol. 11, № 6. — DOI:10.3390/antibiotics11060718.

2. Назаров Д., Ежов И., Юдинцева Н.М. et al. Antibacterial and Osteogenic Properties of Ag Nanoparticles and Ag/TiO₂ Nanostructures Prepared by Atomic Layer Deposition // Journal of Functional Biomaterials. — 2022. — Vol. 13, № 2. — DOI:10.3390/jfb13020062.

3. Гладин Д.П., Козлова Н.С., Королук А.М., Баранцевич Н.Е., Баранов И.А., Хайруллина А.Р., Баранцевич Е.П. - Динамика антибиотикорезистентности стафилококков в многопрофильном стационаре - Педиатр 2022; 12(6): 43-53 DOI:10.17816/PED12643-53.