

Хуснутдинова

Татьяна Алексеевна

**ЛАБОРАТОРНАЯ ЭКСПРЕСС-ДИАГНОСТИКА КЛИНИЧЕСКИ
ЗНАЧИМОЙ БАКТЕРИУРИИ И АНТИБИОТИКОРЕЗИСТЕНТНОСТИ
ВОЗБУДИТЕЛЕЙ ИНФЕКЦИЙ МОЧЕВЫВОДЯЩИХ ПУТЕЙ
У ЖЕНЩИН РЕПРОДУКТИВНОГО ВОЗРАСТА**

14.03.10 – клиническая лабораторная диагностика

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата медицинских наук

Санкт-Петербург – 2021 год

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

Научный руководитель:

Савичева Алевтина Михайловна – заслуженный деятель науки РФ, доктор медицинских наук, профессор

Официальные оппоненты:

Сидоренко Сергей Владимирович - доктор медицинских наук профессор, Федеральное государственное бюджетное учреждение «Детский научно-клинический центр инфекционных болезней Федерального медико-биологического агентства», заведующий отделом молекулярной микробиологии и медицинской эпидемиологии;

Аполихина Инна Анатольевна – доктор медицинских наук профессор, Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии имени академика В.И. Кулакова» Министерства здравоохранения РФ, заведующая отделением эстетической гинекологии и реабилитации.

Ведущая организация:

Федеральное государственное бюджетное военное образовательное учреждение высшего образования «Военно-медицинская академия имени С.М. Кирова» Министерства обороны Российской Федерации

Защита диссертации состоится «14» сентября 2021 г. в 14:30 часов на заседании диссертационного совета Д 205.001.01 при ФГБУ «Всероссийский центр экстренной и радиационной медицины имени А.М. Никифорова» МЧС России по адресу: 194044, Санкт-Петербург, ул. Академика Лебедева, д. 4/2.

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

Автореферат разослан « ____ » _____ 2021 г.

Ученый секретарь

диссертационного совета

кандидат медицинских наук, доцент

Санников Максим Валерьевич

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность исследования

В диагностику инфекционных заболеваний активно внедряются методы амплификации нуклеиновых кислот (Brolund A. et al., 2010; Gröbner S. et al., 2009; Liotti F.M. et al., 2019; Monteiro J. et al., 2012). Новые методы диагностики, направленные на быструю и точную идентификацию возбудителей инфекций и определение их чувствительности к антибактериальным препаратам (АБП), обладающие высокой чувствительностью и специфичностью, имеют важное значение для диагностики и лечения инфекций.

Инфекции мочевыводящих путей (ИМП) являются одними из самых распространенных инфекционных заболеваний во всем мире. В России распространенность ИМП составляет порядка 1000 случаев на 100000 населения (Лоран О.Б. и др., 2008). Риск развития ИМП зависит от пола, возраста пациента, наличия сопутствующих заболеваний и патологии мочевыводящих путей. ИМП регистрируется значительно чаще у женщин, чем у мужчин. В течение жизни до 60% женщин сталкиваются хотя бы с одним эпизодом ИМП. У каждой четвертой пациентки в течение года ИМП рецидивирует (Nicolle L.E, 2008). Особую группу составляют беременные женщины, у которых ИМП нередко осложняют течение беременности, родов, послеродового периода, а также влияют на состояние плода и здоровье новорожденного (Никонов, А.П. и др., 2007; Glaser A.P. et al., 2015; Yan L. et al., 2018).

В подавляющем большинстве случаев возбудителями ИМП являются уропатогенные энтеробактерии - бактерии семейства *Enterobacteriaceae*, главным образом, *Escherichia coli* и *Klebsiella* spp. Значительно реже ИМП могут вызываться грамположительными бактериями, такими как *Staphylococcus* spp. (главным образом, *Staphylococcus saprophyticus*) и *Enterococcus* spp. (Flores-Mireles A.L. et al., 2018).

Клинико-лабораторная диагностика ИМП основывается на данных клинического обследования и результатах лабораторных исследований. В настоящее время культуральное исследование мочи является основным методом диагностики ИМП, выполняемым в бактериологической лаборатории для выделения и идентификации уропатогена, а также определения чувствительности к АБП (Козлов Р.С., 2014). Этот анализ обычно занимает 48-72 часа. Внедрение автоматизированных систем ALFRED 60 AST (Alifax, Италия), BD Phoenix (Becton Dickinson, США), VITEK-2 (BioMerieux, Франция) и MicroScan (Beckman, США) значительно повышает эффективность лабораторных исследований и сокращает время получения результата (Romero-Gómez M.P. et al., 2012; Van den Poel B. et al., 2020).

Основным методом лечения ИМП является антибактериальная терапия, которая направлена на специфическое подавляющее действие против основных возбудителей мочевой инфекции (Перепанова Т.С. и др., 2017; Bonat G. et al., 2018). Лечение ИМП начинается, как

правило, эмпирически, до получения результатов бактериологического исследования мочи, с последующим направленным применением антибиотиков.

В последние годы отмечается устойчивая тенденция к повышению резистентности возбудителей ИМП к антибактериальным препаратам (АБП), традиционно применяемым в терапии этих инфекций, что может приводить к неблагоприятным клиническим исходам, ввиду неэффективности применяемого антибиотика (Палагин И.С. и др., 2019; Ny S. et al., 2019; Rafalskiy V. et al., 2020). Увеличение числа резистентных штаммов микроорганизмов к бета-лактамам антибиотикам (БЛА) в первую очередь обусловлено продукцией ферментов бета-лактамаз, особенно бета-лактамаз расширенного спектра действия (БЛРС), которая является одним из наиболее важных и клинически значимых механизмов устойчивости (Rawat D. et al., 2010; Ruppé É. et al., 2015). По результатам исследований «ДАРМИС», проведенных в 2010-2011 и 2018 годах, среди взрослой популяции был отмечен статистически значимый рост доли штаммов, продуцирующих БЛРС, с 8,5% до 27,0% (Палагин И.С. и др., 2019). В связи с ростом БЛРС-продуцирующих энтеробактерий, широкое применение получают карбапенемы. Важной угрозой, которая требует пристального внимания, является появление устойчивости к карбапенемам у энтеробактерий, опосредованной металл-бета-лактамазами (Rawat D. et al., 2010; Ruppé É. et al., 2015).

К числу основных путей сдерживания растущей резистентности к АБП относятся быстрая этиологическая диагностика, регулярный мониторинг антибиотикорезистентности и ограничение использования эмпирической антибиотикотерапии в пользу этиотропной терапии с учетом профиля антибиотикорезистентности возбудителя. Это также чрезвычайно важно в контексте утвержденного плана по реализации Стратегии предупреждения распространения антимикробной резистентности, которая включает в себя проведение научных исследований, результаты которых позволят оптимизировать использование антибактериальных препаратов (Стратегия предупреждения распространения антимикробной резистентности в Российской Федерации на период до 2030 года, 2017).

Своевременная и точная идентификация и определение чувствительности к уропатогенов к АБП имеет ключевое значение для лечения ИМП, особенно в современных условиях неуклонного повышения уровня резистентности к антибиотикам (Палагин И.С. и др., 2019; Ny S. et al., 2019; Rafalskiy V. et al., 2020). Возможность новых диагностических тестов работать непосредственно с образцами мочи без ущерба для чувствительности и специфичности по сравнению со стандартными методами диагностики имеет первостепенное значение, так как первоначальный культуральный метод исследования мочи является наиболее трудоемким этапом диагностической работы. Разработка и внедрение новых методик на основе количественного анализа ДНК возбудителей ИМП в моче, обладающих высокой

чувствительностью и специфичностью, позволит сократить сроки выявления этиологического агента. Выявление генетических детерминант антибиотикорезистентности непосредственно из проб мочи с использованием методов амплификации нуклеиновых кислот является актуальной клинической и эпидемиологической задачей и будет способствовать своевременному и правильному назначению антибиотикотерапии и, в конечном итоге, сдерживанию растущей антибиотикорезистентности.

Степень разработанности темы исследования

Развитие не зависящих от этапа культивирования бактерий молекулярных технологий, в первую очередь диагностики на основе полимеразной цепной реакции (ПЦР), произвело революцию в диагностике инфекционных заболеваний. Разработанные молекулярные тесты оказались эффективными для идентификации патогенов и потенциальных генов резистентности, но еще остаются проблемы с их использованием в диагностике ИМП. Предложенные исследователями ПЦР-тесты для выявления возбудителей ИМП предоставляют только качественные данные, указывающие на присутствие уропатогенов, но не на их концентрацию (Hansen W.L.J. et al., 2013; 116. van der Zee A. et al., 2016). Однако при диагностике ИМП важное значение имеет количественное определение уропатогенов в образце мочи для принятия клинических решений и отличия истинной инфекции от контаминации.

Выявление генетических детерминант антибиотикорезистентности непосредственно в клиническом материале (первичных пробах мочи) с помощью быстрых молекулярных методов позволило бы не только повысить эффективность ведения пациентов с ИМП, но также, за счет снижения использования эмпирической терапии, понизить темпы роста антибиотикорезистентности микроорганизмов. На протяжении последних лет ведутся активные поиски молекулярных мишеней, выявление которых с высокой точностью предсказывало бы резистентный фенотип, и в этой области уже достигнут определенный прогресс (Carver P.L. et al, 2008; Gröbner S. et al, 2009; Monteiro J. et al., 2012). Однако препятствиями к успешному решению этой задачи являются сложность и разнообразие механизмов антибиотикорезистентности у грамотрицательных бактерий, к числу которых относится большинство уропатогенов, а также случаи несоответствия генотипа и фенотипа.

Разработка и внедрение быстрых и точных методов выявления возбудителей ИМП и определения их профилей резистентности, которые дадут возможность своевременной диагностики и лечения ИМП, послужили основанием для выполнения данного исследования.

Цель исследования

Определить профили и генетические детерминанты антибиотикорезистентности возбудителей инфекций мочевыводящих путей у женщин репродуктивного возраста и

разработать способ экспресс-анализа мочи на гены бета-лактамной резистентности уропатогенных энтеробактерий с применением молекулярно-биологического метода

Задачи исследования

1. Определить показатели антибиотикорезистентности уропатогенов и продукции бета-лактамаз расширенного спектра с применением диско-диффузионного метода в популяции женщин репродуктивного возраста с внебольничными инфекциями мочевыводящих путей в Санкт-Петербурге;

2. Оценить частоту генов различных бета-лактамаз в изолятах уропатогенных энтеробактерий и первичных пробах мочи;

3. Разработать способ экспресс-анализа мочи на гены бета-лактамной резистентности уропатогенных бактерий и определить чувствительность, специфичность, прогностическую значимость положительных и отрицательных результатов по сравнению с результатами фенотипического (диско-диффузионного) метода;

4. Разработать критерии клинически значимой бактериурии при анализе первичных проб мочи методом количественной ПЦР в реальном времени для диагностики пиелонефрита;

5. На основе молекулярно-биологического метода разработать диагностический алгоритм экспресс-анализа мочи для выявления клинически значимой бактериурии и бета-лактамной резистентности возбудителей инфекций мочевыводящих путей.

Научная новизна

Определена чувствительность уропатогенов к основным антибактериальным препаратам, используемым для лечения ИМП (аминопенициллины, цефалоспорины, карбапенемы, фторхинолоны, фосфомицин, нитрофурантоин) в популяции женщин репродуктивного возраста с внебольничными инфекциями мочевыводящих путей в Санкт-Петербурге.

Впервые определена частота генов целого ряда бета-лактамаз уропатогенных энтеробактерий в популяции женщин репродуктивного возраста с внебольничными инфекциями мочевыводящих путей в Санкт-Петербурге.

Впервые разработаны критерии клинически значимого количества ДНК энтеробактерий для диагностики пиелонефрита, выявляемые при ПЦР-исследовании первичных проб мочи. По сравнению с количественным культуральным исследованием мочи чувствительность и специфичность данного ПЦР-анализа составили 99% и 99,5%, соответственно.

Впервые предложен способ экспресс-анализа мочи на гены бета-лактамаз для определения фенотипической резистентности уропатогенных энтеробактерий к амоксициллину/клавуланату и/или цефалоспорином широкого спектра чувствительность и специфичность которого составили 97% и 89%, соответственно (получен патент на изобретение

№ 2738854 «Способ экспресс-анализа мочи на гены бета-лактамной резистентности уропатогенных бактерий у беременных женщин с пиелонефритом» (заявка №2020121910 от 26.06.2020).

Впервые разработан диагностический алгоритм ПЦР-анализа проб мочи, направленный на быстрое определение клинически значимой бактериурии и генов бета-лактамаз уропатогенных энтеробактерий у женщин репродуктивного возраста

Теоретическая значимость

Получены молекулярно-эпидемиологические данные о распространенности генов бета-лактамаз среди уропатогенных энтеробактерий и определяемых ими фенотипах, которые формируют теоретическую базу для разработки и внедрения быстрых молекулярных тестов для анализа первичных проб клинического материала (без культивирования) на генетические детерминанты устойчивости к антибиотикам.

Разработан и теоретически обоснован экспресс-анализ мочи на гены бета-лактамной резистентности уропатогенных энтеробактерий, а также предложен диагностический алгоритм быстрого молекулярно-биологического анализа первичного клинического материала на ДНК патогенных микроорганизмов и генетические детерминанты резистентности к антибиотикам, схема построения которого может быть использована при других инфекционных заболеваниях.

Практическая значимость

Полученные в исследовании данные об уровне резистентности к антибактериальным препаратам среди внебольничных штаммов Enterobacterales и частоте определяющих ее генов в популяции женщин репродуктивного возраста дают возможность объективной оценки эффективности стандартных схем эмпирической терапии инфекций мочевыводящих путей, что особенно актуально в акушерской популяции ввиду ограниченности выбора антибиотиков при беременности.

Проведена разработка критериев количественного определения ДНК основных уропатогенов для диагностики пиелонефрита с применением молекулярно-биологического теста, который может использоваться в качестве высоко чувствительной и специфичной альтернативы классическим культуральным методам.

Разработанный диагностический алгоритм экспресс-анализа мочи для выявления клинически значимой бактериурии и бета-лактамной резистентности возбудителей инфекций мочевыводящих путей с применением молекулярно-биологического метода у женщин репродуктивного возраста позволяет существенно сократить время исследования и повысить эффективность терапии за счет использования этиотропных препаратов с учетом чувствительности к ним выявленных возбудителей.

Положения, выносимые на защиту:

1. Экспресс-анализ первичных проб мочи на гены бета-лактамной резистентности уропатогенных энтеробактерий на основе ПЦР-анализа является эффективным для быстрой оценки антибиотикорезистентности бактерий

2. Разработанный диагностический алгоритм ПЦР-анализа первичных проб мочи для выявления клинически значимой бактериурии и генетических детерминант антибиотикорезистентности позволяет существенно сократить время исследования и своевременно начать эффективную (этиотропную с учетом антибиотикочувствительности возбудителя) терапию

Методология и методы исследования

Диссертационная работа выполнялась с соблюдением всех правил научных исследований и строилась на принципах биоэтики. Для реализации цели исследования и обоснования основных положений были использованы теоретический анализ литературы, лабораторные методы (культуральный метод, молекулярно-биологические методы) и методы статистической обработки данных.

Степень достоверности и апробация результатов исследования

Достоверность полученных результатов обеспечена теоретическим анализом проблемы, репрезентативным объёмом выборок обследованных пациентов (всего обследовано 994 женщины, из них 145 с установленным диагнозом ИМП и 849 женщин, у которых отсутствовали клинические и лабораторные признаки ИМП), достаточным количеством проведенных лабораторных исследований с использованием современных методов диагностики (культуральных, молекулярно-биологических). Всего проанализировано 994 первичные пробы мочи и 145 штаммов уропатогенов. Полученные в ходе исследования данные обработаны с использованием современных методов статистического анализа.

Основные положения работы, а также содержание её отдельных этапов были представлены на VIII Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Молекулярная диагностика – 2014» (Москва, 2014); XXVI Европейском Конгрессе по перинатальной медицине (ЕСРМ 2018) (Санкт-Петербург, 2018); XIII междисциплинарной научно-практической конференции «Актуальные вопросы урологии и гинекологии» (Санкт-Петербург, 2018); II Национальном Конгрессе «Лабораторные технологии в репродуктивной медицине и неонатологии: от науки к практике» (Москва, 2020); II Общероссийской научно-практической конференции для акушеров-гинекологов «Отговские чтения» (Санкт-Петербург, 2020); Всероссийском конгрессе по медицинской микробиологии, эпидемиологии, клинической микологии и иммунологии (XXIII Кашкинские чтения) (Санкт-Петербург, 2020); VII

Общероссийской конференции с международным участием «Перинатальная медицина: от прегравидарной подготовки к здоровому материнству и детству» (Санкт-Петербург, 2021).

Результаты исследования внедрены в практику работы лаборатории клинической микробиологии ФГБНУ «НИИ АГиР им. Д.О.Отта» и отдела лабораторной диагностики ФГБУ «Всероссийский центр экстренной и радиационной медицины имени А.М. Никифорова» МЧС России.

Публикации

По материалам диссертации опубликовано 15 печатных работ, из них 3 статьи в рецензируемых научных изданиях, входящих в перечень ВАК для опубликования основных результатов диссертационных исследований, получен патент на изобретение.

Личное участие автора

Диссертант лично участвовала в планировании и организации работы, проведении лабораторных исследований, обработке, анализе, обобщении, подготовке научных публикаций, текста диссертации и автореферата.

Структура и объем работы

Материалы диссертации изложены на 116 страницах и включают введение, обзор литературы, материалы и методы исследования, результаты собственных исследований, обсуждение результатов, выводы, практические рекомендации и список литературы. Работа иллюстрирована 18 рисунками и 18 таблицами. Список литературы состоит из 117 публикаций, из них 22 – отечественных источника и 95 – зарубежных.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Обследуемая группа и дизайн исследования

В исследование включены беременные и небеременные женщины репродуктивного возраста, которые наблюдались акушером-гинекологом в ФГБНУ «Научно-исследовательский институт акушерства, гинекологии и репродуктологии им. Д.О. Отта». Всего обследовано 994 женщины, из них 145 с установленным диагнозом ИМП и 849 женщин, у которых отсутствовали клинические и лабораторные признаки ИМП.

Диссертационная работа выполнена в два этапа.

На первом этапе был проведен анализ первичных проб мочи и выделенных штаммов уропатогенов с целью определения спектра уропатогенов, профилей и детерминант антибиотикорезистентности. На данном этапе были использованы штаммы уропатогенов, выделенные из мочи пациенток родовых отделений НИИАГиР им. Д.О. Отта с диагнозом ИМП при рутинном бактериологическом исследовании мочи, а также первичные пробы мочи от этих женщин. Критериями включения явились: репродуктивный возраст пациенток, наличие клинической картины одной из нижеперечисленных внебольничных инфекций мочевыводящих

путей (острый цистит, обострение рецидивирующего цистита, острый пиелонефрит, обострение хронического пиелонефрита, бессимптомная бактериурия), выделение уропатогена в диагностически значимом титре ($\geq 10^3$ при цистите, $\geq 10^4$ при пиелонефрите и $\geq 10^5$ КОЕ/мл при бессимптомной бактериурии). Критериями исключения служили: указание в анамнезе на госпитализацию в стационар любого профиля по любому показанию в течение последних 3-х месяцев до развития настоящего эпизода инфекции и терапия антибактериальными препаратами в течение ≥ 24 часов до момента получения мочи для бактериологического исследования.

Штаммы уропатогенов и первичные пробы мочи были получены от 145 женщин репродуктивного возраста с установленными ИМП: 86 беременных женщин в возрасте от 19 до 47 лет (медиана 31 год) и 59 небеременных женщин в возрасте от 21 до 50 лет (медиана 32 года). Группы беременных и небеременных не различались по возрасту ($P=0,302$). Среди нозологических вариантов внебольничных ИМП доля бессимптомной бактериурии составила 32%, цистита – 33%, пиелонефрита – 35%.

На втором этапе проводили анализ первичных проб мочи с целью разработки молекулярных критериев значимой бактериурии, т.е. критериев, полученных при использовании метода количественной ПЦР. Всего обследован 967 женщин. Для определения клинически значимых концентраций ДНК бактерий был использован ROC-анализ (ROC – receiver operating characteristic). В качестве референтных отрицательных образцов использовали пробы мочи ($n=849$), полученные от пациенток родовых отделений НИИАГиР им. Д.О. Отта для рутинного бактериологического исследования, у которых отсутствовали клинические и лабораторные признаки ИМП. Возраст этих пациенток варьировал от 17 до 49 лет (медиана 31 год). В качестве референтных положительных образцов использовали 118 первых проб мочи, включенных в исследование на первом этапе, в которых были обнаружены значимые количества микроорганизмов.

Материалы и методы исследования

Клиническим материалом для исследования служила средняя порция утренней свободно выпущенной мочи.

Культуральное исследование. Бактериологическое исследование клинического материала проводилось с использованием универсальной питательной среды (кровяного агара) с определением числа микробных клеток в 1 мл мочи. Идентификацию выделенных микроорганизмов до вида осуществляли с применением масс-спектрометрического анализа с использованием времяпролетной масс-спектрометрии (MALDI-TOF MS, BRUKER Daltonics, Германия).

Определение чувствительности к антибактериальным препаратам (АБП) проводили диско-диффузионным методом в соответствии с требованиями Европейского комитета по определению чувствительности к АМП. Внутренний контроль качества определения чувствительности осуществляли с использованием контрольного штамма *E. coli* ATCC 25922. Интерпретацию результатов тестирования проводили согласно критериям EUCAST версия 10.0 (The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing).

Все изоляты энтеробактерий, у которых была выявлена резистентность (категория умеренно-резистентный или резистентный) к одному из тестируемых цефалоспоринов были протестированы на выявление БЛРС методом «двойных дисков» с использованием набора дисков производства ФБУН «НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера» (Санкт-Петербург).

Метод амплификации нуклеиновых кислот. Экстракцию ДНК из клинического материала проводили с использованием набора «РИБО-сорб» (ФБУН «Центральный НИИ эпидемиологии» Роспотребнадзора), экстракцию ДНК из культур микроорганизмов проводили с помощью набора РИБО-преп (ФБУН «ЦНИИ эпидемиологии», Москва).

Выявление генов БЛРС группы СТХ-М, генов карбапенемаз КРС и ОХА-48, и металло-бета-лактамаз проводили методом ПЦР в реальном времени с использованием тестов АмплиСенс ESBL СТХ-М-FL, АмплиСенс MDR КРС/ОХА-48-FL и АмплиСенс MDR MBL-FL (ФБУН «Центральный НИИ эпидемиологии» Роспотребнадзора), соответственно, в амплификаторе «Rotor-Gene 6000». Определение генов бета-лактамаз групп AmpC (МОХ, СМУ, LAT, ВIL, ДНА, АСС, МIР, АСТ, FОХ), ТЕМ, SHV, ОХА проводили методом ПЦР с электрофоретической детекцией с использованием опубликованных праймеров, чувствительность и специфичность которых была оценена с использованием целого ряда лабораторных и клинических штаммов уропатогенов. Праймеры были синтезированы в ЗАО Евроген (Москва).

Образцы мочи анализировали методом количественной мультиплексной ПЦР в реальном времени с применением наборов реагентов «АмплиСенс» серии «ИМП» (ФБУН «ЦНИИ эпидемиологии», Москва), предназначенных для оценки содержания общей бактериальной ДНК, ДНК *Enterobacteriaceae*, ДНК *E. coli*, ДНК *Klebsiella pneumoniae*, ДНК *Proteus* spp., ДНК *Staphylococcus saprophyticus*, ДНК *Pseudomonas aeruginosa*, ДНК *Staphylococcus* spp., ДНК *Streptococcus* spp. и ДНК *Enterococcus* spp. Концентрацию ДНК бактерий рассчитывали в ГЭ (геномных эквивалентах) в 1 мл мочи.

Статистический анализ результатов. Для анализа различий между частотными показателями использовали точный критерий Фишера (если сравнивались две переменные и какое-либо число в таблице сопряжения было меньше 5) или критерий хи-квадрат Пирсона (в

остальных случаях). Анализ различий между количественными показателями производили путем расчета критерия Манна-Уитни. Для определения клинически значимых концентраций ДНК бактерий использовали ROC-анализ (ROC – receiver operating characteristic). Клинически значимой считали концентрацию ДНК в координате ROC-кривой, соответствующей оптимальному пороговому значению, которое определяли по максимальному значению индекса Юдена (рассчитывается по сумме чувствительности и специфичности в каждой координате ROC-кривой). Диагностические характеристики теста на выявление генов бета-лактамаз для определения резистентности Enterobacteriaceae к бета-лактамам антибиотикам определяли с помощью таблицы сопряженности 2×2 . Статистический анализ результатов осуществляли с использованием статистического пакета Analyse-Itfor Microsoft Excel 5.11 (Analyse-it Software, Leeds, UK). Во всех случаях различия считались статистически значимыми при значении $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Спектр возбудителей инфекций мочевыводящих путей

Всего было проанализировано 145 штаммов бактерий. Структура возбудителей ИМП, выделенных от женщин репродуктивного возраста представлена на рис. 1. Энтеробактерии составили в общей сложности 81% от всех выделенных уропатогенов. *E. coli* являлась самым частым возбудителем ИМП и была выделена у 66% женщин. Частота выделения *Klebsiella* spp. составила 12%, в 3% случаев были выделены другие представители энтеробактерий (*Proteus* spp, *Enterobacter aerogenes* и *Morganella morganii*). Кроме энтеробактерий были выделены *S. agalactiae* (6%), *Enterococcus* spp. (8%), *S. saprophyticus* (4%) и в 1% случаев *S. oralis*.

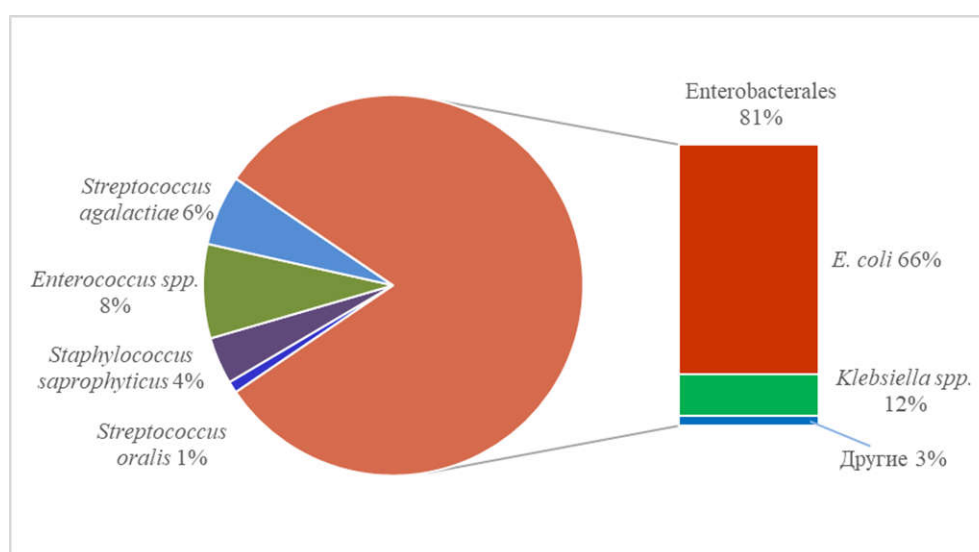


Рис. 1 Структура возбудителей внебольничных ИМП, выделенных у женщин репродуктивного возраста

Фенотипическая резистентность уропатогенов

В связи с доминированием *E. coli* и других энтеробактерий в этиологической структуре ИМП, наибольший практический интерес представляют данные по чувствительности выделенных возбудителей порядка *Enterobacterales* (рис.2). Наибольшей активностью обладали меропенем (100%), фосфомицин (99%), нитрофурантоин (99%) и гентамицин (95%). Чувствительность к различным цефалоспорином варьировала в диапазоне 79,0-84,0%. Наименьшую *in vitro* активность продемонстрировали ампициллин (56,0%) и амоксициллин/клавуланат (72,0%). Чувствительность к ципрофлоксацину и офлоксацину составила 79,0% и 77,0% соответственно, к триметоприму/сульфаметоксазолу – 80,0 %.

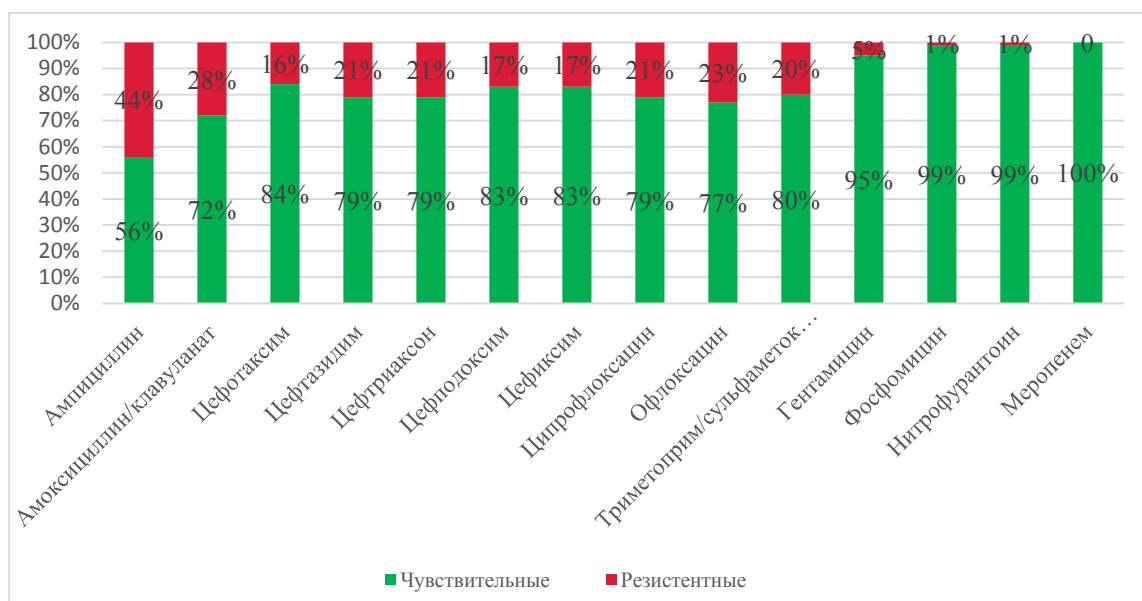


Рис. 2 Чувствительность изолятов порядка *Enterobacterales*, выделенных от женщин репродуктивного возраста

В отношении других возбудителей ИМП (*Staphylococcus* spp., *Enterococcus* spp., *S. agalactiae*, *S. oralis*), выделенных в нашем исследовании, не было выявлено ни одного штамма, резистентного к тестируемым АБП. Таким образом, чувствительность этих микроорганизмов ко всем АБП составила 100%.

Изоляты энтеробактерий, у которых была выявлена резистентность (категория умеренно-резистентный или резистентный) к одному из цефалоспоринов (цефотаксим, цефтазидим, цефтриаксон, цефподоксим) были протестированы на выявление продукции БЛРС фенотипическим методом. Было выявлено 15 (13,0%) штаммов (12 штаммов *E. coli* (12,0%) и 3 штамма *Klebsiella* spp. (16,7%)), продуцирующих БЛРС. При этом в группе беременных было обнаружено 6 штаммов уропатогенной *E. coli* и 2 штамма *Klebsiella* spp, продуцирующих БЛРС; в группе небеременных женщин – 6 штаммов *E. coli* и 1 штамм *Klebsiella* spp соответственно.

Статистических различий в показателях резистентности и продукции БЛРС среди беременных женщин и небеременных женщин не выявлено.

Генетические детерминанты антибиотикорезистентности возбудителей инфекций мочевыводящих путей

Для выявления генетических детерминант резистентности к АБП, наиболее часто применяемым для лечения ИМП (ингибиторозащищенные пенициллины, цефалоспорины широкого спектра) и препаратам группы карбапенемов, было проведено тестирование 116 первичных проб мочи и изолятов Enterobacterales, выделенных из этих проб. Генетические детерминанты резистентности, обусловленные наличием TEM-бета-лактамаз, были обнаружены в 31 изоляте уропатогенов (26,7%), SHV – в 17 изолятах (14,6%), CTX-M типа – в 15 изолятах (12,9%), гена DHA – в 2 (1,7%). Остальные генетические детерминанты резистентности (MOX, CMY, LAT, BIL, ACC, MIR, ACT, FOX, группа KPC, группа OXA-подобных, VIM, IMP, NDM) не были обнаружены ни в одном изоляте Enterobacterales.

Все первичные пробы мочи, из которых были выделены уропатогены, с применением метода ПЦР, были также протестированы на гены бета-лактамаз. Гены бета-лактамаз CTX-M типа, TEM, SHV и DHA, обнаруженные в изолятах уропатогенов, были также обнаружены в пробах мочи, из которых они были выделены. Все остальные бета-лактамазы не были обнаружены ни в изолятах Enterobacterales ни в первичных пробах мочи. Таким образом, совпадение результатов составило 100% (табл.1).

Таблица 1

Обнаружение генетических детерминант антибиотикорезистентности возбудителей ИМП в изолятах уропатогенов и в первичных пробах мочи

Генетические детерминанты резистентности	Изоляты уропатогенов	Первичные пробы мочи	Количество проб, %
CTX-M	+	+	15 (12,9%)
	-	-	0
TEM	+	+	31 (26,7%)
	-	-	0
SHV	+	+	17 (14,6%)
	-	-	0
DHA	+	+	2 (1,7%)
	-	-	0
MOX, CMY, LAT, BIL, ACC, MIR, ACT, FOX, KPC, OXA-подобные, VIM, IMP, NDM	-	-	0

Далее нами было проведено сравнение фенотипа (результат фенотипической резистентности) и генотипа (наличие генов резистентности) для каждого изолята Enterobacterales. Результаты представлены в таблице. 2

Сравнение фенотипической резистентности и обнаружения генетических детерминант резистентности уропатогенных энтеробактерий

Сравнение резистентных фенотипов и генотипов уропатогенных энтеробактерий						
Уропатоген	Резистентный фенотип		Резистентный генотип			Всего штаммов
	Амоксициллин/ клавуланат	Цефалоспорины широкого спектра	СТХ-М	TEM	DHA	
<i>E. coli</i>	-	-	-	-	-	58
<i>E. coli</i>	-	-	-	+	-	9
<i>E. coli</i>	+	-	-	-	-	1
<i>E. coli</i>	+	-	-	-	+	1
<i>E. coli</i>	+	-	-	+	-	13
<i>E. coli</i>	-	+	+	-	-	1
<i>E. coli</i>	+	+	+	-	-	5
<i>E. coli</i>	+	+	+	+	-	6
<i>E. coli</i>	+	+	-	-	+	1
<i>E. coli</i>	+	+	-	+	-	1
<i>K. pneumoniae</i>	-	-	-	-	-	15
<i>K. pneumoniae</i>	+	+	+	+	-	2
<i>K. oxytoca</i>	+	+	+	-	-	1
<i>Proteus spp.</i>	-	-	-	-	-	2

В 75 случаях были выделены уропатогены, чувствительные ко всем тестируемым бета-лактамам антибиотикам. Среди этих штаммов гены резистентности обнаружены не были. У 9 штаммов *E. coli*, чувствительных ко всем тестируемым антибиотикам, был обнаружен ген бета-лактамазы TEM. Фенотипически резистентность к амоксициллину/клавуланату и/или цефалоспорином широкого спектра действия была выявлена у 32 изолятов – 29 *E. coli*, 2 *K. pneumoniae* и 1 *K. oxytoca*. В 31 из этих изолятов были выявлены гены исследуемых типов бета-лактамаз (СТХ-М, TEM, DHA) по отдельности или в сочетаниях и в одном случае не был обнаружен ни один из исследуемых генов.

Разработка теста для экспресс-анализа мочи на гены бета-лактамной резистентности уропатогенных энтеробактерий у женщин

В связи с тем, что бета-лактамы антибиотиков являются основными препаратами для лечения пиелонефрита (особенно во время беременности), а распространенность детерминант резистентности к ним среди энтеробактерий высока, одной из задач нашего исследования было разработать ПЦР-анализ мочи на гены бета-лактамной резистентности уропатогенных энтеробактерий у женщин репродуктивного возраста.

Фенотипически резистентность к амоксициллину/клавуланату и/или цефалоспорином широкого спектра действия была выявлена у 32 изолятов – 28 *E. coli*, 2 *K. pneumoniae* и 1 *K. oxytoca*. В 31 из этих изолятов были выявлены гены исследуемых типов бета-лактамаз (СТХ-М, ТЕМ, ДНА) по отдельности или в сочетаниях. Для того, чтобы оценить, насколько точно наличие данных генов резистентности может предсказывать фенотипическую резистентность к БЛА мы сравнили результаты определения генотипа и фенотипа резистентности и рассчитали диагностические характеристики предлагаемого подхода, т.е. чувствительность, специфичность, прогностическую значимость положительных и отрицательных результатов (табл. 3).

Из 32 штаммов с фенотипом резистентности к бета-лактамам в 31 были обнаружены гены резистентности (как минимум один из генов СТХ-М, ТЕМ, ДНА), и чувствительность, таким образом, составила 97%.

В 9 штаммах были обнаружены гены резистентности, но при этом фенотипически они были чувствительны к бета-лактамам. Таким образом, специфичность составила 89%.

Из 40 штаммов, содержащих гены резистентности, 31 проявили резистентный фенотип к бета-лактамам, и прогностическая значимость положительных результатов составила 78%.

Прогностическая значимость отрицательных результатов была очень высокой (99%): из 76 штаммов, в которых генов резистентности не выявлялись, 75 не имели резистентного фенотипа.

Таблица 3

Диагностические характеристики теста на присутствие генов бета-лактамаз для определения фенотипической резистентности уропатогенных энтеробактерий к амоксициллину/клавуланату и/или цефалоспорином широкого спектра

Гены бета-лактамаз СТХ-М и/или ТЕМ и/или ДНА	Фенотипическая резистентность к амоксициллину/клавуланату и/или цефалоспорином широкого спектра		
	Есть	Нет	Всего
Есть	31	9	40
Нет	1	75	76
Всего	32	84	116
Чувствительность	97% (31 из 32)		
Специфичность	89% (75 из 84)		
Прогностическая значимость положительных результатов	78% (31 из 40)		
Прогностическая значимость отрицательных результатов	99% (75 из 76)		

Определение клинически значимой бактериурии с применением количественной ПЦР в реальном времени

Основной клинической проблемой является лечение пиелонефрита, особенно у беременных женщин, поэтому были разработаны молекулярные критерии клинически значимого количества ДНК уропатогенных энтеробактерий при выявлении бактериурии $\geq 10^4$ КОЕ/мл. Всего было протестировано 967 проб мочи, полученных от пациенток родовых отделений НИИАГиР им. Д.О. Отта для рутинного бактериологического исследования. Из них 118 проб от пациенток с ИМП и 849 – от пациенток без ИМП и без значимой бактериурии.

Пороговые значения концентрации общей ДНК бактерий, ДНК *Enterobacteriaceae* и отдельных групп бактерий, определенные методом ROC-анализа, составили $\geq 1 \times 10^6$, $\geq 5 \times 10^5$ и $\geq 1 \times 10^5$ ГЭ/мл соответственно (табл.4). Показатели чувствительности и специфичности выявления ДНК энтеробактерий методом количественной ПЦР в реальном времени позволяют выявить бактериурию, значимую при пиелонефрите ($\geq 10^4$ КОЕ/мл), с чувствительностью 99% и специфичностью 99,5%. Показатели чувствительности и специфичности выявления бактериурии $\geq 10^4$ КОЕ/мл с применением количественной ПЦР в реальном времени для большинства видов / групп бактерий составили от 97,9 до 100%. Чувствительность и специфичность методики в целом, т. е. выявление всех определяемых бактерий/групп бактерий с использованием установленных для них порогов, составили 98,2% и 97 % соответственно.

Таблица 4

Чувствительность и специфичность выявления клинически значимой бактериурии $\geq 10^4$ КОЕ/мл с применением количественной ПЦР в реальном времени

Параметры бактериурии	Площадь под ROC-кривой	Оптимальный порог (ГЭ/мл)	Чувствительность, %	Специфичность, %
Энтеробактерии $\geq 10^4$ КОЕ/мл	0,999	$\geq 5 \times 10^5$	99,0	99,5
<i>Escherichia coli</i> $\geq 10^4$ КОЕ/мл	0,999	$\geq 1 \times 10^5$	98,7	97,9
<i>Klebsiella pneumoniae</i> $\geq 10^4$ КОЕ/мл	1,000	$\geq 1 \times 10^5$	100	100
<i>Proteus</i> spp. $\geq 10^4$ КОЕ/мл	1,000	$\geq 1 \times 10^5$	100	100
<i>Enterococcus</i> spp. $\geq 10^4$ КОЕ/мл	0,997	$\geq 1 \times 10^5$	90,0	99,7
<i>Streptococcus</i> spp. $\geq 10^4$ КОЕ/мл	0,999	$\geq 1 \times 10^5$	100	99,6
<i>Staphylococcus saprophyticus</i> $\geq 10^4$ КОЕ/мл	1,000	$\geq 1 \times 10^5$	100	100
<i>Staphylococcus</i> spp. $\geq 10^4$ КОЕ/мл	0,997	$\geq 1 \times 10^5$	100	99,5
Все определяемые виды/группы бактерий	-	-	98,2	97,0

Диагностический алгоритм экспресс-анализа мочи для выявления клинически значимой бактериурии и бета-лактамной резистентности возбудителей инфекций мочевыводящих путей с применением молекулярно-биологического метода

Нами разработан алгоритм быстрого молекулярно-биологического анализа первичного клинического материала (мочи) на ДНК патогенных микроорганизмов и гены бета-лактамной резистентности уропатогенных энтеробактерий у женщин с применением молекулярно-биологического метода. Особую практическую значимость данный алгоритм будет иметь при ведении беременных женщин с инфекциями верхних отделов мочевыводящих путей (пиелонефрит) ввиду того, что выбор антибиотиков при данной патологии у беременных женщин ограничен бета-лактамными антибиотиками, а распространенность детерминант резистентности к ним среди энтеробактерий высока.

Диагностический алгоритм экспресс-анализа мочи для выявления клинически значимой бактериурии и бета-лактамной резистентности возбудителей инфекций мочевыводящих путей с применением молекулярно-биологического метода



Рис. 3. Диагностический алгоритм экспресс-анализа мочи для выявления клинически значимой бактериурии бета-лактамной резистентности возбудителей ИМП с применением молекулярно-биологического метода у женщин репродуктивного возраста

Для выявления этиологического агента и наличия генов резистентности пробу мочи, полученную от женщины с клинико-лабораторными признаками инфекции верхних отделов мочевыводящих путей (пиелонефрита), направляют на исследование методом ПЦР. В случае обнаружения ДНК энтеробактерий в количестве менее 5×10^5 ГЭ/мл рекомендуется назначение эмпирической терапии. В этом случае уропатогеном являются не энтеробактерии, а другие микроорганизмы, как правило, представители грамположительной микрофлоры, в большинстве случаев чувствительные к БЛА.

В случае обнаружения ДНК энтеробактерий в количестве равном или превышающем 5×10^5 ГЭ/мл проводят последующий ПЦР-анализ той же пробы ДНК на гены бета-лактамаз CTX-M, TEM и DNA. В зависимости от результата теста можно сделать предположение об эффективности бета-лактаменных антибиотиков:

1. Гены бета-лактамаз CTX-M, TEM и DNA не обнаружены – с большой долей вероятности лечение амоксициллином/клавулановой кислотой и цефалоспоридами будет эффективным;

2. Обнаружены гены бета-лактамаз CTX-M и/или TEM и/или DNA – с большой долей вероятности лечение амоксициллином/клавулановой кислотой и цефалоспоридами будет неэффективным.

Необходимо отметить, что в задачи данного исследования не входила разработка мультиплексного теста для выявления уропатогенных энтеробактерий и значимых генов резистентности «в одной ПЦР пробирке», так как разработка такого теста и его валидация заслуживают отдельной работы. Однако, даже с учетом того, что для молекулярно-биологического исследования проб мочи мы использовали несколько тестов (разработанных другими авторами), продолжительность анализа варьировала в диапазоне 3-3,5 ч, что несопоставимо ниже продолжительности культурального исследования (48-72 часа). В данной работе мы планировали концептуальную разработку подхода к молекулярно-биологическому анализу первичных проб мочи с целью быстрого выявления значимой бактериурии и детерминант антибиотикорезистентности, значимых в обследуемой популяции. Это определило структуру данной работы: 1) мы охарактеризовали спектр возбудителей ИМП в обследуемой популяции, 2) проанализировали их чувствительность к антимикробным препаратам и показали высокую частоту бета-лактаменной резистентности среди энтеробактерий (в отсутствие проблемы резистентности других уропатогенов к стандартно назначаемым препаратам), 3) определили детерминанты резистентности, наиболее точно предсказывающие резистентные фенотипы выделенных штаммов, 4) показали, что первичные пробы мочи и выделенные из них штаммы уропатогенов содержат одни и те же гены резистентности.

Таким образом, разработка количественных критериев значимости выявленной ДНК уропатогенов с применением количественной ПЦР в реальном времени и определение набора наиболее точных генетических маркеров бета-лактаменной резистентности уропатогенных энтеробактерий позволили нам разработать алгоритм быстрой оценки значимой бактериурии и бета-лактаменной резистентности энтеробактерий, имеющий потенциал важного клинического приложения при ведении беременных женщин с инфекциями верхних отделов мочевыводящих путей. Внедрение данного алгоритма в клиническую практику будет способствовать как улучшению клинических исходов, так и сдерживанию растущей антибиотикорезистентности.

ВЫВОДЫ

1. Наибольшей *in vitro* активностью в отношении представителей порядка Enterobacterales обладают фосфомицин (99%), нитрофурантоин (99%), меропенем (100%). Чувствительность к различным цефалоспорином варьирует в диапазоне 79-84%. Наименьшую *in vitro* активность (доля чувствительных микроорганизмов 80% и ниже) проявляют ампициллин, амоксициллин/клавуланат, триметоприм/сульфаметоксазол. Чувствительность к ципрофлоксацину и офлоксацину составляет 79% и 77%, соответственно. В отношении *Escherichia coli*, как основного уропатогена, максимальной активностью обладают нитрофурантоин (100%), фосфомицин (99%), меропенем (100%). Чувствительность к разным цефалоспорином варьирует в диапазоне 82-85%. Наименее активны *in vitro* (доля чувствительных микроорганизмов 80% и ниже) ампициллин, амоксициллин/клавуланат и триметоприм/сульфаметоксазол. Чувствительность *E. coli* к ципрофлоксацину и офлоксацину составляет 77% и 75%, соответственно.

2. Гены бета-лактамаз CTX-M типа выявлены в 15 случаях (13%) бактериурии, обусловленной энтеробактериями, TEM – в 31 случае (26,7%), SHV – в 17 случаях (14,6%), DHA – в 2 случаях (1,7%). Гены бета-лактамаз MOX, CMY, LAT, BIL, ACC, MIR, ACT, FOX, OXA-1, KPC, OXA-48, VIM, IMP, NDM не обнаружены ни в одной исследуемой пробе. Совпадение результатов тестирования первичных проб мочи и выделенных изолятов уропатогенов на наличие генов бета-лактамаз составляет 100%.

3. Выявление генов бета-лактамаз CTX-M и/или TEM и/или DHA предсказывает фенотипическую резистентность к бета-лактамамным антибиотикам (амоксициллину/клавуланату и/или цефалоспорином широкого спектра) с чувствительностью 97% и специфичностью 89%, прогностической значимостью положительных результатов 78% и прогностической значимостью отрицательных результатов 99%.

4. Анализ первичных проб мочи на ДНК энтеробактерий методом количественной ПЦР в реальном времени позволяет выявить бактериурию, значимую при пиелонефрите ($\geq 10^4$ КОЕ/мл), с чувствительностью 99% и специфичностью 99,5%. Для остальных видов/групп бактерий показатели чувствительности и специфичности значимой бактериурии $\geq 10^4$ КОЕ/мл варьируют от 99% до 100%. В целом, чувствительность и специфичность анализа первичных проб мочи для выявления всех уропатогенных бактерий/групп бактерий с порогом $\geq 10^4$ КОЕ/мл составила 98% и 97%, соответственно.

5. Внедрение диагностического алгоритма экспресс-анализа мочи с применением молекулярно-биологического метода для выявления клинически значимой бактериурии и генов бета-лактамаз возбудителей инфекций мочевыводящих путей позволит существенно сократить

время исследования и повысить эффективность терапии за счет использования этиотропных препаратов с учетом чувствительности к ним выявленных возбудителей.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

Специалистам клинической лабораторной диагностики, врачам акушерам-гинекологам, урологам многопрофильных медицинских учреждений, оказывающим специализированную медицинскую помощь женщинам репродуктивного возраста:

1. Молекулярно-биологический тест на основе ПЦР в режиме реального времени, предназначенный для количественного определения ДНК возбудителей инфекций мочевыводящих путей, рекомендуется в качестве высокочувствительной (98%) и высокоспецифичной (97%) альтернативы традиционным бактериологическим исследованиям.

2. Экспресс-анализ первичных проб мочи на гены бета-лактамной резистентности уропатогенных энтеробактерий на основе ПЦР-анализа рекомендуется для быстрой оценки антибиотикорезистентности бактерий, так как позволяет существенно сократить время исследования и повысить эффективность терапии.

3. Предложенный диагностический алгоритм экспресс-анализа мочи с применением молекулярно-биологического метода рекомендуется при ведении беременных женщин с инфекциями верхних отделов мочевыводящих путей ввиду того, что выбор препаратов для лечения данной патологии у беременных женщин ограничен бета-лактамными антибиотиками.

4. Ввиду возрастающей и существенно варьирующей в разных регионах и популяциях резистентности уропатогенных энтеробактерий к антибактериальным препаратам рекомендуется проведение регулярного локального мониторинга фенотипической и генотипической резистентности уропатогенов с целью актуализации эмпирических схем терапии.

ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШЕЙ РАЗРАБОТКИ ТЕМЫ

Необходимо дальнейшее проведение регулярного локального мониторинга фенотипической и генотипической резистентности уропатогенов с целью актуализации эмпирических схем терапии. Применение новых молекулярных тестов, направленных на быстрое выявление возбудителя ИМП и прогнозирование эффективности АБП при лечении этих инфекций, будет способствовать как улучшению клинических исходов, так и сдерживанию растущей антибиотикорезистентности.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи в научных журналах и изданиях, входящих в перечень рецензируемых научных журналов и изданий, рекомендованных ВАК Минобрнауки РФ для опубликования основных результатов диссертационных работ по специальности 14.03.10 – клиническая лабораторная диагностика

1. **Хуснутдинова Т.А.**, Шипицына Е.В., Савочкина Ю.А., Тимошина О.Ю., Рыбина Е.В., Гушин А.Е., Савичева А.М. Определение значимой бактериурии у беременных женщин методом количественной ПЦР в реальном времени// Журнал акушерства и женских болезней. – 2016. – Т. LXV. – N4. – С. 50-56.

2. Палагин И.С., Сухорукова М.В., Дехнич А.В., Эйдельштейн М.В., Перепанова Т.С., Козлов Р.С., Мугин М.Ю., Стребкова В.В., Аминова П.Г., Ветохина А.В., Сухорева М.В. Иванова И.А., Валиуллина И.Р., Частоедова А.Н., Широкова Т.М., Варибрус Е.В., Васильева И.Р., Доманская О.В., Беккер Г.Г., Кульчавеня Е.В., Плугин П.С., Попова Л.Д., Елохина Е.В., Коган М.И., Набока Ю.Л., Жестков А.В., Лямин А.В., **Хуснутдинова Т.А.**, Шипицына Е.В., Булкин А.Н., Москвитина Е.Н., Никифоровская Н.Н., Малев И.В., Варганова А.Н., Мартьянова Н.М., Быконя С.А., Волковская И.В., Малявин А.И., Сидорова Р.К., Хайдаршина Н.Э., Шамаева С.Х., Портнягина У.С., Ершова М.Г. Антибиотикорезистентность возбудителей внебольничных инфекций мочевых путей в России: результаты многоцентрового исследования «ДАРМИС-2018»// Клиническая микробиология и антимикробная терапия. – 2019. – Т. 21. – №. 2. – С.134-146.

3. **Хуснутдинова Т.А.**, Шипицына Е.В., Крысанова А.А., Савичева А.М. Профили и генетические детерминанты антибиотикорезистентности возбудителей внебольничных инфекций мочевыводящих путей у женщин репродуктивного возраста // Медицинский алфавит – 2021. – Т.18 – С. 12-15.

патент

4. **Хуснутдинова Т.А.**, Шипицына Е.В., Шалепо К.В., Крысанова А.А., Будилова О.В., Герасимова Е.Н., Савичева А.М. Патент 2738854 Российская Федерация, МПК G01N 33/58(2006.01), G01N 33/493(2006.01) «Способ экспресс-анализа мочи на гены бета-лактамной резистентности уропатогенных бактерий у беременных женщин с пиелонефритом» – № 2020121910; заявл. 26.06.2020; опублик. 17.12.2020. Электрон. версия печ. публ. Бюл. изобр. № 35. – Доступ с сайта ФГУ ФИПС.

Статьи в научных журналах, тезисы докладов в материалах конференций

5. **Хуснутдинова Т.А.**, Савочкина Ю.А., Шипицына Е.В., Савичева А.М. Оценка метода мультиплексной ПЦР в реальном времени для выявления возбудителей инфекций

мочевыводящих путей у беременных женщин// В сборнике: Молекулярная диагностика. Сборник трудов. Под редакцией В.И. Покровского. – 2014. – С. 242-245.

6. **Хуснутдинова Т.А.**, Савочкина Ю.А., Гушин А.Е., Шипицына Е.В., Савичева А.М. Применение количественной мультиплексной ПЦР в реальном времени для выявления возбудителей инфекций мочевыводящих путей у беременных женщин // Педиатр. – 2014. – Т. 5. – № 3. – С. 37-41.

7. Шипицына Е.В., **Хуснутдинова Т.А.**, Савичева А.М., Т.А. Айвазян / Инфекции мочевыводящих путей в акушерстве и гинекологии// Журнал акушерства и женских болезней. – 2015. – Т. LXIV. – №6. – С.91-104.

8. **Хуснутдинова Т.А.**, Савочкина Ю.А., Шипицына Е.В., Гушин А.Е., Савичева А.М. Применение метода мультиплексной ПЦР в реальном времени для выявления возбудителей инфекций мочевыводящих путей у беременных женщин // Материалы III Нац конгресса «Дискуссионные вопросы современного акушерства», СПб., 28-30 мая 2015. – Журнал акушерства и женских болезней. Спец выпуск. –Т. LXIV. – С. 107-108.

9. Тимошина О.Ю., Савочкина Ю.А., **Хуснутдинова Т.А.**, Шипицына Е.В., Савичева А.М. Выявление генов бета-лактамаз расширенного спектра у энтеробактерий при бактериурии у беременных женщин // В сборнике: Молекулярная диагностика 2017 сборник трудов IX Всероссийской научно-практической конференции с международным участием. – 2017. – С. 241-242.

10. **Хуснутдинова Т.А.**, Савочкина Ю.А., Шипицына Е.В., Тимошина О.Ю., Гушин А.Е., Савичева А.М. Применение метода мультиплексной ПЦР в реальном времени для выявления значимой бактериурии у беременных женщин // В сборнике: Молекулярная диагностика 2017 сборник трудов IX Всероссийской научно-практической конференции с международным участием. – 2017. – С. 368-369.

11. **Хуснутдинова Т.А.**, Шипицына Е.В., Савочкина Ю.А., Тимошина О.Ю., Гушин А.Е., Савичева А.М. Микробный спектр, профили и генетические детерминанты антибиотикорезистентности уропатогенов, выделенных у беременных женщин в Санкт-Петербурге // В сборнике: Молекулярная диагностика 2018 Сборник трудов Международной научно-практической конференции. – 2018. – С. 72-74.

12. **Хуснутдинова Т.А.** Инфекции мочевыводящих путей в акушерстве и гинекологии: актуальные вопросы диагностики и антибиотикотерапии // Журнал акушерства и женских болезней. – 2019. – Т. 68. – № 6 – С. 19-28.

13. **Хуснутдинова Т.А.** Профили и генетические детерминанты антибиотикорезистентности уропатогенных бактерий // Материалы Всероссийского конгресса по медицинской микробиологии, эпидемиологии, клинической микологии и иммунологии

(XXIII Кашкинские чтения), СПб. – Проблемы медицинской микологии. – 2020. – Т.22 – №3. – С. 143.

14. Elena Shipitsyna, **Tatiana Khusnutdinova**, Maria Razinkova, Olga Budilovskaya, Alexey Grigoriev, Yulia Savochkina, Alexandra Khudovekova, Alevtina Savicheva. Antimicrobial resistance profiles and genes in uropathogenic *Enterobacteriaceae* in reproductive-age women in St. Petersburg, Russia: implication for treatment of pyelonephritis in pregnancy// The Journal of Maternal-Fetal and Neonatal Medicine. – 2020. 1-3.

15. Палагин И.С., Сухорукова М.В., Дехнич А.В., Эйдельштейн М.В., Перепанова Т.С., Козлов Р.С., Мутин М.Ю., Стребкова В.В., Тапальский Д.В., Аминова П.Г., Ветехина А.В., Сухорева М.В. Иванова И.А., Валиуллина И.Р., Лавриненко А.В., Частоедова А.Н., Широкова Т.М., Варибрус Е.В., Васильева И.Р., Доманская О.В., Беккер Г.Г., Кульчавеня Е.В., Плугин П.С., Попова Л.Д., Елохина Е.В., Коган М.И., Набока Ю.Л., Жестков А.В., Лямин А.В., **Хуснутдинова Т.А.**, Шипицына Е.В., Булкин А.Н., Москвитина Е.Н., Никифоровская Н.Н., Малев И.В., Варганова А.Н., Мартыанова Н.М., Быконя С.А., Волковская И.В., Малявин А.И., Сидорова Р.К., Хайдаршина Н.Э., Шамаева С.Х., Портнягина У.С., Ершова М.Г. Состояние антибиотикорезистентность возбудителей внебольничных инфекций мочевых путей в России, Беларуси и Казахстане: результаты многоцентрового международного исследования «ДАРМИС-2018»// Урология. – 2020 – № 1. – С. 19-31.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

АБП – антибактериальный препарат

АБР – антибиотикорезистентность

ББ – бессимптомная бактериурия

БЛА – бета-лактамы антибиотики

БЛРС – бета-лактамазы расширенного спектра действия

ГЭ – геномный эквивалент

ДДМ – диско-диффузионный метод

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота

ИМП – инфекции мочевыводящих путей

КОЕ – колониеобразующая единица

МО – микроорганизмы

МПК – минимальная подавляющая концентрация

ОБМ – общая бактериальная масса

ПЦР – полимеразная цепная реакция

ПЦР-РВ – полимеразная цепная реакция в реальном времени