

ЗАТВЕРДЖУЮ  
Директор Інституту молекулярної біології і  
генетики НАН України



**АНОТОВАНИЙ ЗВІТ**  
**про виконану роботу у 2020 році в рамках реалізації проєкту**  
**із виконання наукових досліджень і розробок**

«Розробка комбінованої терапії важких *Klebsiella pneumoniae*–асоційованих нозокоміальних інфекцій для подолання їхньої антибіотикорезистентності»

**Назва конкурсу:** «Підтримка досліджень провідних та молодих вчених»  
**Реєстраційний номер Проєкту:** 2020.02/0246

**Підстава для реалізації Проєкту з виконання наукових досліджень і розробок** (реєстраційний номер та назва Проєкту) реєстраційний номер 2020.02/0246 «Розробка комбінованої терапії важких *Klebsiella pneumoniae*–асоційованих нозокоміальних інфекцій для подолання їхньої антибіотикорезистентності»

Рішення наукової ради Національного фонду досліджень України щодо визначення переможця конкурсу «Підтримка досліджень провідних та молодих вчених» протокол від «21» вересня 2020 року № 16-17.

## 1. ЗАГАЛЬНА ІНФОРМАЦІЯ ПРО ПРОЄКТ

Тривалість виконання Проєкту

Початок – дата укладання Договору про виконання наукових досліджень і розробок;

Закінчення – 2022 рік.

Загальна вартість Проєкту, грн. 9 207 000

Вартість Проєкту по роках, грн.:

1-й рік 1 969 000

2-й рік 4 620 000

3-й рік 2 618 000

## 2. ІНФОРМАЦІЯ ПРО ВИКОНАВЦІВ ПРОЄКТУ

до виконання Проєкту буде залучено 7 виконавців, з них:

доктори наук 1;

кандидати наук 2;

інші працівники 4.

## 3. ІНФОРМАЦІЯ ПРО ГРАНТООТРИМУВАЧА ТА ОРГАНІЗАЦІЮ(Ї) СУБВИКОНАВЦЯ(ІВ) ПРОЄКТУ



Грантоотримувачем є Інститут молекулярної біології і генетики НАН України, директором є Тукало Михайло Арсентійович, який діє на підставі Статуту, затвердженого розпорядженням Президії НАН України від 22.12.2016 № 922. Субвиконавців у проєкті немає.

#### 4. ОПИС ПРОЄКТУ

##### 4.1. Мета Проєкту (до 200 знаків)

Метою першого етапу проєкту було створити та охарактеризувати унікальну колекцію госпітальних ізолятів *K.pneumoniae*.

##### 4.2. Основні завдання Проєкту (до 400 знаків)

Відповідно до мети етапу були поставлені наступні завдання. Перше завдання - відбирати ізоляти *K.pneumoniae* серед бактеріальних штамів-збудників інфекцій від пацієнтів Київської обласної клінічної лікарні. Друге завдання - створити стокову колекцію ізолятів із першого пасажу в низькотемпературних умовах. Третє завдання - ідентифікувати спектри стійкості і мінімальні інгібуючі концентрації (МІК) до колістину і  $\beta$ -лактамних антибіотиків у колекційних штамів. Четверте завдання - виміряти МІК до азитроміцину у колекційних штамів. П'яте завдання - підтвердити та типувати генетичну резистентності до  $\beta$ -лактамів у колекційних MDR штамів.

##### 4.3. Детальний зміст Проєкту:

- Сучасний стан проблеми (до 400 знаків)

Інфекції, спричинені грам-негативними бактеріями, та, особливо, представниками роду *Klebsella* в Україні стали одними з найрозповсюджених збудників госпітальних інфекційних ускладнень із множинною стійкістю до протибактерійних препаратів. Головною проблемою лікування таких інфекцій є їхня власна патогенність та токсичність у поєднанні із полірезистентністю. Такі штами є агресивними та часто призводять до летальних наслідків через низку вірогідність хронічного перебігу інфекційного ускладнення та/або персистенції. Натомість, навіть коли масивна антибактеріальна терапія призводить до хронізації та/або персистенції збудника та зменшення патологічного інфекційного процесу, вірогідність повторного рецидиву інфекції складає до 80% протягом наступних шість місяців. Тому стратегія лікування полірезистентних клебсієльозів є виключним пріоритетом сучасної клінічної мікробіології в Україні зокрема та у світі в цілому.

- Новизна Проєкту (до 400 знаків)

Вперше в Україні було приділено увагу популяційним аспектам антибіотикорезистентності головного збудника грам негативних інфекційних ускладнень.

- Методологія дослідження (до 400 знаків)

Матеріалом для дослідження був патологічний зміст хірургічних ран, бронхіальних змивів, спинномозкової рідини, крові отриманого на різних етапах захворювання. Під час досліджень використовували стандартизовані сухі поживні середовища промислового виробництва, а саме, МПА, МПБ, тіогліколеве середовище, середовище Мюллера-Хінтона, агар Сабуро, середовище Ендо, селективний сольовий агар, шоколадний агар, 5% кров'яний агар, цукровий бульон. Ферментативні властивості для ідентифікації здійснювали на VITEK 2 compact 15 (Франція). Основою для вибору антибіотиків, що підлягали включенню у дослідження, були рекомендації EUCAST guideline (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters Version 10.0, valid from 2020-01-01) для *K.pneumoniae* або групи *Klebsiella spp.*, про поширення серед них набутої резистентності, а



також про клінічну ефективність АБП. Визначення чутливості виділених культур *K.pneumoniae* до АБП визначали за допомогою диск-дифузійного методу відповідно до міжнародних рекомендацій EUCAST-2020р. Граничні значення діаметрів зон пригнічення росту калібровані по відношенню до європейських граничних значень, які опубліковані EUCAST і розміщені у вільному доступі на веб-сайті (<http://www.eucast.org>).

## **5. ОТРИМАНІ НАУКОВІ АБО НАУКОВО-ТЕХНІЧНІ РЕЗУЛЬТАТИ (до 2 сторінок) в поточному році/ в рамках реалізації Проєкту, зокрема:**

### **5.1. Опис наукових або науково-технічних результатів, отриманих в рамках виконання Проєкту (із зазначенням їх якісних та кількісних (технічних) характеристик)**

Дослідження проводились на базі Комунального неприбуткового підприємства Київської обласної ради "Київська обласна клінічна лікарня". Було обстежено 65 пацієнтів з діагнозами: гостре порушення мозкового кровообігу (ГПМК), шлунково-кишкова кровотеча (ШКК), інсульт, гострий парапроктит, дефект м'яких тканин, гострий панкреатит, панкреанекроз, кишкова непрохідність, холецистопанкреатит, інфаркт мозку, флегмона, абсцес печінки, травма головного мозку, вогнищева травма головного мозку, внутрішньочерепна травма, перелом ключиці, абсцес, гострий лейкоз, відкритий перелом, травма голови та інші. Діагнози розподілено на 5 груп: церебро-васкулярні захворювання, захворювання травної системи, гнійні захворювання внутрішніх органів, травми та інші. З них 39 чоловіків (60 % пацієнтів) та 26 жінок (40 % пацієнтів). Середній вік чоловіків складав  $49,6 \pm 1,1$  років, середній вік жінок складав  $56,0 \pm 1,2$  років. Хворі були госпіталізовані в екстреному або плановому порядку. Вік пацієнтів варіював від 23 до 83 років. Матеріал відбирався частіше у пацієнтів працездатного віку (31-60 років) - 41 пацієнт, що у порівнянні до загальної кількості хворих склало 63 %. Чоловіків в даній віковій когорті було 23, жінок - 18. Виходячи з вищесказаного можна зробити висновок, що мікробіологічна діагностика інфекційних ускладнень викликаних *K.pneumoniae* набуває ще і підвищеного медико-соціального значення. Лідерами за інфікуванням *K.pneumoniae* є чоловіки молодого та середнього віку (від 31 до 60 років). Серед інших причин розвитку патологічних станів, за даними по віковим групам, частіше виділяються захворювання, які об'єднані в таблиці під назвою «інші фактори». Найменш численну групу серед чоловіків у всіх вікових категоріях в розвитку інфекційного процесу, що викликаний *K.pneumoniae* склали «травми».

Згідно наведених даних, найбільш частою причиною захворювання була церебро-васкулярна патологія серед чоловіків похилого віку (71 рік і старші). Серед жінок молодого і середнього віку (30-50 років) найбільш частою причиною в розвитку інфекційного процесу, що викликаний *K.pneumoniae* були «гнійні захворювання внутрішніх органів». Картина істотно змінюється в старших вікових групах (від 51 року і старше), де переважали «цереброваскулярні захворювання». Матеріал відбирали одразу після того як стан пацієнта став важчим. Матеріал доставлявся до бактеріологічної лабораторії впродовж 30 хвилин. Надалі з досліджуваного матеріалу виділяли мікроорганізми ідентифікували їх рутинним чином. При ідентифікації ізоляту як *K.pneumoniae* культура перевірялась на чистоту та заморожувалась у музейну колекцію.

Після закінчення стадії ізоляції культур з інфекційного матеріалу, ізоляти аналізувалися наступним чином. Кожний окремий штам регенерували та визначали чутливість до антибіотиків та фенотипові визначали фактори резистентності ESBL та КРС. Всього було ізольовано і ідентифіковано 65 штамів госпітальних ізолятів *K.pneumoniae*. Колекцію із 65 ізолятів патогенних *K.pneumoniae* досліджено щодо чутливості до ключових АБП, що мають важливе клінічне значення у контролі *K.pneumoniae*-опосередкованих інфекцій. Було встановлено, що серед 65 ізолятів *K.pneumoniae* 34 ізоляти були повністю резистентні до всіх застосованих для аналізу АБП класу бета-лактамів. Додатковий аналіз стійкості до поліміксинів (група колістину) показав можливу стійкість до колістину у деяких штамів з колекції, що потребує додаткової перевірки високочутливими рекомендованими методиками.

Для реалізації наступних завдань проєкту необхідно встановити чутливість колекційних штамів до азитроміцину (АЗМ). Як зазначалося вище, *K.pneumoniae* має природну резистентність до макролідів, втім, можливі деякі фенотипові варіації. На цьому етапі було охарактеризовано



зони затримки росту культури під впливом АЗМ та порівняно чи співпадає фенотип підвищеної стійкості до АЗМ із фенотипом MDR. Результати скринінгу чутливості до АЗМ показали високу варіабельність. Цікаво, що не виявилось статистично значимої різниці у зонах затримки росту для MDR і non-MDR груп ізолятів. Втім, серед MDR загалом було виявлено п'ять ізолятів, які не дали нечіткої зони затримки та дали дуже малу чітку зону (чотири штами дали 6 мм) або не дали жодної (один штама). Серед non-MDR таких штамів було всього два, і вони давали суттєві зони затримки в категорії чіткої зони (9 і 10 мм).

Досліджені *in vitro* колекційні штами виділені з клінічного матеріалу аналізували щодо присутності в них генетичних маркерів резистентності класів ESBL (бета-лактамази розширеного спектру дії) і KPC (карбапенемази *K. pneumoniae*) за допомогою хромогенного агару. Інтерпретували результати після 24-годинної інкубації при температурі 37 °С. Спостерігали за характером ростом бактерій на агарі, оцінюючи колір та щільність колоній. За результатами досліджень фенотипово виявлено 88,3% ESBL позитивних штамів і 86,7% KPC позитивних штамів.

Таким чином протягом першого етапу було створено колекцію госпітальних ізолятів *K. pneumoniae*, які спричинили важкі інфекційні ускладнення у пацієнтів Київської обласної клінічної лікарні. Колекція складається із 65 ізолятів. Ізоляти у першому пасажі було підготовлено для глибокого заморожування для довготривалого зберігання протягом проекту. Колекційні ізоляти було охарактеризовано щодо стійкості до АБП вибору у лікуванні важких інфекцій, викликаних *K. pneumoniae*. З'ясувалось, що більше половини ізолятів, зокрема, 34 ізоляти, відносяться до MDR. Колекційні ізоляти також було перевірено щодо їхньої чутливості до АЗМ. Встановлено, що немає статистично значимої кореляції щодо чутливості до АЗМ між MDR і non-MDR групами ізолятів. Втім, кількість цілком АЗМ-нечутливих штамів у групі MDR було 6, а в групі non-MDR – тільки два штами. Тести на наявність бета-лактамаз класів підтвердили широку розповсюдженість ESBL і KPC у колекційних штамів.

## **5.2. За наявності науково-технічної продукції обґрунтування її переваг у порівнянні з існуючими аналогами**

Вперше в Україні було приділено увагу популяційним аспектам антибіотикорезистентності головного збудника грам негативних інфекційних ускладнень. Наразі не ведеться та не оприлюднювалась жодна робота в цьому напрямку.

## **5.3. Практична цінність отриманих результатів реалізації Проекту для економіки та суспільства (стосується проектів, що передбачають проведення прикладних наукових досліджень і науково-технічних розробок)**

Оприлюднено та обговорено проблему множинної стійкості до антибіотиків у госпітальних інфекційних штамів.

## **5.4. Опис шляхів та способів подальшого використання результатів виконання Проекту в суспільній практиці.**

Охарактеризовані штами будуть використані у подальшій роботі за проектом.

Примітка: Анотований звіт не повинен містити відомостей, заборонених до відкритого опублікування

### **Науковий керівник Проекту**

С.н.с. Мошинець О.В

(підпис)

