

Карбапенемазопродуцирующие грамотрицательные бактерии в специализированном стационаре ФГБУ «Российский научный центр радиологии и хирургических технологий» Санкт-Петербурга

Полищук А.Г., Якубович Е.И., Полухина О.В., Осовских В.В., Евтушенко В.И.

ФГБУ «Российский научный центр радиологии и хирургических технологий им. акад. А.М. Гранова» Минздрава России, Санкт-Петербург, Россия

Контактный адрес:

Анна Генриховна Полищук

Эл. почта: apolishchuk@rrcrst.ru

Ключевые слова: грамотрицательные бактерии, карбапенемазы, резистентность, нозокомиальные инфекции.

Цель. Оценить частоту встречаемости карбапенемазопродуцирующих штаммов грамотрицательных бактерий в ФГБУ «РНЦРХТ» МЗ РФ.

Материалы и методы. Проанализированы штаммы грамотрицательных бактерий, выделенные из клинического материала пациентов ФГБУ «РНЦРХТ» с февраля 2014 г. по апрель 2016 г. Скрининг резистентных к карбапенемам бактерий проводился путем посева биоматериала на хромогенные среды, а их видовая идентификация методом времяпролетной масс-спектрометрии (MALDI-TOF MS) на анализаторе VITEK MS. Чувствительность грамотрицательных бактерий к антимикробным препаратам определялась на анализаторе VITEK-2. Полученные результаты интерпретировались в соответствии с критериями EUCAST v. 6.0, 2016. Гены, кодирующие карбапенемазы групп KPC, OXA-48/162, VIM, IMP, NDM, OXA-51, OXA40/24, OXA-23 и OXA-58, выявлялись методом мультиплексной ПЦР в реальном времени.

Результаты. С февраля 2014 г. по апрель 2016 г. выделено 813 штаммов грамотрицательных бактерий (602 пациента), среди которых 2,6% (21 штамм от 16 пациентов), нечувствительных к меропенему и/или имипенему: *Klebsiella pneumoniae* (n=5), *Enterobacter cloacae* (n=2), *Serratia marcescens* (n=1), *Pseudomonas aeruginosa* (n=3), *Acinetobacter baumannii* (n=10). Из клинического материала 4-х пациентов одновременно выделено до 3-х штаммов разных видов нечувствительных к карбапенемам бактерий. У 84% нечувствительных к карбапенемам изолятов обнаружены гены, кодирующие карбапенемазы: *A. baumannii* – OXA40/24 (n=8); *K. pneumoniae* – OXA-48 (n=1), KPC (n=1) и NDM (n=2); *P. aeruginosa* – VIM (n=1) и KPC (n=1); *E. cloacae* – KPC (n=1). Карбапенемаза OXA-48 также обнаружена у одного чувствительного к карбапенемам штамма *K. pneumoniae*. Все карбапенемазопродуцирующие штаммы имели фенотип множественной резистентности к антимикробным препаратам.

Выводы. С февраля 2014 г. по апрель 2016 г. выделен 21 штамм нечувствительных к карбапенемам грамотрицательных бактерий, обладающих множественной устойчивостью к антимикробным препаратам. В большинстве этих штаммов обнаружены гены приобретенных карбапенемаз. У карбапенемазопродуцирующих штаммов *K. pneumoniae*, *E. cloacae* и *P. aeruginosa* не выявлено преобладания какого-либо одного типа карбапенемаз, однако все штаммы *A. baumannii* были продуцентами OXA40/24 карбапенемазы.

Carbapenemase-producing Gram-negative bacteria in the Russian research center of radiology and surgical technologies

Polishchuk A.G., Yakubovich E.I., Polukhina O.V., Osovskikh V.V., Evtushenko V.I.

Russian Research Center of Radiology and Surgical Technologies named after A.M. Granov, Saint-Petersburg, Russia

Contacts:

Anna G. Polishchuk

E-mail: apolishchuk@rrcrst.ru

Key words: Gram-negative bacteria, carbapenemases, resistance, nosocomial infections.

Objective. To assess an incidence rate of carbapenemase-producing Gram-negative bacteria isolated from patients in the RRCRST.

Materials and Methods. The clinical Gram-negative isolates obtained from patients hospitalized to the RRCRST over the period of February 2014 to April 2016 were tested. A screening for carbapenem resistance was performed by culture on chromogenic media, and species identification was made using MALDI-TOF mass-spectrometry. Susceptibility of Gram-negative bacteria to antimicrobial agents was determined using VITEK-2. Susceptibility testing results were interpreted according to EUCAST criteria v6.0 (2016). The genes encoding carbapenemases KPC, OXA-48/162, VIM, IMP, NDM, OXA-51, OXA40/24, OXA-23 and OXA-58 were detected using real-time multiplex PCR.

Results. A total of 813 Gram-negative bacteria isolates was obtained from 602 patients over the period of February 2014 to April 2016; of which 2.6% (21 isolates from 16 patients) were non-susceptible to meropenem and/or imipenem: *Klebsiella pneumoniae* (n=5), *Enterobacter cloacae* (n=2), *Serratia marcescens* (n=1), *Pseudomonas aeruginosa* (n=3), *Acinetobacter baumannii* (n=10). Up to 3 isolates of different carbapenem non-susceptible species was obtained from clinical specimens from the 4 patients. The genes encoding carbapenemases were detected in a total of 84% carbapenem non-susceptible isolates: *A. baumannii* – OXA40/24 (n=8); *K. pneumoniae* – OXA-48 (n=1), KPC (n=1) and NDM (n=2); *P. aeruginosa* – VIM (n=1) and KPC (n=1); *E. cloacae* – KPC (n=1). The OXA-48 carbapenemase was also detected in the one carbapenem-susceptible *K. pneumoniae* isolate. All of the tested carbapenemase-producing isolates were multidrug resistant (MDR).

Conclusions. Over the study period, a total of 21 carbapenem non-susceptible and multidrug resistant Gram-negative isolates were obtained. Most of these isolates carried genes encoding acquired carbapenemases. No one carbapenemase type was predominant in the carbapenemase-producing *K. pneumoniae*, *E. cloacae* and *P. aeruginosa* strains tested; however, all of the tested *A. baumannii* isolates carried the gene encoding OXA40/24 carbapenemase.

Введение

Карбапенемы являются препаратами выбора при лечении ряда серьезных нозокомиальных инфекций, вызванных полирезистентными штаммами грамотрицательных бактерий (ГОб). Среди ГОб наиболее частыми возбудителями нозокомиальных инфекций являются представители семейства Enterobacteriaceae, прежде всего, *Klebsiella pneumoniae* и неферментирующие ГОб – *Acinetobacter baumannii* и *Pseudomonas aeruginosa* [1].

Карбапенемы относятся к бета-лактамам антимикробным препаратам (АМП) и обладают наиболее широким спектром действия среди АМП этой группы. Устойчивость к бета-лактамам АМП может быть обусловлена уменьшенной проницаемостью бактериальной мембраны, активацией систем эффлюкса и экспрессией бактериальных ферментов бета-лактамаз, гидролизующих карбапенемы, т.е. карбапенемаз [2, 3]. Гены, кодирующие приобретенные карбапенемазы, локализируются преимущественно на мобильных генетических элементах генома бактерий, что является причиной их быстрого внутри- и межвидового распространения. В связи с этим, опосредованные карбапенемазами механизмы устойчивости потенциально связаны с высоким риском возникновения вспышек нозокомиальных инфекций. В составе мобильных элементов часто присутствуют генные кассеты, несущие детерминанты устойчивости к АМП других классов, поэтому наличие у ГОб генов карбапенемаз обычно связано с фенотипами множественной резистентности (MDR – multidrug resistant), экстремальной резистентности (XDR – extensively drug-resistant) или панрезистентности (PDR – pandrug-resistant) к АМП [4, 5]. Наиболее эффективными с точки зрения уровня карбапенемазной активности и глобального распространения являются карбапенемазы групп KPC, VIM, IMP, NDM и OXA-48 [6, 7].

Начиная с 1990-х годов, ГОб с карбапенемазной активностью быстро распространились по всему миру и в настоящее время представляют собой одну из наиболее значимых угроз мировому здравоохранению [1, 7, 8]. В этом аспекте, Россия и страны ближнего зарубежья не являются исключением.

По данным исследования «МАРАФОН», все госпитальные штаммы *A. baumannii*, полученные от пациентов 18 стационаров России к 2012 г., оказались нечувствительны к имипенему, в то время как в 2008 г. только 5% выделенных штаммов *A. baumannii* были нечувствительны к этому карбапенему [9, 10]. У половины нечувствительных к имипенему изолятов *A. baumannii*, выделенных к 2012 г., были обнаружены карбапенемазы, в основном OXA-40/24 типа. Большинство карбапенемазопродуцирующих изолятов обладали MDR и XDR фенотипом (94% и 87% соответственно), а 1,2% из них (3 изолята) PDR фенотипом. Доля нечувствительных к имипенему и меропенему изолятов *P. aeruginosa* в 2012 г. также была высока: 88 и 67% соответственно. Среди нечувствительных к карбапенемам (КНЧ) изолятов *P. aeruginosa* больше половины обладали XDR фенотипом, а 0,3% (10 изолятов) PDR фенотипом. У 28% КНЧ штаммов был обнаружен ген карбапенемазы VIM типа [11]. Из выделенных в ходе исследования «МАРАФОН» (2012 г.) штаммов *K. pneumoniae*, 22%, 15% и 5% были нечувствительны к эртапенему, имипенему и меропенему соответственно [12]. О значительно большей доле КНЧ штаммов *K. pneumoniae* сообщалось в проведенном в 2013-2014 гг. в Москве исследовании, где соответствующие цифры составляли 68%, 65% и 44% [13]. Хотя доля продуцирующих карбапенемазы штаммов *K.*

pneumoniae различалась – 7% в исследовании «МАРАФОН» и 55% в московском исследовании, однако в обоих исследованиях основной обнаруженной карбапенемазой была OXA-48. Все карбапенемазопродуцирующие штаммы в обоих исследованиях обладали MDR фенотипом.

Из других нозокомиальных ГОб на территории России зафиксировано появление КНЧ штаммов *Escherichia coli*, *Enterobacter cloacae*, *Enterobacter aerogenes* и *Proteus mirabilis*. Хотя их доля среди КНЧ ГОб была сравнительно невелика в 2012 г., некоторые из выделенных штаммов обладали PDR фенотипом.

Эпидемиологические исследования резистентности ГОб к карбапенемам в Санкт-Петербурге за 2012-2014 гг. показали распространение в стационарах города КНЧ штаммов *K. pneumoniae*, несущих ген карбапенемазы NDM-1. У 98% КНЧ штаммов *K. pneumoniae*, полученных к началу 2013 г., был обнаружен ген карбапенемазы NDM-1 [14-16]. Наличие данной карбапенемазы у бактерий представляет особую опасность, поскольку такие бактерии обычно резистентны почти ко всем используемым АМП, за исключением тигециклина и колистина [7]. В стационарах Санкт-Петербурга также отмечен рост частоты карбапенеморезистентных (КР) штаммов *A. baumannii*. Согласно одному исследованию, объединившему 5 стационаров города, к 2014 г. совокупная доля нозокомиальных изолятов *A. baumannii*, резистентных хотя бы к одному карбапенему, приблизилась к 50%, при этом доля КР изолятов варьировала в зависимости от стационара от 2,5 до 62% [17]. Данные о количестве карбапенемазопродуцирующих штаммов *A. baumannii* в этом исследовании отсутствуют.

Особая эпидемиологическая опасность, которую представляют ГОб, продуцирующие карбапенемазы, определяет необходимость их раннего выявления путём постоянного мониторинга антибиотикорезистентности возбудителей инфекций у госпитализированных пациентов.

Целью данного исследования было определение частоты встречаемости карбапенемазопродуцирующих ГОб у пациентов ФГБУ «РНЦРХТ» МЗ РФ.

Материалы и методы

Изоляты ГОб, нечувствительные к карбапенемам, были получены из клинического материала пациентов ФГБУ «РНЦРХТ» в период с февраля 2014 г. по апрель 2016 г.

Бактериальные изоляты

Посев клинического материала проводили в течение 2 часов после его взятия. Для обнаружения ГОб в крови и других в норме стерильных жидкостях использовали автоматический анализатор BacT/ALERT (bioMérieux, Франция) и флаконы со средой и активированным углем для выделения аэробных и анаэробных гемокультур BacT/ALERT FA и FN. Для обнаружения ГОб в образцах мочи посев проводили по методу Голда, используя питательный агар с 5% бараньей кровью (Sredoff, Россия) и хромогенную неселективную среду «Уриселект агар» (Bio-Rad, Франция). Пробы с отделяемым ран и материалом из нижних дыхательных путей дополнительно засеивали на агар Шедлера (bioMérieux, Франция). Исследование микробной обсемененности фрагментов венозных катетеров проводили количественным методом, предложенным Brun-Buisson с нашей модификацией (Рацпредложение «Способ количественной оценки бактериальной обсемененности венозного катетера», рег. № 12947/8 от 29.11.2011 г.). Фрагменты катетеров вы-

севали на 5% кровяной агар и «Уриселект агар». Посевы инкубировали от 24 до 72 часов. Посевы на хромогенных средах инкубировали при 35°C. Посевы на агаре Шедлера термостабирировали в анаэробном состоянии.

Клинически значимыми считали все случаи выделения микроорганизмов из образцов крови, при посеве фрагментов катетеров – в концентрации 10^3 КОЕ/мл и более, проб раневого отделяемого – 10^5 КОЕ/мл, мокроты и аспирата трахеобронхиального дерева – 10^6 КОЕ/мл, бронхоальвеолярной жидкости – 10^4 КОЕ/мл. Клиническую значимость возбудителей, выделенных из мочи, оценивали в соответствии с критериями, представленными в литературе [18].

Видовая идентификация

Видовая идентификация микроорганизмов проводилась методом времяпролетной масс-спектрометрии (MALDI-TOF MS) на анализаторе VITEK MS, с использованием базы белковых спектров клинически значимых видов микроорганизмов и программы «Расширенный классификатор спектров» (bioMérieux, Франция).

Определение чувствительности бактерий к антимикробным препаратам

Для обнаружения ГОБ, резистентных к карбапенемам, при первичном посеве клинического материала использовали среду «CHROMagar KPC» (DRG, Франция).

Определение чувствительности ГОБ к АМП проводили автоматизированным методом с помощью анализатора VITEK 2 и карт, предназначенных для определения минимальных подавляющих концентраций (МПК) АМП, актуальных для ГОБ – GNS-101 и 102 (bioMérieux, Франция). При необходимости проводили дополнительные исследования с помощью E-тестов на агаре Мюллера-Хинтон (bioMérieux, Франция). Полученные значения МПК интерпретировались в соответствии с критериями, установленными в 2016 г. Европейским комитетом по определению чувствительности микроорганизмов к АМП (EUCAST) [19]. При определении чувствительности бактерий к АМП на анализаторе VITEK 2 использовалась экспертная программа Advanced Expert System (AES), способная предположить механизм устойчивости микроорганизмов к АМП. Программа AES использует базу данных, включающую более 2000 фенотипов резистентности различных патогенных микроорганизмов.

ПЦР детекция генов, кодирующих карбапенемазы

Гены карбапенемазы выявлялись методом мультиплексной ПЦР с гибридационно-флуоресцентной детекцией продуктов амплификации в режиме реального времени с использованием наборов реагентов «АмплиСенс® MDR MBL-FL», «АмплиСенс® MDR Ab-OXA-FL» и «АмплиСенс® MDR KPC/OXA-48-FL» (Интерлабсервис, Россия). Выявлялись гены, кодирующие приобретенные сериновые карбапенемазы групп KPC и OXA-48-подобных (OXA-48 и OXA-162), OXA-карбапенемазы ацинетобактеров групп OXA-23-, OXA-58-, OXA-40/24-подобных и видоспецифичные карбапенемазы *A. baumannii* (OXA-51-подобные) и металло-бета-лактамазы с карбапенемазной активностью групп VIM, IMP и NDM.

Результаты и их обсуждение

С февраля 2014 г. по апрель 2016 г. из клинического материала 602 пациентов ФГБУ «РНЦРХ» было выделено 813 штаммов ГОБ. При первичном посеве клинического материала на селективную среду для отбора ГОБ, нечувствительных

к карбапенемам (КНЧ), получено 23 штамма КНЧ ГОБ от 18 пациентов.

Пациенты

Из 18 пациентов, 12 проходили хирургическое лечение по поводу метастатических форм рака, 3-м пациентам с циррозом печени была проведена трансплантация печени, 1 пациент находился в стационаре с диагнозом «эхинококкоз печени» и 1 пациент с диагнозом «атеросклероз аорты» (таблица 1). Все пациенты перенесли полостные операции в период их нахождения в ФГБУ «РНЦРХ», причем в большинстве случаев более одной до момента получения КНЧ изолятов. Период нахождения пациентов в стационаре варьировал от 7 до 97 дней, в течение которого большинство из них перемещалось между отделением реанимации и интенсивной терапии (ОРИТ) и другими отделениями стационара (рисунок 1). Пациенты №5 и №15 находились только в ОРИТ, а пациент №11 только в отделении сосудистой хирургии. КНЧ изоляты были получены во время пребывания пациентов в ОРИТ (пациенты №1-5, 9-10, 13-15), отделении общей хирургии (№8), сосудистой хирургии (№11) и урологическом отделении (№12). Штамм *Klebsiella pneumoniae* №7, продуцирующий NDM карбапенемазу, был выделен из мочи пациента в день его поступления в ОРИТ ФГБУ «РНЦРХ» (конец апреля 2015). Поскольку этот пациент ранее не лечился в ФГБУ «РНЦРХ», можно сделать вывод, что инфицирование пациента произошло вне данного стационара.

Клинический материал

Источниками выделения КНЧ штаммов ГОБ были кровь (n=8), моча (n=7), материал из дыхательных путей (n=5), ликвор (n=1), отделяемое брюшной полости (n=1) и желчь (n=1).

Видовой состав изолятов

Среди 23 КНЧ штаммов ГОБ были 9 изолятов энтеробактерий (6 *K. pneumoniae*, 1 *Serratia marcescens*, 2 *E. cloacae*), 3 изолята *P. aeruginosa* и 11 изолятов *A. baumannii* (рисунок 1, таблица 2).

Чувствительность изолятов к карбапенемам

Значения МПК АМП для выделенных штаммов ГОБ, полученные с помощью анализатора VITEK 2, приведены в таблице 2. Из 23 выросших на селективной среде КНЧ штаммов, 2 оказались чувствительны к карбапенемам в соответствии с критериями EUCAST (МПК имипенема и меропенема ≤ 2 мкг/мл) – *K. pneumoniae* №1 и *A. baumannii* №12. Остальные штаммы энтеробактерий были или резистентны к карбапенемам (МПК > 8 мкг/мл), или умеренно резистентны к ним ($2 < \text{МПК} \leq 8$). Все 3 штамма *P. aeruginosa* были умеренно резистентны к меропенему ($1 < \text{МПК} \leq 16$), в то время как 2 из них были резистентны к имипенему (МПК > 8 мкг/мл). Десять из 11 штаммов *A. baumannii* были резистентны к карбапенемам (МПК > 8 мкг/мл). Таким образом, суммарная доля КНЧ (резистентные + умеренно резистентные) штаммов составила 2,6% (21 штамм) от общего числа выделенных штаммов ГОБ (813 штаммов). У пациентов №5, 10, 14 и 18 одновременно обнаружены несколько видов КНЧ ГОБ (рисунок 1).

Карбапенемазы, выявленные у изолятов

ПЦР была проведена для 19 из 21 КНЧ штаммов ГОБ (для штаммов №8 и №6 ПЦР не проводилась), в 16 из них (84%) были обнаружены гены карбапенемазы (рисунок 1).

У всех штаммов *A. baumannii* выявлен ген карбапенемазы OXA51, что соответствует литературным данным о том, что наличие гена *blaOXA-51* в геноме *A. baumannii* является видовым признаком этой бактерии [20]. Ген *blaOXA-51* имеет хромосомную локализацию и, если не изменен геномными пе-

Таблица 1. Клинические характеристики пациентов, у которых выделены грамотрицательные бактерии, продуцирующие карбапенемазы

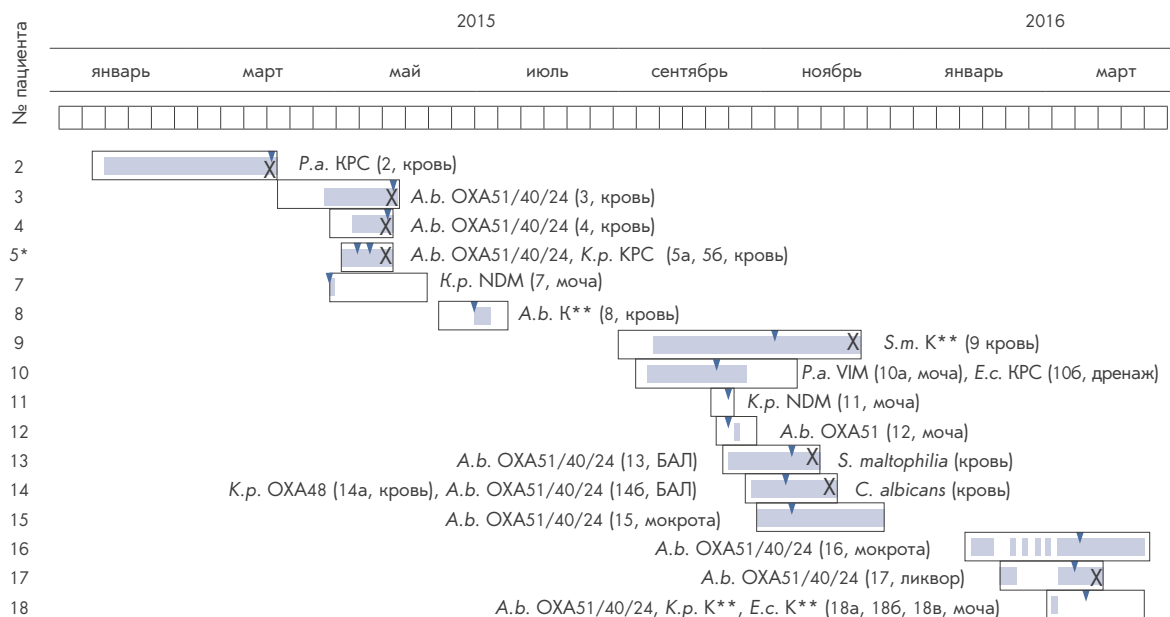
№ пациента	Возраст	Пол	Место жительства	Основной диагноз	Нахождение в стационаре		Количество полостных операций до получения изолята
					Всего дней	По отделениям	
2014							
1	38	М	СПб	Цирроз печени	39	ОРИТ/ Хир	2
2015							
2	75	М	СПб	Рак ободочной кишки	82	Хир/ОРИТ	2
3	38	Ж	НД	Рак почки	50	Ур/ОРИТ	НД
4	87	М	СПб	Рак мочевого пузыря	26	Ур/ОРИТ	2
5	57	Ж	СПб	Цирроз печени	16	ОРИТ	2
6	51	М	НД	НД	НД	Хир	НД
7	70	М	СПб	Рак предстательной железы	43	ОРИТ/Ур	1
8	65	Ж	СПб	Рак поджелудочной железы	30	Хир/ОРИТ	1
9	83	М	СПб	Атеросклероз аорты	97	Хир/ОРИТ	3
10	78	Ж	СПб	Рак поджелудочной железы	71	Хир/ОРИТ	3
11	52	Ж	СПб	Рак сигмовидной кишки	7	Сосудистая хирургия	1
12	61	М	Тверская обл.	Рак мочевого пузыря	18	Ур/ОРИТ	1
13	61	М	Мурманск	Рак поджелудочной железы	41	Хир/ОРИТ	4
14	77	Ж	Ленинградская обл.	Эхинококкоз печени	43	Хир/ОРИТ	3
15	67	М	НД	Рак мочевого пузыря	59	ОРИТ	3
2016							
16	62	Ж	СПб	Цирроз печени	76	Хир/ОРИТ	5
17	67	Ж	СПб	Рак поджелудочной железы	45	Хир/ОРИТ	2
18	46	Ж	СПб	Рак мочевого пузыря	40	ОРИТ/Ур	1

ОРИТ – отделение реанимации и интенсивной терапии; Ур – урологическое отделение; Хир – хирургическое отделение; НД – нет данных.

рестройками в промоторной области, слабо экспрессируется и не придаёт бактерии резистентный к карбапенемам фенотип [20]. Этим может объясняться тот факт, что штамм №12, в котором обнаружен только ген *blaOXA-51*, чувствителен к обоим протестированным карбапенемам. Во всех штаммах *A. baumannii*, кроме штамма №12, также был выявлен ген *OXA-40/24* карбапенемазы, что соответствует эпидемиологическим данным о широкой распространенности на территории России бета-лактамазы *OXA-40/24* типа у нозокомиальных штаммов *A. baumannii* [10]. Интересно отметить, что в отличие от *OXA-40/24*-продуцирующих штаммов *A. baumannii*, выделенных в стационарах России, которые в большинстве случаев имеют высокий уровень устойчивости к имипенему и меропенему с типичными МПК = 128 мкг/мл, *OXA-40/24*-продуценты в нашем исследовании имели сравнительно низкие значения МПК этих карбапенемов – 16 мкг/мл [9].

Карбапенемаза *OXA-48* выявлена в двух КНЧ штаммах *K. pneumoniae* (рисунок 1). *OXA-48*-карбапенемаза впервые идентифицирована у полирезистентного нозокомиального штамма *K. pneumoniae*, выделенного в Турции в 2001 г. [21]. Начиная с 2010 г., она была обнаружена у нозокомиальных штаммов бактерий семейства *Enterobacteriaceae* в странах Ближнего Востока, Северной Африки и Европе, а с 2011 г. в России [12, 22]. В 2012 г. *OXA-48*-карбапенемаза была выяв-

лена у полирезистентного штамма *K. pneumoniae*, вызвавшего вспышку нозокомиальной инфекции в одном из стационаров Москвы [13]. В отношении уровня устойчивости к карбапенемам у *OXA-48*-продуцирующих штаммов *K. pneumoniae*, выделенных в России, наблюдается превалирование двух групп: одна с МПК имипенема 32 мкг/мл (~50% штаммов), другая – 4 мкг/мл (~30% штаммов). Также 2 группы существуют и для меропенема: около половины штаммов имеют МПК 32 мкг/мл и около трети – 0,5 мкг/мл [12]. В нашем исследовании из двух штаммов *K. pneumoniae*, несущих ген *blaOXA-48*, один (№14а) был резистентным к имипенему (МПК = 16 мкг/мл) и умеренно резистентным к меропенему (МПК = 4 мкг/мл), а второй (№1) был чувствителен к обоим карбапенемам (МПК = 1-2 мкг/мл). Различие в уровне чувствительности к карбапенемам может быть связано с различными механизмами резистентности, как у наших штаммов, так и у выделенных в России другими исследователями. *OXA-48* имеет слабую активность в отношении карбапенемов, однако, у полирезистентных энтеробактерий она часто сочетается с повышенной экспрессией бета-лактамаз расширенного спектра (БЛРС), имеющих некоторую карбапенемазную активность (например, СТХ-М бета-лактамазы) и сниженной проницаемостью наружной мембраны, за счёт чего может достигаться высокий уровень резистентности к карбапенемам у *OXA-48* продуцентов [22].



Пациент 1 (февраль-март 2014) – K.p. OXA48 (1, мокрота)

Пациент 6 (2015) – P.a. K** (6, желчь)

Рисунок 1. Распределение во времени и локализация пациентов, инфицированных грамотрицательными бактериями, продуцирующими карбапенемазы

□ – продолжительность пребывания в ФГБУ «РНЦРХ»; ■ – нахождение в ОРИТ; X – смерть; ▼ – день выделения штамма ГОБ, нечувствительного к карбапенемам;
 P.a. – *P. aeruginosa*, K.p. – *K. pneumoniae*, A.b. – *A. baumannii*, S.m. – *S. marcescens*, S. maltophilia – *Stenotrophomonas maltophilia*, E.c. – *E. cloacae*, C. albicans – *Candida albicans*.
 После видового названия ГОБ указано название выявленной карбапенемазы.
 В скобках указан номер изолята и источник его выделения.
 * – пациент поступил в ОРИТ ФГБУ «РНЦРХ» из другого стационара.
 ** K – данные программы AES о наличии у изолята карбапенемазной активности.

У двух из шести КНЧ штаммов *K. pneumoniae* была выявлена NDM карбапенемаза. Оба штамма были выделены из мочи пациентов, находившихся в ФГБУ «РНЦРХ» в марте (№7, отделение урологии) и октябре (№11, отделение сосудистой хирургии) 2015 г. В случае №7, инфицирование пациента, очевидно, произошло до его поступления в ФГБУ «РНЦРХ», поскольку штамм №7 был выделен у пациента в день его поступления в стационар, а сам пациент ранее не лечился в данном учреждении. NDM карбапенемаза впервые обнаружена в 2008 г. у штамма *K. pneumoniae*, полученного из образца мочи пациента из Индии [23]. К 2015 г. она распространилась по всему миру и была идентифицирована у разных видов энтеробактерий – *P. aeruginosa*, *A. baumannii* и других, менее вирулентных видов [24]. В Санкт-Петербурге почти все полученные к 2013 г. нозокомиальные КНЧ штаммы *K. pneumoniae* являлись носителями гена blaNDM-1 [14, 15]. При этом 80% NDM-продуцентов имели МПК имипенема между 4 и 16 мкг/мл и меропенема между 16 и 64 мкг/мл, а остальные 20% - выше этих значений [15]. Изоляты №7 и №11, выделенные в нашем исследовании, были умеренно резистентны к обоим карбапенемам со значениями МПК = 4-8 мкг/мл.

Из других металло-бета-лактамаз (МБЛ), нами обнаружена VIM МБЛ в одном штамме *P. aeruginosa* (№10а). VIM-продуцирующий штамм *P. aeruginosa* был впервые выделен из раны

хирургического больного в 1997 г. в Италии [25]. К 2005 г. VIM МБЛ распространилась по всему миру [24]. В России количество штаммов *P. aeruginosa*, продуцирующих МБЛ, увеличилось с 0% в 1999 г. до 28% в 2012 г., причем единственной МБЛ, выявленной у *P. aeruginosa* в 2012 г., была МБЛ VIM-типа с МПК имипенема = 128 мкг/мл и МПК меропенема ≥32 мкг/мл [11, 26]. VIM-продуцирующий штамм *P. aeruginosa*, выделенный в нашем исследовании, имел значительно более низкий уровень резистентности с МПК обоих карбапенемов 16 мкг/мл.

KPC карбапенемаза была обнаружена нами в трех КНЧ штаммах: *K. pneumoniae*, *E. cloacae* и *P. aeruginosa*. МПК имипенема и меропенема у всех трех изолятов составила 8 мкг/мл. Ген blaKPC-1 с плазмидной локализацией был идентифицирован в 2001 г. у нозокомиального штамма *K. pneumoniae*, выделенного в 1996 г. в Америке и имевшего МПК имипенема и меропенема 16 мкг/мл [27]. В России до настоящего времени описаны единичные случаи обнаружения этой карбапенемазы.

В штаммах №18б, №18в и №10а гены карбапенемаз KPC, VIM, IMP, NDM, OXA-48, 23, 58, 40/24 не выявлены, что не исключает наличие у них карбапенемаз других типов.

Чувствительность изолятов к другим категориям АМП

В целях стандартизации описания и классификации бактерий, устойчивых одновременно ко многим АМП, экспертной

Таблица 2. Чувствительность к антимикробным препаратам грамотрицательных бактерий, продуцирующих карбапенемазы

Изолят	Карбапенемаза	МПК ¹ (мкг/мл)											Нечувствительность к категориям АМП ²
		Амикацин	Гентамицин	Нетилимицин	Азтреонам	Тигецилин	Цефепим	Цефтазидим	Ципрофлоксацин	Колестилин	Имипенем	Меропенем	
<i>K. pneumoniae</i>													
1	ОХА48	2	1	1	64	н/о	64	64	1	0,5	2	1	2/6
56	КРС	16	16	8	32	н/о	64	64	4	0,5	8	8	5/6
7	NDM	16	16	16	16	н/о	64	64	4	0,5	8	4	5/6
11	NDM	16	16	16	32	2	64	64	4	0,5	8	8	6/7
14а	ОХА48	4	16		32	н/о	64	64	2	0,5	16	4	5/6
186	К ³	16	16	16	32	н/о	64	64	4	0,5	16	16	5/6
<i>S. marcescens</i>													
9	К	8	8	8	32	н/о	32	32	4	16	8	16	6/6
<i>E. cloacae</i>													
106	КРС	16	16	16	32	4	64	64	4	16	8	8	7/7
18в	К	2	16	4	32	н/о	64	64	4	0,5	2	16	5/6
<i>P. aeruginosa</i>													
2	КРС	2	16	16		н/о	4	4	4	0,5	8	8	3/5
10а	VIM	64	16	32		н/о	64	16	4	0,5	16	16	4/5
6	К	4	4	4		н/о	16	64	1	0,5	16	16	4/5
<i>A. baumannii</i>													
3	ОХА51/40/24	16	16	16	32	0,5	64	64	4	0,5	16	16	3/4
4	ОХА51/40/24	16	16	16	32	4	64	64	4	0,5	16	16	3/4
5а	ОХА51/40/24	16	16	16	32	32	64	64	4	0,5	16	16	3/4
8	К	16	16	16	32	4	64	64	4	0,5	16	16	3/4
12	ОХА51	16	16	16	32	4	64	64	4	0,5	1	0,25	2/4
13	ОХА51/40/24	16	16	16	32	4	64	64	4	0,5	16	16	3/4
146	ОХА51/40/24	16	16	16	32	4	64	64	4	0,5	16	16	3/4
15	ОХА51/40/24	64	16	16	32	4	64	64	4	0,5	16	16	3/4
16	ОХА51/40/24	16	16	16	32	4	64	64	4	0,5	16	16	3/4
17	ОХА51/40/24	16	16	32	64	4	64	64	4	0,5	16	16	3/4
18а	ОХА51/40/24	16	16	16	64	0,5	64	16	4	0,5	16	16	3/4

¹ МПК – минимальная подавляющая концентрация; н/о – не определялась.

Жирным шрифтом выделены значения МПК АМП, соответствующие категории «нечувствительные» по критериям EUCAST [19].

² В столбце указано: количество категорий АМП с нечувствительностью штамма хотя бы к одному препарату категории/количество протестированных категорий АМП. Категории в соответствии с Magiorakos et al. [19].

³ То же, что и в рисунке 1.

группой Европейского общества по клинической микробиологии и инфекционным заболеваниям (ESCMID) для каждой бактерии или группы бактерий был предложен список «категорий» АМП для определения фенотипов множественной лекарственной резистентности (MDR), экстремальной лекарственной резистентности (XDR) и панрезистентности (PDR) [4]. Для определения MDR, XDR и PDR у бактерий семейства Enterobacteriaceae предложено использовать 17 категорий АМП (содержащих 28 АМП), у *P. aeruginosa* – 8 категорий (17 АМП) и у *A. baumannii* – 9 категорий (22 АМП). В соответ-

ствии с выработанными экспертной группой критериями, бактерия обладает MDR фенотипом, если она нечувствительна как минимум к трём препаратам, относящимся к различным категориям АМП; XDR фенотипом, если она нечувствительна хотя бы к одному препарату всех, кроме одной-двух категорий АМП; и PDR фенотипом, если она нечувствительна ко всем препаратам всех категорий АМП [4].

В нашем исследовании определялась чувствительность карбапенемазопродуцирующих изолятов к АМП 6-7 категорий АМП (таблица 2). Все штаммы, за исключением двух

(*K. pneumoniae* №1, *A. baumannii* №12), обладали MDR фенотипом, поскольку были нечувствительны одновременно к АМП как минимум трех категорий. Обладал ли какой-либо изолят XDR/PDR фенотипом, определить не удалось, поскольку для этого необходимы данные по чувствительности изолятов к большему количеству АМП, чем было протестировано в нашем исследовании.

Следует отметить 1 штамм *E. cloacae* (№106), нечувствительный ко всем протестированным АМП, включая колистин и тигециклин, 1 штамм *S. marcescens* (№9), нечувствительный к колистину, и 1 из двух NDM-продуцирующих штаммов *K. pneumoniae* (№11), нечувствительный к тигециклину.

Заключение

Исследование проводилось с февраля 2014 г. по апрель 2016 г. В течение этого периода было выделено 813 штаммов грамотрицательных бактерий из клинического материала пациентов, большая часть которых была представлена онкологическими больными. Выделен 21 штамм ГОБ (2,6% от всех штаммов ГОБ), нечувствительных к имипенему и/или меропенему, при этом было показано, что пациент одновременно может быть инфицирован нечувствительными к карбапенемам штаммами разных видов ГОБ. Уровень резистентности к имипенему и меропенему выделенных карбапенемазопродуцирующих штаммов был значительно ниже типичного для таких штаммов, выделенных в стационарах России. Спектр видов

карбапенемазопродуцирующих КНЧ ГОБ и типы обнаруженных приобретенных карбапенемаз характерны для территории России: *K. pneumoniae*, *E. cloacae*, *P. aeruginosa*, *A. baumannii* и КРС, ОХА-48, VIM, NDM, ОХА40/24 соответственно. Хотя у отдельных видов энтеробактерий и *P. aeruginosa* не обнаружено преобладания какого-либо одного типа карбапенемаз, все выявленные КНЧ штаммы *A. baumannii* были продуцентами ОХА40/24 карбапенемазы. Поскольку в исследовании не проводилось молекулярное типирование штаммов *A. baumannii*, сделать заключение о клоальности распространения ОХА40/24-продуцентов затруднительно. Все карбапенемазопродуцирующие штаммы ГОБ имели фенотип множественной резистентности к антимикробным препаратам, причем 3 из них были нечувствительны к колистину и/или тигециклину.

В заключении следует отметить, что хотя суммарная доля нечувствительных к карбапенемам штаммов ГОБ, выделенных в нашем исследовании, сравнительно невелика, все они обладают множественной устойчивостью к АМП, и в большинстве из них обнаружены гены приобретенных карбапенемаз, что делает эти штаммы особенно опасными с эпидемиологической и клинической точек зрения.

Благодарность

Выражаем благодарность сотруднику ФБУН «ЦНИИ эпидемиологии» Роспотребнадзора (Москва) Савочкиной Ю.А. за предоставленный набор реагентов и методику для выявления генов ОХА-карбапенемаз ацинетобактеров.

Литература

- European Centre for Disease Prevention and Control. Carbapenemase-producing bacteria in Europe: interim results from the European Survey on carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* (EuSCAPE) project. Stockholm: ECDC 2013. Available at: www.ecdc.europa.eu.
- Gutkind G., Di Conza J., Power P., Radice M. β -lactamase-mediated resistance: A biochemical, epidemiological and genetic overview. *Curr Pharm Des.* 2013;19(2):164-208.
- Tapalski D.V., Osipov V.A., Zhavoronok S.V. Carbapenemases of gram-negative pathogens: spread and methods of detection. *Medicinskij zhurnal.* 2012;2:10-15. Russian. (Тапальский Д.В., Осипов В.А., Жаворонок С.В. Карбапенемазы грамотрицательных бактерий: распространение и методы детекции. *Медицинский журнал.* 2012;2:10-15.)
- Magiorakos A.P., Srinivasan A., Carey R.B., et al. Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clin Microbiol Infect.* 2012;18:268-281.
- Meletis G. Carbapenem resistance: overview of the problem and future perspectives. *Ther Adv Infect Dis.* 2016;3(1):15-21.
- Queenan A.M., Bush K. Carbapenemases: the versatile β -lactamases. *Clin Microbiol Rev.* 2007;20(3):440-458.
- Nordmann P., Poirel L. The difficult-to-control spread of carbapenemase producers among *Enterobacteriaceae* worldwide. *Clin Microbiol Infect.* 2014;20:821-830.
- Babenco D.B., Lavrinenko A.V., Zaharova E.A., et al. Laboratory detection of carbapenemase-producing enterobacteria. *Laboratornaja medicina.* 2012-2013;1-2(4):47-61. Russian. (Бабенко Д.Б., Лавриненко А.В., Захарова Е.А. и соавт. Лабораторная детекция карбапенемаза-продуцирующих энтеробактерий. *Лабораторная медицина.* 2012-2013;1-2(4):47-61.)
- Sukhorukova M.V., Edelstein M.V., Skleenova E.Ju., et al. Antimicrobial Resistance of Nosocomial *Acinetobacter* spp. Isolates in Russia: Results of National Multicenter Surveillance Study «MARATHON» 2011-2012. *Klinicheskaja mikrobiologija i antimikrobnaja himioterapija.* 2014;16(4):266-272. Russian. (Сухорукова М.В., Эйдельштейн М.В., Скленова Е.Ю. и соавт. Антибиотикорезистентность нозокомиальных штаммов *Acinetobacter* spp. в стационарах России: результаты много-
- центрового эпидемиологического исследования МАРАФОН в 2011-2012 гг. *Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия.* 2014;16(4):266-272.)
- Martinovich A.A., Edelstein M.V. Increase of carbapenem-non-susceptibility and carbapenemase production rate in nosocomial *Acinetobacter* spp. in Russia in 2002-2012. *Vestnik Smolenskoj Gosudarstvennoj Medicinskoj Akademii.* 2014;13(2):34-39. Russian. (Мартинович А.А., Эйдельштейн М.В. Рост нечувствительности к карбапенемам и частоты продукции карбапенемаз у нозокомиальных штаммов *Acinetobacter* spp. в России в 2002-2012 гг. *Вестник Смоленской Государственной Медицинской Академии.* 2014;13(2):34-39.)
- Sukhorukova M.V., Edelstein M.V., Skleenova E.Ju., et al. Antimicrobial Resistance of Nosocomial *Pseudomonas aeruginosa* Isolates in Russia: Results of National Multicenter Surveillance Study «MARATHON» 2011-2012. *Klinicheskaja mikrobiologija i antimikrobnaja himioterapija.* 2014;16(4):273-279. Russian. (Сухорукова М.В., Эйдельштейн М.В., Скленова Е.Ю. и соавт. Антибиотикорезистентность нозокомиальных штаммов *Pseudomonas aeruginosa* в стационарах России: результаты многоцентрового эпидемиологического исследования МАРАФОН в 2011-2012 гг. *Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия.* 2014;16(4):273-279.)
- Sukhorukova M.V., Edelstein M.V., Skleenova E.Ju., et al. Antimicrobial Resistance of Nosocomial *Enterobacteriaceae* Isolates in Russia: Results of National Multicenter Surveillance Study «MARATHON» 2011-2012. *Klinicheskaja mikrobiologija i antimikrobnaja himioterapija.* 2014;16(4):254-265. Russian. (Сухорукова М.В., Эйдельштейн М.В., Скленова Е.Ю. и соавт. Антибиотикорезистентность нозокомиальных штаммов *Enterobacteriaceae* в стационарах России: результаты многоцентрового эпидемиологического исследования МАРАФОН в 2011-2012 гг. *Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия.* 2014;16(4):254-265.)
- Fursova N.K., Astashkin E.I., Knyazeva A.I., et al. The spread of *bla* OXA-48 and *bla* OXA-244 carbapenemase genes among *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis* and *Enterobacter* spp. isolated in Moscow, Russia. *Ann Clin Microbiol Antimicrob.* 2015;14(1):1.
- Egorova S.A., Kaftyreva L.A., Lipskaja L.V., et al. *Enterobacteriaceae*, producing EBLs and metallo- β -lactamase ndm-1, isolated in hospitals of

- Baltic region countries. *Infekcija i immunitet*. 2013;3(1):29-36. Russian. (Егорова С.А., Кафтырева Л.А., Липская Л.В. и соавт. 2013; 3(1): 29-36.).
15. Ageevets V.A., Partina I.V., Lisitsyna E.S., et al. Emergence of carbapenemase-producing Gram-negative bacteria in Saint Petersburg, Russia. *Int J Antimicrob Agents*. 2014;44(2):152-155.
 16. Barantsevich E.P., Churkina I.V., Barantsevich N.E., et al. Emergence of *Klebsiella pneumoniae* producing NDM-1 carbapenemase in Saint Petersburg, Russia. *J Antimicrob Chemother*. 2013;68(5):1204-1206.
 17. Svetlichnaja Ju.S. Prevalence of carbapenem resistant *A. baumannii* strains in multi-disciplinary medical facilities of St. Petersburg. *Medicinskij al'manah*. 2015;5(40):102-105. Russian. (Светличная Ю.С. Распространение карбапенем устойчивых штаммов *A. baumannii* в многопрофильных стационарах Санкт-Петербурга. *Медицинский альманах*. 2015;5(40):102-105.).
 18. Naber K., Bishop M., Bjerklund-Johansen T., et al. Guidelines on The Management of Urinary and Male Genital Tract Infections. European Association of Urology, 2007. Available at: <http://uroweb.org/wp-content/uploads/EAU-Guidelines-Male-UTI-2007.pdf>.
 19. The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST). Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 6.0, 2016. Available at: www.eucast.org.
 20. Evans B.A., Amyes S.G. OXA β -lactamases. *Clinical Microbiol Rev*. 2014;27(2):241-263.
 21. Carrère A., Poirel L., Eraksoy H., et al. Spread of OXA-48-positive carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* isolates in Istanbul, Turkey. *Antimicrob Agents Chemother*. 2008;52:2950-2954.
 22. Poirel L., Potron A., Nordmann P. OXA-48-like carbapenemases: the phantom menace. *J Antimicrob Chemother*. 2012;67(7):1597-1606.
 23. Yong D., Toleman M.A., Giske C.G., et al. Characterization of a new metallo-beta-lactamase gene, *bla*(NDM-1), and a novel erythromycin esterase gene carried on a unique genetic structure in *Klebsiella pneumoniae* sequence type 14 from India. *Antimicrob Agents Chemother*. 2009;53:5046-5054.
 24. Nordmann P. Carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*: overview of a major public health challenge. *Med Mal Infect*. 2014;44(2):51-56.
 25. Lauretti L., Riccio M., Mazzariol A., et al. Cloning and characterization of *bla*VIM, a new integron-borne metallo-beta-lactamase gene from a *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate. *Antimicrob Agents Chemother*. 1999;43:1584-1590.
 26. Edelstein M.V., Skleenova E.N., Shevchenko O.V., et al. Spread of extensively resistant VIM-2-positive ST235 *Pseudomonas aeruginosa* in Belarus, Kazakhstan, and Russia: a longitudinal epidemiological and clinical study. *Lancet Infect Dis*. 2013;13(10):867-876.
 27. Yigit H., Queenan A.M., Anderson G.J., et al. Novel carbapenem-hydrolyzing beta-lactamase, KPC-1, from a carbapenem-resistant strain of *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2001;45:1151-1161.