



УДК 579.61

РАСПРОСТРАНЕННОСТЬ КАРБАПЕНЕМАЗ СРЕДИ НОЗОКОМИАЛЬНЫХ ШТАММОВ ENTEROBACTERIACEAE В РОССИИ

М. В. Эйдельштейн¹, В. С. Журавлев², Е. А. Шек^{1,2}

¹Научно-исследовательский институт антимикробной химиотерапии СГМУ, Смоленск

²Саратовский национальный исследовательский государственный университет имени Н. Г. Чернышевского
E-mail: eugeneshack@gmail.com

Рассмотрена проблема антибиотикорезистентности в России среди нозокомиальных штаммов Enterobacteriaceae, обусловленная продукцией карбапенемаз. В ходе проведенного исследования в 2014 году выявлено 4 типа ферментов у 6 видов энтеробактерий. Установлено, что основным возбудителем нозокомиальных инфекций и носителем генов приобретенных карбапенемаз является *Klebsiella pneumoniae*. Зафиксированы случаи продукции карбапенемаз среди внебольничной флоры у госпитализированных пациентов. Рост антибиотикорезистентности подтверждается анализом динамики выявления продуцентов карбапенемаз у нозокомиальных энтеробактерий в период с 2006 по 2014 годы.

Ключевые слова: карбапенемазы, антибиотикорезистентность, Enterobacteriaceae.

Prevalence of Nosocomial Strains Enterobacteriaceae Have Carbapenemases in Russia

M. V. Edelstein, V. S. Zhuravlev, E. A. Shek

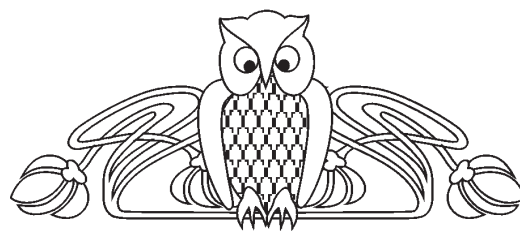
In this article we have looked into the matter of antibiotic resistance among the group of nosocomial strains Enterobacteriaceae which has been determined by the production of carbapenemases. In 2014 there were revealed four types of enzymes and six types of enterobacterias. The main causative agent of nosocomial infections and the major host of the acquired carbapenemases gene is *Klebsiella pneumoniae*. There were cases of carbapenemases' production about extramural flora of hospitalized patients. The hypothesis of increasing of antibiotic resistance is supported by the analysis of carbapenemases' detection dynamics on the material of nosocomial enterobacterias regarded during the period from 2006 to 2014.

Key words: carbapenemases, antibiotic resistance, Enterobacteriaceae.

DOI: 10.18500/1816-9775-2017-17-1-36-41

Введение

Проблема формирования и распространения антибиотикорезистентности стала очевидна уже к середине 40-х гг. прошлого века. Причиной тому явилось выявление штамма золотистого стафилококка, обладающего устойчивостью к действию пенициллина, буквально спустя несколько лет после начала его первого и широко-масштабного применения. В настоящее время



большую клиническую значимость имеют антибиотики группы карбапенемов, формирование устойчивости к которым можно рассматривать как одну из наиболее серьезных угроз системе современного здравоохранения [1].

Карбапенемы являются антибиотиками класса β -лактамов. В клиническую практику вошли в середине 1980-х гг. как препараты «резерва» вследствие широкого распространения полирезистентности среди грамотрицательных бактерий, обусловленной продукцией β -лактамаз расширенного спектра (БЛРС) [1]. В настоящее время клиническую значимость имеют четыре препарата: имипенем (1986), меропенем (1996), эртапенем и дорипенем (2010) [1–4]. Как и все β -лактамы, карбапенемы являются бактерицидными ингибиторами синтеза пептидогликана клеточной стенки бактерий. Важным отличительным свойством карбапенемов среди остальных β -лактамов является наиболее широкий спектр антимикробной активности. Так, спектр активности имипенема, меропенема и дорипенема включает большинство грамотрицательных и грамположительных аэробных и анаэробных микроорганизмов, среди которых исключением являются *Stenotrophomonas maltophilia*, метициллин-резистентные стафилококки (MRSA) и *Enterococcus faecium*. Отличием эртапенема является отсутствие активности в отношении грамотрицательных неферментирующих бактерий. Карбапенемы применяются в основном для лечения тяжелых и жизнеугрожающих инфекций, вызванных множественно резистентными бактериальными возбудителями (нозокомиальная пневмония, менингит, интраабдоминальные инфекции и др.) [3, 4].

Устойчивость микроорганизмов к различным антибактериальным препаратам может определять целый ряд механизмов. Однако в формировании устойчивости к карбапенемам наибольшее значение имеет ферментативная инактивация препарата через продукцию микроорганизмом ферментов β -лактамаз, названных карбапенемазами [1,5]. На сегодняшний день карбапенемазы представляют собой обширную группу фермен-



тов, неоднородную как по структуре, так и по субстратной специфичности и происхождению. Согласно классификации β -лактамаз К. Bush и G. A. Jacoby эти ферменты относятся к трем молекулярным классам – А, В и D [6]. Ферменты классов А и D содержат серин в активном центре, что определяет их принадлежность к сериновым β -лактамазам. В противоположность им ферменты класса В являются металлосодержащими β -лактамазами и несут один или два атома цинка в своем активном центре. Карбапенемазной активностью обладают отдельные представители всех трех молекулярных классов: А, D и В, которые принадлежат к функциональным группам: 2f, 2df и 3 соответственно [1, 6]. Наличие карбапенемаз у микроорганизма определяет его устойчивость практически ко всем β -лактамам. Многочисленные исследования показали, что для Европы характерен различный уровень распространенности карбапенемазопродуцирующих штаммов, однако даже для наиболее благоприятных в эпидемиологическом плане стран ЕС (Норвегия, Швеция, Финляндия) свойствен широкий спектр наличия карбапенемаз [1, 7, 8].

Во всем мире крайне серьезную проблему представляет формирование карбапенемоустойчивых штаммов микроорганизмов в лечебно-профилактических учреждениях и стационарах. Именно в них в результате селективного прессинга происходит адаптация и дальнейшее распространение наиболее устойчивых представителей. Нахождение больного в подобной среде сопровождается риском развития у последнего внутрибольничной, или нозокомиальной, инфекции (НИ) [9, 10]. ВОЗ определяет НИ как инфекцию, развившуюся у пациента через 48 и более часов после госпитализации, при условии, если при поступлении пациента в стационар инфекция отсутствовала и не находилась в инкубационном периоде. Также под определение НИ попадают те случаи, при которых инфекция является следствием предшествующей госпитализации. Для пациента развитие НИ грозит осложнением течения болезни и ухудшением прогноза на выздоровление, что, как правило, приводит к повышению риска летального исхода. Одними из распространенных возбудителей госпитальной инфекции являются представители семейства Enterobacteriaceae [11].

В связи с этим целью данной работы стало определение с использованием молекулярно-генетических методов наличия и разнообразия основных типов карбапенемаз (металло- β -лактамаз VIM, IMP, NDM типов; сериновых карбапенемаз групп KPC, OXA-48 и GES 2/5) у клинических штаммов энтеробактерий, выделенных в 2014 г.

Материалы и методы

Объектами исследования явились 1524 неповторяющихся (по одному от каждого пациента) клинических изолятов энтеробактерий, полученных в рамках многоцентрового проспективного эпидемиологического исследования антибиотикорезистентности МАРА-ФОН-2014 в период с 1.01.2014 по 31.12.2014 г. из 30 стационаров 19 городов РФ. В исследование включались изоляты-возбудители инфекций как нозокомиальной, так и внебольничной природы, полученные от госпитализированных пациентов. Из 1524 полученных микроорганизмов 1112 были определены как нозокомиальные и 412 как внебольничные возбудители. Работа проводилась на базе НИИАХ ГБОУ ВПО СГМУ Минздрава России (г. Смоленск).

Выявление генов наиболее распространенных карбапенемаз

Для выявления продукции карбапенемаз было отобрано 466 изолятов энтеробактерий, проявляющих в соответствии с критериями EUCAST пониженную чувствительность хотя бы к одному из карбапенемов: МПК имипенема ≥ 1 мг/л, МПК меропенема или эртапенема $\geq 0,125$ мг/л [11–13].

Наличие генов металло- β -лактамаз (bla_{VIM} , bla_{IMP} и bla_{NDM}) и сериновых карбапенемаз (bla_{KPC} и bla_{OXA-48}) определяли методом ПЦР в режиме реального времени с использованием коммерческих наборов «АмплиСенс MDR MBL-FL» и «АмплиСенс KPC/OXA-48-FL» соответственно (Интерлабсервис, Россия). Амплификацию с гибридационно-флуоресцентной детекцией в режиме реального времени проводили с применением детектирующего амплификатора DTprime 5 X1 (ДНК-Технология, Россия) согласно протоколу.

Для выявления генов GES β -лактамаз использовали метод ПЦР в режиме реального времени с последующим анализом кривых плавления флуоресцентно-меченого зонда, ранее разработанный в НИИАХ. Состав ПЦР-смеси представлен в табл. 1. Наличие внутренних фрагментов генов, кодирующих GES β -лактамазы «дикого типа» (GES-1-подобные ферменты) и мутантные производные, обладающие карбапенемазной активностью (GES-2- и GES-5-подобные ферменты), определяли в соответствии с температурой плавления зонда, регистрируемой по изменению флуоресценции на канале FAM: $62,8 \pm 0,2^\circ\text{C}$ – для GES-1, $56,9 \pm 0,2^\circ\text{C}$ – для GES-5, $51,6 \pm 0,2^\circ\text{C}$ – для GES-2.



Таблица 1

Состав ПЦР-смеси для дифференциальной детекции генов GES β -лактамаз

Компоненты	Конечная концентрация
Праймер GES-Fpm (5'-cgcaagagcc(g-LNA)gagatg-3')*	0,2 мкМ
Праймер GES-Rpm-BHQ (5'-tgtatctctgagg(t-BHQ)cgccagg-3')*	0,8 мкМ
Зонд GES-PbC-FAM (5'-gccaggtgtgtgtgcc-3'-FAM)*	0,2 мкМ
Смесь dNTP	0,2 мкМ
Буфер SNP Detect с Mg ²⁺ (Евроген, Россия)	1X
Полимераза SNP Detect (Евроген, Россия)	5 ед.
Образец ДНК	3,8 мкл
Общий объем реакции	10 мкл

Примечание. * Олигонуклеотиды синтезированы ЗАО Синтол (Россия).

Результаты и их обсуждение

В результате проведенного тестирования карбапенемазы различных типов обнаружены у 96 нозокомиальных энтеробактерий, что составляет 8,6% всех случаев внутрибольничной инфекции. Всего выявлено 4 типа ферментов из 7 исследованных, относящихся к трем молекулярным классам. Среди металло- β -лактамаз обнаружен фермент группы NDM ($n=17$). Сериновые карбапенемазы почти полностью представлены OXA-48-подобными ферментами, они найдены у 72 микроорганизмов (6,5% случаев). У одного изолята *Klebsiella pneumoniae*, обнаруженного в стационаре Санкт-Петербурга,

выявлен фермент группы KPC. Следует отметить эндемичность распространения данного фермента – в России все случаи зарегистрированы в Санкт-Петербурге. Отдельную группу составили микроорганизмы, несущие комбинацию генов OXA-48 и NDM, всего было выявлено 6 подобных случаев, что составляет 0,5% от всех нозокомиальных микроорганизмов. Все изоляты, у которых имеет место копродукция двух карбапенемаз, принадлежат виду *K. pneumoniae* и выделены в Санкт-Петербурге. Гены, кодирующие ферменты карбапенемаз групп VIM, IMP, а также карбапенемазы и β -лактамазы расширенного спектра группы GES, обнаружены не были (табл. 2).

Таблица 2

Распространенность карбапенемаз среди нозокомиальных и внебольничных изолятов

Тип карбапенемаз	Среди нозокомиальных изолятов ($n=1112$)		Среди внебольничных изолятов ($n=412$)		Среди всех изученных изолятов ($n=1524$)	
	количество изолятов	доля изолятов, %	количество изолятов	доля изолятов, %	количество изолятов	доля изолятов, %
OXA-48	72	6,5	4	0,97	76	5
NDM	17	1,5	1	0,24	18	1,2
OXA-48+NDM	6	0,5	–	–	6	0,4
KPC	1	0,09	–	–	1	0,07
Всего	96	8,6	5	1,21	101	6,63

Кроме того, большой интерес может представлять обнаружение продуцентов карбапенемаз среди возбудителей внебольничной инфекции. Всего зафиксировано 5 подобных случаев в 4 городах – Краснодаре, Смоленске, Тюмени и Набережных Челнах. У четырех из пяти изолятов выявлены OXA-48 подобные ферменты и у одного NDM – карбапенемаза. В четырех

случаях возбудителем являлась *K. pneumoniae* и в одном *E. coli*.

Большую часть всех энтеробактерий–продуцентов карбапенемаз составили представители вида *K. pneumoniae* – 88% ($n=89$). Остальные виды, включая *E. coli*, *Proteus mirabilis* и *Serratia marcescens*, в совокупности составили десятую часть всех изолятов (табл. 3).



Таблица 3

Видовой состав продуцентов карбапенемаз

Вид микроорганизма-продуцента карбапенемаз	Тип карбапенемаз				Всего	Доля среди всех продуцентов (n=101), %
	OXA-48	NDM	OXA-48+NDM	KPC		
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	70	12	6	1	89	88
<i>Escherichia coli</i>	1	3	–	–	4	3,96
<i>Proteus mirabilis</i>	–	3	–	–	3	2,97
<i>Serratia marcescens</i>	3	–	–	–	3	2,97
<i>Enterobacter cloacae</i>	1	–	–	–	1	0,99
<i>Citrobacter freundii</i>	1	–	–	–	1	0,99
Итого	76	18	6	1	101	100

Карбапенемазопродуцирующие энтеробактерии обнаружены в 15 стационарах 10 городов России. Наиболее распространенным в географическом плане стал фермент OXA-48, который выявлен в 9 городах России. Металлофермент группы NDM занял второе место как по частоте выявления, так и по распространению – обнаружен в 4 городах. В целом основными очагами распространения карбапенемазопродуцирующих штаммов энтеробактерий можно считать

крупные центры, такие как Москва, Санкт-Петербург и Краснодар, однако единичные случаи отмечаются и в относительно небольших городах (Смоленск, Ижевск, Набережные Челны), что может служить одним из признаков роста тенденции к повсеместному распространению устойчивости к карбапенемам. Санкт-Петербург оценивается как наиболее неблагоприятный по эпидемиологической обстановке город – в нем выявлены ферменты всех 4 групп (табл. 4).

Таблица 4

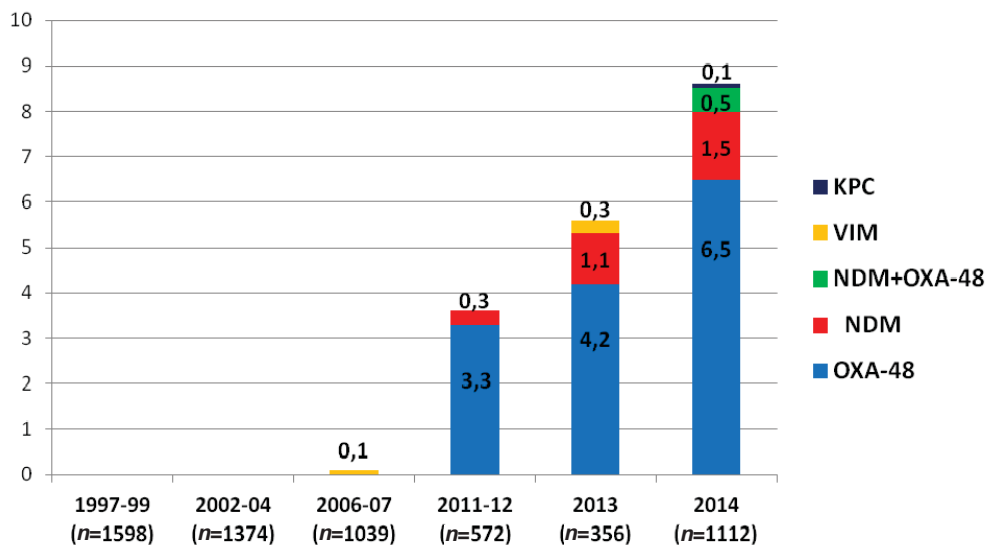
Географическая распространенность продуцентов карбапенемаз

Город	Тип карбапенемаз				Всего	Доля среди всех продуцентов (n=101), %
	OXA-48	NDM	OXA-48+NDM	KPC		
Москва	35	4	–	–	39	38,6
Краснодар	15	3	–	–	18	17,8
Санкт-Петербург	3	7	6	1	17	16,8
Ижевск	9	–	–	–	9	8,9
Набережные Челны	7	–	–	–	9	6,9
Томск	4	–	–	–	4	3,96
Омск	1	3	–	–	4	3,96
Ростов-на-Дону	1	–	–	–	1	0,99
Тюмень	1	–	–	–	1	0,99
Смоленск	–	1	–	–	1	0,99
Итого	76	18	6	1	101	100

Динамика выявления карбапенемаз представлена на рисунке. Оценивая динамику выявления карбапенемаз среди энтеробактерий с 2006 г., можно судить об отчетливом росте числа подобных случаев среди внутрибольничной флоры, а также об увеличении разнообразия выявляемых групп ферментов [11].

Заключение

В ходе проведенного исследования определено наличие и разнообразие генов основных карбапенемаз среди клинических изолятов семейства Enterobacteriaceae, выделенных в 2014 году. Энтеробактерии, способные гидролизовать карбапенемы, обнаружены в



Динамика выявления карбапенемазопродуцирующих штаммов энтеробактерий в России

15 стационарах 10 городов России. Основным возбудителем нозокомиальной инфекции различной этиологии и локализации, а также продуцентом карбапенемаз является вид *K. pneumoniae* – типичный представитель больничной микрофлоры. В 2014 г. выявлено 96 случаев продукции карбапенемаз среди нозокомиальных энтеробактерий, а также 5 случаев – среди внебольничных возбудителей. Основной детерминантой устойчивости к карбапенемам среди энтеробактерий является β -лактамаза класса D – фермент OXA-48. В меньшей степени резистентность обуславливает наличие NDM металло- β -лактамазы. Анализ динамики выявления штаммов семейства Enterobacteriaceae, продуцирующих карбапенемазы, свидетельствует как о росте числа обнаружения подобных микроорганизмов, так и об увеличении разнообразия выявляемых групп ферментов. В 2014 г. зафиксирован наиболее высокий уровень продукции карбапенемаз – 8,6% всех нозокомиальных изолятов.

Таким образом, можно сделать вывод об увеличении числа случаев продукции карбапенемаз различного типа у представителей семейства Enterobacteriaceae в стационарах России. Подобная ситуация ведет к потенциальному увеличению числа случаев неэффективного применения карбапенемов при антимикробной терапии и росту резистентности. Одними из наиболее доступных методов сдерживания дальнейшего роста резистентности являются постоянный мониторинг устойчивости к карбапенемам и другим антибиотикам и ограничение их нерационального применения путем проведения информацион-

но-просветительской работы среди пациентов и медицинских работников, а также усиление контроля за проведением санитарно-гигиенических мероприятий в медицинских учреждениях.

Благодарности

Авторы выражают признательность директору и коллективу НИИ АХГБОУ ВПО СГМУ Р. С. Козлову, М. В. Сухоруковой, Н. В. Иванчик за предоставленные данные, советы и помощь в выполнении практической части работы.

Список литературы

1. Агеевец В. А., Лазарева И. В., Сидоренко С. В. Проблема устойчивости к карбапенемным антибиотикам : распространение карбапенемаз в мире и России, эпидемиология, диагностика, возможности лечения // Фарматека. 2015. №14. С. 9–16.
2. Страчунский Л. С., Белоусов Ю. Б., Козлов Н. С. Практическое руководство по антимикробной химиотерапии. Смоленск : Изд-во Межрегион. ассоциации по клинической микробиологии и антимикробной химиотерапии, 2007. 534 с.
3. Белобородов В. Б., Грувер К.П. Карбапенемы в современной клинической практике // Рус. мед. журн. 2012. Т. 18, № 17. С. 1037–1042.
4. Галкин Д. В. Карбапенемы через 20 лет после открытия : современные микробиологические и клинические аспекты // Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. 2007. Т. 9, № 2. С. 133–152.
5. Страчунский Л. С. β -лактамазы расширенного спектра – растущая и плохо осознаваемая угроза // Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. 2005. Т. 7, № 1. С. 92–96.



6. *Bush K., Jacoby G.A.* Update functional classification of β -lactamases // *Antimicrob Agents Chemother.* 2010. Vol. 54 (3). P. 969–976.
7. *Агеевец В. А., Партина И. В., Лисицина Е. С., Батыршин И. М., Попенко Л. Н., Шляпников С. А., Ильина Е. Н., Сидоренко С. В.* Первое обнаружение металло- β -лактамазы NDM-типа в многопрофильном стационаре // *Мед. академ. журн.* 2012. Т. 12, № 4. С. 43–45.
8. *Эйдельштейн М. В., Склеенова Е. Ю., Шевченко О. В., Тапальский Д. В., Азизов И. С., Дсоуза Дж. В., Тимохова А. В., Сухорукова М. В., Козырева В. К., Сафронова Е. В., Астахова М. В., Карпов И. А., Шамаева С. Х., Абрамова Н. В., Гординская Н. А.* Распространенность и молекулярная эпидемиология грамотрицательных бактерий, продуцирующих металло- β -лактамазы, в России, Беларуси и Казахстане // *Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия.* 2012. Т. 14, №2. С. 132–152.
9. *Штейнберг Л. Л.* Клинико-экономическая оценка применения различных карбапенемов в лечении нозокомиальной пневмонии : автореф. дис. ... канд. мед. наук. М., 2014. 24 с.
10. *Белоусов Ю. Б., Ушкалова Е. А.* Нозокомиальные инфекции и принципы их лечения // *Фарматека.* 2001. №. 12. С. 32–36.
11. *Сухорукова М. В., Эйдельштейн М. В., Склеенова Е. Ю., Иванчик Н. В., Тимохова А. В., Дехнич А. В., Козлов Р. С.* Антибиотикорезистентность нозокомиальных штаммов Enterobacteriaceae в стационарах России : результаты многоцентрового эпидемиологического исследования МАРАФОН в 2011–2012 гг. // *Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия.* 2014. Т.16, № 4. С. 254–265.
12. *EUCAST guidelines for detection of resistance mechanisms and specific resistances of clinical and/or epidemiological importance // European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (valid from 11.12.2013, version 1.0).* URL: http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Resistance_mechanisms/EUCAST_detection_of_resistance_mechanisms_v1.0_20131211.pdf (дата обращения: 5.03.2016).
13. *МУК 4.2.1890-04.* Определение чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препаратам. М., 2004. 91 с.

Образец для цитирования:

Эйдельштейн М. В., Журавлев В. С., Шек Е. А. Распространенность карбапенемаз среди нозокомиальных штаммов enterobacteriaceae в России // *Изв. Саратов. ун-та. Нов. сер. Сер. Химия. Биология. Экология.* 2017. Т. 17, вып. 1. С. 36–41. DOI: 10.18500/1816-9775-2017-17-1-36-41.

Cite this article as:

Edelstein M. V., Zhuravlev V. S., Shek E. A. Prevalence of Nosocomial Strains Enterobacteriaceae Have Carbapenemases in Russia. *Izv. Saratov Univ. (N. S.), Ser. Chemistry. Biology. Ecology,* 2017, vol. 17, iss. 1, pp. 36–41 (in Russian). DOI: 10.18500/1816-9775-2017-17-1-36-41.