

Ю.А. Савочкина

МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МЕТОДЫ ВЫЯВЛЕНИЯ АНТИБИОТИКОРЕЗИСТЕНТНОСТИ У ГОСПИТАЛЬНЫХ ШТАММОВ, ОБУСЛОВЛЕННОЙ ПРОДУКЦИЕЙ БЕТА-ЛАКТАМАЗ И КАРБАПЕНЕМАЗ

ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, Москва

Рост резистентности возбудителей инфекций к бета-лактамам антибиотикам представляет сегодня серьезную проблему для здравоохранения. Ключевую роль в формировании устойчивости Грам-отрицательных микроорганизмов к бета-лактамам антибиотикам, играет распространение бета-лактамаз расширенного спектра (БЛРС). А в последние годы нарастающую угрозу представляет распространение приобретенных карбапенемаз, продукция которых обеспечивает механизм резистентности ко всем бета-лактамам, включая карбапенемы.

БЛРС гидролизуют все цефалоспорины и, таким образом, обуславливают резистентность возбудителя ко всем цефалоспорином I-IV поколений. Данная группа бета-лактамаз получила в настоящее время глобальное распространение в стационарах. Быстрое распространение БЛРС объясняется переносом их генов в составе мобильных генетических элементов, на трансмиссивных плаزمидах, и также распространением за счет эпидемических штаммов. Продукты БЛРС зачастую являются полирезистентными вследствие сцепления различных генов резистентности на плазмидах, а также ко-селекции различных механизмов резистентности [2, 3]. Продукция БЛРС на практике может служить маркером полирезистентности возбудителя. В сочетании с существующими методическими трудностями выявления БЛРС это приводит к высокому риску неадекватной стартовой терапии при инфекциях, вызванных БЛРС-продуцирующими возбудителями [1, 2].

Эта проблема особенно актуальна в нашей стране, поскольку в России наблюдается рекордно высокая распространенность БЛРС в стационарах. От 25 до 97 процентов изолятов энтеробактерий продуцировали БЛРС по данным многоцентрового исследования «РЕВАНШ», проведенного в 2006-2007 годах в стационарах 26 городов России. Средний показатель доли БЛРС-продуцирующих штаммов составил 67,4% для *E.coli* и 89,4% для *Klebsiella pneumoniae* [3]. Помимо глобального распространения в стационарах, в последние годы наблюдается резкий рост

внебольничных инфекций, вызванных БЛРС-продуцирующими возбудителями, в основном – инфекций мочевыводящих путей и интраабдоминальных инфекций [5].

БЛРС гидролизуют пенициллины, цефалоспорины I-IV поколений, но не гидролизуют карбапенемы. Они относятся к сериновым бета-лактамазам молекулярных классов A и D, чувствительны (в большей или меньшей степени) к специфическим ингибиторам – клавулановой кислоте, сульбактаму и тазобактаму. Основными продуцентами БЛРС являются энтеробактерии, которые составляют около 30% в этиологической структуре различных нозокомиальных инфекций [3], а также некоторые Грам-отрицательные неферментирующие бактерии.

К БЛРС относятся три основные группы бета-лактамаз. Первая группа, доминирующая в настоящее время, – группа СТХ-М. Она разделяется на 4 (5) основных кластеров: СТХ-М-1, СТХ-М-2, СТХ-М-9 и СТХ-М-8/25. Преобладающим в Европе [2] и в России [4] является тип СТХ-М-15. В России типы СТХ-М-15 и СТХ-М-3, относящиеся к кластеру СТХ-М-1, составляют 87% всех выявляемых БЛРС, по данным исследования «РЕВАНШ» [4]. Вторая группа – это SHV-бета-лактамазы, большое количество типов ферментов этой группы относятся к БЛРС. Различные типы ферментов группы SHV отличаются единичными заменами в аминокислотной последовательности. В России распространены типы SHV-5-подобные, которые составляют около 18% БЛРС, и SHV-2-подобные (около 2% БЛРС) [4]. Третья группа – TEM бета-лактамазы, многие из которых относятся к БЛРС. При этом распространенность бета-лактамаз группы TEM среди БЛРС в России составляет всего 0,1% [4].

Для выявления БЛРС используются как фенотипические, так и молекулярные методы. Фенотипические методы выявления БЛРС основаны на выявлении повышенных значений минимальных подавляющих концентраций (МПК) цефалоспоринов (ЦС) III поколения (или уменьшения диаметра зон подавления роста) в

сочетании со снижением МПК ЦС III (увеличением диаметра зон подавления роста) в присутствии клавулановой кислоты. Для выявления синергизма с клавулановой кислотой используют метод двойных дисков или комбинированные диски, Е-тесты, метод микроразведений в агаре или бульоне, в том числе, с помощью автоматических систем.

Молекулярные методы выявления БЛРС включают ПЦР с гибридизацией на ДНК-чипах, ПЦР с детекцией в режиме реального времени и ПЦР с секвенированием продуктов амплификации. При выявлении БЛРС с помощью молекулярных методов существует два типа задач. Первый – это выявление генов бета-лактамаз СТХ-М группы. Эта задача легко решается с помощью ПЦР и ПЦР в режиме реального времени. Также для ее решения можно использовать и гибридизацию на ДНК-чипах. Второй тип задач – это выявление точечных мутаций, определяющих БЛРС-активность бета-лактамаз групп SHV и TEM. Для этой задачи также можно использовать ПЦР в режиме реального времени, специальные модификации этого метода, но более распространенными методами выявления мутаций в генах SHV- и TEM-групп являются ПЦР с гибридизацией на ДНК-чипах и ПЦР с секвенированием продуктов амплификации. Метод ПЦР с гибридизацией на ДНК-чипах используется в имеющихся зарубежных коммерческих наборах для выявления БЛРС.

В контексте негативной ситуации, обусловленной широким распространением БЛРС-продуцирующих микроорганизмов в стационарах, ключевыми препаратами в терапии тяжелых инфекций, а также инфекций, вызванных полирезистентными возбудителями, являются карбапенемы. Самую серьезную угрозу в настоящее время представляет рост резистентности к препаратам этой группы.

Продукция приобретенных карбапенемаз является самым эффективным механизмом резистентности Грам-отрицательных микроорганизмов к карбапенемам. Этот механизм антибиотикорезистентности имеет особое клиническое и эпидемиологическое значение. Возможности терапии инфекций, вызванных карбапенем-резистентными возбудителями, критически ограничены. В связи с этим серьезную угрозу представляет возможность широкого распространения генов карбапенемаз. Их гены зачастую ассоциированы с мобильными генетическими элементами, локализируются на трансмиссивных

плазмидах, и за счет этого могут передаваться между различными штаммами и между различными видами. Некоторые из этих генов выявлены у эпидемических клонов. Все это создает опасность их быстрого широкого распространения.

Продуцентами приобретенных карбапенемаз являются основные Грам-отрицательные возбудители, которые играют ключевую роль в этиологической структуре различных нозокомиальных инфекций - *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii*, *Klebsiella pneumoniae*, *E.coli*. Они являются проблемными микроорганизмами в силу характерной полирезистентности к антимикробным препаратам. Приобретая карбапенемазы, эти микроорганизмы становятся резистентными и к карбапенемам, и такие штаммы относятся к супер-резистентным, а некоторые из них панрезистентны.

Приобретенные карбапенемазы подразделяются на три основные группы.

Первая группа – это металло-бета-лактамазы (МБЛ) – ферменты класса В, в активном центре которых присутствует цинк (Zn^{2+}). МБЛ включает группу типов VIM (27 типов), группу типов IMP (29 типов) и группу типов NDM (6 типов). Основными продуцентами МБЛ являются в первую очередь *Pseudomonas aeruginosa*, а также *Acinetobacter baumannii* и энтеробактерии. МБЛ имеют в настоящее время глобальное распространение [6]. Наиболее распространенная группа MBL – это группа VIM, и среди них тип VIM-2, который часто встречается и у российских изолятов *Pseudomonas aeruginosa* [3]. Широкое распространение МБЛ типа VIM-2 в России и других странах связано с эпидемическим клональным комплексом CC235 (ST-235) [7]. Некоторые другие типы МБЛ (SPM, GIM, AIM, SIM) имеют в основном локальное распространение. Но следует учитывать, что ситуация может динамично изменяться.

Вторая группа – это сериновые карбапенемазы группы KPC. Продуцентами их являются *Klebsiella pneumoniae* (наиболее часто) и другие энтеробактерии. Микроорганизмы, продуцирующие карбапенемазы группы KPC, в настоящее время эндемичны в стационарах США, Греции и Израиля, а также встречаются в других странах.

Третья группа – это OXA-карбапенемазы, включающие группу OXA-48-подобных карбапенемаз, характерных для *Klebsiella pneumoniae*, и OXA-карбапенемазы ацинетобактеров – групп

пы ОХА-23-подобных, ОХА-58-подобных и ОХА-40/24-подобных.

Примером разнообразия типов карбапенемаз, которые могут одновременно выявляться в различных стационарах одной европейской страны, являются данные, полученные референсной лабораторией Германии в 2011 г. [8]. При анализе 1079 изолятов были выявлены 19 различных типов, представляющих все основные группы карбапенемаз. Обращает на себя внимание большое число изолятов энтеробактерий, продуцирующих карбапенемазу ОХА-48, карбапенемазы КРС-2, -3, ацинетобактеров, продуцирующих карбапенемазы типов ОХА-23, и изолятов, продуцирующих МБЛ типов VIM-1, VIM-2 или NDM-1 [8].

В России наибольшее распространение имеют МБЛ группы VIM (тип VIM-2), выявляемые у 20% изолятов синегнойной палочки, по данным исследования «РЕВАНШ» [3]. С наибольшей частотой МБЛ-продуцирующие изоляты *P.aeruginosa* выявлялись в отделениях гнойной хирургии и ожоговых отделениях. Причем, по данным НИИ антимикробной химиотерапии, 96,6% изолятов *P.aeruginosa*, продуцирующих МБЛ (типов VIM-2 и IMP-30), принадлежат к эпидемической линии ST-235 [3]. Среди карбапенем-нечувствительных изолятов ацинетобактеров в России наиболее распространенной является группа ОХА-40-подобных карбапенемаз, следующей по частоте является группа ОХА-23-подобных, и реже выявляется группа ОХА-58 [9, 10]. В 2011 г. в России были выявлены изоляты *Klebsiella pneumoniae*, продуцирующие карбапенемазу ОХА-48 [11].

Для обеспечения инфекционного контроля и предупреждения широкого распространения приобретенных карбапенемаз необходимы эффективные методы их выявления. С этой целью могут использоваться фенотипические и молекулярные методы.

Для выявления нечувствительных к карбапенемам штаммов на практике широко используется определение повышенных МПК карбапенемов или уменьшения зон подавления роста при использовании диско-диффузионного метода. Следует отметить, что для достаточно эффективного выявления нечувствительных к карбапенемам штаммов путем определения МПК (диаметра зон подавления роста) при интерпретации результатов необходимо ориентироваться на граничные значения, указанные в обновленных рекомендациях EUCAST или CLSI 2011 г.

[12, 7]. Тогда как граничные значения МПК в российских методических указаниях по определению чувствительности микроорганизмов к антибиотикам МУК-4.2.1890-04 [13] существенно выше рекомендованных в обновленных зарубежных рекомендациях. Однако и при использовании сниженных граничных значений, недостаточная точность рутинного определения МПК может приводить к ошибочному определению чувствительности к карбапенемам у штаммов, имеющих МПК, близкие к граничным значениям [1].

Для выявления карбапенемазной активности используется модифицированный Ходж-тест (МНТ) [6]. Для выявления карбапенемаз различных групп могут использоваться тесты, основанные на выявлении синергизма с теми или иными ингибиторами, соответствующими конкретным группам карбапенемаз, с использованием двойных дисков или комбинированных дисков [6, 14]. Так, для выявления МБЛ используется выявление синергизма с ЭДТА или дипиколиновой кислотой [14], а для выявления карбапенемаз группы КРС – тест с аминифенилбороновой кислотой (АРВА). Следует отметить, что для выявления карбапенемаз группы ОХА отсутствуют специфические фенотипические методы.

Существуют методические трудности выявления продукции карбапенемаз, особенно у энтеробактерий и при сниженных значениях МПК [1, 6]. Чувствительность ни одного из методов не является абсолютной, одновременно нельзя говорить и об абсолютной специфичности фенотипических методов.

С точки зрения клинической практики, наиболее значимым аргументом в пользу использования дополнительных специальных тестов для выявления приобретенных карбапенемаз является риск неэффективности монотерапии карбапенемами при инфекциях, вызванных продуцирующими карбапенемазы возбудителями [1]. В связи с этим, при выявлении карбапенемаз следует рассматривать возможности комбинированной схемы терапии или изменения режима дозирования. Причем, по мнению ряда ведущих специалистов, даже в случае сниженных, близких к граничным значениям МПК возбудителя, обладающего карбапенемазой, данных, подтверждающих эффективность монотерапии карбапенемами, в настоящее время недостаточно [1]. Кроме того, выявление микроорганизмов, обладающих приобретенными карбапенемаза-

ми, необходимо для обеспечения эффективного инфекционного контроля.

Молекулярные методы выявления приобретенных карбапенемаз включают ПЦР и ПЦР в режиме реального времени. ПЦР с гибридизацией на ДНК-чипах и новый молекулярный метод – это MALDI-TOF спектрометрический метод регистрации продуктов гидролиза карбапенемов. Последний метод позволяет определять карбапенемазную активность независимо от типов карбапенемаз, что является его преимуществом. ПЦР – наиболее широко используемый молекулярный метод. Его преимуществами являются высокая скорость получения результатов, высокая стандартизованность, невысокая трудоемкость. Ограничением же этого метода является возможность выявлять только уже известные типы карбапенемаз.

Молекулярные методы сегодня признаны как наиболее надежные и эффективные для выявления приобретенных карбапенемаз. Они используются как референсные методы в научных исследованиях и в референсных лабораториях. В каких случаях использование этих методов в более широкой практике может быть эффективным и востребованным? Рассматривая этот вопрос, М.В. Эйдельштейн называет три условия [15], по которым дополнительные методы, в частности молекулярные тесты, могут быть востребованы в рутинной практике. Во-первых, если дополнительные тесты позволяют существенно повысить эффективность и скорость выявления наиболее значимых механизмов резистентности по сравнению со стандартными методами определения чувствительности. Это относится и к использованию молекулярных методов для выявления приобретенных карбапенемаз. Во-вторых, если выявляемые факторы резистентности являются единственной или основной причиной устойчивости к антибиотикам определенной группы или класса. Это условие зависит от локальной распространенности тех или иных механизмов резистентности. Но следует отметить, что положительный результат выявления приобретенных карбапенемаз имеет существенное клиническое значение. И третья причина востребованности дополнительных тестов для выявления резистентности – если определяемые детерминанты резистентности имеют особое эпидемиологическое значение. Это условие в полной мере относится к генам приобретенных карбапенемаз.

Несколько зарубежных производителей предлагают в настоящее время наборы реагентов для выявления генов приобретенных карбапенемаз методом ПЦР. В качестве примера можно привести набор «Huplex³ SuperBug ID» («AMPLEX Biosystems», Нидерланды), основанный на ПЦР с ГИФА-детекцией в формате микропланшета и позволяющий выявлять гены карбапенемаз пяти основных групп – VIM, IMP, KPC, OXA-48 и NDM. Второй пример – это набор «Check-MDR CT102» («Check-Points», Германия), который основан на ПЦР с гибридизацией на ДНК-чипе, где чип локализован на дне специальной пробирки. Тест, выполняемый с использованием этого набора, позволяет выявлять как гены карбапенемаз пяти основных групп, перечисленных выше, так и гены БЛРС группы CTX-M и основных типов SHV и TEM [16]. В настоящее время производители этого набора начали выпуск набора для выявления генов карбапенемаз, основанного на ПЦР в режиме реального времени – «Check-MDR Carba».

При широком использовании в практике ПЦР в режиме реального времени имеет ряд преимуществ по сравнению с пост-ПЦР гибридизацией. Недостатками пост-ПЦР гибридизации на ДНК-чипе или в формате ГИФА являются длительность выполнения анализа (8 часов и более), высокая трудоемкость, но что наиболее важно – высокий риск контаминации продуктами ПЦР, что может приводить к ложно-положительным результатам. Использование ПЦР в реальном времени позволяет решить эту проблему и свести к минимуму риск контаминации, поскольку детекция проводится в закрытых пробирках, и продукты амплификации не попадают во внешнюю среду. При этом время анализа составляет всего один-два часа.

В настоящее время наборы реагентов для выявления генов приобретенных карбапенемаз основных групп методом мультиплексной ПЦР в режиме реального времени разработаны и внедряются в производство в научно-производственной лаборатории ФБУН ЦНИИ эпидемиологии. Первый из трех разработанных наборов реагентов позволяет выявлять гены МБЛ групп VIM, IMP и NDM. Второй набор позволяет выявлять гены карбапенемаз групп KPC и OXA-48, характерные для энтеробактерий. Третий набор позволяет выявлять гены OXA-карбапенемаз ацинетобактеров (группы OXA-23-подобных, OXA-58-подобных и OXA-40/24-подобных) [17]. В каждом тесте регистрация результатов

для генов карбапенемаз различных групп проводится по отдельным каналам флуоресцентной детекции. Время проведения анализа составляет около 2 часов. С использованием этих тестов можно анализировать различные образцы – чистые культуры, гемокультуры, посев ликвора или БАЛ на среду обогащения, а также исходный биологический материал (например, мочу при острых инфекциях мочевыводящих путей или мазки со слизистых оболочек ротоглотки и прямой кишки при проведении скрининга или эпидемиологических исследований). С использованием этих ПЦР-тестов были выявлены клинические изоляты *Klebsiella pneumoniae*, продуцирующие карбапенемазу OXA-48 в трех стационарах в различных городах России [11, 18]. Далее, с использованием данных тестов при проведении многоцентрового исследования был выявлен (также впервые в России) клинический изолят *Acinetobacter pittii*, продуцирующий МБЛ группы NDM [18]. По нашим данным, эти ПЦР-тесты могут служить эффективным инструментом для выявления штаммов, обладающих приобретенными карбапенемазами [17].

По мнению ведущих российских и зарубежных специалистов [1, 6, 15], использование комплексного подхода, включающего фенотипические и молекулярные методы, может существенно повысить эффективность выявления БЛРС и приобретенных карбапенемаз. Использование эффективных методов выявления данных механизмов антибиотикорезистентности является необходимым условием обеспечения инфекционного контроля и практики рационального использования антибиотиков.

Литература

1. Livermore D. Are susceptibility tests enough, or should laboratories still seek ESBLs and carbapenemases directly? / D. Livermore, et al. // J. Antimicrob. Chemother. – 2012. – Vol. 67. – P. 1569–1577.
2. Cornaglia G. Living with ESBLs / G. Cornaglia, J. Gau, D. Livermore // Clin. Microbiol. Infect. – 2008. – Vol. 14 (Suppl. 1). – P. 1-2.
3. Эйдельштейн М.В. Антибиотикорезистентность Грам(-) микроорганизмов в России и пути ее преодоления / М.В. Эйдельштейн // Сб. трудов III ежегодного Всеросс. конгресса по инфекционным болезням. – М., 2011.
4. Sukhorukova M. et al. / ECCMID, 2010. – P. 716.
5. Голуб А.В. Антибактериальная терапия осложнённых интраабдоминальных инфекций / А.В. Голуб, А.В. Дехнич, Р.С. Козлов // Клин. микробиол. антимикроб. химиотер. – 2011. – Т. 13. №2. – С. 158-162.
6. Miragou V. Acquired carbapenemases in Gram-negative bacterial pathogens: detection and surveillance issues / V. Miragou, G. Cornaglia, M. Edelstein, I. Galania, C.G. Giske, et al. // Clin. Microbiol. Infect. – 2010. – Vol. 16. – P. 112–122.
7. Edelstein M. Rapid spread of *Pseudomonas aeruginosa* clonal complex 235 throughout Russia: implications in increasing antibiotic resistance / M. Edelstein, et al. // 22^d ECCMID, 2012. – P. 1835.
8. Kaase M. Carbapenemases arrived in Germany: report for 2011 of the national reference laboratory for multidrug-resistant gram-negative bacteria / M. Kaase, et al. // 22^d ECCMID, 2012. – P. 1681.
9. Мартинович А.А. Генетическое разнообразие и фармакодинамическое обоснование прогноза резистентности к антимикробным препаратам нозокомиальных штаммов *Acinetobacter spp* в различных регионах России и Белоруссии: дисс. ... канд. мед. наук. – Смоленск, 2010. – 119 с.
10. Martinovich A. Ten-years resistance trends of nosocomial *Acinetobacter spp* in Russia / A. Martinovich, et al. // 19th ECCMID, 2009. – P. 1717.
11. Sukhorukova M. First outbreak of carbapenem-resistant OXA-48-producing *Klebsiella pneumoniae* in Russia / M. Sukhorukova, et al. // 22^d ECCMID, 2012. – P. 2508.
12. EUCAST. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. – Version 1.3, January 2011.
13. Определение чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препаратам: Методические указания. – МУК-4.2.1890-04. – 2004.
14. Шевченко О.В. Металло-бета-лактамазы: значение и методы выявления у грамм-отрицательных неферментирующих бактерий: Методические рекомендации / О.В. Шевченко, М.В. Эйдельштейн, М.Н. Степанова // Клин. микробиол. антимикроб. химиотер. – 2007. – Т. 9. №3. – С. 211-218.
15. Эйдельштейн М.В. XIII международный конгресс МАКМАХ/ESCMID, 2011.
16. Naas T. Evaluation of a DNA microarray (CheckMDR CT102) for rapid detection of TEM, SHV, and CTX-M extended-spectrum β -lactamases and of KPC, OXA-48, VIM, IMP, and NDM-1 carbapenemases / T. Naas, et al. // J. Clin. Microbiol. – 2011. – Vol. 49. № 4. – P. 1608-1613.
17. Савочкина Ю.А. XIV международный конгресс МАКМАХ/ESCMID / Ю.А. Савочкина // Клин. Микробиол. Антимикроб. Химиотер. – 2012. – Т.14, № 2.
18. Сухорукова М.В. XIV международный конгресс МАКМАХ/ESCMID / М.В. Сухорукова // Клин. Микробиол. Антимикроб. Химиотер. – 2012. – Т.14, № 2.