

Генетические маркеры резистентности у грамотрицательных бактерий, устойчивых к карбапенемам, выделенных у пациентов реанимации онкологического стационара

Аминова Полина Геннадьевна^{1,2}, Исламова Елена Николаевна², Агалакова Милана Арсеновна², Попов Валерий Валерьевич³, Андрюкова Ярослава Борисовна²

¹Кафедра медицинской микробиологии и клинической лабораторной диагностики ФГБОУ ВО «Уральский государственный медицинский университет» Минздрава России

²ООО «Кволити Мед» Екатеринбург, Россия

³Государственное автономное учреждение здравоохранения Свердловской области «Свердловский областной онкологический диспансер»

Автор, ответственный за переписку: Аминова Полина Геннадьевна
телефон – 8 (919)3970925, почта – pga@qualitymed.ru

Введение

В настоящее время множественная лекарственная устойчивость у грамотрицательных бактерий представляет собой ежедневную проблему для управления антимикробной терапией у пациентов отделений реанимации и интенсивной терапии. Показано, что бактерии с критическим профилем резистентности, ответственны за 45–70% вентилятор-ассоциированных пневмоний [1], 20–30% катетер-ассоциированных инфекций кровотока [2] и часто вызывают инфекции в области хирургического вмешательства, инфекции мочевыводящих путей [3], постоперационные менингиты и другие. В таких ситуациях своевременное назначение адекватной антибиотикотерапии является решающим фактором, определяющим исход для пациентов, особенно при наличии критериев сепсиса и септического шока [4].

Устойчивость к бета-лактамам у бактерий порядка *Enterobacterales*, *Pseudomonas aeruginosa* и *Acinetobacter baumannii* обусловлена продукцией ферментов, инактивирующих антибиотики, и/или множеством других неферментативных механизмов [5]. Генетические детерминанты, определяющие фенотип приобретенной антибиотикорезистентности, представлены: хромосомными мутациями, происходящие в *core*-геноме бактериальной клетки, и генетическими детерминантами, которые могут передаваться горизонтальным путем (например, в виде мобильных генетических элементов: плазмид и транспозонов).

Распространение бета-лактамаз, переносимых плазмидами, представляет собой наиболее критическую проблему устойчивости. Плазмиды, кодирующие ESBL и карбапенемазы, часто несут детерминанты резистентности и к другим классам противомикробных препаратов, включая аминогликозиды (аминогликозид-модифицирующие ферменты или 16S рРНК-метилазы) и фторхинолоны (Qnr, AAC(6)-Ib-cr или эффлюксные насосы), что является ключевой особенностью, способствующей распространению множественной лекарственной устойчивости у грамотрицательных бактерий.

Цель данного исследования – оценить частоту встречаемости генетических детерминант резистентности у штаммов грамотрицательных бактерий с фенотипической устойчивостью к карбапенемам (или с подозрением на нее по результатам скрининга), выделенных от пациентов с инфекцией, с использованием тест-системы «БакРезиста GLA», а также проанализировать паттерны антибиотикорезистентности этих штаммов.

Материалы и методы

Штаммы изучаемых бактерий были получены из биоматериала пациентов, находящихся в отделении реанимации и интенсивной терапии стационара онкологического профиля ГАУЗ СО «СООД» г. Екатеринбурга. Микробиологические исследования проводились в лаборатории ООО «Кволити мед» (г. Екатеринбург). Для исследования были отобраны штаммы грамотрицательных бактерий, выделенные с сентября 2023 по июль 2024 гг., устойчивые к карбапенемам, а также штаммы энтеробактерий с диаметром зоны задержки роста для меропенема <28 мм [6].

Образцы биологического материала: мазки из ран, кровь, эндотрахеальные аспираты и мочу, собирали в соответствии со стандартными операционными процедурами. По очагу инфекции пациенты распределялись следующим образом: с инфекцией кровотока – 2, с инфекцией нижних дыхательных путей – 20 человек, с интраабдоминальной инфекцией – 14, с инфекцией кожи и мягких тканей – 6, с инфекцией мочевых путей – 7.

Микробиологические методы.

Посев биоматериала проводился на стандартизированные питательные среды (агар с 5% кровью барана, хромогенный агар, шоколадный агар, агар Сабуро и другие). Идентификацию выросших колоний производили фенотипическими методами и методом прямого белкового профилирования - MALDI-TOF масс-спектрометрии (время пролетная матрично-ассоциированная лазерная десорбционная ионизационная масс-спектрометрия) на приборе Vitek MS (BioMérieux, пр-во Франция). Для этого бактериальную массу наносили на спот слайда, покрывали 1 мкл матрицы (α -циано-3-гидроксикоричная кислота), высушивали при комнатной температуре, далее считывали прибором масс-спектры рибосомальных белков и сравнивали с базой данных с использованием программного обеспечения Myla (BioMérieux, пр-во Франция). Чувствительность к антибиотикам определяли диско-диффузионным методом по стандартной методике, описанной EUCAST. Считывание производили с использованием прибора Adagio («Bio-Rad», США). Критерии для интерпретации категорий чувствительности осуществляли по действующему стандарту EUCAST: Clinical breakpoints - bacteria.

Молекулярно-генетические методы. Бактериальную ДНК выделяли с использованием набора ПРОБА-НК («ДНК-технология», Россия) в соответствии с инструкцией к используемому комплекту реагентов. Детекцию генов резистентности к бета-лактамам антибиотикам у бактерий осуществляли методом ПЦР в режиме реального времени с использованием тест-системы «БакРезиста GLA» («ДНК-технология») на амплификаторе ДТ96 («ДНК-технология»).

В исследование включены клинические изоляты следующих микроорганизмов: *Klebsiella pneumoniae* – 42 штамма, *Pseudomonas aeruginosa* - 2, *Escherichia coli* - 1, *Enterobacter cloacae* – 1, *Acinetobacter baumannii* – 3 штамма.

Результаты исследований и обсуждение

Частота встречаемости генов bla_{CTX-M-1}, bla_{TEM} и bla_{SHV} у *K.pneumoniae* была отмечена у 90,5%, 26,2% и 100% изолятов соответственно.

Сочетание трех генов bla_{CTX-M-1}, bla_{TEM} и bla_{SHV} было замечено у 9 штаммов (21,4%), двух генов bla_{TEM} и bla_{SHV} – у 11 (26,2%), двух генов bla_{CTX-M} и bla_{SHV} – у 38 (90,5%) штаммов *K.pneumoniae*.

Частота встречаемости разных групп генов карбапенемаз у *K. pneumoniae* показана на рис. 1. Наиболее распространенными были гены bla_{OXA-48} – 33,3%, bla_{NDM} – 16,77%, а также сочетание bla_{OXA-48} и bla_{NDM} – 35,7%.

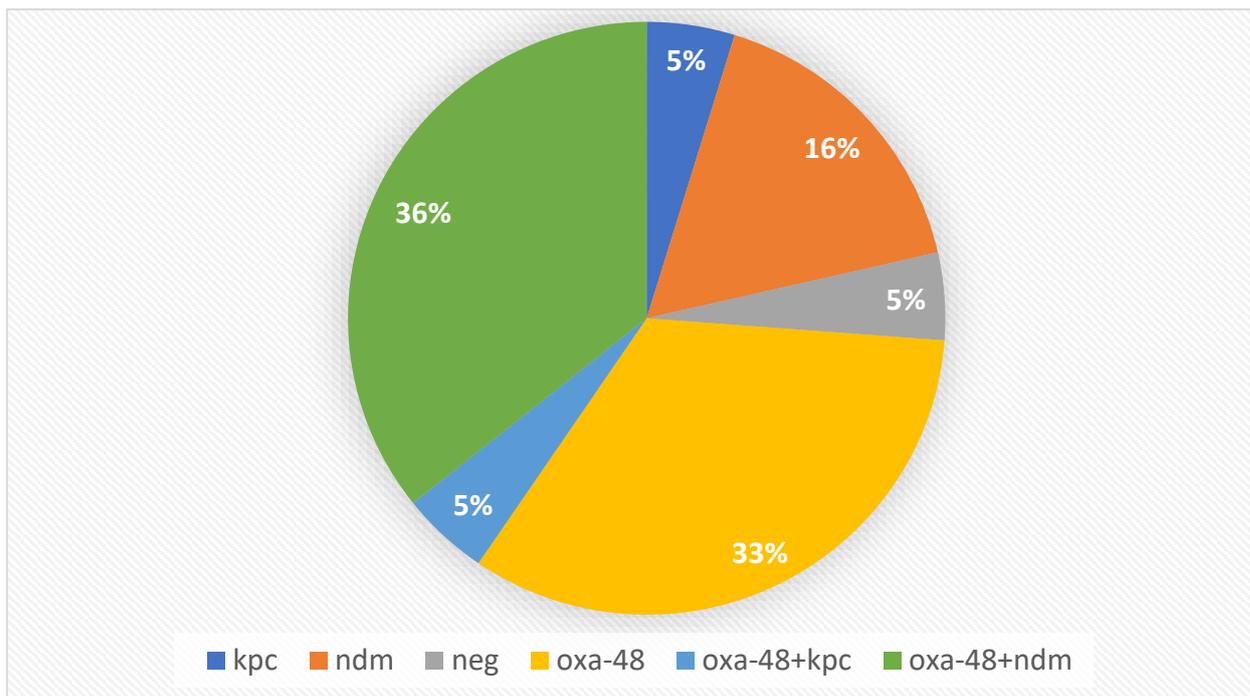


Рис. 1. Частота встречаемости разных групп генов карбапенемаз у *K. pneumoniae*

Также мы проанализировали паттерны резистентности к разным группам противомикробных препаратов штаммов *K. pneumoniae* в зависимости от типа карбапенемазы. Результаты приводятся в таблице 1.

Наиболее благоприятный профиль антибиотикочувствительности у штаммов клебсиелл, продуцирующих карбапенемазы группы ОХА-48. Среди них 14,3% были чувствительны к меропенему, 85,7% изолятов - чувствительны к меропенему при повышенной экспозиции, 50% - чувствительны к амикацину, 28,6% - к гентамицину, 7,1% - к цефалоспорином III-IV поколений, чувствительны к цефтазидиму/авибактаму были все изоляты (100%). Самый неблагоприятный профиль у штаммов *K. pneumoniae*, продуцирующих карбапенемазы групп NDM и сочетание продукции NDM и ОХА-48 карбапенемаз. Такие изоляты обладали устойчивостью ко всем исследуемым группам препаратов, кроме аминогликозидов. Среди продуцентов NDM 42,9% и 85,7% были чувствительны к амикацину и гентамицину соответственно. При сочетанной продукции NDM и ОХА-48 - 86,7% штаммов были чувствительны к гентамицину.

Среди 42 штаммов - 2 штамма *K. pneumoniae* обладали фенотипической устойчивостью к карбапенемам, но у них не были выявлены гены карбапенемаз. Следует подчеркнуть, что продукция карбапенемаз не является единственным механизмом устойчивости к карбапенемам у Enterobacterales, поскольку этот фенотип может также возникать в процессе терапии у гиперпродуцентов ESBL или AmpC с приобретенной непроницаемостью для карбапенемов из-за потери поринов внешней мембраны в результате мутации [5]. Также это может быть связано с ограниченным перечнем выявляемых маркеров резистентности в тест-системе для ПЦР.

При исследовании 2 штаммов *P. aeruginosa* с устойчивостью к карбапенемам мы обнаружили, что оба они несут ген bla_{GES}. В предыдущие годы мы встречались с обнаружением у *P. aeruginosa* только генов металло-β-лактамаз (а именно bla_{VIM}) или неферментными механизмами, которые очень часты у *P. aeruginosa* (например, потеря порина OprD и др.). Данные штаммы обладали устойчивостью ко всем протестированным

препаратам (в т.ч. к цефтазидиму/авибактаму), за исключением чувствительности к амикацину.

Среди 3 штаммов *Acinetobacter baumannii*: 2 штамма имели сочетание bla_{OXA-51} и bla_{OXA-40}, 1 штамм - bla_{OXA-23}. При этом отличались паттерны их антибиотикорезистентности. Штаммы *Acinetobacter baumannii* OXA-51 + OXA-40 – были чувствительны к триметоприм/сульфаметоксазолу и устойчивы к аминогликазидам, а штамм с OXA-23 карбапенемазой был чувствителен к гентамицину и тобрамицину, но устойчив к триметоприм/сульфаметоксазолу.

Среди других энтеробактерий, фенотипически устойчивых к карбапенемам, мы выявляли: *E.coli* - продуцент ESBL и карбапенемазы (за счет наличия генов bla_{CTX-M-1} и bla_{OXA-48}), *E.cloacae* - продуцент ESBL и карбапенемазы (за счет наличия генов bla_{CTX-M-1} и сочетания bla_{OXA-48}+ bla_{NDM}).

Выводы

Таким образом, с течением времени мы наблюдаем постепенное изменение спектра карбапенемаз у грамотрицательных бактерий в сторону их многообразия и частое появление их сочетанной продукции, что в свою очередь отражается на паттернах антибиотикорезистентности. Кроме того, мы отметили появление в нашем регионе штаммов *P.aeruginosa*, несущих ген bla_{GES}, а также появление карбапенемаз у других энтеробактерий (*E.coli*, *E.cloacae*).

Мы предлагаем стратегию обнаружения карбапенемаз, при которой фенотипические и молекулярные тесты используются одновременно. Устойчивые к карбапенемам, но отрицательные по результатам ПЦР изоляты часто имеют другие генетические варианты ESBL и карбапенемаз или неферментативные механизмы резистентности. В свою очередь молекулярные тесты, помогают обнаруживать продукцию карбапенемаз при экспрессии генов на низком уровне, когда фенотипически наблюдается чувствительность к карбапенемам (в случаях продукции OXA-48).

Что касается клинической практики, известные механизмы устойчивости к противомикробным препаратам у грамотрицательных бактерий могут влиять на несколько аспектов при лечении антибиотиками у пациентов в критическом состоянии: выбор эмпирического режима терапии, выбор доступных вариантов деэскалации и эскалации, например, из-за возникновения устойчивости во время терапии.

Список литературы

1. Barbier F, Andremont A, Wolff M, Bouadma L. Hospital-acquired pneumonia and ventilator-associated pneumonia: recent advances in epidemiology and management. *Curr Opin Pulm Med*. 2013;19(3):216–228.
2. REA-Raisin Network (2012) Surveillance of nosocomial infections in critically ill adult patients, France, 2012.
3. Rosenthal VD, Bijie H, Maki DG, Mehta Y, Apisarnthanarak A, Medeiros EA, et al. International Nosocomial Infection Control Consortium (INICC) report, data summary of 36 countries, for 2004–2009. *Am J Infect Control*. 2012;40(5):396–407.
4. Dellinger RP, Levy MM, Rhodes A, Annane D, Gerlach H, Opal SM, et al. Surviving Sepsis Campaign: international guidelines for management of severe sepsis and septic shock, 2012. *Intensive Care Med*. 2013;39(2):165–228.
5. Findlay J, Hamouda A, Dancer SJ, Amyes SG. Быстрое приобретение сниженной восприимчивости к карбапенемам у штамма *Klebsiella pneumoniae*, возникающего во время терапии меропенемом. *Clin Microbiol Infect*. 2012; 18 (2):140–146.
6. EUCAST_files/Breakpoint_tables/v_14.0
https://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Breakpoint_tables/v_14.0_Breakpoint_Tables.pdf

Таблица 1. Паттерны резистентности к разным группам противомикробных препаратов штаммов *K. pneumoniae* в зависимости от типа карбапенемазы.

Тип карбапенемазы	kpc						ndm						оха-48						оха-48+kpc						оха-48+ndm											
	S		I		R		S		I		R		S		I		R		S		I		R		S		I		R							
КЧ	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%						
АБ																																				
ам/кл	-	-	-	-	2	100	-	-	-	-	7	100	-	-	-	-	14	100	-	-	-	-	2	100	-	-	-	-	15	100	-	-	-	-	15	100
цеф	-	-	-	-	2	100	-	-	-	-	7	100	1	7,1	-	-	13	92,9	-	-	-	-	2	100	-	-	-	-	15	100	-	-	-	-	15	100
цеф/ав	2	100	-	-	-	-	-	-	-	-	7	100	14	100	-	-	-	-	2	100	-	-	-	-	-	-	-	-	15	100	-	-	-	-	15	100
мер	-	-	-	-	2	100	-	-	-	-	7	100	2	14,3	12	85,7	-	-	-	-	-	-	2	100	-	-	-	-	15	100	-	-	-	-	15	100
ам	2	100	-	-	-	-	3	42,9	-	-	4	57,1	7	50	-	-	7	50	2	100	-	-	-	-	-	-	-	-	15	100	-	-	-	-	15	100
ген	2	100	-	-	-	-	6	85,7	-	-	1	14,3	4	28,6	-	-	10	71,4	2	100	-	-	-	-	13	86,7	-	-	2	13,3	-	-	-	-	2	13,3
цип	-	-	-	-	2	100	-	-	-	-	7	100	-	-	-	-	14	100	-	-	-	-	2	100	-	-	-	-	15	100	-	-	-	-	15	100

Примечание. S – чувствительные, I – чувствительные при увеличенной экспозиции, R – резистентные
 ам/кл – амоксициллин/клавуланат, цеф – цефотаксим, цеф/ав – цефтазидим/авибактам, мер - меропенем, ам – амикацин, ген – гентамицин, цип - ципрофлоксацин
 КЧ – категория чувствительности, АБ – антибактериальный препарат