

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ «НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ИНСТИТУТ ДЕТСКИХ ИНФЕКЦИЙ ФЕДЕРАЛЬНОГО МЕДИКО-БИОЛОГИЧЕСКОГО АГЕНТСТВА»

На правах рукописи

АГЕЕВЕЦ ВЛАДИМИР АНДРЕЕВИЧ

МОЛЕКУЛЯРНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ПРОДУЦЕНТОВ
КАРБАПЕНЕМАЗ СЕМЕЙСТВА ENTEROBACTERIACEAE,
ВЫДЕЛЕННЫХ В САНКТ-ПЕТЕРБУРГЕ

03.02.03 – микробиология

Диссертация на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

Научный руководитель:

д. м. н., профессор Сидоренко С. В.

Санкт-Петербург

2016

Оглавление

	Стр.
Введение	5
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	18
1.1. Появление антимикробной резистентности	19
1.2. Механизм действия β -лактамных антибиотиков	21
1.3. Устойчивость к β -лактамным антибиотикам, не связанная с продукцией β -лактамаз	22
1.4. Классификация β -лактамаз	24
1.5. Происхождение β -лактамаз	30
1.6. Механизмы гидролиза β -лактамазами	31
1.7. Основные общественно-значимые карбапенемазы	33
1.7.1. Карбапенемазы IMP-группы	34
1.7.2. Карбапенемазы VIM-группы	35
1.7.3. Карбапенемазы KPC-группы	37
1.7.4. Карбапенемазы OXA-48-группы	40
1.7.5. Карбапенемазы NDM-группы	41
1.8. Выявление инфекций, вызванных продуцентами карбапенемаз и бессимптомного носительства	46
1.9. Глобальная эпидемиология карбапенемаз	49
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	55
2.1. Фенотипические методы исследования	55

2.1.1. Выделение, хранение и идентификация изолятов	55
2.1.2. Определение чувствительности к антибактериальным изолятам	55
2.2. Генотипические методы исследования	56
2.2.1. Постановка ПЦР (выделение ДНК, амплификация, электрофорез)	56
2.2.2. Мультилокусное сиквенс-типирование	58
2.3. Полногеномное секвенирование	58
2.4. Выделение плазмидной ДНК, трансформация, конъюгация	59
2.5. Обработка результатов исследования	61
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	63
3.1. Оптимизация метода детекции карбапенемазной активности грамотрицательных бактерий с помощью MALDI-TOF масс-спектрометрии и методов детекции генов карбапенемаз	63
3.1.1. Оптимизация метода детекции карбапенемазной активности изолятов с помощью MALDI-TOF масс-спектрометрии	63
3.1.2. Оптимизация методов молекулярной детекции генов карбапенемаз	67
3.2. Анализ молекулярной эпидемиологии штаммов-продуцентов карбапенемаз циркулирующих на территории Санкт-Петербурга	71
3.2.1. Анализ молекулярной эпидемиологии штаммов-продуцентов гена <i>bla_{NDM-1}</i>	71
3.2.2. Анализ молекулярной эпидемиологии штаммов-продуцентов гена <i>bla_{KPC}</i>	73
3.2.3. Анализ молекулярной эпидемиологии штаммов-продуцентов гена <i>bla_{OXA-48}</i>	74

3.2.4. Анализ молекулярной эпидемиологии штаммов-продуцентов гена <i>bla</i> _{VIM-4}	75
3.2.5. Анализ резистома типовых продуцентов карбапенемаз на основе данных полногеномного секвенирования	75
3.3. Оценка частоты носительства и разнообразия продуцентов карбапенемаз пациентами отделений хирургии Санкт-Петербурга	79
3.4. Детальный молекулярный анализ первого изолята-продуцента карбапенемазы <i>bla</i> _{KPC-2} , выделенного в России	84
3.4.1. Исследование мобильного элемента несущего ген <i>bla</i> _{KPC-2}	87
3.4.2. Эпидемиология и возможная эволюция мобильных элементов включающих TEM-KPC - комплекс	93
ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ ИССЛЕДОВАНИЯ	96
4.1. Сравнение внедрённых в практику методов детекции карбапенемаз с аналогами	96
4.2. Особенности эпидемиологии карбапенемаз в Санкт-Петербурге	98
4.3. Носительство карбапенемаз и его роль в их распространении	101
4.4. Новый вариант генетического окружения гена <i>bla</i> _{KPC-2}	102
Заключение	104
Выводы	106
Практические рекомендации	107
Список сокращений	108
Благодарности	110
Список использованной литературы	111

Введение

Актуальность исследования

В течение более тридцати лет карбапенемные антибиотики были ключевым звеном в терапии нозокомиальных инфекций, вызванных патогенами, устойчивыми к другим группам антибиотиков. Первый карбапенемный антибиотик – имипенем был внедрен в практику в начале 1980-х годов (Baumgartner et al., 1983), практически, одновременно с первым описанием бета-лактамаз расширенного спектра действия (БЛРС, ESBL – Extended-spectrum-beta-lactamase), которые эффективно гидролизуют пенициллины и цефалоспорины I – IV поколений, но не карбапенемные антибиотики. За карбапенемами закрепился штамп «последняя линия антимикробной обороны», который применяется чтобы подчеркнуть значимость антибиотиков данной группы в лечении тяжёлых инфекций.

Быстрое распространение БЛРС привело к резкому снижению роли большинства бета-лактамов в лечении тяжелых госпитальных инфекций, возрастанию роли и частоты применения карбапенемов. Следствием стало формирование и распространение резистентности к этим антибиотикам. Причиной появления у бактерий резистентности к карбапенемным антибиотикам могут быть: модификация мишени действия препаратов в результате спонтанных мутаций в кодирующих их генах, активное выведение антибиотика из клетки (эффлюкс), нарушение проницаемости внешних структур микробной клетки, инактивация молекулы антибиотика, а также различные комбинации данных механизмов. Несмотря на существование различных механизмов формирования приобретённой устойчивости к карбапенемным антибиотикам, наибольшей угрозой во всём мире признано распространение резистентности за счёт инактивации молекулы антибиотика под действием ферментов группы карбапенемаз, т.е. ферментов, расщепляющих молекулы карбапенемного антибиотика. Инфекции, вызванные СРЕ (carbapenemase producing *Enterobacteriaceae*), связаны с

высоким уровнем смертности (Gasink, Edelstein et al. 2009), по разным оценкам, достигающим 50-90% (Schwaber et al. 2008, Ben-David et al. 2012). По оценке экспертов центров по контролю за заболеваниями США (CDC – Centres for Diseases Control), распространение энтеробактерий, устойчивых к карбапенемам, рассматривается как одна из трех наиболее серьезных угроз системе здравоохранения (Enfield et al. 2014).

Особенностью наиболее значимых генов, кодирующих карбапенемазы, является их локализация на мобильных генетических элементах, что обеспечивает им быстрое внутри- и межвидовое распространение, в ходе горизонтального переноса. Наиболее характерным примером быстрого распространения генов карбапенемаз может служить появление и распространение фермента NDM-1, который впервые был описан в 2009 году (Yong et al. 2009), а ретроспективно его удалось обнаружить в коллекции 2006 года. На сегодняшний день, случаи выявления этого гена у клинических изолятов были описаны более чем в 40 странах.

Опасность быстрого распространения продуцентов карбапенемаз усугубляется рядом важных фактов, так для этих бактерий характерно наличие ассоциированной резистентности к антибиотикам большинства групп, в ряде случаев возможно формирование «панрезистентных» штаммов, при этом в ближайшие 4 – 5 лет появление в медицинской практике новых антибиотиков, преодолевающих этот механизм резистентности, маловероятно. Сложившаяся ситуация связана с риском возврата в «доантибиотическую эру», когда даже нетяжелые по современным представлениям инфекции будут приводить к летальным исходам. Таким образом, очевидно, что сдерживание распространения карбапенемаз следует отнести к наиболее актуальным задачам современного здравоохранения. В свою очередь, очевидно и то, что эффективно решить указанную задачу без детального понимания закономерностей процессов распространения резистентности невозможно.

Степень разработанности темы исследования

Первый случай продукции представителем *Enterobacteriaceae* фермента способного разрушать молекулы карбапенемных антибиотиков (NmcA) был описан в 1993 году (Naas and Nordmann 1994). С начала 1990хх, описано большое количество различных карбапенемаз, относящихся, в основном, к трём молекулярным классам А, В и D (Queenan and Bush 2007).

В 2013 году наиболее распространёнными карбапенемазами в Европе были КРС-тип (*Klebsiella pneumoniae* carbapenemase), VIM-тип (Verona integron-encoded metallo-beta-lactamase), IMP-тип (IMP-type metallo-beta-lactamase), NDM-тип (New Delhi metallo-beta-lactamases) и OXA-48-тип (OXA-48-like carbapenem-hydrolysing oxacillinases) (Walsh et al. 2010, Nordmann et al. 2011). Распространение различных карбапенемаз на 2013 год в Европе по данным Европейского центра профилактики болезней и контроля (European Centre for Disease Prevention and Control) имеет следующую картину: эндемичными очагами названы Италия и Греция (пятая группа по эпидемиологической шкале), внутрибольничное распространение CRE происходят в Израиле, Ирландии, Венгрии (4 группа). Всего в 26 странах Европы ситуация находится в состоянии от регулярных вспышек до эндемической, в девяти странах обнаружены единичные случаи и в трёх странах нет выявленных случаев инфекций, вызванных CRE: в Исландии, Черногории и Македонии.

В России по состоянию на 2012 год было достаточно хорошо изучено распространение карбапенемаз у *P. aeruginosa*, первые сообщения об обнаружении у этих бактерий карбапенемаз VIM-типа относятся к 2006 г (Черкашин Е.А, и др. 2006). Позднее были опубликованы данные о распространении на территории России, Казахстана и Белоруссии генетических линий *P. aeruginosa*, продуцирующих VIM-2 карбапенемазы (Edelstein et al. 2013). О распространении карбапенемаз среди *Enterobacteriaceae* было известно гораздо меньше. OXA-48 были

обнаружены в Смоленске, а VIM-4 - в Москве (Shevchenko et al. 2012). В Санкт-Петербурге карбапенемазы NDM-1 обнаружены одновременно в трех лабораториях, включая лабораторию, где выполнялась данная работа (Ageevets et al. 2013, Barantsevich et al. 2013, Pavelkovich et al. 2014).

Цель исследования

Оценить распространение и охарактеризовать клональную структуру представителей семейства *Enterobacteriaceae*, продуцирующих ферменты карбапенемазы в Санкт-Петербурге

Задачи исследования

1. Выявить и охарактеризовать с помощью мультилокусного сиквенс-типирования клональность продуцентов карбапенемаз семейства *Enterobacteriaceae* в Санкт-Петербурге, выявить их связь с глобальными генетическими линиями.
2. Оценить наличие бессимптомной колонизации кишечника пациентов отделений реанимации и интенсивной терапии продуцентами карбапенемаз.
3. Оптимизировать методы MALDI-TOF масс-спектрометрической детекции карбапенемазной активности грамотрицательных бактерий и ПЦР детекции наиболее актуальных генов карбапенемаз.
4. Выявить локализацию и расшифровать структуру генетического окружения гена *bla*_{KPC-2} у изолята *Klebsiella pneumoniae* №565 – первого описанного продуцента карбапенемазы KPC-типа в России.

Научная новизна

Впервые на территории Российской Федерации выявлено распространение бактерий семейства *Enterobacteriaceae*, продуцирующих карбапенемазы групп NDM и KPC. Изоляты *K. pneumoniae*, несущие ген *bla*_{NDM-1}, выявлены в пяти стационарах Санкт-Петербурга, в трёх стационарах изоляты относились к генетической линии ST340, а в двух к – ST101 и ST147. Выявленные продуценты *bla*_{OXA-48} относятся к *K. pneumoniae* ST147 и ST395. Продуценты *bla*_{KPC-2} относятся к *K. pneumoniae* ST258, ST15 а также ST273. Продукция карбапенемазы KPC у *K. pneumoniae* ST273 описана впервые. Среди бактерий-продуцентов карбапенемазы NDM-1 *K. pneumoniae*

генетической линии ST340 обнаружены в трёх стационарах, что свидетельствует в пользу гипотезы о единичных эпизодах импорта генов в Россию. Разнообразие клональных групп продуцентов КРС карбапенемаз (ST258, ST15 и ST273) позволяет предположить множественность случаев импорта этих бактерий на территорию Российской Федерации.

Эпидемический процесс распространения продуцентов карбапенемаз проявляется как в виде бессимптомной колонизации желудочно-кишечного тракта, достигающей у пациентов отделений реанимации 50%, так и случаями клинически выраженных инфекций.

Установлено, что у изолята *K. pneumoniae* 565 (ST273) ген *bla*_{КРС-2} находится в составе нового гипотетически мобильного генетического элемента – составного транспозона, фланкированного Tn3 – повторами. Данный мобильный элемент локализован на плазмиде, включающей два участка регуляции двух групп несовместимости: IncFII и IncR. Полногеномный сиквенс плазмиды несущей данный элемент депонирован в базу данных «ГенБанк» (GenBank Acession number KP008371.1).

Получены факты, позволяющие предположить импорт карбапенемаз КРС-типа из Юго-Восточной Азии.

При анализе результатов полногеномного секвенирования восьми изолятов-продуцентов карбапенемаз, были выявлены дополнительные детерминанты резистентности к β-лактамам, к аминогликозидам, фторхинолонам, МЛС (макролид-линкозамид-стрептограмин), сульфонамиду и триметоприму, что свидетельствует о эффективном накоплении детерминант резистентности нозокомиальными изолятами, что приводит к их множественной устойчивости.

Теоретическая значимость работы

Полученные данные дополняют картину глобального распространения детерминант устойчивости в микробных популяциях. В ходе исследования

были обнаружены как пандемически распространённые генетические линии несущие детерминанты резистентности, как, например, клональная группы *K. pneumoniae* ST258, так и новые генетические линии, как ST273. Отдельно распространение в Санкт-Петербурге доминирующей генетической линии *K. pneumoniae* относящейся к сиквенс-типу 340 (ST340) является примером вспышки, вероятно, связанной с единственным случаем импорта, но распространившейся на несколько лечебно-профилактических учреждений Санкт-Петербурга.

Практическая значимость работы

При анализе результатов оценки антибиотикочувствительности грамотрицательных бактерий – возбудителей госпитальных и внебольничных инфекций необходимо выявлять изоляты, подозрительные на продукцию карбапенемаз.

К подозрительным следует относить изоляты, в отношении которых МПК (или диаметр зоны задержки роста, при использовании диско-диффузионного метода), хотя бы одного карбапенемного антибиотика превосходит значение «эпидемиологической точки отсечения», рекомендуемых EUCAST.

Для верификации продукции подозрительными изолятами карбапенемаз и наличия у них соответствующих генов следует использовать фенотипические методы (тест Ходжа, масс-спектрометрию) и молекулярные тесты (традиционную ПЦР или ПЦР в реальном времени).

Для оценки эпидемиологической ситуации и обоснования мероприятий по сдерживанию распространения антибиотикорезистентности в медицинских учреждениях среди пациентов следует проводить скрининг на бессимптомное носительство продуцентов карбапенемаз.

Выявление в стационарах Санкт-Петербурга бактерий семейства *Enterobacteriaceae*, продуцирующих карбапенемазы, обосновывает

необходимость изменения существующих стандартов этиотропной терапии и профилактики широкого круга инфекций различной локализации.

Одним из резервуаров продуцентов карбапенемаз в человеческой популяции являются пациенты отделений реанимации, среди которых частота бессимптомной колонизации желудочно-кишечного тракта может достигать 50%.

Для быстрого выявления продуцентов карбапенемаз была разработана методика детекции карбапенемазной активности с помощью MALDI-TOF масс-спектрометрии. Создан протокол анализа на основе опубликованных зарубежных работ, который по скорости выполнения и стоимости превзошёл аналоги.

Внедрение результатов работы в практику

Значение полученных результатов подтверждается тем, что разработаны и внедрены рекомендации по детекции карбапенемазной активности у клинических изолятов, определены перспективы практического использования новых знаний о детекции карбапенемазной активности, а также о эпидемиологической ситуации распространения карбапенемазо-продуцирующих штаммов на территории Санкт-Петербурга. Создана эффективная система профилактического обследования пациентов на носительство карбапенемаз. Результаты исследования внедрены в работу ФГБУ НИИ ДИ ФМБА России. Результаты исследования получены на сертифицированном оборудовании согласно рекомендациям производителей, а также с использованием предусмотренных контрольных образцов.

Связь работы с научными программами

Грант РФФИ (Российский фонд фундаментальных исследований).
Название проекта: “Молекулярная и микробиологическая характеристика

граммотрицательных бактерий, продуцирующих карбапенемазы” на срок 2014-2016. Номер проекта: 14-04-00563. Участие в проекте - исполнитель.

Перспективы дальнейшего изучения

Полученные в исследовании данные не дают полного представления о распространении продуцентов карбапенемаз в стационарах России. Необходимо провести исследование с большой выборкой на носительство продуцентов карбапенемаз среди пациентов отделений интенсивной терапии, хирургии, ожоговых отделений и др., где наиболее часто применение широкого спектра антибиотиков и где распространение продуцентов карбапенемаз наиболее характерно и приводит к наиболее серьезным последствиям. Необходимо сформировать систему делающую анализ изолятов со сниженной чувствительностью к карбапенемным антибиотикам обязательным для всех лечебно-профилактических учреждений.

Изучение микроэволюции и внутривидовой филогении основных продуцентов карбапенемаз, например, *K. pneumoniae* – продуцентов bla_{NDM-1} , относящихся к ST340, позволит понять механизмы, пути и скорость распространения и адаптации подобных изолятов в регионах где ранее подобные явления не были описаны.

Личное участие автора в получении результатов

Все этапы экспериментальной части диссертационной работы, а также литературный обзор выполнены самостоятельно. Отдельные части работы – MLST типирование и полногеномное секвенирование были проведены в сотрудничестве с сотрудниками ФГБУ «НИИ ФХМ ФМБА России», а также работы по трансконъюгации и трансформации проведены совместно с Санкт-Петербургским филиалом ФГБУН Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН.

Положения, выносимые на защиту

1. Начиная с 2011 г. в медицинских учреждениях Санкт-Петербурга циркулируют и формируют эндемичные очаги грамотрицательных бактерии – продуцентов глобально распространенных карбапенемаз: NDM-, KPC- и OXA-48-типов.

2. Для сдерживания распространения карбапенемаз необходимо быстрое выявление бактерий-продуцентов на основании анализа фенотипа подозрительных изолятов и детекции генов резистентности молекулярными методами.

3. В глобальном распространении карбапенемаз группы KPC принимает участие новый вариант гипотетического мобильного элемента несущий гены *bla*_{KPC-2}, *bla*_{TEM-1}, *mphA*. Выдвинута гипотеза о связи данного варианта генетического окружения с ранее описанными случаями, где был обнаружен уникальный вариант гена *bla*_{TEM}.

Апробация и публикация материалов диссертации

1. Всероссийская научно-практическая конференция по медицинской микробиологии и клинической микологии (XVI Кашкинские чтения), Санкт-Петербург 2013
2. The 23rd European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases. Berlin 2013
3. Итоговая XXXV научно-практическая конференция ФГБУ «НИИДИ ФМБА России», Санкт-Петербург 2013
4. VII Всероссийская научно-практическая конференция с международным участием «Молекулярная диагностика – 2014, Москва 2014
5. III Санкт-Петербургский международный экологический форум «Окружающая среда и здоровье человека: фундаментальные,

клинические и экологические аспекты современной микробиологии», 2014

6. Российско-китайская научно-практическая конференция по медицинской микробиологии и клинической микологии (XVIII Кашкинские чтения), Санкт-Петербург, 2015

Публикации

Результаты исследований опубликованы в **пяти** журналах, рекомендованных высшей аттестационной комиссией для публикаций материалов диссертационного исследования:

1. Сидоренко С. В. Партина И.В. Агеевец В.А. Имипенем: 30 лет терапии//Антибиотики и химиотерапия. — 2013, Т.58; С. 55-61
2. Агеевец В.А., Партина И.В., Лисицына Е.С., Батыршин И.М., Поненко Л.Н., Шляпников С.А., Ильина Е.Н., Сидоренко С.В. Чувствительность грамотрицательных бактерий, продуцентов карбапенемаз, к антибиотикам различных групп//Антибиотики и химиотерапия, — 2013, Т. 58; №. 3—4 С. 10-13
3. Ageevets V.A., Partina I.V., Lisitsyna E.S., Ilina E.N., Lobzin Y.V., Shlyapnikov S.A., Sidorenko S.V. Emergence of carbapenemase-producing Gramnegative bacteria in Saint Petersburg, Russia// International Journal of Antimicrobial Agents—2014, V. 44. №.2. —P. 152-155
4. 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 (307) С. 9-16

5. Шабанова В.В, Краснова М.В., Божкова С.А., Агеевец В.А., Лазарева И.В., Рукина А.Н., Сидоренко С.В. Первый случай выявления в России *Klebsiella pneumoniae* ST147, продуцирующей NDM-1 карбапенемазу, в травматолого-ортопедическом стационаре. Травматология и ортопедия России. —2015; №.2 (76) С. 90-98.

Результаты исследований, опубликованные в материалах конференций:

1. Агеевец В.А. и др. Первое обнаружение метало-бета-лактамазы NDM-типа в многопрофильном стационаре в России/Агеевец В.А., Партина И.В., Лисицына Е.С., Батыршин И.М., Попенко Л.Н., Шляпников С.А., Ильина И.Н., Сидоренко С.В.//Медицинский академический журнал. Том.12. Выпуск №4. 2012. С. 43-45
2. Агеевец В.А. и др. Выявление карбапенемазной активности у клинических изолятов с помощью масс-спектрометрии/В.А. Агеевец, И.В. Партина, С.В. Сидоренко//Матер. V Ежегодного Всероссийского Конгресса по инфекционным болезням (Москва, 25-27 марта 2013 г.) С. 10-11.
3. Ageevets V.A. Partina I.V. Lisitsyna E.S., Batyrshin I.M., Popenko L.N., Shlyapnikov S.A., Ilna E.N., Sidorenko S.V. Emergence of New Delhi metallo beta-lactamase-1 (NDM-1)-producing *Klebsiella pneumoniae* in Saint Petersburg, Russia //The 23rd European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases Abstract # P1287. Berlin, 2013

4. В.А. Агеевец и др. Угроза распространения карбапенемаз в России/В.А. Агеевец,, Партина И.В., Лисицына Е.С., Ильина Е.Н., Сидоренко С.В./Материалы всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Молекулярная диагностика 2014» (Москва 18-20 марта 2014)/Т. 1, с. 281-282
5. V. Ageevets. J. Sopova. I. Partina. M. Malakhova. E. Pina. E. Kostryukova. S. Sidorenko. Complete sequence of blaKPC-2 harbouring IncFII plasmid from Klebsiella pneumoniae sequence type 273 isolated in Saint Petersburg, Russia//The 25rd European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases Abstract # Copenhagen, 2015
6. I. Partina, V. Ageevets. A. Goncharov. L. Zueva. S. Sidorenko. Cross-sectional study of faecal carriage of carbapenem-resistant Gram-negative bacteria in Saint Petersburg hospitals// The 25rd European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases Abstract # Copenhagen, 2015

Объем и структура диссертационной работы

Диссертация изложена на 137 страницах машинописного текста и состоит из введения, 4 глав, заключения, выводов, списка сокращений и списка литературы. Библиографический список литературы включает 178 источника литературы, в том числе 3 отечественных и 175 иностранных. Диссертация иллюстрирована 12 таблицами и 12 рисунками.

Глава 1. Обзор литературы

Выдержка из книги «Спутник земского врача» 1905 года издания, относящаяся к лечению тяжелого инфекционного заболевания дыхательных путей — пневмонии: «Абсолютный покой; чай с молоком, кофе, коньяк, щелочно-соленые минеральные воды. При высокой t° хинин, салициловые препараты, ванны 20–25° С (до и после рюмки вина). Против колотья в боках горчичники, скипидарники, согревающие компрессы... При кашле капли дионина, кодеина, героина, морфия... При сильно затрудненном дыхании и цианозе — кровососные банки... Для поддержания сердечной деятельности — красное вино, коньяк, шампанское».

Через 55 лет, в конце 60-х годов, успехи антибиотикотерапии и вакцинопрофилактики создали настолько позитивную картину, что победа над инфекционными заболеваниями казалась совсем близкой. Наиболее известную цитату ошибочно приписывают Вильяму Стюарту (Spellberg and Taylor-Blake 2013) «Мы можем победить все инфекционные заболевания» Как мы знаем, в дальнейшем человечество столкнулось с множеством инфекционных опасностей.

Следует отметить несколько событий связанных с появлением проблемы антибиотикорезистентности. Первое событие произошло в 1940 году, вышла публикация посвященная субстанции разрушающей антибактериальные свойства пенициллина (Abraham 1940), которая ссылалась на ещё более ранние работы Александра Флеминга. Таким образом, проблема антибиотикорезистентности берёт своё начало ещё до активного применения пенициллина в практике. В 2001 году Всемирной организацией здравоохранения был разработан и принят фундаментальный документ «Глобальная стратегия по сдерживанию антимикробной резистентности» (Organization 2001). Сам феномен антибиотикорезистентности стал рассматриваться как новая инфекция. В различных документах, принятых в разных странах в период с 2001 по настоящее время, общими являются

постулаты о необходимости сдерживания антибиотикорезистентности и необходимости изучения генетических и биохимических механизмов антимикробной резистентности, а также закономерностей её формирования и распространения.

1.1. Появление антимикробной резистентности

Появление антимикробной устойчивости, как экологический механизм взаимодействия микроорганизмов в среде обитания, появился задолго до вмешательства вида *Homo sapiens* в отношения бактерий. Метагеномные исследования последних лет выявили детерминанты устойчивости у бактерий из самых разнообразных экологических ниш, особое внимание уделяется образцам, полученным из областей, где не прослеживается влияние человека. Подавляющее число исследований ставит своей целью изучить эволюцию детерминант резистентности под влиянием человеческого фактора в виде различных схем антимикробных терапий. Однако, опубликованы данные о том, что эволюция механизмов устойчивости развивается также в нишах изолированных от влияния деятельности человека (Rolain et al. 2012). Распространение резистентности в течение периода активного применения антибиотиков в лечебной практике связано с переносом сформированных ранее детерминант устойчивости из свободноживущих видов бактерий к представителям человеческой микробиоты. К механизмам такого переноса генов относят трансдукцию (Lupo et al. 2012) (Parsley et al. 2010), а также мобилизацию генов на мобильных генетических элементах (транспозонах). Новейшая история эволюции и распространения детерминант резистентности началась с «золотой эры антибиотикотерапии». Итогом стали мультирезистентные штаммы основных клинически - значимых микроорганизмов. Накопление нескольких детерминант резистентности к различным классам антимикробных препаратов является глобальной проблемой общественного здоровья. Изначально резистентные штаммы выделяются в медицинских

учреждениях, где наиболее активно применяются антимикробные препараты. *Streptococcus pyogenes*, устойчивый к действию сульфонида, впервые обнаружен в 1930-х годах в военном госпитале (Levy 1982), а пенициллин-резистентный *Staphylococcus aureus*, был обнаружен в Лондоне очень скоро после внедрения пеницилина в 1940-х годах (Barber and Rozwadowska-Dowzenko 1948). Множественная устойчивость впервые была обнаружена у *Escherichia coli*, *Shigella* sp. и *Salmomella* sp. в конце 1950-х-1960-х годов (Watanabe 1963). Подобные изоляты стали проблемой в первую очередь в развивающихся странах, но в 1970-х годах ситуация поменялась, когда у *Haemophilus influenzae* и *Neisseria gonorrhoeae* была выявлена устойчивость к ампициллину, а у *H. influenza* ещё и устойчивость к хлорамфениколу и тетрациклину (Elwell et al. 1977). На волне роста популярности антибиотиков началось быстрое распространение детерминант устойчивости к антибиотикам среди различных патогенов, особенно остро эта проблема представлена в странах, где использование антибиотиков допускается без рекомендаций врачей. Тенденция распространения устойчивых штаммов привела к постепенной смене антибактериальных препаратов на новые, эффективные, но более дорогие. Лечение заболеваний, вызванных мульти-устойчивыми изолятами требует применения нескольких типов антимикробных препаратом, иногда их количество достигает 6-7 (Iseman 1993).

Существует несколько механизмов обеспечивающих резистентность бактерий. Действие β -лактамаз направлено непосредственно на сам антибиотик, аналогично инактивируются аминогликозиды (гентамицин, стрептомицин) и хлорамфеникол. Другой путь защиты микробной клетки связан с транспортом антибиотика либо внутрь клетки, либо во вне. Активное выведение антибиотика из клетки связано зачастую с устойчивостью к хлорамфениколу и фторхинолонам (Nikaido 1996). Третий механизм связан с модификацией мишени антибиотика, что приводит к

неспособности антимикробного агента препятствовать реализации витальной функции, например, ферменты участвующие в репликации ДНК или синтезе клеточной мембраны. Один и тот же тип устойчивости может быть реализован несколькими генами, в том числе в одной клетке. Классический пример – наличие нескольких генов β -лактамаз у нозокомиальных изолятов *Klebsiella* sp. Существует более двадцати детерминант обеспечивающих активное выведение тетрациклина из клетки (эффлюкс). При чём, одновременно могут реализовываться несколько механизмов устойчивости к одному антибиотику, например, эффлюкс тетрациклина и защита мишени (рибосомы) (Levy et al. 1999). Резистентность может определяться хромосомными мутациями или приобретёнными генами на мобильных генетических элементах (Martinez-Martinez et al. 1998). Важно понимать, что β -лактамазы существовали задолго до эры антибиотиков (Bush 2013).

1.2 Механизм действия β -лактамных антибиотиков

Пенициллин дал начало эре антимикробной терапии, на сегодняшний день известно более 100 β -лактамных антибиотиков, часть которых утратило клиническое значение из-за формирования резистентности, а часть активно применяется в практике, их классификация основана на химической структуре и спектре активности (Ghannoum and Rice 1999). В целом, β -лактамы до сих пор не утратили своего лидирующего положения, на их долю приходится до 60% всех антибиотиков потребляемых в мире. История взаимоотношений β -лактамов и бактерий – наиболее яркий пример возможностей направленной химической модификации по получению новых β -лактамных структур с заданными свойствами, а также способности бактерий к использованию различных механизмов для быстрого формирования устойчивости к новым соединениям (В.А. Агеевец и др. 2015).

β -лактамные антибиотики обеспечивают бактерицидный эффект ингибируя ферменты обеспечивающие синтез клеточной стенки бактерии. Целостность бактериальной клеточной стенки - необходимое условие для

поддержания формы клетки в гипертонической и враждебной среде. Осмотическая стабильность сохраняется за счёт ригидной клеточной стенки, включающей в себя чередующиеся N-ацетилглюкозамин (NAM) и N-ацетилмурамовую кислоту (NAG). NAM и NAG соединены β -1,4 гликозидными связями, формируемых ферментом трансглюкозидазой. NAM-элементы соединены пентаглициновыми мостиками, формирование которых происходит с помощью фермента транспептидазы, который также называют пенициллин-связывающим белком (ПСБ). Подобное перекрёстное сшивание цепей обеспечивает прочность клеточной стенки (Goffin and Ghuyesen 1998).

V-лактажное кольцо стерически сходно с d-аланин-d-аланином, обеспечивающим сшивку молекул N-ацетилглюкозамина и ПСБ (пенициллин связывающий белок) по ошибке связывается с молекулой антибиотика принимая её за «строительный блок» (Zarun et al. 2008). Данное взаимодействие приводит к ацилированию ПСБ, следствием чего является прекращение ферментного образования связей между молекулами N-ацетилглюкозамина. Синтез клеточной стенки замедляется вплоть до полной остановки, что, в свою очередь, приводит к автолизу пептидогликана. Распад пептидогликана (муреиновой оболочки клетки) приводит к вскрытию и увеличению проницаемости оболочки (Bayles 2000).

1.3 Устойчивость к β -лактамам антибиотикам не связанная с продукцией β -лактамаз

Существует четыре основных механизма обеспечивающих устойчивость бактерий к β -лактамам антибиотикам. Наиболее значимым безусловно является продукция β -лактамаз, но альтернативные механизмы устойчивости также существуют.

Модификация мишени, в случае с устойчивостью к β -лактамам антибиотикам, заключается в модификации ПСБ, что приводит к уменьшению аффинности (родства) между ПСБ и молекулой антибиотика и,

как следствие, к увеличению значений МПК. Примером подобной модификации является ПСБ *Streptococcus pneumoniae* (Laible et al. 1991). В ходе микроэволюции произошла модификация генома с помощью трансформации и конъюгации *Neisseria* spp. и *Streptococcus* spp. приобрели устойчивость к β -лактамам, благодаря ПСБ с низкой аффинностью к антибиотикам (Zapun et al. 2008). Устойчивость к пеницилинам у *Streptococcus sanguis*, *Streptococcus oralis* и *Streptococcus mitis* сформировалась благодаря горизонтальному переносу гена ПСБ2b от *Streptococcus pneumoniae* (Dowson et al. 1990). Устойчивость к метициллину также серьёзная проблема резистентности у *Staphylococcus* spp. Наличие на генной кассете гена *mecA*, который кодирует ПСБ2a', обеспечивает устойчивость к высоким концентрациям β -лактамов (Chambers 1999).

Снижение проницаемости мембраны за счёт уменьшения уровня экспрессии генов кодирующих порины ОМР (outer membrane porins) – ещё один вариант устойчивости. Для того чтобы молекула β -лактамного антибиотика добралась до своей мишени – ПСБ, она должна преодолеть клеточную оболочку, что может достигаться за счёт диффузии или с помощью использования пориновых каналов (поринов). Потеря поринов (ОМР) свойственна некоторым энтеробактериям, например, (*Enterobacter* spp., *Klebsiella pneumoniae* и *Escherichia coli*). Аналогично потеря пориновых каналов происходит у *Pseudomonas aeruginosa* (OprD) и *Acinetobacter baumannii* CarO ОМР (Hopkins and Towner 1990, Mussi, Limansky et al. 2005). Мутации, делеции или другие изменения генов кодирующих порины, могут также приводить к снижению проницаемости мембраны. Тем не менее, даже полная потеря поринов, не всегда приводит к формированию резистентного фенотипа, в большинстве случаев это достигается в комбинации с экспрессией β -лактамаз (Doumith et al. 2009).

Механизм эффлюкса или эффлюксные насосы – также может быть вариантом приобретённой или врождённой устойчивости. Механизм устойчивости заключается в выведении различных веществ из периплазмы во

внешнюю среду. Если скорость выведения выше скорости проникновения субстрата внутрь клетки, достигается устойчивый фенотип (Poole 2004). Эффлюксные насосы являются важным механизмом резистентности у многих грамотрицательных патогенов, в частности, *Acinetobacter* spp. и *Pseudomonas aeruginosa*. У *P.aeruginosa* система MexA-MexB-OprD в комбинации со снижением проницаемости мембраны может приводить к устойчивости ко многим антибиотикам (пенициллины, цефалоспорины, хинолоны, тетрациклин и хлорамфеникол) (Saito et al. 1999, Srikumar et al. 2000).

1.4 Классификация β -лактамаз

В основе современной классификации лежат две схемы. Молекулярная классификация, предложена Ambler, основана на выделении групп энзимов со сходной аминокислотной последовательностью. По молекулярной классификации β -лактамазы разделяются на три класса сериновых β -лактамаз (А- С- и D-) и класс В – металлоферментов, которые имеют в активном центре ионы цинка.

Функциональная классификация была разработана раньше молекулярной и отражает субстратную специфичность различных ферментов и влияние ингибиторов (Bush 1988, Bush 1989), что важно для практикующих врачей. Основные группы β -лактамаз по молекулярной и функциональной классификации в общем совпадают. В 2010 году функциональная классификация β -лактамаз была обновлена и согласно последней версии группа 1 (класс С по молекулярной классификации) – цефалоспориназы, группа 2 (классы А и D) включает β -лактамазы расширенного спектра действия, сериновые карбапенемазы и группа 3 – класс металло- β -лактамаз (Bush and Jacoby 2010).

Группа 1 – цефалоспориназы, относящаяся к молекулярному классу С и кодируемые в подавляющем большинстве на хромосомах многих

представителей *Enterobacteriaceae* (Jacoby 2009). Они наиболее активны по отношению к цефалоспорином чем бензилпенициллинам и устойчивы к ингибированию клавуланатом. У многих организмов экспрессия генов AmpC низкая, но индуцируется под действием b-лактамов (Bush et al. 1985). Встречается наличие генов AmpC, но дефект генов отвечающих за индукцию этих ферментов нарушен, например это характерно для *Escherichia coli*, *Acinetobacter baumannii*. В таких случаях фермент экспрессируется в больших количествах и это приводит к увеличению значений МПК, особенно карбапенемного антибиотика – эртапенема (Bradford et al. 1997). Плазмидно-опосредованные ферменты первой группы (CMY, ACT, DHA, FOX, MIR) известны с конца 1980-х годов, но существенно менее распространены чем плазмидно-опосредованная субгруппы 2be b-лактамаз расширенного спектра действия (ESBLs Extendet-spectrum-beta-lactamase) (Jacoby 2009). К первой группе также относятся варианты AmpC с повышенной активностью по отношению к цефтазидиму и которые возникли в результате генетической модификации и получили название «AmpC широкого спектра» (Nukaga et al. 1995, Rodriguez-Martinez et al. 2009).

Функциональная группа 2 включает в себя сериновые ферменты молекулярных классов А и D, представляющая наиболее обширную группу b-лактамаз, в значительной степени за счёт появления за последние двадцать лет большого числа новых b-лактамаз расширенного спектра действия. Подгруппа 2a – пенициллиназы представлена небольшой группой ферментов с относительно низким спектром гидролитической активности, включающем бензилпенициллин и его производные. Ферменты группы 2a ингибируются клавуланатом и тазобактамом. Большинство ферментов имеют хромосомную локализацию. Подгруппа 2b характеризуется способностью легко гидролизовать пенициллины и первые цефалоспорины, а также эффективно ингибируется клавуланатом и тазобактамом. Группа включает широко распространённые плазмидно-опосредованные ферменты TEM и SHV

впервые описанные в 1970-х годах (Matthew 1979, Roy, Foz et al. 1983). Подгруппа 2be включает в себя β -лактамазы расширенного спектра действия. Ферменты данной группы гидролизуют пенициллины и цефалоспорины подобно ферментам подгруппы 2b, а также дополнительно активны по отношению к цефотаксиму, цефтазидиму и азтреонаму (оксиимино- β -лактамам). Наибольшее число представителей этой группы произошло в результате замен в кодирующих последовательностях ферментов TEM-1, SHV-1 в результате чего произошло расширение спектра активности (TEM-SHV-type ESBLs) (Queenan et al. 2004). В эту группу также включена обширная группа ферментов CTX-M, которые произошли от хромосомно-кодируемых β -лактамаз представителей рода *Kluyvera* (Bonnet 2004). Название «CTX-M» предполагает большую эффективность по отношению цефотаксиму чем к цефтазидиму, хотя есть исключения. В отличие от TEM- и SHV- ESBLs, ферменты CTX-M ингибируются тазобактамом на порядок эффективнее чем клавуланатом (Bonnet et al. 2004, Walther-Rasmussen and Hoiby 2004). Относительно менее распространённые ферменты BEL-1, BES-1, SFO-1, TLA-1, TLA-2 относятся к семействам PER и VEB. Отличительной чертой группы 2be является ингибирование клавуланатом, что применяется для их дифференцировки в лабораторной практике (Bush and Jacoby 2010). Подгруппа 2br представлена β -лактамазами широкого спектра действия устойчивыми к ингибированию клавуланатом. Из 135 описанных вариантов TEM, 36 вариантов относятся к данной группе (например, TEM-30, TEM-31), а также аналогично 72 β -лактамазы SHV-типа. Представители группы CTX-M не представлены в группе 2be (Bush and Jacoby 2010). Подгруппа 2ber включает варианты TEM которые обладают расширенным спектром действия и относительной устойчивостью к ингибиторам, например, TEM-50. Ферменты данного типа обозначают CMT (complex mutant TEM) (Sirot et al. 1997, Robin et al. 2005). Подгруппа 2c – пенициллиназы, характеризующиеся способностью гидролизовать карбенициллин или тикарциллин, как минимум, на 60% быстрее чем бензилпенициллин, при этом клоксациллин или

оксациллин гидролизуются в два раза медленнее чем бензилпенициллин (Bush et al. 1995). Так как карбенициллин – антибиотик применяемый относительно редко, случай описания новых ферментов данной группы также редки (Petroni et al. 2004). Подгруппа 2се включает карбенициллиназу расширенного спектра действия – фермент RTG-4 (CARB-10), активный по отношению к цефепиму и цефпирому (Potron et al. 2009). Подгруппа 2d включает β -лактамазы, объединенные способностью гидролизовать клоксациллин или оксациллин, как минимум, в два раза эффективнее чем бензилпенициллин, что привело к общему названию этих ферментов – ОХА-тип. ОХА-группа достаточно обширна и формируется в первую очередь на основании сходства аминокислотной последовательности ферментов. Группа ОХА-ферментов вторая по величине после семейства TEM (Bush and Jacoby 2010). Подгруппа 2de – ферменты наиболее активные по отношению к клоксациллину или оксациллину с расширенным спектром действия, но не включают карбапенемазы. Типичными представителями являются ОХА-11 и ОХА-15, которые выявлены у *Pseudomonas aeruginosa* в Турции и Франции (Bradford et al. 2001). Устойчивость к цефтазидиму обычно более выраженная, чем к азтреонаму или цефотаксиму. В случае, если изолят имеет несколько оксациллиназ, может сохраняться чувствительность к цефтазидиму при устойчивости к цефепиму (Aubert et al. 2001). Подгруппа 2bf представляет в данном случае повышенный интерес, так как включает карбапенемазы. Наибольшее распространение они получили у *Acinetobacter baumannii* и зачастую имеют хромосомную локализацию (Walther-Rasmussen and Hoiby 2006). Плазмидно-локализованные ОХА-23 и ОХА-48 встречаются у представителей *Enterobacteriaceae*. Эти ферменты обладают наибольшей активностью из карбапенемных антибиотиков прежде всего имипенему, меньшей к меропенему (Poirel et al. 2004). Характеристика группы 2е включает способность гидролизовать цефалоспорины расширенного спектра действия и ингибирование клавуланатом или тазобактамом. Хромосомные цефалоспориназы представителей рода *Proteus* чаще всего относятся к этой

группе. Возможны проблемы дифференцировки так как ферменты данной группы формируют фенотип схожий с ферментами других групп (например, AmpC) и встречаются у бактерий одного семейства (Bush and Jacoby 2010). Подгруппа 2e дифференцируется от группы 1 слабой активностью к азтреонаму. Число ферментов данной группы не меняется с 1995 года, но не исключено расширение данной группы в дальнейшем. Вероятно, часть ферментов этой группы характеризуются как ESBL (Bush et al. 1989).

Сериновые карбапенемазы класса А формируют подгруппу 2f. Карбапенемные антибиотики выступают в данном случае диагностическим субстратом. Ферменты данной группы лучше ингибируются тазобактамом чем клавуланатом. Наибольшую угрозу представляют плазмидно-локализованные ферменты группы 2f, включающие KPC-тип. Вспышки CRE в США и Израиле, а также других странах, в основном, связаны с появлением ферментов KPC-типа, на сегодняшний день, ферменты KPC-типа распространены по всему миру (Bradford et al. 2004, Naas et al. 2005).

Группа 3 включает металло-*b*-лактамазы (MBL), которые выделяются как по структурной, так и по фенотипической характеристике. Основное структурное отличие от других групп отражено в самом названии группы – в активном центре содержится ион цинка. Основное свойство ферментов данной группы – способность гидролизовать карбапенемы, но, в качестве диагностического признака, такая субстратная специфичность малопригодна так как аналогичным свойством обладают некоторые сериновые *b*-лактамазы. В отличие от последних, MBL обладают слабой активностью по отношению к монобактамам и не ингибируются клавуланатом или тазобактамом, зато ингибируются ЭДТУ и дипиколиновой кислотой, которые являются хелатирующими ион цинка веществами (Laraki et al. 1999, Marchiaro et al. 2008). Металлоферменты делятся на субтипы по структуре на B1, B2 и B3. По функциональной классификации они делятся 3a, 3b и 3c (Rasmussen and Bush 1997). Изначально, металло-*b*-лактамазы были обнаружены как

хромосомно-кодируемые ферменты грамположительных бактерий или, в редких случаях, грамотрицательных бацилл (*Bacteroides fragilis*, *Stenotrophomonas maltophilia*) (Yotsuji et al. 1983, Livermore and Woodford 2000, Mercuri et al. 2002). С момента когда ферменты данной группы стали выявляться на мобильных генетических элементах, они стали объектом интенсивного отбора и быстрой эволюции, что привело к формированию нескольких десятков вариантов, включающих NDM, VIM, IMP и др.

При более разностороннем изучении биохимической структуры большого числа металло- β -лактамаз, на сегодняшний день выделяется две функциональные группы. Самая большая группа 3а, которая включает плазмидно-локализованные ферменты как VIM, IMP, которые получили глобальное распространение и наиболее часто встречаются у неферментирующих бактерий, хотя у *Enterobacteriaceae* они также присутствуют (Queenan and Bush 2007). Эти ферменты относятся к молекулярному подклассу B1, который выделяется на основании близкой аминокислотной последовательности ферментов данной группы. В активном центре данных ферментов находится два атома цинка и они имеют широкий спектр гидролитической активности (Garau et al. 2004). Также в группу 3а включены металло- β -лактамазы из *S. maltophilia* (L1 MBL) и ферменты подкласса B3 CAU-1, GOB-1, и FEZ-1. Хотя эти ферменты по аминокислотной последовательности стоят несколько в стороне, они удовлетворяют требованиям класса за счёт наличия двух атомов цинка и широкого спектра активности, т.е. характерного для всего класса субстратного профиля (Bellais et al. 2000, Galleni et al. 2001).

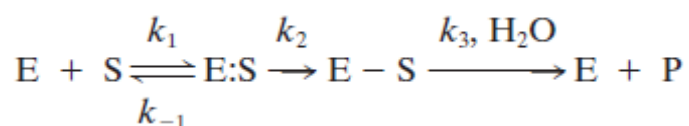
Подгруппа 3b включает в себя небольшое число ферментов, которые активнее гидролизуют карбапенемы по сравнению с пенициллинами и цефалоспорины (Segatore et al. 1993). Представителями этой подгруппы являются хромосомные ферменты представителей рода *Aeromonas*, зачастую

эти ферменты не детектируются в лабораторной практике так как они не взаимодействуют с нитроцефином (Yang and Bush 1996).

1.5. Происхождение β -лактамаз

На сегодняшний день, большинство учёных сходятся во мнении, что ПСБ и β -лактамазы имеют общего предшественника. Об этом свидетельствует гомология ПСБ и сериновых β -лактамаз по аминокислотной последовательности, а также по четвертичной структуре фермента. Селективным давлением, способствовавшим появлению и распространению древних β -лактамаз, стали антибиотики выделяющиеся во внешнюю среду почвенными бактериями. Предполагаемое филогенетическое древо ПСБ и β -лактамаз представлено на Рисунке 1 (Massova and Mobashery 1998).

ПСБ и β -лактамазы обладают схожей аминокислотной последовательностью, взаимодействие и тех и других ферментов с мишенью происходит аналогично, но в отличие от ПСБ, β -лактамаза образует с молекулой антибиотика нестабильный комплекс.



В этой схеме E – β-лактамаза, S – β-лактамный субстрат, E:S – комплекс Михаэлиса (Michaelis complex), E – S – комплекс ацил-фермент, P – продукт лишённый антибактериальной активности. Константы скорости для каждого шага представлены k_1 , k_{-1} , k_2 , и k_3 , k_1 , и k_{-1} , являющиеся константами ассоциации – диссоциации комплекса. k_2 – константа скорости ацилирования, k_3 – константа деацилирования (Drawz and Vonomo 2010). На рисунке 3 представлена типовая схема реакции. После образования комплекса Генри-Михаэлиса (Henri-Michaelis complex), активный сериновый сайт проводит нуклеофильную атаку на карбонильную группу β-лактамного антибиотика что приводит к образованию высокоэнергетического тетраэдрического ацилированного продукта. Далее следуют промежуточные переходы на менее энергетически затратную форму ацил-фермент с последующим протонированием атома азота в молекуле β-лактама и разрыва амидной связи (C-N). Следующий этап – активированная молекула воды взаимодействует с ковалентным комплексом что приводит к образованию высокоэнергетического тетраэдрического деацилированного промежуточного продукта. Гидролиз связи между карбоксильной группой и кислородом нуклеофильной молекулы серина восстанавливает активность фермента и освобождает инактивированную молекулу β-лактама (Drawz and Vonomo 2010).

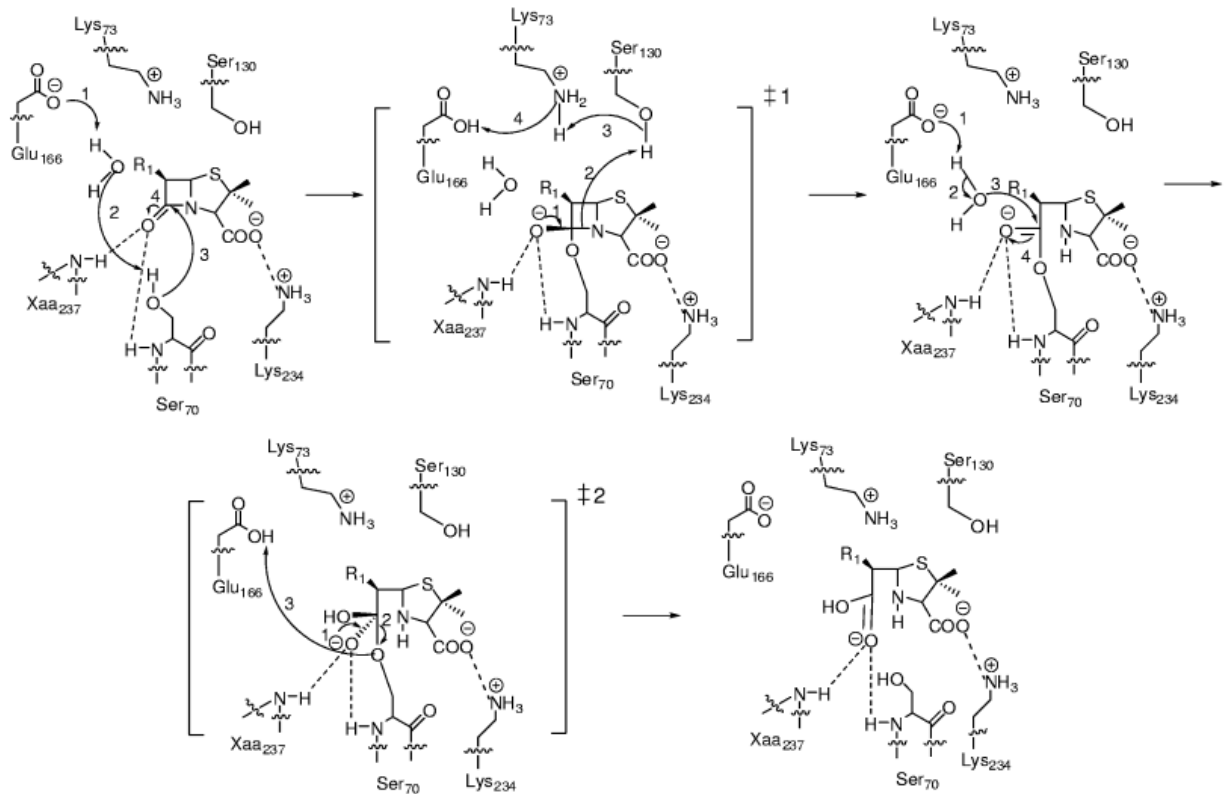


Рисунок 2. Предполагаемый механизм реакции β -лактамного субстрата и сериновой β -лактамазы глицин (Glu166) которой участвует в активации молекулы воды для ацилирования и деацилирования (Meroueh, Fisher et al. 2005). Пунктиром обозначены водородные связи. После активации гидроксильной группы серин (Ser70) проводит нуклеофильную атаку на карбонильную группу β -лактамного антибиотика с образованием нестабильного промежуточного ацилированного продукта. Протонирование атома азота в составе β -лактамного антибиотика приводит к разрыву связи C-N с образованием ковалентного комплекса ацил-фермент, который стабильнее предыдущего комплекса. Атака активной молекулы воды приводит к образованию деацилированного продукта, с последующим гидролизом связи между β -лактамной карбоксильной группы и атомом кислорода Ser70. Деацилирование восстанавливает активность фермента.

1.7 Основные общественно-значимые карбапенемазы

Карбапенемазы представляют наиболее разнообразную группу β -лактамаз, превосходящую по спектру активности все другие ферменты гидролизующие β -лактамы. Название «карбапенемазы» не отражает способности большинства ферментов данной группы гидролизовать почти все β -лактамы при сохранении устойчивости, в большом количестве случаев,

к коммерчески доступным ингибиторам β -лактамаз (Queenan and Bush 2007). Карбапенемазы представлены в классах А, В и D, соответственно А и D относятся к сериновым ферментам, а класс В включает ферменты с атомами цинка в активном центре. Класс А включает в себя ферменты SME, IMI, NMC, GES и KPC групп. Класс D включает карбапенемазы OXA-группы, а к металло- β -лактамазам относятся ферменты NDM, IMP, VIM, SPM, GIM, и SIM.

Первые описанные карбапенемазы были видоспецифичными и обладали хромосомной локализацией. Однако, через некоторое время, был описан фермент IMP-1 у *Pseudomonas aeruginosa* (Watanabe et al. 1991), а также OXA-23 у *Acinetobacter baumannii* (Paton et al. 1993) и KPC-1 у *Klebsiella pneumoniae* (Yigit et al. 2001). Проблема клонального распространения устойчивых штаммов сменилась проблемой распространения мобильных генетических элементов, несущих детерминанты устойчивости как внутри вида, так и между различными видами.

На сегодняшний день, наиболее актуальными карбапенемазами для мирового здравоохранения, являются KPC, NDM, OXA, VIM и IMP. Им будут посвящены отдельные подглавы в порядке хронологии описания данных ферментов.

1.7.1 Карбапенемазы IMP-группы

Первое обнаружение металло- β -лактамазы, локализованной на мобильном генетическом элементе, произошло в 1988 году в Японии. Носителем гена *bla*_{IMP-1} была *Pseudomonas aeruginosa* (Watanabe et al. 1991). Обнаруженный изолят демонстрировал устойчивость на уровне 50 мг/л к имипенему и >400 мг/л к цефтазидиму. Было показано, что данный ген локализован на конъюгативной плазмиде. Через три года данный ген снова был выявлен, но уже у *Serratia marcescens*. Ген *bla*_{IMP-1} был локализован на

интегрене третьего класса граничащим с $aac(6')Ib$ -подобным геном в составе крупной плазмиды около 120 т.п.о. (Arakawa et al. 1995). В период с 1992 по 1994 год в Японии было проведено крупное исследование по выявлению IMP-положительных изолятов, в результате которого было выявлено 15 IMP-положительных *P. aeruginosa* (Senda et al. 1996). Выявленные изоляты демонстрировали фенотип устойчивости к имипенему в диапазоне от 2 мг/л до 128 мг/л, что свидетельствует о дополнительных факторах, влияющих на фенотип, кроме самого приобретения гена устойчивости. В дальнейшем были выявлены *S. marcescens*, *Achromobacter xylosoxidans*, *Pseudomonas putida*, и *Klebsiella pneumoniae*, продуцирующие данный ген. В дальнейшем, ген bla_{IMP-1} был выявлен у представителей 16 видов грамотрицательных бактерий в составе интегрона третьего класса (Shibata et al. 2003). Также были выявлены несколько редких вариантов этого гена $bla_{IMP-3-6-10}$. В течение нескольких лет, считалось что металло- β -лактамазы на подвижных мобильных элементах - только японская проблема, пока не были выявлены случаи выявления ферментов IMP-2 и IMP-5 в 1997-98 годах в Португалии и Италии (Cornaglia et al. 1999, Daiyasu et al. 2001). Распространение данных ферментов привело к увеличению доли резистентных к карбапенемным антибиотикам грамотрицательных изолятов в отдельных странах до трёх раз (например, с 6% в 1998 году до 19% в 2001 году в Корее) (Lee et al. 2003). На сегодняшний день группа генов bla_{IMP} -типа широко распространена, тем не менее, она остаётся единственной из наиболее значимых, которая пока не обнаружена на территории России.

1.7.2. Карбапенемазы VIM-группы

Впервые карбапенемаза группы VIM была описана в Вероне (Италия) у *P. aeruginosa* в 1997 году (Lauretti et al. 1999). Ферменты данной группы являются типичными представителями металло- β -лактамаз, т.е. обладают активностью к широкому спектру β -лактамных антибиотиков, но не гидролизуют азтреонам, а также ингибируются ЭДТУ. Впоследствии этот ген

был выявлен у *Achromobacter xylosoxidans* в том же госпитале что и первая *P. aeruginosa*. Анализ генетической локализации показал, что ген находится на неконъюгативной плазмиде, содержащей интегрон первого класса, включающего четыре генных кассеты и три различных гена устойчивости к аминогликозидам (*aacA4*, *aphA15* и *aadA1*). Через 3-4 года ген *bla_{VIM-1}* был обнаружен в Греции, Франции у *E. coli* и *K. pneumoniae* (Giakkouri et al. 2003). В 1996 году во Франции был описан фермент VIM-2 у *P. aeruginosa*, гомологичный VIM-1 на 90% (Poirel et al. 2000). Распространение *P. aeruginosa* с геном *bla_{VIM-2}* на территории Греции и Испании стало причиной нескольких внутрибольничных вспышек (Pournaras et al. 2003). Обнаружение в США гена *bla_{VIM-2}* связано с небольшой вспышкой вызванной *P. aeruginosa*, демонстрирующей чувствительность только к азтреонаму. Гены *bla_{VIM-2}* были также обнаружены у *Citrobacter freundii* в Тайвани, у *S. marcescens* и *Enterobacter cloacae* в Южной Корее (Yan, Ko et al. 2002, Yum et al. 2002).

Ген *bla_{VIM-4}*, обнаруженный у *E. cloacae* в Санкт-Петербурге (Ageevets et al. 2014), впервые был обнаружен в 2001 году в Греции также у *P. aeruginosa* (Pournaras et al. 2002). Отличие гена *bla_{VIM-4}* от *bla_{VIM-1}* заключается в одной аминокислотной замене (Ser175Arg). В 2002 году были обнаружены *K. pneumoniae* и *E. cloacae* несущие этот же ген. Значения МПК у этих изолятов, выделенных у одного пациента, существенно отличались, так у клебсиеллы МПК к имипенему 2 мг/л, а к меропенему 0.5 мг/л, а у энтеробактера 0.25 и 0.12 мг/л соответственно. Таким образом, значения МПК могут сильно варьировать у представителей одного семейства (Luzzaro et al. 2004). На сегодняшний день, число вариантов гена *bla_{VIM}* насчитывает более десяти генов. Основным резервуаром и наиболее частым носителем этого гена является *P. aeruginosa*. Исследования изолятов *P. aeruginosa*, выделенных на территории России, Казахстана и Белоруссии, показывают увеличение доли карбапенем-устойчивых штаммов, продуцирующих

ферменты группы металло- β -лактамаз от 4.5% в 2002 – 2004 году до 28.7% в 2010 году. Основным доминирующим сиквенс-типом является ST235, несущий ген *bla_{VIM-2}* (Edelstein et al. 2013).

1.7.3 Карбапенемазы КРС-группы

Фермент КРС-1 впервые был описан в 2001 году (Yigit et al. 2001) в Северной Каролине (США). До сегодняшнего дня, продукция ферментов КРС-типа остаётся основным механизмом устойчивости энтеробактерий к карбапенемным антибиотикам на территории США (Lee et al. 2009). Первые крупные вспышки были обнаружены в Нью-Йорке в 2005 году, в течение четырёх лет выявлялись отдельные случаи продукции фермента КРС (Bratu et al. 2005). Изоляты, ставшие причиной крупных внутрибольничных вспышек, демонстрировали устойчивость ко всем β -лактамам. Более того, из 95 изолятов, собранных в госпиталях Бруклина в 2003-2004 годах, примерно половина демонстрировала чувствительность к аминогликозидам и некоторые сохранили чувствительность к фторхинолонам (Bratu et al. 2005). Один из примеров роста числа продуцентов КРС-типа выглядит следующим образом (данные одного из ЛПУ Бруклина) 2002 год – 9%, 2004 – 18%, 2008 – 38% (Arnold et al. 2011). В 2005 году произошло первое обнаружение фермента КРС-типа за пределами США – во Франции, но с эпидемиологической ссылкой на США, а первая вспышка произошла в Израиле (Leavitt et al. 2007). На сегодняшний день, КРС-ферменты эндемичны для Израиля и Греции. Ферменты группы КРС широко распространены по всему миру, в том числе и в Санкт-Петербурге (Ageevets et al. 2014). Анализ музея CDC (<http://www.cdc.gov/>), в который собирались изоляты в период 1996 – 2008 год показал, что около 70% изолятов относятся к сиквенс-типу 258 (ST258) (Kitchel et al. 2009). Большинство изолятов ST258 продуцируют ферменты КРС-3, а другие сиквенс-типы чаще имеют альтернативные варианты гена. Всего в базе данных (<http://www.lahey.org/studies/>) представлены варианты *bla_{KPC-2}* – *bla_{KPC-22}*.

Вариант *bla*_{KPC-1} оказался гомологичным *bla*_{KPC-2}. В большинстве стран Европы уровень продуцентов KPC остаётся низким, периодически появляются сообщения о единичных случаях, которые чаще всего связаны с путешествиями пациентов в области, где менее благополучная эпидемиологическая обстановка (Samuelson et al. 2009). Тем не менее, несколько внутрибольничных вспышек было зафиксировано во Франции, также неблагополучная ситуация в некоторых регионах Польши и Италии (Giani et al. 2009). Так как гены KPC-типа выявляются на мобильных генетических элементах, то вполне логично что в областях, где клебсиеллы продуцирующие варианты KPC получили широкое распространение, другие виды энтеробактерий также получили данный фермент, так на втором месте по частоте наличия гена *bla*_{KPC} оказалась *E. coli* (Goren et al. 2010).

Гены *bla*_{KPC}-типа выявлены на 2014 год у 115 сиквенс-типов, т.е. у примерно 7,5% всех известных сиквенс-типов. Для анализа эпидемиологии введено понятие клональной группы, которая объединяет близкие сиквенс-типы, выявленные на основе процедуры мультилокусного сиквенс-типирования (www.pasteur.fr). На первом месте стоит клональная группы (CG) CG258, включающая ST258 и ST11 (профиль 3-3-1-1-1-1-79 и профиль 3-3-1-1-1-1-4 соответственно). На втором месте ST340 (3-3-1-1-1-1-18), ST437 (3-3-1-1-1-1-31), и ST512 (54-3-1-1-1-1-79) (Chen et al. 2014). Сиквенс-тип 258 (ST258) превалирует в основном в Северной Америке, Латинской Америке, а также некоторых странах Европы, в то время как ST11 характерен для стран Азии (Andrade et al. 2011, Qi, Wei et al. 2011). *K. pneumoniae* ST512 продуцирующие ген *bla*_{KPC} распространены в Колумбии, Израиле, Италии, а продуценты ST340 в Бразилии и Греции (Munoz-Price et al. 2013). Изоляты продуцирующие ген *bla*_{KPC}, но относящиеся в другим клональным группам часто характерны только для одного географического региона, например ST442 был описан только в Бразилии, а ST273 только в Санкт-Петербурге (Ageevets et al. 2014, Ramos et al. 2014). Несмотря на большое число сиквенс-

типов, у представителей которых были описаны гены КРС-типа, основной клональной группой, с которой связано эффективное распространение данных генов, остаётся CG258, включающая следующие сиквенс-типы: ST258, 379, 418, 512, 554, 650, 744, 745, 868, 1084, 1199, 1406, 1458, 1461, 1481, и 1519. Изоляты данной клональной группы объединяет уникальный вариант аллели *tonB* – *tonB79*, которая была изначально найдена у ST258 и его SLV (single locus variant) и (DLV double locus variant). На основе клональной группы CG258 и уникального варианта аллели *tonB* выделяется группа «CG258–*tonB79* кластер». Для выявления изолятов относящихся к данному кластеру можно использовать метод ПЦР в реальном времени для детекции двух полиморфизмов, характерных для аллели *tonB* или классический вариант – секвенирование (Chen et al. 2012).

Наиболее распространённый мобильный элемент несущей ген *bla*_{КРС} – Tn3-подобный транспозон Tn4401 (Naas et al. 2008). Tn4401 транспозон имеет 10 тыс. п.о., фланкирован инвертированными повторами по 39 п.о. и включает помимо гена *bla*_{КРС} ген Tn3 транспозазы (TnpA), Tnp3 резолвазы (tnpR) и два IS элемента ISKpn6 и ISKpn7 (Naas et al. 2008). Tn4401 обычно фланкирован 5 п.о. TSD (target site duplication). Согласно основной гипотезе, транспозон произошел от Tn3 элемента, от которого сохранил гены TnpA и TnpR и независимой вставки элементов ISKpn6 и ISKpn7. На сегодняшний день, пять вариантов данного элемента описано, отличия между которыми заключается в делециях разного размера (Naas et al. 2012). Также ген *bla*_{КРС} встречается в составных мобильных элементах, состоящих из частей Tn4401 и Tn1331, которые обнаружены на плазмидах различных групп несовместимости IncN, IncI2, и IncFIA (Chen et al. 2013). Для некоторых изоформ Tn4401 характерны конкретные варианты плазмид. Например, для Tn4401a характерна плазида IncFIIK2, а для Tn4401b плазида IncI2 (pVK15692) (Chen et al. 2013). Также ген *bla*_{КРС} был найден в «не Tn4401» элементе, в оригинале «non-Tn4401 mobile elements», которые были

выявлены у изолятов в Китае и Аргентине (Gomez et al. 2011). На 1 апреля 2014 года в базе данных «ГенБанк» представлены 40 полногеномных сиквенсов плазмид несущих ген *bla*_{KPC} и в большинстве случаев данные плазмиды несут несколько детерминант устойчивости, например, к аминогликозидам, фторхинолонам, триметоприму, сульфонидамидам и тетрациклину. Плазмиды IncFII – типа классический пример плазмиды с которой связано распространение гена *bla*_{KPC}, кстати, именно на плазмиде этого типа локализован ген *bla*_{KPC-2}, выделенный в Санкт-Петербурге у *K. pneumoniae* ST273. Ранее плазмиды данного типа связывали с распространением гена *bla*_{CTX-M-15} в *E. coli* ST131 (Deschamps et al. 2009).

1.7.4 Карбапенемазы ОХА-48-группы

Впервые, фермент ОХА-48 был описан в 2004 году у выделенной в 2001 году *K. pneumoniae*. Была показана его плазмидная локализация и отдалённое родство с другими ферментами ОХА-группы (Poirel et al. 2004). Карбапенемазы ОХА-48-типа относятся к молекулярному классу D и не ингибируются клавуланатом, сульбактамом или тазобактамом.

Подобно ферментам IMP-группы в Японии, долгое время выявление продуцентов карбапенемаз группы ОХА-48 связывали в той или иной форме с Турцией, в случае выявления продуцентов вне Турции, обнаруживалась эпидемиологическая ссылка на Турцию. Наиболее часто ген *bla*_{ОХА-48} выявляется у *K. pneumoniae*, хотя также встречаются продуценты других видов. Наибольшее распространение они получили на «Среднем Востоке» - территории Западной Азии, расположенной между Европой и Пакистаном. В странах Европы выявляются единичные случаи продукции карбапенемаз ОХА-48-типа (Poirel et al. 2012). Долгое время выявлялся один вариант *bla*_{ОХА-48}, но потом была обнаружена серия вариантов. Первым был выявлен вариант *bla*_{ОХА-162}, отличающийся одной аминокислотной заменой (GenBank ACZ73269). По спектру активности данный вариант гена не отличается от *bla*_{ОХА-48}. В 2012 году *bla*_{ОХА-162} был обнаружен в Германии у разных видов

бактерий (*E. coli*, *C. freundii* и *Raoultella ornithinolitica*) (Pfeifer et al. 2012). Затем был обнаружен вариант *bla*_{OXA-163} у аргентинских изолятов. Вариант *bla*_{OXA-181} получил широкое распространение. Достаточно часто продуценты *bla*_{OXA-181} также несут другие карбапенемазы, например, *bla*_{NDM-1} или *bla*_{VIM-5}, что может свидетельствовать о связи с индийским субконтинентом (Poirel et al. 2011, Potron et al. 2011). Описание варианта *bla*_{OXA-204} связано с Алжиром и Тунисом. От варианта *bla*_{OXA-48} его отличают две аминокислотные замены, он имеет схожую активность по отношению к антибиотикам и ингибиторам (Poirel et al. 2012). Вариант *bla*_{OXA-232} выявлен у изолятов, выделенных от пациентов приехавших с о. Маврикий (остров в юго-западной части Индийского океана). Этот вариант ближе к *bla*_{OXA-181} (отличаются одной аминокислотной заменой) (Poirel et al. 2012).

Любопытно, что в отличие от большинства карбапенемаз, для карбапенемаз группы OXA известен предшественник – *bla*_{OXA-51} ген *Shewanella xiamenensis* (Poirel et al. 2010). Ген *bla*_{OXA-51} обладает гомологией 92% с геном *bla*_{OXA-48} (Poirel et al. 2004).

Изначально, ген *bla*_{OXA-48} был обнаружен в составе составного транспозона Tn1999 (Aubert et al. 2006), также были описаны несколько вариаций данного транспозона. При изучении генетического окружения гена *bla*_{OXA-181}, было выявлено полное отсутствие элементов Tn1999 (Potron et al. 2011). В *K. pneumoniae* из Омана, ген *bla*_{OXA-181} был выявлен на транспозоне названном Tn2013 (Potron et al. 2011).

1.7.5. Карбапенемазы NDM-группы

Стоит отметить, что появление и распространение новых карбапенемаз напоминает экспоненту. Первые описанные карбапенемазы достаточно долго сохраняли чёткую географическую локализацию, в то время как описанные позже ферменты, распространялись существенно быстрее. С точки зрения «успешности» гена, основываясь на скорость его распространения, можно сделать предположение, что гены и мобильные элементы с ними связанные,

описанные позже эволюционно совершеннее, чем их функциональные предшественники. Если эта тенденция действительно существует, то отсюда вытекает два следствия: 1. на сегодняшний день карбапенемазы NDM-типа наиболее совершенные 2. можно ожидать появления ещё более успешных мобильных элементов с новыми карбапенемазами, которые смогут распространиться быстрее предшественников.

Карбапенемаза NDM-1 (New Delhi metallo- β -lactamase) была впервые описана в Швеции у пациента совершившего путешествие в Индию. Публикация вышла в 2009 году, а сам изолят был выделен 9 января 2008 года, что можно считать датой появления на свет актуальной научной области граничащей с эпидемиологией (Yong et al. 2009).

Фермент NDM-1 относится к молекулярному классу В, имеет минимальную гомологию аминокислотной последовательности с другими ферментами данной группы. Наибольшая гомология наблюдается с ферментами VIM-1/2 -типа и составляет всего 32.4% идентичности. По субстратной активности фермент NDM превышает VIM-2 при гидролизе большинства цефалоспоринов, в частности цефуроксим (K_m NDM-1=8 μ M, K_m VIM-2= 22 μ M), цефотаксим (K_m NDM-1=10 μ M, K_m VIM-2=32 μ M), цефалотин (K_m NDM-1=10 μ M, K_m VIM-2=44 μ M), и к пенициллину (K_m NDM-1=16 μ M, K_m VIM-2=49 μ M). Подобно другим металло- β -лактамазам, NDM-1 эффективно гидролизует множество β -лактамов, включая пенициллины, цефалоспорины и карбапенемы, исключением являются монобактамы (например, азтреонам). Аналогично другим металло- β -лактамазам, активный центр NDM-1 содержит два сайта связывания ионов металла. Анализ трёхмерной структуры молекулы фермента выявил присутствие двух ионов цинка (Zn^{2+}) на расстоянии 4.20 Å (Wang and Chou 2013). Эффективность металло- β -лактамаз зависит от взаимодействия ионов цинка в активном центре молекулы фермента с молекулой β -лактамного антибиотика. Из этого вытекает что их активность ингибируется хелатными комплексами двухвалентных катионов, например ЭДТУ (Этилендиаминтетрауксусная

кислота или EDTA). При моделировании развития сепсиса на мышах, использование ЭДТУ в качестве ингибитора и *E. coli* продуцирующей NDM-1 показало свою эффективность и возможность применения в клинике (Yoshizumi et al. 2013). Фактически, во всех случаях выявления гена bla_{NDM-1} у клинических изолятов (*Enterobacteriaceae*, *Acinetobacter* sp., и *Pseudomona* sp.) также обнаруживаются другие детерминанты устойчивости. Описаны следующие варианты: AmpC цефалоспорины, различные β -лактамазы расширенного спектра действия, другие карбапенемазы (OXA-48-, VIM-, и KPC-типов), 16S метилазы (устойчивость к аминогликозидам), Qnr – гены (к хинолонам), эстеразы (гены устойчивости к макролидам), к рифампицину (рифампицин-модифицирующие ферменты), к хлорамфениколу и сульфометаксозолу (Dortet et al. 2014). В результате накопления большого числа детерминант устойчивости для терапии инфекций? вызванных продуцентами ферментов NDM-типа? чаще всего для их лечения применяются фосфомицин и тигециклин. Одной из перспективных стратегий лечения является комбинация ингибиторов ESBL с азтреонамом.

Эпидемиология продуцентов NDM-1 является предметом пристального внимания учёных всего мира. Причиной этому является быстрое распространение продуцентов, преимущественно представителей *Enterobacteriaceae* и *Acinetobacter* spp., тяжёлые последствия инфекций вызванных этими возбудителями, а также из-за высокой скорости распространения данных генов по всей планете. Достаточно быстро связь между появляющимися сообщениями об обнаружении генов bla_{NDM} с индийским субконтинентом была установлена. Анализ распространения генов bla_{NDM} в Индии и Пакистане показал, что их частота колеблется от 5% до 18,5% (Dortet et al. 2014). Более того, ген bla_{NDM-1} был выявлен в Индии не только у пациентов, но и в образцах из окружающей среды, а также питьевой воды (Walsh et al. 2011).

У представителей *Enterobacteriaceae* ген bla_{NDM-1} , в большинстве случаев, находится на конъюгативных плазмидах различных групп. Однако,

анализ коллекции продуцентов bla_{NDM} показал, что распространение данного гена не связано с распространением специфических успешных штаммов или плазмид также как и одиночных генетических элементов (Poirel et al. 2011).

У представителей рода *Acinetobacter* гены bla_{NDM-1} обнаружена как на мобильных генетических элементах, так и с хромосомной локализацией. В редких случаях обнаружения гена bla_{NDM-1} у *Pseudomonas aeruginosa* также наблюдалась хромосомная локализация (Jovsic et al. 2011). Самое ближайшее окружение гена bla_{NDM-1} включает в себя последовательность элемента *ISAbal25*, в некоторых случаях его фрагмент, а также ген ble_{MBL} (Рис. 3.).

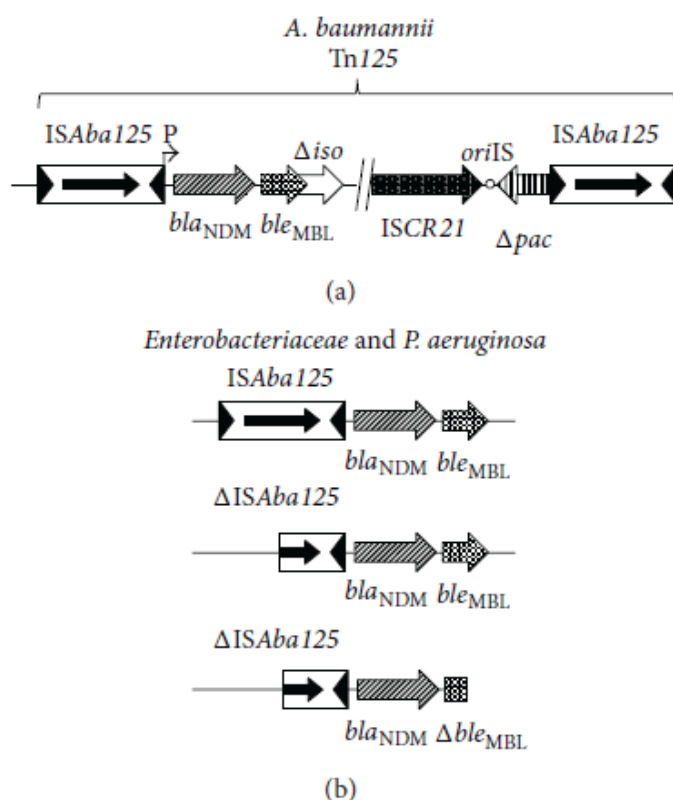


Рис. 3. Схема bla_{NDM-1} – ассоциированного генетического окружения описанного у грамтрицательных клинических изолятов. (a) структура, обнаруженная у *A. baumannii* в составе сложного транспозона Tn125. (b) Структуры обнаруженные у представителей *Enterobacteriaceae* и *P. aeruginosa*, в которых *ISAbal25* присутствует полностью или частично вместе с геном ble_{MBL} (кодирует устойчивость к блеомицину). Гены и их пространственная ориентация отмечены стрелками. *oriIS* элемента *ISCR21* отмечена пунсоном. Промотор гена bla_{NDM-1} отмечен «P» (Dortet et al. 2014).

Последовательный анализ составных транспозонов с геном *bla*_{NDM-1} у энтеробактерий, указывает на то, что представители рода *Acinetobacter* были естественным резервуаром этих генов до их переноса в бактерии семейства *Enterobacteriaceae*. Согласно гипотезе, виды рода *Acinetobacter* своего рода площадка для сборки мобильных элементов с несколькими детерминантами устойчивости, которые уже в готовом виде они передают другим видам (Dortet et al. 2014).

Всего на сегодняшний день описаны восемь вариантов генов *bla*_{NDM} (*bla*_{NDM-1} – *bla*_{NDM-8}). Первый вариант – *bla*_{NDM-2} отличается от *bla*_{NDM-1} заменой «С» на «G», что привело к аминокислотной замене, тем не менее, существенных отличий по фенотипу не было обнаружено. Вариант *bla*_{NDM-2} пока обнаружен только у *Acinetobacter* sp. и *Pseudomonas* sp. *bla*_{NDM-3}-вариант обнаружен у *E.coli* и также отличается одиночной заменой, приводящей к замене 95-й аминокислоты (Asp → Asn), что также не влияет на гидролитическую активность фермента (Rogers, Sidjabat et al. 2013). *bla*_{NDM-4} отличается от *bla*_{NDM-1} также одной аминокислотной заменой (Met → Leu) в позиции 154. Данный вариант в отличие от предшествующих отличается увеличением гидролитической активности по отношению к следующим антибиотикам: цефазолин, цефтазидим, цефотаксим, имипенем и меропенем, а вот цефепим, наоборот, гидролизует менее активно (Nordmann et al. 2012). *bla*_{NDM-5} имеет аминокислотную замену в позиции 154 (Met → Leu) аналогичную *bla*_{NDM-4}, а также вторую аминокислотную замену в позиции 88 (Val → Leu). *bla*_{NDM-6} отличается от *bla*_{NDM-1} заменой в 233 (Ala → Val), что не приводит к изменению гидролитической активности (Williamson et al. 2012). Вариант *bla*_{NDM-7} одновременно и независимо был описан у *E.coli* у пациента из Франции и Йемена, но оба пациента с историей путешествий и госпитализаций в учреждениях других стран. *bla*_{NDM-7} отличается двумя нуклеотидными заменами 388 (G → A) и 460 (A → C), приводящими к соответствующим аминокислотным заменам 130 (Asp → Asn) и 154 (Met → Leu), последняя приводит к увеличению активности фермента (Cuzon et al.

2013). Последний описанный вариант *bla*_{NDM-8} имеет две аминокислотные замены по сравнению с *bla*_{NDM-1} в позициях 130 (Asp → Gly) и 154 (Met → Leu), но не отличается увеличенным уровнем гидролитической активности (Dortet et al. 2014).

1.8 Выявление инфекций, вызванных продуцентами карбапенемаз и бессимптомного носительства.

С момента, когда распространение продуцентов карбапенемаз обрело статус серьёзной угрозы, появилась необходимость выявления носителей бактерий, обладающих этими генами, в некоторых странах, были введены методические указания для скрининга таких пациентов. В «группу риска» обычно включают следующих пациентов: тех, у кого был случай выявления носительства продуцентов карбапенемаз ранее, пациентов с историей госпитализации в учреждениях других стран, пациентов из отделений трансплантации, а также с подавленной иммунной системой. Так как кишечная микробиота основной резервуар энтеробактерий, ректальные мазки и фекалии являются оптимальным клиническим материалом для проведения скрининга. Подобные образцы обычно сеются на селективные среды с одним из карбапенемных антибиотиков (например, имипенем 0.5–1 µg/mL или эртапенем 0.5 µg/mL) (Landman et al. 2005). Во время внутрибольничных вспышек, промежуточный этап посева на среду с карбапенемным антибиотиком способен увеличить чувствительность скрининга и сократить число ложноотрицательных результатов за счёт увеличения в посевах доли целевого штамма. С другой стороны, это приводит к задержке выдачи ответа из-за необходимости подтверждения наличия карбапенемаз. Данный подход был апробирован при скрининге продуцентов *bla*_{KPC}, но должен работать и с продуцентами ферментов NDM-типа. Надо отметить, что скрининговое исследование проводимое в 2014-2015 годах на базе ФГБУ НИИ Детских Инфекций ФМБА России строится по аналогичному принципу, но дублируется молекулярными методами.

Одним из методов выявления карбапенемазной активности является спектрофотометрический метод. Суть метода заключается в том, что степень поглощения раствора имипенема при длине волны в УФ области уменьшается при воздействии экстрактом штамма-продуцента карбапенемазы. Грубый экстракт может быть получен путём механического разрушения ночной культуры бактерий. Данный спектрофотометрический метод детекции карбапенемазной активности дешёв и обладает 100% чувствительностью и 98,5% специфичностью, хотя требует дополнительного оборудования и квалифицированных специалистов (Bernabeu et al. 2012).

Альтернативный подход, но близкий по сути это детекция карбапенемазной активности с помощью MALDI-TOF (matrix assisted laser depolarization-ionization time of fly mass spectrometry). Суть этого метода заключается в том, что при анализе масс-спектра раствора, содержащего карбапенемный антибиотик и суспензию тестируемого штамма, фиксируются пики соответствующие массам антибиотика в негидролизированных формах, а также его продуктов гидролиза. По изменению состава пиков в области масс-спектра, которая соответствует данным значениям, делается вывод о присутствии или отсутствии в растворе карбапенемазы. Таким образом, если известные продукты гидролиза в растворе появились, можно сделать вывод о присутствии в растворе карбапенемазы. Для данного теста достаточно двух часов инкубации. Данный метод модифицировался и внедрён в практику в ФГБУ НИИДИ ФМБА России, является быстрым, дешёвым и с высокими значениями чувствительности и специфичности. К недостаткам можно отнести требующееся дорогое оборудование, сам масс-спектрометр, а также квалифицированные специалисты. Также стоит отметить, что при непосредственном применении теста в рутинной диагностике имеет смысл ставить несколько контролей, т.е. клеточный положительный, клеточный отрицательный, бесклеточный положительный, бесклеточный отрицательный, а также не тестировать более 24 изолятов в одном

эксперименте чтобы во время пробоподготовки не произошло спонтанное разрушение антибиотика (при догом хранении молекула распадается, что может привести к ложноположительному результату) (Hrabak et al. 2011).

Наиболее оптимальным тестом, на сегодняшний день, является Carba NP-test, который позволяет выявлять все типы карбапенемаз энтеробактерий. Суть метода заключается в детекции гидролиза имипенема по смещению рН в результате образования дополнительной гидроксильной группы. Смещение рН регистрируется за счёт внесенного в реакционную смесь индикатора с цветовым переходом в соответствующей области. Данный тест демонстрирует по данным авторов 100% чувствительность и специфичность. Вторая версия «Carba NPII» является модификацией первого теста и включает в себя возможность дифференцировать карбапенемазы энтеробактерий и *P. aeruginosa* за счет добавления ингибитора (ЭДТУ). Данный метод апробирован в том числе и на обогащенных культурах крови (blood culture), продемонстрировав также высокие значения чувствительности и специфичности. Основной недостаток – требует самостоятельного приготовления реагентов, так как коммерческий вариант пока недоступен (Dortet et al. 2012, Vasoo et al. 2013).

Для включения изолятов в список потенциальных продуцентов карбапенемаз, первым признаком является снижение чувствительности к карбапенемным антибиотикам. Согласно основным документам - CLSI и EUCAST, существуют формальные пограничные значения, имеющие отличия. Так, для *Enterobacteriaceae*, по CLSI, чувствительные штаммы к меропенему обладают МПК <1, а устойчивые >4 мг/л, в то время как по критериям EUCAST чувствительные изоляты ≤ 2 , а устойчивые >8 мг/л. Эти данные приведены в качестве примера формальных различий критериев на основе которых, зачастую, формируют выборку для скрининга на карбапенемазную активность. Приверженность к тем или иным критериям отбора существенно меняет итоговые значения чувствительности и специфичности.

1.9 Глобальная эпидемиология карбапенемаз

Вопрос эпидемиологии распространения антибиотикорезистентности в масштабе всего мира остаётся весьма неоднозначным и имеющим множество «белых пятен». Несмотря на то, что резистентность к антимикробным препаратам стараются приравнять по значимости и степени угрозы, связанной с этой проблемой, к распространению новой инфекции, резистентность имеет множество принципиальных отличий. Анализ распространения устойчивости среди изолятов безусловно задача эпидемиологическая, но имеющая целый ряд особенностей. Во-первых, угрозы связанные с распространением устойчивости относительно новые для большинства эпидемиологов. Во-вторых, исследование механизмов устойчивости требует использования комплекса методов, которые не всегда доступны в лечебно-профилактических учреждениях. Третье – это отсутствие нормативной базы, регламентирующей тестирование клинических изолятов и проведение эпидемических мер по сдерживанию распространения устойчивых изолятов, как следствие – возможность только следить за увеличением числа случаев инфекций связанных с мультирезистентными штаммами (ситуация характерная, на сегодняшний день, для России). Также усложняет ситуацию множественность как генов и механизмов, отвечающих за резистентность, так и самих объектов, что исключает решение проблемы с помощью небольшого числа методов или использованием одного подхода. Наиболее развитая система контроля за распространением устойчивых изолятов существует в странах Европы и США. В странах Европы программы по борьбе с этой проблемой координируются и курируются ECDC (European Centre for Disease Prevention and Control). Документы ECDC отражают наиболее актуальную информацию, но затрагивают только 38 стран Европы, при этом различные страны сильно отличаются по степени эффективности работы лабораторий, проводящих исследования по резистентности.

Эпидемиология антимикробной резистентности сильно вариабельна по видовому составу бактерий, группе антимикробных препаратов и географической области. При анализе максимального объема данных, собранных в странах Европы, специалисты ECDC фиксируют градиент распространения антимикробной устойчивости. Наиболее благоприятная ситуация наблюдается в Скандинавии, а худшая ситуация на Юге и Востоке Европы. В 2013 году ECDC (<http://www.ecdc.europa.eu/en/publications/Publications/antimicrobial-resistance-surveillance-europe-2013.pdf>) обозначила тенденцию распространения устойчивости у грамотрицательных изолятов (*Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* и *Acinetobacter* sp.), как наиболее опасную. Фиксируется продолжение увеличения числа устойчивых *E. coli* и *K. pneumoniae* к основным группам антибиотиков. Наибольшая частота устойчивости к карбапенемным антибиотикам выявлена у *K. pneumoniae* и составляет 8.3%, в то время как выявление карбапенем-устойчивых *E. coli* событие редкое и составляет 0,2%, что, в общем, коррелирует с данными по Санкт-Петербургу. Страны, в которых выявлено увеличение частоты карбапенем-устойчивых *E. coli*, относятся к эпидемиологически неблагополучным. Частота устойчивых *Acinetobacter* sp. и *Pseudomonas aeruginosa* также продолжает расти. Следующим этапом формирования суперрезистентного фенотипа является приобретение устойчивости к полимиксину В, что также наблюдается в странах с наименее благоприятной обстановкой.

Частота *E. coli* устойчивых к карбапенемам наблюдается в Греции и Болгарии на уровне 1-5%, в остальных странах, вошедших в исследование ECDC составляет <1%.

Наибольшую угрозу, связанную с распространением антибиотикорезистентности, представляют штаммы *K. pneumoniae*. Приобретение детерминант устойчивости в большинстве случаев происходит путём передачи плазмид. В отличие от *E. coli*, *K. pneumoniae* имеет

хромосомно-локализованную собственную β -лактамазу, что обеспечивает устойчивость к аминопеницилинам. Каким-то образом, *K. pneumoniae* очень эффективно приобретает детерминанты устойчивости, именно у неё было впервые выявлено множество новых вариантов ESBL.

Карбапенемы активно применялись во многих странах Европы из-за распространения ESBL, следствием чего стало распространение генов кодирующих карбапенемазы. В 2013 году, в Европе, наблюдалась следующая ситуация по частоте генов карбапенемаз у инвазивных изолятов *K. pneumoniae*: наихудшая ситуация в Греции (>50%), Италии (25-50%), Румынии (10-25%). В остальных странах значения составили менее 5%.

Ситуация с распространением продуцентов КРС следующая. Активное распространение продуцентов КРС началось в первом десятилетии 21 века в США. Анализ распространения показал, что эпицентром был Нью-Йорк (Bratu et al. 2005). После выявления изолятов в Нью-Йорке, начали выявляться изоляты продуцирующие ферменты КРС-2 и КРС-3 в соседних штатах (Kitchel et al. 2009). Следом за США, последовали случаи выявления продуцентов КРС в странах Латинской Америки, а ещё немного позже в Израиле (Villegas et al. 2006, Leavitt et al. 2007). Чуть позже продуценты попали в Грецию, где за два года фактически достигли уровня эпидемии (Giakkoupi et al. 2011). В северных и западных странах Европы, распространение продуцентов КРС остаётся низким. В этих странах наблюдаются редкие случаи выявления продуцентов, чаще всего связанные с посещением пациентами территорий, где эпидемиологическая обстановка менее благополучная (Woodford et al. 2008). Госпитальные вспышки были зафиксированы в 2009 году во Франции (Carbonne et al. 2010), широкое распространение было зафиксировано в Польше и Италии (Baraniak et al. 2009, Giani, D'Andrea et al. 2009).

Ген *bla*_{КРС} был выявлен у клебсиелл, относящихся к множеству разных сиквенс-типов, но основную долю составил ST258. Данный сиквенс-тип строго ассоциирован с фенотипом множественной устойчивости и

продукцией ферментов КРС-типа. Остаются непонятными причины такой успешности этого сиквенс-типа, тем не менее, *K. pneumoniae* ST258, продуцирующая фермент КРС, на сегодняшний день, является наиболее широко распространённым и успешным возбудителем нозокомиальных инфекций.

Выявление других видов бактерий, продуцирующих фермент КРС, чаще всего происходит в областях, где широко распространены *K. pneumoniae*, продуцирующие КРС, что вполне логично. После *K. pneumoniae*, наиболее часто выявляются вспышки *E. coli* с данными генами, особенно в США, Греции и Израиле (Bratu et al. 2005, Goren et al. 2010, Mavroidi et al. 2012).

Штаммы *K. pneumoniae*, продуцирующие металло- β -лактамазы (VIM, IMP и NDM), уже достигли глобального распространения, хотя ситуация в различных регионах существенно может отличаться. Продуценты VIM распространялись из южной Европы начиная с 2001 года, сначала по странам Европы, а потом были привезены в США и другие страны. Относительно других карбапанемаз, продуценты VIM редко являются причиной крупных внутрибольничных вспышек (Grundmann et al. 2010). Наименее благополучная ситуация наблюдалась в Тунисе, Венесуэле и Южной Корее (Ktari et al. 2006, Yong et al. 2006, Marcano et al. 2008).

Первые обнаружения IMP-ферментов произошли в Японии, Тайвани и Сингапуре (Queenan and Bush 2007). До сегодняшнего дня, продуценты IMP чаще всего выявляются в Японии (Fukigai et al. 2007). *bla*_{IMP-4}-положительные *K. pneumoniae* наиболее распространены в Австралии и Китае. IMP-положительные энтеробактерии (*S. marcescens* и *E. cloacea*) были выявлены в этих же областях (Queenan and Bush 2007). Таким образом, распространение ферментов IMP не является пандемическим и остаётся явлением специфичным для определённых областей, несмотря на достаточно долгое время, прошедшее с момента первого выявления данного фермента (относительно NDM, например).

Продуценты ферментов NDM-типа оказались в невыгодном положении. Сконцентрировав на себе внимание множества исследователей и попав в программы изучения и борьбы множества стран и международных проектов, по распространению данных ферментов, представлена наиболее полная информация относительно других карбапенемаз. Эпицентром распространения бактерий имеющих гены NDM-типа является индийский субконтинент, где наиболее частыми являются случаи выявления этих генов, при чём не только в различных лечебных учреждениях, но и в пробах из окружающей среды (Kumarasamy et al. 2010, Nordmann et al. 2011). Также гены *bla*_{NDM} выявлены у наибольшего разнообразия видов бактерий (Walsh et al. 2011). Вторым резервуаром продуцентов NDM является Балканский полуостров, при этом эпидемиологическая связь с индийским субконтинентом остаётся неизвестной (Livermore et al. 2011, Halaby et al. 2012). Быстрое распространение продуцентов NDM по всему миру на первом этапе было связано с медицинским туризмом жителей Европы в эндемичные области для этого фермента. Спустя некоторое время, эпидемиологическая связь с индийским полуостровом потерялась и передача продуцентов начала происходить между странами далёкими от Индии или Балканского полуострова (Kim et al. 2012).

Продуценты ОХА-карбапенемаз впервые были обнаружены в Турции в 2001 году, где отмечали их редкие внутрибольничные вспышки (Poirel et al. 2004). После Турции вспышки продуцентов ОХА-48-типа были выявлены в странах западной Азии и северной Африки (Carrer et al. 2010, Cuzon et al. 2010), после чего добрались до стран западной Европы. Тем не менее, основным резервуаром карбапенемаз типа ОХА-48 остаются страны, где они впервые были описаны. Хотя, по данным ФГБУ НИИДИ ФМБА России в Москве ситуация с распространением ОХА-48 очень тяжёлая, пока публикаций по этой теме нет (на середину 2015 года).

Стоит подвести итог, что серьёзная работа по выявлению продуцентов карбапенемаз ведётся в первую очередь в странах Европы и США. До 2012

года в России серьёзных исследований представителей семейства *Enterobacteriaceae* на наличие генов карбапенемаз не проводилось, аналогичная ситуация во множестве стран, так что полная картина распространения и разнообразия генов, кодирующих различные карбапенемазы, остаётся туманной. Исследования в области эпидемиологии генов кодирующих карбапенемазы на территории России и Санкт-Петербурга в частности, необходимы для оценки динамики распространения устойчивости к карбапенемным антибиотикам, а также оценки эффективности принимаемым мер по сдерживанию данного процесса.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1. Фенотипические методы исследования

2.1.1. Выделение, идентификация и хранение изолятов

В работу включены 1115 изолятов семейства *Enterobacteriaceae*, выделенных от больных с разными формами внутрибольничных инфекций. Изоляты были собраны в период 2011-2015 годов в стационарах Санкт-Петербурга и Москвы. Источниками выделения микроорганизмов были: раневое отделяемое различного происхождения (ожоговые раны, остеомиелиты, хирургические раны), мокрота (пневмонии), кровь (сепсис), носоглоточные мазки, отделяемое при инфекциях мягких тканей, ликвор, кал. Выделенные в лечебных учреждениях изоляты хранились и транспортировались в НИИДИ на среде, содержащей 1% - колумбийского агара («BioMérieux», Франция), 10% сахарозы, 30% глицерина и разлитой в пробирки типа эппендорф. Идентификацию ночных культур, выращенных на агаре Мюллера-Хинтона, проводили с помощью MALDI-TOF масс-спектрометра Microflex LT («Bruker Daltonics», Германия), со средним коэффициентом идентификации (score) $2,2 \pm 0,7$. В лаборатории ФГБУ НИИДИ ФМБА России изоляты депонировались в музей культур с использованием вышеописанной среды и хранились при -75°C . Для проведения последующих исследований культуры восстанавливали на среде Мюллера-Хинтона.

2.1.2. Определение чувствительности к антибактериальным препаратам

Антибиотикочувствительность оценивали методом серийных микроразведений с определением минимальной подавляющей концентрации (МПК) в бульоне Cation-Adjusted Mueller Hinton (CAMH) II Broth («Becton Dickinson», США), в соответствие с рекомендациями CLSI 2011- 2013. Для постановки опыта использовали ночные культуры, выращенные на агаре

Мюллера-Хинтона. Непосредственно перед постановкой серийных микроразведений, готовили бактериальную суспензию по стандарту мутности 0,5 McF в стерильном физиологическом растворе. Далее полученную взвесь клеток разводили в 100 раз бульоном САМН, и использовали для инокуляции с тестируемыми антибиотиками. Были использованы следующие субстанции антибиотиков: ампициллин (AMP), цефотаксим (CTX), цефоперазон-сульбактам (CSL), цефтазидим (CAZ), цефтазидим-клавуланат (CAZ/CC), цефепим (FEP), цефепим-клавуланат (FEP/CC), азтреонам (ATM), эртопенем (ERT), имипенем (IMI), меропенем (MER), дорипенем (DOR), биापенем (BIA), гентамицин (GEN), амикацин (AMK), тигециклин (TYG), полимиксин В (POL), фосфомицин (FOS), ципрофлоксацин (CIP), триметоприм-сульфаметаксозол (SXT), хлорамфеникол (CHL). Постановку опыта проводил в 96 луночных планшетах для иммуноферментного анализа (НПО «Медполимер», Санкт-Петербург). В каждом планшете делали 11 разведений (ряды 1-11) с 2 - х кратным шагом, 12 лунка использовалась как контроль роста. Один планшет содержал 8 антибиотиков (ряды А-Н). За МПК принимали лунку в ряде разведений, где отсутствовал видимый рост культуры при положительном росте в контрольной лунке. Базовые растворы антибиотиков хранили не более 6 месяцев при -75°C, рабочие растворы использовали *ex tempore*.

2.2 Генотипические методы исследования

2.2.1. Постановка ПЦР (выделение ДНК, амплификация, электрофорез)

Для проведения типирования (амплификация генов домашнего хозяйства для процедуры мультилокусного сиквенс-типирования, определения генов резистентности), а также для детекции генов карбапенемаз использовали ПЦР с электрофоретической детекцией продуктов амплификации. Выделение тотальной бактериальной ДНК проводили с помощью наборов «ДНК-сорб Б» («АмплиСенс», Россия),

согласно протоколу производителя. Подбор праймеров, а также расчет мультиплексных сетов, множественные выравнивания и оценку специфичности осуществляли соответственно в Oligo v.7.0, ClustalW, и NCBI BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Праймеры синтезированы в ЗАО «Евроген» (Россия). Для ПЦР использовали готовые мастермиксы «HS-ScreenMix» (ЗАО «Евроген») в конечном объеме 25 мкл на реакцию/мультиплекс, объем вносимой ДНК составлял 10 мкл. Амплификацию проводили в термоциклере «Терцик» («ДНК-Технология», Россия). Продукты амплификации разделяли в 2% агарозном геле («Amresco», США) с бромистым этидием в 1X TAE буфере (НПФ «Литех», Россия) при напряжении 100 V в течение 25 минут. В качестве маркера использовали ДНК лестницу (100 – 3000 п.н., 12 бэндов) 100 bp DNA Ladder («Ахургер», США). Электрофореграммы получали с использованием системы гель – документации GelDoc («Bio-Rad», США).

Для детекции генов карбапенемаз использовались праймеры, представленные в таблице 1 (Poirel et al. 2011).

Таблица 1.

Праймеры, использованные для детекции генов карбапенемаз

Название	Последовательность	Размер ампликона (п.о.)
IMP-F	GGAATAGAGTGGCTTAAУTCTC	<i>bla</i> _{IMP} 232
IMP-R	GGTTTAAУAAAACAACCACC	
SPM-F	AAAATCTGGGTACGCAAACG	<i>bla</i> _{SPM} 271
SPM-R	ACATTATCCGCTGGAACAGG	
AIM-F	CTGAAGGTGTACGGAAACAC	<i>bla</i> _{AIM} 322
AIM-R	GTTCGGCCACCTCGAATTG	
VIM-F	GATGGTGTТTGGTCGCATA	<i>bla</i> _{VIM} 390
VIM-R	CGAATGCGCAGCACCAG	
OXA-F	GCGTGGTTAAGGATGAACAC	<i>bla</i> _{OXA-48} 438
OXA-R	CATCAAGTTCAACCCAACCG	

GIM-F	TCGACACACCTTGGTCTGAA	<i>bla_{GIM} 477</i>
GIM-R	AACTTCCAACCTTTGCCATGC	
BIC-F	TATGCAGCTCCTTTAAGGGC	<i>bla_{BIC} 537</i>
BIC-R	TCATTGGCGGTGCCGTACAC	
SIM-F	TACAAGGGATTCGGCATCG	<i>bla_{SIM} 570</i>
SIM-R	TAATGGCCTGTTCCCATGTG	
NDM-F	GGTTTGGCGATCTGGTTTTTC	<i>bla_{NDM} 621</i>
NDM-R	CGGAATGGCTCATCACGATC	
DIM-F	GCTTGTCTTCGCTTGCTAACG	<i>bla_{DIM} 699</i>
DIM-R	CGTTCGGCTGGATTGATTTG	
KPC-Fm	CGTCTAGTTCTGCTGTCTTG	<i>bla_{KPC} 798</i>
KPC-Rm	CTTGTCATCCTTGTTAGGCG	

2.2.2 Мультилокусное сиквенс-типирование

Мультилокусное сиквенс-типирование (MLST) осуществляли по общепринятой схеме в соответствии с (Diancourt, Passet et al. 2005). Реакция секвенирования была выполнена с использованием набора ABI Prism BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready reaction Kit и системы ДНК-анализа ABI 3730 Genetic Analyzer («Applied Biosystems», США). Анализ секвенированных фрагментов генов домашнего хозяйства (*rpoB*, *gapA*, *mdh*, *pgi*, *phoE*, *infB*, *tonB*), а также определение аллельных профилей и сиквенс-типов осуществляли на сервере <http://bigsdB.web.pasteur.fr/klebsiella/>.

2.3 Полногеномное секвенирование

Полногеномное секвенирование изолятов 57, 410, 552, 783, (*bla_{NDM-1}*); 565, 570 (*bla_{KPC-2}*) а также 485 (*bla_{OXA-48}*) было проведено с помощью генетического анализатора MiSeq (Illumina). Принцип секвенирования основан на технологии Solexa, включающей обогащение методом bridge-ПЦР на проточном чипе, секвенирование методом синтеза (SBS) с использованием флуоресцентно-меченных нуклеотидов и детекцию

света флуоресценции от кластеров ДНК. Подготовка библиотеки проводилась с помощью кита Nextera XT DNA Library Preparation Kit согласно рекомендациям производителя. Среднее покрытие полученных последовательностей составило x21.

Полногеномное секвенирование плазмидной ДНК трансконъюганта было выполнено с помощью прибора Ion Torrent PGM. Подготовка библиотек была проведена с помощью следующих китов: Ion Xpress™ Plus Fragment Library Kit, Ion PGM Template OT2 400 Kit, Ion PGM Sequencing 400 Kit, Ion 318 v2 Chip Kit согласно инструкциям производителя. Среднее покрытие полученных контигов составило x117.

2.4 Выделение плазмидной ДНК, трансформация, конъюгация

Выделение плазмидной ДНК

Плазмидная ДНК выделялась по протоколу адаптированному для работы с плазмидами длиной более 100 тыс. п.о.:

1. Выращивалась ночная культура на качалке при 37°C
2. Клетки осаждались из объёма 1,5 – 2 мл при 5 тыс. об. 5 минут
3. Супернатант удалялся
4. Осадок ресуспензировался в 100 мкл. буфера (50 mM глюкоза/10 mM EDTA/10 mM Tris-HCl pH=8.0)
5. Вносилось 200 мкл. лизирующего раствора (готовитлся каждый раз свежий (0,2 M NaOH/ 1% SDS)). Аккуратно перемешивлся при комнатной температуре
6. Вносилось 150 мкл. 7,5 M ацетата аммония и 150 мкл. хлороформа. Аккуратно перемешивалось.

7. 10 минут инкубировалось на льду, после чего центрифугировалось 10 минут при 15000 g (желательно при 4 °C).
8. Супернатант переносился в 200 мкл. 30% ПЭГ/1,5 М NaCl. Аккуратно перемешивалось (mix by inversion). Остужалось на льду 15 минут.
9. Осаждалась ДНК. Удалялся супернатант. Высушивалось и разводилось в H₂O или TE-буфере.

Приготовление электрокомпетентных клеток

1. Штамм *E.coli* DH5a сеялся в 10мл. среды LB на ночь (overnight)
2. 1.25 мл ночной культуры сеялся в колбу с LB, выращивался на качалке при 37°C до ОП= 0,6 при длине волны 610 нм
3. Охлаждался на льду 20 минут, также охлаждались центрифужные стаканы
4. Суспензия клеток переносилась в центрифужный стакан и осаждалась при 4000 g (4 °C 15 минут)
5. Удалялся супернатант
6. Ресуспензировалась в 125 мл. 10% глицерина
7. Центрифугировался 15 минут при 4000 g и 4° C, удался супернатант
8. Снова ресуспензировали в 5 мл. глицерина, повторяли отмывку
9. Ресуспензировали в 500 мкл. глицерина (на этой стадии 10% глицерин должен быть чистым)
10. Вносились аликвоты в заранее охлаждённые пробирки по 20 мкл. и сразу замораживались в жидком азоте.

Электропорация

1. Готовились пробирки со средой SOC (по 1 мл)
2. Оттаивались на льду клетки и ДНК

3. Охлаждались на льду кюветы электропоратора
4. Вносились в кювету электропоратора 20 мкл. суспензии клеток и 1 мкл. ДНК
5. Проводилась электропорация
6. Быстро вносились суспензия клеток в 1 мл. среды SOC
7. Пробирку с электротрансформантами ставили на качалку (1 час при 37 °C)
8. Осаждали клетки в эппендорфе при 4000 g 5 минут
9. Осадок ресуспензировали и вносили на селективную среду

Трансконъюгация

1. Выращивался ночной инокулюм реципиента *E. coli* C600 Az^RRif^R в среде LB при 37°C на качалке, аналогично выращивался инокулюм донора.
2. Инокулюм разводился 1:50 в LB, после чего опять выращивался при 37°C до ОП=0,6 (при длине волны 610 нм).
3. Суспензия клеток донора ставилась на 30 минут при комнатной температуре, а реципиента на 15 минут при 42 °C
4. Суспензии клеток смешивали в соотношении 1:10 с избытком реципиента, после чего суспензия осаждалась на фильтре
5. Фильтр помещали на чашки Петри со средой LB (клетками вверх), инкубируется при 37°C ночь
6. С фильтра смывалась клеточная суспензия в среде LB, после чего производился посев на селективную среду для трансконъюгантов.

2.5. Обработка результатов исследования

Все полученные в ходе исследования результаты были анализированы с помощью следующего программного обеспечения: Microsoft «Excel» 2007 (составление базы данных), WHOnet 5.6 (анализ результатов

антибиотикочувствительности), Unipro Ugene, Vector NTI, SnapGene, Geneious (работа с нуклеотидными последовательностями).

Глава 3. Результаты исследования

3.1 Оптимизация метода детекции карбапенемазной активности грамотрицательных бактерий с помощью MALDI-TOF масс-спектрометрии и методов молекулярной детекции генов карбапенемаз

Существует два принципиальных подхода к детекции карбапенемазной активности: фенотипический и молекулярный. Фенотипический подход основан на явлении разрушения карбапенемного антибиотика штаммом-продуцентом карбапенемазы, наиболее распространенные варианты это модифицированный тест Ходжа (МТХ), не отличающийся высокими показателями чувствительности и специфичности, а также методы на основе масс-спектрометрии. Методы на основе масс-спектрометрии, к которым относится приведённый ниже протокол, превосходят МТХ по чувствительности, специфичности, а также скорости проведения анализа – менее трёх часов при наличии чистой культуры, но требует дорогого оборудования – масс-спектрометра. Методы на основе ПЦР обладают множеством преимуществ (высокая скорость проведения анализа, высокая степень стандартизации, чувствительность), но и рядом недостатков. Большое число известных генов карбапенемаз делает их рутинный скрининг затруднительным из-за необходимости постановки большого числа ПЦР-реакций, а также метод не позволяет обнаруживать новые гены карбапенемаз. Внедрение в практику методов фенотипической и молекулярной детекции карбапенемаз - необходимый этап для их изучения и контроля их распространения.

3.1.1 Оптимизация метода детекции карбапенемазной активности изолятов с помощью MALDI-TOF масс-спектрометрии

Для детекции карбапенемазной активности с помощью MALDI-TOF масс-спектрометрии, на основе литературных данных, был разработан и апробирован следующий протокол исследования:

1. Готовится свежий раствор лекарственной формы субстанции меропенема 200 мкг/мл в 0,9% NaCl (массовая доля меропенема в субстанции 85%)
2. Готовится суспензия тестируемого штамма V=1 мл. ОП 4 - 4.20 по шкале McFarland, после чего клетки осаждаются центрифугированием при 7 тыс. об. 7 минут и супернатант удаляется
3. К осаждённым клеткам вносится 15 мкл. раствора антибиотика и содержимое пробирки ресуспензируется на вортексе
4. Смесь клеток и раствора антибиотика культивируются при температуре 37° С 2,5 часа, после чего пробирка снова центрифугируется и 2 мкл. супернатанта переносятся на плашку масс-спектрометра
5. Детекция масс-спектров проводится в диапазоне 280-520 Da
6. При отсутствии пика, соответствующего нативной форме меропенема (384 Da), результат считается положительным
7. Важно включать в анализ следующие контроли:
 - А) Раствор 0,9% NaCl
 - Б) Раствор меропенема из пункта 1.
 - В) Тест со штаммом, обладающим валидированной карбапенемазной активностью
 - Г) Тест со штаммом, не обладающим карбапенемазной активностью

В основе метода лежит детекция разрушения нативной (исходной) формы молекулы меропенема и образования гидролизованного продукта (Рис.4). При гидролизе происходит уменьшение массы молекулы антибиотика за счёт потери атома углерода и атома кислорода 384 Da → 358 Da.

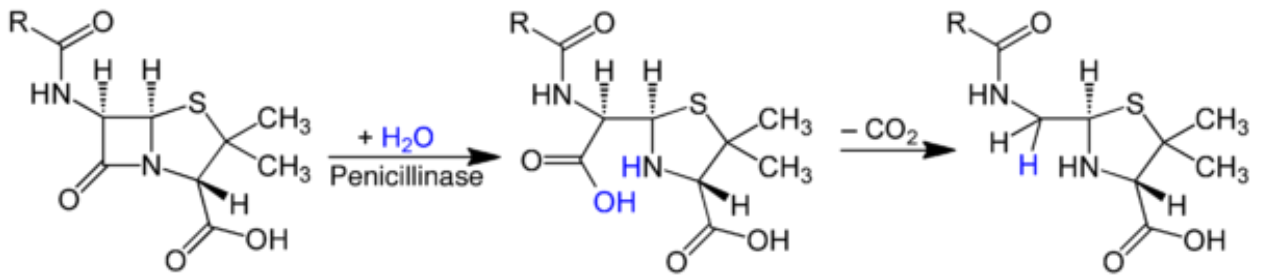


Рисунок 4. Схема ферментативного гидролиза молекулы антибиотика

Так как карбапенемные антибиотики являются нестабильными молекулами и медленное образование гидролизованных форм в растворе возможно без влияния ферментов, в данной методике показателем карбапенемазной активности является исчезновение пика, соответствующего исходной форме меропенема (рисунок 5).

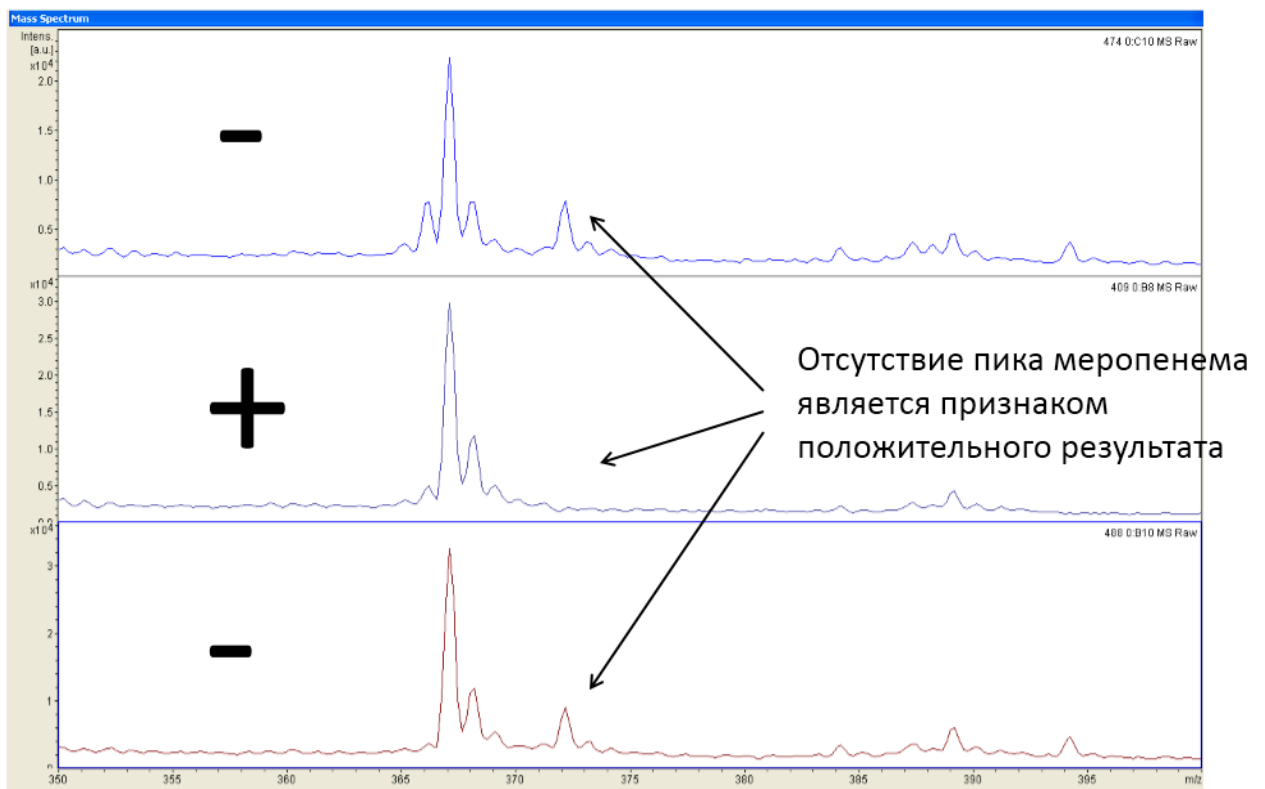


Рисунок 5. Пример результатов анализа масс-спектра, где верхний масс-спектр – контрольный раствор меропенема (пик соответствует массе молекулы антибиотика), средний масс-спектр с отсутствующим пиком меропенема – после инкубирования клеток штамма-продуцента карбапенемазы в растворе меропенема. Нижний масс-спектр – инкубирование раствора меропенема вместе с взвесью клеток штамма не продуцирующего карбапенемазу.

Апробация метода.

Метод был апробирован на коллекции фенотипически типированных нозокомиальных изолятов *Enterobacteriaceae*. Из 475 изолятов были отобраны все изоляты, демонстрирующие снижение чувствительности хотя бы к одному из карбапенемных антибиотиков (меропенем, имипенем, дорипенем, эртапенем). В качестве критерия отбора было использовано превышение значений МПК штамма эпидемиологической точки отсечения по критерию EUCAST (<http://www.eucast.org>).

По данному критерию были отобраны 98 изолятов, из которых 22 были положительны при анализе карбапенемазной активности с использованием собственного протокола.

Наличие генов, кодирующих ферменты NDM-1, VIM-4 и OXA-48 было подтверждено у 18 изолятов, а 4 изолята, после повторной идентификации, были отнесены к неферментирующим бактериям: *Stenotrophomonas maltophilia* (n=2), *Acinetobacter baumannii* и *Achromobacter xylosoxia*, для которых характерны собственные хромосомно-локализованные карбапенемазы.

В ходе отработки методики были определены следующие факторы, которые необходимо учитывать при внедрении масс-спектрометрического метода детекции карбапенемаз:

1. Спонтанная деградация антибиотика в растворе
2. Ферментативный гидролиз
3. Чувствительность прибора
4. Образование различных солей антибиотика
5. Отсутствие количественной оценки
6. Сорбция антибиотика мишенями

3.1.2. Оптимизация методов молекулярной детекции генов карбапенемаз

Для молекулярной детекции генов карбапенемаз с помощью полимеразной цепной реакции с флуоресцентным методом детекции, была разработана мультиплексная ПЦР на гены *bla*_{KPC}-типа, *bla*_{OXA-48}-типа, а также *bla*_{NDM}-типа. Данная реакция обеспечивает выявление наиболее распространённых вариантов карбапенемаз в Санкт-Петербурге и Москве у представителей семейства *Enterobacteriaceae*. Подбор праймеров проводился с учётом консервативных участков генов карбапенемаз приведённых в таблице 2.

Таблица 2.

Список генов карбапенемаз, использованных при подборе праймеров в мультиплексной ПЦР для выявления генов *bla*_{KPC}-типа, *bla*_{NDM}-типа и *bla*_{OXA-48}-типа.

Фермент	Номер референса в базе GenBank	Фермент	Номер референса в базе GenBank	Фермент	Номер референса в базе GenBank
KPC-1	AF297554	NDM-1	FN396876	OXA-48	AY236073
KPC-2	AY034847	NDM-2	JF703135	OXA-162	HM015773
KPC-3	AF395881	NDM-3	JQ734687	OXA-163	HQ700343
KPC-4	AY700571	NDM-4	JQ348841	OXA-181	JN205800
KPC-5	EU400222	NDM-5	JN104597	OXA-204	JQ809466
KPC-6	EU555534	NDM-6	JN967644	OXA-232	JX423831
KPC-7	EU729727	NDM-7	JX262694	OXA-244	JX438000
KPC-8	FJ234412	NDM-8	AB744718	OXA-245	JX438001
KPC-9	FJ624872	NDM-9	KC999080	OXA-247	JX893517
KPC-10	GQ140348	NDM-10	KF361506		
KPC-11	HM066995	NDM-12	AB926431		
KPC-12	HQ641421	NDM-13	LC012596		
KPC-13	HQ342889	NDM-14	KM210087		

КРС-14	JX524191	NDM-15	КР735848
КРС-15	КС433553	NDM-16	КР862821
КРС-16	КС465199		
КРС-17	КС465200		
КРС-18	КР681699		
КРС-19	КJ775801		
КРС-22	КМ379100		

Подобранные праймеры, а также длина продуктов амплификации, представлены в таблице 3.

Таблица 3.

Праймеры для мультиплексной амплификации генов *bla*_{КРС}-типа, *bla*_{ОХА-48}-типа и *bla*_{NDM} – типов

Мишень	Название праймера	Последовательность праймера 5'-3'	Продукт (пар оснований)
<i>bla</i> _{КРС}	МКРСF	GCTGACCAACCTCGTCGCGGAA	753
	МКРСR	GCCTCGCTGTGCTTGTCAATCC	
<i>bla</i> _{ОХА}	МОХAF	ТААТСТТААААСGGGCGAACCA	514
	МОХAR	AAGTTCAACCCAACCGACCCA	
<i>bla</i> _{NDM}	MNDMF	TGCTCAGTGTCTGGCATCACC	176
	MNDMR	GAACCAGCAACCGCGCCCA	

Температурный протокол амплификации представлен в таблице 4:

Таблица 4.

Температурный протокол амплификации генов *bla*_{KPC}-типа, *bla*_{OXA-48}-типа и *bla*_{NDM} – типов.

Т ⁰ С	Время	Цикл
95	5 минут	X1
95	15 секунд	X25
62	15 секунд	
72	15 секунд	
72	2 минуты	X1

В результате тестирования данной мультиплексной реакции на типированных изолятах с известной нуклеотидной последовательностью генов карбапенемаз (*bla*_{KPC-2}, *bla*_{OXA-48} и *bla*_{NDM-1}), были получены чёткие бэнды, соответствующие расчётным размерам. Фотография геля представлена на рисунке 6.

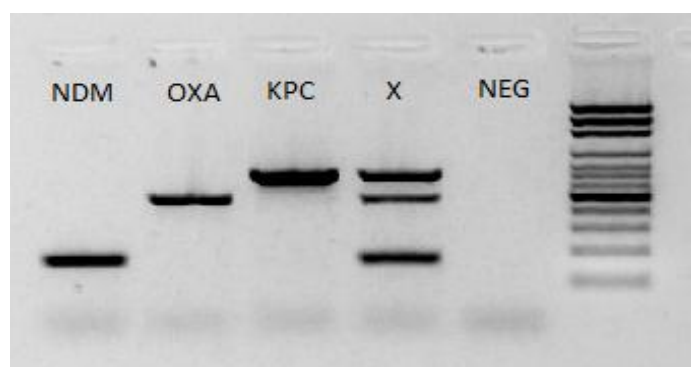


Рисунок 6. Фотография гель-электрофореза амплификации мультиплексной ПЦР с праймерами, представленными в таблице 2. NDM – амплификация ДНК выделенной из штамма-продуцента гена *bla*_{NDM-1}, OXA - амплификация ДНК выделенной из штамма-продуцента гена *bla*_{OXA-48}, KPC-амплификация ДНК выделенной из штамма-продуцента KPC-2, X – амплификация смеси равных объемов ДНК, использованных в пробах NDM, OXA и KPC. NEG – отрицательный контроль.

Для сравнения длин полученных ампликонов в мультиплексной реакции с расчётными, был поставлен капиллярный электрофорез (Рисунок 7)

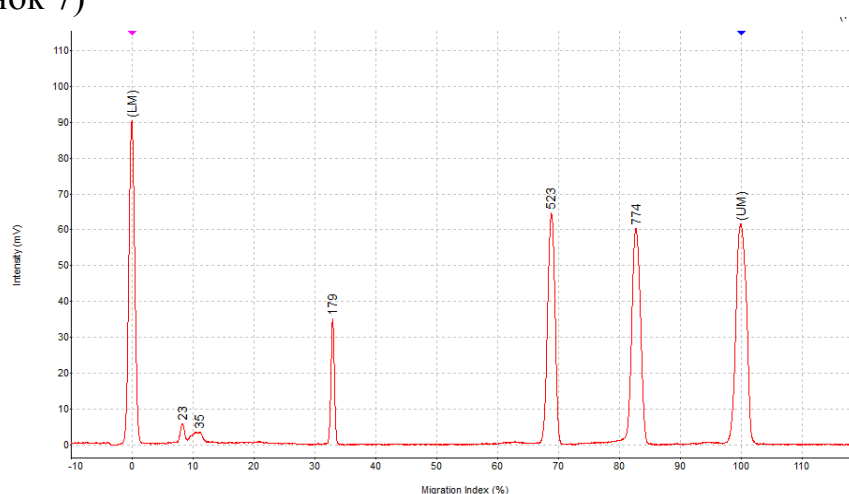


Рисунок 7. Данные капиллярного электрофореза, где крайние пики соответствуют внутреннему стандарту, пики с значением 23 и 35 – области масс праймеров и три пика, соответствующие значениям 179 п.о, 523 п.о. и 774 п.о. соответствующих бэндам, полученным в ходе мультиплексной реакции.

Соответственно, ожидаемые размеры ампликонов совпадают с расчётными в пределах погрешности прибора 5%.

Оптимизированные и внедрённые в практику методы позволяют эффективно и быстро выявлять карбапенемазную активность, а также основные гены карбапенемаз. Комбинирование данных методов необходимо в связи с большим числом описанных в мире генов карбапенемаз, что делает применение только методов на основе ПЦР не рациональным. Также, не всегда продукция карбапенемаз сопровождается повышением МПК к карбапенемным антибиотикам до уровня более 8 мг/л, при этом важно определить связано ли повышение МПК с альтернативными механизмами устойчивости (эффлюкс и пр.), или наличием фермента. Рациональным алгоритмом работы с подобными штаммами является ПЦР-типирование на наиболее распространенные гены карбапенемаз, характерные для региона или стационара, где они были выделены, в случае отрицательного результата далее следует определение карбапенемазной активности с помощью масс-спектрометрии. В случае положительного результата следует серия ПЦР на редкие гены карбапенемаз. В случае отрицательного результата, необходим

более глубокий молекулярный анализ изолята с применением методов секвенирования.

3.2 Анализ молекулярной эпидемиологии штаммов-продуцентов карбапенемаз, циркулирующих на территории Санкт-Петербурга

3.2.1 Анализ молекулярной эпидемиологии штаммов-продуцентов гена

*bla*_{NDM-1}

Из 53 изолятов продуцирующих ген *bla*_{NDM}, случайным образом, были отобраны 23 изолята (21 *Klebsiella pneumoniae* и 2 изолята *Acinetobacter nosocomialis*) для секвенирования гена *bla*_{NDM} и проведения мультилокусного сиквенс-типирования (только для *K. pneumoniae*). Данные представлены в таблице 5.

Таблица 5.

Характеристика продуцентов карбапенемаз NDM-типа

Ном ер изол ята	Дата выдел ения	Тип гена	Вид М/О *	Ста цио нар	ST**	Пол	диагноз	Исх од** *	возр аст	Материал выделени я
28	2011	NDM-1	Крп	А	ST 340	F	Язва желудка/ перитонит	S	67	моча
49	2011	NDM-1	Крп	А	ST 340	М	Язва желудка/ перитонит	S	62	Рана
54	2011	NDM-1	Крп	А	ST 340	F	Эндометрит/ перитонит	L	nd	nd
55		NDM-1	Крп	А	ST 340		nd	nd	nd	nd
57	2011	NDM-1	Крп	А	ST 340	М	Некроз толстой кишки/ перитонит	L	67	жидк. бр. пол.
59	2011	NDM-1	Крп	А	ST 340	М	Панкреонекроз/ перитонит	L	31	рана
82	2012	NDM-1	Крп	А	ST 340	F	менингоэнцефа лит	L	nd	кровь
83	2012	NDM-1	Крп	А	ST 340	F	Холецистит/ перитонит	L	nd	моча
107	2012	NDM-1	Крп	А	ST 340	F	Рак печени/ перитонит	L	nd	кровь
112	2012	NDM-1	Крп	А	ST 340	М	Разрыв тонкой кишки/перитон	L	nd	кровь

											ИТ	
409	2012	NDM-1	Kpn	D	ST 340	M	пневмония	n.d.	61	мокрота		
410	2012	NDM-1	Kpn	D	ST 340	M	пневмония	L	53	мокрота		
416	2012	NDM-1	Kpn	D	ST 340	M	пневмония	L	53	моча		
456	2012	NDM-1	Kpn	D	ST 340	F	пневмония	L	57	моча		
458	2012	NDM-1	Kpn	D	ST 340	F	пневмония	n.d.	53	моча		
524	2012	NDM-1	Kpn	A	ST 340	M	nd	L	26	кровь		
552	2012	NDM-1	Kpn	B	ST 340	nd	nd	nd	nd	nd		
714	2012	NDM-1	Kpn	E	ST14 7	nd	nd	nd	nd	nd		
783	2012	NDM-1	Kpn	F	ST 101	M	сепсис	nd	nd	моча		
785	2012	NDM-1	Kpn	F	ST 101	M	ягодичный абсцесс	nd	nd	рана		
N15 2	2012	NDM-1	A.n_ 13	H	-							
N19 9	2012	NDM-1	A.n_ 13	H	-	nd	nd	nd	nd	nd		

* Микроорганизм

** Сиквенс-тип

*** S – выжил, L – летальный исход, nd – нет данных

Минимальное значение летальности пациентов с инфекциями вызванными продуцентами карбапенемазы NDM-1 составило 20%, максимальное значение установить невозможно из-за отсутствия информации или из-за перевода пациента в другие стационары, частично это связано с ретроспективностью анализа собранных в 2011 – 2012 годах изолятов.

Доминирующим сиквенс-типом является ST340, а также были выявлены минорные варианты ST147 и ST101. Данные сиквенс-типы не относятся к единым клональным комплексам, что может свидетельствовать либо о независимых случаях импорта, либо о передаче гена, предположительно, от ST340 к другим генетическим линиям на мобильном элементе. Последний сценарий представляется наиболее вероятным. Регулярное обнаружение

продуцентов генов NDM-типа в отдельных стационарах одной и той же генетической линии говорит о продолжающихся нелокализованных вспышках.

3.2.2 Анализ молекулярной эпидемиологии штаммов-продуцентов генов *bla*_{KPC}-типа.

Из 19 изолятов, продуцирующих гены *bla*_{KPC}-типа, были отобраны 9 изолятов для секвенирования гена *bla*_{KPC}, а также проведения мультилокусного сиквенс-типирования. Результаты представлены в таблице 6.

Таблица 6.

Анализ сиквенса генов *bla*_{KPC}-типов, а также видовой идентификации и определения сиквенс-типа типовых изолятов.

N (стационар)	Дата выделения	Тип гена	Вид микроорганизма	MLST
565 (A)	2012	KPC-2	Kpn	ST273
570 (B)	2013	KPC-2	Kpn	ST258
713 (C)	2013	KPC-2	Kpn	ST15
1291 (D)	2013	KPC-3	Kpn	ST258
834 (D)	2014	KPC-3	Kpn	ST258
838 (E)	2014	KPC-2	Kpn	ST258
846 (E)	2014	KPC-2	Kpn	ST258
858 (E)	2014	KPC-2	Kpn	ST258
859 (E)	2014	KPC-2	Kpn	ST258

В отличие от продуцентов гена *bla*_{NDM-1}, продуценты карбапенемазы KPC-типов имеют более разнообразный состав. Всего выявлено 4 комбинации типа гена и сиквенс-типа, что говорит в пользу гипотезы о многократных случаях импорта данных продуцентов в стационары Санкт-Петербурга. Изолят 565, вероятно, был завезён с территории Вьетнама, ниже он будет рассмотрен подробно.

Доминирование генетической линии ST258 коррелирует с литературными данными о преобладании представителей «CG258-TonB79» -

кластера среди продуцентов генов *bla*_{КРС}-типа. Регулярное обнаружение продуцентов генов *bla*_{КРС}-типа в отдельных стационарах одной и той же генетической линии, говорит о продолжающихся нелокализованных вспышках.

3.2.3. Анализ молекулярной эпидемиологии штаммов-продуцентов генов *bla*_{ОХА-48}-типа.

Из 23 изолятов продуцирующих гены *bla*_{ОХА-48}-типа, были отобраны 3 изолята для секвенирования гена *bla*_{ОХА}, а также проведения мультилокусного сиквенс-типирования. Результаты представлены в таблице 7.

Таблица 7.

Анализ сиквенса генов *bla*_{ОХА-48}-типов, а также видовой идентификации и определения сиквенс-типа типовых изолятов.

N (источник)	Дата выделения	Тип гена	Вид микроорганизма	MLST
38 (А)	2011	ОХА-48	<i>K. pneumoniae</i>	ST147
42 (А)	2011	ОХА-48	<i>K. pneumoniae</i>	ST147
786 (В)	2012	ОХА-48	<i>K. pneumoniae</i>	ST395

По неопубликованным данным, распространение продуцентов ОХА-48 характерно в первую очередь для Москвы, в то время как в Санкт-Петербурге частота продуцентов ОХА-48 существенно меньше, несмотря на то, что первые случаи обнаружения датированы 2011 годом. Продуценты ОХА-48, в отличие от продуцентов КРС и NDM карбапенемаз, характеризуются спорадическими выявлениями, не связанными с развитием госпитальных вспышек. Наиболее вероятно, что резервуар распространения генов данной группы остаётся не выявленным.

3.2.4. Анализ молекулярной эпидемиологии штаммов-продуцентов генов *bla*_{VIM}-типа.

Было обнаружено лишь два продуцента карбапенемазы VIM-типа, оба выделены в одном стационаре - *Enterobacter cloacea* VIM-4. По нашим данным, гены VIM-типа наименее распространённые среди представителей семейства *Enterobacteriaceae*. По литературным данным, основным резервуаром генов данного типа является *Pseudomonas aeruginosa* (Edelstein et al. 2013). Также об этом говорят данные исследования на носительства карбапенемаз приведённые в главе 3.3.

Из наиболее актуальных карбапенемаз в мире, карбапенемазы IMP- и VIM-типов, на сегодняшний день, среди *Enterobacteriaceae*, в России, имеют наименьшее значение по сравнению с OXA-48, NDM-1 и KPC-типами, но из-за большого количества необследованных на носительство карбапенемаз стационаров, необходимо допускать вероятность наличия неизвестных на сегодняшний день очагов распространения данных карбапенемаз, как на территории Санкт-Петербурга, так и других городов России. Прежде всего это крупные города с высокой степенью миграции, а также лечебно-профилактические учреждения, обслуживающие пациентов из разных регионов.

3.2.5 Анализ резистома типовых продуцентов карбапенемаз на основе данных полногеномного секвенирования

Были выбраны семь изолятов *K. pneumoniae*, выделенных в разных ЛПУ Санкт-Петербурга, в период с 2011 по 2013 год. 4 изолята продуцировали карбапенемазы NDM-1 и относились к ST340 (N=3) и ST101 (N=1), 2 изолята продуцировали KPC-2 (ST273 и ST258), один изолят OXA-48 (ST395). Фенотип антибиотикорезистентности оценивали по значениям МПК цефалоспоринов, карбапенемов, аминогликозидов и фторхинолонов, тигециклина, полимиксина и фосфомицина, использовали рекомендации

CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institution). Клональность оценивали с помощью мультилокусного сиквенс-типирования (MLST), согласно рекомендациям <http://www.pasteur.fr>. Резистом проанализирован на основе результатов полногеномного секвенирования, выполненного на секвенаторе MiSeq Illumina с помощью сервиса ResFinder-2.0 <http://cge.cbs.dtu.dk/services/ResFinder/>. При использовании сервиса ResFinder-2.0, устанавливались следующие параметры: «Antimicrobial configuration» - all, «threshold for %ID» - 80%, «minimum length» - 60%. Данные анализа приведены в таблице 8.

Таблица 8.

Данные анализа приобретённых детерминант резистентности типовых изолятов-продуцентов карбапенемаз

№ изолята	Карба пенем аза.	Аминоглико зиды	В-лактамы	Фторхинолоны	Фосфомицин	МЛС	Феникол	Сульфонамид	Тетрациклин	Триметоприм
57 St 340	NDM-1	<i>aph(3')-VIa</i> <i>aadA2</i> <i>aac(6')Ib-cr</i>	<i>blaSHV-11</i>	<i>oqxB</i> <i>oqxA</i> <i>aac(6')Ib-cr</i>	<i>fosA</i>	<i>msr(E)</i> <i>mph(E)</i>	<i>catB3</i>	<i>sul1</i>		<i>dfrA12</i>
410 ST 340	NDM-1	<i>aph(3')-VIa</i> <i>aadA2</i> <i>aac(6')Ib-cr</i> <i>armA</i> <i>aac(3)-IIa</i>	<i>blaCTX-M-15</i> <i>blaOXA-1</i>	<i>aac(6')Ib-cr</i> <i>QnrB1</i>	<i>fosA</i>	<i>msr(E)</i> <i>mph(E)</i>	<i>catB3</i>	<i>sul1</i>		<i>dfrA12</i>
552 ST 340	NDM-1	<i>aac(6')Ib-cr</i> <i>aadA2</i> <i>aac(3)-IIa</i>	<i>blaCTX-M-15</i> <i>blaSHV-11</i>	<i>oqxA</i> <i>oqxB</i> <i>aac(6')Ib-cr</i>	<i>fosA</i>	<i>msr(E)</i> <i>mph(E)</i>	<i>catB3</i>	<i>sul1</i>		<i>dfrA12</i>
783 ST 101	NDM-1	<i>aph(3')-VIa</i> <i>aadA2</i> <i>armA</i>	<i>blaCTX-M-15</i> <i>blaSHV-1</i>	<i>oqxB</i>	<i>fosA</i>	<i>msr(E)</i> <i>mph(E)</i>		<i>sul1</i>		<i>dfrA12</i>
565 ST273	blaKP C-2	<i>strA</i> <i>aac(3)-IIa</i> <i>aac(6')Ib-cr</i> <i>strB</i>	<i>blaTEM-1</i> <i>blaSHV-11</i> <i>blaCTX-M-15</i>	<i>oqxA</i> <i>QnrS1</i> <i>oqxB</i> <i>aac(6')Ib-cr</i>	<i>fosA</i>	<i>mph(A)</i>	<i>catB3</i>	<i>sul2</i>	<i>tet(A)</i>	<i>dfrA14</i>
570 ST258	blaKP C-2	<i>aac(6')-Ib</i>	<i>blaTEM-1</i> <i>blaSHV-11</i>	<i>oqxB</i> <i>oqxA</i> <i>aac(6')Ib-cr</i>	<i>fosA</i>					
485 ST395	OXA-48	<i>aac(6')Ib-cr</i>	<i>blaSHV-11</i> <i>blaCTX-M-15</i> <i>blaTEM-1</i> <i>blaOXA-1</i>	<i>oqxA</i> <i>oqxB</i> <i>aac(6')Ib-cr</i> <i>QnrS1</i>	<i>fosA</i>		<i>catB3</i> <i>catA1</i>	<i>sul1</i>	<i>tet(A)</i>	<i>dfrA1</i>

Анализ резистома семи продуцентов карбапенемаз выявил в среднем 12 детерминант резистентности у каждого изолята. В целом, это характерная ситуация для нозокомиальных изолятов, циркулирующих в ЛПУ и подвергающихся постоянному селективному влиянию различных схем антимикробной терапии. Основная угроза штаммов-продуцентов карбапенемаз заключается не в наличии одного из ферментов, способного формировать резистентный фенотип к карбапенемным антибиотикам у возбудителя заболевания, а в сформировавшейся мультирезистентности к широкому спектру возможных антимикробных препаратов. Для подобных инфекций карбапенемные антибиотики являются основным инструментом борьбы, но приобретение детерминант резистентности и к карбапенемам, приводят к высокой степени летальности.

Представленные в таблице 8 гены, обуславливающие устойчивость к аминогликозидам, являются ферментами модифицирующими молекулу антибиотика, что приводит к формированию устойчивости к таким препаратам как амикацин, канамицин, стрептомицин и т.д. Например, ген *armA* являющийся метилазой выявлен у нозокомиальных изолятов несущих различные гены карбапенемаз и относящихся к различным клональным группам, что является поводом предположить высокую частоту данного гена на плазмидах, циркулирующих в среде нозокомиальных изолятов. Устойчивости к β -лактамам обусловлена разнообразными β -лактамазами, включающими, кроме карбапенемаз, ферменты обладающие относительно узким спектром активности, как *bla*_{TEM-1}, *bla*_{SHV-1}, так и β -лактамазы расширенного спектра действия, как *bla*_{CTX-M-15}. Устойчивость к хинолонам и фторхинолонам обусловлена двумя вариантами реализации механизма защиты – активное выведение молекулы антибиотика из клетки (*oqxA*, *oqxV* и др.), а также модификация молекулы антибиотика (*qnrB1*, *qnrS1*). Во всех проанализированных штаммах за устойчивость к фосфомицину отвечает ген *fosA*, кодирующий фермент модифицирующий молекулу антибиотика, также распространены механизмы

устойчивости к фосфомицину опосредованные модификацией мишени антибиотика.

У пяти из семи изолятов, устойчивость к макролидам, обусловлена действием генов *msr(E)*, *mph(E)*, модифицирующими молекулу антибиотика, у большинства изолятов представлены оба гена. К хлорамфениколу активность проявляют ферменты кодируемые генами *catB3* и *catA1*, только у одного из семи изолятов не найдено генов данной группы, которые ацетилируют молекулу антибиотика. В геноме исследуемых изолятов обнаружены гены *sul1* и *sul2*, оба гена кодируют дигидроптеоратсинтетазу (модификация молекулы антибиотика). За устойчивость к тетрациклину отвечают найденные в двух изолятах гены *tetA*, обеспечивающие активное выведение молекул антибиотика из клетки. К триметоприму устойчивость обеспечивается дигидрофтолатредуктазами, кодируемыми генами *dfrA12*, *dfrA14* и *dfrA1*.

Полученные данные о совокупности приобретённых детерминант резистентности нозокомиальными штаммами, продуцирующими карбапенемазы, подтверждают тенденцию формирования панрезистентного фенотипа внутрибольничным штаммами, за счёт горизонтального переноса генов в сочетании с селективным давлением различных схем антимикробной терапии.

3.3 Оценка частоты носительства и разнообразия продуцентов карбапенемаз пациентами отделений хирургии в Санкт-Петербурге

Для оценки распространения штаммов-продуцентов карбапенемаз в стационарах Санкт-Петербурга, было проведено исследование на носительство подобных изолятов среди пациентов отделений хирургии пяти лечебно-профилактических учреждений Санкт-Петербурга. В качестве изучаемого материала использовался ректальный мазок. Был разработан следующий план исследования, рассчитанный на 5 дней для каждого из ЛПУ.

День 1.

Этап 1. Забор ректального мазка с помощью урогенитального зонда.

Транспортировка кончика урогенитального зонда в фосфатном буфере (объем 1 мл, рН=7.4)

Этап 2. Вортексирование пробирки с ректальным мазком 5 минут, удаление из пробирки кончика урогенитального зонда. Забор 333 мкл. объема фосфатного буфера с образцом для хранения при - 70⁰ С. Центрифугирование 7 минут при 5 тыс. об. мин. на микроцентрифуге, удаление супернатанта. Ресуспензирование осадка в 100 мкл. бульона МХ с меропенемом (1 мг/л).

50 мкл. – посев на среду McConkey с добавлением меропенема в концентрации 1 мг/литр (среда готовится непосредственно перед посевом).

К оставшимся 50 мкл. вносилось 500 мкл. Бульона МХ с меропенемом в концентрации 1 мг/литр, после чего пробирка помещается в термостат на 18 часов.

День 2

Этап 3. Идентификация выросших за ночь колоний, посев чистых культур на среду McConkey без добавления меропенема.

Этап 4. Выделение ДНК из ночного инокулюма, постановка Real-time-PCR на основные гены карбапенемаз (KPC/OXA-48/NDM/IMP/VIM)

День 3

Этап 5. Выделение ДНК и RT-PCR чистых культур на гены карбапенемаз.

День 4

Этап 6. Внесение культур в музей, определение фенотипа с помощью метода серийных микроразведений к следующим антибиотикам: Меропенем, Имипенем, Полимиксин

День 5

Этап 7. Учет фенотипов.

Результаты:

Всего было получено 140 образцов, в таблице 9 приведены все образцы с обнаруженными генами карбапенемаз. Все пробы были получены в период с апреля по декабрь 2014 года. Для детекции генов *bla*_{OXA-48}-типа, *bla*_{KPC}-типа, *bla*_{NDM}, IMP, VIM – типов, а также карбапенемаз, характерных для рода *Acinetobacter*, использовались готовые наборы фирмы ООО «Интерлабсервис» для проведения ПЦР-анализа с гибридизационно-флуоресцентной детекцией (Real Time PCR) «АмплиСенс MDR KPC/OXA-48-FL», «АмплиСенс MDR MBL-FL», «АмплиСенс MDR Ab-OXA-FL».

Таблица 9.

Характеристика положительных образцов на гены карбапенемаз, полученных в ходе исследования на носительство в отделениях хирургии лечебно-профилактических учреждений Санкт-Петербурга

№	Стационар	Микроорганизм	ПЦР М/о* (NDM, KPC, IMP, OXA-48, VIM)	ПЦР первичный материал (NDM, KPC, IMP, OXA, VIM)	ПЦР <i>A. baumannii</i>	IMI**	MEM	PN
1	A	<i>A. baumannii</i>		OXA-40	OXA-40			
6	A	<i>A. baumannii</i>		OXA-40	OXA-40	64	>64	0,03
7	A	<i>A. baumannii</i>		OXA-40	OXA-40	64	>64	0,06
8	A	<i>A. baumannii</i>		OXA-40	OXA-40	64	>64	0,06
10	A	<i>A. baumannii</i>		OXA-40	OXA-40	64	>64	0,03
11	A	<i>A. baumannii</i>		OXA-40	OXA-40			
14	A	<i>A. baumannii</i>		OXA-40	OXA-40	32	>64	0,12
15	A	<i>A. baumannii</i>		OXA-40	OXA-40	64	>64	0,03
16	A	<i>A. baumannii</i>		OXA-40	OXA-40	64	>64	0,06
19	A	<i>K. pneumoniae</i>	OXA-48	OXA-48		16	32	0,12
20	A	<i>A. baumannii</i>		OXA-40	OXA-40; OXA-23	64	>64	0,12

23	B	<i>K. pneumoniae</i>	NDM	NDM		>64	>64	0.12
24	B	<i>K. pneumoniae</i>	NDM	NDM, OXA		>64	>64	>16
24	B	<i>A. baumannii</i>		OXA-40	OXA-40	>64	>64	0.03
25	B	<i>K. pneumoniae</i>	NDM	NDM, VIM		>64	>64	0.03
26	B	<i>K. pneumoniae</i>	NDM	NDM		>64	>64	0.03
26	B	<i>A. baumannii</i>		OXA-40	OXA-40	>64	>64	>16
27	B	<i>K. pneumoniae</i>	NDM	NDM, VIM		>64	>64	0.03
27	B	<i>A. baumannii</i>		OXA-40	OXA-40	64	>64	0.06
28	B	<i>K. pneumoniae</i>	NDM	NDM		>64	>64	0.12
28	B	<i>A. baumannii</i>		OXA-40	OXA-40	>64	>64	1
29	B	<i>K. pneumoniae</i>	NDM	NDM		16	16	0.06
30	B	<i>A. baumannii</i>		OXA-40	OXA-40	>64	>64	>16
31	B	<i>K. pneumoniae</i>	NDM	NDM		>64	>64	0.25
32	B	<i>K. pneumoniae</i>	NDM	NDM		>64	>64	1
33	B	<i>K. pneumoniae</i>	NDM	NDM		>64	>64	>16
34	B	<i>K. pneumoniae</i>	NDM	NDM		>64	64	0.015
34	B	<i>A. baumannii</i>		OXA-40	OXA-40		64	0.06
35	B	<i>A. baumannii</i>		OXA-40	OXA-40	64	>64	>16
36	B	<i>K. pneumoniae</i>	NDM	NDM		>64	>64	0.03
38	B	<i>A. baumannii</i>		OXA-40	OXA-40	64	>64	0.03
40	B	<i>A. baumannii</i>		OXA-40	OXA-40	32	>64	0.03
45	B	<i>K. pneumoniae</i>	NDM	NDM		>64	>64	0.03
46	B	<i>K. pneumoniae</i>	NDM	NDM		64	>64	0.06
47	B	<i>K. pneumoniae</i>	NDM	NDM		16	64	0.25
49	B1	<i>K. pneumoniae</i>	NDM	NDM		32	64	0.12
50	B1	<i>A. baumannii</i>		OXA-40	OXA-40	32	>64	0.03
59	B	H.p.***		OXA-40				
62	B	<i>A. baumannii</i>		OXA-40	OXA-40	32	>64	0,03
63	B	<i>A. baumannii</i>			OXA-40	32	>64	0.06
64	B	<i>K. pneumoniae</i>	OXA-48	OXA-48				
64	B	<i>A. baumannii</i>		OXA-40	OXA-40			
92	D	<i>A. baumannii</i>		OXA-40	OXA-40	<0,25	<0,5	<0,12
107	D	<i>A.baumannii</i>		OXA-40	OXA-40	>32	>32	<0.12

110	E	<i>K.pneumoniae</i>	КРС	КРС		16	32	0.5
116	E	<i>K.pneumoniae</i>		КРС		>32	>32	0.5
118	E	Н.р.		КРС				
122	E	<i>K.pneumoniae</i>		КРС		16	32	0.5
124	E	<i>P.aeruginosa</i>		VIM		>32	>32	0.5
124	E	<i>K.pneumoniae</i>		КРС		>32	>32	0.5

*ПЦР М/о – полимеразная реакция чистой культуры полученной путём высева образца на селективную среду, содержащую карбапенемный антибиотик.

** IMI – Имипенем, MEM – меропенем, PN – полимиксин В.

*** Н.р. – нет роста

Гены карбапенемаз были обнаружены в 43 образцах, что составило 30,7% от общего числа полученных образцов. В двух образцах были одновременно выделены два карбапенемазо-продуцирующих микроорганизма – номера образцов 64 и 124. В образце №64 были выделены *K. pneumoniae* (ОХА-48-тип) и *A. baumannii* (ОХА-40-тип). В образце №124 были выделены *P. aeruginosa* (VIM-тип) и *K. pneumoniae* (КРС-тип). В двух образцах, гены карбапенемаз (КРС-типа) были обнаружены только в исходной суспензии, при посеве микроорганизмы, продуцирующие данные ферменты не были обнаружены. Все микроорганизмы кроме №92 демонстрировали устойчивость к карбапенемным антибиотикам (меропенему и имипенему). Несколько изолятов демонстрируют устойчивость к полимиксину В: 2 изолята *K. pneumoniae*, продуцирующих ген *bla_{NDM-1}*, а также два изолята *A. baumannii* продуцирующих ОХА-40. Из пяти стационаров, предоставивших материал, только в одном не были обнаружены продуценты карбапенемаз.

3.4 Детальный молекулярный и фенотипический анализ первого изолята-продуцента карбапенемазы КРС-2 выделенного в России

В 2012 году, в Санкт-Петербурге, от пациентки с онкологическим заболеванием и воспалением почек, с поездкой во Вьетнам в анамнезе, был выделен изолят *Klebsiella pneumoniae*. Данный изолят демонстрировал устойчивость фактически ко всем антибиотикам. С помощью сервиса ResFinder-2.1 на основе данных полногеномного (shot gun) секвенирования выделенного изолята, был проведён анализ его резистоста. Фенотип и данные анализа полногеномного секвенирования представленный в таблице 10.

Таблица 10. Фенотип и резистом изолята КР 565.

Антибиотик	МИК мг/л)	Детерминанты устойчивости
Ампициллин	512	<i>bla</i> _{TEM-1} (570/861 99,82%)
Цефотаксим	>256	<i>bla</i> _{SHV-11} (99,88%)
Цефоперазон-сульбактам	>128	<i>bla</i> _{CTX-M-15} (100%)
Цефтазидим	>128	
Цефтазидим/клавуланат	>128	
Цефепим	>128	
Цефепим/клавуланат	>128	
Азтреонам	>64	
Эртапенем	>64	<i>bla</i> _{КРС-2} (100%)
Имипенем	>64	
Меропенем	64	
Дорипенем	>16	
Биапенем	64	
Гентамицин	128	<i>strA</i> (100%)
Амикацин	1	<i>aac</i> (3)-IIa (99,7%) <i>aac</i> (6')Ib-cr (100%) <i>strB</i> (100%)
Фосфомицин	128	<i>fosA</i> (413/420 98,79%)
Ципрофлоксацин	>256	<i>oqxA</i> (99,49%) <i>QnrS1</i> (100%) <i>oqxB</i> (1715/2450 99,07%) <i>aac</i> (6')Ib-cr (100%)
Ко-тримоксазол	>32	<i>dfrA14</i> (99,59%) <i>sul2</i> (100%)
Хлорамфеникол	256	<i>catB3</i> (442/633 100%)
Макролид-Линкозамид- СтрептограминВ	nd*	<i>mph(A)</i> (100%)
Тетрациклин	nd	<i>tet(A)</i> (100%)

* nd – нет данных

Сопоставление выявленных генов приобретённой устойчивости и фенотипа данного изолята, демонстрирует способность нозокомиальных изолятов накапливать детерминанты резистентности к различным классам антибиотиков, при чём данная тенденция, наблюдается независимо от клональной принадлежности изучаемого изолята, что подтверждает актуальность проблемы раннего выявления продуцентов карбапенемаз, как бактерий, преодолевающих последнюю линию антимикробной обороны.

Анализ сиквенс-типа выявил ST273, для которого ранее наличие гена *bla*_{KPC-2} не было описано в литературе. Данный сиквенс-тип относится к клональному комплексу 147 (CC147), не связанному с глобально распространённой клональной группой CG258, на которую приходится более 80% случаев выявления генов *bla*_{KPC}-типа. Клональная структура популяции *Klebsiella pneumoniae* представлена на Рис. 7. Схема клонального комплекса CC 147 представлена на рисунке 8. По литературным данным, представители данного комплекса не связаны со вспышками выявления генов *bla*_{KPC}-типа.

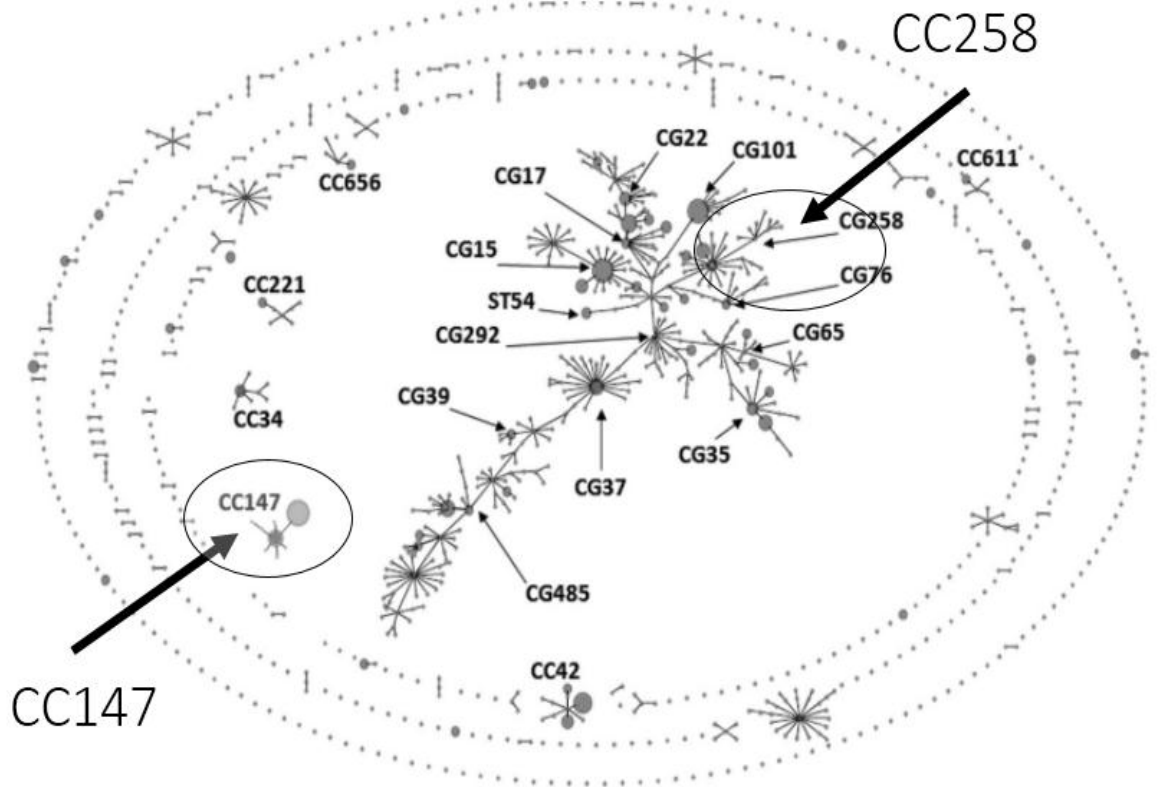


Рис. 7. Клональная структура популяции *Klebsiella pneumoniae* построенная на основе базы MLST (<http://www.pasteur.fr/mlst>). Данная схема построена с помощью алгоритма eBurst. Иллюстрация взята из статьи (Baraniak et al. 2013) с дополнениями.

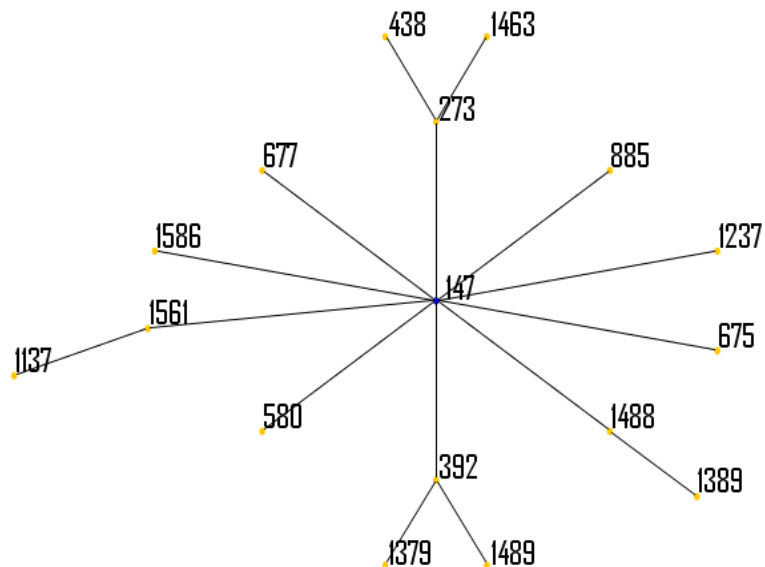


Рис.8 Структура клонального комплекса 147 (CC147). Схема построена с помощью алгоритма eBurst на основе базы данных института Пастера (Франция) <http://www.pasteur.fr/mlst>.

3.4.1. Исследование мобильного элемента, несущего ген *bla*_{KPC-2}.

Для выявления локализации гена *bla*_{KPC-2}, были поставлены эксперименты по электропорации плазмидной ДНК из изолята KP565 в штамм *E. coli* DH5a и трансконъюгации с изолятом KP 565 в качестве донора и *E. coli* C-600 (Az^R Rif^R) в качестве реципиента. В экспериментах по электропорации не удалось получить клетки *E. coli*, способные расти на среде с меропенемом, что, вероятно, связано с большим размером плазмиды. Задача по переносу плазмиды из исходного штамма в *E. coli* была выполнена с помощью трансконъюгации. Был отобран трансконъюгант на селективной среде содержащей 0,5 мг/л меропенема и 300 мг/л азиды натрия. У трансконъюганта была выявлена одна плазида, которая была секвенирована по методике «секвенирования следующего поколения» (Next Generation Sequence). В результате полногеномного секвенирования плазмидной ДНК, было получено 61612 ридов со средней длиной 273 по. Сборка *de novo* была выполнена с помощью программы Newbler *De Novo* Assembler v3.0. Были получены 9 контигов со средним покрытием x117. Контиги были объединены с помощью секвенирования по Сенгеру.

Был выявлен неканонический вариант генетического окружения гена *bla*_{KPC-2}, генетическая карта которого представленный на рисунке 9.

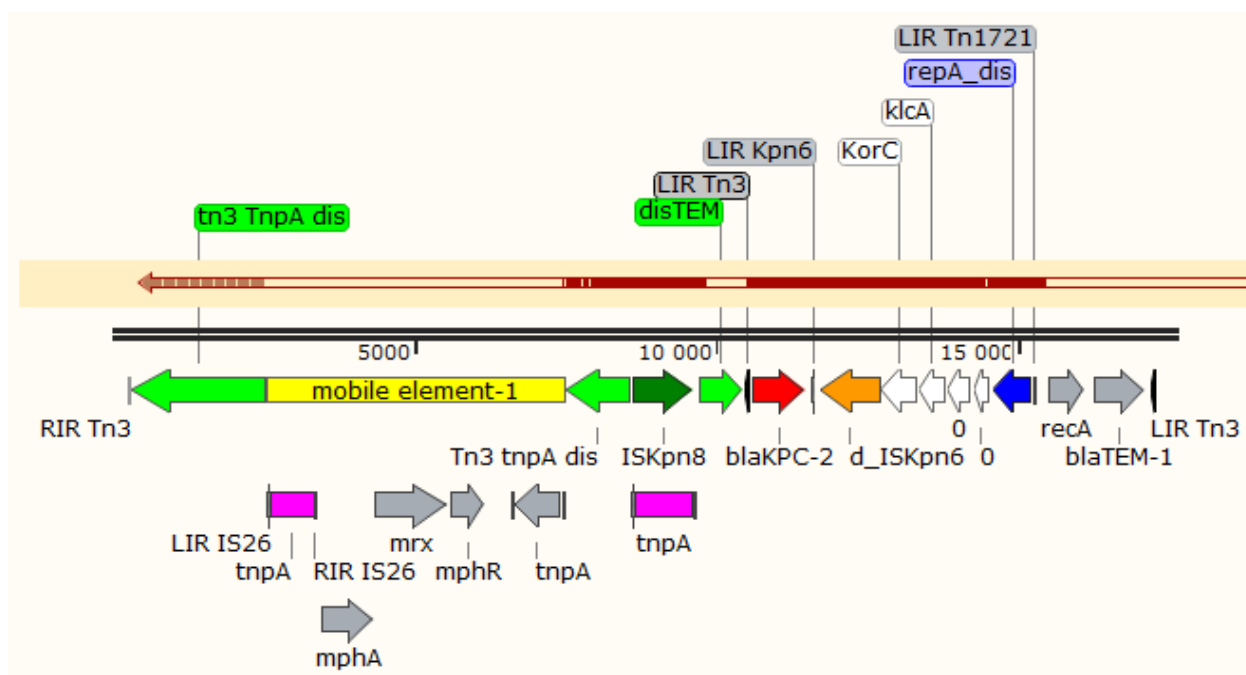


Рис. 9. Карта гипотетического мобильного элемента, несущего ген *bla*_{KPC-2}. Темным выделены области гомологичные варианту генетического окружения, описанные на плазмиде pKP048 (NCBI Reference Sequence: NC_014312.1).

Гипотетический мобильный элемент фланкирован инвертированными повторами Tn3-типа, включает в себя (слева направо) фрагмент гена транспозазы, в которой встроился мобильный элемент несущий гены устойчивости к макролидам (*mphA*, *mrx*, *mphR*), IS- элемент Kpn8, фрагмент гена *bla*_{TEM}, несущий однонуклеотидные замены, не характерные для описанных ранее полных вариантов данного гена. Далее следует фрагмент, включающий ген *bla*_{KPC-2} и транспозазы, представляющие область гомолгичную каноническому варианту генетического окружения, т.е. транспозону Tn4401 и его изоформам. Далее следует фрагмент несущий гены кодирующие ферменты антирестрикции (*KlcA*), фрагмент транспозона Tn1721, после чего следует фрагмент транспозона Tn3 с геном *bla*_{TEM-1}. Данный вариант генетического окружения имеет высокую степень гомологии отдельных участков с вариантом NTEкpc-1a (Chen et al. 2014), представленным на плазмиде pKP048. Сравнение с данным вариантом генетического окружения показало инсерцию мобильного элемента с генами

устойчивости к макролидам (см. выше), инсерцию фрагмента гена *bla*_{TEM}, а также замену фрагмента транспозона Tn1721 на фрагмент транспозона Tn3.

Ранее варианты генетического окружения включающие TEM-KPC комплекс описывались только с помощью секвенирования по Сэнгеру, без полной характеристики мобильного элемента, несущего данный комплекс. Описанные ранее варианты представлены в таблице 11.

Таблица 11.

Описанные варианты генетического окружения включающие TEM-KPC комплекс.

Вид МО	Дата выделения	Страна выделения	ST/Inc-группа	Номер записи в базе ГенБанк
<i>Aeromonas hydrophila</i>	2012	Китай	ND	KC355363.1
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	2012	Сингапур	ST841/non IncFII	KC344543.1 (Koh, Cao et al. 2013)
<i>Escherichia coli</i>	2008	Аргентина	16 изолятов с различными плазмидами	JN048641 (Gomez, Pasteran et al. 2011)
<i>Citrobacter freundii</i>	2008	Аргентина		JN048639.1
<i>Klebsiella oxytoca</i>	2009	Китай	ND	NG_041239.1
<i>Klebsiella pneumoniae N=5</i>	2006-2007	Китай	ND	ND (Shen, Wei et al. 2009)
<i>Klebsiella pneumoniae (TEM-1)</i>	2008	Израиль	ST15/IncN	KJ510411.1 (Chmelnitsky, Shklyar et al. 2013)
<i>Escherichia coli (KPC-3)</i>	До 2010	Китай	ND	NG_036720.1 (Li, Wei et al. 2011)
<i>Klebsiella pneumoniae 565</i>	2012	Россия	ST273/IncFII	KP008371.1

В отличие от канонических вариантов локализации гена *bla*_{KPC-2} на транспозоне Tn4401, обладающим высокой специфичностью для *K. pneumoniae*, относящихся к клональной группе 258 (ST258), выявленные ранее варианты генетического окружения включающие TEM-KPC комплекс не обладают видовой специфичностью, из чего можно сделать предположение что мобильный элемент или элементы несущие данный вариант окружения, обладают высокой мобильностью.

Установлено, что у изолята *K. pneumoniae* 565 (ST273), ген *bla*_{KPC-2} локализован на плазмиде, включающей два участка регуляции плазмид двух групп несовместимости: IncFII и IncR и в составе нового гипотетически мобильного генетического элемента – составного транспозона, фланкированного Tn3 – повторами. Анализ полногеномного сиквенса плазмиды, несущей ген *bla*_{KPC-2} показал её гомологию с семью плазмидами представленными в базе данных ГенБанк (GenBank). Филогенетическое древо представлено на Рис.9.

Анализ последовательности гена *repA*, являющегося систематически значимым при классификации, показал связь данной плазмиды с плазмидами pс15-k; pK1HV; pKF3-94, которые выделены на территории Китая и Вьетнама (Рисунок 10). С учётом того, что пациент, у которого был выделен изолят КР 565, имеет в анамнезе поездку во Вьетнам, возможна эпидемиологическая связь с этим регионом.

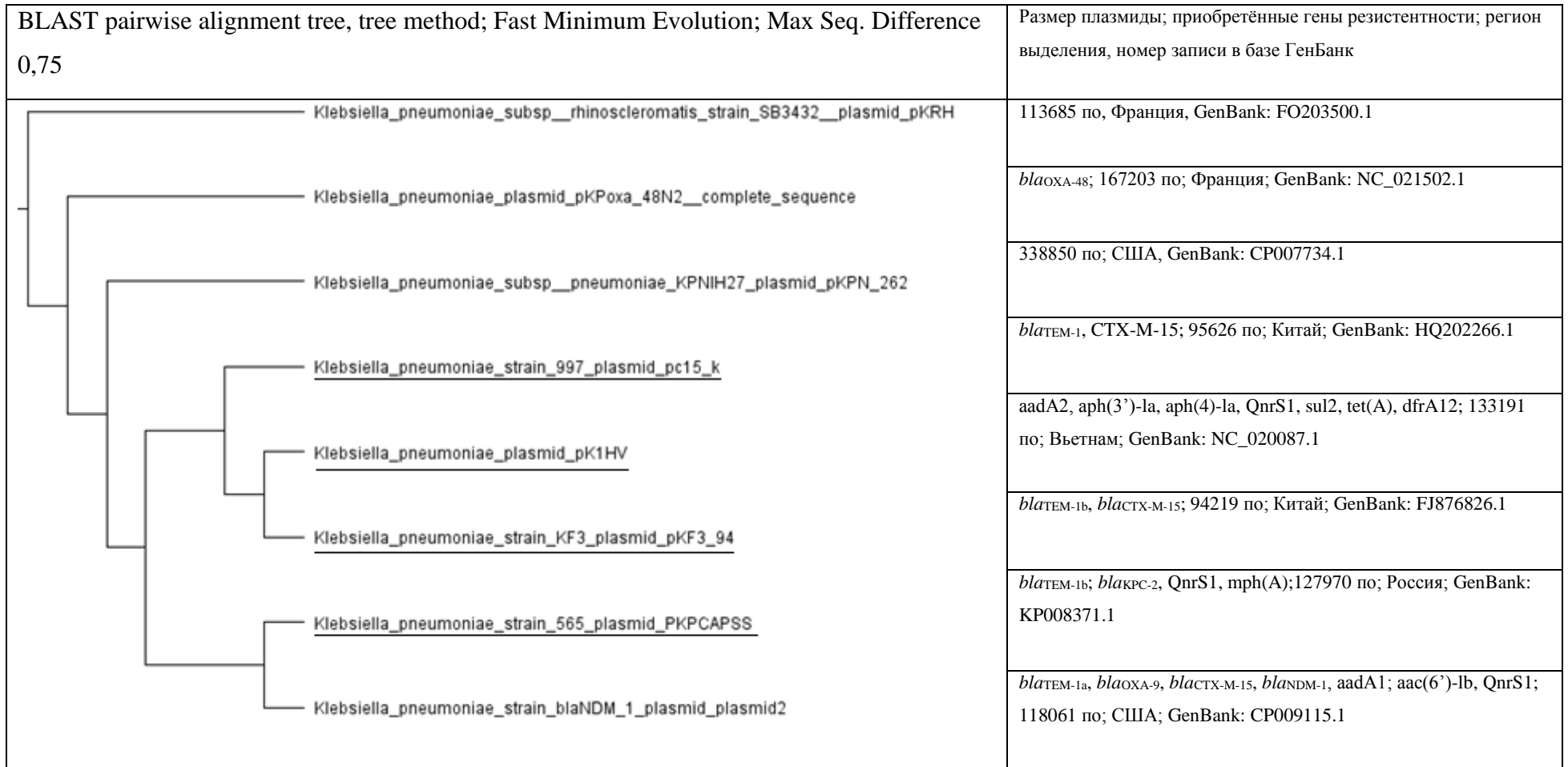


Рисунок 10. Филогенетическое древо плазмид построенное с помощью алгоритма BLAST при сравнении полногеномной последовательности плазмиды рКРАРСС с ближайшими по степени гомологии представленными в базе GeneBank. Приведены общие характеристики плазмид, отображенных на филогенетической схеме. Подчеркнуты наименования плазмид, обладающие 100% гомологией по гену *repA*.

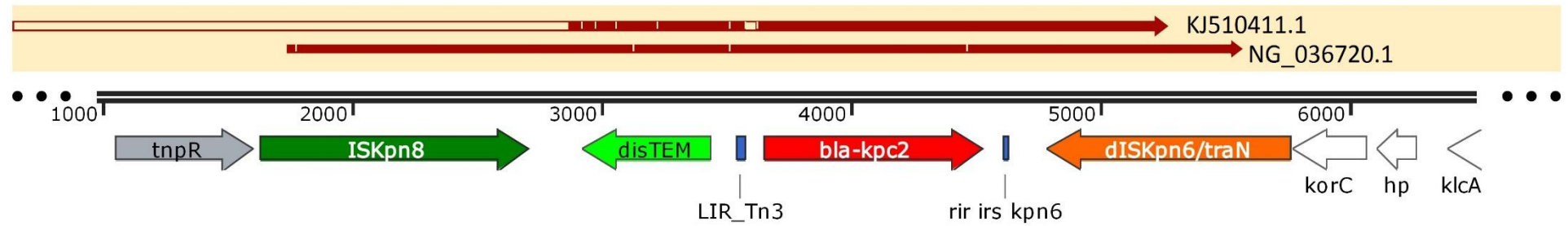


Рисунок 11. Выравнивание последовательности генетического окружения гена *bla*_{KPC-2}, выявленного на плазмиде рКРАРSS (данное исследование), с вариантами описанными в Израиле (KJ510411.1) и Китае (NG_036720.1). Красным выделены области полной гомологии.

3.4.2 Эпидемиология и возможная эволюция мобильных элементов, включающих TEM-КРС-комплекс

Анализ фрагментов представленных в базе ГенБанк (GenBank) показал 100% гомологию последовательности на плазмиде рКРАРSS с фрагментом длиной 3893 п.о., описанную у изолята, выделенного в Сингапуре (GenBank: KC344543.1). Данный фрагмент включает область аналогичную последовательности NG_036720.1, представленную на рисунке 10. Изолят, у которого был выделен данный вариант генетического окружения, относится к ST841, проведенный авторами анализ (Koh et al. 2013) типов несовместимости плазмид не выявил IncFII группу. Так как ST841 не относится к клональному комплексу 147 (CC147), можно сделать предположение, что распространение данного элемента, если исходить из гипотезы о близкой филогении, основанной на отсутствии SNP, происходит через перемещение транспозона между плазмидами *Enterobacteriaceae*. Также в пользу этой гипотезы говорит видовое разнообразие бактерий у которых были выявлены подобные комплексы (табл. 10).

Наиболее специфичным фрагментом, близким к гену *bla*_{КРС-2}, является фрагмент гена *bla*_{ТЕМ}. Именно сочетание этих двух генов можно назвать маркером данного варианта окружения, но, на сегодняшний день, недостаточно информации для детального анализа генетического окружения других изолятов, включающих данную комбинацию генов. Последовательность фрагмента гена *bla*_{ТЕМ} включает специфичные SNP, накопление которых может быть связано с отсутствием отбора работоспособных генов. Вероятно, аналогичным образом, происходит накопление SNP в фрагментах гена транспозазы, в который встроился мобильный элемент с генами устойчивости к макролидам. Характеристика описанных последовательностей гена *bla*_{ТЕМ} представлена в таблице 12.

Таблица 12.

Характеристика известных фрагментов гена *bla*_{ТЕМ} в ТЕМ-КРС комплексе в сравнении с референсной последовательностью гена *bla*_{ТЕМ-1}.

Вариант окружения	Размер делеции	Позиция замены (относительно ТЕМ-1)
<i>bla</i> _{ТЕМ-1}	-	-
<i>K.pneumoniae</i> Израиль	-	339 (Т-А) 344 (Т-А)
<i>E.coli</i> Аргентина	291 bp	396 (Т-G) 643 (G-A)
<i>C. freundii</i> Аргентина	291 bp	396 (Т-G) 643 (G-A)
<i>A. hydrophila</i> Китай	291 bp	396 (Т-G) 643 (G-A)
<i>K.pneumoniae</i> Сингапур	342 bp	396 (Т-G) 643 (G-A)
<i>K. oxytoca</i> Китай	342 bp	396 (Т-G) 643 (G-A)
pKPCAPSS	342 bp	396 (Т-G) 643 (G-A)
<i>E.coli</i> Китай <i>bla</i> _{КРС-3}	342 bp	396 (Т-G) 549 (G-A) 643 (G-A)

Анализ фрагмента гена *bla*_{ТЕМ} показал три варианта. 1. Делеция 291 п.о. по сравнению с референсной последовательностью *bla*_{ТЕМ-1} и две однонуклеотидные замены: 396 (Т-G) 643 (G-A), делеция 342 п.о. с аналогичными заменами и вариант с делецией 342 п.о., но с дополнительной, третьей заменой, в позиции 549 (G-A). Исходя из этих данных, мы можем выдвинуть две гипотезы:

1. В результате генетических событий ТЕМ-КРС комплекс появился независимо, в результате транспозиций по Tn3-повторам (классический Tn-3 транспозон включает ген *bla*_{ТЕМ-1}), которые характерны для Tn4401.
2. Мы наблюдаем микроэволюцию минорного варианта мобильного элемента, сформировавшегося однократно.

В пользу второй гипотезы говорят общие для всех секвенированных вариантов фрагмента гена ТЕМ специфичные SNP. В этом случае, появление данного варианта генетического окружения, на сегодняшний день, можно связать с территорией Израиля, где в ТЕМ-КРС комплексе представлена последовательность гена ТЕМ без делеции (табл.10). А наиболее эволюционно отдалённым вариантом, можно назвать вариант выделенный в Китае, включающий ген *bla*_{КРС-3}. Выравнивание генетического окружения

последовательности с плазмиды рКРАРSS, а также перечисленными двумя вариантами представлен на рисунке 10.

Присутствие в комплексе TEM-КРС-3 аналогичных SNP комплексу TEM-КРС-2 говорит либо о наличии у фрагмента гена TEM неизвестной функции, которая определяет консервативность замен в независимо сформировавшихся TEM-КРС комплексах, либо об общих закономерностях, которые приводят к независимому формированию такой конструкции. Во всех перечисленных вариантах гена *bla*_{TEM} (табл. 10), фрагмент начинается с последовательности «ATG», что допускает процесс существования продукта и может означать наличие у данного гена неизвестной функции, которая определяет консервативность замен.

ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ ИССЛЕДОВАНИЯ

Эпоха применения антибиотиков принесла человечеству, с одной стороны, «большую победу» над бактериальными инфекциями, а с другой сыграла существенную роль в эволюции и формировании новых популяций микроорганизмов. На примере представителей семейства *Enterobacteriaceae* и, в частности, *K. pneumoniae*, можно проследить эволюцию антибиотикорезистентности. Под действием селективного действия антибиотиков, предположительно из свободноживущих бактерий, ферменты карбапенемаз хромосомной локализации попали в популяцию микробиоты человека уже на интегронах и транспозонах, что обеспечило им быстрое распространение.

Массовое распространение карбапенемаз по всему миру, в первую очередь, среди энтеробактерий, привело к разработке арсенала методов для рутинного выявления карбапенемазной активности, фенотипического типирования карбапенемаз, а также молекулярной диагностики. Высокая специфичность и чувствительность вместе с высокой скоростью выполнения анализов современных методов позволяет не только выявлять опасные патогены, но и вести борьбу с их распространением. Эпидемиология карбапенемаз в России становится важным объектом исследований, особенно в Санкт-Петербурге и Москве, а также является большой проблемой здравоохранения.

4.1 Сравнение внедрённых в практику методов детекции карбапенемаз с аналогами

Первая публикация, посвященная вариантам методик детекции карбапенемазной активности с помощью масс-спектрометрии, вышла в 2011 году (Hrabak et al. 2011), после чего последовал целый ряд предложенных модификаций (Burckhardt and Zimmermann 2011, Birgy et al. 2012, Sparbier et al. 2012). Каждая из предложенных методик достойна внедрения в практику,

но, тем не менее, внедрение собственного протокола, основанного на анализе более ранних работ позволило существенно упростить как пробоподготовку, так и сам процесс учёта результатов. К существенным упрощениям можно отнести использование матрицы НССА, которая применяется в рутинной идентификации видов бактерий бактериологическими лабораториями вместо ДНА, что снимает необходимость дополнительных закупок реактивов. Использование стандартного протокола, используемого при идентификации микроорганизмов, позволяет пользователям работать с данной методикой не вдаваясь в подробности специфики различных характеристик настроек прибора. Также, важным элементом является использование лекарственной формы меропенема, а не чистой субстанции, что делает данный протокол экономически более эффективным по сравнению с аналогами. Перечисленные качества позволяют провести внедрение данного метода по предложенному протоколу в лаборатории, где уже используется MALDI-TOF масс-спектрометр для рутинной видовой идентификации. При вышеперечисленных достоинствах сохраняются показатели чувствительности и специфичности выше чем у модифицированного теста Ходжа. К сожалению, адекватно сравнить чувствительность и специфичность предложенного протокола с его аналогами не представляется возможным, но порядок этих значений ожидается аналогичный.

В данной работе использовались три варианта детекции генов карбапенемаз с помощью ПЦР:

Мультиплексная ПЦР с электрофоретической детекцией генов *bla*_{NDM}, *bla*_{OXA-48} и *bla*_{KPC} – типов, праймеры подобраны самостоятельно. Данный вариант представляется наиболее экономичным, он позволяет выявлять гены основных карбапенемаз, распространенных в регионе Санкт-Петербурга

Мультиплексная ПЦР в реальном времени для детекции генов KPC-, OXA-48-, IMP-, NDM-, VIM-типов (готовые наборы производства ООО «Интерлабсервис»). Наличие поставляемых в комплекте контролей даёт возможность не хранить контрольные культуры, а также уменьшает влияние

«человеческого фактора». Тем не менее, мишени в подобных наборах сформированы по схеме соответствующей систематике карбапенемаз, что является плюсом при сочетании данной методики с методикой дифференцировки карбапенемаз с помощью ингибиторов, но вынуждает использовать два набора для изучения одной пробы, так как, например, гены наиболее распространенных карбапенемаз *bla*_{KPC}-типа и *bla*_{NDM}-типа не могут быть выявлены в одной мультиплексной реакции из-за компоновки наборов

Традиционная ПР с электрофоретической детекцией генов с использованием праймеров из статьи (Poirel et al. 2011). Данный вариант позволяет выявлять максимальное количество генов карбапенемаз, включая редкие, в том числе не описанные на сегодняшний день на территории России и не входящие в число мишеней готовых ПЦР-наборов отечественного производства.

Все перечисленные подходы являются вполне адекватными, но обладающими плюсами и минусами. По мнению автора, в арсенале лаборатории включившей в свою практику выявление и идентификацию генов карбапенемаз у энтеробактерий уместны все три варианта ПЦР.

Вполне очевидно, что на практике возможно использовать последовательное применение серии методов.

И, наконец, предложенная в данной работе мультиплексная ПЦР позволяет, на сегодняшний день, с учётом известного состава карбапенемаз энтеробактерий в Санкт-Петербурге, провести анализ с помощью одной реакции. Такой подход, по мнению автора, наиболее экономически привлекателен и не требует существенных временных затрат, но, безусловно, следует ожидать увеличения разнообразия карбапенемаз и иметь в запасе готовые ПЦР системы на все возможные мишени.

4.2 Особенности эпидемиологии карбапенемаз в Санкт-Петербурге

Проблема карбапенемаз и эпидемиология отдельных генов карбапенемаз является специфичной для каждого региона. Данных по ситуации в России

достаточно мало, тут уместно привести результаты исследования «Антибиотикорезистентность нозокомиальных штаммов *Enterobacteriaceae* в стационарах России: результаты многоцентрового эпидемиологического исследования МАРАФОН в 2011–2012 гг. (М.В. Сухорукова и др. 2012) исследовательская группа «МАРАФОН» НИИ антимикробной химиотерапии ГБОУ ВПО СГМА Минздрава России, Смоленск, Россия». В данном исследовании была собрана и проанализирована коллекция нозокомиальных изолятов *Enterobacteriaceae* из 25 стационаров 18 городов России – Воронежа, Екатеринбурга, Ижевска, Казани, Кирова, Москвы, Мурманска, Нижнего Новгорода, Новокузнецка, Новосибирска, Омска, Санкт-Петербурга, Смоленска, Томска, Тюмени, Челябинска, Якутска и Ярославля. Изоляты анализировались в период 2011 – 2012 годов. Динамика роста устойчивости к карбапенемам представлена на рисунке 12.



Рисунок 12. Динамика устойчивости* к карбапенемам и продукция карбапенемаз у нозокомиальных штаммов энтеробактерий в РФ по данным многоцентровых исследований НИИАХ/МАКМАХ.

*% нечувствительных (умеренно резистентных и резистентных изолятов) ** НД – нет данных.

Необходимо отметить, что в большинстве случаев увеличение МПК к карбапенемным антибиотикам не связано с продукцией карбапенемаз, тем не менее, в коллекции 2011-2012 года наблюдается резкое увеличение доли резистентных штаммов продуцирующих карбапенемазы. Сравнивая данные полученные в этом исследовании с собственными результатами можно заключить что ситуация в Санкт-Петербурге, в общем, коррелирует с динамикой увеличения доли продуцентов карбапенемаз в России. Тем не менее, типовой состав карбапенемаз отличается. Доминирующим типом карбапенемаз в исследовании «МАРАФОН» является ОХА-48-тип, NDM карбапенемазы представлены единичными случаями, а КРС не были выявлены. В коллекции собранной в Санкт-Петербурге Доля ОХА-48 карбапенемаз существенно меньше доли NDM и КРС, что свидетельствует о различной эпидемиологической ситуации в различных городах России, а также может говорить о формировании отдельных неблагоприятных регионов.

Следует отметить, что для достоверной оценки частоты встречаемости продуцентов карбапенемаз в Санкт-Петербурге, необходимо провести масштабное исследование, включающее, как минимум, четверть стационаров, а также фиксированное число случайно отобранных изолятов из каждого стационара, в противном случае, получить достоверную картину не получится из-за доминирования штаммов-продуцентов из стационаров, где уже зафиксированы внутрибольничные вспышки продуцентов карбапенемаз. Также ситуация за три года могла измениться, например, гены КРС-типа в 2012 году в России ещё не были обнаружены, а в 2014 - 2015 году были зафиксированы уже несколько внутрибольничных вспышек. Проведение масштабного исследования определения частоты продуцентов карбапенемаз в Санкт-Петербурге с повторяемостью в один-два года является прикладной эпидемиологической задачей для оценки динамики распространения карбапенемаз. На основе собственных результатов, можно предположить, что Санкт-Петербург, на сегодняшний день, претендует на

звание города с самой неблагоприятной ситуацией распространения карбапенемаз в России.

Из нашего исследования следует, что для Санкт-Петербурга наиболее актуальными генами карбапенемаз являются NDM-, KPC- и OXA-48- типы, т.е. гены, имеющие наибольшее значение как в Европе, так и других регионах мира (Gupta et al. 2011). Одной из причин формирования неблагоприятной ситуации стали пропущенные первые случаи импорта карбапенемаз на территорию Санкт-Петербурга и отсутствие обозначенной проблемы в медицинском сообществе. Необходимо внедрение методов детекции карбапенемаз в практику бактериологических лабораторий, а также вести контроль за выполнением мер по борьбе с уже выявленными внутрибольничными вспышками.

4.3 Носительство карбапенемаз и его роль в их распространении

Бессимптомное носительство продуцентов карбапенемаз было выявлено в стационарах, где ранее уже были зафиксированы штаммы-продуценты карбапенемаз явившиеся возбудителями инфекций. Существенная доля выявленных *A. baumannii* заслуживает дополнительного исследования. Продуценты семейства *Enterobacteriaceae* были выявлены в 7,3% от общего количества образцов. В данном случае, эти данные доказывают необходимость введения в практику выявления носителей карбапенемаз. Если обратиться в опыту Великобритании, то данный вопрос уже имеет варианты решения и проработанную стратегию принятия мер, но с большим трудом экстраполируется на отечественную практику. Кратко можно перечислить основные меры по выявлению носителей карбапенемаз:

1. Анализ на носительство продуцентов карбапенемаз при поступлении пациента с историей госпитализации в других странах, контакта с другими носителями или госпитализацией в стационарах, где была зафиксирована внутрибольничная вспышка.

2. Госпитализация таких пациентов в отдельных палатах с отдельными ванными комнатами и соблюдение всех правил личной гигиены.

По нашим данным, фиксируемые вспышки продуцентов карбапенемаз в стационарах также сопровождаются и бессимптомным носительством, что абсолютно коррелирует с литературными данными (Gupta et al. 2011). Выявление бессимптомного носительства продуцентов карбапенемаз является ключевым звеном в борьбе с их распространением.

4.4 Новый вариант генетического окружения гена *bla*_{KPC-2}

Передача плазмид между различными штаммами является важным механизмом, определяющим распространение детерминант резистентности. Эпидемиологии плазмид незаслуженно уделяется мало внимания, что объясняется, вероятно, относительной сложностью подходов для их изучения. На сегодняшний день, в базе данных «ГенБанк», представлены 33 полностью отсеквенированных плазмиды несущих гены *bla*_{KPC}-типа, включая плазмиду, представленную в данном исследовании (GenBank: KP008371.1). Большинство плазмид относятся к IncFI и IncFII – группам несовместимости, т.е. являются способными к конъюгации. Из 33 записей, 25 включают окружение гена *bla*_{KPC} соответствующее изоформам транспозона Tn4401, 8 включают варианты неканонического окружения. Плазида, отсеквенированная в данном исследовании, является, на текущий момент, единственной несущей вариант генетического окружения, включающего TEM-KPC – комплекс. Безусловно, наибольший научный интерес представляет перспектива отсеквенировать другие плазмиды, несущие TEM-KPC-комплект, которые были выявлены с помощью секвенирования по Сэнгеру, но, на сегодняшний день, представлены маленькой областью покрытия (от 1000 до 9000 п.о.) (Gomez et al. 2011, Chen et al. 2014, Chmelnitsky et al. 2014), не отражающей структуру мобильного элемента, а также данные о самой плазмиде.

Суммирование найденной информации о случаях выявления вариантов TEM-KPC-комплекса говорит о, вероятно, начале нового витка распространения гена карбапенемаз KPC-типа. Данный пример отражает способностью тех или иных генов не только менять локализацию с хромосомной на «плазмидную», но и менять структуру мобильного элемента на более подвижный и более эффективно обеспечивающий распространение генов резистентности.

Заключение

Продуценты карбапенемаз являются важнейшими возбудителями внутрибольничных, и, в последнее время, внебольничных инфекций. В последние годы наблюдается тенденция к их быстрому распространению. В России циркуляции продуцентов карбапенемаз уделяется недостаточное внимание. В этой связи, очень важным является проведение мониторинга как уровня антибиотикорезистентности, так и клональной принадлежности отдельных продуцентов карбапенемаз. На сегодняшний день сложно оценить динамику изменения частоты продуцентов карбапенемаз в связи с ограниченной выборкой и коротким промежутком времени изучения данной проблемы. Можно предположить, что наименее благоприятная ситуация складывается в Санкт-Петербурге, так как именно в Санкт-Петербурге, впервые в России, были обнаружены продуценты KPC и NDM – типов, в том числе в масштабах внутрибольничных вспышек.

Анализируя молекулярную эпидемиологию продуцентов карбапенемаз, можно сделать вывод, что для разных типов генов карбапенемаз, мы наблюдаем разный эпидемиологический путь распространения. Если для продуцентов генов *bla_{NDM-1}* мы предполагаем единичные случаи импорта с последующим распространением единой генетической линии по нескольким стационарам Санкт-Петербурга, то для продуцентов генов KPC-типа ситуация наблюдается обратная, что, вероятнее всего, свидетельствует о многократных случаях импорта, в том числе, удалось показать возможную связь плазмиды несущей *bla_{KPC-2}* (*K. pneumoniae* ST273) с регионом Китая и Вьетнама. В других случаях, были зафиксированы внутрибольничные вспышки, вызванные представителями одной генетической линии.

Описанный в данном исследовании гипотетический мобильный элемент, несущий ген *bla_{KPC-2}*, представляет как фундаментальный интерес, с точки зрения эволюции мобильных генетических элементов, так и его

эпидемиология является вопросом имеющим прикладное значение в связи с выявленными особенностями его распространения, выражающимися в отсутствии видового предпочтения внутри семейства энтеробактерий. Выявление новых мобильных элементов, являющихся на сегодняшний день минорными, но, тем не менее, выявляемыми в разных странах позволяет при их детальном анализе получить данные о их микроэволюции, а также даёт шанс выявить закономерности определяющие распространение общественно-значимых детерминант резистентности.

Таким образом, проведённые генотипические исследования позволили выявить связь Российских изолятов-продуцентов карбапенемаз с другими генетическими линиями, циркулирующими на земной шаре. Заложены основы для наблюдения за распространением и микроэволюцией продуцентов карбапенемаз на территории России.

Выводы

1. Обнаружены представители *K. pneumoniae*, продуцирующие карбапенемазы, которые относятся к следующим генетическим линиям: NDM-тип у генетических линий *K. pneumoniae* ST340, ST147 и ST101; KPC-тип - у ST258, ST11 и ST273; OXA-48-тип - у ST147 и ST395.
2. Установлен факт бессимптомного носительства пациентами отделений реанимации и интенсивной терапии продуцентов карбапенемаз.
3. Разработан оптимизированный алгоритм выявления продуцентов карбапенемаз, включающий фенотипическую детекцию карбапенемазной активности с помощью масс-спектрометрии, а также молекулярную детекцию генов карбапенемаз с помощью ПЦР.
4. Описан новый гипотетический мобильный элемент несущий ген *bla*_{KPC-2}, фланкированный повторами Tn3-типа и включающий помимо гена карбапенемазы два гена *bla*_{TEM}-типа и ген макролид-2-фосфотрансферазы.

1. Практические рекомендации

При анализе результатов оценки антибиотикочувствительности грамотрицательных бактерий – возбудителей госпитальных и внебольничных инфекций необходимо выявлять изоляты, подозрительные на продукцию карбапенемаз.

К подозрительным следует относить изоляты в отношении которых МПК (или диаметр зоны задержки роста, при использовании диско-диффузионного метода), хотя бы одного карбапенемного антибиотика превосходит значение «эпидемиологической точки отсечения», рекомендуемых EUCAST.

Для верификации продукции подозрительными изолятами карбапенемаз и наличия у них соответствующих генов следует использовать фенотипические методы (тест Ходжа, масс-спектрометрию) и молекулярные тесты (традиционную ПЦР или ПЦР в реальном времени).

Для оценки эпидемиологической ситуации и обоснования мероприятий по сдерживанию распространения антибиотикорезистентности в медицинских учреждениях среди пациентов следует проводить скрининг на бессимптомное носительство продуцентов карбапенемаз.

Список сокращений

ESBL – extended spectrum b-lactamase

CPE – carbapenem-producing enterobacteria

ST – sequence type

MLST- multi locus sequence typing

MBL – metallo-b-lactamase

EDTA - Ethylenediaminetetraacetic acid

CG – clonal group

CC – clonal complex

BLAST – basic local alignment tool

SNP – small nucleotide polymorphism

SLV – single locus variant

DLV – double locus variant

mg/ml – мили грамм на миллилитр

CLSI - Clinical laboratory standards institute

EUCAST - The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing

ECDC - European Centre for Disease Prevention and Control

ТАЕ - Трис-ацетатный буфер

АМР – ампициллин

СТХ – цефотаксим

CSL - цефоперазон-сульбактам

CAZ - цефтазидим

CAZ/CC - цефтазидим-клавуланат

FER - цефепим

FER/CC - цефепим-клавуланат

ATM – азтреонам

ERT - эртопенем

IMI – имипенем

MER – меропенем

DOR – дорипенем

BIA – биапенем

GEN - гентамицин

AMK – амикацин

TYG – тигециклин

POL – полимиксин

FOS фосфомицин

CIP – ципрофлоксацин

SXT - триметоприм-сульфаметаксозол

CHL – хлорамфеникол

ПСБ – пенициллин-связывающий белок

МПК – минимальная подавляющая концентрация

ЭДТУ - Этилендиаминтетрауксусная кислота

Мг/л – мили грамм на литр

ПЦР – полимеразная цепная реакция

ДНК - дезоксирибонуклеиновая кислота

Благодарности

Автор выражает благодарность за руководство, всестороннюю поддержку и бесценные советы на всех этапах выполнения работы научному руководителю доктору медицинских наук, профессору Сергей Владимировичу Сидоренко («ФГБУ НИИДИ ФМБА России», Санкт-Петербург). Автор также выражает благодарность всем сотрудникам медицинских учреждений и институтов, с которыми было сотрудничество в рамках темы диссертационной работы, за предоставленные изоляты микроорганизмов. Автор выражает благодарность к.б.н. Соповой Юлии Викторовне (ФГБУ «Санкт-Петербургский Государственный Университет») доктору биологических наук Елене Николаевне Ильиной (ФГБУ «НИИ ФХМ ФМБА России», Москва), за помощь в проведении отдельных этапов диссертационной работы.

Список использованной литературы

1. Агеевец В.А., Партина И.В., Лисицина Е.С., Батыршин И.М., Попенко Л. В., Шляпников С. А., Ильина Е. Н., Сидоренко С. В. Чувствительность грамотрицательных бактерий, продуцентов карбапенемаз, к антибиотикам различных групп // Антибиотики и химиотерапия. — 2013. — Т. 58, № 3-4. — С. 10-13.
2. 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. — Т. 307, №14. - С 9-16.
3. Черкашин Е.А., Федорчук В.В., Иванов Д.В., Сидоренко С.В., В.И. Т. Исследование распространения металло-бета-лактамаз в Российской Федерации // Вестник Московского университета. Серия 2: Химия. — 2006. — Т. 47, № 2. — С. 83-86.
4. Abraham E. P. An Enzyme from Bacteria able to Destroy Penicillin // Nature. — 1940. — V. 28, P. 837.
5. Ageevets V. A., Partina I. V., Lisitsyna E. S., Ilina E. N., Lobzin Y. V., Shlyapnikov S. A., Sidorenko S. V. Emergence of carbapenemase-producing Gram-negative bacteria in Saint Petersburg, Russia // Int J Antimicrob Agents. — 2014. — V. 44, № 2. — P. 152-155.
6. Andrade L. N., Curiao T., Ferreira J. C., Longo J. M., Climaco E. C., Martinez R., Bellissimo-Rodrigues F., Basile-Filho A., Evaristo M. A., Del Peloso P. F., Ribeiro V. B., Barth A. L., Paula M. C., Baquero F., Canton R., Darini A. L., Coque T. M. Dissemination of blaKPC-2 by the spread of *Klebsiella pneumoniae* clonal complex 258 clones (ST258, ST11, ST437) and plasmids (IncFII, IncN, IncL/M) among Enterobacteriaceae species in Brazil // Antimicrob Agents Chemother. — 2011. — V. 55, № 7. — P. 3579-3583.

7. Arakawa Y., Murakami M., Suzuki K., Ito H., Wacharotayankun R., Ohsuka S., Kato N., Ohta M. A novel integron-like element carrying the metallo-beta-lactamase gene blaIMP // *Antimicrob Agents Chemother.* — 1995. — V. 39, № 7. — P. 1612-1615.
8. Arnold R. S., Thom K. A., Sharma S., Phillips M., Kristie Johnson J., Morgan D. J. Emergence of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing bacteria // *South Med J.* — 2011. — V. 104, № 1. — P. 40-45.
9. Aubert D., Naas T., Heritier C., Poirel L., Nordmann P. Functional characterization of IS1999, an IS4 family element involved in mobilization and expression of beta-lactam resistance genes // *J Bacteriol.* — 2006. — V. 188, № 18. — P. 6506-6514.
10. Aubert D., Poirel L., Chevalier J., Leotard S., Pages J. M., Nordmann P. Oxacillinase-mediated resistance to cefepime and susceptibility to ceftazidime in *Pseudomonas aeruginosa* // *Antimicrob Agents Chemother.* — 2001. — V. 45, № 6. — P. 1615-1620.
11. Baraniak A., Izdebski R., Fiett J., Sadowy E., Adler A., Kazma M., Salomon J., Lawrence C., Rossini A., Salvia A., Vidal Samsó J., Fierro J., Paul M., Lerman Y., Malhotra-Kumar S., Lammens C., Goossens H., Hryniewicz W., Brun-Buisson C., Carmeli Y., Gniadkowski M., Mosar W. P., Groups W. P. S. Comparative population analysis of *Klebsiella pneumoniae* strains with extended-spectrum beta-lactamases colonizing patients in rehabilitation centers in four countries // *Antimicrob Agents Chemother.* — 2013. — V. 57, № 4. — P. 1992-1997.
12. Baraniak A., Izdebski R., Herda M., Fiett J., Hryniewicz W., Gniadkowski M., Kern-Zdanowicz I., Filczak K., Lopaciuk U. Emergence of *Klebsiella pneumoniae* ST258 with KPC-2 in Poland // *Antimicrob Agents Chemother.* — 2009. — V. 53, № 10. — P. 4565-4567.
13. Barantsevich E. P., Churkina I. V., Barantsevich N. E., Pelkonen J., Schlyakhto E. V., Woodford N. Emergence of *Klebsiella pneumoniae*

- producing NDM-1 carbapenemase in Saint Petersburg, Russia // *J Antimicrob Chemother.* — 2013. — V. 68, № 5. — P. 1204-1206.
14. Barber M., Rozwadowska-Dowzenko M. Infection by penicillin-resistant staphylococci // *Lancet.* — 1948. — V. 2, № 6530. — P. 641-644.
 15. Baumgartner J. D., Glauser M. P. Comparative imipenem treatment of *Staphylococcus aureus* endocarditis in the rat // *J Antimicrob Chemother.* — 1983. — V. 12 Suppl D. — P. 79-87.
 16. Bayles K. W. The bactericidal action of penicillin: new clues to an unsolved mystery // *Trends Microbiol.* — 2000. — V. 8, № 6. — P. 274-278.
 17. Bellais S., Aubert D., Naas T., Nordmann P. Molecular and biochemical heterogeneity of class B carbapenem-hydrolyzing beta-lactamases in *Chryseobacterium meningosepticum* // *Antimicrob Agents Chemother.* — 2000. — V. 44, № 7. — P. 1878-1886.
 18. Ben-David D., Kordevani R., Keller N., Tal I., Marzel A., Gal-Mor O., Maor Y., Rahav G. Outcome of carbapenem resistant *Klebsiella pneumoniae* bloodstream infections // *Clin Microbiol Infect.* — 2012. V. 18, № 1. — P. 54-60.
 19. Bernabeu S., Poirel L., Nordmann P. Spectrophotometry-based detection of carbapenemase producers among Enterobacteriaceae // *Diagn Microbiol Infect Dis.* — 2012. — V. 74, № 1. — P. 88-90.
 20. Birgy A., Bidet P., Genel N., Doit C., Decre D., Arlet G., Bingen E. Phenotypic screening of carbapenemases and associated beta-lactamases in carbapenem-resistant Enterobacteriaceae // *J Clin Microbiol.* — 2012. — V. 50, № 4. — P. 1295-1302.
 21. Bonnet R. Growing group of extended-spectrum beta-lactamases: the CTX-M enzymes // *Antimicrob Agents Chemother.* — 2004. — V. 48, № 1. — P. 1-14.

22. Bradford P. A. Extended-spectrum beta-lactamases in the 21st century: characterization, epidemiology, and detection of this important resistance threat // *Clin Microbiol Rev.* — 2001. — V. 14, № 4. — P. 933-951.
23. Bradford P. A., Bratu S., Urban C., Visalli M., Mariano N., Landman D., Rahal J. J., Brooks S., Cebular S., Quale J. Emergence of carbapenem-resistant *Klebsiella* species possessing the class A carbapenem-hydrolyzing KPC-2 and inhibitor-resistant TEM-30 beta-lactamases in New York City // *Clin Infect Dis.* — 2004. — V. 39, № 1. — P. 55-60.
24. Bradford P. A., Urban C., Mariano N., Projan S. J., Rahal J. J., Bush K. Imipenem resistance in *Klebsiella pneumoniae* is associated with the combination of ACT-1, a plasmid-mediated AmpC beta-lactamase, and the loss of an outer membrane protein // *Antimicrob Agents Chemother.* — 1997. — V. 41, № 3. — P. 563-569.
25. Bratu S., Landman D., Haag R., Recco R., Eramo A., Alam M., Quale J. Rapid spread of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* in New York City: a new threat to our antibiotic armamentarium // *Arch Intern Med.* — 2005. — V. 165, № 12. — P. 1430-1435.
26. Bratu S., Mooty M., Nichani S., Landman D., Gullans C., Pettinato B., Karumudi U., Tolaney P., Quale J. Emergence of KPC-possessing *Klebsiella pneumoniae* in Brooklyn, New York: epidemiology and recommendations for detection // *Antimicrob Agents Chemother.* — 2005. — V. 49, № 7. — P. 3018-3020.
27. Bratu S., Tolaney P., Karumudi U., Quale J., Mooty M., Nichani S., Landman D. Carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* in Brooklyn, NY: molecular epidemiology and in vitro activity of polymyxin B and other agents // *J Antimicrob Chemother.* — 2005. — V. 56, № 1. — P. 128-132.
28. Burckhardt I., Zimmermann S. Using matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry to detect carbapenem

- resistance within 1 to 2.5 hours // *J Clin Microbiol.* — 2011. — V. 49, № 9. — P. 3321-3324.
29. Bush K. Beta-lactamase inhibitors from laboratory to clinic // *Clin Microbiol Rev.* — 1988. — V. 1, № 1. — P. 109-23.
 30. Bush K. Characterization of beta-lactamases // *Antimicrob Agents Chemother.* — 1989. V. 33, № 3. — P. 259-263.
 31. Bush K. Proliferation and significance of clinically relevant beta-lactamases // *Ann N Y Acad Sci.* — 2013. — V. 1277. — P. 84-90.
 32. Bush K., Jacoby G. A. Updated functional classification of beta-lactamases // *Antimicrob Agents Chemother.* — 2010. — V. 54, № 3. — P. 969-976.
 33. Bush K., Jacoby G. A., Medeiros A. A. A functional classification scheme for beta-lactamases and its correlation with molecular structure // *Antimicrob Agents Chemother.* — 1995. — V. 39, № 6. — P. 1211-1233.
 34. Bush K., Tanaka S. K., Bonner D. P., Sykes R. B. Resistance caused by decreased penetration of beta-lactam antibiotics into *Enterobacter cloacae* // *Antimicrob Agents Chemother.* — 1985. — V. 27, № 4. — P. 555-60.
 35. Carbonne A., Thiolet J. M., Fournier S., Fortineau N., Kassis-Chikhani N., Boytchev I., Aggoune M., Segquier J. C., Senechal H., Tavolacci M. P., Coignard B., Astagneau P., Jarlier V. Control of a multi-hospital outbreak of KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* type 2 in France, September to October 2009 // *Euro Surveill.* — 2010. — V. 15, № 48.
 36. Carrer A., Poirel L., Yilmaz M., Akan O. A., Feriha C., Cuzon G., Matar G., Honderlick P., Nordmann P. Spread of OXA-48-encoding plasmid in Turkey and beyond // *Antimicrob Agents Chemother.* — 2010. — V. 54, № 3. — P. 1369-1373.
 37. Chambers H. F. Penicillin-binding protein-mediated resistance in pneumococci and staphylococci // *J Infect Dis.* — 1999. — V. 179 Suppl 2. — P. S353-359.

38. Chen L., Chavda K. D., Al Laham N., Melano R. G., Jacobs M. R., Bonomo R. A., Kreiswirth B. N. Complete Nucleotide Sequence of a blaKPC-Harboring IncI2 Plasmid and Its Dissemination in New Jersey and New York Hospitals // *Antimicrob Agents Chemother.* — 2013. — V. 57, № 10. — P. 5019-5025.
39. Chen L., Chavda K. D., Mediavilla J. R., Zhao Y., Fraimow H. S., Jenkins S. G., Levi M. H., Hong T., Rojzman A. D., Ginocchio C. C., Bonomo R. A., Kreiswirth B. N. Multiplex real-time PCR for detection of an epidemic KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* ST258 clone // *Antimicrob Agents Chemother.* — 2012. — V. 56, № 6. — P. 3444-3447.
40. Chen L., Mathema B., Chavda K. D., DeLeo F. R., Bonomo R. A., Kreiswirth B. N. Carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae*: molecular and genetic decoding // *Trends Microbiol.* — 2014. — Oct 7.
41. Chen L., Mathema B., Chavda K. D., DeLeo F. R., Bonomo R. A., Kreiswirth B. N. Carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae*: molecular and genetic decoding // *Trends Microbiol.* — 2014. — V. 22, № 12. — P. 686-696.
42. Chmelnitsky I., Shklyar M., Hermesh O., Navon-Venezia S., Edgar R., Carmeli Y. Unique genes identified in the epidemic extremely drug-resistant KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* sequence type 258 // *J Antimicrob Chemother.* — 2013. — V. 68, № 1. — P. 74-83.
43. Chmelnitsky I., Shklyar M., Leavitt A., Sadovsky E., Navon-Venezia S., Ben Dalak M., Edgar R., Carmeli Y. Mix and match of KPC-2 encoding plasmids in Enterobacteriaceae-comparative genomics // *Diagn Microbiol Infect Dis.* — 2014. — V. 79, № 2. — P. 255-260.
44. Cornaglia G., Riccio M. L., Mazzariol A., Lauretti L., Fontana R., Rossolini G. M. Appearance of IMP-1 metallo-beta-lactamase in Europe // *Lancet.* — 1999. — V. 353, № 9156. — P. 899-900.

45. Cuzon G., Bonnin R. A., Nordmann P. First identification of novel NDM carbapenemase, NDM-7, in *Escherichia coli* in France // *PLoS One*. — 2013. — V. 8, № 4. — P. e61322.
46. Cuzon G., Naas T., Lesenne A., Benhamou M., Nordmann P. Plasmid-mediated carbapenem-hydrolysing OXA-48 beta-lactamase in *Klebsiella pneumoniae* from Tunisia // *Int J Antimicrob Agents*. — 2010. — V. 36, № 1. — P. 91-93.
47. Daiyasu H., Osaka K., Ishino Y., Toh H. Expansion of the zinc metallo-hydrolase family of the beta-lactamase fold // *FEBS Lett*. — 2001. — V. 503, № 1. — P. 1-6.
48. Deschamps C., Clermont O., Hipeaux M. C., Arlet G., Denamur E., Branger C. Multiple acquisitions of CTX-M plasmids in the rare D2 genotype of *Escherichia coli* provide evidence for convergent evolution // *Microbiology*. — 2009. — V. 155, № Pt 5. — P. 1656-1668.
49. Diancourt L., Passet V., Verhoef J., Grimont P. A., Brisse S. Multilocus sequence typing of *Klebsiella pneumoniae* nosocomial isolates // *J Clin Microbiol*. — 2005. — V. 43, № 8. — P. 4178-4182.
50. Diene S. M., Rolain J. M. Carbapenemase genes and genetic platforms in Gram-negative bacilli: *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas* and *Acinetobacter* species // *Clin Microbiol Infect*. — 2014. — V. 20, № 9. — P. 831-838.
51. Dortet L., Poirel L., Nordmann P. Rapid identification of carbapenemase types in *Enterobacteriaceae* and *Pseudomonas* spp. by using a biochemical test // *Antimicrob Agents Chemother*. — 2012. — V. 56, № 12. — P. 6437-6440.
52. Dortet L., Poirel L., Nordmann P. Worldwide dissemination of the NDM-type carbapenemases in Gram-negative bacteria // *Biomed Res Int*. — 2014. — V. 2014. — P. 249856.
53. Doumith M., Ellington M. J., Livermore D. M., Woodford N. Molecular mechanisms disrupting porin expression in ertapenem-resistant *Klebsiella*

- and *Enterobacter* spp. clinical isolates from the UK // *J Antimicrob Chemother.* — 2009. — V. 63, № 4. — P. 659-67.
54. Dowson C. G., Hutchison A., Woodford N., Johnson A. P., George R. C., Spratt B. G. Penicillin-resistant viridans streptococci have obtained altered penicillin-binding protein genes from penicillin-resistant strains of *Streptococcus pneumoniae* // *Proc Natl Acad Sci U S A.* — 1990. — V. 87, № 15. — P. 5858-5862.
55. Drawz S. M., Bonomo R. A. Three decades of beta-lactamase inhibitors // *Clin Microbiol Rev.* — 2010. — V. 23, № 1. — P. 160-201.
56. Edelstein M. V., Skleenova E. N., Shevchenko O. V., D'Souza J W., Tapalski D. V., Azizov I. S., Sukhorukova M. V., Pavlukov R. A., Kozlov R. S., Toleman M. A., Walsh T. R. 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. — V. 13, № 10. — P. 867-876.
57. Elwell L. P., Roberts M., Mayer L. W., Falkow S. Plasmid-mediated beta-lactamase production in *Neisseria gonorrhoeae* // *Antimicrob Agents Chemother.* — 1977. — V. 11, № 3. — P. 528-533.
58. Enfield K. B., Huq N. N., Gosseling M. F., Low D. J., Hazen K. C., Toney D. M., Slitt G., Zapata H. J., Cox H. L., Lewis J. D., Kundzins J. R., Mathers A. J., Sifri C. D. Control of simultaneous outbreaks of carbapenemase-producing enterobacteriaceae and extensively drug-resistant *Acinetobacter baumannii* infection in an intensive care unit using interventions promoted in the Centers for Disease Control and Prevention 2012 carbapenemase-resistant Enterobacteriaceae Toolkit // *Infect Control Hosp Epidemiol.* — 2014. — V. 35, № 7. — P. 810-817.
59. Fukigai S., Alba J., Kimura S., Iida T., Nishikura N., Ishii Y., Yamaguchi K. Nosocomial outbreak of genetically related IMP-1 beta-lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* in a general hospital in Japan // *Int J Antimicrob Agents.* — 2007. — V. 29, № 3. — P. 306-310.

60. Galleni M., Lamotte-Brasseur J., Rossolini G. M., Spencer J., Dideberg O., Frere J. M., Metallo-beta-lactamases Working G. Standard numbering scheme for class B beta-lactamases // *Antimicrob Agents Chemother.* — 2001. — V. 45, № 3. — P. 660-663.
61. Garau G., Garcia-Saez I., Bebrone C., Anne C., Mercuri P., Galleni M., Frere J. M., Dideberg O. Update of the standard numbering scheme for class B beta-lactamases // *Antimicrob Agents Chemother.* — 2004. — V. 48, № 7. — PC. 2347-2349.
62. Gasink L. B., Edelstein P. H., Lautenbach E., Synnestvedt M., Fishman N. O. Risk factors and clinical impact of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing *K. pneumoniae* // *Infect Control Hosp Epidemiol.* — 2009. — V. 30, № 12. — P. 1180-5.
63. Ghannoum M. A., Rice L. B. Antifungal agents: mode of action, mechanisms of resistance, and correlation of these mechanisms with bacterial resistance // *Clin Microbiol Rev.* — 1999. — V. 12, № 4. — P. 501-517.
64. Giakkoupi P., Papagiannitsis C. C., Miriagou V., Pappa O., Polemis M., Tryfinopoulou K., Tzouvelekis L. S., Vatopoulos A. C. An update of the evolving epidemic of blaKPC-2-carrying *Klebsiella pneumoniae* in Greece (2009-10) // *J Antimicrob Chemother.* — 2011. — V. 66, № 7. — P. 1510-1513.
65. Giakkoupi P., Xanthaki A., Kanelopoulou M., Vlahaki A., Miriagou V., Kontou S., Papafraggas E., Malamou-Lada H., Tzouvelekis L. S., Legakis N. J., Vatopoulos A. C. VIM-1 Metallo-beta-lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* strains in Greek hospitals // *J Clin Microbiol.* — 2003. — V. 41, № 8. — P. 3893-3896.
66. Giani T., D'Andrea M. M., Pecile P., Borgianni L., Nicoletti P., Tonelli F., Bartoloni A., Rossolini G. M. Emergence in Italy of *Klebsiella pneumoniae* sequence type 258 producing KPC-3 Carbapenemase // *J Clin Microbiol.* — 2009. — V. 47, № 11. — P. 3793-3794.

67. Goffin C., Ghuysen J. M. Multimodular penicillin-binding proteins: an enigmatic family of orthologs and paralogs // *Microbiol Mol Biol Rev.* — 1998. V. 62, № 4. — C. 1079-1093.
68. Gomez S. A., Pasteran F. G., Faccone D., Tijet N., Rapoport M., Lucero C., Lastovetska O., Albornoz E., Galas M., Group K. P. C., Melano R. G., Corso A., Petroni A. Clonal dissemination of *Klebsiella pneumoniae* ST258 harbouring KPC-2 in Argentina // *Clin Microbiol Infect.* — 2011. — V. 17, № 10. — P. 1520-1524.
69. Goren M. G., Navon-Venezia S., Chmelnitsky I., Carmeli Y. Carbapenem-resistant KPC-2-producing *Escherichia coli* in a Tel Aviv Medical Center, 2005 to 2008 // *Antimicrob Agents Chemother.* — 2010. — V. 54, № 6. — P. 2687-2691.
70. Grundmann H., Livermore D. M., Giske C. G., Canton R., Rossolini G. M., Campos J., Vatopoulos A., Gniadkowski M., Toth A., Pfeifer Y., Jarlier V., Carmeli Y., Group C. W. Carbapenem-non-susceptible Enterobacteriaceae in Europe: conclusions from a meeting of national experts // *Euro Surveill.* — 2010. — V. 15, № 46.
71. Gupta N., Limbago B. M., Patel J. B., Kallen A. J. Carbapenem-resistant Enterobacteriaceae: epidemiology and prevention // *Clin Infect Dis.* — 2011. — V. 53, № 1. — P. 60-67.
72. Halaby T., Reuland A. E., Al Naiemi N., Potron A., Savelkoul P. H., Vandembroucke-Grauls C. M., Nordmann P. A case of New Delhi metallo-beta-lactamase 1 (NDM-1)-producing *Klebsiella pneumoniae* with putative secondary transmission from the Balkan region in the Netherlands // *Antimicrob Agents Chemother.* — 2012. — V. 56, № 5. — P. 2790-2791.
73. Hopkins J. M., Towner K. J. Enhanced resistance to cefotaxime and imipenem associated with outer membrane protein alterations in *Enterobacter aerogenes* // *J Antimicrob Chemother.* — 1990. — V. 25, № 1. — P. 49-55.

74. Hrabak J., Walkova R., Studentova V., Chudackova E., Bergerova T. Carbapenemase activity detection by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry // *J Clin Microbiol.* — 2011. — V. 49, № 9. — P. 3222-3227.
75. Iseman M. D. Treatment of multidrug-resistant tuberculosis // *N Engl J Med.* — 1993. — V. 329, № 11. — P. 784-791.
76. Jacoby G. A. AmpC beta-lactamases // *Clin Microbiol Rev.* — 2009. — V. 22, № 1. — P. 161-182.
77. Jovcic B., Lepsanovic Z., Suljagic V., Rackov G., Begovic J., Topisirovic L., Kojic M. Emergence of NDM-1 metallo-beta-lactamase in *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates from Serbia // *Antimicrob Agents Chemother.* — 2011. — V. 55, № 8. — P. 3929-39231.
78. Kim M. N., Yong D., An D., Chung H. S., Woo J. H., Lee K., Chong Y. Nosocomial clustering of NDM-1-producing *Klebsiella pneumoniae* sequence type 340 strains in four patients at a South Korean tertiary care hospital // *J Clin Microbiol.* — 2012. — V. 50, № 4. — P. 1433-1436.
79. Kitchel B., Rasheed J. K., Patel J. B., Srinivasan A., Navon-Venezia S., Carmeli Y., Brolund A., Giske C. G. Molecular epidemiology of KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* isolates in the United States: clonal expansion of multilocus sequence type 258 // *Antimicrob Agents Chemother.* — 2009. — V. 53, № 8. — P. 3365-3370.
80. Koh T. H., Cao D., Shan Q. Y., Bacon A., Hsu L. Y., Ooi E. E. Acquired carbapenemases in *Enterobacteriaceae* in Singapore, 1996-2012 // *Pathology.* — 2013. — V. 45, № 6. — P. 600-603.
81. Ktari S., Arlet G., Mnif B., Gautier V., Mahjoubi F., Ben Jmeaa M., Bouaziz M., Hammami A. Emergence of multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* isolates producing VIM-4 metallo-beta-lactamase, CTX-M-15 extended-spectrum beta-lactamase, and CMY-4 AmpC beta-lactamase in a Tunisian university hospital // *Antimicrob Agents Chemother.* — 2006. — V. 50, № 12. — P. 4198-4201.

82. Kumarasamy K. K., et al. Emergence of a new antibiotic resistance mechanism in India, Pakistan, and the UK: a molecular, biological, and epidemiological study // *Lancet Infect Dis.* — 2010. — V. 10, № 9. — P. 597-602.
83. Laible G., Spratt B. G., Hakenbeck R. Interspecies recombinational events during the evolution of altered PBP 2x genes in penicillin-resistant clinical isolates of *Streptococcus pneumoniae* // *Mol Microbiol.* — 1991. — V. 5, № 8. — P. 1993-2002.
84. Landman D., Salvani J. K., Bratu S., Quale J. Evaluation of techniques for detection of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* in stool surveillance cultures // *J Clin Microbiol.* — 2005. — V. 43, № 11. — P. 5639-5641.
85. Laraki N., Franceschini N., Rossolini G. M., Santucci P., Meunier C., de Pauw E., Amicosante G., Frere J. M., Galleni M. Biochemical characterization of the *Pseudomonas aeruginosa* 101/1477 metallo-beta-lactamase IMP-1 produced by *Escherichia coli* // *Antimicrob Agents Chemother.* — 1999. — V. 43, № 4. — P. 902-906.
86. Lauretti L., Riccio M. L., Mazzariol A., Cornaglia G., Amicosante G., Fontana R., Rossolini G. M. Cloning and characterization of blaVIM, a new integron-borne metallo-beta-lactamase gene from a *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate // *Antimicrob Agents Chemother.* — 1999. — V. 43, № 7. — P. 1584-1590.
87. Leavitt A., Navon-Venezia S., Chmelnitsky I., Schwaber M. J., Carmeli Y. Emergence of KPC-2 and KPC-3 in carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* strains in an Israeli hospital // *Antimicrob Agents Chemother.* — 2007. — V. 51, № 8. — P. 3026-3029.
88. Lee J., Patel G., Huprikar S., Calfee D. P., Jenkins S. G. Decreased susceptibility to polymyxin B during treatment for carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* infection // *J Clin Microbiol.* — 2009. — V. 47, № 5. — P. 1611-1612.

89. Lee K., Lee W. G., Uh Y., Ha G. Y., Cho J., Chong Y., Korean Nationwide Surveillance of Antimicrobial Resistance G. VIM- and IMP-type metallo-beta-lactamase-producing *Pseudomonas* spp. and *Acinetobacter* spp. in Korean hospitals // *Emerg Infect Dis.* — 2003. — V. 9, № 7. — P. 868-871.
90. Levy S. B. Microbial resistance to antibiotics. An evolving and persistent problem // *Lancet.* — 1982. — V. 2, № 8289. — P. 83-88.
91. Levy S. B., McMurry L. M., Barbosa T. M., Burdett V., Courvalin P., Hillen W., Roberts M. C., Rood J. I., Taylor D. E. Nomenclature for new tetracycline resistance determinants // *Antimicrob Agents Chemother.* — 1999. — V. 43, № 6. — P. 1523-4.
92. Li G., Wei Q., Wang Y., Du X., Zhao Y., Jiang X. Novel genetic environment of the plasmid-mediated KPC-3 gene detected in *Escherichia coli* and *Citrobacter freundii* isolates from China // *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* — 2011. — V. 30, № 4. — P. 575-580.
93. Livermore D. M., Walsh T. R., Toleman M., Woodford N. Balkan NDM-1: escape or transplant? // *Lancet Infect Dis.* — 2011. — V. 11, № 3. — P. 164.
94. Livermore D. M., Woodford N. Carbapenemases: a problem in waiting? // *Curr Opin Microbiol.* — 2000. — V. 3, № 5. — P. 489-495.
95. Lupo A., Coyne S., Berendonk T. U. Origin and evolution of antibiotic resistance: the common mechanisms of emergence and spread in water bodies // *Front Microbiol.* — 2012. — V. 3. — P. 18.
96. Luzzaro F., Docquier J. D., Colinon C., Endimiani A., Lombardi G., Amicosante G., Rossolini G. M., Toniolo A. Emergence in *Klebsiella pneumoniae* and *Enterobacter cloacae* clinical isolates of the VIM-4 metallo-beta-lactamase encoded by a conjugative plasmid // *Antimicrob Agents Chemother.* — 2004. — V. 48, № 2. — P. 648-650.
97. Marcano D., Pasteran F., Rapoport M., Faccione D., Ugarte C., Salgado N., Payares D., Spadola E., Lopez Y., Maggi G., Galas M., Sanchez D.

- First isolation of a VIM-producing *Klebsiella pneumoniae* from a seven-year-old child in Venezuela // *J Infect Dev Ctries.* — 2008. — V. 2, № 3. — C. 241-244.
98. Marchiaro P., Ballerini V., Spalding T., Cera G., Mussi M. A., Moran-Barrio J., Vila A. J., Viale A. M., Limansky A. S. A convenient microbiological assay employing cell-free extracts for the rapid characterization of Gram-negative carbapenemase producers // *J Antimicrob Chemother.* — 2008. — V. 62, № 2. — P. 336-344.
99. Martinez-Martinez L., Pascual A., Jacoby G. A. Quinolone resistance from a transferable plasmid // *Lancet.* — 1998. — V. 351, № 9105. — P. 797-9.
100. Massova I., Mobashery S. Kinship and diversification of bacterial penicillin-binding proteins and beta-lactamases // *Antimicrob Agents Chemother.* — 1998. — V. 42, № 1. — P. 1-17.
101. Matthew M. Plasmid-mediated beta-lactamases of Gram-negative bacteria: properties and distribution // *J Antimicrob Chemother.* — 1979. — V. 5, № 4. — P. 349-358.
102. Mavroidi A., Miriagou V., Malli E., Stefos A., Dalekos G. N., Tzouveleki L. S., Petinaki E. Emergence of *Escherichia coli* sequence type 410 (ST410) with KPC-2 beta-lactamase // *Int J Antimicrob Agents.* — 2012. — V. 39, № 3. — P. 247-250.
103. Mercuri P. S., Ishii Y., Ma L., Rossolini G. M., Luzzaro F., Amicosante G., Franceschini N., Frere J. M., Galleni M. Clonal diversity and metallo-beta-lactamase production in clinical isolates of *Stenotrophomonas maltophilia* // *Microb Drug Resist.* — 2002. — V. 8, № 3. — P. 193-200.
104. Meroueh S. O., Fisher J. F., Schlegel H. B., Mobashery S. Ab initio QM/MM study of class A beta-lactamase acylation: dual participation of Glu166 and Lys73 in a concerted base promotion of Ser70 // *J Am Chem Soc.* — 2005. — V. 127, № 44. — P. 15397-153407.

105. Minasov G., Wang X., Shoichet B. K. An ultrahigh resolution structure of TEM-1 beta-lactamase suggests a role for Glu166 as the general base in acylation // *J Am Chem Soc.* — 2002. — V. 124, № 19. — P. 5333-5340.
106. Munoz-Price L. S., Poirel L., Bonomo R. A., Schwaber M. J., Daikos G. L., Cormican M., Cornaglia G., Garau J., Gniadkowski M., Hayden M. K., Kumarasamy K., Livermore D. M., Maya J. J., Nordmann P., Patel J. B., Paterson D. L., Pitout J., Villegas M. V., Wang H., Woodford N., Quinn J. P. Clinical epidemiology of the global expansion of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemases // *Lancet Infect Dis.* — 2013. — V. 13, № 9. — P. 785-796.
107. Mussi M. A., Limansky A. S., Viale A. M. Acquisition of resistance to carbapenems in multidrug-resistant clinical strains of *Acinetobacter baumannii*: natural insertional inactivation of a gene encoding a member of a novel family of beta-barrel outer membrane proteins // *Antimicrob Agents Chemother.* — 2005. — V. 49, № 4. — P. 1432-1440.
108. Naas T., Cuzon G., Truong H. V., Nordmann P. Role of ISKpn7 and deletions in *bla*KPC gene expression // *Antimicrob Agents Chemother.* — 2012. — V. 56, № 9. — P. 4753-4759.
109. Naas T., Cuzon G., Villegas M. V., Lartigue M. F., Quinn J. P., Nordmann P. Genetic structures at the origin of acquisition of the beta-lactamase *bla* KPC gene // *Antimicrob Agents Chemother.* — 2008. — V. 52, № 4. — P. 1257-1263.
110. Naas T., Nordmann P. Analysis of a carbapenem-hydrolyzing class A beta-lactamase from *Enterobacter cloacae* and of its LysR-type regulatory protein // *Proc Natl Acad Sci U S A.* — 1994. — V. 91, № 16. — P. 7693-7697.
111. Naas T., Nordmann P., Vedel G., Poyart C. Plasmid-mediated carbapenem-hydrolyzing beta-lactamase KPC in a *Klebsiella pneumoniae*

- isolate from France // *Antimicrob Agents Chemother.* — 2005. — V. 49, № 10. — P. 4423-4424.
112. Nikaido H. Multidrug efflux pumps of gram-negative bacteria // *J Bacteriol.* — 1996. — V. 178, № 20. — P. 5853-9.
113. Nordmann P., Boulanger A. E., Poirel L. NDM-4 metallo-beta-lactamase with increased carbapenemase activity from *Escherichia coli* // *Antimicrob Agents Chemother.* — 2012. — V. 56, № 4. — P. 2184-2186.
114. Nordmann P., Naas T., Poirel L. Global spread of Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae // *Emerg Infect Dis.* — 2011. — V. 17, № 10. — P. 1791-1798.
115. Nordmann P., Poirel L., Toleman M. A., Walsh T. R. Does broad-spectrum beta-lactam resistance due to NDM-1 herald the end of the antibiotic era for treatment of infections caused by Gram-negative bacteria? // *J Antimicrob Chemother.* — 2011. — V. 66, № 4. — P. 689-692.
116. Nukaga M., Haruta S., Tanimoto K., Kogure K., Taniguchi K., Tamaki M., Sawai T. Molecular evolution of a class C beta-lactamase extending its substrate specificity // *J Biol Chem.* — 1995. — V. 270, № 11. — P. 5729-5735.
117. Organization W. H. WHO Global Strategy for Containment of Antimicrobial Resistance // WHO/CDS/CSR/DRS/2001.2. — 2001.
118. Ozturk H., Ozkirimli E., Ozgur A. Classification of Beta-lactamases and penicillin binding proteins using ligand-centric network models // *PLoS One.* — 2015. — V. 10, № 2. — e0117874.
119. Parsley L. C., Consuegra E. J., Kakirde K. S., Land A. M., Harper W. F., Jr., Liles M. R. Identification of diverse antimicrobial resistance determinants carried on bacterial, plasmid, or viral metagenomes from an activated sludge microbial assemblage // *Appl Environ Microbiol.* — 2010. — V. 76, № 11. — P. 3753-3757.

120. Paton R., Miles R. S., Hood J., Amyes S. G., Miles R. S., Amyes S. G. ARI 1: beta-lactamase-mediated imipenem resistance in *Acinetobacter baumannii* // *Int J Antimicrob Agents*. — 1993. — V. 2, № 2. — P. 81-87.
121. Pavelkovich A., Balode A., Edquist P., Egorova S., Ivanova M., Kaftyreva L., Konovalenko I., Koljalg S., Lillo J., Lipskaya L., Miciuleviciene J., Pai K., Parv K., Parna K., Roop T., Sepp E., Stsepetova J., Naaber P. Detection of carbapenemase-producing enterobacteriaceae in the baltic countries and st. Petersburg area // *Biomed Res Int*. — 2014. V. 2014. — P. 548960.
122. Petroni A., Melano R. G., Saka H. A., Garutti A., Mange L., Pasteran F., Rapoport M., Miranda M., Faccone D., Rossi A., Hoffman P. S., Galas M. F. CARB-9, a carbenicillinase encoded in the VCR region of *Vibrio cholerae* non-O1, non-O139 belongs to a family of cassette-encoded beta-lactamases // *Antimicrob Agents Chemother*. — 2004. — V. 48, № 10. — P. 4042-4046.
123. Pfeifer Y., Schlatterer K., Engelmann E., Schiller R. A., Frangenberg H. R., Stiewe D., Holfelder M., Witte W., Nordmann P., Poirel L. Emergence of OXA-48-type carbapenemase-producing Enterobacteriaceae in German hospitals // *Antimicrob Agents Chemother*. — 2012. — V. 56, № 4. — P. 2125-2128.
124. Poirel L., Collet L., Nordmann P. Carbapenem-hydrolyzing metallo-beta-lactamase from a nosocomial isolate of *Pseudomonas aeruginosa* in France // *Emerg Infect Dis*. — 2000. — V. 6, № 1. — P. 84-85.
125. Poirel L., Dortet L., Bernabeu S., Nordmann P. Genetic features of bla_{NDM-1}-positive Enterobacteriaceae // *Antimicrob Agents Chemother*. — 2011. — V. 55, № 11. — P. 5403-5407.
126. Poirel L., Heritier C., Nordmann P. Chromosome-encoded ambler class D beta-lactamase of *Shewanella oneidensis* as a progenitor of carbapenem-hydrolyzing oxacillinase // *Antimicrob Agents Chemother*. — 2004. — V. 48, № 1. — P. 348-351.

127. Poirel L., Heritier C., Tolun V., Nordmann P. Emergence of oxacillinase-mediated resistance to imipenem in *Klebsiella pneumoniae* // *Antimicrob Agents Chemother.* — 2004. — V. 48, № 1. — P. 15-22.
128. Poirel L., Naas T., Nordmann P. Diversity, epidemiology, and genetics of class D beta-lactamases // *Antimicrob Agents Chemother.* — 2010. — V. 54, № 1. — P. 24-38.
129. Poirel L., Potron A., Nordmann P. OXA-48-like carbapenemases: the phantom menace // *J Antimicrob Chemother.* — 2012. — V. 67, № 7. — P. 1597-1606.
130. Poirel L., Ros A., Carricajo A., Berthelot P., Pozzetto B., Bernabeu S., Nordmann P. Extremely drug-resistant *Citrobacter freundii* isolate producing NDM-1 and other carbapenemases identified in a patient returning from India // *Antimicrob Agents Chemother.* — 2011. — V. 55, № 1. — P. 447-448.
131. Poirel L., Walsh T. R., Cuvillier V., Nordmann P. Multiplex PCR for detection of acquired carbapenemase genes // *Diagn Microbiol Infect Dis.* — 2011. — V. 70, № 1. — P. 119-123.
132. Poole K. Efflux-mediated multiresistance in Gram-negative bacteria // *Clin Microbiol Infect.* — 2004. — V. 10, № 1. — P. 12-26.
133. Potron A., Nordmann P., Lafeuille E., Al Maskari Z., Al Rashdi F., Poirel L. Characterization of OXA-181, a carbapenem-hydrolyzing class D beta-lactamase from *Klebsiella pneumoniae* // *Antimicrob Agents Chemother.* — 2011. — V. 55, № 10. — P. 4896-4899.
134. Potron A., Poirel L., Croize J., Chanteperdrix V., Nordmann P. Genetic and biochemical characterization of the first extended-spectrum CARB-type beta-lactamase, RTG-4, from *Acinetobacter baumannii* // *Antimicrob Agents Chemother.* — 2009. — V. 53, № 7. — P. 3010-3016.
135. Pournaras S., Maniati M., Petinaki E., Tzouvelekis L. S., Tsakris A., Legakis N. J., Maniatis A. N. Hospital outbreak of multiple clones of *Pseudomonas aeruginosa* carrying the unrelated metallo-beta-lactamase

- gene variants blaVIM-2 and blaVIM-4 // *J Antimicrob Chemother.* — 2003. — V. 51, № 6. — P. 1409-1414.
136. Pournaras S., Tsakris A., Maniati M., Tzouveleki L. S., Maniatis A. N. Novel variant (bla(VIM-4)) of the metallo-beta-lactamase gene bla(VIM-1) in a clinical strain of *Pseudomonas aeruginosa* // *Antimicrob Agents Chemother.* — 2002. — V. 46, № 12. — P. 4026-4028.
137. Qi Y., Wei Z., Ji S., Du X., Shen P., Yu Y. ST11, the dominant clone of KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* in China // *J Antimicrob Chemother.* — 2011. — V. 66, № 2. — P. 307-312.
138. Queenan A. M., Bush K. Carbapenemases: the versatile beta-lactamases // *Clin Microbiol Rev.* — 2007. — V. 20, № 3. — P. 440-458.
139. Queenan A. M., Foleno B., Gownley C., Wira E., Bush K. Effects of inoculum and beta-lactamase activity in AmpC- and extended-spectrum beta-lactamase (ESBL)-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* clinical isolates tested by using NCCLS ESBL methodology // *J Clin Microbiol.* — 2004. — V. 42, № 1. — P. 269-275.
140. Ramos P. I., Picao R. C., Almeida L. G., Lima N. C., Girardello R., Vivian A. C., Xavier D. E., Barcellos F. G., Pelisson M., Vespero E. C., Medigue C., Vasconcelos A. T., Gales A. C., Nicolas M. F. Comparative analysis of the complete genome of KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* Kp13 reveals remarkable genome plasticity and a wide repertoire of virulence and resistance mechanisms // *BMC Genomics.* — 2014. — V. 15. — P. 54.
141. Rasmussen B. A., Bush K. Carbapenem-hydrolyzing beta-lactamases // *Antimicrob Agents Chemother.* — 1997. — V. 41, № 2. — P. 223-232.
142. Robin F., Delmas J., Chanal C., Sirot D., Sirot J., Bonnet R. TEM-109 (CMT-5), a natural complex mutant of TEM-1 beta-lactamase combining the amino acid substitutions of TEM-6 and TEM-33 (IRT-5) // *Antimicrob Agents Chemother.* — 2005. — V. 49, № 11. — P. 4443-4447.

143. Rodriguez-Martinez J. M., Poirel L., Nordmann P. Extended-spectrum cephalosporinases in *Pseudomonas aeruginosa* // *Antimicrob Agents Chemother.* — 2009. — V. 53, № 5. — P. 1766-1771.
144. Rogers B. A., Sidjabat H. E., Silvey A., Anderson T. L., Perera S., Li J., Paterson D. L. Treatment options for New Delhi metallo-beta-lactamase-harboring enterobacteriaceae // *Microb Drug Resist.* — 2013. — V. 19, № 2. — P. 100-103.
145. Rolain J. M., Canton R., Cornaglia G. Emergence of antibiotic resistance: need for a new paradigm // *Clin Microbiol Infect.* — 2012. — V. 18, № 7. — P. 615-616.
146. Roy C., Foz A., Segura C., Tirado M., Fuster C., Reig R. Plasmid-determined beta-lactamases identified in a group of 204 ampicillin-resistant Enterobacteriaceae // *J Antimicrob Chemother.* — 1983. — V. 12, № 5. — P. 507-510.
147. Saito K., Yoneyama H., Nakae T. nalB-type mutations causing the overexpression of the MexAB-OprM efflux pump are located in the mexR gene of the *Pseudomonas aeruginosa* chromosome // *FEMS Microbiol Lett.* — 1999. — V. 179, № 1. — P. 67-72.
148. Samuelsen O., Naseer U., Tofteland S., Skutlaberg D. H., Onken A., Hjetland R., Sundsfjord A., Giske C. G. Emergence of clonally related *Klebsiella pneumoniae* isolates of sequence type 258 producing plasmid-mediated KPC carbapenemase in Norway and Sweden // *J Antimicrob Chemother.* — 2009. — V. 63, № 4. — P. 654-658.
149. Schwaber M. J., Klarfeld-Lidji S., Navon-Venezia S., Schwartz D., Leavitt A., Carmeli Y. Predictors of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* acquisition among hospitalized adults and effect of acquisition on mortality // *Antimicrob Agents Chemother.* — 2008. — V. 52, № 3. — P. 1028-33.
150. Segatore B., Massidda O., Satta G., Setacci D., Amicosante G. High specificity of cphA-encoded metallo-beta-lactamase from *Aeromonas*

- hydrophila AE036 for carbapenems and its contribution to beta-lactam resistance // *Antimicrob Agents Chemother.* — 1993. — V. 37, № 6. — P. 1324-1328.
151. Senda K., Arakawa Y., Nakashima K., Ito H., Ichiyama S., Shimokata K., Kato N., Ohta M. Multifocal outbreaks of metallo-beta-lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* resistant to broad-spectrum beta-lactams, including carbapenems // *Antimicrob Agents Chemother.* — 1996. — V. 40, № 2. — P. 349-353.
152. Shen P., Wei Z., Jiang Y., Du X., Ji S., Yu Y., Li L. Novel genetic environment of the carbapenem-hydrolyzing beta-lactamase KPC-2 among Enterobacteriaceae in China // *Antimicrob Agents Chemother.* — 2009. — V. 53, № 10. — P. 4333-4338.
153. Shevchenko O. V., Mudrak D. Y., Skleenova E. Y., Kozyreva V. K., Ilina E. N., Ikryannikova L. N., Alexandrova I. A., Sidorenko S. V., Edelstein M. V. First detection of VIM-4 metallo-beta-lactamase-producing *Escherichia coli* in Russia // *Clin Microbiol Infect.* — 2012. V. 18, № 7. — P. E214-E217.
154. Shibata N., Doi Y., Yamane K., Yagi T., Kurokawa H., Shibayama K., Kato H., Kai K., Arakawa Y. PCR typing of genetic determinants for metallo-beta-lactamases and integrases carried by gram-negative bacteria isolated in Japan, with focus on the class 3 integron // *J Clin Microbiol.* — 2003. — V. 41, № 12. — P. 5407-5413.
155. Sirot D., Recule C., Chaibi E. B., Bret L., Croize J., Chanal-Claris C., Labia R., Sirot J. A complex mutant of TEM-1 beta-lactamase with mutations encountered in both IRT-4 and extended-spectrum TEM-15, produced by an *Escherichia coli* clinical isolate // *Antimicrob Agents Chemother.* — 1997. — V. 41, № 6. — P. 1322-1325.
156. Sparbier K., Schubert S., Weller U., Boogen C., Kostrzewa M. Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry-based functional assay for rapid detection of resistance against beta-

- lactam antibiotics // *J Clin Microbiol.* — 2012. — V. 50, № 3. — P. 927-937.
157. Spellberg B., Taylor-Blake B. On the exoneration of Dr. William H. Stewart: debunking an urban legend // *Infect Dis Poverty.* — 2013. — V. 2, № 1. — P. 3.
158. Srikumar R., Paul C. J., Poole K. Influence of mutations in the mexR repressor gene on expression of the MexA-MexB-oprM multidrug efflux system of *Pseudomonas aeruginosa* // *J Bacteriol.* — 2000. — V. 182, № 5. — P. 1410-1414.
159. Vasoo S., Cunningham S. A., Kohner P. C., Simner P. J., Mandrekar J. N., Lolans K., Hayden M. K., Patel R. Comparison of a novel, rapid chromogenic biochemical assay, the Carba NP test, with the modified Hodge test for detection of carbapenemase-producing Gram-negative bacilli // *J Clin Microbiol.* — 2013. — V. 51, № 9. — P. 3097-3101.
160. Villegas M. V., Lolans K., Correa A., Suarez C. J., Lopez J. A., Vallejo M., Quinn J. P., Colombian Nosocomial Resistance Study G. First detection of the plasmid-mediated class A carbapenemase KPC-2 in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* from South America // *Antimicrob Agents Chemother.* — 2006. — V. 50, № 8. — P. 2880-2882.
161. Walsh F., Cooke N. M., Smith S. G., Moran G. P., Cooke F. J., Ivens A., Wain J., Rogers T. R. Comparison of two DNA microarrays for detection of plasmid-mediated antimicrobial resistance and virulence factor genes in clinical isolates of Enterobacteriaceae and non-Enterobacteriaceae // *Int J Antimicrob Agents.* — 2010. — V. 35, № 6. — P. 593-8.
162. Walsh T. R., Weeks J., Livermore D. M., Toleman M. A. Dissemination of NDM-1 positive bacteria in the New Delhi environment and its implications for human health: an environmental point prevalence study // *Lancet Infect Dis.* — 2011. — V. 11, № 5. — P. 355-362.

163. Walther-Rasmussen J., Hoiby N. Cefotaximases (CTX-M-ases), an expanding family of extended-spectrum beta-lactamases // *Can J Microbiol.* — 2004. — V. 50, № 3. — P. 137-165.
164. Walther-Rasmussen J., Hoiby N. OXA-type carbapenemases // *J Antimicrob Chemother.* — 2006. — V. 57, № 3. — P. 373-383.
165. Wang J. F., Chou K. C. Metallo-beta-lactamases: structural features, antibiotic recognition, inhibition, and inhibitor design // *Curr Top Med Chem.* — 2013. — V. 13, № 10. — P. 1242-1253.
166. Watanabe M., Iyobe S., Inoue M., Mitsuhashi S. Transferable imipenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa* // *Antimicrob Agents Chemother.* — 1991. — V. 35, № 1. — P. 147-151.
167. Watanabe T. Infective heredity of multiple drug resistance in bacteria // *Bacteriol Rev.* — 1963. — V. 27. — P. 87-115.
168. Williamson D. A., Sidjabat H. E., Freeman J. T., Roberts S. A., Silvey A., Woodhouse R., Mowat E., Dyet K., Paterson D. L., Blackmore T., Burns A., Heffernan H. Identification and molecular characterisation of New Delhi metallo-beta-lactamase-1 (NDM-1)- and NDM-6-producing Enterobacteriaceae from New Zealand hospitals // *Int J Antimicrob Agents.* — 2012. — V. 39, № 6. — P. 529-533.
169. Woodford N., Zhang J., Warner M., Kaufmann M. E., Matos J., Macdonald A., Brudney D., Sompolinsky D., Navon-Venezia S., Livermore D. M. Arrival of *Klebsiella pneumoniae* producing KPC carbapenemase in the United Kingdom // *J Antimicrob Chemother.* — 2008. — V. 62, № 6. — P. 1261-1264.
170. Yan J. J., Ko W. C., Chuang C. L., Wu J. J. Metallo-beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae isolates in a university hospital in Taiwan: prevalence of IMP-8 in *Enterobacter cloacae* and first identification of VIM-2 in *Citrobacter freundii* // *J Antimicrob Chemother.* — 2002. — V. 50, № 4. — P. 503-511.

171. Yang Y., Bush K. Biochemical characterization of the carbapenem-hydrolyzing beta-lactamase AsbM1 from *Aeromonas sobria* AER 14M: a member of a novel subgroup of metallo-beta-lactamases // *FEMS Microbiol Lett.* — 1996. — V. 137, № 2-3. — PC. 193-200.
172. Yigit H., Queenan A. M., Anderson G. J., Domenech-Sanchez A., Biddle J. W., Steward C. D., Alberti S., Bush K., Tenover F. C. Novel carbapenem-hydrolyzing beta-lactamase, KPC-1, from a carbapenem-resistant strain of *Klebsiella pneumoniae* // *Antimicrob Agents Chemother.* — 2001. — V. 45, № 4. — P. 1151-1161.
173. Yong D., Choi Y. S., Roh K. H., Kim C. K., Park Y. H., Yum J. H., Lee K., Chong Y. Increasing prevalence and diversity of metallo-beta-lactamases in *Pseudomonas* spp., *Acinetobacter* spp., and *Enterobacteriaceae* from Korea // *Antimicrob Agents Chemother.* — 2006. — V. 50, № 5. — P. 1884-1886.
174. Yong D., Toleman M. A., Giske C. G., Cho H. S., Sundman K., Lee K., Walsh T. R. 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. — V. 53, № 12. — P. 5046-5054.
175. Yoshizumi A., Ishii Y., Livermore D. M., Woodford N., Kimura S., Saga T., Harada S., Yamaguchi K., Tateda K. Efficacies of calcium-EDTA in combination with imipenem in a murine model of sepsis caused by *Escherichia coli* with NDM-1 beta-lactamase // *J Infect Chemother.* — 2013. — V. 19, № 5. — P. 992-995.
176. Yotsuji A., Minami S., Inoue M., Mitsuhashi S. Properties of novel beta-lactamase produced by *Bacteroides fragilis* // *Antimicrob Agents Chemother.* — 1983. — V. 24, № 6. — P. 925-929.
177. Yum J. H., Yong D., Lee K., Kim H. S., Chong Y. A new integron carrying VIM-2 metallo-beta-lactamase gene cassette in a *Serratia*

- marcescens isolate // *Diagn Microbiol Infect Dis.* — 2002. — V. 42, № 3. — P. 217-219.
178. Zapun A., Contreras-Martel C., Vernet T. Penicillin-binding proteins and beta-lactam resistance // *FEMS Microbiol Rev.* — 2008. — V. 32, № 2. — P. 361-385.

АКТ ВНЕДРЕНИЯ

Предложение: «Методика выявления генов карбапенемаз NDM-, KPC- и OXA-48-типов с помощью мультиплексной ПЦР» в рамках НИР «Применение молекулярных методов для выявления резистентности грамотрицательных бактерий к бета-лактамам антибиотикам» шифр: 006-10»

Авторы: Агеев В.А., Лазарева И.В., Сидоренко С.В.

Аннотация: Разработана методика выявления генов карбапенемаз относящихся к группам *bla*_{KPC}-, *bla*_{NDM}- и *bla*_{OXA-48}-, как основных генов приобретённой устойчивости к карбапенемным антибиотикам, в чистых культурах представителей семейства *Enterobacteriaceae*, циркулирующих в Санкт-Петербурге. Суть метода заключается в амплификации с помощью полимеразной цепной реакции консервативных участков последовательностей трех мишеней, соответствующим трём группам генов, а затем электрофоретической детекцией. Условия реакции подобраны с возможностью мультиплексирования трех мишеней в одной реакции. Применяются следующие последовательности праймеров: МКРСФ: GCTGACCAACCTCGTCGCGGAA; МКРСР: GCCTCGCTGTGCTTGTCAATCC; МОХАФ: TAATCTTAAACGGGCGAACCA; МОХАР: AAGTTCAACCCCAACCGACCCA; МНДМФ: TGCTCAGTGTCGGCATCACC; МНДМР: GAACCAGCAACCGCGCCCA. Каждой паре праймеров, в случае присутствия в пробе нуклеотидных последовательностей целевых генов, соответствует полоска на геле следующей длины: для генов *bla*_{KPC}-типа – 753 п.о.; для генов *bla*_{OXA-48}-типа – 514 п.о.; для генов *bla*_{NDM}-типа – 176 п.о. Амплификация генов карбапенемаз с перечисленными выше праймерами проходит в следующем температурном режиме: Денатурация при 95 С⁰ – 5 минут, 25 циклов, включающих 95 С⁰, 62 С⁰, 72 С⁰ по 15 секунд, а также 72 С⁰ в течение 2 минут. Для детекции результатов ПЦР используется гель-электрофорез в 2% агарозе с бромистым этидием в течение 15 минут при напряжении 100 mV. При обнаружении четкой полоски в геле, в условиях освещения интенсивным светом длиной волны 200 – 400 нм, соответствующей по размеру расчетным значениям (753 п.о., 514 п.о., 176 п.о.) делается вывод о присутствии у тестируемой культуры перечисленных генов карбапенемаз.

Форма внедрения: обучение лаборантов, врачей-инфекционистов, врачей клинико-диагностической лаборатории.

Раздел внедрения: диагностический процесс.

Срок внедрения: 2015-2016 гг.

База внедрения: 197022, г. Санкт-Петербург, ул. Профессора Попова, 9, ФГБУ НИИДИ ФМБА России, лаборатория медицинской микробиологии.

Эффективность: медико-социальная. Метод апробирован при скрининге на продукцию карбапенемаз коллекции нозокомиальных изолятов семейства *Enterobacteriaceae*, собранной в ходе многоцентрового исследования по детекции генов карбапенемаз в ФГБУ НИИДИ ФМБА России. Число протестированных изолятов – 1115. Были выявлены 53 (4,7%) продуцента карбапенемаз NDM-типа, 23 (2%) продуцента карбапенемаз OXA-48-типа и 19 (1,7%) продуцентов карбапенемаз KPC-типа. Таким образом, разработанная методика является эффективной, применимой в лабораторной практике.

Руководитель лаборатории клинической микробиологии

ФГБУ НИИДИ ФМБА России

Главный врач ФГБУ НИИДИ ФМБА России



Э.А. Мартенс

И.Г. Самойлова

АКТ ВНЕДРЕНИЯ

Предложение: «Методика выявления карбапенемазной активности у грамотрицательных бактерий с помощью MALDI-TOF масс-спектрометрии» в рамках НИР «Применение молекулярных методов для выявления резистентности грамотрицательных бактерий к бета-лактамам антибиотикам» шифр: 006-10»

Авторы: Агеев В.А., Лазарева И.В., Сидоренко С.В.

Аннотация: Разработан протокол детекции карбапенемазной активности с помощью время-пролётной масс-спектрометрии с использованием прибора Microflex (Bruker Inc., Германия) основанный на явлении разрушения нативной (исходной) формы молекулы карбапенемного антибиотика - меропенема и образования гидролизованного продукта под действием фермента - карбапенемазы. При гидролизе происходит уменьшение массы молекулы антибиотика за счёт потери атома углерода и атома кислорода 384 Da → 358 Da. Протокол выполнения исследования:

Готовится свежий раствор лекарственной формы субстанции меропенема 200 мкг/мл в 0,9% NaCl (массовая доля меропенема в субстанции 85%) – пункт 1, Готовится суспензия тестируемого штамма V=1 мл. ОП 4 - 4.20 по шкале McFarland, после чего клетки осаждаются центрифугированием при 7 тыс. об. 7 минут и супернатант удаляется. К осаждённым клеткам вносится 15 мкл. раствора антибиотика и содержимое пробирки ресуспендируется на вортексе. Смесь клеток и раствора антибиотика культивируются при температуре 37° С 2,5 часа, после чего пробирка снова центрифугируется и 2 мкл. супернатанта переносятся на плашку масс-спектрометра. Детекция масс-спектров проводится в диапазоне 280-520 Da. При отсутствии пика, соответствующего нативной форме меропенема (384 Da), результат считается положительным. Важно включать в анализ следующие контроли: А) Раствор 0,9% NaCl. Б) Раствор меропенема из пункта 1. В) Тест со штаммом, обладающим валидированной карбапенемазной активностью. Г) Тест со штаммом, не обладающим карбапенемазной активностью.

Форма внедрения: обучение лаборантов, врачей-инфекционистов, врачей клинико-диагностической лаборатории.

Раздел внедрения: диагностический процесс.

Срок внедрения: 2015-2016 гг.

База внедрения: 197022, г. Санкт-Петербург, ул. Профессора Попова, 9, ФГБУ НИИДИ ФМБА России, лаборатория медицинской микробиологии.

Эффективность: медико-социальная. Метод апробирован при скрининге на карбапенемазную активность коллекции нозокомиальных изолятов семейства *Enterobacteriaceae*, собранной в ходе многоцентрового исследования по детекции генов карбапенемаз в ФГБУ НИИДИ ФМБА России. Было протестировано 98 штаммов, демонстрирующих увеличение МПК к карбапенемному антибиотику выше эпидемиологической точки отсечения по критерию EUCAST. Было обнаружено 22 положительных штамма (22,4%), из которых у 18 штаммов (18,4%) было подтверждено наличие генов карбапенемаз с помощью ПЦР.

Руководитель лаборатории клинической микробиологии

ФГБУ НИИДИ ФМБА России



Э.А. Мартенс

Главный врач ФГБУ НИИДИ ФМБА России

И.Г. Самойлова