Министерство образования и науки Российской Федерации

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ «САРАТОВСКИЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ Н.Г. ЧЕРНЫШЕВСКОГО»

Кафедра биохимии и биофизики

Работа выполнена на базе лаборатории антибиотикорезистентности НИИАХ СГМУ (г. Смоленск)

МОЛЕКУЛЯРНАЯ ЭПИДЕМИОЛОГИЯ НОЗОКОМИАЛЬНЫХ ШТАММОВ *KLEBSIELLA PNEUMONIAE*, ПРОДУЦИРУЮЩИХ КАРБАПЕНЕМАЗЫ В РФ

АВТОРЕФЕРАТ БАКАЛАВРСКОЙ РАБОТЫ

студента 4 курса 422 группы

направления 06.03.01 - биология

биологического факультета

Журавлева Владимира Сергеевича

Научный руководитель:

профессор кафедры биохимии и биофизики, д.б.н., доцент

<u>Глеше</u> Е.В. Плешакова

Зав. кафедрой биохимии и биофизики,

д.б.н., профессор

<u>Гли</u> С.А. Коннова 15.06.20Д,

\Саратов 2017

Введение. «Двадцать первого сентября 2016 года государства – члены ООН впервые в истории приняли решение объединить усилия для борьбы с распространением инфекций, устойчивых к антибиотикам. Участники заседания, состоявшегося «на полях» 71-й сессии Генеральной Ассамблеи OOH, Политическую устойчивости поддержали декларацию ПО антибиотикам», – сообщает новостной портал Организации Объединенных Наций [1]. Анализируя сообщения мировых информационных агентств за последние несколько лет, можно прийти к выводу, что проблема антибиотикорезистентности уже давно перешагнула рамки медицины и все обсуждения предметом чаше становится политиков, экономистов, социологов и пр. [2]. По мнению профессора экономики Манчестерского университета и председателя Review on Antimicrobial Resistance Джима O'нилла (Jim O'neill) ежегодно из-за лекарственно-устойчивых инфекций умирает, по меньшей мере, 700000 человек. По прогнозам, к 2050 году эта цифра может достичь 10 млн. человек в год [3].

В настоящее время актуальной темой является развитие устойчивости к карбапенемам внутрибольничных, нозокомиальных среди или энтеробактерий [4]. Более 50% всех изолятов энтеробактерий, выделенных у Klebsiella пациентов, приходится pneumoniae [4, 5].на вид Распространенность карбапенемазо-продуцирующих энтеробактерий (СРЕ – carbapenemase-producing Enterobacteriaceae), главным образом, K. pneumoniae, в ряде учреждений эндемичных районов может достигать 40%. СРЕ в являются причиной увеличения стационаре продолжительности госпитализации больного и характеризуются высокими показателями смертности – от 24 до 70% [6, 7, 8].

В связи с наличием и неуклонным ростом уровня устойчивости нозокомиальных штаммов *К. pneumoniae* к карбапенемам, отсутствием полноценных эпидемиологических данных о карабапенемазопродуцирующих энтеробактериях по регионам, в России необходим непрерывный мониторинг, который был бы направлен на изучение

качественного и количественного состава продуцентов карбапенемаз в стационарах страны, а также на отслеживание возникновения новых эпидемиологических клонов, выяснение факторов и путей передачи при эпидемиологических вспышках.

Целью настоящей работы стала оценка клонального разнообразия карбапенемазо-продуцирующих изолятов *К. pneumoniae* на территории России, полученных в 2014 году в ходе многоцетрового эпидемиологического исследования антибиотикорезистентности возбудителей нозокомиальных инфекций "МАРАФОН-2014".

Для реализации цели были поставлены следующие задачи:

- 1. Определить с использованием молекулярно-генетических методов наличие и разнообразие карбапенемаз у клинических изолятов семейства Enterobacteriaceae.
- 2. Оценить динамику изменения устойчивости к карбапенемам и продукции карбапенемаз среди основных видов нозокомиальных возбудителей сем. Enterobacteriaceae, в 2006-2014 гг.
- 3. Установить клональную принадлежность карбапенемазопродуцирующих *К. рпеитопіае* методом мультилокусного секвенированиятипирования (MLST).

Объектом исследования стали 1524 неповторяющихся (по одному от каждого пациента) клинических изолятов энтеробактерий из 30 стационаров 19 городов РФ. Из которых на долю *К. pneumoniae* пришелся 41% (n=618).

Чувствительность полученных микроорганизмов определяли методом микрооразведений в бульоне. Суточные культуры тестируемых микроорганизмов ресуспендировали в физиологическом растворе. Суспензии тестируемых штаммов вносили в лунки микропланшет, содержащих 100 мкл бульона с разведениями антибиотиков, в объеме 0,3 мкл с помощью автоматического многоканального инокулятора Mast URI Dot System. Инокулированные планшеты инкубировали в термостате 16-20 часов при температуре 35°C. Учет результатов проводили визуально, оценивая рост

микроорганизмов в лунках без антибиотиков (положительный контроль роста) и в присутствии различных концентраций антибиотиков.

Выявление генов наиболее распространенных карбапенемаз проводили с использованием коммерческих наборов для ПЦР в режиме реального времени с гибридизационно-флуоресцентной детекцией (Интерлабсервис, Россия): "АмплиСенс MDR MBL-FL" (для генов bla_{VIM} , bla_{IMP} и bla_{NDM}) и "АмплиСенс KPC/OXA-48-FL" (для генов bla_{KPC} и генов группы bla_{OXA-48}).

Внутривидовому типированию были подвергнуты все карбапенемазопродуцирующие изоляты вида *К. pneumoniae* (n=89). Принадлежность отобранных клебсиелл к определенным генетическим линиям устанавливали методом мультилокусного секвенирования-типирования по общепринятой схеме [9]. Определение нуклеотидной последовательности внутренних участков проводили названных генов c помощью наборов секвенирования BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) и генетического анализатора ABI 3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystems). Идентификацию аллельных профилей и сиквенс-типа проводили с помощью программного обеспечения BioNumerics 7.1.

Бакалаврская работа состоит из введения, 3-х глав (обзор литературы, материалы и методы, результаты исследования), заключения, выводов, списка использованных источников, включающего 57 источников, и 3-х приложений (A, Б, В).

Основное содержание работы. Видовой состав изолятов — представителей семейства Enterobacteriaceae, выделенных в 2014 году, включал 16 видов, относящихся к 10 родам. Основными возбудителями, на долю которых приходится почти 80% всех изолятов, являются виды К. pneumoniae и Е. coli. Кроме того, значительный вклад внесли представители родов Enterobacter spp. (6,8%), Proteus spp. (5,4%), Serratia spp. (3,6%), Citrobacter spp. (1,2%), а также виды Klebsiella oxytoca и Morganella morganii — 2,95% и 0,9% соответственно. Доля остальных выделенных энтеробактерий составила 1%.

Исследование доли чувствительных/устойчивых микроорганизмов к отдельным карбапенемам позволяет прогнозировать эффективность успешного применения препаратов в клинике. Долю нечувствительных микроорганизмов определяли как совокупность умеренно-резистентных и резистентных изолятов (I+R). Так, нечувствительными к меропенему и имипенему считались микроорганизмы с МПК ≥ 4 мг/л. Фенотипически устойчивыми к эртапенему являлись изоляты с МПК от 1 мг/л и выше.

По результатам проведенных исследований нечувствительность к имипенему и меропенему демонстрировало 82 и 79 энтеробактерий соответственно, что составило 7,4% и 7,1% всех нозокомиальных изолятов. Устойчивость у эртапенему установлена для 215 микроорганизмов (19,3%). Анализируя результаты оценки чувствительности предыдущих лет, можно говорить об уверенном росте устойчивости к препаратам меропенему и эртапенему. В 2014 году отмечается снижение уровня устойчивости к имипенему в сравнении с предыдущими тремя годами (рисунок 1).

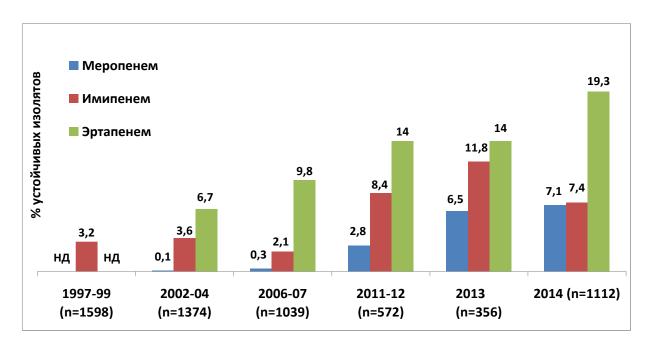


Рисунок 1 – Динамика чувствительности представителей семейства Enterobacteriaceae к карбапенемам по данным НИИАХ.

В результате проведенного молекулярно-генетического тестирования карбапенемазы различных типов обнаружены у 96 нозокомиальных энтеробактерий, что составляет 8,6% всех случаев внутрибольничной инфекции в 2014 году. Всего выявлено 4 типа ферментов из исследованных, относящихся к трем молекулярным классам. Среди металлоβ-лактамаз обнаружен фермент группы **NDM** (n=17).Сериновые карбапенемазы практически полностью представлены ОХА-48-подобными микроорганизмов (6,5% случаев). ферментами, ОНИ найдены y 72 У одного изолята К. pneumoniae стационара Санкт-Петербурга обнаружен фермент группы КРС. Отдельную группу составили микроорганизмы копродуценты ферментов ОХА-48 и NDM, всего было выявлено 6 подобных изолятов, что составляет 0,5% от всех нозокомиальных микроорганизмов.

Отдельно стоит отметить факт обнаружения продуцентов карбапенемаз среди возбудителей внебольничной инфекции. Всего зафиксировано 5 подобных случаев в 4 городах — Краснодаре, Смоленске, Тюмени и Набережных Челнах. У четырех из пяти изолятов выявлены ОХА-48-подобные ферменты и у одного — NDM карбапенемаза. В четырех случаях возбудителем являлась *К. рпеитопіае* и в одном *Е. coli*.

Большую часть всех нозокомиальных энтеробактерий-продуцентов карбапенемаз составили представители вида *К. pneumoniae* – 88% (n=89). Остальные виды, включая *E. coli*, *P. mirabilis* и *S. marcescens*, в совокупности составили десятую часть всех изолятов.

Карбапенемазо-продуцирующие энтеробактериии всего обнаружены в 10 городах России. В целом, основными очагами распространения являются крупные центры, такие как Москва, Санкт-Петербург и Краснодар, однако единичные случаи отмечаются и в относительно небольших городах (Смоленск, Ижевск, Набережные Челны), что может служить одним из признаков тенденции к повсеместному распространению. Санкт-Петербург оценивается как наиболее неблагоприятный по эпидемиологической обстановке город – в нем выявлены ферменты всех 4 групп.

Динамика выявления карбапенемаз среди нозокомиальных энтеробактерий представлена на рисунке 2.

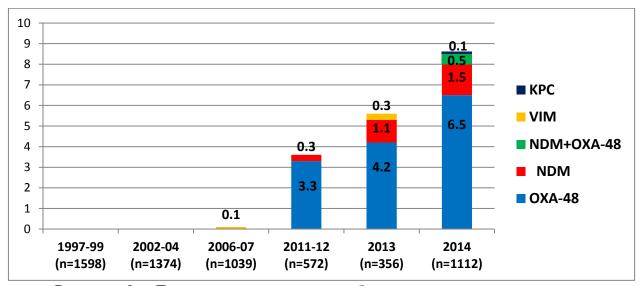


Рисунок 2 — Динамика выявления карбапенемазо-продуцирующих нозокомиальных представителей семейства Enterobacteriaceae в России по данным НИИАХ (%).

70 По клебсиелл, результатам генотипирования изолятов OXA-48, продуцирующих фермент принадлежат 13 К различным генетическим линиям, или сиквенс-типам (ST). Преобладающими из них являются ST 395 (n=29) и ST 147 (n=17). На их долю пришлось 66% всех ОХА-48-положительных клебсиелл. Генетическая линия ST 395 выявлена в 8 из 9 городов, где наблюдались продуценты ОХА-48. В стационарах Омска, Ростова-на-Дону Набережных Челнов, данная генетическая К. pneumoniae является единственной. Изоляты, относящиеся к ST 147, выявлены в одном из стационаров Москвы, Краснодаре и Ижевске. Для остальных 11 штаммов, как правило, характерно распространение в конкретных стационарах. Так, в Москве выявлены генетические линии 23, 48, 218 и 307, причем, только последняя характеризуется распространением более чем в одном стационаре. Специфичными для Краснодара являются сиквенс-типы 383, 336 и 15. Генетические линии ST 437 и ST 377 обнаружены исключительно в Санкт-Петербурге и Томске соответственно.

Кроме того, были выявлены новые сиквенс-типы -2 изолята из Томска с однонуклеотидной заменой G > T в 294 позиции локуса глюкозо-6-фосфатизомеразы, являющиеся однолокусным вариантом ST 101 и один изолят из Краснодара, характеризующийся ранее не описанной комбинацией известных аллелей (рисунок 3).

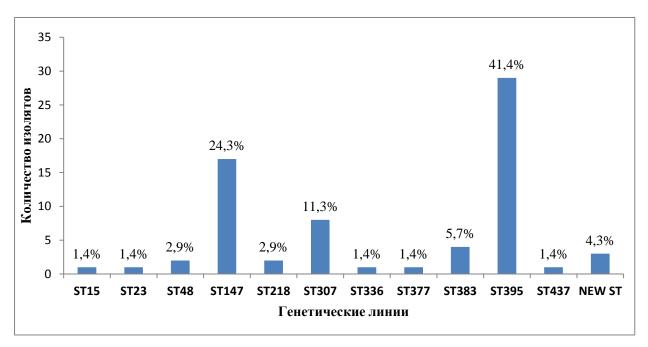


Рисунок 3 — Генетические линии OXA-48-продуцирующих изолятов *K. pneumoniae*.

Среди 12 продуцентов NDM металло-β-лактамазы выявлено 6 различных штаммов, из которых преобладали и имели распространение более чем в одном городе ST 395 (Москва, Краснодар) и ST 11 (Смоленск, Москва, Санкт-Петербург). Остальные генетические линии представлены единичными изолятами и характерны либо для Краснодара (ST 15, ST 383), либо для Санкт-Петербурга (ST 437, ST 1160). Причем, в Краснодаре изоляты названных штаммов характеризуются циркуляцией в двух различных учреждениях, в Санкт-Петербурге – в одном (рисунок 4).

Единственный продуцент сериновой карбапенемазы КРС-типа, выявленный в рамках данного исследования, относится к глобально распространенной генетической линии ST 258.

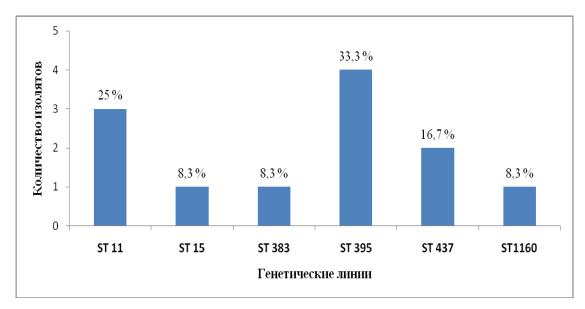


Рисунок 4 – Генетические линии NDM-продуцирующих изолятов *K. pneumoniae*.

Шесть изолятов, ко-продуцирующих ферменты ОХА-48 и NDM, выделены в одном стационаре в Санкт-Петербурге, 5 из них относятся к ST 1160 и один к ST 395. Интерес представляет то, что в этом же стационаре выделен изолят ST 1160, продуцирующий только NDM металло-фермент и ST 395, кодирующий карбапенемазу группы ОХА-48-подобных. Анализируя данную ситуацию, можно предположить, что мы являемся свидетелями горизонтального переноса генов устойчивости между представителями двух различных генетических линий и дальнейшего клонального распространения ко-продуцирующих изолятов.

Заключение. Таким образом, в работе рассмотрена проблема нозокомиальных карбапенемаз среди изолятов семейства выявления Enterobacteriaceae, a молекулярная эпидемиология также одного важнейших, в клиническом плане, представителей семейства – вида *К. pneumoniae*. Проведен анализ уровня клинической чувствительности энтеробактерий основным карбапенемам, определены основные детерминанты устойчивости, характерные энтеробактерий, ДЛЯ циркулирующих в ряде лечебных учреждений России.

В ходе исследования выявлено 4 типа карбапенемаз среди 6 видов энтеробактерий, основным возбудителем НИ и продуцентом карбапенемаз является вид *К. pneumoniae* – типичный представитель нозокомиальной флоры. Оценка динамики выявления продуцентов карбапенемаз стационарах РФ в 2014 году показала увеличение числа случаев продукции карбапенемаз в сравнение с 2013 годом в 1,5 раза. Отмечено самое высокое разнообразие выявленных типов ферментов за весь период исследования. В ходе молекулярно-генетического типирования продуцентов карбапенемаз *K*. вида pneumoniae выявлены основные генетические линии, циркулирующие в стационарах России. Полученные данные позволяют установить связь российских изолятов-продуцентов карбапенемаз мировыми генетическими линиями *K. pneumoniae*

Результаты работы могут служить основой для последующего эпидемиологического мониторинга представителей семейства Enterobacteriaceae. В дальнейшем, анализ резистома исследованных штаммов *К. pneumoniae* позволит сделать точные выводы об эпидемиологических путях распространения отдельных генетических линий.

Выводы:

- 1. Показан рост устойчивости к карбапенемам среди нозокомиальных штаммов семейства Enterobacteriaceae в России в период с 2006 по 2014 г.
- 2. В 2014 году продукция карбапенемаз выявлена у 96 (8,6%) нозокомиальных изолятов, среди которых на долю *К. pneumoniae* пришлось 88% всех продуцентов.
- 3. Преобладающим типом карбапенемаз, выявленном у штаммов из 9 городов, является фермент группы ОХА-48. Металлофермент группы NDM обнаружен в 5 городах.
- 4. В одном из стационаров Санкт-Петербурга отмечено распространение штаммов, ко-продуцирующих ОХА-48 и NDM, а также обнаружен единственный изолят, продуцирующий КРС-карбапенемазу.

5. Определены основные генетические линии среди продуцентов карбапенемаз вида *К. pneumoniae*, а именно: ST 395, ST 147 среди продуцентов ОХА-48; ST 11 и ST 395 у NDM-продуцентов; ST 258 у изолята, продуцирующего фермент типа KPC; ST 1160 — ко-продуцентов ферментов ОХА-48 и NDM.

Список использованных источников

- 1. At UN, global leaders commit to act on antimicrobial resistance [Электронный ресурс]: // United Nations News Centre [Электронный ресурс]: [сайт]. URL: http://www.un.org/apps/news/story.asp?NewsID=55011# (дата обращения: 13.02.2017). Загл. с экрана. Яз. англ.
- 2. The Global Risks Report 2016, 11th Edition [Электронный ресурс]: // World Economic Forum [Электронный ресурс]: [сайт]. URL: http://www3.weforum.org/docs/GRR/WEF_GRR16.pdf (дата обращения: 16.02.2017). Загл. с экрана. Яз. англ.
- 3.Using Antibiotics Wisely [Электронный ресурс]: // Project Sindicate [Электронный ресурс] : [сайт]. URL: https://www.project-syndicate.org/commentary/using-antibiotics-wisely-by-jim-o-neill-2015-09 (дата обращения 16.02.2017). Загл. с экрана. Яз. англ.
- 4. Козлов, Р. С. Нозокомиальные инфекции: эпидемиология, патогенез, профилактика, контроль / Р. С. Козлов // Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. 2000. Т. 2, № 1. С. 16-30.
- 5. Антибиотикорезистентность нозокомиальных штаммов Enterobacteriaceae в стационарах России: результаты многоцентрового эпидемиологического исследования МАРАФОН в 2011-2012 гг. / М. В. Сухорукова [и др.] // Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. 2014. Т. 16, № 4. С. 254-265.

- 7. Occurrence of carbapenemase-producing *Klebsiella pneum*oniae and *Escherichia coli* in European survey of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae (EuSCAPE): a prospective, multinational study / H. Grundmann [et al.] // The Lancet Infectious Diseases. 2017. V. 17, № 2. P. 153-163.
- 8. Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae in Europe: assessment by national experts from 38 countries, May 2015 / B. Albiger [et al.] // Eurosurveillance. 2015. V. 20, № 45. P. 1-18.
- 9. Multilocus sequence typing of *Klebsiella pneumoniae* nosocomial isolates / L. Diancourt [et al.] // Journal of Clinical Microbiology. 2005. V. 43, № 8. P. 4178-4182.

Muspelor