

Чувствительность грамотрицательных бактерий, продуцентов карбапенемаз, к антибиотикам различных групп

В.А. АГЕЕВЕЦ¹, И. В. ПАРТИНА¹, Е. С. ЛИСИЦЫНА², И. М. БАТЫРШИН⁴,
Л. Н. ПОПЕНКО⁴, С. А. ШЛЯПНИКОВ⁴, Е. Н. ИЛЬИНА³, С. В. СИДОРЕНКО¹

¹ НИИ детских инфекций ФМБА России, Санкт-Петербург

² ООО НПФ Литех, Москва

³ НИИ физико-химической медицины ФМБА России, Москва

⁴ НИИ скорой помощи им. Джанелидзе, Санкт-Петербург

Susceptibility of Gramnegative Carbapenemase-Producing Bacteria to Various Group Antibiotics

V. A. AGEEVETS, I. V. PARTINA, E. S. LISITSINA, I. M. BATYRSHIN, L. N. POPENKO, S. A. SHLYAPNIKOV, E. N. ILYINA, S. V. SIDORENKO

Research Institute of Children's Infections, St. Petersburg

Litekh, Moscow

Research Institute of Physico-Chemical Medicine, Moscow

Dzhanelidze Research Institute of Emergent Medical Service, St. Petersburg

В исследование включено 25 изолятов грамотрицательных бактерий, продуцирующих карбапенемазы. 17 изолятов *Klebsiella pneumoniae* продуцировали карбапенемазу NDM-1 и проявляли высокий уровень устойчивости к цефалоспорином (МПК>128 мкг/мл), карбапенемам (МПК>16 мкг/мл), аминогликозидам и фторхинолонам, однако среди этих изолятов 4 сохраняли чувствительность к азтреонаму, и все они были чувствительны к тигециклину и полимиксину. Два изолята *Acinetobacter genomospecies* 13 продуцировали NDM-1, они были устойчивы ко всем беталактам и амикацину, но сохраняли чувствительность к гентамицину, ко-тримоксазолу, тигециклину и полимиксину, чувствительность к ципрофлоксацину была снижена. Карбапенемазу VIM-4 продуцировали два изолята *Enterobacter cloacae*, они демонстрировали высокий уровень устойчивости к цефалоспорином и азтреонаму, но при этом между цефепимом и клавуланатом проявлялся выраженный синергизм. Уровень устойчивости к карбапенемам у этих изолятов был невысоким (МПК 0,5—4,0 мкг/мл), они были также устойчивы к аминогликозидам и ципрофлоксацину, но чувствительны к тигециклину и полимиксину. Карбапенемазы KPC-2 были выявлены у двух изолятов *K.pneumoniae* и у одного изолята *E.cloacae*. Перечисленные изоляты были устойчивы ко всем беталактам, ципрофлоксацину, аминогликозидам и ко-тримоксазолу. Один изолят *E.cloacae* проявлял устойчивость к тигециклину, и один изолят *K.pneumoniae* — к полимиксину. У одного изолята *K.pneumoniae* была обнаружена карбапенемаза OXA-48, он был устойчив ко всем беталактам, ципрофлоксацину, ко-тримоксазолу, но чувствителен к аминогликозидам, тигециклину и полимиксину.

Ключевые слова: карбапенемазы, продуценты, грамотрицательные бактерии, антибиотикограммы.

The study involved 25 isolates of gramnegative carbapenemase-producing bacteria. 17 isolates of *Klebsiella pneumoniae* produced carbapenemase NDM-1 and were highly resistant to cephalosporins (MIC>128 mcg/ml), carbapenems (MIC>16 mcg/ml), aminoglycosides and fluoroquinolones, while among them 4 isolates preserved susceptibility to aztreonam and all of them were susceptible to tigecycline and polymyxin. 2 isolates of *Acinetobacter genomospecies* 13 produced NDM-1 and were resistant to all the beta-lactams and amikacin, while preserved susceptibility to gentamicin, co-trimoxazole, tigecycline and polymyxin, the susceptibility to ciprofloxacin being lowered. Carbapenemase VIM-4 was produced by 2 isolates of *Enterobacter cloacae*, which were highly resistant to cephalosporins and aztreonam, significant synergism being observed between cefepim and clavulanate. The resistance of the isolates to carbapenems was low (MIC 0.5—4.0 mcg/ml), they also being resistant to aminoglycosides and ciprofloxacin and susceptible to tigecycline and polymyxin. Carbapenemases KPC-2 were detected in 2 isolates of *K.pneumoniae* and in 1 isolate of *E.cloacae*. The above isolates were resistant to all the beta-lactams, ciprofloxacin, aminoglycosides and co-trimoxazole. 1 isolate of *E.cloacae* showed resistance to tigecycline and 1 isolate of *K.pneumoniae* was resistant to polymyxin. Carbapenemase OXA-48 was detected in 1 isolate of *K.pneumoniae*. It was resistant to all the beta-lactams, ciprofloxacin and co-trimoxazole and susceptible to aminoglycosides, tigecycline and polymyxin.

Key words: carbapenemases, producers, gramnegative bacteria, antibioticograms.

В течение более 30 лет карбапенемы составляли основу этиотропной терапии тяжёлых инфек-

ций, вызванных грамотрицательными бактериями, устойчивыми к антибиотикам других групп. Однако в последние годы наблюдается быстрое распространение резистентности и к этим антибиотикам. Резистентность к карбапенемам может быть обусловлена несколькими механизмами, но

© Коллектив авторов, 2013

Адрес для корреспонденции: 197022, Санкт-Петербург, ул. Профессора Попова, д.9. НИИ детских инфекций

основную угрозу представляют ферменты карбапенемазы [1], гены которых локализованы на различных подвижных генетических элементах, что определяет их способность к быстрому внутри- и межвидовому распространению.

Первоначально карбапенемазы выявляли преимущественно среди штаммов *Pseudomonas aeruginosa*, но в настоящее время они быстро распространяются среди других грамотрицательных бактерий, прежде всего среди представителей семейства Enterobacteriaceae.

Между географическими регионами наблюдаются различия в распространении отдельных карбапенемаз, но в целом наибольшее значение имеют следующие: КРС-тип (молекулярный класс А), группа ферментов ОХА-типа (молекулярный класс D) и обширная группа ферментов молекулярного класса В (IMP-тип, VIM-тип, SPM-тип и GIM-тип, SIM-тип, AIM-тип). К классу В также относится необычайно быстро распространяющаяся и эволюционирующая группа ферментов NDM-типа [2].

Целью работы явилось определение чувствительности грамотрицательных бактерий, продуцирующих карбапенемазы, к антибиотикам различных групп.

Материал и методы

В исследование были включены грамотрицательные бактерии, продуцирующие карбапенемазы различных групп, выделенные в стационарах Санкт-Петербурга в 2011—2013 гг. Определение чувствительности к антимикробным препаратам проводили методом серийных микроразведений в бульоне Мюллера-Хинтона (BD, США) согласно рекомендациям CLSI [3] в 96-луночных планшетах для иммунологических исследований. МПК определяли для следующих антибиотиков: цефотаксим (CTX), цефепим (FEP), цефтазидим (CAZ), гентамицин (GEN), амикацин (AN), имипенем (IMP), дорипенем (DOR), меропенем (MEM), ко-тримоксазол (SXT), тигециклин (TGC), полимиксин (PB), азтреонам (AZT), ципрофлоксацин (CIP), цефепим/клавуланат (FEP/CL), цефтазидим/клавуланат (CAZ/CL), цефоперазон/сульбактам (CFP/SU).

Для приготовления рабочих растворов антибиотиков использовали субстанции антибактериальных препаратов с известной активностью (Sigma Aldrich). Микропланшеты с внесённым туда бульоном Мюллера-Хинтона и 2-кратными разведениями антибиотиков сохранялись до использования при -80°C . Перед тестированием культур микропланшеты однократно размораживались.

Постановка МПК проводилась микрометодом при величине конечного объёма 0,2 мл. Постановка каждой новой серии планшетов сопровождалась тремя контролями: контроль пригодности используемых антибактериальных препаратов со штаммом *E.coli* ATCC 25922, контроль роста тестируемых штаммов и контроль стерильности используемого субстрата (бульона Мюллера-Хинтона). Для интерпретации результатов оценки чувствительности использовали критерии CLSI [3] и EUCAST [4].

Результаты исследований

Результаты оценки антибиотикочувствительности продуцентов карбапенемаз представлены в таблице. Изоляты *K.pneumoniae*, продуцирующие

NDM-1 проявляли высокий уровень устойчивости к подавляющему большинству бета-лактамов антибиотиков. МПК цефотаксима, цефепима, комбинаций этих антибиотиков с клавулановой кислотой, а также цефоперазона/сульбактама были равны или превышали 128 мкг/мл, МПК карбапенемов были равны или превышали 16,0 мкг/мл. Определённые различия были выявлены лишь по уровню чувствительности к азтреонаму. Четыре изолята проявляли чувствительность, а 13 — устойчивость. Известно, что азтреонам устойчив к гидролизу многими карбапенемазами, в том числе и NDM-1. Появление у части изолятов устойчивости к этому антибиотику, вероятно, связано с приобретением ими генов бета-лактамаз расширенного спектра. Все *K.pneumoniae*, продуцирующие NDM-1, были также высокоустойчивы к ципрофлоксацину, аминогликозидам и ко-тримоксазолу, но сохраняли чувствительность к тигециклину и полимиксину.

Продукция карбапенемаз NDM-1 была также выявлена у двух изолятов *Acinetobacter genomospecies* 13. Эти изоляты были высокоустойчивы к цефалоспорином (МПК > 64,0 мкг/мл) и карбапенемам (МПК > 16,0 мкг/мл), демонстрировали умеренное снижение чувствительности к ципрофлоксацину, в то же время они сохраняли чувствительность к аминогликозидам, ко-тримоксазолу, полимиксину и тигециклину.

Два изолята *Enterobacter cloacae*, продуцирующие карбапенемазы VIM-4, демонстрировали высокий уровень устойчивости к цефалоспорином и азтреонаму (МПК > 64,0 мкг/мл) и невысокий уровень устойчивости к карбапенемам (МПК 0,5—4,0 мкг/мл). Оба изолята демонстрировали синергизм цефепима и клавулановой кислоты (снижение МПК более чем в 4 раза), при отсутствии синергизма цефтазидима с клавулановой кислотой. Наиболее вероятным объяснением такого фенотипа может быть наличие у изолята бета-лактамаз расширенного спектра класса А, а также бета-лактамаз класса С (плазмидных либо хромосомных гиперпродуцентов). Оба изолята были также высокоустойчивы к ципрофлоксацину и аминогликозидам, демонстрировали незначительное снижение чувствительности к ко-тримоксазолу, но сохраняли чувствительность к полимиксину и тигециклину.

Карбапенемазы КРС-2 продуцировали два изолята *K.pneumoniae* и один — *E.cloacae*. Изоляты *K.pneumoniae*, продуцирующие КРС-2, были высокоустойчивы ко всем бета-лактамам, ципрофлоксацину и ко-тримоксазолу, но несколько различались по другим признакам. Одни изолят был устойчив к полимиксину и гентамицину, а другой сохранял чувствительность к этим антибиотикам. Оба изолята были чувствительны к тигециклину и амикацину. Изолят *E.cloacae* прояв-

лял устойчивость к цефалоспорином и карбапенемам, ципрофлоксацину, ко-тримоксазолу и гентамицину, а также к тигециклину, но сохранял чувствительность к полимиксину и амикацину.

Изолят *K.pneumoniae*, продуцирующий карбапенемазу ОХА-48, был высокоустойчив ко всем беталактам, ципрофлоксацину и ко-тримоксазолу, но сохранял чувствительность к аминогликозидам, тигециклину и полимиксину.

Обсуждение результатов

Лечение инфекций, вызванных грамотрицательными бактериями, продуцирующими карбапенемазы, относится к наиболее сложным проблемам антибактериальной химиотерапии, прежде всего, из-за недостатка данных и, как следствие, отсутствия общепринятых рекомендаций. В недавнем обзоре, посвящённом *K.pneumoniae*, продуцирующим карбапенемазы, авторам удалось собрать данные лишь о 301 случае лечения соответствующих инфекций, причём более половины случаев приходилось на продуценты КРС [5]. Применявшиеся режимы были крайне разнообразны, в виде монотерапии и в виде различных комбинаций использовали карбапенемы, колистин, тигециклин и аминогликозиды. Именно к перечисленным препаратам продуценты карбапенемаз могут сохранять чувствительность либо демонстрировать невысокий уровень устойчивости. В приведённом выше обзоре было показано, что карбапенемы сохраняют клиническую эффективность при МПК, равной 8,0 мкг/мл и ниже. Это значение совпадает с критериями EUCAST (ус-

МПК антибиотиков основных групп в отношении грамотрицательных бактерий, продуцирующих различные карбапенемазы

№ штамма	Фермент	Вид микроорганизма	МПК антибиотиков (в мкг/мл) и критерии чувствительности (S≤/R≥)													
			CTX	FER	FER/CL	CAZ	CAZ/CL	AZT	CIP/SU	IMP	MEM	DOR	CIP	GEN	AN	SXT
55	NDM-1	Kpn	>256	128	>128	>128	>128	0,12	>128	32	>16	>16	>256	>128	>256	>32
57	NDM-1	Kpn	>256	>128	>128	>128	>128	0,25	>128	>64	>16	>16	>256	>128	>256	>32
59	NDM-1	Kpn	>256	128	>128	>128	>128	0,12	>128	64	>16	>16	>256	>128	>256	>32
83	NDM-1	Kpn	>256	128	>128	>128	>128	0,25	>128	>64	>16	>16	>256	>128	>256	>32
28	NDM-1	Kpn	>256	128	>128	>128	>128	>64	>128	32	16	>16	>256	>128	>256	>32
49	NDM-1	Kpn	>256	128	>128	>128	>128	>64	>128	32	>16	>16	>256	>128	>256	>32
54	NDM-1	Kpn	>256	>128	>128	>128	>128	>64	>128	32	>16	>16	>256	>128	>256	>32
82	NDM-1	Kpn	>256	128	>128	>128	>128	>64	>128	32	>16	>16	>256	>128	>256	>32
107	NDM-1	Kpn	>256	128	>128	>128	>128	>64	>128	32	>16	>16	>256	>128	>256	>32
112	NDM-1	Kpn	>256	>128	>128	>128	>128	>64	>128	>64	>16	>16	>256	>128	>256	>32
409	NDM-1	Kpn	>256	128	>128	>128	>128	>64	>128	32	>16	>16	>256	>128	>256	>32
410	NDM-1	Kpn	>256	128	>128	>128	>128	>64	>128	32	16	>16	>256	>128	>256	>32
416	NDM-1	Kpn	>256	128	>128	>128	>128	>64	>128	32	>16	>16	>256	>128	>256	>32
456	NDM-1	Kpn	>256	128	>128	>128	>128	>64	>128	32	>16	>16	>256	>128	>256	>32
458	NDM-1	Kpn	>256	128	>128	>128	>128	>64	>128	32	>16	>16	>256	>128	>256	>32
524	NDM-1	Kpn	>256	>128	>128	>128	>128	>64	>128	>64	>16	>16	>256	>128	>256	>32
552	NDM-1	Kpn	>256	>128	>128	>128	>128	>64	>128	32	>16	>16	>256	>128	>256	>32
N152	NDM-1	Ac,gs13	>256	>128	>128	>128	>128	>64	>128	>64	>16	>16	2	0,5	16	0,5
N199	NDM-1	Ac,gs13	>128	>128	64	>128	64	>64	>128	>16	>16	>16	0,5	1,0	16	1
31	VIM-4	Ecl	>256	>128	8	>128	>128	>64	>128	4	1	4	>256	>128	>256	8
34	VIM-4	Ecl	>256	128	8	>128	>128	>64	>128	2	0,5	2	>256	>128	>256	2
565	KPC-2	Kpn	>256	>128	>128	>128	>128	>64	>128	>64	>16	>16	>256	128	1	>32
570	KPC-2	Kpn	>256	>128	>128	>128	>128	>64	>128	>64	>16	>16	>256	0,5	16	32
566	KPC-2	Ecl	>256	>128	>128	128	128	>64	>128	16	8	>16	>256	64	1	>32
485	OXA-48	Kpn	>256	>128	>128	>128	128	>64	128	8	>16	>16	>256	0,12	2	>32

Примечание. ¹ — критерии CLSI отсутствуют, использованы критерии EUCAST; ² — критерии CLSI отсутствуют, использованы критерии EUCAST для колистина; Kpn — *K.pneumoniae*; Ac, gs13 — *Acinetobacter genotomoreses* 13; Ecl — *E.coliaceae*.

стойчивыми к имипенему и меропенему считаются изоляты при МПК > 8 мкг/мл), но выше критерия CLSI (устойчивыми к имипенему, меропенему и дорипенему считаются изоляты при МПК > 4,0 мкг/мл).

Известно, что уровень и спектр ассоциированной резистентности у продуцентов различных карбапенемаз может существенно различаться. Среди бактерий-продуцентов, выделенных в Санкт-Петербурге, наибольшей устойчивостью характеризовались *K. pneumoniae*, продуцирующие металло-бета-лактамазы NDM-1. Они проявляли высокий уровень устойчивости ко всем антибиотикам, кроме полимиксина и тигециклина. Важно отметить высокий уровень устойчивости к карбапенемам (МПК > 16,0 мкг/мл), что не позволяет рассчитывать на эффективность этих антибиотиков даже при применении в максимальных дозах. Определённый интерес представляет то, что некоторая часть изолятов сохраняла чувствительность к азтреонаму. Этот антибиотик может быть использован для лечения в случае подтверждения чувствительности возбудителя, но не для эмпирической терапии.

Другие продуценты карбапенемаз демонстрировали несколько более широкий спектр чувствительности к антибиотикам. Так, *Acinetobacter genomospecies* 13 в дополнение к полимиксину и тигециклину сохранял чувствительность к аминогликозидам и ко-тримоксазолу, а также демонстрировали невысокий уровень устойчивости к цiproфлоксацину. Продуценты металло-бета-лактамазы VIM-4 проявляли невысокий уровень устойчивости к карбапенемам (МПК > 8,0 мкг/мл), что позволяет рассчитывать на определённую эффективность этих антибиотиков. Продуценты KPC-2 и OXA-48 частично сохраняли чувствительность к аминогликозидам. В отношении одного изолята, продуцирующего KPC-2, умеренную активность сохранял меропенем.

ЛИТЕРАТУРА

1. Nordmann P., Naas T., Poirel L. Global spread of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. Emer Infect Dis 2011; 17: 1791–1798.
2. Johnson A. P., Woodford N. Global spread of antibiotic resistance: the example of New Delhi metallo-beta-lactamase (NDM)-mediated carbapenem resistance. J Med Microbiol 2013; 62: 499–513.
3. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standard for antimicrobial susceptibility testing. Nineteenth Informational Supplement Document M100-S22. CLSI, Wayne, PA. 2012.
4. The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 3.0, 2013. <http://www.eucast.org>.
5. Tzouveleki L. S., Markogiannakis A., Psichogiou M., Tassios P. T., Daikos G. L. Carbapenemases in *Klebsiella pneumoniae* and other Enterobacteriaceae: an evolving crisis of global dimensions. Clin Microbiol Rev 2012; 25: 682–707.
6. Biswas S., Brunel J. M., Dubus J. C., Reynaud-Gaubert M., Rolain J. M. Colistin: an update on the antibiotic of the 21st century. Expert Rev Anti Infect Ther 2012; 10: 917–934.
7. Stein G. E., Babinchak T. Tigecycline: an update. Diagn Microbiol Infect Dis 2013; 75: 331–336.

В целом следует отметить, что наибольшую чувствительность продуценты карбапенемаз проявляли к полимиксину и тигециклину. Однако место этих антибиотиков в лечении тяжёлых инфекций, прежде всего вызванных продуцентами карбапенемаз, окончательно не определено. Так, к полимиксину проявляют природную устойчивость такие важные возбудители нозокомиальных инфекций, как *Proteus mirabilis*, *Serratia marcescens* и *Morganella morganii*. Серьёзной проблемой для этого антибиотика является нефротоксичность. Обсуждается вопрос о целесообразности применения полимиксина в комбинации с другими антибиотиками (карбапенемами, тетрациклинами и рифампином) [6].

Для тигециклина также характерны некоторые ограничения в спектре действия (природная устойчивость *Pseudomonas aeruginosa* и *Proteus*), однако профиль безопасности намного более благоприятный, чем у полимиксина. Официально применение тигециклина разрешено при инфекциях кожи и мягких тканей, интраабдоминальных инфекциях и внебольничной пневмонии. Однако в настоящее время проводятся многочисленные исследования по применению этого антибиотика при госпитальной пневмонии, в том числе и связанной с искусственной вентиляцией лёгких, инфекциях мочевыводящих путей, сепсисе, вызванном множественноустойчивыми бактериями [7].

В тех учреждениях, где карбапенемазы стали реальностью, целесообразно рассмотреть вопрос о включении тигециклина и, возможно, полимиксина в схемы эмпирической терапии тяжёлых инфекций у отдельных групп пациентов. Не исключено, что более широкое применение тигециклина несколько снизит селективный прессинг карбапенемов и приведёт к сдерживаю распространения карбапенемаз.