

**МОНИТОРИНГ РАСПРОСТРАНЕНИЯ НОЗОКОМИАЛЬНЫХ ШТАММОВ  
НЕФЕРМЕНТИРУЮЩИХ ГРАМОТРИЦАТЕЛЬНЫХ БАКТЕРИЙ (НФГОБ)  
В МНОГОПРОФИЛЬНЫХ СТАЦИОНАРАХ г. АЛМАТЫ**

Д.А. Адамбеков<sup>1</sup>, А.Л. Бисекенова<sup>2</sup>, Б.А. Рамазанова<sup>2</sup>, Ш.М. Нурмолдин<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Кыргызская Государственная медицинская академия им. И.К. Ахунбаева,  
г. Бишкек, Кыргызская Республика

<sup>2</sup> Казахский национальный медицинский университет им. С.Д. Асфендиярова,  
г. Алматы, Республика Казахстан

**Резюме.** В настоящей работе представлены данные исследования распространенности и молекулярной эпидемиологии неферментирующих грамотрицательных бактерий (НФГОБ), продуцирующих карбапенемазы молекулярного класса D и металло-β-лактамазы в г. Алматы (Казахстан) в период 2015-2016 гг. Доля изолятов НФГОБ в общей этиологической структуре хирургических инфекций составляет 14,5%. Преобладающими видами были *P.aeruginosa* и *A.baumannii*.

У 33,3% изолятов *A.baumannii* выявлено наличие генов приобретенных карбапенемаз молекулярного класса D (ОХА-23). Изоляты *A.baumannii* были абсолютно резистентны к пиперациллину (100%), цефтазидиму (100%), цефепиму (100%), гентамицину (100%), цiproфлорксацину (100%), левофлорксацину (100%). Наибольшую активность в их отношении проявляли карбапенемы: имипенем (66,7% чувствительных изолятов) и меропенем (55,6%); из аминогликозидов - тобрамицин (77,8%).

У 20% изолятов *P.aeruginosa* выявлена продукция металло-β-лактамаз (MBL) VIM-2 типа. Большинство изолятов *P.aeruginosa* были также нечувствительны к фторхинолонам: цiproфлорксацину (80%) и левофлорксацину (50%), аминогликозидам: гентамицину (50%) и тобрамицину (80%), цефалоспорином: цефтазидиму (60%) и цефепиму (40%).

**Ключевые слова:** неферментирующие грамотрицательные бактерии (НФГОБ), *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii*, карбапенемазы, металло-β-лактамазы, антибиотикорезистентность.

**АЛМАТЫ ШААРЫНЫН КӨП ПРОФИЛДҮҮ ООРУКАНАЛАРЫНЫН,  
ФЕРМЕНТТЕЙ АЛБАГАН ГРАМ ТЕРС БАКТЕРИЯЛАРЫНЫН МОНИТОРИНГИ**

Д.А. Адамбеков<sup>1</sup>, А.Л. Бисекенова<sup>2</sup>, Б.А. Рамазанова<sup>2</sup>, Ш.М. Нурмолдин<sup>2</sup>

<sup>1</sup> И.К. Ахунбаев атындагы Мамлекеттик медициналык академиясы.

Бишкек ш., Кыргыз Республикасы

<sup>2</sup> С.Д. Асфендияров атындагы Казак улуттук медициналык университети.

Алматы ш., Казахстан Республикасы

**Корутунду:** 2015-2016 ж.ж. арасында, Алматы шаарынын (Казахстан) D тобундагы молекулалардын карбапенемаза жана металло-β-лактамазанын ферменттей албаган, грам терс бактериялардын эпидемиологиясы жана таркалышы жөнүндө маалымат ушул эмгекте чагылдырылган. Этиологиялык жактан эң негизги хирургиялык тармакта 14,5 % ферменттей албаган грам терс бактериялары тузгон. Эң негизгиси болуп, *P.aeruginosa* жана *A.baumannii* түзгөн.

Ал эми 33,3% *A.baumannii* бактериясында карбапенемаз D тобундагы (ОХА -23) тубаса гени табылган. *A.baumannii* көбүнчө пиперациллинге (100%), цефтазидимге (100%), цефепимге (100%), гентамицинге (100%), цiproфлорксацинге (100%), левофлорксацинге (100%) туруктуу экендиги аныкталган.

Эң жогорку активдүүлүктү карбапенемге: имипенем (66,7%) жана меропенем (55,6%), ал эми аминогликозиддерге : тобрамицин (77,8%) түзгөн.

*P.aeruginosa* 20% болсо металло-β-лактамазага VIM -2 түрүнө болгон.

*P.aeruginosa* көбүнчөсү фторхинолонго: цiproфлорксацинге (80%) жана левофлорксацинге (50%), аминогликозиддерге: гентамицинге (50%), тобрамицинге (80%), цефалоспоринге: цефтазидимге (60%) жана цефепимге (40%) туруктуу эместиги аныкталган.

**Негизги сөздөр:** ферменттей албаган грам терс бактериялар, *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii*, карбапенемаза, металло-β-лактамаза, антибиотикке туруктуулук.

THE MONITORING OF THE SPREADING OF NOSOCOMIAL STRAINS  
OF NON-FERMENTATIVE GRAM-NEGATIVE BACTERIA (PHOB)  
IN THE MULTI-FIELD HOSPITALS OF ALMATY

D.A. Adambekov<sup>1</sup>, A.L. Bissekenova<sup>2</sup>, B.A. Ramazanova<sup>2</sup>, SH.M. Nurmoldin<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Kyrgyz State Medical Academy n.a. I.K. Akhunbaev, Bishkek, Kyrgyz Republic

<sup>2</sup> Asfendiyarov Kazakh National Medical University, Almaty, Republic of Kazakhstan

**Resume.** This paper presents research data on the prevalence and molecular epidemiology of gram-negative non-fermenting bacteria (PHOB), which produce carbapenemase molecular class D and metallo- $\beta$ -lactamase in Almaty (Kazakhstan) in the period of 2015-2016. The proportion of isolates PHOB in the common etiological pattern of surgical infections is 14.5%. The predominant species were *P. aeruginosa* and *A. baumannii*. 33.3% of isolates of *A. baumannii* revealed the presence of genes acquired carbapenemase of molecular class-D (OXA-23). *A. baumannii* isolates were absolutely resistant to piperacillin (100%), ceftazidime (100%), cefepime (100%), gentamycin (100%), ciprofloxacin (100%), levofloxacin (100%). The most active of the carbapenems: imipenem (66,7% of sensitive isolates), meropenem (55,6%); of the aminoglycosides: tobramycin (77,8%).

20% of *P. aeruginosa* isolates revealed production of metallo- $\beta$ -lactamase (MBL) VIM-2 type. Most isolates of *P. aeruginosa* were also insensitive to fluoroquinolones: ciprofloxacin (80%) and levofloxacin (50%), aminoglycosides: gentamycin (50%) and tobramycin (80%), cephalosporins: ceftazidime (60%) and cefepime (40%).

**Key words:** non-fermenting gram-negative bacteria (PHOB), *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii*, carbapenemase, metallo- $\beta$ -lactamase, antibiotic resistance.

**Введение**

Неферментирующие грамотрицательные бактерии (НФГОБ) являются наиболее распространенными и проблемными в отношении антибиотикочувствительности возбудителями нозокомиальных инфекций [1, 2, 3]. По данным многоцентрового эпидемиологического исследования МАРА-ФОН в 2011-2012 гг. в Российской Федерации доля изолятов *Pseudomonas aeruginosa* среди всех бактериальных возбудителей нозокомиальных инфекций составила 20,2%, *Acinetobacter baumannii* – 14,8% [4, 5].

Для этих бактерий характерны множественные, сложные механизмы резистентности к антибиотикам: изменение проницаемости наружной клеточной мембраны, активация системы эффлюкса, продукция гидролизующих карбапенемы  $\beta$ -лактамаз (карбапенемаз), что усложняет выбор рациональной антибиотикотерапии. В связи с их низкой природной чувствительностью к большинству  $\beta$ -лактамовых антибиотиков, включая аминопенициллины и их комбинации с ингибиторами  $\beta$ -лактамаз для лечения инфекций, вызванных данными возбудителями обычно используются карбапенемы. Описаны различные карбапенемазы, принадлежащие к трем молекулярным классам А, D и В. В настоящее время отмечается рост приобретенной устойчивости к карбапенемам, связанный с распространением штаммов, продуцирующих металло- $\beta$ -лактамазы молекулярного класса В (MBL) и карбапенемазы молекулярного класса D [4-8].

Наиболее частыми продуцентами МБЛ VIM и IMP-типов являются бактерии рода *Pseudomonas*, а более значимым механизмом устойчивости к карбапенемам у нозокомиальных штаммов *Acinetobacter baumannii* в России, Беларуси, Центральном Казахстане (города Астана, Караганда) является продукция карбапенемаз класса D, относящихся к группам OXA-23, OXA-40 OXA-58 [8, 9].

Цель данного исследования: изучить распространенность и молекулярную эпидемиологию антибиотикорезистентных штаммов НФГОБ, выделенных от пациентов многопрофильных стационаров г. Алматы (Казахстан).

**Материал и методы**

В исследование были включены 214 клинически значимых бактериальных изолятов, собранные в рамках внутривузовского научного проекта: «Мониторинг резистентности возбудителей внебольничных и нозокомиальных инфекций к антимикробным препаратам и изучение его молекулярных механизмов» в двух многопрофильных стационарах (отделений гнойной хирургии, урологии ГКБ г. Алматы №4, 12). Материалом для микробиологических исследований служили: отделяемое раневых поверхностей, дренажей при абдоминальных инфекциях, моча. Из них 31 изолята НФГОБ, были изучены на предмет продукции БЛРС и карбапенемаз. Выделение и первичная идентификация бактериальных изолятов проводилась в лаборатории кафедры микробиологии КазНМУ им. С.Д. Асфендиярова. Окончательная

видовая идентификация и определение их чувствительности к антимикробным препаратам проводились в НКДЛ НИИ им. Атчабарова. Все исследованные изоляты были идентифицированы до вида и определена их антибиотико-чувствительность на бактериологическом автоматизированном анализаторе "VITEK-2 Compact", дополнительно использовали классический диско-диффузионный метод определения антибиотико-чувствительности на агаре Мюллера-Хинтона, согласно рекомендациям EUCAST [10].

Для фенотипического выявления продукции БЛРС использовали метод двойных дисков [11]. По наличию расширенной зоны подавления роста между дисками с цефтазидимом (CAZ, 30 мкг), цефепимом (CPM, 30 мкг) и диском, содержащим комбинацию амоксициллина с клавулановой кислотой (AMC 20/10 мкг). Для контроля

качества определения чувствительности использовали штаммы E.coli ATCC 25922, K.pneumoniae ATCC 700603 (ESBL+).

Детекцию наиболее распространенных и клинически значимых генов класса A (TEM1, STX-M1, SHV, OXA) для культур сподтвержденным ESBL-фенотипом проводили методом ПЦР [12]. Выделение геномной и плазмидной ДНК грамотрицательных бактерий проводили по стандартной методике с помощью набора Easy Pure Bacteria Genomic DNA Kit (выделение геномной ДНК) и Easy Pure Plasmid MiniPrep Kit (выделение плазмидной ДНК) (TransGenBiotech, Китай). Использовались по 5 мл 18-20-часовой культуры бактерий.

Использованные праймеры для проведения полимеразной цепной реакции на 4 пары генов БЛРС (TEM1, STX-M1, SHV, OXA) приведены в таблице 1.

Таблица 1

Использованные праймеры

Ген	Направление праймера	Последовательность	Длина продукта (п.н.)
OXA	f	ACACAATACATATCAACTTCGC	814
	r	AGTGTGTTTAGAATGGTGATC	
TEM1	f	TCAACATTTTCGTGTCGCCCT	765
	r	ACTACGATACGGGAGGGCTT	
SHV	f	GGTTATGCGTTATATTCGCC	865
	r	TTAGCGTTGCCAGTGCTC	
CTX-M1	f	ATGTGCAGYACCAGTAARGT	593
	r	TGGGTRAARTARGTSACCAGA	

Для ПЦР использовалось по 10 пмоль каждого праймера и 20 нг геномной и плазмидной ДНК бактерий, таким образом, проводилось 2 реакции на 1 образец. Использовался готовый мастер микс Platinum® PCR Super Mix (LifeTechnologies, CAUSA), объем реакции составлял 25 мкл, амплификацию проводили с использованием термоциклера BioRadIQ5 (Bio-Rad Laboratories, Inc., CAUSA) по следующему протоколу: 95°C – 5 мин, 95°C - 45сек, 53.5° (60°, 54°, 55°C) – 45 сек 35 циклов соответственно, 72°C – 45 сек, и окончательный отжиг 72°C – 10 мин. Последующая детекция генов осуществлялась на 1% агарозном геле с добавлением этидиум бромид. По образованию продукта амплификации делали заключение о наличии или отсутствии гена, характеризующегося определенной длиной, что давал нам качественные результаты.

Детекция генов карбапенемаз класса D (OXA-23), а также карбапенемаз класса B-металло-β-

лактамаз (VIM-2) у выделенных и идентифицированных нами бактериальных изолятов Acinetobacter baumannii, Pseudomonas aeruginosa проводилась методом ПЦР в режиме реального времени с использованием коммерческих наборов «АмплиСенс®.MDR Acinetobacter-OXA-FL» и «АмплиСенс®.MDR MBL-FL» (ФБУН Центральный НИИ эпидемиологии Роспотребнадзора, Россия) и системы Rotor-Gene 6000 (Corbett Research, Австралия) в НИИ антимикробной химиотерапии г.Смоленск в рамках участия в многоцентровом проекте APEX.

**Результаты и их обсуждение**

В этиологической структуре инфекций (n=214) в хирургических стационарах г. Алматы грамотрицательные микроорганизмы в совокупности занимают ведущую роль – 116 изолятов (54,2%). Из них доля изолятов неферментирующих грамотрицательных бактерий (НФГОБ) составляют 31 (14,49%) (рисунок).

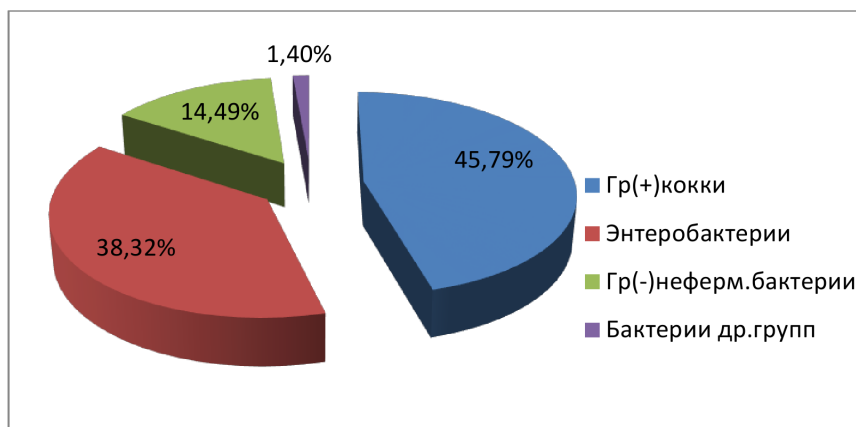


Рисунок. Этиологическая структура инфекций в многопрофильных стационарах г. Алматы.

Распределение видов в этиологической структуре выделенных изолятов неферментирующих грамотрицательных бактерий (НФГОБ) пред-

ставлена в таблице 2, неферментирующих грамотрицательных бактерий было выделено - 31, из них 10 штаммов - *Ps.aeruginosa*, 9 - *A.baumannii*.

Таблица 2

Видовой состав изолятов неферментирующих грамотрицательных бактерий (n=31)

Вид	Абс.кол-во	Отн.
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	10	32,26%
<i>Acinetobacter baumannii</i>	9	29,03%
<i>Sphingomonas paucimobilis</i>	6	19,36%
<i>Pseudomonas luteola</i>	3	9,68%
<i>Burkholderia cepacia</i>	2	6,45%
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	1	3,23%

Показатели степени чувствительности выделенных штаммов неферментирующих грамотрицательных микроорганизмов даны в таблице 3. Из 31 изолятов НФГОБ резистентность к цефалоспорином III-IV поколений проявили 19 штаммов, что составило 61,29%, из них *P.aeruginosa* –

6, *P.luteola* – 1, *A.baumannii* – 9, *Stenotrophomonas maltophilia* - 1 и 2 штамма *Burkholderia cepacia*. Наряду с нечувствительностью к цефалоспорином III-IV поколений резистентность к карбапенемам проявляли 4 изолята *A.baumannii*, 2- *P.aeruginosa*.

Таблица 3

Распределение выделенных штаммов НФГОБ (в %) по степени чувствительности к антибиотикам

Антибиотики	Ч %	МИК МКГ/МЛ	УР %	МИК МКГ/МЛ	Р %	МИК МКГ/МЛ
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (n=10)						
Пиперациллин	10	≤ 4	-	-	90	≥128
Цефтазидим	40	2-8	-	-	60	16-64
Цефепим	60	2-4	-	-	40	16-64
Меропенем	60	0,25-1	-	-	40	≥16
Имипенем	80	≤0,25	-	-	20	≥16
Амикацин	70	≤ 2	-	-	30	≥64
Гентамицин	50	≤1	-	-	50	8-16
Тобрамицин	20	≤1	-	-	80	8
Ципрофлоксацин	-	-	20	1	80	2-4
Левифлоксацин	40	0,5-1	10	2	50	≥8

Acinetobacter baumannii (n=9)						
Пиперациллин	-	-	-	-	100	≥128
Цефтазидим	-	-	-	-	100	≥64
Цефепим	-	-	-	-	100	32-64
Меропенем	55,6	0,25-1	-	-	44,4	≥16
Имипенем	66,7	≤0,25	-	-	33,3	≥16
Гентамицин	-	-	-	-	100	8-16
Тобрамицин	77,8	≤1	-	-	22,2	8
Ципрофлоксацин	-	-	-	-	100	≥4
Левифлоксацин	-	-	-	-	100	4-8
Триметоприм/сульфаметоксазол	44,4	≤20	-	-	55,6	≥320
Burkholderia ceracia (n=2)						
<u>Пиперациллин</u>	-	-	-	-	100	≥128
<u>Цефтазидим</u>	-	-	-	-	100	≥64
<u>Цефепим</u>	-	-	100	16	-	-
<u>Мерапенем</u>	100	≤0,25	-	-	-	-
<u>Имипенем</u>	100	≤0,25	-	-	-	-
<u>Амикацин</u>	100	≤2	-	-	-	-
<u>Гентамицин</u>	-	-	-	-	100	≥16
<u>Тобрамицин</u>	-	-	-	-	100	≥16
<u>Ципрофлоксацин</u>	-	-	-	-	100	≥4
<u>Левифлоксацин</u>	-	-	-	-	100	≥8

**Примечание.** Ч – чувствительность, Р – резистентность, УР – умеренная резистентность.

Pseudomonas aeruginosa. В ходе исследования было выделено 10 штаммов *P.aeruginosa*, 90% из них были нечувствительны (резистентны) к пиперациллину. К цефтазидиму резистентны были 6 штаммов, к цефепиму и меропенему резистентность проявляли 4 штамма. При ПЦР-детекции у 3 штаммов из них определены гены TEM1, отвечающие за продукцию БЛРС молекулярного класса А. Наиболее высокую активность в отношении выделенных штаммов *P.aeruginosa* проявляли карбапенемы: имипенем (80%), меропенем (70%); из аминогликозидов: амикацин (70% штаммов были чувствительными), из фторхинолонов: левифлоксацин – 40% штаммов. У 2 штаммов (20%), абсолютно резистентных на все группы антибиотиков, при ПЦР-детекции выявлены гены VIM-2, кодирующие выработку карбапенемазы молекулярного класса В: металло-β-лактамаз.

*Acinetobacter baumannii.* Все выделенные 9 штаммов *A.baumannii* проявляли абсолютную устойчивость к антибиотикам разных групп: пиперациллину (100%), цефтазидиму (100%), цефепиму (100%), гентамицину (100%), ципрофлоксацину (100%), левифлоксацину (100%). Наиболее активными препаратами в их отношении были карбапенемы: имипенем (66,7% чувствительных изолятов) и меропенем (55,6%); из аминогликозидов – тобрамицин (77,8%). Наряду с нечувствительностью к цефалоспорином III-IV поколений резистентность к карбапенемам (меропенему и

имипенему) проявляли 3 изолята *A.baumannii* (33,3%), у которых при генотипической детекции зарегистрированы гены приобретенных карбапенемазы класса D (ОХА-23). 2 изолята несли гены TEM1, отвечающие за выработку БЛРС молекулярного класса А.

*Burkholderia ceracia.* Выделенные 2 штамма были нечувствительны ко всем исследованным антибиотикам, кроме карбапенемов. При ПЦР-детекции у обоих штаммов обнаружены гены TEM1.

#### Заключение

Результаты нашего исследования свидетельствуют о том, что с точки зрения выбора антибактериальной терапии наиболее «проблемными» возбудителями нозокомиальных инфекций являются *Pseudomonas aeruginosa* и *Acinetobacter baumannii*.

Нами зарегистрированы МБЛ VIM-2 продуцирующие штаммы *P.aeruginosa* (20%), ОХА-23 карбапенемазы продуцирующие штаммы *A.baumannii* (33,3%) в стационарах г.Алматы, что свидетельствует о распространении и вероятной эпидемиологической связи с ранее описанными нозокомиальными штаммами на территории России, Беларуси и Центрального Казахстана [4,5,8,9].

Ассоциированная резистентность к антибиотикам всех классов, за исключением полимиксинов, ограничивает возможности терапии инфек-

ций, вызванных такими штаммами. В этой ситуации своевременная микробиологическая диагностика и строгое соблюдение мер инфекционного контроля в стационарах являются единственным путем сдерживания распространения МБЛ и карбапенемаз класса D.

**Литература.**

1. Kempf M., Rolain JM. Emergence of resistance to carbapenems in *Acinetobacter baumannii* in Europe: clinical impact and therapeutic options. // *Int J Antimicrob Agents*. – 201239 (2): 105-14.
2. Breidenstein EB, de la Fuente-Nunez C, Hancock RE. *Pseudomonas aeruginosa*: all roads lead to resistance. // *Trends Microbiol*. – 2011; 19(8):419-26.
3. Dijkshoorn L, Nemec A, Seifert H. An increasing threat in hospitals: multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. // *Nat Rev Microbiol*. – 20075 (12):939-51.
4. Сухорукова М.В., Эйдельштейн М.В., Склеенова Е.Ю. и др. Антибиотикорезистентность нозокомиальных штаммов *Pseudomonas aeruginosa* в стационарах России: результаты многоцентрового эпидемиологического исследования МАРАФОН в 2011-2012 гг. // *Клин микробиол антимикроб химиотер*. - 2014. - Том 16, №4. – С. 273-279.
5. Сухорукова М.В., Эйдельштейн М.В., Склеенова Е.Ю. и др. Антибиотикорезистентность нозокомиальных штаммов *Acinetobacter spp.* в стационарах России: результаты многоцентрового эпидемиологического исследования МАРАФОН в 2011-2012 гг. // *Клин микробиол антимикроб химиотер*. -2014. - Том 16, №4. – С. 266-272.
6. Pfeifer Y., Cullik A., Witte W. Resistance to cephalosporins and carbapenems in Gram-negative bacterial pathogens. // *Int J Med Microbiol*. – 2010. – 300(6):371-9.
7. Zarrilli R, Pournaras S, Giannouli M, Tsakris A. Global evolution of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* clonal lineages. // *Int J Antimicrob Agents*. – 2013. – 41(1):11-9.
8. Эйдельштейн М. В., Склеенова Е. Ю., Шевченко О. В. и др. Распространенность и молекулярная эпидемиология грамотрицательных бактерий, продуцирующих металло-бета-лактамазы, в России, Беларуси и Казахстане. // *Клин микробиол антимикроб химиотер*. - 2012. - Том 14, №2. – С. 132-152.
9. Азизов И. С., Захарова Е. А., Лавриненко А. В. и др. Многолетний мониторинг распространения штаммов НГОБ при госпитальных интраабдоминальных инфекциях в Центральном Казахстане. // *Клин микробиол антимикроб химиотер*. -2015. - Том 17, №2, Приложение 1. – С. 12-13.
10. The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Breakpoint Tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 4.0, 2014. (<http://www.eucast.org>).
11. Эйдельштейн М. В. Выявление бета-лактамаз расширенного спектра у грамотрицательных бактерий с помощью фенотипических методов. *Клин микробиол антимикроб химиотер*. - 2001; 3(2)183-189.
12. Monstein HJ, O'stholm-Balkhed A, Nilsson MV, Nilsson M, Dornbusch K & Nilsson LE (2007) Multiplex PCR amplification assay for the detection of blaSHV, blaTEM and blaCTX-M genes in Enterobacteriaceae. *APMIS* 115: 1400-1408.