

**ЗНАЧЕНИЕ МЕТАЛЛО- $\beta$ -ЛАКТАМАЗ  
В ФОРМИРОВАНИИ И РАСПРОСТРАНЕНИИ УСТОЙЧИВОСТИ  
СИНЕГНОЙНОЙ ПАЛОЧКИ К КАРБАПЕНЕМАМ В БЕЛАРУСИ:  
РЕЗУЛЬТАТЫ МНОГОЦЕНТРОВОГО ИССЛЕДОВАНИЯ**

**Тапальский Д. В., Осипов В. А., Левшина Н. Н., Славинская А. А., Окулич В. К.,  
Копычко А. Н., Ребеко Л. Н., Кузнецов О. Е., Дысько А. В., Склеенова Е. Ю.,  
Романов А. В., Эйдельштейн М. В.**

**Учреждение образования**

**«Гомельский государственный медицинский университет»  
г. Гомель, Республика Беларусь**

**Учреждение**

**«Минский городской центр гигиены и эпидемиологии»  
г. Минск, Республика Беларусь**

**Учреждение образования**

**«Витебский государственный медицинский университет»  
г. Витебск, Республика Беларусь**

**Учреждение**

**«Могилевский областной центр гигиены, эпидемиологии и общественного здоровья»  
г. Могилев, Республика Беларусь**

**Учреждение здравоохранения**

**«Гродненская областная клиническая больница»  
г. Гродно, Республика Беларусь**

**Учреждение**

**«Научно-исследовательский институт антимикробной химиотерапии»  
г. Смоленск, Российская Федерация**

Широкое распространение устойчивости *Pseudomonas aeruginosa* к антибактериальным препаратам представляет серьезную проблему для здравоохранения. Проблемы выбора адекватного стартового режима антибактериальной терапии в наибольшей степени связаны с тем, что нозокомиальные штаммы *P. aeruginosa* обычно характеризуются устойчивостью ко многим потенциально эффективным антибиотикам, в частности, антипсевдомонадным пенициллинам и цефалоспорином, карбапенемам, аминогликозидам, фторхинолонам. Большинство штаммов *P. aeruginosa*, выделяемых у больных, находящихся в отделениях реанимации и интенсивной терапии (ОРИТ), являются полирезистентными, т. е. проявляющими устойчивость к 3 и более потенциально эффективным антибиотикам. Панрезистентные (устойчивые ко всем противосинегнойным препаратам) штаммы *P. aeruginosa* в настоящее время уже не являются экзотическими находками.

Антибиотики группы карбапенемов обладают чрезвычайно широким спектром активности и высокой стабильностью к расщеплению большинством известных  $\beta$ -лактамаз. Вследствие этого, карбапенемы рассматриваются как одни из наиболее эффективных препаратов для лечения тяжелых инфекций. Вместе с тем, приобретенная устойчивость к антибиотикам данной группы становится в настоящее время все более распространенной среди грамотрицательных неферментирующих бактерий.

Формирование резистентности к карбапенемам у *P. aeruginosa* может быть связано с различными механизмами. Наибольшее клиническое и эпидемиологическое значение имеет продукция приобретенных металло- $\beta$ -лактамаз (МБЛ). Опасность ферментов данного класса обусловлена целым рядом причин, обуславливающим высокую эпидемиологическую значимость данного механизма антибиотикорезистентности:

- высокая каталитическая активность;
- широкий спектр субстратной специфичности, включающий практически все  $\beta$ -лактамы антибиотики;
- сцепление генов МБЛ с другими детерминантами резистентности и как следствие множественная лекарственная устойчивость или панрезистентность штаммов-продуцентов МБЛ;
- локализация генов, кодирующих продукцию МБЛ, в составе высоко мобильных интегронов, способных быстро распространяться между микроорганизмами с помощью плазмид и транспозонов;
- формирование отдельных эпидемиологически значимых клонов полиантибиотикорезистентных МБЛ-продуцентов, способных быстро распространяться на обширных географических территориях и вызывать серьезные инфекции, трудно поддающиеся терапии.

За последнее десятилетие описано 9 генетических групп приобретенных МБЛ: IMP, VIM, SPM, GIM, SIM, AIM, KHM, NDM, TMB. Наиболее широкое распространение и клиническое значение получили ферменты VIM и IMP типов. Данные зарубежных эпидемиологических исследований свидетельствуют о распространенности МБЛ в Японии, странах Юго-Восточной Азии (в Гонконге, Сингапуре, Тайване, Таиланде, Корее), Европы (в Италии, Испании, Греции, Франции, Португалии, Англии, Польше, Хорватии и Германии) и Латинской Америки (в Бразилии). Отдельные случаи обнаружения МБЛ описаны в США, Канаде и многих других странах.

В России, по данным многоцентровых исследований «РЕЗОРТ» и «Металл», в период с 2002 по 2007 гг. МБЛ-продуцирующие штаммы *P. aeruginosa* выявлены в 23 стационарах 9 городов (Воронеж, Краснодар, Липецк, Москва, Нижний Новгород, Новосибирск, Омск, Смоленск и Тюмень).

Создание систем наблюдения за появлением и распространением устойчивых к антибактериальным препаратам микроорганизмов является основой для сдерживания антибиотикорезистентности. Системы наблюдения особенно необходимы для раннего обнаружения карбапенемрезистентных МБЛ-позитивных бактерий на территориях, на которых они ранее не встречались.

Микробиологический мониторинг должен включать не только фенотипические и генотипические методы детекции МБЛ, но и молекулярные методы субвидового типирования, позволяющие оценивать родственность отдельных изолятов и изучать популяционную структуру карбапенемрезистентных микроорганизмов. Молекулярные методы эпидемиологического маркирования микроорганизмов, такие как пульс-электрофорез (PFGE), мультилокусное секвенирование-типирование (MLST), анализ множественных tandemных повторов (MLVA) могут использоваться для выявления в популяционной структуре бактерий эпидемиологически значимых клонов, способных быстро распространяться и вызывать серьезные инфекции, трудно поддающиеся терапии.

Своевременное выявление МБЛ-продуцирующих полирезистентных штаммов *P. aeruginosa* позволит предотвратить их широкое распространение как в отдельных стационарах, так и в целом по Беларуси.

#### **Цель исследования**

Определение распространения МБЛ среди клинических изолятов *P. aeruginosa* в различных регионах Беларуси.

#### **Материалы и методы**

Собрана коллекция из 107 полиантибиотикорезистентных карбапенемрезистентных клинических изолятов *P. aeruginosa*, выделенных из клинического материала госпитализированных больных в 2007–2009 гг. в 16 стационарах 4-х областных центров Беларуси и г. Минска. Выполнена реидентификация штаммов и определена чувствительность к 15 антибактериальным препаратам методом пограничных концентраций с использованием автоматического бактериологического анализатора АТВ Expression (bioMérieux, Франция). Для всех карбапенемрезистентных штаммов выполнен феноти-

пический скрининг продукции МБЛ методом двойных дисков с ЭДТА. Для обнаружения генов МБЛ VIM и IMP типов использована мультиплексная полимеразная цепная реакция в режиме реального времени (Шевченко и соавт., 2007 г.). Для тестирования отобраны 19 МБЛ-положительных изолятов и 11 карбапенемрезистентных изолятов *P. aeruginosa*, для которых фенотипический скрининговый тест с ЭДТА выявил отрицательный или сомнительный результат. Идентификация амплификационных фрагментов blaVIM и blaIMP генов проводилась путем определения температур их плавления (~80 °C для blaIMP и ~85 °C для blaVIM) в присутствии интеркалирующего флуоресцентного красителя SYBR Green I. Дополнительно сравнивались кривые плавления опытных образцов с кривыми плавления положительных контрольных штаммов.

Для оценки структуры интегронов, несущих гены МБЛ, использован метод ПЦР-рестрикционного картирования (O. Shevchenko и соавт., 2008 г.). Вариабельные участки интегронов I класса амплифицированы с помощью праймеров к 5' (intI1) и 3' (qacEΔ1 или tniC/Tn5090) консервативным последовательностям интегронов в парах с внутренними праймерами к генам blaVIM и подвергнуты рестрикции эндонуклеазой TaqI. Полученные рестрикционные профили ПЦР-фрагментов сопоставлены с соответствующими профилями известных МБЛ-кодирующих интегронов, использованных в качестве контролей.

Выполнено эпидемиологическое маркирование карбапенемрезистентных изолятов *P. aeruginosa* с использованием мультилокусного анализа tandemных повторов (multiple-locus variable number tandem repeat analysis, MLVA) согласно схеме L. Onteniente и соавт. Проведена оценка количества tandemных повторов в шести VNTR-локусах (VNTR — Variable Number Tandem Repeat, tandemные повторы с переменным числом звеньев). Амплификация шести VNTR-локусов выполнена с помощью мультиплексной ПЦР (по 2 отдельные реакции для каждого изолята). Анализ размеров продуктов амплификации шести VNTR-локусов выполнен методом капиллярного электрофореза с флуоресцентной детекцией (фрагментный анализ) на автоматическом секвенаторе ABI-310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems). Кластерный анализ MLVA профилей проведен с помощью программного пакета Bionumerics v.6.01 (Applied Maths) с использованием категориальных значений длин VNTR локусов и алгоритма построения дендрограмм минимальных дистанций (Minimum Spanning Tree).

#### **Результаты и обсуждение**

Для всех штаммов подтверждена устойчивость к карбапенемам, сочетающаяся с устойчивостью к большинству исследованных антибактериальных препаратов, за исключением колистина.

С помощью метода «двойных дисков с ЭДТА» продукция МБЛ выявлена у 19 из 107 карбапенемрезистентных штаммов *P. aeruginosa* из 6 лечебных учреждений 3-х городов. Проанализирована ассоциированная устойчивость МБЛ-продуцирующих карбапенемрезистентных штаммов. Все они имели общий фенотип резистентности (устойчивость к тикарциллину, тикарциллин/клавуланату, пиперациллину, пиперациллин-тазобактаму, цефтазидиму, цефепиму, имипенему, меропенему, амикацину, гентамицину, тобрамицину, ципрофлоксацину, котримоксазолу; чувствительность к колистину).

У всех 19 изолятов по данным ПЦР анализа подтверждено наличие МБЛ VIM-типа. Методом ПЦР-рестрикционного картирования установлена идентичность структуры интегронов, несущих ген МБЛ, у данных изолятов и VIM-2-кодирующего интегрона с набором генетических каскадов: aacA7-blaVIM-2-dhfrB5-aacC-A5 (GenBank Acc. No. DQ52233), ранее описанного у штаммов *P. aeruginosa* из США (K. Lolans и соавт., 2005 г.), России (O. Shevchenko и соавт., 2008 г.) и Норвегии (O. Samuelsen и соавт., 2010 г.).

По результатам MLVA-типирования показана принадлежность 18 из 19 МБЛ-положительных штаммов к единому клональному комплексу, о чем свидетельствует соответствие количества tandemных повторов по 5–6 анализируемым VNTR-локусам (таблица 1). Отдельного внимания заслуживает штамм № 2950 (г. Могилев), имеющий от-

личия по четырем VNTR-локусам (ms061, ms127, ms142 и ms010) от преобладающего MLVA-паттерна. Представленный изолят не являлся частью единого клонального комплекса, в который входили все другие выделенные на территории Беларуси МБЛ-продуцирующие штаммы *P. aeruginosa*.

Таблица 1 — MLVA-паттерны МБЛ-продуцирующих *P. aeruginosa*, выделенных в лечебных учреждениях Беларуси

Город Центр (число изолятов)	MLVA паттерн (ms061-ms127-ms077-ms172-ms142-ms010)	Тип интегрона / МБЛ
<b>Минск</b>		
Центр 1 (n=1)	109-225-392-826-180-191	DQ52233 / VIM-2
Центр 2 (n=7)	109-225-392-826-180-191	DQ52233 / VIM-2
Центр 2 (n=1)	115-225-392-826-180-191	DQ52233 / VIM-2
Центр 2 (n=2)	109-225-392-826-180-197	DQ52233 / VIM-2
Центр 2 (n=1)	109-225-392-826-180-203	DQ52233 / VIM-2
Центр 3 (n=2)	109-225-392-826-180-191	DQ52233 / VIM-2
<b>Гомель</b>		
Центр 1 (n=1)	109-225-392-826-180-185	DQ52233 / VIM-2
Центр 2 (n=1)	109-225-392-826-180-185	DQ52233 / VIM-2
<b>Могилев</b>		
Центр 1 (n=1)	115-225-392-826-180-185	DQ52233 / VIM-2 DQ52233 / VIM-2
Центр 2 (n=1)	109-225-392-826-180-185	DQ52233 / VIM-2
Центр 2 (n=1)	139-210-392-826-961-233	DQ52233 / VIM-2

### **Заключение**

В результате исследования обнаружено 19 МБЛ-продуцирующих изолятов, выделенных в шести лечебных учреждениях 3-х регионов республики и определено наличие у них blaVIM-генов. Показано, преимущественно, клональное распространение МБЛ-продуцирующих штаммов синегнойной палочки на территории республики. Вместе с тем, совпадение структуры МБЛ-кодирующего интегрона у всех изолятов, включая генетически отличный штамм, указывает на возможность как вертикального, так и горизонтального распространения МБЛ среди клинических штаммов. Выявлена возможность горизонтального переноса blaVIM-генов от представителей эпидемического клона локальным эндемичным штаммам *P. aeruginosa* в составе интегрона I класса. Данный факт требует дальнейшего изучения в связи с опасностью формирования локальных популяций карбапенем-резистентных *P. aeruginosa*, максимально адаптированных к условиям госпитальной среды.

Для ограничения циркуляции МБЛ-продуцирующих изолятов *P. aeruginosa* в лечебных учреждениях необходимо создание системы микробиологического мониторинга, направленного на выявление колонизированных пациентов. Для своевременного выявления эпидемически значимых клонов и разработки мероприятий инфекционного контроля необходимо проведение многоцентровых исследований, включающих определение механизмов карбапенем-резистентности и эпидемиологическое маркирование карбапенем-резистентных изолятов.

**УДК 616.98-036.22:578. 828 HIV (476.2)**

## **ЭПИДЕМИЧЕСКАЯ СИТУАЦИЯ ПО ВИЧ-ИНФЕКЦИИ В СВЕТЛОГОРСКОМ РАЙОНЕ**

**Тарасенко А. А., Столбова Н. Л.**

**Учреждение**

**«Зональный центр гигиены и эпидемиологии»**

**г. Светлогорск, Республика Беларусь**

### **Введение**

Эпидемиологическая ситуация по ВИЧ-инфекции на территории Светлогорского района до 1996 г. оставалась относительно спокойной. Начиная с июня 1996 г. ситуация резко обострилась среди наркоманов, использующих наркотики внутривенно.