

## Распространенность *Klebsiella pneumoniae* – продуцентов карбапенемаз в Беларуси и их конкурентоспособность

Тапальский Д.В.<sup>1</sup>, Петренёв Д.Р.<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Гомельский государственный медицинский университет, Гомель, Беларусь

<sup>2</sup> Институт радиобиологии Национальной академии наук Беларуси, Гомель, Беларусь

Контактный адрес:

Дмитрий Викторович Тапальский  
Эл. почта: tapalskiy@yandex.by

Ключевые слова: *Klebsiella pneumoniae*, антибиотикорезистентность, карбапенемазы, кинетика роста, конкурентоспособность.

Определена чувствительность к антибиотикам для 208 госпитальных изолятов *K. pneumoniae*, выделенных в четырех регионах Беларуси. Показано широкое распространение устойчивости к карбапенемам. Гены карбапенемаз  $bla_{NDM}$ ,  $bla_{OXA-48}$  или  $bla_{KPC}$  обнаружены у 55 штаммов из 12 многопрофильных больниц 4 городов. Выявлена пониженная скорость экспоненциального роста и низкая конкурентоспособность продуцентов карбапенемаз по сравнению с антибиотикочувствительными штаммами *K. pneumoniae*.

## Prevalence of carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* isolates in Belarus and their competitive ability

Tapalskiy D.V.<sup>1</sup>, Petrenyov D.R.<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Gomel State Medical University, Gomel, Belarus

<sup>2</sup> Institute of Radiobiology of the National Academy of Sciences of Belarus, Gomel, Belarus

Contacts:

Dmitry V. Tapalskiy  
E-mail: tapalskiy@yandex.by

Key words: *Klebsiella pneumoniae*, drug resistance, carbapenemases, growth kinetics, competitive ability.

Susceptibility to antibiotics was determined for 208 hospital isolates from 4 regions of Belarus. The broad abundance of resistance to carbapenems was shown. The genes of carbapenemases  $bla_{NDM}$ ,  $bla_{OXA-48}$  and  $bla_{KPC}$  were detected in 55 strains from 12 multifield hospitals in 4 cities. The reduced velocity of exponential growth and low competitive ability were revealed in carbapenemase-producing isolates in comparison to drug susceptible strains of *K. pneumoniae*.

### Введение

Распространение устойчивости к карбапенемам, связанное с продукцией приобретенных карбапенемаз – наиболее важная современная проблема антибиотикорезистентности клинически значимых грамотрицательных бактерий [1, 2]. Гены карбапенемаз за счет своей локализации на мобильных генетических элементах способны быстро распространяться не только внутри одной популяции микроорганизмов, но и между микроорганизмами разных видов, что существенно осложняет эпидемическую обстановку в учреждениях здравоохранения, приводит к быстрому росту устойчивости циркулирующих микроорганизмов к карбапенемам и может способствовать возникновению не только единичных случаев инфекций, но и трудно ликвидируемых вспышек [3].

Несколько типов карбапенемаз получили распространение среди *K. pneumoniae* и других энтеробактерий – KPC (*Klebsiella pneumoniae* карбапенемаза), OXA-48 (оксациллиназа-48), VIM (Верона интегрон-кодированная металло-β-лактамаза), IMP (имипенемаза), NDM (Нью-Дели металло-β-лактамаза). Наличие карбапенемаз у *K. pneumoniae* является важным маркером экстремальной антибиотикорезистентности, поскольку, как правило, оно ассоциируется с устойчивостью к большинству не β-лактамных препаратов [4, 5]. С клинических позиций на-

личие карбапенемаз у энтеробактерий часто приводит к неадекватной стартовой антибиотикотерапии, следствиями которой являются повышение риска летального исхода, удлинение сроков госпитализации пациентов, большая частота осложнений, необходимость в применении дополнительных лечебных и диагностических высокотехнологических вмешательств и существенные экономические потери [6-8].

Интенсивное глобальное распространение карбапенеморезистентности у *K. pneumoniae* происходит, главным образом, вертикально в составе отдельных эпидемически успешных клональных групп, например ST258 для KPC, ST15, ST101 и ST395 для OXA-48 [9, 10]. Горизонтальный перенос генов карбапенемаз в составе мобильных генетических элементов имеет второстепенное значение в формировании устойчивости *K. pneumoniae*, однако генетический обмен с более конкурентоспособными гипервирулентными штаммами может стать причиной появления в ближайшем будущем новых экстремально-антибиотикорезистентных штаммов, способных вызывать тяжелые инвазивные инфекции [11, 12].

Устойчивость к антибиотикам обычно имеет определенную биологическую стоимость для микроорганизмов, которая может проявляться в замедлении темпов роста, снижении конку-

Тапальский Д.В., Петренёв Д.Р.

*K. pneumoniae*, продуцирующие карбапенемазы, в Беларуси

рентоспособности и вирулентности антибиотикорезистентных штаммов [13, 14]. Биологическая стоимость препятствует интенсивному накоплению антибиотикорезистентных штаммов в бактериальных популяциях, главным образом, в периоды существования бактерий в среде, свободной от антибиотика – например, после прекращения приема антибактериального препарата или во время нахождения бактерий во внешней среде [15]. Биологическая стоимость значительно варьирует и зависит от большого количества разнообразных факторов, важнейшим из которых является основной генетический механизм, приводящий к развитию антибиотикорезистентности. Например, мутационная устойчивость к карбапенемам у энтеробактерий, связанная с изменениями пориновых белков, сопровождается значительным снижением жизнеспособности. Напротив, приобретение генов карбапенемаз в составе мобильных генетических элементов обычно оказывает меньшее влияние на вирулентность и жизнеспособность бактерий [15-17].

Ряд исследований были посвящены поиску причин глобальной диссеминации карбапенемаз, быстро распространяющихся среди грамотрицательных бактерий различных видов, существующих как во внутрибольничной среде в условиях селективного давления антибиотиков, так и в окружающей среде. Предполагалась сниженная биологическая стоимость устойчивости к карбапенемам или приобретение дополнительных факторов патогенности в составе плазмид, несущих гены карбапенемаз [18]. Количество исследований, изучающих влияние присутствия *bla*<sub>NDM</sub>, *bla*<sub>KPC</sub> и других генов карбапенемаз на жизнеспособность, конкурентоспособность и патогенность бактерий, очень ограничено. В работе S. Gottig и соавт. на изогенных штаммах *E. coli* и *K. pneumoniae* показано, что присутствие плазмиды, несущей *bla*<sub>NDM</sub>, не влияет на кинетику бактериального роста, патогенность и цитотоксичность, но снижает конкурентоспособность карбапенеморезистентных штаммов по отношению к изогенным бесплазмидным штаммам [19]. Электропорация плазмид pG12-KPC-2 и pG06-VIM-1 от карбапенеморезистентных *K. pneumoniae* уропатогенным *E. coli* различных геногрупп незначительно снижала конкурентоспособность последних в парных экспериментах с исходными изогенными штаммами [20]. Вместе с тем, экспрессия *bla*<sub>VIM-2</sub> у *Salmonella typhimurium* сопровождалась значительным снижением скорости роста, подвижности и утратой способности к инвазии в эпителиальные клетки по сравнению с изогенным штаммом [21].

Цель исследования – выявление продуцентов карбапенемаз среди госпитальных изолятов *K. pneumoniae* из различных регионов Беларуси и оценка конкурентоспособности экстремально-антибиотикорезистентных штаммов, экспрессирующих карбапенемазы.

## Материалы и методы

В исследование включено 208 клинических изолятов *K. pneumoniae* с множественной устойчивостью к антибиотикам, выделенных в 2013-2016 гг. от пациентов, госпитализированных в учреждения здравоохранения четырех регионов Беларуси (Гомель – 90 изолятов, Могилев – 72 изолята, Минск – 32 изолята, Витебск – 14 изолятов). Все изоляты выделены из различных видов клинического материала – мокроты, крови, раневого отделяемого, интраоперационного материала, мочи в диагностически значимых количествах. Повторные штаммы, выделенные от одного пациента, исключались из исследова-

ния. Дополнительно в исследование включены 14 клинических изолятов *K. pneumoniae* с сохраненной чувствительностью к большинству антибиотиков, выделенные от амбулаторных и госпитализированных пациентов в Гомеле в 2013-2014 гг.

Первичная идентификация изолятов выполнена в локальных микробиологических лабораториях с применением тест-систем для идентификации API 20E (bioMérieux, Франция) или с использованием автоматических микробиологических анализаторов VITEK 2 Compact на идентификационных картах VITEK 2 GN (bioMérieux, Франция). Реидентификация изолятов выполнена методом матричной лазерной времяпролетной масс-спектрометрии (MALDI-TOF) на анализаторе VITEK MS (bioMérieux, Франция).

Чувствительность к амоксицилину/клавуланату, азтреонаму, цефотаксиму, имипенему, меропенему, ципрофлоксацину, амикацину определяли диско-диффузионным методом на агаре Мюллера-Хинтона. Использовали стандартные картонные диски для определения чувствительности (BD Sensi-Disc Susceptibility Test Discs, Becton Dickinson, США). При выполнении исследования, учете и интерпретации результатов руководствовались стандартом EUCAST [22]. Ввод, хранение, анализ микробиологических данных и построение профилей антибиотикорезистентности проводились с помощью базы данных микробиологической лаборатории WHONET 5.6.

Для изолятов *K. pneumoniae* с выявленной диско-диффузионным методом нечувствительностью (устойчивостью или умеренной устойчивостью) хотя бы к одному из карбапенемов (диаметр зон подавления роста вокруг дисков с 10 мкг имипенема или меропенема менее 22 мм [22]) методом ПЦР в реальном времени осуществляли детекцию генов карбапенемаз KPC и OXA-48 (диагностический набор «АмплиСенс MDR KPC/OXA-48-FL», ФБУН ЦНИИ эпидемиологии Роспотребнадзора, Российская Федерация) и металло-β-лактамаз групп VIM, IMP, NDM (диагностический набор «АмплиСенс MDR MBL-FL», ФБУН ЦНИИ эпидемиологии Роспотребнадзора). Экстракцию ДНК бактериальных культур, амплификацию с гибридно-флуоресцентной детекцией в режиме реального времени на амплификаторе RotorGene 3000 (Corbett Research, Австралия), анализ и интерпретацию полученных результатов выполняли в соответствии с инструкциями производителя диагностических наборов.

Для сравнительной оценки кинетики роста антибиотикорезистентных штаммов-продуцентов карбапенемаз различных типов и штаммов с сохраненной чувствительностью к антибиотикам из суточных культур микроорганизмов, выращенных на триптон-соевом агаре (BD, США), готовили суспензию с оптической плотностью 0,5 МакФарланд, которой инокулировали бульон Мюллера-Хинтона. Стартовая концентрация микроорганизмов в среде составила 10<sup>5</sup> микробных клеток/мл. Тестирование проводили в объеме 100 мкл в трех повторях для каждого штамма в 96-луночных плоскодонных планшетах (Sarstedt, Германия). Инкубацию и учет результатов выполняли на микропланшетном ридере Infinite M200 (TECAN, Австрия) в течение 24 часов при температуре 37°C с измерением оптической плотности в ячейках на длине волны 600 нм (OD<sub>600</sub>) каждые 15 минут с предварительным орбитальным перемешиванием (амплитуда 3 мм, скорость 44 об/мин) длительно-стью 1 мин. Данные регистрировали при помощи программы Magellan 6.6 (TECAN). Анализ кинетических кривых выполняли в бесплатном программном обеспечении для анализа роста микроорганизмов GATHODE [23]. Оценивали время адаптации популяции, максимальную скорость роста в экспоненциальной

фазе и время удвоения популяции. Для обработки полученных данных применяли программное обеспечение Prism 6.04 (GraphPad Software Inc.). Данные представлены как среднее ± ошибка или как медиана (25-75%). В зависимости от характера распределения показателей в группах использовали параметрический или непараметрический варианты теста One way ANOVA (Крускал-Уолес). Оценку отличий групповых средних (медиан) от контроля проводили с помощью теста Холм-Сидака (Данна) для множественных сравнений.

Для изучения конкурентных взаимоотношений между антибиотикорезистентными штаммами-продуцентами карбапенемаз и антибиотикочувствительными штаммами выполняли прямой парный эксперимент с одномоментным внесением в бульонную питательную среду двух конкурирующих штаммов в одинаковых концентрациях с последующей количественной оценкой содержания каждого из них в смеси по окончании совместной инкубации. Предварительная инкубация каждого из штаммов выполнена в течение 12 часов в сердечно-мозговом бульоне (BD, США) в шейкере-инкубаторе ES-20 (Biosan, Латвия) при 37°C с орбитальным перемешиванием 180 об/мин. Полученные ночные бульонные культуры доводили до оптической плотности 0,5 МакФарланд ( $10^8$  микробных клеток/мл) и вносили в предварительно подогретый до 37°C сердечно-мозговой бульон одновременно суспензии 2 штаммов (антибиотикорезистентного и антибиотикочувствительного) в соотношении 1:1, стартовая концентрация каждого из штаммов в среде  $5 \times 10^4$  микробных клеток/мл. Всего подобрано 11 пар, в которых в качестве антибиотикорезистентного изолята выступали продуценты карбапенемаз ОХА-48 (3 пары), КРС и NDM (по 4 пары). Для минимизации влияния на результаты парного эксперимента кинетических характеристик роста и размножения, установленных для монокультур, пары подобраны таким образом, чтобы каждый из микроорганизмов имел сходные (отличающиеся не более чем на 20%) значения максимальной скорости роста в экспоненциальной фазе. В качестве контролей все штаммы, включенные в пары, также параллельно исследовались в виде монокультур. Инкубацию парных бактериальных культур выполняли в ячейках 96-луночных плоскодонных планшетов на микропланшетном ридере как описано выше. По окончании инкубации из содержимого ячеек готовили 10-кратные серийные разведения в стерильном 0,85% растворе хлорида натрия, и делали количественные высевы из разведений на агар Мюллера-Хинтона и агар Мюллера-Хинтона с 8 мкг/мл левофлоксацина (селективная среда для подавления роста антибиотикочувствительных штаммов). После 18-часовой инкубации при 35°C проводили подсчет колоний на чашках с обычной и селективной средой и рассчитывали концентрации каждого из штаммов в смеси. Все исследования выполняли в трех независимых повторах.

Индекс конкуренции (КИ) рассчитывали как соотношение финальных концентраций штамма-продуцента карбапенемазы и антибиотикочувствительного штамма. Константу скорости отбора  $s$ , выраженную в обратных часах ( $ч^{-1}$ ) определяли исходя из регрессионной модели [24]:

$$\log_e R_{(t)} = \log_e R_{(0)} + st,$$

где  $R_{(t)}$  и  $R_{(0)}$  – соотношение концентраций двух конкурирующих изолятов (резистентного и чувствительного) в начале эксперимента и по окончании инкубации,  $t$  – продолжительность инкубации.

## Результаты и обсуждение

В отношении исследуемых изолятов *K. pneumoniae* наименьшие уровни устойчивости выявлены для карбапенемов (29,3% изолятов, нечувствительных к имипенему, и 32,2% изолятов, нечувствительных к меропенему) и амикацина (53,8% нечувствительных изолятов). Частота устойчивости к другим антибиотикам превышала 80% (рис. 1). К сожалению, в силу ограниченности исследованной выборки и значительной предселекции на этапе включения штаммов в исследование (выполнялся целенаправленный отбор клинических изолятов с множественной устойчивостью к антибиотикам) представленные данные не могут в достаточной мере отражать ситуацию с антибиотикорезистентностью *K. pneumoniae* в Беларуси.

Преобладающими профилями антибиотикорезистентности *K. pneumoniae* являлись АМС АТМ СТХ СІР (нечувствительность к амоксицилину/клавуланату, азтреонаму, цефотаксиму и ципрофлоксацину – 30,8% изолятов) и АМС АТМ СТХ ІМР МЕМ СІР АН (нечувствительность ко всем тестируемым препаратам – 27,4% изолятов).

Для 16 карбапенемонечувствительных изолятов *K. pneumoniae* в ПЦР выявлено наличие  $bla_{NDM}$ -генов. Продукция металло-β-лактамаз также дополнительно подтверждена у них методом двойных дисков с ЭДТА (рис. 2).

Все продуценты NDM-карбапенемазы имели профиль антибиотикорезистентности АМС АТМ СТХ ІМР МЕМ СІР АН (нечувствительность ко всем тестируемым диско-диффузионным методом антибиотикам). При определении их чувствительности к 16-17 антибактериальным препаратам с использованием

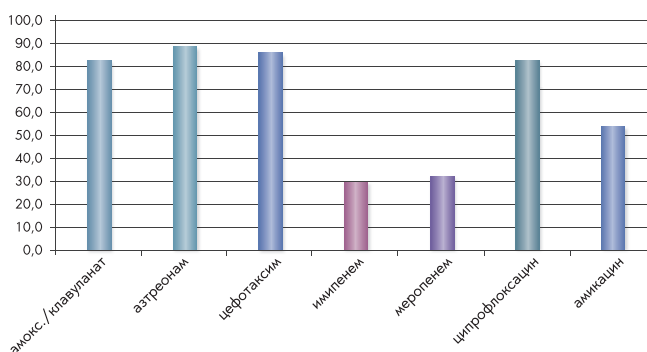


Рисунок 1. Антибиотикорезистентность клинических изолятов *K. pneumoniae* (% нечувствительных изолятов)

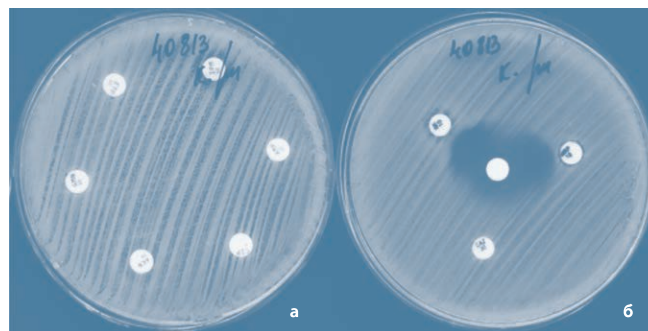


Рисунок 2. Определение чувствительности к антибиотикам (а) и выявление продукции металло-β-лактамаз методом двойных дисков с ЭДТА (б) для клинического изолята *K. pneumoniae* 40813 (г. Минск)

автоматизированного метода (микробиологический анализатор VITEK 2 Compact, карты AST-XN05) в локальных микробиологических лабораториях выявлена их чувствительность только к колистину (чувствительны все продуценты металло-β-лактамазы NDM) и тигециклину (чувствительны 12 изолятов, остальные – умеренно устойчивы).

Продуценты NDM были выделены в восьми лечебных учреждениях трех городов (табл. 1). Большинство из них – 10 (62,5%) – получены от пациентов, госпитализированных в отделения реанимации и интенсивной терапии.

Наличие генов  $bla_{OXA-48}$  подтверждено для 27 изолятов *K. pneumoniae*, один из которых являлся ко-продуцентом карбапенемаз OXA-48 и NDM. Профиль антибиотикорезистентности AMC ATM CTX IMP MEM CIP AN (нечувствительность ко всем тестируемым диско-диффузионным методом антибиотикам) имели 19 изолятов, 8 изолятов сохраняли чувствительность к амикацину и/или ципрофлоксацину. В локальных микробиологических лабораториях с использованием автоматизированного метода выявлена чувствительность продуцентов OXA-карбапенемаз к колистину и тигециклину. Методом двойных дисков с ЭДТА были получены отрицательные результаты (карбапенемаза OXA-48 относится к группе сериновых карбапенемаз и не содержит катионов цинка в активном центре).

Продуценты карбапенемазы OXA-48 были выделены в семи учреждениях здравоохранения трех городов. Большинство из них были выделены от пациентов, госпитализированных в отделения реанимации и интенсивной терапии и хирургические отделения.

Наличие генов  $bla_{KPC}$  обнаружено у 13 изолятов *K. pneumoniae*, в единственном учреждении здравоохранения (г. Витебск). Продуценты карбапенемазы KPC были нечувствительными ко всем антибиотикам, тестируемым диско-диффузионным методом.

Анализ динамических показателей роста клинических изолятов *K. pneumoniae* выявил некоторые характерные различия у антибиотикочувствительных и антибиотикорезистентных форм. Максимальная экспоненциальная скорость роста изолятов дикого типа была статистически значимо выше ( $p=0,0083$ , ANOVA), чем у продуцентов карбапенемаз (рис. 3). Средние значения показателя по группам составили: WT ( $n=14$ ) –  $1,814 \pm 0,067$ ; OXA-48 ( $n=13$ ) –  $1,599 \pm 0,034$ ,  $p=0,021$ ; NDM ( $n=6$ ) –  $1,471 \pm 0,151$ ,  $p=0,005$ ; KPC ( $n=14$ ) –  $1,633 \pm 0,040$ ,  $p=0,027$ . Снижение скорости роста у антибиотикорезистентных изолятов привело к закономерному увеличению ( $p=0,0376$ , тест Крускал-Уолеса) времени удвоения популя-

Таблица 1. *K. pneumoniae* – продуценты карбапенемаз, выделенные в различных регионах Беларуси

	KPC		OXA-48		NDM		OXA-48 + NDM	
	центров	изолятов	центров	изолятов	центров	изолятов	центров	изолятов
Гомель			1	4	1	5		
Могилев			2	15	2	4		
Минск			3	7	4	6	1	1
Витебск	1	13						
Всего	1	13	6	26	7	15	1	1

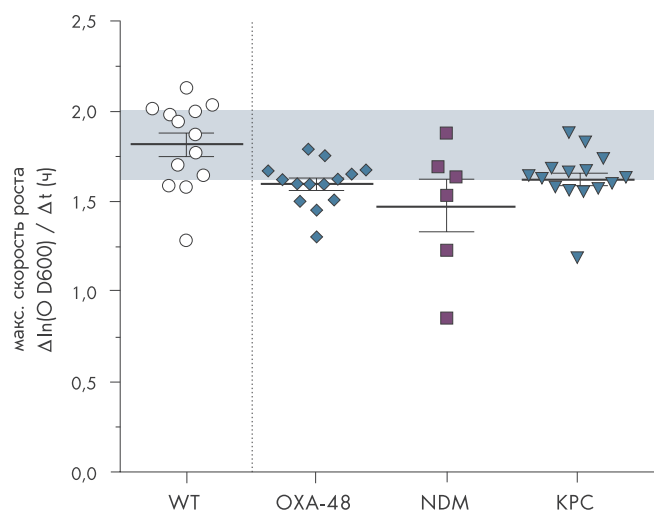


Рисунок 3. Максимальная экспоненциальная скорость роста антибиотикочувствительных изолятов *K. pneumoniae* (WT) и антибиотикорезистентных изолятов-продуцентов карбапенемаз OXA-48, NDM, KPC. Представлены индивидуальные значения, а также среднее±ошибка и интерквартильный размах 25-75% в контрольной группе (серая область)

ции (рис. 4). Так, если антибиотикочувствительным формам *K. pneumoniae* в экспоненциальной фазе роста для увеличения популяции вдвое было необходимо 0,387 (0,355-0,425) ч, то антибиотикоустойчивым изолятам: OXA-48 – 0,426 (0,413-0,435) ч,  $p=0,06$ ; NDM – 0,439 (0,399-0,907) ч,  $p=0,061$ ; KPC – 0,423 (0,412-0,440) ч,  $p=0,081$ .

Среднее значение продолжительности индуктивной фазы ( $T_{lag}$ ) у антибиотикочувствительных изолятов *K. pneumoniae* составило  $1,211 \pm 0,037$  ч. Как видно из данных, представленных на рисунке 5, продуценты карбапенемаз, за исключением NDM, демонстрировали тенденцию ( $p=0,0697$ , ANOVA) к сни-

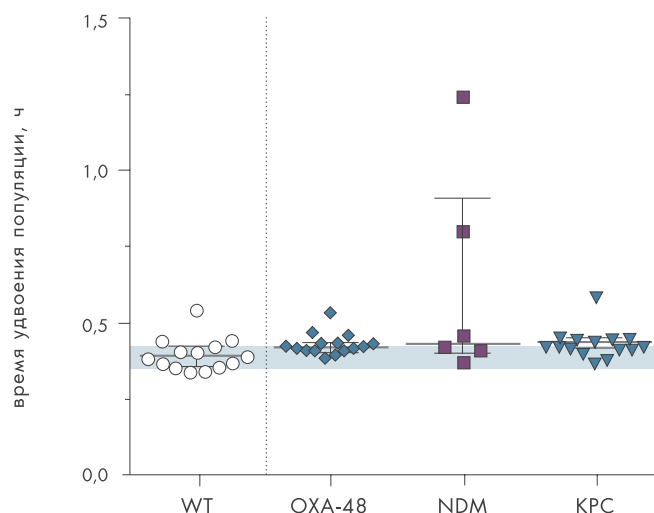
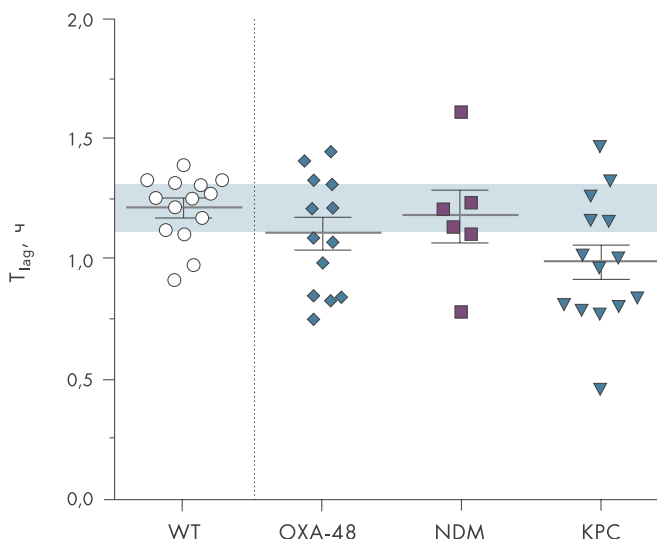


Рисунок 4. Время удвоения популяции в экспоненциальной фазе роста антибиотикочувствительных изолятов *K. pneumoniae* (WT) и антибиотикорезистентных изолятов-продуцентов карбапенемаз OXA-48, NDM, KPC. Представлены индивидуальные значения, а также медиана и интерквартильный размах 25-75%



**Рисунок 5.** Время адаптации популяции ( $T_{lag}$ ), определенное по максимальной экспоненциальной скорости роста для антибиотикочувствительных (WT) изолятов *K. pneumoniae* и продуцентов карбапенемаз (OXA-48, NDM, KPC). Представлены индивидуальные значения, а также среднее±ошибка и интерквартильный размах 25-75% в контрольной группе (серая область)

жению этого показателя (OXA-48:  $1,101 \pm 0,066$ ,  $p=0,381$ ; NDM:  $1,177 \pm 0,108$ ,  $p=0,762$ ; KPC:  $0,985 \pm 0,072$ ,  $p=0,034$ ).

В экспериментах с парными культурами для 10 из 11 пар финальные концентрации антибиотикочувствительных штаммов в смеси превышали концентрации продуцентов карбапенемаз за исключением одной пары, в которой концентрация антибиотикорезистентного штамма незначительно превышала концентрацию чувствительного (табл. 2). Индекс конкуренции варьировал в пределах от 0,03 до 1,25 и статистически значимо отличался от 1 ( $p=0,0029$ , критерий Вилкоксона) с медианным значением 0,18 (интерквартильный размах 25-75% – 0,10-0,67, 95% доверительный интервал – 0,105-0,639).

Константы скорости отбора  $s$  для пар с продуцентами NDM находились в диапазоне от -0,096 до 0,009 со средним значением  $-0,048 \pm 0,028$  ( $N=4$ ), для пар с продуцентами OXA-48 – от -0,123 до -0,026 и средним  $-0,082 \pm 0,029$  ( $N=3$ ), для пар с продуцентами KPC – от -0,153 до -0,017 и средним  $-0,075 \pm 0,029$  ( $N=4$ ). В среднем по всем проанализированным парам этот показатель значимо отличался от нуля ( $p=0,0029$ , критерий Вилкоксона) и составил  $-0,0670 \pm 0,01557$  с 95% доверительным интервалом от -0,1017 до -0,03231. Статистически значимых различий между продуцентами карбапенемаз различных типов по этому показателю не выявлено ( $F=0,3981$ ,  $p=0,6842$ , ANOVA). Отрицательные значения константы  $s$  указывают на низкую конкурентоспособность большинства карбапенеморезистентных штаммов при их совместном культивировании со штаммами, сохраняющими чувствительность к антибиотикам. При исследовании контролей (бульонных монокультур) показано отсутствие роста всех антибиотикочувствительных штаммов на селективной среде с 8 мг/мл левофлоксацина, и отсутствие влияния левофлоксацина на количественные параметры роста антибиотикорезистентных культур (финальные концентрации для антибиотикорезистентных монокультур, рассчитанные в высевах на обычных и селективных средах, совпадали).

**Таблица 2.** Конкурентоспособность *K. pneumoniae* – продуцентов карбапенемаз в парных экспериментах с антибиотикочувствительными штаммами

№ пары	Изолят	Гено-тип	Финальная концентрация в смеси (среднее значение), КОЕ/мл		Индекс конкуренции (КИ)	$s$ , ч <sup>-1</sup>
			WT	CarbR		
I	<i>K. pneumoniae</i> K-37	WT	$5,5 \times 10^9$	$4,5 \times 10^9$	0,82	-0,008
	<i>K. pneumoniae</i> K-103 (Могилёв)	$bla_{NDM}$				
II	<i>K. pneumoniae</i> K-32	WT	$4,6 \times 10^9$	$4,5 \times 10^8$	0,10	-0,096
	<i>K. pneumoniae</i> K-103 (Могилёв)	$bla_{NDM}$				
III	<i>K. pneumoniae</i> K-49	WT	$4,5 \times 10^9$	$4,5 \times 10^8$	0,10	-0,096
	<i>K. pneumoniae</i> K-72 (Минск)	$bla_{NDM}$				
IV	<i>K. pneumoniae</i> K-76	WT	$2,0 \times 10^9$	$2,5 \times 10^9$	1,25	0,009
	<i>K. pneumoniae</i> K-72 (Минск)	$bla_{NDM}$				
V	<i>K. pneumoniae</i> K-32	WT	$4,1 \times 10^9$	$4,0 \times 10^8$	0,10	-0,097
	<i>K. pneumoniae</i> K-23 (Гомель)	$bla_{OXA-48}$				
VI	<i>K. pneumoniae</i> K-49	WT	$6,5 \times 10^8$	$3,5 \times 10^8$	0,54	-0,026
	<i>K. pneumoniae</i> 32336 (Минск)	$bla_{OXA-48}$				
VII	<i>K. pneumoniae</i> K-76	WT	$9,5 \times 10^9$	$5,0 \times 10^8$	0,05	-0,123
	<i>K. pneumoniae</i> 32336 (Минск)	$bla_{OXA-48}$				
VIII	<i>K. pneumoniae</i> K-37	WT	$8,0 \times 10^9$	$2,0 \times 10^9$	0,25	-0,058
	<i>K. pneumoniae</i> 636 (Витебск)	$bla_{KPC}$				
IX	<i>K. pneumoniae</i> K-32	WT	$1,5 \times 10^9$	$1,0 \times 10^9$	0,67	-0,017
	<i>K. pneumoniae</i> 636 (Витебск)	$bla_{KPC}$				
X	<i>K. pneumoniae</i> K-49	WT	$9,8 \times 10^9$	$2,5 \times 10^8$	0,03	-0,153
	<i>K. pneumoniae</i> 460 (Витебск)	$bla_{KPC}$				
XI	<i>K. pneumoniae</i> K-76	WT	$8,5 \times 10^9$	$1,5 \times 10^9$	0,18	-0,072
	<i>K. pneumoniae</i> 460 (Витебск)	$bla_{KPC}$				

Оценка вклада отдельных генетических конструкций, несущих гены карбапенемаз у *K. pneumoniae*, не входила в задачи настоящего исследования. Вместо сравнения изогенных штаммов, отличающихся лишь присутствием плазмид карбапенеморезистентности, проведена оценка разрозненных клинических изолятов с различными уровнями устойчивости к антибиотикам, выделенных на протяжении нескольких лет на территории четырех регионов Беларуси. Выполненные эксперименты не позволяют объяснить наблюдаемое широкое распространение экстремально-антибиотикорезистентных клонов *K. pneumoniae*

особенностями их биологических свойств, обеспечивающими какие-либо конкурентные преимущества по отношению к антибиотикочувствительным штаммам. Выявленные отличия в кинетике микробного роста свидетельствуют о низкой конкурентоспособности большинства экстремально-антибиотикорезистентных изолятов *K. pneumoniae*, продуцирующих карбапенемазы NDM, OXA-48 и KPC. Тем не менее, наблюдаемое в настоящее время их быстрое распространение в госпитальной среде поддерживается массивным использованием антибактериальных препаратов, создающим дополнительные конкурентные преимущества за счет вытеснения антибиотикочувствительных бактерий.

Появление карбапенемазопродуцирующих энтеробактерий диктует особую необходимость развития системы инфекционного контроля. В 2012 году Центр по контролю и профилактике заболеваний США (CDC) издал «Руководство по контролю за распространением карбапенеморезистентных энтеробактерий» («Guidance for Control of Carbapenem-resistant Enterobacteriaceae»), которое определяет комплекс мероприятий, направленных на ограничение циркуляции экстремально-антибиотикорезистентных энтеробактерий в стационарах (гигиена рук, ограничение контактов, когортизация пациентов и персонала, минимизация инвазивных процедур, рациональное использование антибиотиков). В документе подчеркивает-

ся, что одним из ключевых аспектов инфекционного контроля, позволяющим сдерживать распространение карбапенеморезистентных энтеробактерий в стационаре, является микробиологический скрининг с целью своевременного выявления колонизированных лиц [25]. В 2014 году Европейским обществом по клинической микробиологии и инфекционным болезням (ESCMID) было опубликовано руководство с аналогичными рекомендациями [26].

В настоящее время появляется необходимость не только мониторировать общий уровень резистентности ключевых микроорганизмов к определенным антибиотикам, но и организовать систематические многоцентровые микробиологические исследования, направленные на выявление экстремально-антибиотикорезистентных грамотрицательных бактерий, относящихся к клонам высокого риска, с определением у них ключевых механизмов антибиотикорезистентности как фенотипическими (на уровне локальных микробиологических лабораторий), так и генотипическими (на уровне референсных лабораторий) методами. Это позволит своевременно получать информацию о возникновении вспышек и случаях эндемичного распространения в учреждениях здравоохранения карбапенемазопродуцирующих микроорганизмов, что является необходимым условием для осуществления адекватных и своевременных противоэпидемических мероприятий.

## Литература

- Nordmann P., Naas T., Poirel L. Global spread of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*. *Emerg Infect Dis*. 2011;17:1791-1798.
- Тапальский Д.В., Осипов В.А., Жаворонко С.В. Карбапенемазы грамотрицательных бактерий: распространение и методы детекции. *Медицинский журнал*. 2012;2:10-15. Russian. (Тапальский Д.В., Осипов В.А., Жаворонко С.В. Карбапенемазы грамотрицательных бактерий: распространение и методы детекции. *Медицинский журнал*. 2012;2:10-15.)
- Pitout J.D.D., Nordmann P., Poirel L. Carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae*, a key pathogen set for global nosocomial dominance. *Antimicrob Agents Chemother*. 2015;59:5873-5884.
- Gupta N., Limbago B.M., Patel J.B., Kallen A.J. Carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae*: epidemiology and prevention. *Clin Infect Dis*. 2011;53:60-67.
- Chen L., Mathema B., Chavda K.D., et al. Carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae*: molecular and genetic decoding. *Trends Microbiol*. 2014;22:686-696.
- Neidell M.J., Cohen B., Furuya Y., et al. Costs of healthcare- and community-associated infections with antimicrobial-resistant versus antimicrobial-susceptible organisms. *Clin Infect Dis*. 2012;55:807-815.
- Hamprecht A., Gottig S. Treatment of infections caused by carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae*. *Curr Treat Options Infect Dis*. 2014;6:425-438.
- Dautzenberg M.J., Wekesa A.N., Gniadkowski M., et al. The association between colonization with carbapenemase-producing enterobacteriaceae and overall ICU mortality: an observational cohort study. *Crit Care Med*. 2015;43:1170-1177.
- Woodford N., Turton J.F., Livermore D.M. Multiresistant Gram-negative bacteria: the role of high-risk clones in the dissemination of antibiotic resistance. *FEMS Microbiol Rev*. 2011;35:736-755.
- Potron A., Poirel L., Rondinaud E., Nordmann P. Intercontinental spread of OXA-48 beta-lactamase-producing *Enterobacteriaceae* over a 11-year period, 2001 to 2011. *Euro Surveill*. 2013;18(31).
- Bialek-Davenet S., Criscuolo A., Ailloud F., et al. Genomic definition of hypervirulent and multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* clonal groups. *Emerg Infect Dis*. 2014;20:1812-1820.
- Shon A.S., Bajwa R.P., Russo T.A. Hypervirulent (hypermuticous) *Klebsiella pneumoniae*: a new and dangerous breed. *Virulence*. 2013;15:107-118.
- Andersson D.I., Hughes D. Antibiotic resistance and its cost: is it possible to reverse resistance? *Nat Rev Microbiol*. 2010;8:260-271.
- Vogwill T., MacLean R.C. The genetic basis of the fitness costs of antimicrobial resistance: a meta-analysis approach. *Evol Appl*. 2015;8:284-295.
- Hennequin C., Robin F. Correlation between antimicrobial resistance and virulence in *Klebsiella pneumoniae*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2016;35:333-341.
- Pages J.-M., James C.E., Winterhalter M. The porin and the permeating antibiotic: a selective diffusion barrier in Gram-negative bacteria. *Nat Rev Microbiol*. 2008;6:893-903.
- Adler M., Anjum M., Andersson D.I., Sandegren L. Influence of acquired b-lactamases on the evolution of spontaneous carbapenem resistance in *Escherichia coli*. *J Antimicrob Chemother*. 2013;68:51-59.
- Lee C.R., Lee J.H., Park K.S., et al. Global dissemination of carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae*: epidemiology, genetic context, treatment options, and detection methods. *Front Microbiol*. 2016;7:895.
- Gottig S., Riedel-Christ S., Saleh A., et al. Impact of blaNDM-1 on fitness and pathogenicity of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*. *Int J Antimicrob Agents*. 2016;47:430-435.
- Di Luca M.C., Sorum V., Starikova I., et al. Low biological cost of carbapenemase-encoding plasmids following transfer from *Klebsiella pneumoniae* to *Escherichia coli*. *J Antimicrob Chemother*. 2017;72:85-89.
- Cordeiro N.F., Chabalgoity J.A., Yim L., Vignoli R. Synthesis of metallo-beta-lactamase VIM-2 is associated with a fitness reduction in *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium. *Antimicrob Agents Chemother*. 2014;58:6528-6535.
- The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 6.0, 2016. Available at: <http://www.eucast.org>.
- Jung P.P., Christian N., Kay D., et al. Protocols and programs for high-throughput growth and aging phenotyping in yeast. *PLoS ONE*. 2015;10(3):e0119807.
- Lenski R.E., Simpson S.C., Nguyen T.T. Genetic analysis of a plasmid-encoded, host genotype-specific enhancement of bacterial fitness. *J Bacteriol*. 1994;176:3140-3147.
- Centers for Disease Control and Prevention. Guidance for control of carbapenem-resistant Enterobacteriaceae (CRE). 2012. Available at: <http://www.cdc.gov/hai/pdfs/cre/CRE-guidance-508.pdf> (accessed 06 March 2017).
- Tacconelli E., Cataldo M.A., Dancer S.J., et al. ESCMID guidelines for the management of the infection control measures to reduce transmission of multidrug-resistant Gram-negative bacteria in hospitalized patients. *Clin Microbiol Infect*. 2014;20(Suppl. 1):1-55.