



Карпова Е.В., Тапальский Д.В.✉

Гомельский государственный медицинский университет, Гомель, Беларусь

Роль эффлюкса и продукции карбапенемаз в формировании множественной устойчивости к антибиотикам у штаммов *Klebsiella pneumoniae* и *Acinetobacter baumannii*, выделенных от пациентов с инфекцией COVID-19

Конфликт интересов: не заявлен.

Вклад авторов: Карпова Е.В. – анализ литературы, планирование и выполнение микробиологических и молекулярно-генетических исследований, подготовка текста рукописи; Тапальский Д.В. – анализ литературы, анализ и интерпретация полученных данных, редактирование рукописи.

Подана: 17.03.2022

Принята: 06.06.2022

Контакты: tapalskiy@yandex.by

Резюме

Введение. Пациентам, госпитализированным с COVID-19, часто назначают антибиотики широкого спектра действия, которые могут способствовать селекции и распространению антибиотикорезистентных штаммов.

Цель. Выявить продукцию карбапенемаз и установить механизмы активного выведения антибиотиков различных групп у множественно- и экстремально-антибиотикорезистентных штаммов *Klebsiella pneumoniae* и *Acinetobacter baumannii*, выделенных от госпитализированных пациентов с инфекцией COVID-19.

Материалы и методы. Для 51 множественно- и экстремально-антибиотикорезистентного штамма *Klebsiella pneumoniae* и 47 множественно-антибиотикорезистентных штаммов *A. baumannii*, выделенных от госпитализированных пациентов с инфекцией COVID-19, методом микроразведений в бульоне определены минимальные подавляющие концентрации (МПК). Дополнительно установлены МПК антибиотиков в присутствии протонного ингибитора эффлюксных насосов – карбонилцианид-3-хлорфенилгидразона (СССР). Фенотипический скрининг продукции метало-β-лактамаз (МБЛ) у штаммов *K. pneumoniae* выполнен методом двойных дисков с ЭДТА. Детекция генов карбапенемаз осуществлена методом ПЦР-анализа в режиме реального времени.

Результаты. Все штаммы проявляли множественную либо экстремальную устойчивость к антибиотикам. Все штаммы *A. baumannii* были устойчивы к карбапенемам, левофлоксацину, амикацину и являлись продуцентами ОХА-карбапенемаз. Сохранили чувствительность к карбапенемам только 2,0–3,9% штаммов *K. pneumoniae*, к амикацину – 7,8% штаммов. Продукция карбапенемаз выявлена у 68,6% штаммов *K. pneumoniae* (NDM – 31,4%, ОХА-48 – 23,5%, КРС – 2,0%, копродукция двух карбапенемаз – 11,8%). Ингибирование эффлюксных насосов позволило снизить значения МПК карбапенемов, цефалоспоринов, левофлоксацина, амикацина, тигециклина для

2,1–25,5% штаммов *A. baumannii* и *K. pneumoniae*, но не восстанавливало их чувствительность к антибиотикам.

Заключение. Устойчивость к карбапенемам и другим β -лактамам у штаммов *A. baumannii* и *K. pneumoniae* связана с продукцией карбапенемаз. Присутствие у части исследуемых штаммов механизмов эффлюкса является важным, но не единственным механизмом антибиотикорезистентности.

Ключевые слова: *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, множественная антибиотикорезистентность, эффлюкс, карбапенемазы, инфекция COVID-19

Karpova E., Tapalski D. 
Gomel State Medical University, Gomel, Belarus

The Role of Efflux Pump and Carbapenemase Production in the Development of Multidrug Resistance in *Klebsiella Pneumoniae* and *Acinetobacter Baumannii* Strains Isolated from Patients with COVID-19 Infection

Conflict of interest: nothing to declare.

Authors' contribution: Karpova E. – literature review, conducting microbiological and molecular genetic studies, writing text; Tapalski D. – literature review, data analysis and interpretation, editorial correction.

Submitted: 17.03.2022

Accepted: 06.06.2022

Contacts: tapalskiy@yandex.by

Abstract

Introduction. Patients hospitalized with COVID-19 are often prescribed broad-spectrum antibiotics that can contribute the selection and spread of antibiotic-resistant strains.

Purpose. To identify carbapenemase production and the active efflux mechanisms for antibiotics of various classes in multidrug- and extensively drug-resistant *Klebsiella pneumoniae* and *Acinetobacter baumannii* strains isolated from patients with COVID-19 infection.

Materials and methods. This study included 51 multidrug- and extensively drug-resistant *Klebsiella pneumoniae* strains and 47 multidrug-resistant strains of *Acinetobacter baumannii* isolated from patients with COVID-19 infection. The minimum inhibitory concentrations (MICs) for meropenem, imipenem, cefepime, ceftazidime, doxycycline, levofloxacin, tigecycline, rifampicin, chloramphenicol and amikacin were assessed by broth microdilution method for all investigated strains. Moreover, MICs of antibiotics in the presence of efflux pump inhibitor (carbonyl cyanide-chlorophenylhydrazone, CCCP) were determined. For phenotypic detection of metallo- β -lactamase (MBL) production the double-disk EDTA method was performed. Carbapenemase genes were detected by real-time PCR.

Results. All of the isolated strains have demonstrated multidrug or extensively drug resistance. All strains of *A. baumannii* were resistant to carbapenems, levofloxacin, amikacin

and were OXA-carbapenemase producers. Susceptibility to carbapenems remained only in 2.0–3.9% of *K. pneumoniae* strains, to amikacin – in 7.8% of strains. Carbapenemase production was detected in 68.6% of *K. pneumoniae* strains (NDM – 31.4%, OXA-48 – 23.5%, KPC – 2.0%, co-production of two carbapenemase – 11.8%). Inhibition of efflux pumps made it possible to reduce the MIC values for carbapenems, cephalosporins, levofloxacin, amikacin, tigecycline in 2.1–25.5% of *A. baumannii* and *K. pneumoniae* strains. On the other hand, it didn't restore their susceptibility to antibiotics.

Conclusion. Resistance to carbapenems and other β -lactams in *A.baumannii* and *K. pneumoniae* strains is associated with the production of carbapenemases. The presence of efflux mechanisms in some of the studied strains is an important, but not the only mechanism of antibiotic resistance.

Keywords: *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, multidrug resistance, efflux, carbapenemases, COVID-19 infection

■ ВВЕДЕНИЕ

Возрастающее число инфекций, вызванных микроорганизмами с множественной и экстремальной антибиотикорезистентностью, представляет серьезную проблему во всем мире и является одной из ведущих причин высокой летальности [1]. Пациентам, госпитализированным с COVID-19, часто назначают антибиотики широкого спектра действия, которые могут способствовать селекции и распространению антибиотикорезистентных штаммов. Среди микроорганизмов с множественной лекарственной устойчивостью, вызывающих бактериальные осложнения на фоне инфекции COVID-19, чаще всего сообщается о метициллин-резистентных *Staphylococcus aureus*, устойчивых к карбапенемам *A. baumannii*, *K. pneumoniae* и *Pseudomonas aeruginosa*, и мультирезистентных *Candida auris* [2].

Клиническая значимость исследования *A. baumannii* и *K. pneumoniae* в Беларуси значительно возрастает на фоне приобретения ими плазмидопосредованных карбапенемаз, что сопровождается развитием устойчивости к большинству β -лактамов и не относящихся к β -лактамам антибиотиков [3, 4].

Среди других механизмов антибиотикорезистентности важное значение имеют предотвращение попадания антимикробного препарата в бактериальную клетку за счет изменения проницаемости мембраны (утраты или изменения поринов) и активное выведение антибиотиков во внешнюю среду системами эффлюкса [5]. Системы эффлюкса представляют собой энергозависимые транспортные системы цитоплазматической мембраны, способные удалять из бактериальной клетки антибиотики сразу нескольких классов, что способствует проявлению множественной антибиотикорезистентности [6]. Представляется важным исследование наличия эффлюксных механизмов у *A. baumannii* и *K. pneumoniae* и поиск возможных способов подавления резистентности, опосредованного эффлюксными насосами [7].

■ ЦЕЛЬ ИССЛЕДОВАНИЯ

Выявить продукцию карбапенемаз и механизмы активного выведения антибиотиков различных групп у множественно- и экстремально-антибиотикорезистентных

штаммов *Klebsiella pneumoniae* и *Acinetobacter baumannii*, выделенных от госпитализированных пациентов с инфекцией COVID-19.

■ МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В исследование включены 47 множественно-антибиотикорезистентных штаммов *A. baumannii* и 51 множественно- и экстремально-антибиотикорезистентный штамм *Klebsiella pneumoniae*, выделенные от госпитализированных пациентов с бактериальными коинфекциями на фоне инфекции COVID-19. Штаммы были получены в период 2020–2021 гг. при исследовании пациентов, пребывавших на лечении в 9 стационарах трех областей Беларуси: Гомеля и Гомельской области (7 штаммов *A. baumannii* и 9 штаммов *K. pneumoniae*), Витебской областной клинической больницы (15 штаммов *A. baumannii* и 31 штамм *K. pneumoniae*), Могилевской больницы № 1 (25 штаммов *A. baumannii* и 11 штаммов *K. pneumoniae*). Отобранные штаммы были выделены в диагностически значимых количествах из мокроты (63,8% штаммов *A. baumannii* и 78,4% штаммов *K. pneumoniae*), крови (23,4% штаммов *A. baumannii* и 17,7% штаммов *K. pneumoniae*) и мочи (12,8% штаммов *A. baumannii* и 3,9% штаммов *K. pneumoniae*). Большинство штаммов (43 штамма *A. baumannii* и 38 штаммов *K. pneumoniae*) выделены от пациентов отделений реанимации и интенсивной терапии. Первичная идентификация и определение чувствительности к антибиотикам была выполнена в локальных микробиологических лабораториях с использованием автоматических микробиологических анализаторов. До проведения исследований штаммы подвергались криоконсервации и хранились в бульоне с сердечно-мозговой вытяжкой и 30% глицерина при -62°C .

Определение минимальных подавляющих концентраций (МПК) антибиотиков выполняли методом микроразведений в бульоне в соответствии с ISO 20776-1:2006 [8]. Двукратные последовательные разведения 10 антибиотиков (меропенем, имипенем, цефтазидим, цефепим, доксициклин в диапазоне концентраций от 0,5 до 512 мг/л; левофлоксацин, рифампицин, тигециклин, хлорамфеникол – от 0,125 до 128 мг/л; амикацин – от 1 до 1024 мг/л) готовили в бульоне Мюллера-Хинтона (Oxoid, Великобритания). Стартовая концентрация микробных клеток после инокуляции составляла 5×10^5 КОЕ/мл. Результаты интерпретировали на основании пограничных значений МПК, установленных Европейским комитетом по определению чувствительности к антимикробным лекарственным средствам EUCAST [9]. Для контроля качества использовали референсные штаммы *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 и *Escherichia coli* ATCC 25922 с известными значениями МПК.

Для фенотипического определения активности эффлюксных насосов оценивали кратность снижения МПК антибиотиков при добавлении в бульон Мюллера-Хинтона ингибитора эффлюксных насосов – карбонилцианид-3-хлорфенилгидразона (carbonyl cyanide 3-chlorophenylhydrazone, CCCP). Ввиду наличия у препарата собственной бактерицидной активности в предварительном эксперименте определили его МПК: установлено, что в концентрации 8 мг/л он не ингибировал видимый рост всех штаммов *A. baumannii* и *K. pneumoniae*. Поскольку карбонилцианид-3-хлорфенилгидразон не растворим в воде, базовый его раствор с концентрацией 10 г/л готовили в метаноле. Базовый раствор вносили в бульон Мюллера-Хинтона до достижения концентрации CCCP 8 мг/л. Расчетная концентрация метанола в бульоне не превышала 0,1%, что значительно ниже МПК метанола для исследуемых штаммов.

При снижении МПК антибиотика в присутствии СССР в 4 раза и более считали, что устойчивость может быть связана с активностью систем эффлюкса.

Обнаружение генов МБЛ NDM, VIM и IMP, а также сериновых карбапенемаз KPC, OXA-48, OXA-23 и OXA-40 выполняли методом ПЦР с флуоресцентной детекцией. Использовали диагностические наборы «АмплиСенс MDR MBL-FL», «АмплиСенс MDR KPC/OXA-48-FL» и «АмплиСенс MDR Ab-OXA-FL» производства ФБУН ЦНИИ эпидемиологии Роспотребнадзора (Москва, Российская Федерация). Выделение ДНК из бактериальных культур выполняли с помощью температурного лизиса в ТЕ-буфере. Амплификацию с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени» выполняли на амплификаторе RotorGene 3000 (Corbett Research, Австралия) в соответствии с инструкциями производителя диагностических наборов.

Дополнительно проводили фенотипический скрининг продукции МБЛ для штаммов *K. pneumoniae* методом двойных дисков с этилендиаминтетраацетатом (ЭДТА), который основан на способности ЭДТА хелатировать ионы цинка из активного центра МБЛ и подавлять их гидролитическую активность в отношении β -лактамных субстратов. Для контроля качества использовали референсный штамм *P. aeruginosa* ATCC 27853 (отрицательный контроль) и штамм *P. aeruginosa* P-033 (продуцент МБЛ VIM, положительный контроль). Для повышения чувствительности метода использовали комбинацию из трех дисков (имипенем, меропенем, цефтазидим), поскольку некоторые штаммы могут проявлять синергизм только с каким-либо одним из антибиотиков. Образование расширенной зоны подавления роста между диском с ЭДТА и хотя бы одним из дисков, содержащих β -лактамные антибиотики, расценивали как наличие продукции МБЛ у тестируемого штамма [10].

■ РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Все штаммы *A. baumannii* были устойчивы к карбапенемам, левофлоксацину, амикацину (табл. 1). Все штаммы *K. pneumoniae* оказались устойчивыми к цефтазидиму, цефепиму, левофлоксацину, тигециклину, хлорамфениколу. Сохраняли чувствительность к карбапенемам только 2,0–3,9% штаммов *K. pneumoniae*, к амикацину – 7,8% штаммов (табл. 2). Таким образом, все исследуемые штаммы проявляли множественную либо экстремальную устойчивость к антибиотикам.

Наличие механизмов эффлюкса (проявляемых значимым снижением МПК для одного или более антибиотиков в присутствии ингибитора эффлюксных насосов СССР) отмечено для 51,1% штаммов *A. baumannii* и 47,1% штаммов *K. pneumoniae*. У 2,1% штаммов *A. baumannii* и 11,8% штаммов *K. pneumoniae* значимое снижение МПК отмечалось одновременно для 4 и более антибиотиков, относящихся к различным классам, что может свидетельствовать об универсальности присутствующих у них эффлюксных систем.

В присутствии карбонилцианид-3-хлорфенилгидразона отмечалось снижение МПК β -лактамных антибиотиков в 4 раза и более для 4,4–17,0% штаммов *A. baumannii* и 5,9–7,6% штаммов *K. pneumoniae* (табл. 3). Снижение в присутствии СССР МПК тигециклина отмечалось для 17,6% штаммов *K. pneumoniae* и только 2,1% штаммов *A. baumannii*. Наиболее существенное влияние ингибитора эффлюкса выявлено по отношению чувствительности *K. pneumoniae* к амикацину: для 25,5% штаммов в присутствии СССР отмечалось снижение МПК в 4 раза и более, при этом для 5,9% штаммов МПК амикацина снижалась в 16 раз.



Таблица 1
Распределение МПК антибиотиков для штаммов *A. baumannii* в отсутствии и присутствии ингибитора эффлюксных насосов карбонилцианид-3-хлорфенилгидразона (СССР)
Table 1
Antibiotic MIC distribution for *A. baumannii* strains either alone and in the presence of the efflux pump inhibitor carbonyl cyanide-3-chlorophenylhydrazone (СССР)

Антибиотик	% изолятов со значениями МПК, мг/л											% изолятов по категориям*						МПК, мг/л	
	≤0,5	1	2	4	8	16	32	64	128	256	512	≥1024	S	I	R	50%	90%		
Meropenem	0	0	0	0	0	0	2,1	17,0	51,1	29,8	0	0	0	0	100	128	256		
Meropenem/СССР	0	0	0	0	0	2,1	6,4	44,7	40,4	6,4	0	0	0	0	100	64	128		
Imipenem	0	0	0	0	0	0	6,4	63,8	29,8	0	0	0	0	0	100	64	128		
Imipenem/СССР	0	0	0	0	0	2,2	6,7	86,7	4,4	0	0	0	0	0	100	64	64		
Cefepime	0	0	0	0	0	6,4	10,6	14,3	29,8	6,4	42,6	0	NB**			128	512		
Cefepime/СССР	0	0	0	0	2,2	8,9	11,1	20,0	17,8	35,6	4,4	0	NB			128	256		
Ceftazidime	0	0	0	0	0	0	4,3	17,0	17,0	21,3	14,9	25,5	NB			256	1024		
Ceftazidime/СССР	0	0	0	0	2,1	0	6,4	34,0	8,5	25,5	17,0	6,4	NB			128	512		
Levofloxacin	0	0	0	8,5	0	8,5	17,0	23,4	38,3	4,3	0	0	0	0	100	64	128		
Levofloxacin/СССР	0	2,1	2,1	6,4	2,1	19,1	19,1	12,8	36,2	0	0	0	0	2,1	97,9	32	128		
Rifampicin	14,9	10,6	59,6	2,1	2,1	0	4,3	4,3	2,1	0	0	0	NB			2	32		
Rifampicin/СССР	14,9	25,5	44,7	4,3	0	0	6,4	4,3	0	0	0	0	NB			2	32		
Tigecycline	4,3	36,2	23,4	29,8	6,4	0	0	0	0	0	0	0	IE***			2	4		
Tigecycline/СССР	12,8	36,2	25,5	25,5	0	0	0	0	0	0	0	0	IE			2	4		
Chloramphenicol	0	0	0	2,1	2,1	4,3	0	0	14,9	78,7	0	0	NB			256	256		
Chloramphenicol/СССР	0	0	0	2,2	0	8,7	6,5	2,2	39,1	41,3	0	0	NB			128	256		
Amikacin	0	0	0	0	0	0	0	2,1	2,1	2,1	0	93,6	0	0	100	2048	2048		
Amikacin/СССР	0	0	0	0	0	2,1	2,1	6,4	8,5	4,3	10,6	66,0	0	0	100	1024	2048		

Примечания: * S – чувствительные; I – чувствительный при увеличенной экспозиции антибиотика; R – устойчивые (S – susceptible, I – susceptible, increased exposure, R – resistant); ** нет пограничных значений (no breakpoints); *** не получено убедительных доказательств эффективности терапии инфекции, вызванной данным микроорганизмом (insufficient evidence).

Таблица 2
Распределение МПК антибиотиков для штаммов *K. pneumoniae* в отсутствие и присутствии ингибитора эффлюксных насосов карбонилцианид-3-хлорфенилгидразона (СССР)
Table 2
Antibiotic MIC distribution for *K. pneumoniae* strains either alone and in the presence of the efflux pump inhibitor carbonyl cyanide-3-chlorophenylhydrazone (СССР)

Антибиотик	% изолятов со значениями МПК, мг/л										% изолятов по категориям *			МПК, мг/л			
	≤0,5	1	2	4	8	16	32	64	128	256	512	≥1024	S	I	R	50%	90%
Meropenem	0	0	2,0	0	2,0	11,7	23,5	23,5	19,6	9,8	5,9	2,0	2,0	2,0	96,1	64	256
Meropenem/СССР	0	0	2,0	2,0	5,9	5,9	37,3	21,6	15,7	9,8	0	0	2,0	7,8	90,2	32	128
Imipenem	2,0	0	2,0	3,9	39,2	11,8	7,8	23,5	5,9	2,0	0	2,0	3,9	3,9	92,2	16	64
Imipenem/СССР	2,0	0	5,9	29,4	23,5	5,9	21,6	3,9	7,8	0	0	0	7,8	29,4	62,7	8	64
Cefepime	0	0	0	0	2,0	0	0	0	3,9	25,5	19,6	49,0	0	0	100	512	1024
Cefepime/СССР	0	0	0	0	2,0	0	0	5,9	27,5	13,7	41,2	9,8	0	0	100	512	512
Ceftazidime	0	0	0	0	0	0	0	2,0	19,6	15,7	19,6	43,1	0	0	100	512	1024
Ceftazidime/СССР	0	0	0	0	0	5,9	13,7	17,6	17,6	21,6	5,9	35,3	0	0	100	256	1024
Levofloxacin	0	0	0	0	0	5,9	7,8	58,8	27,5	0	0	0	0	0	100	128	256
Levofloxacin/СССР	0	0	0	0	0	2,0	13,7	27,5	39,2	17,6	0	0	0	0	100	128	256
Rifampicin	0	0	2,0	2,0	0	2,0	39,2	11,8	0	45,1	0	0	NB**		64	256	256
Rifampicin/СССР	0	0	2,0	0	0	7,8	45,1	2,0	0	43,1	0	0	NB		32	256	256
Tigecycline	0	2,0	3,9	45,1	31,4	15,7	2,0	0	0	0	0	0	0	0	100	4	16
Tigecycline/СССР	0	7,8	31,4	41,2	15,7	3,9	0	0	0	0	0	0	0	0	100	4	8
Doxycycline	0	0	9,8	25,5	25,5	3,9	0	21,6	13,7	0	0	0	NB		8	128	128
Doxycycline/СССР	0	5,9	5,9	25,5	25,5	2,0	3,9	27,5	3,9	0	0	0	NB		8	64	64
Chloramphenicol	0	0	0	0	0	0	2,0	11,8	7,8	78,4	0	0	0	0	100	256	256
Chloramphenicol/СССР	0	0	0	0	0	2,0	7,8	11,8	7,8	70,6	0	0	0	0	100	256	256
Amikacin	0	0	3,9	0	3,9	3,9	3,9	3,9	0	0	0	80,4	7,8	0	92,2	2048	2048
Amikacin/СССР	0	0	3,9	2,0	0	7,8	2,0	3,9	5,9	0	3,9	70,6	5,9	0	94,1	1024	2048

Примечания: * S – чувствительные, I – чувствительный при увеличенной экспозиции антибиотика, R – устойчивые (S – susceptible, I – susceptible, increased exposure, R – resistant); ** нет пограничных значений (no breakpoints); *** пограничные значения приведены для *E. coli* (breakpoints validated for *E. coli*).

Таблица 3
Штаммы *A. baumannii* и *K. pneumoniae*, для которых выявлено снижение МПК антибиотиков в присутствии ингибитора эффлюксных насосов

Table 3
***A. baumannii* and *K. pneumoniae* strains with decreased MIC of antibiotics in the presence of the efflux pump inhibitor**

	<i>A. baumannii</i>		<i>K. pneumoniae</i>	
	n	%	n	%
Meropenem	2	4,3	3	5,9
Imipenem	0	0,0	8	15,7
Cefepime	4	8,5	8	15,7
Ceftazidime	8	17,0	9	17,6
Levofloxacin	3	6,4	5	9,8
Rifampicin	1	2,1	1	2,0
Tigecycline	1	2,1	9	17,6
Doxycycline			2	3,9
Chloramphenicol	6	12,8	1	2,0
Amikacin	12	25,5	6	11,8

Практически для всех антибиотиков в присутствии СССР отмечено снижение значений МПК₅₀ или МПК₉₀ (табл. 1, 2). Вместе с тем связанное с ингибированием эффлюкса снижение МПК антибиотиков не приводило к восстановлению чувствительности к ним (переходу из категорий «резистентный» или «чувствительный» при увеличенной экспозиции антибиотика в категорию «чувствительный»). Таким образом, наличие механизмов эффлюкса у исследуемых штаммов являлось важным, но не единственным механизмом антибиотикорезистентности, а их «выключение» в ряде случаев существенно снижало значения МПК антибиотика, но не восстанавливало чувствительность к нему.

Устойчивость к карбапенемам исследуемых штаммов также была опосредована продукцией карбапенемаз. В фенотипическом тесте с ЭДТА присутствие металло-β-лактамаз подтверждено для 13 штаммов *K. pneumoniae* (25,5%). Гены МБЛ NDM выявлены у 19 штаммов *K. pneumoniae*, при этом у 3 из них дополнительно обнаруживались гены сериновых карбапенемаз (табл. 4). Продуцентами карбапенемаз различных типов являлись 35 штаммов *K. pneumoniae* (68,6%), 6 из них (11,8%) – копродуцентами одновременно нескольких карбапенемаз. Широко распространенная в странах Западной Европы сериновая карбапенемаза КРС обнаруживалась только у 4 штаммов (7,8%), у 3 из них – в сочетании с карбапенемазой OXA-48. В ранее выполненном в 2013–2014 гг. многоцентровом исследовании MBL NDM была обнаружена у 11,9% штаммов *K. pneumoniae*, выделенных от госпитализированных пациентов в трех городах Беларуси, OXA-48 – у 15,6% штаммов, КРС и копродуценты нескольких типов карбапенемаз не обнаруживались [3].

Результаты выполненного исследования показали, что детекция карбапенемаз и определение их типов важны для прогнозирования клинической эффективности новых антибиотиков резерва. Так, ингибитор-защищенные карбапенемы (меропенем-ваборбактам, имипенем-релебактам) активны только в отношении продуцентов КРС, цефтазидим-авибактам не активен в отношении продуцентов МБЛ [11]. Отмечены существенные локальные отличия распространенности продуцентов МБЛ NDM:

Таблица 4
Присутствие генов карбапенемаз у штаммов *A. baumannii* и *K. pneumoniae*
Table 4
Presence of carbapenemase genes in *A. baumannii* and *K. pneumoniae* strains

Карбапенемаза	<i>A. baumannii</i> , n (%)	<i>K. pneumoniae</i> , n (%)
OXA-23	17 (36,2%)	
OXA-40	29 (61,7%)	
OXA-48		12 (23,5%)
KPC		1 (2,0%)
NDM		16 (31,4%)
KPC+OXA-48		3 (5,9%)
OXA-48+NDM		1 (2,0%)
KPC+NDM		2 (3,9%)
OXA-23 + OXA-40	1 (2,1%)	
Не обнаружено		16 (31,4%)

такowymi являлись 9,7% штаммов *K. pneumoniae*, выделенных в Витебской областной клинической больнице, 55,6% штаммов, выделенных в стационарах Гомельской области, и 100% штаммов, выделенных в Могилевской больнице № 1.

Наличие генов карбапенемаз выявлено у всех включенных в исследование штаммов *A. baumannii* (OXA-23 – 36,2% штаммов, OXA-40 – 61,7% штаммов, копродукция OXA-23 и OXA-40 – 2,1% штаммов).

■ ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Штаммы *A. baumannii* и *K. pneumoniae*, выделенные от пациентов с инфекцией COVID-19, характеризуются устойчивостью к большинству антибиотиков. Устойчивость к карбапенемам и другим β -лактамам связана с широким распространением продукции карбапенемаз (OXA-23 и OXA-40 у *A. baumannii*, NDM, OXA-48 и KPC у *K. pneumoniae*). Отмечено присутствие копродукторов карбапенемаз нескольких типов. В условиях множественной и экстремальной антибиотикорезистентности основных грамотрицательных возбудителей бактериальных коинфекций выявление продуцируемых ими карбапенемаз с определением принадлежности к молекулярному классу является важным для прогнозирования активности новых ингибитор-защищенных цефалоспоринов и карбапенемов.

Присутствие у части исследуемых штаммов механизмов эффлюкса является важным, но не единственным механизмом антибиотикорезистентности. Ингибирование эффлюксных насосов позволило снизить значения МПК карбапенемов, цефалоспоринов, левофлоксацина, амикацина, тигециклина для 2,1–25,5% штаммов *A. baumannii* и *K. pneumoniae*, но не восстанавливало чувствительность к этим антибиотикам.

■ ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

1. Bart S., Rubin D., Kim P., Farley J., Nambiar S. (2021) Trends in hospital-acquired and ventilator-associated bacterial pneumonia trials. *Clin Infect Dis.*, vol.73, pp. 602–608. doi: 10.1093/cid/ciaa1712
2. Kariyawasam R.M., Julien D.A., Jelinski D.C. et al. (2022) Antimicrobial resistance (AMR) in COVID-19 patients: a systematic review and meta-analysis (November 2019 – June 2021). *Antimicrob Resist Infect Control.*, vol. 11, no 1. doi: 10.1186/s13756-022-01085-z
3. Tapalski D.V., Osipov V.A., Yevseyenko E.O., Saveliyeva A.K., Kozlovskaya I.V., Kozik A.P. et al. (2017) Metallo-beta-lactamases and carbapenemases among extreme antibiotic-resistant *Klebsiella pneumoniae*: occurrence in Belarus. *Zdravoohranenie*, vol. 3, pp. 40–47. (In Russian)
4. Tapalski D.V., Karpova E.V., Akulenok O.M., Okulich V.K., Generalov I.I. et al. (2021) Antibiotic resistance of *Klebsiella pneumoniae* against the background of the COVID-19 pandemic: experience of the multidisciplinary hospital. *Infectious diseases: News, Opinions, Training.*, vol. 10, no 3, pp. 15–22. doi: 10.33029/2305-3496-2021-10-3-15-22. (In Russian)
5. Pulzova L., Navratilova L. and Comor L. (2017) Alterations in outer membrane permeability favor drug-resistant phenotype of *Klebsiella pneumoniae*. *Microb Drug Resist.*, vol. 23, no 4, pp. 413–420. doi:10.1089/mdr.2016.0017
6. Nishino K., Yamasaki S., Nakashima R., Zwama M., Hayashi-Nishino M. (2021) Function and Inhibitory Mechanisms of Multidrug Efflux Pumps. *Front Microbiol.*, vol. 12, Art. 737288. doi: 10.3389/fmicb.2021.737288
7. Garcia I.R., de Oliveira Garcia F.A., Pereira P.S., Coutinho H.D.M., Siyadatpanah A. et al. (2022) Microbial resistance: The role of efflux pump superfamilies and their respective substrates. *Life Sci.*, vol. 295, Art. 120391. doi: 10.1016/j.lfs.2022.120391
8. ISO 20776-1:2006. (2006) «Clinical laboratory testing and in vitro diagnostic test systems – susceptibility testing of infectious agents and evaluation of performance of antimicrobial susceptibility test devices» – Part 1: Reference method for testing the in vitro activity of antimicrobial agents against rapidly growing aerobic bacteria involved in infectious diseases. 1st ed. Switzerland, 19 p. Available at: <https://www.iso.org/standard/41630.html> (accessed 14 Mar 2022).
9. The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) (2022). Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 12.0 Available at: https://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Breakpoint_tables/v_12.0_Breakpoint_Tables.pdf (accessed 15 Mar 2022).
10. Tapalski D.V., Osipov V.A., Zhavoronok S.V. (2012) Carbapenemases of gram-negative pathogens: spread and methods of detection. *Med journal*, no 2, pp. 10–15. (In Russian)
11. Karaiskos I., Galani I., Papoutsaki V., Galani L., Giamarellou H. (2022) Carbapenemase producing *Klebsiella pneumoniae*: implication on future therapeutic strategies. *Expert Rev Anti Infect Ther.*, vol. 20, pp. 53–69. doi: 10.1080/14787210.2021.1935237