

А.Л. БИСЕКЕНОВА, Б.А. РАМАЗАНОВА, А.А. МУСАЕВА, Ш.М. НУРМОЛДИН,
Ж.С. АЛИБАЕВА, Ш.Е. УГЫШОВА

АНТИБИОТИКОРЕЗИСТЕНТНОСТЬ ШТАММОВ ENTEROBACTERIACEAE,
ВЫДЕЛЕННЫХ ОТ ПАЦИЕНТОВ МНОГОПРОФИЛЬНЫХ
СТАЦИОНАРОВ

УДК 579.842.17:57.063.8:615.281:579.252.55:615.859

В данной работе представлены этиологическая структура хирургических инфекций в многопрофильных стационарах г.Алматы (214 клинически значимых бактериальных изолятов), распределение видов выделенных энтеробактерий, результаты оценки чувствительности к антибактериальным препаратам 82 изолятов Enterobacteriaceae. Энтеробактерии составили в общей сложности 38,32% всех выделенных бактериальных возбудителей, наиболее частыми видами были *Escherichia coli* (23,83%) и *Klebsiella pneumoniae* (4,21%). Продукция β-лактамаз расширенного спектра действия (ESBL) обнаружена у 56,1% изолятов Enterobacteriaceae, в том числе, у 70,59% *E.coli* и 77,78% *K.pneumoniae*. При генотипической детекции у всех резистентных к цефалоспорином III–IV поколений штаммов *E.coli* в геноме и в плазмиде регистрировались гены TEM, из них 43,5% - изоляты, несущие только ген TEM; 43,5% - изоляты, несущие одновременно гены двух групп β-лактамаз TEM1+CTX-M1; 13% - комбинацию генов TEM1+CTX-M1+OXA. У всех 7 резистентных к цефалоспорином штаммов *K.pneumoniae* в геноме и плазмиде выявлены гены TEM-1, у 4 штаммов - комбинация генов TEM-1+CTX-M-1.

Ключевые слова: Enterobacteriaceae, *Escherichiacoli*, *Klebsiella pneumoniae*, антибиотикорезистентность, β-лактамазы расширенного спектра.

Введение. Известно, что в этиологической структуре нозокомиальных и внебольничных инфекций ведущая роль принадлежит энтеробактериям. По результатам многоцентрового эпидемиологического исследования антибиотикорезистентности возбудителей нозокомиальных инфекций МАРАФОН в 2011-2012 гг. в стационарах России энтеробактерии составили в общей сложности 33,7% всех выделенных бактериальных возбудителей. Наиболее частыми видами были *Klebsiella pneumoniae* (16,9%), *Escherichia coli* (7,9%) и *Enterobacter cloacae* (2,6%) [1]. В сравнении с аналогичными показателями, полученными в исследованиях, проведенных в России ранее, отмечалась тенденция к нарастанию: доля изолятов Enterobacteriaceae составила в 2002-2004 гг. 30,1% и 34,5% в 2006-2007 гг. [2, 3].

Наиболее клинически значимой является проблема резистентности грамотрицательных бактерий к современным цефалоспорином и карбапенемам вследствие эпидемического распространения штаммов, продуцирующих β-лактамазы расширенного спектра действия [4,5,6,7, 8].

Гены, кодирующие β-лактамазы описаны у многих возбудителей инфекций, особенно нозокомиальных. В разных регионах мира преимущественное распространение получили разные варианты таких генов. Наиболее значимыми в эпидемическом плане относятся гены, кодирующие БЛРС CTX-M-типа [9,10,11].

Целью настоящего исследования явилось изучение резистентности штаммов Enterobacteriaceae, выделенных от пациентов многопрофильных стационаров г.Алматы к β-лактамам антибиотикам, анализ его молекулярных механизмов для выработки локальной эпидемиологической карты распространения bla-генов

Материалы и методы. В исследование были включены 214 клинически значимых бактериальных изолятов, собранные в рамках внутривизовского 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 82 изолята – представители семейства Enterobacteriaceae, были изучены на предмет продукции БЛРС. 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. Атачбарова. Все исследованные изоляты были идентифицированы до вида и определена их антибиотикочувствительность на бактериологическом автоматизированном анализаторе "VITEK-2 Compact". Также дополнительно использовали классический диско-диффузионный метод определения антибиотикочувствительности на агаре Мюллера - Хинтона.

Для фенотипического выявления продукции БЛРС использовали метод двойных дисков [12]. 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 (AMC20/10 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 с подтвержденным ESBL – фенотипом проводили методом ПЦР [13]. Выделение геномной и плазмидной ДНК грамотрицательных бактерий был произведен 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). Использовалось 5 мл 18-20-часовой культуры бактерий.

Для проведения полимеразной цепной реакции на 4 пар генов БЛРС (TEM1, CTX-M1, SHV, OXA) использованные праймеры приведены в таблице 1.

Таблица 1 - Используемые праймеры

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

Для ПЦР реакции использовалось 10 пмоль каждого праймера и 20 нг геномной и плазмидной ДНК бактерий, таким образом, проводилось 2 реакции на 1 образец. ПЦР проводилось следующей программой 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. Использовался готовый мастер микс Platinum® PCR SuperMix (Life Technologies, CAUSA) объем реакции составлял 25 мкл, ПЦР проводился на BioRadIQ5 (BioRad Laboratories, Inc., CAUSA). Последующая детекция генов осуществлялась на 1% агарозном геле с добавлением этидиум бромид. Каждый ген

характеризуется определенной длиной, что дает нам качественные результаты.

Результаты исследования.

В этиологической структуре инфекций (n=214) в многопрофильных стационарах г.Алматы грамотрицательные микроорганизмы в совокупности занимают ведущую роль – 116 изолятов (54,2%) . Доля изолятов семейства Enterobacteriaceae среди всех возбудителей хирургических инфекций составила – 82 (38,32%), наиболее частыми видами были Escherichia coli (23,83%) и Klebsiella pneumoniae (4,21%). Доля изолятов неферментирующих грамотрицательных бактерий составила - 31 (14,49%) (рисунок 1).

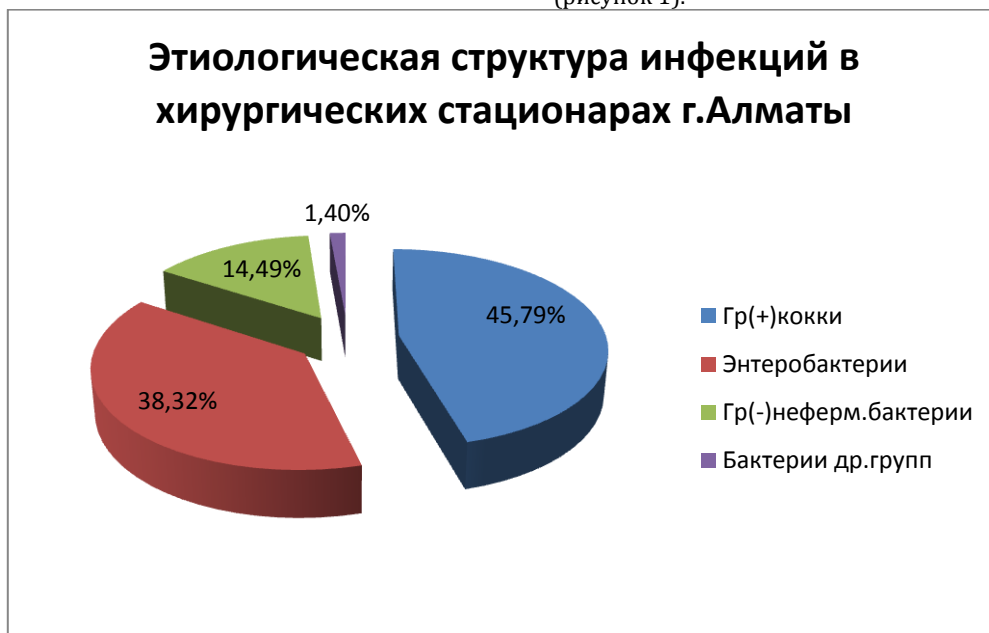


Рисунок 1

Распределение видов в этиологической структуре выделенных изолятов семейства Enterobacteriaceae представлена в таблице 1, из них наибольшее

количество – 51 изолятов были представлены E.coli, K.pneumoniae – 9 штаммов; Proteus mirabilis – 5 штаммов и Enterobacter spp. – 3.

Таблица 2 - Видовой состав изолятов - представителей семейства Enterobacteriaceae (n=82)

Вид	Абс. кол-во	Отн. кол-во
Escherichia coli	51	62,20%
Klebsiella pneumoniae	9	10,98%
Proteus mirabilis	5	6,10%
Enterobacter cloacae	3	3,66%
Pantoea spp.	3	3,66%
Serratiamarcescens	2	2,44%
Salmonella enterica	2	2,44%
Shigella group	2	2,44%
Raoultellaplanticola	2	2,44%
Providenciastuartii	1	1,22%

Cedecealapegi	1	1,22%
Citrobacterkoseri	1	1,22%

Показатели степени чувствительности выделенных штаммов энтеробактерий даны в таблице 2. Из 82 изолятов семейства Enterobacteriaceae резистентность к цефалоспорином III – IV поколений

проявили 46 штаммов, что составило 56,1%, из них 36 – E.coli, 7 – K.pneumoniae, 2 – E.cloacae и 1штамм C.koseri.

Таблица 3 - Чувствительность изученных штаммов энтеробактерий к АМП

Антибиотики	Ч %	МИК мкг/мл	УР %	МИК мкг/мл	Р %	МИК мкг/мл
Escherichia coli (n=51)						
Ампициллин	7,84	≤ 2	-	-	92,16	≥32
Пиперацillin	5,88	≤4	-	-	94,12	≥128
Цефтазидим	31,37	≤1	21,57	4	47,06	16-64
Цефтриаксон	27,45	≤1	-	-	72,55	16-64
Цефепим	45,10	≤1	41,18	2-4	13,73	8-16
Эртапенем	98,04	≤0,5	-	-	1,96	-
Меропенем	94,12	≤0,25	5,71	5,88	-	-
Амикацин	82,35	≤ 2	13,73	16	3,92	≥16
Гентамицин	66,67	≤1	1,96	4	31,37	≥16
Тобрамицин	56,86	1-2	1,96	4	41,18	8-16
Ципрофлоксацин	35,29	≤0,25	3,92	1	60,78	2-4
Левифлоксацин	37,25	0,12-1	-	-	62,75	≥8
Триметоприм/сульфаметоксазол	31,37	≤ 20	-	-	68,62	≥320
Klebsiella pneumonia (n=9)						
Ампициллин	-	-	-	-	100	≥32
Пиперацillin	-	-	-	-	100	≥128
Цефтазидим	22,22	≤1	11,11	4	66,67	≥64
Цефтриаксон	22,22	≤1	-	-	77,78	≥64
Цефепим	22,22	≤1	11,11	4	66,67	≥64
Эртапенем	55,56	≤0,5	22,22	4	22,22	4
Меропенем	88,89	≤0,25	-	-	11,11	≥16
Амикацин	44,44	2-4	22,22	16	33,33	≥16
Гентамицин	22,22	≤1	-	-	77,78	≥16
Тобрамицин	22,22	≤1	-	-	77,78	≥16
Ципрофлоксацин	22,22	≤0,25	-	-	77,78	≥4
Левифлоксацин	22,22	≤0,12	-	-	77,78	≥8
Триметоприм/сульфаметоксазол	22,22	≤ 20	-	-	77,78	≥320
Enterobacter cloacae (n=3)						
Пиперацillin	-	-	-	-	100	≥128
Цефтазидим	33,33	≤1	-	-	66,67	≥64
Цефтриаксон	33,33	≤1	-	-	66,67	≥64
Цефепим	33,33	≤1	-	-	66,67	32
Эртапенем	33,33	≤0,5	-	-	66,67	≥8
Меропенем	100	≤0,25	-	-	-	-
Амикацин	33,33	≤ 2	-	-	66,67	≥64
Гентамицин	33,33	≤1	-	-	66,67	≥16
Тобрамицин	66,67	≤1	-	-	33,33	≥16
Ципрофлоксацин	33,33	≤0,25	-	-	66,67	≥4
Левифлоксацин	33,33	≤0,12	-	-	66,67	≥8
Триметоприм/сульфаметоксазол	66,67	≤ 20	-	-	33,33	≥320

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

Escherichia coli. Среди представителей семейства Enterobacteriaceae (n=82) E.coli выделяли в отделениях хирургических стационаров г.Алматы чаще всего (в 62,2% случаев). Наиболее активными антибактериальными препаратами в отношении исследованных штаммов E.coli были карбапенемы (эртапенем – 98,0% чувствительных штаммов,

меропенем – 94,29%). Высокая частота устойчивости к цефалоспорином III – IV поколений (цефтриаксон – 72,55% резистентных штаммов; цефтазидим – 47,06% резистентных, 21,57% умеренно резистентных штаммов) была обусловлена продукцией БЛРС, выявленной по тесту синергизма цефтазидима и амоксициллин/клавуланата (рисунок 2).

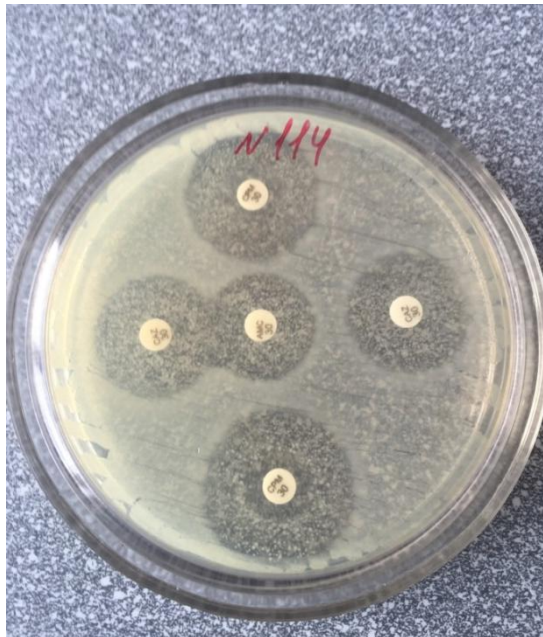


Рисунок 1 - Положительный фенотипический тест на продукцию БЛРС – метод двойных дисков

Среди цефалоспоринов наименьшая частота устойчивости была в отношении цефепима (резистентных штаммов – 11,43%, умеренно резистентных – 40,0%). Из аминогликозидов наиболее активным в отношении *E.coli* был амикацин (чувствительных штаммов – 82,35%); к гентамицину были чувствительными – 66,67% и к тобрамицину – 56,86% штаммов. К фторхинолонам: ципрофлоксацину – отмечалась 60,78% резистентность, левофлоксацину – 62,75% резистентности. При генотипической детекции у всех резистентных к цефалоспорином III – IV поколений штаммов *E.coli* в геноме и в плазмиде регистрировались гены TEM1, из них 43,5% - изоляты, несущие только ген TEM1; 43,5% - изоляты, несущие одновременно гены двух групп бета-лактамаз TEM1+CTX-M1; 13% - комбинацию генов TEM1+CTX-M1+OXA (рисунок 3).

Klebsiella pneumoniae. Выделенные 9 штаммов *K.pneumoniae* составили 10,98% от всех представителей семейства Enterobacteriaceae (n=82). К цефалоспорином III – IV поколений проявляли устойчивость 7 штаммов. К эртапенему и меропенему были чувствительны 8 выделенных штаммов. Чувствительность к аминогликозидам: амикацину сохраняли также 4 изолята, гентамицину и тобрамицину – 2 штамма. К фторхинолонам были резистентны 77,78% штаммов. При генотипической детекции у всех 7 резистентных к цефалоспорином штаммов *K.pneumoniae* в геноме и плазмиде выявлены гены TEM-1, 4 штамма - комбинацию генов TEM-1+CTX-M-1.

Enterobacter cloacae. Было выделено 3 штамма *E.cloacae*, что составило 4% от всех энтеробактерий. Из них 2 штамма проявили резистентность на все

группы антибиотиков, кроме меропенема. Оба резистентных штамма при ПЦР-детекции несли гены TEM-1.

Обсуждение результатов и заключение.

Результаты данного исследования свидетельствуют о преобладании в этиологической структуре инфекций (n=214) в многопрофильных стационарах г.Алматы грамотрицательных микроорганизмов – (54,2%). Доля изолятов семейства Enterobacteriaceae среди всех возбудителей хирургических инфекций составила – 38,32%, наиболее частыми видами были *Escherichia coli* (23,83%) и *Klebsiella pneumoniae* (4,21%).

Зарегистрированная высокая частота резистентности к современным цефалоспорином у изолятов семейства Enterobacteriaceae (56,1%) и прежде всего, у *E.coli* (70,59%) и *K.pneumoniae* (77,78%), обусловленная распространением БЛРС исключает возможность их эмпирического применения для лечения внутрибольничных и внебольничных инфекций, вызванных энтеробактериями и определяет необходимость осуществления регулярного мониторинга чувствительности возбудителей инфекций в стационарах, и при необходимости коррекции стратегии антибиотикотерапии.

Полученные локальные данные о высокой частоте сочетанной устойчивости выделенных штаммов *E.coli*, *K.pneumoniae* к традиционно используемым не-β-лактамным антибиотикам – аминогликозидам II поколения (гентамицин, тобрамицин) – (31 – 78%); фторхинолонам (ципрофлоксацин, левофлоксацин) – (60 – 78%), также не позволяет рекомендовать их широкое применение, за исключением случаев подтвержденной чувствительности.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- 1 Сухорукова М. В., Эйдельштейн М. В., Скленова Е. Ю., Иванчик Н. В., Тимохова А. В., Дехнич А. В., Козлов Р. С. и исследовательская группа «Марафон». Антибиотикорезистентность нозокомиальных штаммов Enterobacteriaceae в стационарах России: результаты многоцентрового эпидемиологического исследования МАРАФОН в 2011 – 2012 гг. // Клинико-микробиологический журнал. - 2014. - №16 (4). - С.254-265.

- 2 Решедько Г. К., Рябкова Е. Л., Кречикова О. И., Сухорукова М. В., Шевченко О. В., Эйдельштейн М. В., Козлов Р. С., Туркутюков В. Б. и др. Резистентность к антибиотикам грамотрицательных возбудителей нозокомиальных инфекций в ОРИТ многопрофильных стационаров России. //Клин микробиолантимикроб химиотер.-2008.- №8(2). – С.96-112.
- 3 Сидоренко С. В., Березин А. Г., Иванов Д. В. Молекулярные механизмы устойчивости грамотрицательных бактерий семейства Enterobacteriaceae к цефалоспориновым антибиотикам // Антибиотики и химиотерапия. – 2011. - 49(3). – С. 6-16.
- 4 Ильина В. Н., Субботовская А. И., Козырева В. С., Сергеевичев Д. С., Шилова А. Н. Характеристика штаммов Enterobacteriaceae, продуцирующих БЛРССТХ-М типа, выделенных в кардиохирургическом стационаре // Клин микробиолантимикроб химиотер. – 2013. - 15(4). – С. 309-314.
- 5 Мудрак Д. Е. Молекулярно-генетические особенности устойчивости к бета-лактамам антибиотикам грамотрицательных микроорганизмов-возбудителей нозокомиальных инфекций: Автореф. ... канд.биол.наук – М., 2010. – 22 с.
- 6 Степанова М. Н. Мутационная изменчивость СТХ-М β-лактамаз и формирование устойчивости к цефтазидиму у клинических и лабораторных штаммов Escherichiacoli: Автореф. ... канд.биол.наук – М., 2011. – 23 с.
- 7 Poirel L., Gnadkowski M., Nordmann P. Biochemical analyzing extended-spectrum β-lactamase CTX-M-15 and of its structurally related β-lactamase CTX-M-3. // J. Antimicrob Chemother. – 2002. - №50. – P. 1031-1034.
- 8 Coque T. M., Novais A., Carattoli A. et al. Dissemination of clonally related Escherichia coli strains expressing extended-spectrum β-lactamase CTX-M-15 // Emerging Infectious Diseases. – 2008. - №14. – P. 195-200.
- 9 Hawkey P. M., Jones A. M. The changing epidemiology of resistance // J Antimicrob Chemother. – 2009. - №64. – P. 3-10.
- 10 Фурсова, Прямчук С. Д., Абаев И. В., Ковалев Ю. Н., Шишкова Н. А. и др. Генетическое окружение генов bla_{CTX-M}, локализованных на конъюгативных плазмидах нозокомиальных изолятов Enterobacteriaceae, выделенных в России в 2003-2007 гг. // Антибиотики и химиотерапия. – 2010. - №11. – С. 3-10.
- 11 Эйдельштейн М. В. Выявление бета-лактамаз расширенного спектра у грамотрицательных бактерий с помощью фенотипических методов // Клин микробиол антимикроб химиотер. – 2001. - №3(2). - С. 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 bla_{SHV}, bla_{TEM} and bla_{CTX-M} genes in Enterobacteriaceae // APMIS. -2008. – 115. – P. 1400-1408.

**А.Л. БИСЕКЕНОВА, Б.А. РАМАЗАНОВА, А.А. МУСАЕВА, Ш.М. НУРМОЛДИН,
Ж.С. АЛИБАЕВА, Ш.Е. УГЫШОВА**

КӨПСАЛАЛЫ СТАЦИОНАРЛАРДАҒЫ ЕМДЕЛУШІ НАУҚАСТАРДАН БӨЛІП АЛЫНҒАН
ЕНТЕРОБАКТЕРИАЦЕАЕ ШТАММДАРЫНЫҢ АНТИБИОТИКТЕРГЕ ТӨЗІМДІЛІГІ

Түйін: Берілген жұмыста Алматы қ. көпсалалы емханалары стационарларында кездесетін хирургиялық инфекциялардың этиологиялық құрылымы (клиникалық маңызы бар 214 бактериалды изолят), бөлініп алынған энтеробактериялардың түрлерге жіктелуі, Enterobacteriaceae 82 изолятының антибактериалды препараттарға сезімталдығын бағалау нәтижелері ұсынылған. Жалпы, бөліп алынған бактериалды қоздырғыштардың ішінде 38,32% үлесін энтеробактериялар құрады, көп мөлшерде Escherichia coli (23,83%) анықталды және Klebsiella pneumonia (4,21%) үлесін құрады. Әсер ету спектрі кең β-лактамаз өнімі 56,1% Enterobacteriaceae изолятында анықталды, сонымен қатар 70,59 % E.coli және 77,78% K.pneumoniae – да анықталды. Генотиптік детекциялау кезінде III–IV кезеңінің цефалоспорин өніміне төзімді E.coli штамдарының геномында және плазмидасында TEM гендері тіркелді, олардың ішінде 43,5% - изоляттар тек TEM гендерін тасымалдаушылар; 43,5% - изоляттар бір уақытта екі топ, бета – лактамаз TEM1+CTX-M1 гендерін тасымалдаушылар; 13% - изолятында TEM1+ CTX - M1+ OXA гендерінің комбинациясы анықталды. Барлық цефалоспоринге төзімді K.pneumoniae –ның 7 штамының геномында және плазмидасында TEM-1 гендері анықталды, 4 штамында - TEM-1+CTX-M-1 гендерінің комбинациясы анықталды.

Түйінді сөздер: Enterobacteriaceae, Escherichiacoli, Klebsiella pneumoniae, антибиотикке төзімділік, әсер ету спектрі кең β-лактамаз өнімі.

**A.L. BISSEKENOVA, B.A. RAMAZANOVA, A.A. MUSSAYEVA, SH.M. NURMOLDIN,
ZH.S. ALIBAEVA, SH.E. UGUSHOVA**

ANTIBIOTIC RESISTANCE OF STRAINS OF ENTEROBACTERIACEAE ISOLATED FROM PATIENTS
IN MULTIDISCIPLINARY HOSPITALS

Resume: This paper presents etiological structure of surgical infections in the multi-field hospitals of Almaty (214 clinically significant bacterial isolates), the distribution of types of selected enterobacteria, the evaluation results of sensitivity to antibacterial preparations of 82 isolates of Enterobacteriaceae.

Enterobacteria amounted to a total of 38,32% of all the selected bacterial pathogens, the most common species were Escherichia coli (23,83%) and Klebsiella pneumonia (4,21%). Production of β-lactamase extended spectrum (ESBL) was detected in 56.1% of isolates of Enterobacteriaceae, including in 70,59% of E. coli and 77.78% of K. pneumoniae.

During genotypic detection of all resistant to cephalosporins III – IV generations of E. coli strains, TEM1 genes were recorded in the genome, of which 43,5% of the isolates carrying only the gene TEM1; 43,5% of the isolates carrying simultaneously the genes of two groups of beta-lactamase TEM1+CTX-M1; 13% a combination of genes TEM1+CTX-M1+OXA. All 7 resistant to cephalosporins strains of K. pneumoniae in genome were identified to have genes TEM-1, 4 strains - a combination of genes TEM-1 +CTX

Keywords: Enterobacteriaceae, Escherichia coli, Klebsiella pneumoniae, antibiotic resistance, β-lactamase extended-spectrum.