

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

УДК 615.779.9

©Иванов, Егоров

РАСПРОСТРАНЕНИЕ И МЕХАНИЗМЫ РЕЗИСТЕНТНОСТИ МИКРООРГАНИЗМОВ, ПРОДУЦИРУЮЩИХ БЕТА-ЛАКТАМАЗЫ. МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МЕХАНИЗМЫ УСТОЙЧИВОСТИ К БЕТА-ЛАКТАМНЫМ АНТИБИОТИКАМ ШТАММОВ КЛЕБСИЕЛЛ, ВЫДЕЛЕННЫХ ПРИ ВНУТРИБОЛЬНИЧНЫХ ИНФЕКЦИЯХ

Д.В. Иванов*, А.М. Егоров

Российская медицинская академия последипломного образования, 117105 Москва,
ул. Нагатинская, д. 3а; тел.: (499) 611-20-20; факс: (499) 611-42-38;
эл. почта: dmv1303@yandex.ru

Исследована антибиотикочувствительность внутрибольничных штаммов бактерий рода *Klebsiella*, выделенных у больных, находившихся на стационарном лечении в 30 медицинских центрах 15 различных регионов России. Всего было получено 212 штаммов клебсиелл. В исследовании род *Klebsiella* был представлен следующими видами: *Klebsiella pneumoniae* ss. *pneumoniae* – 182 (85,8%), *Klebsiella pneumoniae* ss. *ozaenae* – 1 (0,5%), *Klebsiella oxytoca* – 29 (13,7%) штаммов. Чувствительность к антибактериальным препаратам определяли методом серийных разведений в микрообъеме. Наиболее активными антибактериальными препаратами в отношении исследованных штаммов оставались карбапенемы (имипенем и меропенем). Среди цефалоспоринов III поколения самые низкие значения МПК наблюдались у ингибиторозащищенных препаратов, таких как цефтазидим/клавуланат (МПК₅₀ – 0,25 мкг/мл, МПК₉₀ – 64 мкг/мл) и цефоперазон/сульбактам (МПК₅₀ – 16 мкг/мл, МПК₉₀ – 64 мкг/мл). Методом ПЦР детектирование генов бета-лактамаз класса А (TEM, SHV, CTX) проведено у 42 штаммов *Klebsiella pneumoniae* ss. *pneumoniae*. В изолированном виде либо в различных комбинациях TEM бета-лактамазы были обнаружены у 16 (38,1%) штаммов, SHV – у 29 (69%), а CTX – у 27 (64,3%) штаммов. Комбинации двух различных детерминант резистентности к бета-лактамам были обнаружены у 23,8% изолятов, трех – у 26,2%. Скрининг устойчивых к карбапенемам клебсиелл на продукцию металло-бета-лактамаз класса В показал отсутствие среди них штаммов с фенотипически доказанной выработкой данных ферментов.

Ключевые слова: внутрибольничные инфекции, *Klebsiella* spp., антибиотикорезистентность, цефалоспорины, бета-лактамазы, металло-бета-лактамазы.

ВВЕДЕНИЕ. Причиной 90% госпитальных инфекций являются бактерии; вирусы и грибы встречаются значительно реже [1–3]. За последние 3 десятилетия этиология госпитальных инфекций претерпела значительные изменения; это является следствием использования новых антибактериальных препаратов широкого спектра действия, а также - появления мультирезистентных штаммов в окружающей среде и увеличения количества инвазивных процедур [2, 4, 5].

Внедрение в клиническую практику пенициллинастабильных бета-лактамных антибиотиков привело к снижению роли стафилококков в этиологии нозокомиальных инфекций. Одновременно, в 60–80-х годах, произошел значительный рост числа инфекций, вызванных грамотрицательными возбудителями. В большинстве исследований того времени на долю грамотрицательных аэробных бактерий приходилось около 60% всех нозокомиальных инфекций, 30% – на долю грамположительных возбудителей, 3% – на анаэробы, оставшиеся 7% имели грибковую или вирусную этиологию [2, 6, 7].

* - адресат для переписки

В то же время характер госпитальной микробной флоры отличается достаточным разнообразием, что зависит от многих особенностей стационаров. Этиология внутрибольничных инфекций отличается не только в разных странах или регионах, но и в различных медицинских учреждениях [3, 8, 9].

Из-за наибольшей частоты распространения некоторые возбудители госпитальных инфекций приобретают огромное клиническое значение. В условиях широкого и порой неконтролируемого применения антибиотиков увеличивается количество генных мутаций у таких ранее чувствительных бактерий как *E. coli*, *Klebsiella spp.*, *Enterobacter spp.*, *Citrobacter spp.*, *Serratia spp.* [10], и именно эти грамотрицательные микроорганизмы в последнее десятилетие стали определять микробиологическую картину современного стационара, а при тяжелом течении заболевания или у больных с сопутствующей патологией (сахарный диабет, сердечная недостаточность, цирроз печени, онкологические заболевания и заболевания, сопровождающиеся иммунодефицитом) возрастает роль некоторых микроорганизмов, характеризующихся множественной резистентностью к антибактериальным средствам, прежде всего к бета-лактамам антибиотикам, фторхинолонам и аминогликозидам, которые традиционно используются в качестве базовых средств терапии [11, 12].

Среди резистентных к III поколению цефалоспоринов грамотрицательных микроорганизмов, основную проблему составляют продуцирующие бета-лактамазы расширенного спектра (БЛРС). В настоящее время выработка БЛРС определяет высокую устойчивость к бета-лактамам антибиотикам. Частота распространения БЛРС значительно варьирует в отдельных географических регионах. Так, по данным многоцентрового исследования “MYSTIC”, в Европе наибольшую частоту распространения БЛРС стабильно отмечают в России и Польше (более 30% среди всех изученных штаммов энтеробактерий) [13]. В отдельных лечебных учреждениях РФ частота продукции БЛРС среди *Klebsiella spp.* превышает 90% [3].

С целью выяснения реальной картины резистентности к широкому спектру антибактериальных препаратов и выявления наиболее распространенных генетических детерминант устойчивости к бета-лактамам антибиотикам нами проведено исследование штаммов *Klebsiella spp.*, выделенных при внутрибольничных инфекциях у больных, находившихся на стационарном лечении в отделениях реанимации и интенсивной терапии (ОРИТ) и других отделениях медицинских центров различных городов России.

МЕТОДИКА. В исследование были включены штаммы бактерий рода *Klebsiella*, которые были выделены общепринятыми методами при нозокомиальных инфекциях и обладали промежуточной или высокой устойчивостью хотя бы к одному из цефалоспоринов III поколения, к защищенным пенициллинам, карбапенемам и/или имели положительный тест на продукцию бета-лактамаз расширенного спектра (критерии включения).

Культуры клебсиелл, выделенные из клинического материала, помещали в криопробирки (Symport, Канада) с транспортной средой, после чего сразу замораживали. Затем бактериологический материал передавали в лабораторию Сектора медицинской микробиологии и химиотерапии Государственного научного центра по антибиотикам (ГНЦА, Москва).

Идентификацию культур проводили стандартными методами на основании морфологических, тинкториальных, культуральных свойств и по биохимическим признакам с помощью коммерческих тест-систем “BBL Crystal/NF” (Becton Dickinson, США).

Чувствительность штаммов клебсиелл к антибиотикам определяли унифицированным методом серийных разведений в микрообъеме, учитывая критерии CLSI (ранее NCCLS, США) и используя сбалансированный по катионному составу бульон Мюллера-Хинтона (Becton Dickinson, США). Для тестирования использовали суспензию суточной культуры бактерий, соответствующую стандарту мутности 0,5 по МакФарланду. Определяли значения

минимальной подавляющей концентрации (МПК) цефокситина, цефотаксима, цефтазида, цефтазида/клавуланата, цефоперазона, цефоперазона/сульбактама, цефепима, имипенема, меропенема, гентамицина, амикацина, ципрофлоксацина, хлорамфеникола и ко-тримоксазола. Для интерпретации полученных результатов определения антибиотикочувствительности использовали критерии NCCLS [14, 15].

Устойчивые к имипенему и/или меропенему штаммы клебсиелл являлись подозрительными на продукцию металло-бета-лактамаз (MBL). Продукция MBL класса В данными штаммами изучалась в подтверждающем тесте - метод двойных дисков (double-disk approximation test) с ингибитором металло-бета-лактамаз – ЭДТА. На чашку Петри с агаром Мюллера-Хинтона, предварительно засеянную исследуемым микроорганизмом, накладывали диск с ЭДТА (500 ммоль/диск), а на расстоянии 15-20 мм от него – диски с карбапенемами (имипенем и меропенем по 10 мкг/диск, Bio-Rad, США). Если исследуемый микроорганизм продуцирует металло-бета-лактамазы класса В, зона ингибирования роста вокруг диска с карбапенемом оказывалась "вытянутой" в сторону диска с ЭДТА, в некоторых случаях наблюдалось слияние зон ингибирования. Фенотипический скрининг штаммов клебсиелл на продукцию металло-бета-лактамаз класса В проводили на базе Сектора медицинской микробиологии и химиотерапии Государственного научного центра по антибиотикам (Москва).

Штаммы, подозрительные согласно критериям CLSI на продукцию БЛРС, включали в исследование методом полимеразной цепной реакции для детекции генов бета-лактамаз класса А (TEM, SHV, CTX) (табл. 1).

Таблица 1. Праймеры, использованные для детекции генов бета-лактамаз класса А.

Ген-мишень	Праймер	Последовательность нуклеотидов (5'-3')	Размерность Ампликона (пн)	Позиция в гене	Номер в GenBank	t отжига (°C)
TEM	TEM-F	AAACGCTGGTGAAAAGTA	774	280-295	AY628199	50
	TEM-R	TAATCAGTGAGGCACCTATCTC		1032-1053	AY628199	
SHV	SHV-F	TTATCTCCCTGTTAGCCACC	731	193-212	AY223863	56
	SHV-R	TGCTTTGTATTTCGGGCCAA		903-922	AY223863	
CTX-M	CTX-M-F	ATGTGCAGTACCAGTAAGGTGATGGC	538	210-235	Y14156	60
	CTX-M-R	GCGATATCGTTGGTGGTGCC		729-748	Y14156	
CTX-M1group	CTX-M1-F	AAATCACTGCGTCAGTTCACGC	864	604-625	AJ416340	54
	CTX-M1-R	CAAACCGTTGGTGACGAT		1450-1467	AJ416340	
CTX-M2group	CTX-M2-F	ATGATGACTCAGAGCATTCG	869	1-20	AB176535	55
	CTX-M2-R	CCGTGGGTTACGATTTTCGC		850-869	AB176535	
CTX-M8group	CTX-M8-F	ATGATGAGACATCGCGTTAA	870	274-293	AF189721	56
	CTX-M8-R	TCCGTCGGTGACGATTTTCGCG		1122-1143	AF189721	
CTX-M9group	CTX-M9-F	ATGGTGACAAAGAGAGTGC	869	6336-6354	AF174129	56
	CTX-M9-R	CCTTCGGCGATGATTCGCG		7185-7204	AF174129	
CTX-M25group	CTX-M25-F	ATGATGAGAAAAAGCGTAAG	869	2321-2340	AF518567	58
	CTX-M25-R	CCGTCGGTGACAATTCTGGC		3170-3189	AF518567	

РЕЗИСТЕНТНОСТЬ МИКРООРГАНИЗМОВ, ПРОДУЦИРУЮЩИХ БЕТА-ЛАКТАМАЗЫ

Полимеразную цепную реакцию проводили в ПЦР-пробирках (QSP, США) в объёме 25 мкл. В состав реакционной смеси входили: 2,5 мкл 1×Taq ДНК полимеразного буфера, содержащего 2,5 mM MgCl₂, 0,2 мкл 1 Ед Taq ДНК полимеразы (СибЭнзим, Россия), 200 мкмоль дезоксинуклеозидтрифосфатов (Хеликон, Россия) – 2,5 мкл, по 15 пмоль прямого и обратного праймеров (Литех, Россия) – 2 мкл, 13 мкл деионизованной воды (Литех, Россия) и 5 мкл раствора матрицы ДНК. Амплификацию проводили в термоциклере Терцик (ДНК Технология, Россия) согласно стандартному протоколу реакции: денатурация в течение 2 минут при 94°C, затем 30 циклов амплификации (45 секунд денатурация при 94°C, 1 минута отжиг праймеров, 1 минута элонгация при 72°C) затем 10 минут финальная элонгация при 72°C. Продукты реакции разделяли с помощью электрофореза в горизонтальном аппарате SE-1 (Хеликон, Россия) при напряжении 100 Вольт от постоянного источника тока (LKB, Германия) в течение 25 минут, варьируя плотность геля агарозы в пределах 1,2–1,7% в зависимости от размерности ампликонов. Агарозный гель готовили на трис-ацетатном буфере (50 mM Трис-HCl, pH 8,3, 50 mM CH₃COONa, 5 mM EDTA) (Хеликон, Россия). Визуализацию полос осуществляли после окрашивания геля бромидом этидия (0,5 мкг/мл) с помощью ультрафиолетового транслюминатора и системы документации Gel Analyse (ДНК Технология, Россия). Длина продукта амплификации оценивалась с помощью маркера молекулярной массы – 100 п.о. (СибЭнзим, Россия).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ. Исследовали 212 изолятов бактерий рода *Klebsiella*, выделенных при внутрибольничных инфекциях у больных, находившихся на стационарном лечении в 30 медицинских центрах 15 различных регионов России. В исследовании род *Klebsiella* был представлен следующими видами: *K. pneumoniae* ss. *pneumoniae* – 182 (85,8%), *K. pneumoniae* ss. *ozaenae* – 1 (0,5%), *K. oxytoca* – 29 (13,7%) штаммов. После проведения фенотипирования 199 (93,9%) штаммов удовлетворяли критериям включения микроба в исследование.

Наиболее часто клебсиеллы, как возбудитель нозокомиальной инфекции, высевались у больных с госпитальной инфекцией органов дыхания (38,2% случаев). Показатели частоты выявления госпитальной инфекции органов мочевого выделения составляли – 30,7%, а нозокомиальной хирургической инфекции – 25%, этиологическим фактором которых являлись бактерии рода *Klebsiella* (рис. 1). Нозокомиальный сепсис, вызванный исключительно штаммами *K. pneumoniae* ss. *pneumoniae*, был диагностирован в 13 случаях.

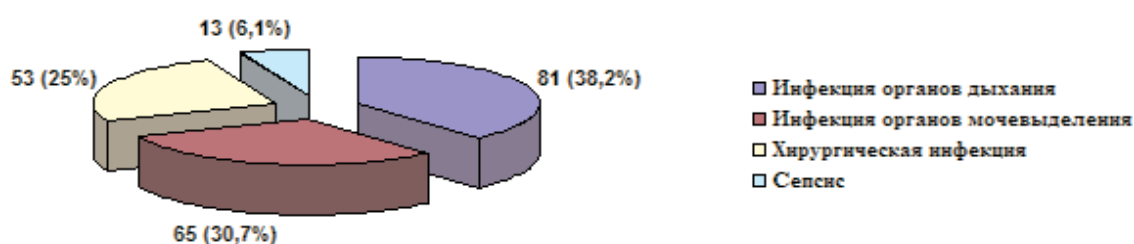


Рисунок 1.

Структура госпитальной инфекции,
этиологическим фактором которой были бактерии рода *Klebsiella*.

Так как в подавляющем большинстве случаев этиологическим агентом нозокомиальных инфекций, вызванных клебсиеллами, была *K. pneumoniae* ss. *pneumoniae*, дальнейшие этапы исследования были направлены на изучение только данного вида.

Распределение изученных штаммов бактерий *K. pneumoniae* ss. *pneumoniae* по величине МПК антибиотиков (с учётом критериев включения) представлено в таблице 2.

Таблица 2. Распределение 172 штаммов *Klebsiella pneumoniae* ss. *pneumoniae* по значениям МПК и уровням антибиотикочувствительности, выделенных от больных с госпитальной инфекцией, с учётом критериев включения.

% ШТАММОВ																	
Концентрация антибиотика	<0,125	0,125	0,25	0,5	1	2	4	8	16	32	64	128	256	512	*R	*I	*S
Анализ выполнен																	
Цефтриаксон				1,7	7,6	19,2	12,8	19,2	11,0	7,6	3,5	5,2	5,2	7,0	28,5	11,0	60,5
Цефотаксим			0,6			1,2	7,0	8,1	7,0	9,9	9,3	17,4	12,2	27,3	66,3	16,9	16,9
Цефепим			1,7				2,3	4,1	2,3	5,2	5,2	6,4	11,0	61,6	84,3	5,2	10,5
Цефепим/сульбактам				0,6	7,0	5,8	15,1	20,9	23,8	14,0	4,1	6,4	2,3		-	-	-
Цефтазидим	1,2		1,7	4,7	8,7	8,7	12,2	11,6	12,8	11,6	3,5	1,7	1,2	20,3	38,4	12,8	48,8
Цефтазидим			1,2	1,7	4,7	9,9	5,2	7,0	10,5	13,4	15,7	7,0	6,4	17,4	59,9	10,5	29,7
Цефтазидим-КК	27,9		32,6	12,8	5,2	1,7	1,7	1,7	2,9	1,7	2,9	2,3	3,5	2,3	-	-	-
Улипансепим	55,8		26,2	9,9	3,5	4,1			0,6						8,6	8	99,4
Меропенем	80,8		9,3	2,3	2,3	2,3	1,3		1,7						1,7	8	98,3
Гентамицин	4,1		3,5	0,6	1,7	2,9	5,2	8,7	18,0	6,4	15,7	9,9	2,9	20,3	73,3	8,7	18,0
Амикацин	1,7		5,8	7,0	4,7	7,0	8,1	18,0	13,4	1,7	3,5			29,1	32,6	1,7	65,7
Ципрофлоксацин	31,0		9,9	5,3	7,0	8,8	8,8	2,3	3,5	6,4	8,8	4,1	2,3	1,8	38,8	8,8	53,2
Хлорамфеникол					1,2	4,7	9,9	7,6	7,6	5,2	4,1	8,1	8,7	43,0	69,2	7,6	23,3
Ко-тримоксазол	2,3	1,7	2,9	2,9	4,1	3,5	3,5	2,3	5,8	70,9					82,6	8	17,4

*Примечание: R - резистентные штаммы, I - штаммы с промежуточной чувствительностью, S - чувствительные штаммы.

РЕЗИСТЕНТНОСТЬ МИКРООРГАНИЗМОВ, ПРОДУЦИРУЮЩИХ БЕТА-ЛАКТАМАЗЫ

Наиболее активными антибактериальными препаратами в отношении исследованных штаммов клебсиелл остаются карбапенемы (имипенем – 99,4% и меропенем – 98,3% чувствительных штаммов). Однако, среди 172 изолятов *K. pneumoniae* ss. *pneumoniae* выявлены 1 устойчивый к имипенему и 2 резистентных к меропенему штаммов.

Суммарное количество клебсиелл, имеющих промежуточный или высокий уровень резистентности к цефокситину, как маркеру гиперпродукции хромосомных AmpC-бета-лактамаз, составило почти 40%. Среди цефалоспоринов III поколения самые низкие значения МПК наблюдались у ингибиторозащищенных препаратов, таких как цефтазидим/клавуланат (МПК₅₀ - 0,25 мкг/мл, МПК₉₀ – 64 мкг/мл) и цефоперазон/сульбактам (МПК₅₀ - 16 мкг/мл, МПК₉₀ – 64 мкг/мл). К цефотаксиму были чувствительными 16,9% штаммов клебсиелл, к цефтазидиму – 29,7%, а к цефоперазону – всего лишь 10,5%. Менее половины (48,8%) всех изолятов *K. pneumoniae* ss. *pneumoniae* оставались чувствительными к цефепиму (цефалоспорин IV поколения), а значения его МПК колебались в диапазоне МПК₅₀ - 16 мкг/мл, МПК₉₀ – 512 мкг/мл.

Из аминогликозидов самые низкие значения МПК наблюдались у амикацина (МПК_{средняя} - 15,61 мкг/мл). При этом более 65% штаммов клебсиелл были чувствительными к амикацину, а 1,7% - имели промежуточный уровень резистентности. Для гентамицина значение МПК_{средняя} было почти в 2 раза выше, чем таковое для амикацина, и, соответственно, доля чувствительных к нему изолятов *K. pneumoniae* ss. *pneumoniae* составляла всего лишь 18%.

Ципрофлоксацин обладал низкой активностью в отношении изученных клебсиелл: 38% штаммов были резистентными; 8,8% обладали промежуточным уровнем устойчивости, а чувствительными были 53,2% штаммов.

Активность хлорамфеникола и ко-тримоксазола в отношении штаммов *K. pneumoniae* ss. *pneumoniae* была практически самой низкой (чувствительность 23,3 и 17,4% соответственно).

Скрининг устойчивых к карбапенемам клебсиелл на продукцию металло-бета-лактамаз класса В показал отсутствие среди них штаммов с фенотипически доказанной выработкой данных ферментов.

Результаты детекции методом ПЦР генов основных бета-лактамаз класса А у 42 штаммов *Klebsiella pneumoniae* ss. *pneumoniae*, подозрительных на их продукцию, представлены на рисунке 2.

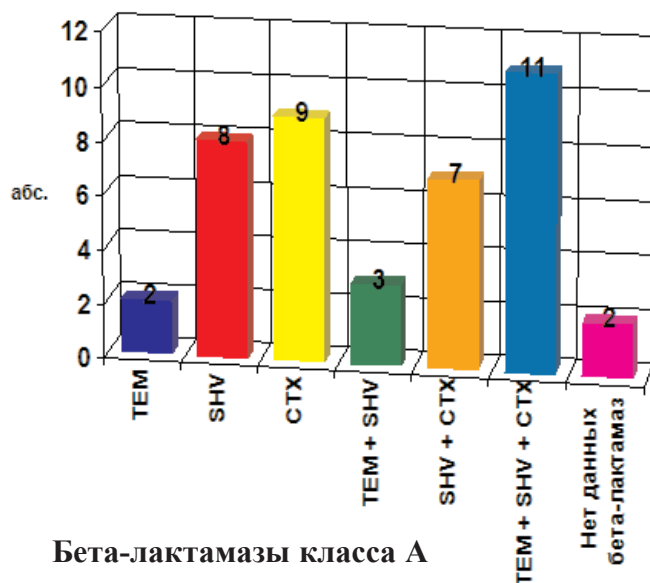


Рисунок 2.

Распределение генов наиболее распространенных ферментов бета-лактамаз класса А среди 42 штаммов *Klebsiella pneumoniae* ss. *pneumoniae*, включенных в исследование.

Как следует из представленных данных, у 95,2% штаммов *K. pneumoniae ss. pneumoniae*, являвшихся подозрительными на продукцию БЛРС по данным фенотипического анализа, были выявлены гены наиболее распространенных ферментов (TEM, SHV, CTX), либо их комбинации. В изолированном виде гены этих ферментов были выявлены у 19 (45,2%) штамма, а различные их комбинации обнаружены у 21 (50%) штаммов, при этом у 11 (26,2%) изолятов были обнаружены комбинации трёх детерминант устойчивости одновременно.

Таким образом, в изолированном виде либо в различных комбинациях TEM бета-лактамазы были обнаружены у 16 (38,1%) штаммов, SHV – у 29 (69%), а CTX – у 27 (64,3%) штаммов.

Методом ПЦР у штаммов клебсиелл, имеющих гены бета-лактамаз типа CTX, была определена генетическая подгруппа данных ферментов. Энзимы подгруппы CTX-M1 выявлены у всех (100%) 27 штаммов *K. pneumoniae ss. pneumoniae*, несущих CTX-гены.

Антибиотикочувствительность штаммов *K. pneumoniae ss. pneumoniae* к бета-лактамам антибиотикам, продуцирующим различные типы бета-лактамаз класса А и их комбинации представлена в таблице 3.

Таблица 3. Антибиотикочувствительность (%) штаммов *Klebsiella pneumoniae ss. pneumoniae*, продуцирующих различные типы бета-лактамаз класса А и их комбинации.

Бета- лактамы антибиотики	SHV (n=5)			CTX (n=9)			SHV + CTX (n=7)			TEM + SHV + CTX (n=10)		
	R	I	S	R	I	S	R	I	S	R	I	S
Цефокситин	14,3	28,6	57,1	0	0	100	14,3	28,6	57,1	25	0	75
Цефотаксим	28,6	42,9	28,6	100	0	0	85,7	0	14,3	50	25	25
Цефоперазон	71,4	0	28,6	100	0	0	85,7	14,3	0	100	0	0
Цефтазидим	85,7	0	14,3	25	0	75	57,1	14,3	28,6	25	0	75
Цефсим	0	14,3	85,7	50	0	50	14,3	57,1	28,6	37,5	0	62,5
Имипенем	0	0	100	0	0	100	0	0	100	0	0	100
Меропенем	0	0	100	0	0	100	14,3	0	85,7	0	0	100

Вне зависимости от типа продуцируемых БЛРС класса А, практически все изученные штаммы клебсиелл были устойчивы к цефоперазону, но все чувствительны к имипенему. Были выявлены изоляты клебсиелл с комбинацией генов бета-лактамаз SHV и CTX, которые были устойчивыми к меропенему. Все остальные изученные штаммы *K. pneumoniae ss. pneumoniae* являлись чувствительными к меропенему. Наиболее резистентные к бета-лактамам штаммы клебсиелл имели генетические детерминанты устойчивости SHV как в изолированном состоянии, так и в комбинации с другими детерминантами (TEM и CTX). Антибиотикочувствительность штаммов *K. pneumoniae ss. pneumoniae* к бета-лактамам антибиотикам, продуцирующим CTX-тип бета-лактамаз в изолированном виде, полностью согласуется с известными данными о субстратной специфичности этих ферментов.

Как видно из полученных результатов, антибиотикочувствительность штаммов *K. pneumoniae ss. pneumoniae* к бета-лактамам антибиотикам, продуцирующих различные типы бета-лактамаз, была также различной.

Следует учитывать, что спектр возбудителей, выделяемых при нозокомиальных инфекциях, существенно варьирует в различных странах. Вследствие этого существует необходимость проведения национальных клинико-эпидемиологических исследований. Так, в 2002 году были опубликованы “Рекомендации по оптимизации антимикробной терапии нозокомиальных инфекций, вызванных грамотрицательными бактериями в отделениях реанимации и интенсивной терапии” [12]. В основу этого пособия были положены результаты обследования 2187 пациентов с нозокомиальными грамотрицательными инфекциями в ОРИТ стационаров различных регионов России в 1997-1999 гг. В итоге, основными грамотрицательными возбудителями нозокомиальных инфекций в ОРИТ являются *Pseudomonas aeruginosa* (30%), *Escherichia coli* (18,4%), *Klebsiella pneumoniae* (14,6%), *Proteus spp.* (10%), *Enterobacter spp.* (7,6%), *Acinetobacter spp.* (6,9%). Кроме того, в ходе исследования отмечен высокий уровень резистентности штаммов *K. pneumoniae* ко всем исследованным бета-лактамам антибиотикам, за исключением имипенема. Из аминогликозидов гентамицин обладал низкой активностью в отношении всех исследованных грамотрицательных нозокомиальных бактерий. Резистентность к нему достигала 55,8% у *K. pneumoniae*. Амикацин значительно превосходил по активности гентамицин, частота резистентности к амикацину составляла 9% у клебсиелл. Ципрофлоксацин был высокоактивен в отношении *K. pneumoniae* (12,9% устойчивых штаммов) [12].

Полученные в ходе настоящего исследования данные по антибиотикочувствительности штаммов *K. pneumoniae ss. pneumoniae*, выделенных при внутрибольничных инфекциях, соответствуют общемировым тенденциям. Снижение чувствительности бактерий рода *Klebsiella* к цефалоспорином III поколения, составлявших в течение многих лет основу лечения соответствующих инфекций, объясняется распространением среди данных микробов БЛРС. Уже в 1998 году частота распространения БЛРС в ОРИТ города Москва в среднем составила 66% среди *Klebsiella spp.* [16]. По данным настоящего исследования, этот показатель достиг почти 90%.

Установлено, что наряду с типичными для изолятов клебсиелл БЛРС SHV-типа в России широко распространены ферменты группы CTX. Их особенностью является преимущественный гидролиз цефотаксима и менее эффективный гидролиз цефтазидима. Гены этих ферментов либо изолированно, либо в комбинации с генами других бета-лактамаз класса A были обнаружены у 64,3% штаммов *K. pneumoniae ss. pneumoniae*. Данные о высокой частоте распространения CTX бета-лактамаз в России были также получены и другими исследователями [16]. Кроме того, лидирующей подгруппой данного типа бета-лактамаз в России является CTX-M1, что характерно для Юго-Восточной Азии, где распространение CTX-M1 бета-лактамаз у бактерий семейства *Enterobacteriaceae* приобрело эпидемический характер [17, 18].

В заключении хотелось бы отметить, что антимикробная резистентность возбудителей нозокомиальных инфекций представляет собой значительные терапевтические проблемы практически во всех стационарах.

ВЫВОДЫ:

1. Отмечается высокий уровень резистентности нозокомиальных штаммов бактерий рода *Klebsiella* ко всем антибактериальным препаратам, имеющим широкое практическое значение в терапии, за исключением карбапенемов.
2. У большинства нозокомиальных штаммов клебсиелл, являвшихся подозрительными на продукцию БЛРС по данным фенотипического анализа, были выявлены гены ферментов бета-лактамаз класса A (SHV и CTX), либо их комбинации.
3. Энзимы подгруппы CTX-M1 выявлены у всех внутрибольничных штаммов *K. pneumoniae ss. pneumoniae*, несущих CTX-гены.

4. Скрининг устойчивых к карбапенемам клебсиелл на продукцию металло-бета-лактамаз класса В показал отсутствие среди них штаммов с фенотипически доказанной выработкой данных ферментов.

5. Карбапенемные антибиотики и ингибиторозащищенные цефалоспорины III поколения – наиболее активные антибактериальные препараты в отношении исследованных нозокомиальных штаммов клебсиелл.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Bergognie-Berezin E.* (1995) *Chest*, **108**, 268-348.
2. *Hierholzer W.J., Zernos M.J.* (1991) in: *Bacterial infections of humans: epidemiology and control* (Evans A.S., Brachman P.S., eds.) 2nd edn. Plenum Medical Book Company, New York, pp. 467-497.
3. *Сидоренко С.В., Страчунский Л.С., Ахмедова Л.И. и др.* (1999) Антибиотики и химиотерапия, **44**(11), 7-16.
4. *Сидоренко С.В.* (2001) Антибиотики и химиотерапия, **46**(12), 27-34.
5. *Яковлев С.В.* (1999) Клин. антимикробная химиотерапия, **1**, 32-34.
6. *Centers for Disease Control* (1986) Nosocomial infection surveillance, 1984 MMWR, **35** Suppl, 1SS: 17-29.
7. *Bennett V., Brachman P.C.* (1992) *Hospital Infections*. 3rd edn. New York.
8. *Hayner C., Baughman R.* (1995) *Infect. Med.*, **12**(7), 322-330.
9. *Mayer J., Campbell G.* (1996) *Infect. Med.*, **13**, 1027-1029, 1033-1036, 1044.
10. *Сидоренко С.В.* (2001) Антибиотики и химиотерапия, **46**(12), 34-36.
11. *Richards M.J., Edwards J.R., Culver D.H., Gaynes R.P.* (2000) *Infect. Control. Hosp. Epidemiol.*, **21**, 510-515.
12. *Страчунский Л.С., Решедько Г.К., Рябкова Е.Л. и др.* (2002) Клин. микробиол. антимикроб. химиотер., **4**, 379-390.
13. *Poire L., Heritier C., Podglajen J., Sougaakoff W., Gutmann L., Nordmann P. et al.* (2003) *Antimicrob. Agents Chemother.*, **47**, 755-758.
14. *NCCLS.* (1999) Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Eighth Informational Supplement. NCCLS document M100-S9. NCCLS, Wayne, PA.
15. *NCCLS.* (1998) Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Eighth Informational Supplement. NCCLS document M100-S8. NCCLS, Wayne, PA.
16. *Edelstein M., Pimkin M., Palagin I., Edelstein J., Stratchounski L.* (2003) *Antimicrob. Agents Chemother.*, **47**, 3724-3732.
17. *Li C.R., Li Y., Zhang P.A.* (2003) *Int. J. Antimicrob. Agents*, **22**, 521-525.
18. *Minday C. J., Xiong J., Li C., Shen D., Hawkey P. M.* (2004) *Ibid.*, **23**, 175-180.

Поступила: 26. 09. 2007.

SPREADING AND MECHANISMS OF ANTIBIOTIC RESISTANCE OF MICROORGANISMS,
PRODUCING BETA-LACTAMASES.
MOLECULAR MECHANISMS OF RESISTANCE TO BETA-LACTAMS OF *KLEBSIELLA SPP.*
STRAINS, ISOLATED IN CASES OF NOSOCOMIAL INFECTIONS

D.V. Ivanov, A.M. Egorov

Russian Medical Academy of Postgraduate Training. Nagatinskaya ul., 3a, Moscow, 117105 Russia;
tel.: (499) 611-20-20; fax: (499) 611-42-38; e-mail: dmv1303@yandex.ru

Antibiotic sensitivity of nosocomial *Klebsiella spp.* strains (n = 212), isolated from patients treated in 30 medical centers of 15 various regions of Russia was investigated. The *Klebsiella* genus was represented by the following species: *Klebsiella pneumoniae ss. pneumoniae* – 182 (85.8%), *Klebsiella pneumoniae ss. ozaenae* – 1 (0.5%), *Klebsiella oxytoca* – 29 (13.7%) isolates. The most active antibacterial agents against the investigated strains were carbapenems (imipenem and meropenem). Among 3rd generation cephalosporine the lowest MICs were observed for ceftazidime/clavulanic acid (MIC₅₀ – 0.25 µg/ml, MIC₉₀ – 64 µg/ml) and cefoperazone/sulbactam (MIC₅₀ – 16 µg/ml, MIC₉₀ – 64 µg/ml). Beta-lactamase genes (TEM, SHV, CTX) were detected in 42 *Klebsiella pneumoniae ss. pneumoniae* strains by PCR. Alone or in various combinations TEM type beta-lactamases have been found in 16 (38.1%) isolates, SHV - in 29 (69%), and CTX – in 27 (64.3%). Combinations of 2 different determinants were detected in 23,8% of the isolates, 3 – in 26,2%. There were not isolates producing MBL class B among resistant to carbapenems nosocomial *Klebsiella spp.* strains.

Key words: nosocomial infections, *Klebsiella spp.*, antibiotic resistance, cephalosporines, beta-lactamases, metallo-beta-lactamases.