

УДК 579.61

РАСПРОСТРАНЕННОСТЬ И ВКЛАД В АНТИБИОТИКОУСТОЙЧИВОСТЬ В-ЛАКТАМАЗ У АМБУЛАТОРНЫХ ИЗОЛЯТОВ KLEBSIELLA PNEUMONIAE

Покудина И.О., Коваленко К.А.

ФГАОУ ВО Южный федеральный университет, Ростов-на-Дону, e-mail: ipokudina@mail.ru

Исследована распространенность генов ферментов бета – лактамаз TEM-1,2, CTX-M и устойчивость к антибиотикам у изолятов *Klebsiella pneumoniae*, выделенных у амбулаторных пациентов. Чувствительность исследованных изолятов к цефалоспорином I – IV поколения составила 41.7% – 50.0%. у 100% изолятов зарегистрирована устойчивость к пенициллинам и чувствительность к карбапенемам. у 58.3% образцов отмечена множественная лекарственная устойчивость. Гены bla_{TEM-1,2} и bla_{CTX-M} детектированы у 11 (30.6%) и 20 (55.5%) изолятов соответственно. при этом у 19.4% изолятов обнаружены оба гена. в результате проведенного исследования установлено, что 72% внебольничных штаммов *K. pneumoniae* устойчивость к бета-лактамам реализуется за счет продукции β-лактамаз, что является одним из ключевых факторов приобретения и распространения множественной резистентности к антибиотическим препаратам не только в стационарах, а также среди здоровых лиц и в различных объектах окружающей среды.

Ключевые слова: бета-лактамазы, устойчивость бактерий к антибиотикам, *Klebsiella pneumoniae*

THE PREVALENCE AND CONTRIBUTING TO ANTIBIOTIC-RESISTANT OF B-LACTAMASES IN AMBULATORY ISOLATES KLEBSIELLA PNEUMONIAE

Pokudina I.O., Kovalenko K.A.

South federal University, Rostov-on-Don, e-mail: ipokudina@mail.ru

To investigate the prevalence of genes of enzymes beta – lactamase TEM-1,2, CTX-M and resistance to beta-lactam antibiotic drugs in outpatient isolates of *Klebsiella pneumoniae*. Sensitivity rate *K. pneumoniae* isolates to cephalosporins I – IV generation amounted to 41.7–50.0%. We registered 100% of the isolates resistant to penicillins and sensitive to the carbapenems. In 58.3% of samples was marked by multidrug resistance. Genes bla_{TEM-1,2} and bla_{CTX-M} detected in 11 (30.6%) and 20 (55.5%) isolates, respectively. Both genes were found in 19.4% of the isolates of *K. pneumoniae*. The result showed that resistance to beta-lactams in 72% community-acquired strains of *K. pneumoniae* is realized by product beta-lactases, which is a key factor in the spread of multidrug resistance to beta-lactam antibiotic drugs not only in hospitals but also among healthy persons and in various environmental samples.

Keywords: beta-lactamase, antimicrobial resistance, *Klebsiella pneumoniae*

Бета-лактамы антибиотики (БЛА), в настоящее время являются наиболее широко используемым классом антибактериальных средств для лечения тяжелых инфекционных патологий, включая госпитальные инфекции. Основным фактором, ограничивающим клиническую эффективность БЛА, является способность микроорганизмов вырабатывать гидролитические ферменты бета-лактамазы, разрушающие их структуру и придающие устойчивость бактериям ко многим, а в некоторых случаях ко всем β-лактамам антибиотикам [7]. Прогрессирующее увеличение устойчивости к антибиотикам, опосредованное продукцией β-лактамаз, наблюдается во многих странах и ведет к многочисленным вспышкам инфекций. [2,8].

β-лактамазы расширенного спектра (БЛРС) впервые были выявлены в середине 1980-х, в последние десятилетия устойчивость к БЛА за счет продукции БЛРС достигла масштабов эпидемии [7]. Синтез ферментов БЛРС обеспечивает бактериям устойчивость к β-лактамам препаратам широкого спектра, таким как пеницилли-

ны, азтреонам, а также к цефалоспорином первого, второго и третьего поколения. Гены БЛРС локализируются на хромосомах или на мобильных генетических элементах плазмидах и транспозонах, это является важным драйвером возрастания резистентности в результате горизонтального переноса и клональной экспансии устойчивых штаммов [10].

Наиболее распространенными во всем мире возбудителями инфекций с множественной лекарственной устойчивостью являются бактерии семейства Enterobacteriaceae, преимущественно *Klebsiella pneumoniae*. *K. pneumoniae* является важным патогеном нозокомиальных инфекций человека и наиболее распространенным грам – отрицательными бактериями с множественной лекарственной устойчивостью во всем мире. БЛРС- продуцирующие *K. pneumoniae* вызывают инфекции ассоциированные с мочевыводящей системой, желудочно-кишечным и респираторным трактом [6].

Появление полирезистентных патогенов в амбулаторных условиях представляет собой серьезную проблему в борьбе с инфек-

циями и является фактором риска для дальнейшего распространения множественной лекарственной устойчивости к различным классам антибиотиков [8]. Исследования формирования и пространственной локализации антибиотикорезистентности, как многоцентровые, так и локальные являются важнейшим мероприятием по сдерживанию дальнейшего распространения патогенных организмов.

Цель данного исследования заключалась в выявлении БЛРС – продуцирующих штаммов *Klebsiella pneumoniae* у амбулаторных пациентов, изучении их чувствительности к антибиотическим препаратам различных групп и распространенности генов бета-лактамаз расширенного спектра bla_{TEM-1,2}, bla_{CTX-M}.

Материалы и методы исследования

Для исследования были отобраны 36 изолятов *Klebsiella pneumoniae*, выделенных из различных локусов организма амбулаторных пациентов г. Ростова-на-Дону в период с апреля по октябрь 2015 г. Критерием включения изолятов в исследование было снижение чувствительности хотя бы к одному из β-лактамных антибиотических препаратов до уровня, предлагаемого Национальным комитетом по клиническим лабораторным стандартам США – CLSI [5].

Чувствительность к антибиотическим препаратам определялась диско-диффузионным методом согласно рекомендациям и критериями, изложенным в Методических указаниях по определению чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препаратам [1].

Видовую идентификацию изолятов проводили с использованием тест-систем MIKRO-LA-TEST (PLIVA-Lachema Diagnostika s.r.o., Чехия) и автомати-

ческого бактериологического анализатора «VITEK-2 compact» (BioMérieux, Франция).

Для обнаружения генов-маркеров резистентности к пенициллинам bla_{TEM-1,2} и цефалоспорином bla_{CTX-M} изоляты исследовали с помощью ПЦР. Для этого использовали ПЦР наборы ООО НПО «Литех» для обнаружения генетически обусловленной устойчивости микроорганизмов к антибиотикам формата one step.

ДНК из суточной культуры исследуемых изолятов выделяли с помощью набора «ДНК-экспресс» (ООО НПФ «Литех», г. Москва), согласно инструкции.

ПЦР проводилась в амплификаторе «Терцик» (ДНК технологии, Россия) в соответствии с протоколом производителя. Продукты амплификации разделяли методом горизонтального электрофореза в 2 % агарозном геле. Анализ электрофореграмм проводили на трансиллюминаторе GelDoc (BioRad).

Результаты исследования и их обсуждение

Все отобранные для исследования изоляты были протестированы на чувствительность к антибиотикам различных групп: бета – лактамным препаратам пенициллинам (ампициллину, амоксициллину), цефалоспорином I, II, III, IV поколения (цефазолину, цефуроксиму, цефотаксиму, цефепиму), карбапенемам (имипенему, дорипенему), а также к аминогликозидам (гентамицину) и фторхинолонам (ципрофлоксацину).

Было установлено, что 58.3 % *K. pneumoniae* устойчивы к цефазолину, цефотаксиму и цефепиму, резистентность к цефуроксиму составила 50%. у 100% изолятов зарегистрирована устойчивость к ампициллину, амоксициллину. Все исследованные изоляты оказались чувствительными к имипенему и дорипенему. Результаты представлены в табл. 1.

Таблица 1

Чувствительность изолятов *K. pneumoniae* к БЛА (n=36)

Антибиотик	Категория чувствительности (Количество микроорганизмов, %)	
	R (Устойчивые)	S (Чувствительные)
Ампициллин	36 (100%)	0%
Амоксициллин	36 (100%)	0%
Цефазолин	21 (58.3%)	15 (41.7)%
Цефуроксим	18 (50.0)%	18 (50.0)%
Цефотаксим	21 (58.3%)	15 (41.7)%
Цефепим	21 (58.3%)	15 (41.7)%
Имипенем	0%	36 (100%)
Дорипенем	0%	36 (100%)
Гентамицин	2 (5%)	34 (95%)
Ципрофлоксацин	3 (8%)	33 (8%)

Среди изолятов был выявлены образцы, обладающие множественной лекарственной устойчивостью не только к БЛА, а также к антибиотикам других групп: гентамицину и ципрофлоксацину – 2 и 3 изолята соответственно.

У части образцов одновременно зарегистрирована полирезистентность к пенициллинам и цефалоспорином I-IV поколения, т.е. они экспрессируют фенотип БЛРС. Выраженная устойчивость к этим препаратам является следствием наличия у бактерий генов, кодирующих продукцию детерминант устойчивости к БЛА.

В нашем исследовании все изоляты были протестированы на наличие у них генов $bla_{TEM-1,2}$ и bla_{CTX-M} . Результаты анализа генотипов представлены в табл. 2.

продуцирующих штаммов *K. pneumoniae* CTX-M является доминирующим, но TEM и SHV ферменты, а также β -лактамазы трех других классов (B, C, D) также детектированы и широко распространены. Резистентность к карбапенемам может ассоциироваться с продукцией карбопенемаз класса A KPCs, класса B металло- β -лактамаз (VIM, IMP, или NDM-1) или класса D OXA-тип энзимов [9].

Большинство субтипов TEM и SHV бета-лактамаз являются БЛРС, способными расщеплять не только антибиотики пенициллинового ряда и ранние цефалоспорины, но и цефалоспорины III и IV поколений. Характерную для БЛРС активность проявляют также все ферменты CTX-M типа [3].

Результаты анализа фенотипов и генотипов позволили установить, что резистент-

Таблица 2

Распределение генов β -лактамаз у *K.pneumoniae* устойчивых к БЛА

Тип β -лактамаз	Количество исследованных изолятов	Результат амплификации	
		+	–
TEM	36	30.6% (11)	69.4% (25)
CTX-1,2	36	55.5% (20)	44.5% (16)
TEM, CTX-1,2	36	19.4% (7)	80.6% (29)

Положительные результаты амплификации $bla_{TEM-1,2}$ и bla_{CTX-M} зарегистрированы у 11 и 20 исследованных изолятов соответственно, т.е. относительная частота встречаемости bla_{CTX-M} практически в 2 раза выше, чем $bla_{TEM-1,2}$, при этом у 19.4% *K.pneumoniae* обнаружены оба исследуемых гена.

Устойчивость к β -лактамам антибиотикам у бактерий реализуется за счет нескольких механизмов, включая продукцию различных энзимов, изменения конформации пенициллинсвязывающих белков, снижения проницаемости оболочки клетки и активного выведения АБП из микробной клетки (эффлюкса).

В настоящее время внимание исследователей обращено в основном на изучение трех основных групп ферментов бета-лактамаз, относящихся к молекулярному классу а – TEM, SHV и CTX-M, которые способны расщеплять не только антибиотики пенициллинового ряда и ранние цефалоспорины, но и цефалоспорины III и IV поколений. в каждой из этих групп бета-лактамазы отличаются от основного фермента единичными аминокислотными заменами, которые расширяют спектр их ферментативной активности или приводят к возникновению устойчивости к ингибиторам [4]. у БЛРС-

ность к БЛА у 72% исследованных изолятов ассоциирована с генами β -лактамаз $bla_{TEM-1,2}$ и bla_{CTX-M} .

В дополнение к БЛРС, устойчивость к бета-лактамам расширенного спектра у Enterobacteriaceae может быть опосредована другими плазмидами и ферментами, закодированными на хромосомах, такими как карбапенемазы и AmpC цефалоспорины [2]. Многие гены БЛРС располагаются на больших плазмидах, на которых могут также присутствовать детерминанты устойчивости к другим классам антибиотиков к аминогликозидам, тетрациклам, сульфониламидам или фторхинолонам. Это ведет к появлению БЛРС-продуцирующих патогенов с множественной лекарственной устойчивостью. в нашем исследовании также детектированы изоляты, обладающие множественной лекарственной устойчивостью к различным классам антибиотиков: БЛА, аминогликозидам и фторхинолонам.

Заключение

Полученные результаты показывают, что обнаруженная множественная лекарственная устойчивость у амбулаторных изолятов *K.pneumoniae* связана с производством генов β -лактамаз CTX-M и TEM-

1,2 и подтверждают потенциальную роль *K. pneumoniae*, как резервуара для БЛРС генов и других детерминант резистентности. Наличие патогенов устойчивых к современным антибиотикам не только у госпитализированных, но и у амбулаторных пациентов способствует распространению БЛРС среди здоровых людей, в общественных учреждениях и в окружающей среде.

Исследование выполнено при поддержке Министерства образования и науки Российской Федерации в рамках базовой части государственного задания в сфере научной деятельности № 1878 «Разработка фундаментальных аспектов молекулярной диагностики и митохондриальной фармакологии».

Список литературы

1. Методические указания МУК 4.2.1890-04 «Определение чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препаратам» (утв. Главным государственным санитарным врачом РФ 4 марта 2004 г.). – М.: Федеральный центр госсанэпиднадзора Минздрава России, 2004.
2. Adwan G, Jaber AA. Frequency and molecular characterization of β -lactamases producing *Escherichia coli* isolated from North of Palestine // BMRJ 2016. V.11. P.1–13.
3. Bush K, Jacoby GA. Updated functional classification of beta-lactamases // Antimicrob Agents Chemother. – 2010. – №54. – P.969–76.
4. Braykov N.P., Eber M.R., Klein E.Y., Morgan D.J., Laxminarayan R. Trends in resistance to carbapenems and third generation cephalosporins among clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* in the United States, 1999–2010 // Infect Control Hosp Epidemiol. – 2013. – V.34. №3. – P. 259–68.
5. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing: Twentieth Informational Supplement (June 2009 Update). 2009.
6. Eisen J.A., Jospin G., Farra A., Coil D.A., Tokajian S. Whole genome sequencing of extended-spectrum β -lactamase producing *Klebsiella pneumoniae* isolated from a patient in Lebanon // Front Cell Infect Microbiol. – 2015. – V.8. – P. 5–32.
7. Knothe H., Shah P., Krcmery V., Antal M., Mitsuhashi S. Transferable resistance to cefotaxime, cefoxitin, cefamandole and cefuroxime in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* and *Serratia marcescens* // Infection. – 1983. – Vol.11. № 6. – P. 315–7.
8. Logan L.K., Braykov N.P., Weinstein R.A., Laxminarayan R. CDC Epicenters Prevention Program. Extended-Spectrum β -Lactamase-Producing and Third-Generation Cephalosporin-Resistant Enterobacteriaceae in Children: Trends in the United States 1999–2011 // J Pediatric Infect Dis Soc. – 2014. – № 3. – P. 320–328.
9. Manoharan A., Premalatha K., Chatterjee S., Mathai D. SARI Study Group. Correlation of TEM, SHV and CTX-M extended-spectrum beta lactamases among Enterobacteriaceae with their in vitro antimicrobial susceptibility // Indian J Med Microbiol. – 2011. – V.29; № 2. – P.161–164.
10. Uzunović S., Ibrahimagić A., Hodžić D., Bedenić B. Molecular epidemiology and antimicrobial susceptibility of AmpC- and/or extended-spectrum (ESBL) β -lactamase-producing *Proteus* spp. clinical isolates in Zenica-Doboj Canton, Bosnia and Herzegovina // Med Glas (Zenica). – 2016. – V.1; №2. – P.103–112.