

**β-ЛАКТАМАЗИ КЛІНІЧНИХ ІЗОЛЯТІВ РОДИНИ
ENTEROBACTERIACEAE**

Серед 62 клінічних штамів ентеробактерій, ізольованих з кишкового тракту, представники *p. Escherichia* склали – 67,4 %, *p. Klebsiella* - 4,84 %, *p. Citrobacter* - 4,84 %, *p. Enterobacter* - 8,06 %, *p. Proteus* - 6,45%, *p. Morganella* - 8,06%. Найбільш ефективними стосовно ентеробактерій виявились препарати фторхінолонової групи – гатіфлоксацин і моксіфлоксацин – кількість стійких штамів складала від 0,0 % до 33,3 %. Досліджувані штами ентеробактерій проявили значну стійкість до β-лактамних антибіотиків. Найвища чутливість була відмічена щодо цефотаксиму: *Escherichia spp.* - 7,1 %, *Citrobacter spp.* – 0,0 %, *Klebsiella spp.* - 33,3 %, *Enterobacter spp.* - 20,0 %, *Proteus spp.* - 25,0 %, *Morganella spp.* - 20,0 %, стійких штамів. Із 62 виділених штамів ентеробактерій 48 продукували β-лактамази. Продукція β-лактамаз розширеного спектру дії (БЛРС) була виявлена у 100 % штамів *Klebsiella spp.*, 81,8 % - *Escherichia spp.*, 66,7 % - *Enterobacter spp.*, 25,0 % - *Morganella spp.*, 33,3 % - *Citrobacter spp.* та *Proteus spp.* від загальної кількості продукуючих β-лактамази штамів.

Ключові слова: ентеробактерії, антибіотикорезистентність, β-лактамні антибіотики, β-лактамази, β-лактамази розширеного спектру дії.

Останнім часом лікування захворювань, викликаних представниками родини *Enterobacteriaceae* пов'язано зі значними труднощами. Основною причиною цього є антибіотикорезистентність ентеробактерій. Останні стійкі до основних класів антибіотиків, які є найбільш важливими для лікування багатьох захворювань [4].

Найбільш вживаними для лікування захворювань, викликаних ентеробактеріями, є β-лактамні антибіотики, однак поширення штамів, що продукують β-лактамази, в тому числі β-лактамази розширеного спектру дії (БЛРС) значно знижує ефективність цефалоспоринів та пеніцилінів [5, 4, 7, 10].

Незважаючи на значну актуальність вказаної проблеми, дані щодо поширення штамів, продукуючих β-лактамази в Україні практично відсутні. Водночас відомо, що β-лактамазопродукуючі штами ентеробактерій є досить поширеними у країнах, які межують з Україною (зокрема Польща, Росія) [1].

Метою нашої роботи було дослідження продукції β-лактамаз клінічними штамми ентеробактерій, включно з продукцією β-лактамаз розширеного спектру дії.

Матеріали та методи. Об'єктом дослідження були 62 клінічних штами родини *Enterobacteriaceae*, виділених із кишкового тракту людини, які знаходились на обстеженні в інституті Гастроентерології АМН України. Виділення та ідентифікацію штамів ентеробактерій проведено у лабораторії мікробіології і імунології Інституту гастроентерології АМН України. Визначення β-лактамазної активності досліджуваних штамів проводили на кафедрі мікробіології та вірусології ДНУ.

Для визначення видової приналежності виділених штамів та визначення їх фізіолого-біохімічних властивостей використовували стандартні тести згідно з наказом МОЗ № 535 «Про уніфікацію мікробіологічних (бактеріологічних) методів дослідження, застосовуваних у клініко-діагностичних установах».

Для визначення чутливості досліджуваних штамів до антибіотиків використовували метод дифузії в агар із застосуванням стандартних паперових дисків [3]. Було визначено чутливість до таких антибіотиків: ампіцилін, ампіцилін/сульбактам, амоксицилін/клавуланат, цефотаксим, цефтріаксон, цефтазідім, цефепім, цефокситін, цефпоразон/сульбактам, тикарцилін/клавуланат, гентаміцин, нетилміцин, ципрофлоксацин, офлоксацин, моксіфлоксацин, гатіфлоксацин, доксициклін, іміпенем.

Визначення β-лактамазної активності досліджуваних штамів проводили ацидометричним, йодометричним методами та хромогенним тестом із використанням нітроцефіну [8, 11, 6]. Продукцію β-лактамаз розширеного спектру дії визначали методом «подвійних дисків» [8]. Статистичну обробку даних проводили на 5 % рівні значимості із застосуванням t-критерію Стьюдента.

Результати та їх обговорення. В результаті дослідження властивостей виділених штамів *Enterobacteriaceae* було визначено, що вони відносяться до родів: *Escherichia*, *Citrobacter*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Proteus* і *Morganella* (рис. 1).

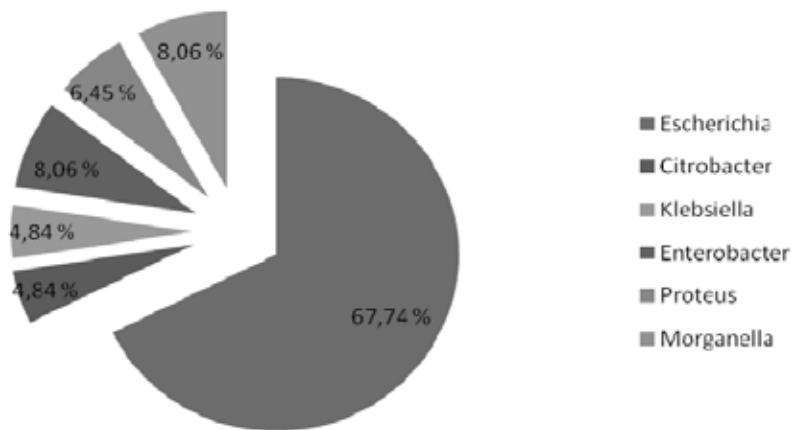


Рис. 1. Структура родової належності виділених штамів *Enterobacteriaceae*

Таким чином, серед 62 клінічних штамів *Enterobacteriaceae* більше половини штамів склали представники роду *Escherichia* - 67,74 %. До родів *Klebsiella* та *Citrobacter* було віднесено по 4,84 % штамів. Штамів *Enterobacter*, *Morganella* та *Proteus* було виявлено відповідно 8,061 %, 8,061 %, 6,45 %.

Результати визначення чутливості виділених штамів до антибіотиків наведено у табл. 1.

Таблиця 1

Стойкість виділених штамів ентеробактерій до антибіотиків

Антибіотик	Кількість стійких штамів (абс/%)					
	<i>Escherichia spp.</i>	<i>Citrobacter spp.</i>	<i>Klebsiella spp.</i>	<i>Enterobacter spp.</i>	<i>Proteus spp.</i>	<i>Morganella spp.</i>
ампіцилін	30/71,4	2/66,7	3/100,0	3/60,0	2/50	2/40
ампіцилін/сульбактам	15/35,7	1/33,3	2/66,7	2/40,0	1/25	1/20
амоксацилін/клавуланат	9/21,4	0/0,0	1/33,3	1/20,0	0/0,0	0/0,0
цефокситін	15/35,7	2/66,7	1/33,3	3/60,0	3/75	4/80,0
цефепім	37/88,1	0/0,0	1/33,3	2/40,0	2/50	4/80,0
цефотаксим	3/7,1	0/0,0	1/33,3	1/20,0	1/25	1/20,0
цефперазон/сульбактам	8/19,05	1/33,3	1/33,3	2/40,0	1/25	2/40,0
цефтріаксон	38/90,5	3/100,0	2/66,6	4/80,0	3/75	4/80,0
цефтазидім	35/83,3	2/66,7	2/66,7	3/60,0	3/75	4/80
гентаміцин	6/14,3	1/33,3	0/0,0	0/0,0	1/25	2/40,00
нетилміцин	4/9,5	1/33,3	0/0,0	0/0,0	1/25	1/20,00
тикарцилін/клавуланат	10/23,8	2/66,7	2/66,7	3/60,0	2/50	3/60,0
іміпенем	1/2,4	1/33,3	0/0,0	0/0,0	1/25	1/20,0
ципрофлоксацин	5/11,9	1/33,3	1/33,3	1/20,0	0/0,0	1/20,0
офлоксацин	6/14,3	0/0,0	1/33,3	0/0,0	0/0,0	0/0,0
гатіфлоксацин	2/4,8	1/33,3	0/0,0	1/20,0	0/0,0	1/20,0
моксифлоксацин	3/7,1	1/33,3	0/0,0	1/20,0	0/0,0	1/20,0
доксациклін	35/83,3	2/66,7	2/66,7	4/80,0	3/75	4/80,0

Штами усіх виділених мікроорганізмів родини *Enterobacteriaceae* характеризувались стійкістю до більшості незахищених β-лактамів –цефтазидіму, цефтріаксону, цефепіму, цефокситину, ампіциліну. Лише цефотаксим характеризувався високим процентом чутливих штамів (табл. 1).

Більшість штамів були чутливі до фторхінолонів і захищених β-лактамів, (комбінації β-лактамних антибіотиків з інгібіторами β-лактамаз) також до карбапенемів та гентаміцину. Виділені нами мікроорганізми характеризувалися різними рівнями стійкості до антибіотиків β-лактамного ряду (табл. 1).

Так, найбільша активність була встановлена щодо комбінації амоксицилін/клавуланат. Серед штамів *Citrobacter spp.*, *Proteus spp.* та *Morganella spp.* стійкість до амоксицикліну/клавуланату виявлена не була. Для інших мікроорганізмів був встановлений такий процент стійких штамів: *Escherichia spp.* – 21,4 %, *Klebsiella spp.* – 33,3 %, *Enterobacter spp.* – 20,0 %.

Серед цефалоспоринів ефективними були захищені комбінації з сульбактамом, а саме цефперазон/сульбактам. Серед *Escherichia spp.* було виявлено 19,05 % стійких штамів. Найбільш ефективним серед незахищених цефалоспоринів виявився цефотаксим: *Escherichia spp.* – 7,1 %, *Citrobacter spp.* – 0 %, *Klebsiella spp.* – 33,3 %, *Enterobacter spp.* – 20,0 %, *Proteus spp.* – 25,0 %, *Morganella spp.* – 20,0 % стійких штамів. Найменш ефективним виявився цефтріаксон. Стосовно нього було виявлено 90,5 % стійких штамів *Escherichia spp.*, та 100 % стійких штамів *Citrobacter spp.* Штами інших родів були менш стійкими: *Klebsiella spp.* – 66,7 %, *Enterobacter spp.* та *Morganella spp.* – 80,0 %, *Proteus spp.* – 75,0 % (табл. 1).

Щодо фторхінолонів виділені нами штамми показали високу чутливість, особливо до моксіфлоксацину та гатіфлоксацину. *Klebsiella spp.* та *Proteus spp.* проявили 100 % чутливість до цих препаратів. *Escherichia spp.* – 7,1 %/4,8 %, *Citrobacter spp.* – 33,3 %, *Enterobacter spp.* та *Morganella spp.* – 20,0 % стійких штамів. До офлоксацину штамми теж проявили чутливість. Так, усі штамми крім *Escherichia spp.* та *Klebsiella spp.* проявили 100 % чутливість.

До гентаміцину виділені штамми *Enterobacteriaceae* були відносно чутливими. Наприклад *Klebsiella spp.* та *Enterobacter spp.* проявили 100 % чутливість (табл. 1). Для інших мікроорганізмів проценти стійких штамів були такими: *Escherichia spp.* – 14,3 %, *Citrobacter spp.* – 33,3 %, *Proteus spp.* – 25,0 %, *Morganella spp.* – 40,0 % стійких штамів. Нетилміцин виявився більш активним стосовно *Escherichia spp.* та *Morganella spp.* ніж гентаміцин – 9,5 % та 20 % стійких штамів відповідно. Всі виділені штамми ентеробактерій характеризувалися високим рівнем стійкості до доксицикліну. Так, 83,3 % штамів *Escherichia spp.* були стійкими. Щодо інших штамів були отримані такі показники: *Citrobacter spp.* та *Klebsiella spp.* – 66,7 %, *Enterobacter spp.* та *Morganella spp.* – 80,0 %, *Proteus spp.* – 75,0 % стійких штамів. Слід зазначити, що отримані нами результати відрізняються від даних інших авторів, які вказують на досить високий відсоток штамів резистентних до гентаміцину (80 %) та ципрофлоксацину (40–60 %) серед штамів р. *Klebsiella* та *E. coli*, що продукують БЛРС [2].

Стійкість до карбапенемів серед представників родини *Enterobacteriaceae* зустрічається дуже рідко і, як правило, носить перехресний характер між окремими представниками групи, тому в дослідження достатньо було включати лише один препарат – іміпенем. Результати, отримані нами при дослідженні чутливості мікроорганізмів, підтвердили дані інших вчених [5, 7]. Так, серед *Escherichia spp.* було виявлено лише 2,4 % стійких штамів. *Klebsiella spp.* та *Enterobacter spp.* показали 100 % чутливість до препарату. Інші мікроорганізми показали наступні результати: *Citrobacter spp.* – 33,3 %, *Proteus spp.* – 25,0 % та *Morganella spp.* – 20,0 % стійких штамів. До недавнього часу не було даних про продукцію представниками р. *Enterobacteriaceae* БЛРС із карбапенемазною активністю. Однак, у 2002 р. у Франції було виділено клінічний штам *Klebsiella pneumoniae*, що продукував БЛРС із карбапенемазною активністю (SHV-38) [9], такий же фермент був виявлений і в Росії [2].

Високий рівень стійкості до β-лактамних антибіотиків пов'язаний із продукцією β-лактамаз – ферментів, що гідролізують β-лактамне кільце пеніцилінів та цефалоспоринів. У зв'язку з цим нами були відібрані стійкі штамми ентеробактерій для подальшого дослідження та визначення β-лактамаз.

β-лактамази були виявлені серед більшості виділених штамів *Enterobacteriaceae*. Так, найбільша кількість β-лактамазопродукуючих штамів було виявлено серед пред-

ставників *Citrobacter spp.*, *Escherichia spp.*, *Morganella spp.*. Дещо менший відсоток β -лактамазопродукуючих штамів відмічався для *Proteus spp.*, *Klebsiella spp.*, *Enterobacter spp.* (рис. 2). Наведені результати вказували на те, що йодометричний та ацедометричний методи та тест з нітроцефіном відрізнялися ступенем чутливості (рис. 2).

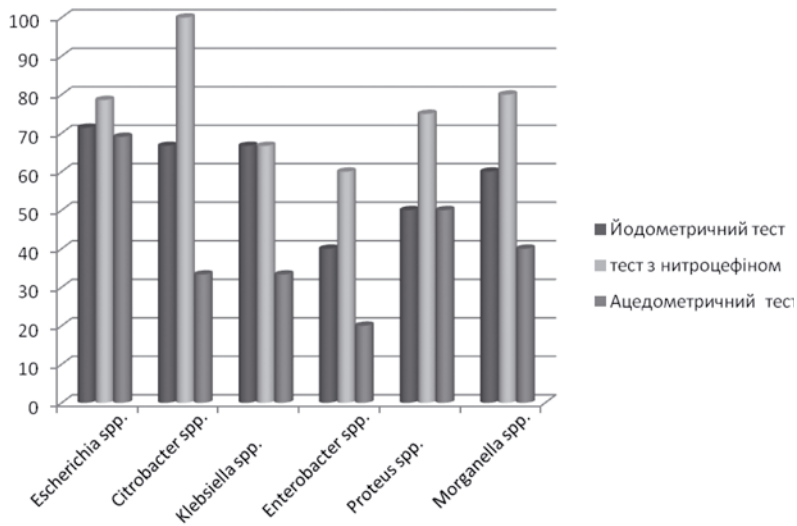


Рис. 2. Розповсюдження здатності до продукції β -лактамаз у досліджуваних штамів

Найбільш чутливим виявився тест з нітроцефіном. Він виявив найбільший процент штамів, що продукують β -лактамазу серед представників ентеробактерій. Згідно з цим методом кількість штамів, продукуючих β -лактамаз була на 20–40 % вища, ніж при використанні йодометричного та ацидометричного методів (рис. 2).

Для того, щоб виявити продукцію β -лактамаз розширеного спектру дії використовували метод «подвійних дисків», що представляє собою варіант класичного диск-дифузійного методу визначення чутливості.

Нами було виявлено, що досліджувані штами р. *Enterobacteriaceae* продукували β -лактамази розширеного спектру дії (рис. 3).

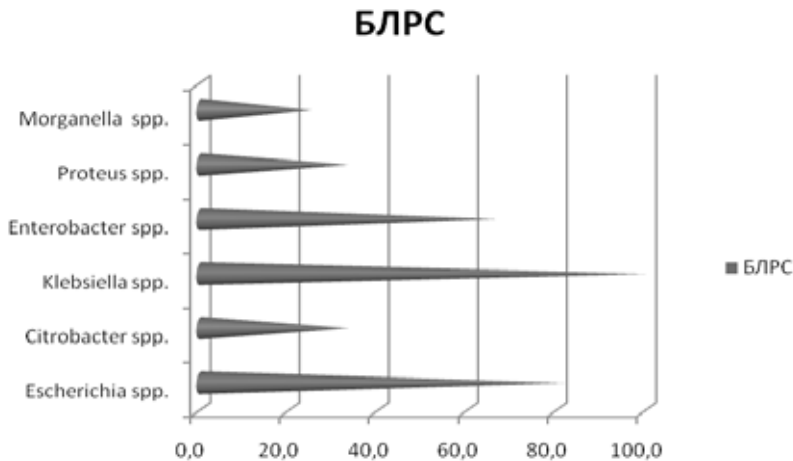


Рис. 3. Розповсюдження у ентеробактерій β -лактамаз розширеного спектру дії, встановлене методом «подвійних дисків»

Умовні позначення: БЛРС – β -лактамази розширеного спектру дії.

Так, найбільша кількість штамів, що продукують БЛРС була виявлена серед *Klebsiella spp.* – 100 % від загальної кількості продукуючих β -лактамази штамів. Серед *Escherichia spp.* було виявлено 81,8 %, серед *Enterobacter spp.* – 66,7 %, *Morganella spp.* – 25,0 %, серед *Citrobacter spp.* та *Proteus spp.* було виявлено 33,3 % від загальної кількості продукуючих β -лактамази штамів.

За даними ряду дослідників частота розповсюдження мікроорганізмів-продуцентів БЛРС залежить від географічних регіонів [2]. В Європі найбільша кількість штамів мікроорганізмів, продукуючих БЛРС, відмічається в Росії і Польщі (більше 30 % серед усіх вивчених штамів ентеробактерій). Так, проведені у Російській Федерації дослідження показали, що за рахунок вироблення БЛРС до цефалоспоринів були стійкими близько 60 % у 1996-97 рр. і 84,3 % в 2002-04 рр. штамів клебсієл та близько 15,8 % і 54,7 % штамів в *E. coli* відповідно [1]. Також відмічено двократне зростання числа БЛРС – продукуючих штамів ентеробактерій у Північній Америці за останні п'ять років [12].

Порівнюючи використані нами методи визначення β-лактамаз, можна зазначити, що найбільш зручним є метод з використанням нітроцефіну, що вимагає найменших витрат матеріалів, реактивів і часу. Слід також зазначити, що метод дозволяє визначити широке коло β-лактамаз.

Наведені результати вказують на те, що серед досліджуваних штамів р. *Enterobacteriaceae* були виявлені досить високі показники продукції β-лактамаз (включно β-лактамаз розширеного спектру дії). Таким чином саме продукція β-лактамаз зумовлює високі рівні стійкості до широкого спектру β-лактамних антибіотиків, при цьому найбільш розповсюджені β-лактамази серед клебсієл порівняно з іншими ентеробактеріями. Водночас, штами ентеробактерій, що продукують БЛРС, зберігають досить високу чутливість до фторхінолонів та карбапенемів. Все це говорить про необхідність всебічного вивчення і впровадження в клінічну практику надійних і стандартизованих методів виявлення β-лактамаз, що буде мати суттєве значення для складання схем раціональної антибіотикотерапії при лікуванні захворювань, викликаних цими мікроорганізмами.

Т.Н. Полишко, Т.В. Скляр, А.В. Крысенко, А.И. Винников, В.Е. Кудрявцева

*Днепропетровский национальный университет им. Олеса Гончара
просп. Гагарина, 72, Днепропетровск, 49050, Украина*

β-ЛАКТАМАЗЫ КЛИНИЧЕСКИХ ИЗОЛЯТОВ СЕМЕЙСТВА *ENTEROBACTERIACEAE*

Резюме

Среди 62 клинических штаммов энтеробактерий, изолированных из кишечного тракта, представители р. *Escherichia* составляли - 67,4 %, р. *Klebsiella* - 4,84 %, р. *Citrobacter* 4,84 %, р. *Enterobacter* – 8,06 %, р. *Proteus* – 6,45 %, р. *Morganella* 8,06 %. Наиболее эффективными относительно энтеробактерий были препараты фторхинолоновой группы – гатифлоксацин и моксифлоксацин – количество устойчивых штаммов составляло – от 0,0 % до 33,3 %. Исследуемые штаммы энтеробактерий проявляли значительную устойчивость к β-лактамным антибиотикам. Наиболее высокая чувствительность была отмечена к цефотаксиму: *Escherichia spp.* – 7,1 %, *Citrobacter spp.* – 0,0 %, *Klebsiella spp.* – 33,3 %, *Enterobacter spp.* – 20,0 %, *Proteus spp.* - 25,0 %, *Morganella spp.* – 20,0% устойчивых штаммов. Из 62 выделенных штаммов энтеробактерий 48 продуцировали β-лактамазы. Продукция β-лактамаз расширенного спектра действия (БЛРС) была обнаружена у 100 % штаммов *Klebsiella spp.*, 81,8 % – *Escherichia spp.*, 66,7 % – *Enterobacter spp.*, 33,3 % – *Citrobacter spp.* и *Proteus spp.* – от общего количества продуцирующих β-лактамазы штаммов.

Ключевые слова: энтеробактерии, антибиотикорезистентность, β-лактамные антибиотики, β-лактамазы, β-лактамазы расширенного спектра действия.

T.M.Polishko, T.V.Sklyar, O.V.Krysenko, A.I.Vinnikov, V.E.Kudryavtseva

Oles Gonchar Dnepropetrovsk National University

β-LACTAMASES OF CLINICAL ISOLATES OF *ENTEROBACTERIACEAE* FAMILY

S u m m a r y

Among 62 clinical strains of enterobacteria, isolated from intestinal tract, representatives of genus *Escherichia* made – 67.4 %, *Klebsiella* - 4.84 %, *Citrobacter* – 4.84 %, *Enterobacter* – 8.06 %, *Proteus* – 6.45 %, *Morganella*

of 8.06 %. Preparations of fluorquinolone group – gatifloxacin and moxifloxacin, the number of steady strains being from 0.0 % to 33.3 %, were the most effective in respect of enterobacteria. The investigated strains of enterobacteria showed considerable resistance to β -lactam antibiotics. The highest sensitivity has been noted to cefotaxim: *Escherichia spp.* – 7.1 %, *Citrobacter spp.* – 0.0 %, *Klebsiella spp.* – 33.3 %, *Enterobacter spp.* – 20.0 %, *Proteus spp.* – 25.0 %, *Morganella spp.* – 20.0 % of steady strains. Among 62 isolated strains of enterobacteria 48 produced β -lactamases. Production of extended-spectrum β -lactamases (ESBL) has been found out in 100 % of strains of *Klebsiella spp.*, 81.8 % of *Escherichia spp.*, 66.7 % of *Enterobacter spp.*, 33.3 % of *Citrobacter spp.* and *Proteus spp.* – from total amount of strains producing β -lactamases.

The paper is presented in Ukrainian.

К е у о р д с: enterobacteria, antimicrobial resistance, β -lactam antibiotics, β -lactamases, β -lactamases of extended-spectrum.

Т h e a u t h o r ' s a d d r e s s: *Sklyar T.V.*, 72 Gagarin's Avenue, Dnepropetrovsk, 49050, Ukraine.

1. Белобородова Н.В., Кузнецова С.Т., Попов Д.А. и др. Клинический опыт лечения тяжелых госпитальных инфекций с применением ингибиторозащищенного цефалоспорино III поколения цефоперазона/сульбактама // Антибиотики и химиотерапия. – М.: Медицина, 2005. - № 50. – С. 33–41.
2. Березин А.Г., Ромашов О.М., Яковлев С.В., Сидоренко С.В. Характеристика и клиническое значение бета-лактамаз расширенного спектра // Антибиотики и химиотерапия. - 2003– Т. 48, № 7. – С. 28–40.
3. Определение чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препаратам. Методические указания МУК 4.2.1890-04 // Клиническая микробиология и химиотерапия – 2004. - № 6. – С. 306–359.
4. Сидоренко С.В. Бета-лактамазы расширенного спектра: клиническое значение и методы детекции // Инфекции и антимикробная терапия. – 2002. – Т. 4, № 6. – С. 6–11.
5. Страчунский Л.С. β -лактамаз расширенного спектра действия – быстро растущая и плохо осознаваемая угроза // Клиническая микробиология и химиотерапия. – 2005. – Т. 7, № 1. – С. 92–96.
6. Эйдельштейн М.В. Бета-лактамазы аэробных грамотрицательных бактерий: характеристика, основные принципы классификации, современные методы выявления и титрования // Клиническая микробиология антимикробная химиотерапия. – М.: Медицина, 2001. - № 3. – С. 223–242.
7. Эйдельштейн М.В., Страчунский Л.С., исследовательская группа РОСНЕТ. Динамика распространенности и чувствительности БЛРС продуцирующих штаммов энтеробактерий к различным антимикробным препаратам в ОРИТ России // Клиническая микробиология и химиотерапия – 2005. – Т. 7, № 4. – С. 323–336.
8. Danilova T.N., Kovaleva V.V., Smirniakova E.S. The determination of the beta-lactamase activity of microorganisms by an acidometric method // Vestn. Dermat. Venerol. – 1990. – N 9. – P. 77–78.
9. Gutmann L., Rentier C., Nordmann P. et al. Emergence in *Klebsiella pneumoniae* of a chromosome-encoded SHV beta-lactamase that compromises the efficacy of imipenem // Antimicrob. Agents Chemother. – 2003. – 47. – P. 755–758.
10. Kohlenberg A., Schwab F., Geffers C., Behnke M., Ruden H., Gastmeier P. Time-trends for Gram-negative and multidrug-resistant Gram-positive bacteria associated with nosocomial infections in German intensive care units between 2000 and 2005 // Clin. Microbiol. Infect. – 2008. – 14, N 1. – P. 93–96.
11. Livermore D.M., Williams J.D. β -Lactams. Mode of action and mechanisms of bacterial resistance; Antibiotics in laboratory medicine / Ed. by V.Lorian. – Baltimore: Williams & Wilkins, 1991. – P. 503–78.
12. Zhanel G.G., DeCorby M., Laing N. et al. Antimicrobial-resistant pathogens in intensive care units in Canada: Results of the Canadian National Intensive Care Unit (CAN-ICU) study, 2005–2006 // Antimicrob. Agents Chemother. – 2008. – 52, N 4. – P. 1430–1437

Отримано 6.04.2010