

Л. В. ЛАГУН, С. В. ЖАВОРОНОК

ЭТИОЛОГИЧЕСКАЯ СТРУКТУРА И МОЛЕКУЛЯРНО-БИОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ВОЗБУДИТЕЛЕЙ ПИЕЛОНЕФРИТА

Гомельский государственный медицинский университет, Белорусский государственный медицинский университет

Цель исследования. Оценить этиологическую структуру и молекулярно-биологические свойства возбудителей острых и хронических пиелонефритов в современных условиях.

Материал и методы. В исследование включено 273 клинических изолята, выделенных в 2005—2010 гг. из мочи пациентов с острым и хроническим пиелонефритом. Проведен ретроспективный анализ этиологической структуры пиелонефритов за 2000—2003 гг. и 2008—2010 гг. Определение чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препаратам осуществлялось методом серийных разведений в агаре. С использованием метода «двойных дисков» выполнен фенотипический скрининг продукции бета-лактамаз расширенного спектра (БЛРС) для исследуемых штаммов. Геноиндикация БЛРС различных классов у возбудителей пиелонефритов проведена с использованием ПЦР. Определение интенсивности пленкообразования выполнено путем окрашивания сформированных биопленок кристаллическим фиолетовым с последующей экстракцией красителя и измерением его концентрации в отмывочном растворе.

Результаты. В этиологической структуре пиелонефритов преобладали штаммы *E. coli* и *P. aeruginosa*. Оценена устойчивость микроорганизмов — возбудителей пиелонефритов — к антибактериальным препаратам различных групп за 2005—2008 гг. и 2009—2010 гг. Изучены механизмы антибиотикорезистентности энтеробактерий. Выявлена высокая распространенность продуцентов БЛРС, относящихся к группе СТХ-М. Среди возбудителей пиелонефритов максимальной пленкообразующей способностью обладали изоляты *P. aeruginosa*. Штаммы, выделенные от пациентов с хроническим пиелонефритом и пиелонефритом, протекающим на фоне мочекаменной болезни, по способности формирования биопленок значительно превосходили штаммы, выделенные от больных с острым пиелонефритом. У штаммов *P. aeruginosa*, *E. coli*, *K. pneumoniae* с максимальной пленкообразующей активностью отмечена более высокая устойчивость к антимикробным препаратам.

Заключение. Полученные данные об этиологической структуре пиелонефритов, способности возбудителей формировать биопленки, уровнях и механизмах устойчивости уропатогенов к антибактериальным препаратам можно использовать для разработки алгоритма микробиологической диагностики и ра-

циональной антибактериальной терапии пиелонефритов.

Ключевые слова: острые и хронические пиелонефриты, возбудители пиелонефритов, резистентность к антибиотикам, бета-лактамазы расширенного спектра, биопленки.

Инфекции мочевыводящих путей относятся к числу наиболее распространенных заболеваний у человека и широко встречаются как в амбулаторной практике, так и в стационаре. Среди болезней почек первое место по частоте занимает пиелонефрит. Это заболевание широко распространено среди взрослых и детей, но чаще ему подвержены девочки раннего возраста, молодые женщины, особенно во время беременности, а также пожилые люди [1—5]. Наиболее частыми возбудителями пиелонефритов являются энтеробактерии, главным образом — *Escherichia coli*, на долю которой приходится до 85% от всех случаев заболевания, а также *Proteus spp.* и *Klebsiella pneumoniae*. Достаточно большой удельный вес в структуре уропатогенов занимает *Pseudomonas aeruginosa* и *Staphylococcus aureus* [4—6]. Вид и характер инфекции имеют большое значение в этиопатогенезе пиелонефрита. В последнее время этот фактор недооценивают, следствием чего является нерациональное применение антибактериальных препаратов в терапии пиелонефритов. Это приводит к широкому распространению резистентных форм микроорганизмов, персистенции инфекции в организме в виде L-форм, что способствует затяжному течению заболевания и хронизации процесса [3, 6].

Одним из факторов патогенности микроорганизмов является образование биопленок. Все представители нормальной микрофлоры в организме человека существуют в составе биопленок. С их образования также начинается развитие инфекции любой локализации, в том числе и мочевыделительной системы [7—9]. Для практической медицины особенно важно, что бактерии в биопленках обладают повышенной выживаемостью в присутствии факторов иммунной защиты организма и антибиотиков. Таким образом, в связи с наличием биопленок при инфекциях требуются новые подходы к диагностике и лечению инфекции.

В настоящее время важно не только установить диагноз пиелонефрита, но и провести этиологическую диагностику и назначить рацио-

нальную антибактериальную терапию. От того, насколько правильно выбрана стартовая антибиотикотерапия пиелонефритов, зависят в конечном итоге эффективность лечения и прогноз болезни. В последнее время резистентность энтеробактерий ко многим антибиотикам, особенно бета-лактамам, приобретает все большее распространение, что является серьезной проблемой здравоохранения. Постоянный контроль за изменением уровней чувствительности патогенов к антибактериальным препаратам — часть стратегии сдерживания распространения антибиотикорезистентности возбудителей инфекций в условиях лечебно-профилактического учреждения [6, 10—13]. Продукция бета-лактамаз расширенного спектра (БЛРС) — один из наиболее распространенных и клинически значимых механизмов резистентности энтеробактерий к современным бета-лактамам антибиотикам. Однако эффективность выявления устойчивости, связанной с продукцией БЛРС, с помощью традиционных методов оценки чувствительности остается очень низкой. Распространение бета-лактамаз часто носит эпидемический характер, при этом доминируют определенные штаммы или ферменты в масштабах как отдельных центров, так и обширных географических зон [14—17]. Для проведения эффективной эмпирической антибактериальной терапии инфекций мочевыводящих путей, в частности пиелонефрита, необходима информация о распространенности антибиотикорезистентности и ее основных механизмах.

Цель настоящего исследования — оценка этиологической структуры и молекулярно-биологических свойств возбудителей острых и хронических пиелонефритов в современных условиях.

Материал и методы

В исследование включили 273 клинических изолята (102 — *Escherichia coli*, 83 — *Pseudomonas aeruginosa*, 63 — *Proteus spp.*, 15 — *Staphylococcus aureus*, 10 — *Klebsiella pneumoniae*), выделенных в 2005—2010 гг. из мочи пациентов с острым и хроническим пиелонефритом. Все пациенты находились на стационарном лечении в урологическом и детском нефрологическом отделениях Гомельской областной клинической больницы. Дополнительно изучили первичную медицинскую документацию 345 пациентов с пиелонефритами за 2000—2003 гг. и 297 больных — за 2008—2010 гг. Про-

вели ретроспективный анализ этиологической структуры возбудителей пиелонефритов в Гомельской областной клинической больнице.

Методом серийных разведений в агаре определяли минимальные подавляющие концентрации (МПК) амоксициллина, амоксициллина/клавуланата, ампициллина/сульбактама, имипенема, цефотаксима, цефтазидима, цефепима, ципрофлоксацина, гентамицина, амикацина для 49 штаммов *E. coli*, 35 штаммов *Proteus spp.*, выделенных из мочи в 2005—2008 гг., и для 32 штаммов *E. coli*, 28 штаммов *Proteus spp.*, выделенных из мочи в 2009—2010 гг. Также данным методом определяли МПК цефтазидима, цефепима, ципрофлоксацина, гентамицина, амикацина, имипенема, меропенема для 47 штаммов *P. aeruginosa*, выделенных из мочи пациентов в 2005—2008 гг., и 36 штаммов *P. aeruginosa*, выделенных из мочи в 2009—2010 гг. Суточные культуры разводили в изотоническом растворе натрия хлорида до стандарта мутности 0,5 по Мак-Фарланду и наносили с помощью штампов-репликаторов на чашки Петри с агаром Мюллера—Хинтона («HiMedia Laboratories», Индия) с различными концентрациями антибактериальных препаратов. Диапазон разведений антибиотиков составил 0,25—128 мкг/мл. При учете и интерпретации результатов руководствовались «Методическими указаниями по определению чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препаратам» [18], рекомендациями и критериями CLSI. Контроль качества определения антибиотикочувствительности проводили с использованием контрольных штаммов *E. coli* ATCC 25922 и *P. aeruginosa* ATCC 27853.

С помощью метода «двойных дисков» выполняли фенотипический скрининг продукции БЛРС для 65 штаммов *E. coli*, 35 штаммов *Proteus spp.*, 10 штаммов *K. pneumoniae* с различными профилями резистентности к антибиотикам. Метод «двойных дисков» представляет собой вариант классического диско-диффузионного метода определения чувствительности. Особенностью такого метода является то, что через 10 мин после инокуляции бактериальной взвеси на поверхность агара Мюллера—Хинтона накладывают диски с антибиотиками: в центр — диск, содержащий клавулановую кислоту (амоксициллин/клавуланат 20/10 мкг), по бокам от него на расстоянии 20 мм и 30 мм между центрами дисков — диски с цефтазидимом (30 мкг) и цефо-

таксимом (30 мкг). Параллельно исследовали контрольные штаммы: *E. coli* ATCC 25922 — отрицательный контроль (БЛРС–); *K. pneumoniae* ATCC 700603 — положительный (БЛРС+). Расширение зоны подавления роста между одним или несколькими дисками с цефалоспорином и диском, содержащим клавулановую кислоту, указывало на наличие БЛРС.

Для выявления генов БЛРС различных классов (TEM, OXA, SHV, CTX-M) провели ПЦР с электрофоретической детекцией продуктов амплификации. Определяли групповую принадлежность БЛРС классов TEM, SHV и CTX-M в мультиплексной ПЦР в реальном времени с последующей оценкой температур плавления зондов, позволяющей выявлять точечные мутации, придающие расширенный спектр β -лактамазной активности в соответствующих кодонах генов. Для ПЦР-тестирования отобрали 49 культур энтеробактерий с подтвержденным БЛРС-фенотипом (*E. coli* — 29 штаммов, *K. pneumoniae* — 5 штаммов, *Proteus spp.* — 15 штаммов).

Для количественной оценки интенсивности формирования микробных биопленок уропатогенами в исследование включили 150 штаммов (69 — *E. coli*, 56 — *P. aeruginosa*, 15 — *S. aureus*, 10 — *K. pneumoniae*). Среди 69 клинических изолятов *E. coli* 27 выделены у больных с острым пиелонефритом и 42 изолята — у пациентов с хроническим пиелонефритом, из 56 изолятов *P. aeruginosa* — 15 и 41 соответственно, среди 15 изолятов *S. aureus* — 8 и 7, из 10 изолятов *K. pneumoniae* — 4 и 6 соответственно. У 55 (36,7%) пациентов пиелонефрит протекал на фоне мочекаменной болезни и был вызван энтеробактериями (25 человек), синегнойной палочкой (28 человек) и золотистым стафилококком (2 человека). Для количественного учета интенсивности пленкообразования из суточных культур готовили суспензии с оптической плотностью 0,5 по Мак-Фарланду, вносили в пробирки эппендорф с бульоном. После инкубации культуру удаляли, добавляли по 1 мл 1% раствора генцианвиолета (ГЦВ). Удалив раствор ГЦВ из эппендорфов, для экстракции краски из биопленки добавили по 1 мл 96% этанола. Далее готовили контрольные образцы (спиртовые растворы ГЦВ с концентрацией 2, 10, 25 и 50 мг/л). Контрольные и опытные образцы вносили в лунки 96-луночного планшета; измерение концентраций ГЦВ проводили на иммуноферментном анализаторе АИФ-М/340, длина волны 570 нм.

Статистическую обработку результатов осуществляли с использованием пакета прикладных программ STATISTICA 6.0. Применяли методы описательной статистики. Для определения статистической значимости различий между группами использовали критерий значимости Стьюдента (t), вероятность значений разницы (P). Для оценки различий частоты встречаемости признаков применяли χ^2 — критерий Пирсона (для малых выборок — точный критерий Фишера) и соответствующий ему уровень значимости. Статистически значимыми считали результаты при $P < 0,05$.

Результаты и обсуждение

При проведении ретроспективного анализа этиологической структуры возбудителя пиелонефритов в Гомельской областной клинической больнице установлено, что в структуре уромикробиоты у больных пиелонефритом в 2000—2003 гг. и 2008—2010 гг. доминировали представители семейства *Enterobacteriaceae* (эшерихия, протей, энтеробактер, клебсиелла, цитробактер, морганелла), среди которых 1-е место по частоте встречаемости занимала *E. coli* (рис. 1).

Установлено, что в 2008—2010 гг. частота выделения штаммов *E. coli* ($P=0,0001$) и *P. aeruginosa* ($P=0,034$) увеличена в 1,5 раза по сравнению с таковой в 2000—2003 гг. Удельный вес штаммов *Enterobacter spp.* ($P < 0,0001$) и *Staphylococcus spp.* ($P=0,0001$) в 2008—2010 гг. снижен в сравнении с таковым в 2000—2003 гг., а штаммов *Proteus spp.*

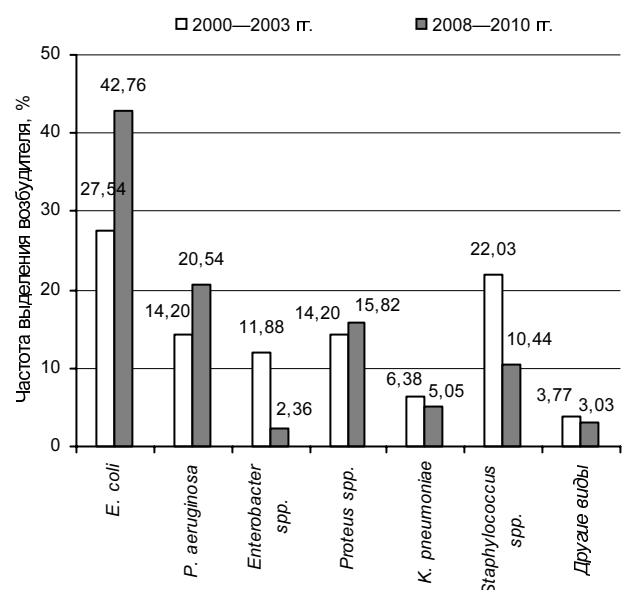


Рис. 1. Сравнительный анализ этиологической структуры возбудителей пиелонефритов

и *K. pneumoniae* на протяжении 10 лет изменялся незначительно ($P>0,05$).

При использовании метода серийных разведений в агаре на основе полученных данных провели анализ динамики антибиотикочувствительности возбудителей пиелонефритов, выделенных в 2005—2008 гг. и 2009—2010 гг. Сравнительные характеристики чувствительности клинических изолятов *E. coli*, *Proteus spp.* и *P. aeruginosa* к антибиотикам представлены на рис. 2—4.

При сравнении данных по чувствительности штаммов *E. coli* за 5 лет отмечено значительное увеличение частоты чувствительности к цефепиму на 28,3% ($P=0,0097$), сохранение чувствительности к имипенему (93,9—100%), амикацину (93,8%), цефепиму (81,3%), цiproфлоксацину (75,0%) ($P>0,05$). Защищенные пенициллины, цефалоспорины III поколения и гентамицин незначительно уступают по активности этим препаратам. Практически неактивным против штаммов *E. coli* был амоксициллин.

Выявлена тенденция к росту чувствительности *E. coli* к цефтазидиму, но в исследуемой выборке статистически значимые различия не установлены. Более высокий удельный вес устойчивых к цефтазидиму *E. coli* отмечен в 2005—2008 гг. по сравнению с 2009—2010 гг., что, возможно, связано с тем, что в 2005—2008 гг. цефтазидим крайне широко применяли в клинике для лечения грамотрицательных инфекций. К восстановлению чувствительности *E. coli* к цефтазидиму могло привести использование других антибактериальных препаратов с 2009 г. На протяжении 5 лет отмечено незначительное изменение чувствительности штаммов *E. coli* к амоксицилину/клавуланату, ампи-

циллину/сульбактаму, цефотаксиму, цiproфлоксацину, гентамицину ($P>0,05$).

С 2005—2008 гг. по 2009—2010 гг. отмечено снижение чувствительности *Proteus spp.* к цефалоспорином III—IV поколения (на 10,0—22,2%) (см. рис. 3). Однако статистически значимые различия выявлены только в активности цефепима (82,9% штаммов *Proteus spp.*, чувствительных к цефепиму в 2005—2008 гг., в сравнении с 60,7% штаммов в 2009—2010 гг., $P=0,049$). Также в 2009—2010 гг. отмечено сни-

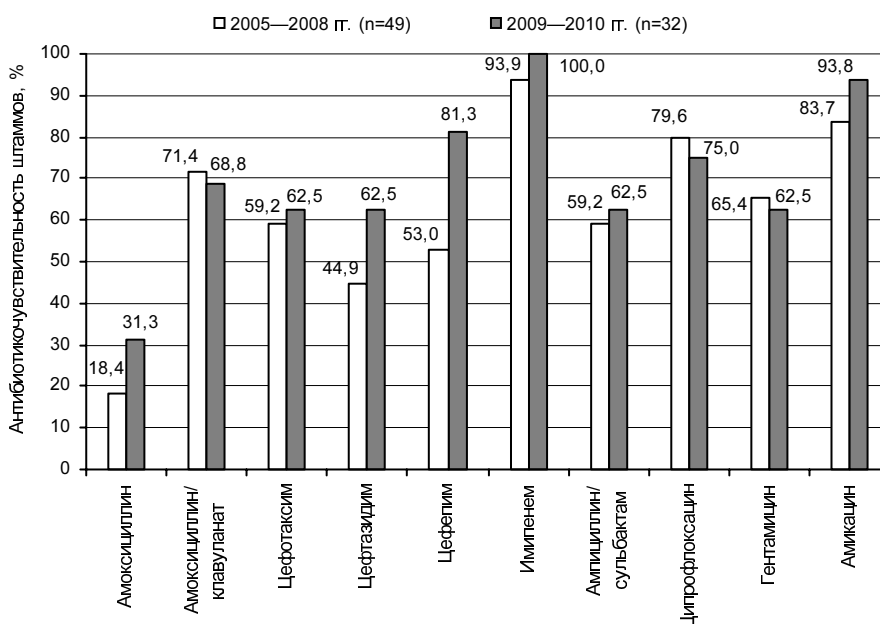


Рис. 2. Сравнительная характеристика антибиотикочувствительности штаммов *E. coli*

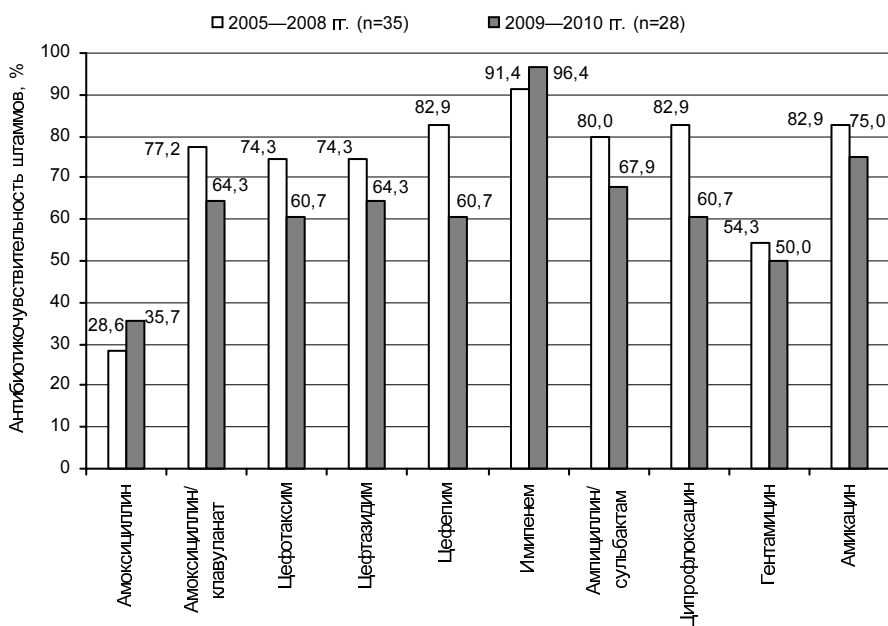


Рис. 3. Сравнительная характеристика антибиотикочувствительности штаммов *Proteus spp.*

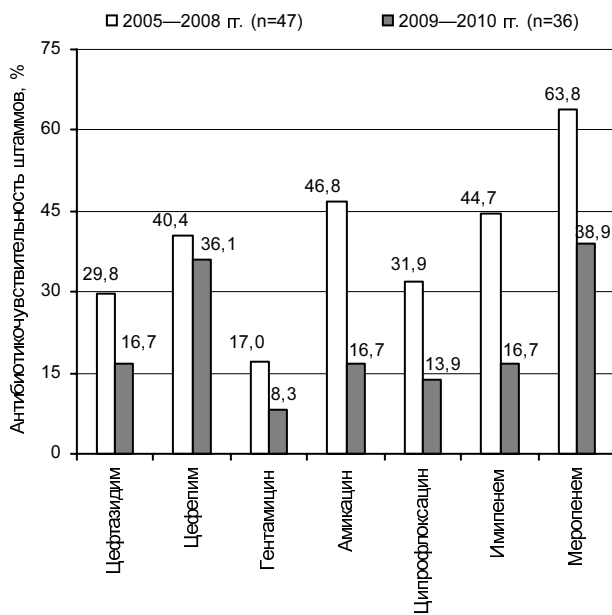


Рис. 4. Сравнительная характеристика антибиотикоустойчивости штаммов *P. aeruginosa*

жение чувствительности *Proteus spp.* к аминогликозидам (на 4,3—7,9%) и ингибиторозащитным бета-лактамам (на 12,1—12,9%) ($P>0,05$). Удельный вес ципрофлоксацинчувствительных штаммов *Proteus spp.* уменьшился с 82,9 до 60,7% ($P=0,049$). Показано, что штаммы *Proteus spp.* за 5-летний период сохранили чувствительность к имипенему.

На протяжении 2005—2010 гг. отмечалась невысокая активность антибактериальных препаратов в отношении *P. aeruginosa* (см. рис. 4). В основном тенденция к увеличению количества резистентных штаммов зарегистрирована к 2009—2010 гг. Активность карбапенемов в отношении *P. aeruginosa* традиционно считалась высокой. Однако наблюдается достоверное снижение доли чувствительных штаммов *P. aeruginosa* к имипенему с 44,7 в 2005—2008 гг. до 16,7% в 2009—2010 гг. ($P=0,007$), меропенему — с 63,8 до 38,9% ($P=0,024$). Разница в активности ципрофлоксацина также статистически значима (31,9% штаммов *P. aeruginosa*, чувствительных к ципрофлоксацину в 2005—2008 гг., в сравнении с 13,9% штаммов в 2009—2010 гг., $P=0,047$). Причины увеличения резистентности в обоих случаях связаны с широким применением этих препаратов в клинике. Отмечено снижение чувствительности *P. aeruginosa* к амикацину с 46,8 до 16,7% к 2009—2010 гг. ($P=0,004$). В то же время значимых различий в частоте встречаемости чувствительных штаммов *P. aeruginosa*, выделенных в 2005—2008 гг. и 2009—2010 гг.,

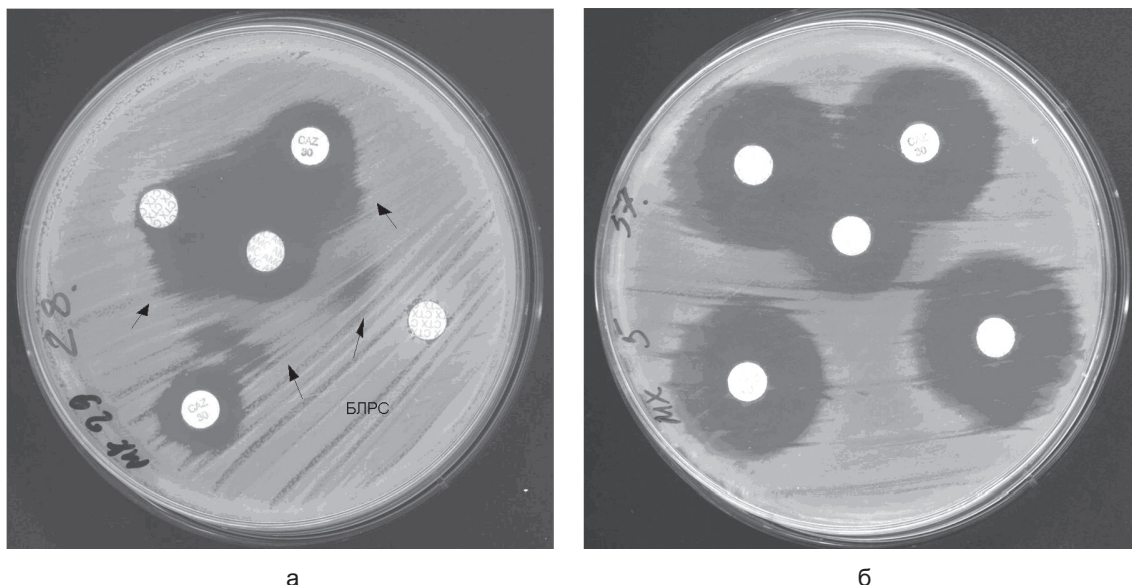
к цефтазидиму (29,8% против 16,7%), цефепиму (40,4% против 36,1%) и гентамицину (17,0% против 8,3%) не выявлено ($P>0,05$).

Методом «двойных дисков» продукция БЛРС выявлена у 29 из 65 ($44,6\pm 6,2\%$) штаммов *E. coli*. В предыдущих испытаниях, выполненных с помощью стандартного диско-диффузионного метода [19], устойчивость к цефотаксиму и цефтазидиму обнаруживалась только у 17 из 29 ($58,6\pm 9,1\%$) БЛРС-продуцирующих штаммов, устойчивость только к цефотаксиму — у 6 ($20,7\pm 7,5\%$), устойчивость только к цефтазидиму — у 4 ($13,8\pm 6,4\%$). Два штамма *E. coli* ($6,9\pm 4,7\%$) с подтвержденной продукцией БЛРС при предварительном исследовании диско-диффузионным методом отнесены к категории чувствительных к цефотаксиму и цефтазидиму.

Продукция БЛРС выявлена у 5 ($50,0\pm 15,8\%$) штаммов *K. pneumoniae*. Из них 2 штамма ранее были охарактеризованы как чувствительные к цефотаксиму и цефтазидиму при использовании стандартного диско-диффузионного метода [19]. Продукция БЛРС выявлена у 15 ($42,9\pm 8,4\%$) штаммов *Proteus spp.* (у 2 из них использование стандартного диско-диффузионного метода не позволило обнаружить устойчивость к цефтазидиму и цефотаксиму).

Для всех штаммов с подтвержденной продукцией БЛРС отмечено увеличение диаметров зон подавления роста при добавлении хлоридной кислоты (синергизм) в отношении обоих цефалоспоринов (рис. 5).

При проведении геноиндикации БЛРС ни у одного из 49 исследуемых штаммов не обнаружено энтеробактерий БЛРС класса ОХА. У 38 из 49 штаммов амплифицировался участок гена bla_{TEM} , однако нуклеотидные замены в 104 позиции, придающих БЛРС-активность, выявлены не были (WT, дикий тип). У всех исследованных штаммов *Proteus spp.* и *E. coli* (независимо от наличия или отсутствия фенотипически определяемой БЛРС-активности) гены bla_{SHV} не детектировались. Анализ кривых плавления зондов не выявил точечные мутации в анализируемых кодонах (179, 238-240) bla_{SHV} -генов исследуемых штаммов клебсиелл. Таким образом, обнаружены bla_{SHV} -гены у изолятов *K. pneumoniae*, относящиеся к генетической группе SHV-1 (плазмидно-кодируемые пенициллиназы SHV-1) и не обладающие расширенным спектром активности в отношении бета-лактамовых антибиотиков.



а

б

Рис. 5. Выявление продукции БЛРС методом «двойных дисков»: а — положительные результаты (БЛРС+); б — отрицательные результаты (БЛРС-).

Стрелками обозначены расширения границ зон подавления роста (синергизм в участке пересечения зон диффузии дисков с цефалоспорином и амоксициллином/клавуланатом).

У 14 штаммов *E. coli*, 8 штаммов *P. mirabilis* и 5 штаммов *K. pneumoniae* обнаружен продукт амплификации длиной около 97 п. н. с температурой плавления 82,8—83,0°C. Аналогичный ПЦР-продукт амплифицировался для позитивного контроля *E. coli* (СТХ-М-3, генетическая группа СТХ-М-1). У 2 штаммов *E. coli* обнаружен продукт амплификации длиной 518 п. н. с температурой плавления 91°C. Аналогичный ПЦР-продукт амплифицировался для позитивного контроля *E. coli* (СТХ-М-14, генетическая группа СТХ-М-9).

При проведении количественной оценки интенсивности формирования биопленок уропатогенами выявлено, что все клинические изоляты *E. coli*, *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa* и *S. aureus* обладали выраженной способностью к образованию биопленок. Для изолятов *E. coli* концентрации кристаллического фиолетового в отмывочных растворах составляли 3,35—17,11 мг/л, *K. pneumoniae* — 4,45—18,79 мг/л, *P. aeruginosa* — 3,36—56,0 мг/л, *S. aureus* — 4,21—7,74 мг/л.

Среди возбудителей острых и хронических пиелонефритов максимальной пленкообразующей способностью обладали штаммы *P. aeruginosa*, которая в 2—3 раза превосходила способность к формированию биопленок у штаммов энтеробактерий и стафилококков. У изолятов, выделенных у больных хроническими пиелонефритами, обнаружено значительное преобладание пленкообразующей активности по сравнению с микроорганизмами, выделенными у лиц с острыми пиелоне-

фритами. Различия статистически значимы для штаммов *E. coli* ($P < 0,0001$), *P. aeruginosa* ($P < 0,0001$), *K. pneumoniae* ($P = 0,0222$), *S. aureus* ($P = 0,0279$).

При проведении сравнительного анализа пленкообразующей способности микроорганизмов возбудителей пиелонефритов в зависимости от сопутствующей мочекаменной болезни установлено, что возбудители, выделенные у больных пиелонефритами с сопутствующей мочекаменной болезнью, в целом отличались большей способностью к пленкообразованию по сравнению с возбудителями инфекций, протекающих без уролитиаза. Различия статистически значимы для энтеробактерий ($P = 0,0011$), отсутствие статистически значимых различий для штаммов *P. aeruginosa* и *S. aureus*, возможно, связано с небольшим объемом выборки.

На основе данных пленкообразующей активности возбудителей пиелонефритов определены средние значения массы красителя для исследуемых микроорганизмов: *E. coli* — $6,50 \pm 0,34$ мкг, *K. pneumoniae* — $9,49 \pm 1,5$ мкг, *P. aeruginosa* — $18,25 \pm 1,15$ мкг. Выявлен ряд штаммов *E. coli*, *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae* с максимальной и минимальной биопленкообразующей способностью. У исследуемых штаммов проанализировали профили антибиотикорезистентности для определения взаимосвязи между способностью штаммов *E. coli*, *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae* к пленкообразованию и антибиотикорезистентностью (табл. 1, 2).

Таблица 1

Профили антибиотикорезистентности штаммов *E. coli*, *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae* с максимальной биопленкообразующей способностью

<i>E. coli</i>		<i>K. pneumoniae</i>		<i>P. aeruginosa</i>	
масса красителя, сорбированного биопленкой, мкг	профиль	масса красителя, сорбированного биопленкой, мкг	профиль	масса красителя, сорбированного биопленкой, мкг	профиль
17,11	ASCFGP	18,79	ACFG	56,0	ZFGPIR
16,16	ACZFGP	14,13	AKCG	38,83	ZFGMPI
13,21	AKCZGMP	13,65	ASZP	34,95	ZGPIR
11,38	ACZG			29,58	ZFGMPIR
				27,81	ZFGMPI

Примечание. Здесь и в табл. 2 буквами обозначены резистентные или умеренно устойчивые штаммы: А — амоксициллин, К — амоксициллин/клавуланат, S — ампициллин/сульбактам, С — цефотаксим, Z — цефтазидим, F — цефепим, G — гентамицин, М — амикацин, Р — ципрофлоксацин, I — имипенем, R — меропенем.

Таблица 2

Профили антибиотикорезистентности штаммов *E. coli*, *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae* с минимальной биопленкообразующей способностью

<i>E. coli</i>		<i>K. pneumoniae</i>		<i>P. aeruginosa</i>	
масса красителя, сорбированного биопленкой, мкг	профиль	масса красителя, сорбированного биопленкой, мкг	профиль	масса красителя, сорбированного биопленкой, мкг	профиль
3,35	A	4,45	AG	3,36	GMP
3,41	ACG	5,06	AC	3,32	ZFG
3,42	AG	5,20	A	5,40	GP
3,49	ACZ			7,19	ZGPI
3,53	AZ				
3,73	AKCGP				
3,81	—				
3,87	—				
4,07	P				
4,10	ACZ				

Штаммы *E. coli* и *P. aeruginosa* с максимальной биопленкообразующей способностью обладают сочетанной устойчивостью ко многим, чаще 6—7 антибиотикам. В отношении штаммов *K. pneumoniae* с максимальной пленкообразующей способностью антибактериальные препараты более активны — профили резистентности отмечены только к 4 антибиотикам. Клинические изоляты *E. coli* с минимальной биопленкообразующей способностью зачастую устойчивы к 1—3 антибиотикам, реже — к 4; в некоторых случаях такие штаммы *E. coli* не имели устойчивости к антибактериальным препаратам. Штаммы *K. pneumoniae* с минимальной биопленкообразующей способностью обладали устойчивостью к 1—2 антибиотикам, *P. aeruginosa* — к 2—4.

Выводы

1. В современных условиях спектр выделяемых возбудителей пиелонефритов кардинально не изменился, однако отмечено увеличение ча-

стоты выделения штаммов *E. coli*, *P. aeruginosa* и снижение количества штаммов *Enterobacter spp.* и *Staphylococcus spp.* Частота выделения штаммов *Proteus spp.* и *K. pneumoniae* на протяжении 10 лет изменилась незначительно.

2. Установлена широкая распространенность устойчивости энтеробактерий к бета-лактамам и не-бета-лактамам антибиотикам. На протяжении 2005—2010 гг. отмечена невысокая активность антибиотиков в отношении *P. aeruginosa* с тенденцией к увеличению количества резистентных штаммов к 2009—2010 гг.

3. У 44,6% штаммов *E. coli*, 50% штаммов *K. pneumoniae* и 42,9% штаммов *Proteus spp.* с использованием фенотипического метода выявлена продукция бета-лактамаз расширенного спектра. Причем 12,2% этих штаммов ранее были определены как чувствительные к цефотаксиму и цефтазидиму при использовании стандартного диско-диффузионного метода. В связи с этим для тестирования таких штаммов показано использование дополнительных

фенотипических тестов (метод «двойных дисков»), выявляющих устойчивость к антибиотикам, опосредованную продукцией бета-лактамаз расширенного спектра. Установлено, что у исследуемых штаммов *E. coli*, *P. mirabilis* и *K. pneumoniae* она опосредована наличием генов СТХ-М.

4. Среди возбудителей пиелонефритов максимальной пленкообразующей способностью обладали изоляты *P. aeruginosa*. Преобладание пленкообразующей активности обнаружено у штаммов *E. coli*, *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae*, *S. aureus*, выделенных у больных с хроническими пиелонефритами и у лиц с сопутствующей мочекаменной болезнью. Способность к формированию биопленки определяется как видом возбудителя, так и характером инфекционного процесса.

5. Установлено, что *P. aeruginosa*, *E. coli*, *K. pneumoniae* с максимальной пленкообразующей активностью более устойчивы к антибиотикам, чем штаммы с минимальной способностью формировать биопленки. Поскольку способность к формированию биопленки обеспечивает возбудителям пиелонефритов повышение устойчивости к антибиотикам, требуется пересмотр принципов терапии хронических инфекций мочевыделительной системы с внедрением методов, направленных на предотвращение формирования или разрушение уже сформированной биопленки.

ЛИТЕРАТУРА

1. Bishop M. C. // *EAU Updated Series*.— 2004.— № 2.— P. 143—150.
2. Foxman B. // *Am. J. Med.* — 2002.— Vol. 113 (Suppl. 1).— P. 5—13.
3. Перепанова Т. С. // *Фарматека*.— 2004.— № 3/4.— С. 16—22.
4. Чиж А. С. *Практическое руководство по нефрологии*.— Минск, 2001.
5. Ronald A. // *Dis. Mon.*— 2003.— Vol. 49.— P. 71—82.
6. Яровой С. К., Максимов В. А., Шимановский Н. Л., Кареев Е. Н. // *Урология*.— 2010.— № 2.— С. 21—27.
7. Романова Ю. М., Гинцбург А. Л. // *Журн. микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*.— 2011.— № 3.— С. 99—109.
8. Hatt J. K. // *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*— 2008.— Vol. 322.— P. 163—192.
9. Tenke P., Koves B., Nagy K., et al. // *World J. Urol.*— 2012.— Vol. 30.— P. 51—57.
10. Wilcox M. H. // *Int. J. Antimicrob. Agents*.— 2009.— Vol. 34.— P. 6—10.
11. Рафальский В. В., Страчунский Л. С., Кречикова О. И. и др. // *Урология*.— 2004.— № 2.— С. 13—17.
12. Lautenbach E. // *Clin. Infect. Dis.*— 2008.— Vol. 47.— P. 1159—1161.
13. Schito G. C., Naber K. G., Botto H., et al. // *Int. J. Antimicrob. Agents*.— 2009.— Vol. 34.— P. 407—413.
14. Страчунский Л. С. // *Клинич. микробиология и антимикробная химиотерапия*.— 2005.— Т. 7, № 1.— С. 92—96.
15. Chaudhary U., Aggarwal R. // *Ind. J. Med. Microbiol.*— 2004.— Vol. 22, № 2.— P. 75—80.
16. Cornaglia G., Garau J., Livermore D. M. // *Clin. Microbiol. Infect.*— 2008.— Vol. 14 (Suppl. 1).— P. 1—2.
17. Paterson D. L., Bonomo R. A. // *Clin. Microbiol. Rev.*— 2005.— Vol. 18, № 4.— P. 657—686.
18. Методические указания по определению чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препаратам (МУК 4.2 1890 — 2004 г.) // *Клинич. микробиология и антимикробная химиотерапия*.— 2004.— Т. 6, № 4.— С. 306—359.
19. Лагун Л. В., Тапальский Д. В. // *Проблемы здоровья и экологии*.— 2012.— № 4.— С. 62—69.

Поступила 30.09.13.

ETIOLOGIC STRUCTURE AND MOLECULAR-BIOLOGICAL QUALITY OF ETIOLOGIC AGENTS OF PYELONEPHRITIS

L. V. Lagun, S. V. Zhavoronok

Objective. Assessment of the etiologic structure and molecular-biological quality of causative agents of acute and chronic pyelonephritis in current conditions was the purpose of the study.

Materials and methods. Two hundred and seventy three clinical strains of microorganisms isolated from urine of patients with acute and chronic pyelonephritis in 2005—2010 were included into the research. A retrospective analysis of the pyelonephritis etiologic structure for 2000—2003 and for 2008—2010 had been performed. The microorganisms susceptibility to antibacterial agents had been determined by agar dilution. Extended-spectrum beta-lactamases (ESBL) production was carried out by the double disk diffusion method. ESBL of various groups of the etiologic agents causing pyelonephritises were indicated genetically by polymerase chain reaction (PCR). The biofilm-formation intensity was determined by crystal violet staining of the formed biofilms followed by the stain extraction and its concentration in the washing solution measuring.

Results. *E. coli* и *P. aeruginosa* strains prevailed in the pyelonephritis etiologic structure. Resistance of the etiologic agents causing pyelonephritises to antibiotics of various groups was assessed for 2005—2008 and for 2009—2010. The mechanisms of enterobacteria resistance to antibiotics were studied. ESBL producers of the CTX-M group were revealed to be widely spread. Among the etiological agents causing pyelonephritis the *P. aeruginosa* isolates were characterized by the maximum film-forming ability. The strains isolated from patients with chronic pyelonephritis and pyelonephritis proceeding with urolithiasis had surpassed the strains isolated from patients with acute pyelonephritis by the film-forming ability. A higher resistance to antibacterial agents was revealed to be characteristic for the *P. aeruginosa*, *E. coli*, *K. pneumoniae* strains with the maximum intensity of biofilm formation.

Conclusion. The data obtained in relation to the pyelonephritis etiologic structure, the causative agents ability to form biofilms, levels and mechanisms of the uropathogens resistance to antibacterial preparations may be used for developing an algorithm for microbiological diagnosis and a rational antibacterial therapy for pyelonephritis.

Key words: acute and chronic pyelonephritis, pyelonephritis causative agents, resistance to antibiotics, extended-spectrum beta-lactamases, biofilms.

Адрес для корреспонденции:

Лагун Людмила Васильевна.
Гомельский государственный медицинский университет.
246050, г. Гомель, ул. Ланге, 5; сп. тел. (8-0232) 74-41-21.