

**АНАЛИЗ ЭТИОЛОГИЧЕСКОЙ СТРУКТУРЫ
И МОЛЕКУЛЯРНО-БИОЛОГИЧЕСКИХ СВОЙСТВ ВОЗБУДИТЕЛЕЙ ОСТРЫХ
И ХРОНИЧЕСКИХ ПИЕЛОНЕФРИТОВ В ГОМЕЛЬСКОМ РЕГИОНЕ**

Лагун Л. В.

**Учреждение образования
«Гомельский государственный медицинский университет»
г. Гомель, Республика Беларусь**

Введение

Среди всех заболеваний человека по частоте пиелонефрит занимает второе место после острых респираторных заболеваний и является одной из наиболее распространенных форм поражения почек у детей и взрослых. Вид и характер инфекции имеют большое значение в этиопатогенезе пиелонефрита и назначении рациональной антибиотикотерапии [1, 2]. Поэтому изучение этиологической роли микроорганизмов в развитии и течении пиелонефритов по-прежнему остается актуальным. Одним из факторов патогенности микроорганизмов является образование биопленок. С их образования также начинается развитие любой инфекции, в том числе и инфекции мочевыделительной системы [3]. Для практической медицины особенно важно, что бактерии в биопленках обладают повышенной выживаемостью в присутствии факторов иммунной защиты макроорганизма и антибиотиков. Таким образом, существование биопленок при инфекциях требует совершенно новых подходов к их диагностике и лечению. В последнее время резистентность энтеробактерий к ряду антибиотиков, особенно β -лактамам, приобретает все большее распространение, что является серьезной проблемой практической медицины. Для проведения эффективной эмпирической антибактериальной терапии пиелонефрита необходима информация не только о распространенности антибиотикорезистентности, но и ее основных механизмах, одним из которых, клинически значимых, является продукция β -лактамаз расширенного спектра (БЛРС) [4].

Цель

Провести анализ этиологической структуры и молекулярно-биологических свойств возбудителей острых и хронических пиелонефритов.

Материал и методы исследования

В исследование включено 185 клинических изолятов (69 — *E. coli*, 56 — *P. aeruginosa*, 35 — *Proteus spp.*, 15 — *S. aureus*, 10 — *K. pneumoniae*), выделенных 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 изучена первичная медицинская документация 297 больных пиелонефритами, на основе данных которой проведен ретроспективный анализ этиологической структуры пиелонефритов.

Определение минимальных подавляющих концентраций антибиотиков для 32 штаммов *E. coli*, 36 штаммов *P. aeruginosa*, 28 штаммов *Proteus spp.* проводили методом серийных разведений в агаре. Диапазон разведений антибиотиков 0,25–128 мкг/мл. Контроль качества определения антибиотико-чувствительности проводился с использованием контрольных штаммов *E. coli* ATCC 25922 и *P. aeruginosa* ATCC 27853.

С использованием метода «двойных дисков» выполнен фенотипический скрининг продукции БЛРС для 65 штаммов *E. coli*, 35 штаммов *Proteus spp.*, 10 штаммов *K. pneumoniae* с различными профилями резистентности к антибактериальным препаратам. Параллельно с анализом испытуемых культур исследовали контрольные штаммы: *E. coli* ATCC 25922 — отрицательный контроль (БЛРС–); *K. pneumoniae* ATCC 700603 — положительный контроль (БЛРС+). Для выявления генов БЛРС различных классов (TEM, OXA, SHV, CTX-M) проведена полимеразная цепная реакция с электрофоретической детекцией продуктов амплификации. Определена групповая 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 бета-лактамазной активности в соответствующих кодонах генов. Для ПЦР-тестирования отобраны 49 культур с подтвержденным БЛРС-фенотипом (*E. coli* — 29 штаммов, *K. pneumoniae* — 5 штаммов, *Proteus spp.* — 15 штаммов).

Количественную оценку интенсивности формирования микробных биопленок уропатогенами проводили для 150 штаммов (69 — *E. coli*, 56 — *P. aeruginosa*, 15 — *S. aureus*, 10 — *K. pneumoniae*). Статистическая обработка результатов выполнена с использованием пакета прикладных программ «Statistica» 6.0. Для определения статистической значимости отличий между группами рассчитывали

критерий значимости Стьюдента (t), вероятность значений разницы (p). Статистически значимыми считали результаты при уровне $p < 0,05$.

Результаты исследования и их обсуждение

В структуре уромикрофлоры больных пиелонефритом доминировали представители семейства *Enterobacteriaceae* (эшерихия, протей, энтеробактер, клебсиелла, цитробактер, морганелла), среди которых первое место по частоте занимала *E. coli* — 42,8 %. Удельный вес штаммов *P. aeruginosa* составил 20,5 %, *Proteus spp.* — 15,8 %, *Staphylococcus spp.* — 10,4 %, *K. pneumoniae* — 5,1 %, *Enterobacter spp.* — 2,4 %, другие виды — 3,0 %.

Установлено, что наибольшей активностью в отношении штаммов *E. coli* обладали имипенем, амикацин, ципрофлоксацин, к которым были чувствительны 100 %, $93,8 \pm 4,3$ %, $75 \pm 7,6$ % исследуемых штаммов соответственно. Активность амоксициллина была самой низкой из всех антибактериальных средств, включенных в исследование ($31,3 \pm 8,2$ %). Из антибиотиков группы пенициллинов наиболее активны в отношении *E. coli* были ингибиторозащищенные пенициллины: к амоксициллин/клавуланату сохраняли чувствительность $68,89 \pm 8,2$ % изолятов. Из цефалоспоринов наибольшая активность была сохранена у цефепима — $81,3 \pm 6,9$ % чувствительных штаммов. В отношении *Proteus spp.* наибольшей активностью обладал имипенем — чувствительность штаммов составила $96,4 \pm 3,5$ %. Штаммы *Proteus spp.* в 64,3 % случаев нечувствительны к аминопенициллинам, в 35,7–39,3 % — к цефалоспорином (цефотаксиму, цефтазидиму и цефепиму). Отмечена невысокая активность антибиотиков в отношении *P. aeruginosa*. Удельный вес чувствительных к меропенему штаммов *P. aeruginosa* составил $38,9 \pm 8,1$ %, к имипенему — $16,7 \pm 6,2$ %, амикацину — $16,7 \pm 6,2$ %, ципрофлоксацину — $13,9 \pm 5,8$ %. Из цефалоспоринов наибольшая активность была сохранена у цефепима — $36,1 \pm 8$ % чувствительных штаммов. Штаммы *E. coli*, *Proteus spp.*, *P. aeruginosa*, выделенные от пациентов с хроническим пиелонефритом, имели тенденцию к снижению доли чувствительных к антибиотикам штаммов по сравнению с микроорганизмами, изолированными при остром пиелонефрите.

С использованием метода «двойных дисков» продукция БЛРС выявлена у 29 из 65 (44,6 %) штаммов *E. coli*. В предыдущих испытаниях, выполненных с помощью стандартного диско-диффузионного метода [5], устойчивость к цефотаксиму и цефтазидиму обнаруживалась только у 58,6 % БЛРС-продуцирующих штаммов, устойчивость только к цефотаксиму — у 20,7 % штаммов, устойчивость только к цефтазидиму — у 13,8 % штаммов. 2 штамма *E. coli* (6,9 %) с подтвержденной продукцией БЛРС при предварительном исследовании диско-диффузионным методом были отнесены к категории «чувствительные» к цефотаксиму и цефтазидиму. Продукция БЛРС была выявлена у 5 (50 %) штаммов *K. pneumoniae*. Из них 2 штамма ранее были охарактеризованы как «чувствительные» к цефотаксиму и цефтазидиму при использовании стандартного диско-диффузионного метода [5]. Продукция БЛРС была выявлена у 15 (42,9 %) штаммов *Proteus spp.* (у 2 из них стандартный диско-диффузионный метод не позволил обнаружить устойчивости к цефтазидиму и цефотаксиму). Для всех штаммов с подтвержденной продукцией БЛРС отмечено увеличение диаметров зон подавления роста при добавлении клавулановой кислоты (синергизм) в отношении обоих цефалоспоринов. Таким образом, диско-диффузионный метод не всегда позволяет выявить истинную резистентность БЛРС-продуцирующих штаммов, поскольку они могут проявлять *in vitro* устойчивость к современным цефалоспорином ниже установленных пограничных значений. Для тестирования таких штаммов показано использование дополнительных фенотипических тестов, выявляющих устойчивость к антибиотикам, опосредованную продукцией БЛРС. Анализ фенотипов антибиотикорезистентности показал наличие множественной устойчивости БЛРС-положительных штаммов (в том числе к не- β -лактамам препаратам).

При проведении геноиндикации БЛРС ни у одного из 49 исследуемых штаммов энтеробактерий БЛРС класса ОХА не обнаружены. У 38 из 49 штаммов амплифицировался участок гена *bla*_{TEM}, однако нуклеотидных замен в 104 позиции, придающих БЛРС-активность, выявлено не было (WT, дикий тип). У всех исследованных штаммов *Proteus spp.* и *E. coli* гены *bla*_{SHV} не детектировались. Обнаружены *bla*_{SHV}-гены у изолятов *K. pneumoniae*, относящиеся к генетической группе SHV-1 (плазмидно-кодируемые пенициллиназы SHV-1), не обладающие расширенным спектром активности в отношении бета-лактамов антибиотиков. 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 °С. Аналогичный ПЦР-продукт амплифицировался для позитивного контроля *E. coli* (генетическая группа СТХ-М-1). У 2 штаммов *E. coli* обнаружен продукт амплификации длиной 518 п.н. с температурой плавления 91 °С. Аналогичный ПЦР-продукт амплифицировался для позитивного контроля *E. coli* (генетическая группа СТХ-М-9). Таким образом, БЛРС-активность исследуемых штаммов *E. coli*, *P. mirabilis* и *K. pneumoniae* опосредована наличием генов СТХ-М.

Проводя количественную оценку интенсивности формирования биопленок уропатогенами выявили, что все клинические изоляты *E. coli*, *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa* и *S. aureus* обладали выра-

женной способностью к образованию биопленок. Для изолятов *E. coli* концентрации кристаллического фиолетового в отмывочных растворах находились в диапазоне 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*, пленкообразующая способность которых в 2–3 раза превосходила способность к формированию биопленок у штаммов энтеробактерий и стафилококков. Для изолятов, выделенных от больных хроническими пиелонефритами, обнаружено значительное преобладание пленкообразующей активности по сравнению с микроорганизмами, выделенными при острых пиелонефритах. Различия статистически значимы для штаммов *E. coli* ($p < 0,0001$), *P. aeruginosa* ($p < 0,0001$), *K. pneumoniae* ($p = 0,0222$), *S. aureus* ($p = 0,0279$). Возбудители, выделенные от 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.

Заключение

Таким образом, полученные в ходе исследования данные об этиологической структуре пиелонефритов, способности возбудителей формировать биопленки, уровнях и механизмах устойчивости уропатогенов к антибактериальным лекарственным средствам могут использоваться для разработки алгоритма микробиологической диагностики и рациональной антибактериальной терапии пиелонефритов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Яровой, С. К. Эмпирическая терапия пиелонефрита / С. К. Яровой, Н. Л. Шимановский, Е. Н. Карева // Урология. — 2010. — № 2. — С. 21–27.
2. Foxman, B. Epidemiology of urinary tract infections: incidence, morbidity, and economic cost / B. Foxman // American Journal of Medicine. — 2002. — Vol. 113, Suppl. 1. — P. 5–13.
3. Update on biofilm infections in the urinary tract / P. Tenke [et al.] // World Journal of Urology. — 2012. — Vol. 30. — P. 51–57.
4. Страчунский, Л. С. β -Лактамазы расширенного спектра — быстро растущая и плохо осознаваемая угроза / Л. С. Страчунский // Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. — 2005. — Т. 7, № 1. — С. 92–96.
5. Лагун, Л. В. Алгоритм рациональной антибактериальной терапии пиелонефритов и его микробиологическое обоснование / Л. В. Лагун, Д. В. Тапальский // Проблемы здоровья и экологии. — 2012. — № 4. — С. 62–69.

УДК 612.17:612.017.2

РОЛЬ ИНДУЦИБЕЛЬНОЙ NO-СИНТАЗЫ В РЕГУЛЯЦИИ ТОНУСА КОРОНАРНЫХ СОСУДОВ ПРИ АДАПТАЦИИ К СТРЕССУ

Лазуко С. С.

Учреждение образования

«Витебский государственный медицинский университет»

г. Витебск, Республика Беларусь

Введение

Современные исследования показали, что в сердце экспрессируются все три изоформы NO-синтаз (NOS) — эндотелиальная (eNOS), нейрональная (nNOS) и индуцибельная (iNOS) [2]. С конститутивными изоформами синтаз оксида азота (eNOS, nNOS) связывают такие его протективные свойства, как вазодилатация, угнетение процессов агрегации, открытие K_{ATP} -каналов, регуляция коронарной циркуляции и сердечных сокращений [3]. В то же время, нет единого мнения о влиянии высоких уровней оксида азота, продуцируемых iNOS, на функцию сердечно-сосудистой системы. С одной стороны, показано, что в патологических условиях (в частности, при инфаркте миокарда, гипертензии, стенокардии, кардиомиопатиях, сердечной недостаточности и других заболеваниях) высокая активность и экспрессия iNOS сопровождается выраженным ростом уровня оксида азота в миокарде и развитием кардиодепрессивного эффекта [4]. С другой стороны, описан кардиопротективный эффект оксида азота, наблюдаемый при активации iNOS [1]. Роль монооксида азота, продуцируемого iNOS, при адаптации к стрессу изучена мало.

Цель

Изучить вклад индуцибельной NO-синтазы в механизмы регуляции тонуса коронарных сосудов и сократительной функции миокарда при адаптации к стрессу.

Материал и методы исследования

Тонус коронарных сосудов и сократительную функцию миокарда изучали на препаратах изолированного по Лангендорфу сердцах крыс-самок, в полость левого желудочка которых вводили ла-