

УЧРЕЖДЕНИЕ ОБРАЗОВАНИЯ
«БЕЛОРУССКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ»

УДК 616.61-002.3-02:[577.21:576.851](043.3)

ЛАГУН
Людмила Васильевна

**ЭТИОЛОГИЧЕСКАЯ СТРУКТУРА
И МОЛЕКУЛЯРНО-БИОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ВОЗБУДИТЕЛЕЙ
ПИЕЛОНЕФРИТОВ**

Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

по специальности 03.02.03 – микробиология

Минск 2014

Работа выполнена в учреждении образования «Белорусский государственный медицинский университет», государственном учреждении «Республиканский научно-практический центр эпидемиологии и микробиологии»

Научные руководители: **Титов Леонид Петрович,**
доктор медицинских наук, профессор, член-корреспондент НАН Беларуси, заведующий лабораторией клинической и экспериментальной микробиологии государственного учреждения «Республиканский научно-практический центр эпидемиологии и микробиологии»

Жаворонок Сергей Владимирович,
доктор медицинских наук, профессор, первый проректор учреждения образования «Белорусский государственный медицинский университет»

Официальные оппоненты: **Римжа Михаил Иванович,**
доктор медицинских наук, профессор, профессор кафедры общей гигиены учреждения образования «Белорусский государственный медицинский университет»

Коломиец Наталья Дмитриевна,
доктор медицинских наук, профессор, заведующий кафедрой эпидемиологии и микробиологии государственного учреждения образования «Белорусская медицинская академия последипломного образования»

Оппонирующая организация: учреждение образования «Витебский государственный ордена Дружбы народов медицинский университет»

Защита состоится 19 ноября 2014 года в 14⁰⁰ на заседании совета по защите диссертаций Д 03.18.04 при учреждении образования «Белорусский государственный медицинский университет» по адресу: 220116, г. Минск, пр-т Дзержинского, 83, e-mail: rector@bsmu.by; телефон ученого секретаря (017) 272-55-98.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке учреждения образования «Белорусский государственный медицинский университет».

Автореферат разослан «___» октября 2014 года.

Ученый секретарь совета
по защите диссертаций,
кандидат медицинских наук, доцент



А.М. Дронина

ВВЕДЕНИЕ

Среди всех заболеваний человека по частоте пиелонефрит занимает второе место после острых респираторных заболеваний и является одной из наиболее распространенных форм поражения почек (Перепанова Т.С., 2004; Шилов Е.М., 2007; Stamm W.E., 2008). Пиелонефрит является широко распространенным заболеванием среди взрослого и детского населения, характеризуется большой длительностью течения, значительной потерей трудоспособности и возможным неблагоприятным исходом (Юшко У.И., 2008; Bonny A., 2005; Olson R.P., 2009). Тяжесть острого пиелонефрита характеризует высокая частота осложнений и послеоперационная летальность (Czaja С.А., 2007; Lim S.K., 2012). У беременных женщин пиелонефрит может обуславливать преждевременные роды (Нечипоренко Н.А, 2008; Пересада О.А., 2012).

Наиболее частыми возбудителями пиелонефритов являются энтеробактерии, главным образом – *Escherichia coli*, на долю которой приходится до 85% всех заболеваний, а также *Proteus spp.* и *Klebsiella pneumoniae*. Достаточно большой удельный вес в структуре уропатогенов занимает *Pseudomonas aeruginosa* и *Staphylococcus aureus*. Вид и характер инфекции имеют большое значение в этиопатогенезе пиелонефрита и назначении рациональной антибиотикотерапии (Саркулова М.Н., 2006; Ronald A., 2003; Schito G.C., 2009). Поэтому изучение этиологической роли микроорганизмов в развитии и течении острых и хронических пиелонефритов по-прежнему остается актуальным.

Одним из факторов патогенности микроорганизмов является образование биопленок, с образования которых начинается развитие любой инфекции, в том числе и инфекции мочевыделительной системы (Hatt J.K., 2008; Marcus R.J., 2008; Tenke P., 2012). Для практической медицины особенно важно, что бактерии в биопленках обладают повышенной выживаемостью в присутствии факторов иммунной защиты макроорганизма и антибиотиков (Романова Ю.М., 2011; Чеботарь И.В., 2012; Donlan R.M., 2002; Cornaglia G., 2008). 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 здравоохранения. Постоянный контроль за изменением уровней чувствительности патогенов к антибактериальным лекарственным средствам является частью стратегии сдерживания распространения антибиотикорезистентности возбудителей инфекций в условиях лечебно-профилактического учреждения (Титов Л.П., 2003; Kaye K.S., 2004; Wilcox M.H., 2009). Продукция β -лактамаз расширенного спектра (БЛРС) –

один из наиболее распространенных и клинически значимых механизмов резистентности энтеробактерий к современным β -лактамным антибиотикам. Однако эффективность выявления устойчивости, связанной с продукцией БЛРС, с помощью традиционных методов оценки чувствительности остается крайне низкой. Распространение β -лактамаз часто носит эпидемический характер, при этом доминируют определенные штаммы или ферменты в масштабах как отдельных центров, так и обширных географических зон (Страчунский Л.С., 2005; Устьянцева И.М., 2009; Paterson D.L., 2005; Ghafourian S., 2012).

Для проведения эффективной эмпирической антибактериальной терапии инфекций мочевыводящих путей, в частности – пиелонефрита, необходима информация не только о распространенности антибиотикорезистентности, но и ее основных механизмах.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Связь работы с крупными научными программами (проектами) и темами

Отдельные этапы диссертационной работы являлись научным исследованием по теме «Значение β -лактамаз расширенного спектра в формировании устойчивости возбудителей пиелонефритов к антибактериальным препаратам» (01.04.2008–31.03.2010 гг., № госрегистрации 20082146 от 20.08.2008 г.), выполненным по договору с БРФФИ Б08М-128.

Цель и задачи исследования

Цель исследования: оценить этиологическую структуру и молекулярно-биологические свойства возбудителей пиелонефритов и разработать алгоритм микробиологической диагностики и тактику рациональной антибактериальной терапии.

Задачи исследования:

1. Определить этиологическую структуру пиелонефритов и изучить резистентность возбудителей пиелонефритов к антибактериальным препаратам различных групп в современных условиях.
2. Выявить молекулярно-генетические механизмы формирования устойчивости штаммов *Escherichia coli*, *Proteus spp.*, *Klebsiella pneumoniae* к β -лактамным антибиотикам.
3. Изучить частоту встречаемости генов β -лактамаз расширенного спектра различных классов у клинических изолятов энтеробактерий и их связь с проявлением фенотипической резистентности к антибиотикам.

4. Изучить интенсивность формирования микробных биопленок штаммами *Pseudomonas aeruginosa*, *E. coli*, *K. pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, выделенными при острых и хронических пиелонефритах.

5. Разработать алгоритм микробиологической диагностики и рациональной антибактериальной терапии пиелонефритов.

Объект исследования: клинические изоляты *E. coli*, *K. pneumoniae*, *Proteus spp.*, *P. aeruginosa*, *S. aureus*, выделенные от пациентов с пиелонефритами.

Предмет исследования: этиологическая структура возбудителей пиелонефритов, фенотипы резистентности к антибиотикам, гены БЛРС различных классов (TEM, OXA, SHV, CTX-M), биопленкообразующая активность клинических изолятов.

Положения, выносимые на защиту:

1. В этиологической структуре пиелонефритов имеет место увеличение доли штаммов *E. coli* и *P. aeruginosa*. У возбудителей пиелонефритов формируется приобретенная резистентность к антибактериальным препаратам, что вызывает необходимость проведения микробиологического мониторинга с целью коррекции антибактериальной терапии.

2. Впервые получены данные о распространенности продуцентов бета-лактамаз расширенного спектра у возбудителей пиелонефритов и оценены генетические механизмы антибиотикорезистентности. Установлено, что БЛРС-активность штаммов *E. coli*, *P. mirabilis* и *K. pneumoniae* обусловлена наличием blaCTX-M-генов, относящихся к генетическим кластерам CTX-M-1 и CTX-M-9. Показано, что обнаружение генов SHV и TEM не является однозначным свидетельством БЛРС-активности и требует анализа наличия точечных мутаций в позициях, увеличивающих спектр активности в отношении цефалоспоринов III–IV поколений.

3. Способность к формированию биопленки определяется как видом возбудителя, так и характером инфекционного процесса. Более интенсивное образование биопленок клиническими изолятами *E. coli*, *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae*, *S. aureus* отмечается при хронических пиелонефритах и пиелонефритах, протекающих на фоне мочекаменной болезни. Штаммы с максимальной пленкообразующей активностью более устойчивы к антимикробным препаратам, чем штаммы с минимальной способностью формировать биопленки.

4. Алгоритм микробиологической диагностики и рациональной антибактериальной терапии пиелонефритов разработан на основе данных об этиологической структуре пиелонефритов, уровнях устойчивости возбудителей к антибактериальным препаратам различных групп, вариантах ассоциированной устойчивости, способности штаммов к формированию биопленки, данных

о распространенности продуцентов бета-лактамаз расширенного спектра среди возбудителей.

Личный вклад соискателя

Под руководством научных руководителей определены тема диссертации, цель и задачи исследования, намечены характеристики и объемы выборок, методы исследования. Соискателем лично выполнены основные этапы лабораторных исследований, проведен анализ литературных источников, сбор и обработка материалов историй болезни, выделение и идентификация клинических изолятов, систематизация и составление базы данных. Экспериментальные исследования выполнялись диссертантом на базах УЗ «Гомельская областная клиническая больница», Центральной научно-исследовательской лаборатории УО «Гомельский государственный медицинский университет», УО «Белорусский государственный медицинский университет», ГУ «Республиканский научно-практический центр эпидемиологии и микробиологии», Научно-исследовательский институт антимикробной химиотерапии ГУОБ ВПО «Смоленская государственная медицинская академия» (г. Смоленск, РФ). Автором проведен анализ научных данных и обобщение полученных результатов, осуществлена их статистическая обработка. Самостоятельно написаны все разделы диссертации, совместно с научными руководителями сформулированы выводы и практические рекомендации. Основные научные результаты, представленные в диссертации, изложены в публикациях. Этиологическая структура пиелонефритов и результаты определения резистентности возбудителей пиелонефритов к антибактериальным лекарственным средствам представлены в публикациях, написанных без соавторов [11, 13–16, 21–24, 26], и в соавторстве [4, 7–10, 12, 18] – вклад диссертанта 90%. Выявление механизмов формирования устойчивости штаммов *Escherichia coli*, *Proteus spp.*, *Klebsiella pneumoniae* к β -лактамным антибиотикам отражено в статьях [1, 2, 4, 7, 17–19] – вклад автора 80%. Определение интенсивности формирования микробных биопленок штаммами бактерий, выделенными при острых и хронических пиелонефритах, изложено в публикациях [3, 5–7, 20, 25] – вклад диссертанта 85%. На основании проведенного исследования разработана инструкция по применению, утвержденная Министерством здравоохранения Республики Беларусь [27].

Апробация результатов диссертации

Результаты научных исследований были представлены на: II Белорусско-Американской научно-практической конференции врачей «Христианство и медицина» и 14-й научной сессии УО «Гомельский государственный медицинский университет» (Гомель, 2004 г.); Республиканской научно-практической конференции «Актуальные проблемы медицины» и 16-й научной сессии УО «Гомельский государственный медицинский университет» (Гомель,

2007 г.); Республиканской научно-практической конференции «Актуальные проблемы медицины» и 19-й итоговой научной сессии УО «Гомельский государственный медицинский университет» (Гомель, 2010 г.); XIV Международном конгрессе МАКМАХ/ESCMID по антимикробной терапии (Москва, 2012 г.); XV Международном конгрессе МАКМАХ/ESCMID по антимикробной терапии (Москва, 2013 г.); научно-практической конференции, посвященной 90-летию со дня основания кафедры микробиологии УО «Белорусский государственный медицинский университет» и 95-летию со дня рождения профессора А.П. Красильникова (Минск, 2013 г.); Республиканской научно-практической конференции с международным участием «Современные проблемы инфекционной патологии человека» (Минск, 2013 г.).

Опубликованность результатов диссертации

По теме диссертационной работы лично и в соавторстве опубликовано 26 печатных работ, в том числе 7 статей (5,1 авторских листа) – в рецензируемых научных журналах, 13 статей в рецензируемых сборниках научных работ (3,3 авторских листа) и 6 тезисов (0,5 авторских листа). Утверждена 1 инструкция по применению Министерством здравоохранения Республики Беларусь (0,4 авторских листа). Общий объем публикаций по теме работы – 9,3 авторских листа.

Структура и объем диссертации

Диссертация состоит из титульного листа, оглавления, перечня условных обозначений, введения, общей характеристики работы, аналитического обзора литературы, описания материалов и методов исследования, 4 глав результатов собственных исследований, заключения, библиографического списка и приложений. Работа изложена на 138 страницах машинописного текста, иллюстрирована 31 таблицей и 12 рисунками. Библиографический список содержит 216 использованных источников (17 страниц), включая 104 русскоязычных и 112 работ зарубежных авторов, и 27 публикаций соискателя. В приложениях (14 страниц) представлены инструкция по применению, акты о внедрении результатов исследования.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материал и методы исследования

На основании изучения первичной медицинской документации 345 пациентов с острыми и хроническими пиелонефритами в 2000–2003 гг. и 297 – в 2008–2010 гг., находившихся на стационарном лечении в урологическом и детском нефрологическом отделениях Гомельской областной клинической больницы, проведен ретроспективный анализ этиологической структуры пиелонефритов.

В исследование включено 273 клинических изолятов (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. Клинические изоляты были обнаружены в этиологически значимых количествах 10^5 и более колониеобразующих единиц в 1 мл исследуемого материала.

В работе использованы микробиологические (определение устойчивости к антибактериальным препаратам диско-диффузионным методом и методом серийных разведений в агаре, фенотипический метод выявления β -лактамаз расширенного спектра – метод «двойных дисков»), молекулярно-генетические методы (полимеразная цепная реакция для выявления генов БЛРС классов TEM, OXA, SHV, CTX-M с электрофоретической детекцией продуктов амплификации, мультиплексная ПЦР в реальном времени для определения групповой принадлежности БЛРС классов TEM, SHV и CTX-M), метод определения интенсивности пленкообразования путем окрашивания сформированных биопленок кристаллическим фиолетовым с экстракцией красителя и измерением его концентрации в отмывочном растворе.

Для контроля качества определения антибиотикочувствительности использовали контрольный штамм *E. coli* ATCC 25922. При выполнении исследования, учете и интерпретации результатов руководствовались рекомендациями и критериями Института клинических и лабораторных стандартов – CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute, США).

При проведении метода «двойных дисков» параллельно с анализом испытуемых культур исследовали контрольные штаммы: *E. coli* ATCC 25922 – отрицательный контроль (БЛРС–); *K. pneumoniae* ATCC 700603 – положительный контроль (БЛРС+). Для геноиндикация БЛРС различных классов (TEM, OXA, SHV, CTX-M) использовали праймеры фирмы «Литех» (г. Москва, Россия). Амплификацию проводили на термоциклере Rotor Gene 3000 (Corbett Research, Австралия).

Статистическая обработка полученных результатов выполнена с использованием статистического модуля программы Microsoft Office Excel 2007, а также пакета статистического анализа данных StatisticaPlus 2005, пакета программ STATISTICA for Windows 6.0 («Stat-Soft», США).

Результаты собственных исследований

Этиологическая структура пиелонефритов и антибиотикорезистентность возбудителей

В этиологической структуре пиелонефритов в 2000–2003 и 2008–2010 гг. доминировали представители семейства *Enterobacteriaceae* (*E. coli*, *Proteus spp.*,

K. pneumoniae, *Enterobacter spp.*, *Citrobacter spp.*, *Morganella morganii*), среди которых первое место по частоте занимала *E. coli* (рисунок 1).

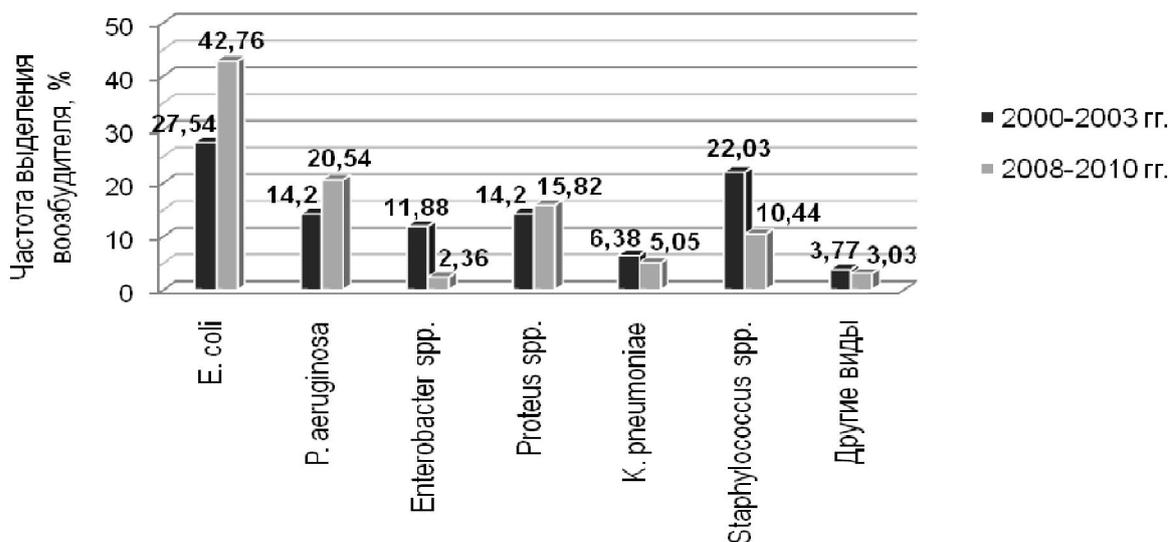


Рисунок 1 – Этиологическая структура пиелонефритов

Частота выделения штаммов *E. coli* и *P. aeruginosa* в 2008–2010 гг. увеличилась в 1,5 раза по сравнению с 2000–2003 гг., а удельный вес штаммов *Enterobacter spp.* и *Staphylococcus spp.*, наоборот, снизился, что подтверждается статистически значимыми различиями для *E. coli* ($\chi^2 = 16,35$; $p = 0,0001$), *P. aeruginosa* ($\chi^2 = 4,51$; $p = 0,034$), *Staphylococcus spp.* ($\chi^2 = 15,44$; $p = 0,0001$), *Enterobacter spp.* ($\chi^2 = 20,94$; $p < 0,0001$). Удельный вес штаммов *Proteus spp.* и *K. pneumoniae* на протяжении 10 лет не претерпел выраженных изменений ($p > 0,05$).

С помощью диско-диффузионного метода определена чувствительность к четырнадцати антибиотикам (ампициллину, карбенициллину, амоксициллину/клавуланату, имипенему, цефазолину, цефуроксиму, цефотаксиму, цефтазидиму, цефепиму, ципрофлоксацину, офлоксацину, гентамицину, амикацину, хлорамфениколу) 70 штаммов *E. coli*, 35 штаммов *Proteus spp.* и 10 штаммов *K. pneumoniae*. Установлено, что наибольшей активностью в отношении штаммов *E. coli* обладали имипенем, амикацин, ципрофлоксацин, офлоксацин, к которым были чувствительны $98,6 \pm 1,4\%$, $84,3 \pm 4,3\%$, $81,4 \pm 4,6\%$, $75,7 \pm 5,1\%$ исследуемых штаммов соответственно. Активность ампициллина, карбенициллина, цефазолина и хлорамфеникола была самой низкой из всех антибактериальных лекарственных средств, включенных в исследование. Из антибиотиков группы пенициллинов наиболее активны в отношении *E. coli* были ингибиторозащищенные пенициллины: к амоксиклаву были резистентны $12,9 \pm 4,0\%$ изолятов. Из цефалоспоринов

наибольшая активность была сохранена у цефотаксима – 62,9% чувствительных штаммов, и цефепима – 61,4%.

В отношении штаммов *Proteus spp.* наибольшей активностью обладали имипенем – чувствительность штаммов составила 100%, офлоксацин – 88,5±5,4%, ципрофлоксацин – 85,7±5,9%, амикацин – 88,6±5,4%, амоксициллин/клавуланат – 74,3±7,4%, цефепим – 85,7±5,9%, цефтазидим – 74,3±7,4% и цефотаксим – 71,4±7,6%. Наименьшей активностью обладали препараты группы пенициллинов и цефазолин. Штаммы *K. pneumoniae* были чувствительны в 100% случаев к офлоксацину, в 90,0±9,5% – к ципрофлоксацину, имипенему, амикацину, 80,0±12,6% – к цефепиму; наименьшей активностью обладали препараты группы пенициллинов – 90,0±9,5% резистентных штаммов.

Анализируя данные, полученные методом серийных разведений в агаре, при сравнении доли чувствительных к антибиотикам штаммов *E. coli* за 5-летний период отмечено увеличение ее к цефепиму на 28,3% ($p=0,0097$); сохраняется чувствительность к имипенему (93,9–100%), амикацину (93,8%), ципрофлоксацину (75,0%), $p>0,05$ (таблица 1). Защищенные пенициллины, цефалоспорины III поколения, гентамицин незначительно уступают по активности этим препаратам. Практически неактивным против штаммов *E. coli* был амоксициллин.

Таблица 1 – Динамика уровней антибиотикочувствительности штаммов *E. coli* и *Proteus spp.* в 2005–2008 гг. и 2009–2010 гг.

Антибиотик	<i>E. coli</i>		<i>Proteus spp.</i>	
	2005–2008 гг. (n=49), %	2009–2010 гг. (n=32), %	2005–2008 гг. (n=35), %	2009–2010 гг. (n=28), %
Амоксициллин	18,4±5,5	31,3±8,2	28,6±7,6	35,7±9,1
Амоксиклав	71,4±6,4	68,8±8,2	77,2±7,1	64,3±9,1
Цефотаксим	59,2±7,0	62,5±8,5	74,3±7,4	60,7±9,2
Цефтазидим	44,9±7,1	62,5±8,5	74,3±7,4	64,3±9,1
Цефепим	53,0±7,1	81,3±6,9	82,9±6,4	60,7±9,2
Имипенем	93,9±3,4	100,0	91,4±4,7	96,4±3,5
Ампициллин/сульбактам	59,2±7,0	62,5±8,5	80,0±6,8	67,9±8,8
Ципрофлоксацин	79,6±5,7	75,0±7,6	82,9±6,4	60,7±9,2
Гентамицин	65,4±6,8	62,5±8,5	54,3±8,4	50,0±9,4
Амикацин	83,7±5,3	93,8±4,3	82,9±6,4	75,0±8,2

Штаммы *Proteus spp.* в 64–71% случаев нечувствительны к аминопеницилинам, в 25–39% – к цефотаксиму и цефтазидиму. За период с 2005–2008 гг. по 2009–2010 гг. отмечается снижение чувствительности *Proteus spp.* к цефалоспорином III–IV поколения (на 10,0–22,2%). Установлено снижение с 82,9±6,4% до 60,7±9,2% доли чувствительных штаммов *Proteus spp.*

к цефепиму ($p=0,049$), к ципрофлоксацину – с $82,9\pm 6,4\%$ до $60,7\pm 9,2\%$ ($p=0,049$). Штаммы *Proteus spp.* за период 2005–2010 гг. сохраняют чувствительность к имипенему ($96,4\pm 3,5\%$).

Что касается *P. aeruginosa*, то наблюдается статистически значимое снижение числа чувствительных штаммов в отношении имипенема с $44,7\%$ в 2005–2008 гг. до $16,7\%$ в 2009–2010 гг. ($p=0,007$), меропенема – с $63,8\%$ до $38,9\%$ ($p=0,024$), амикацина – с $46,8\%$ до $16,7\%$ ($p=0,004$), ципрофлоксацина – с $31,9\%$ до $13,9\%$ ($p=0,047$), рисунок 2.

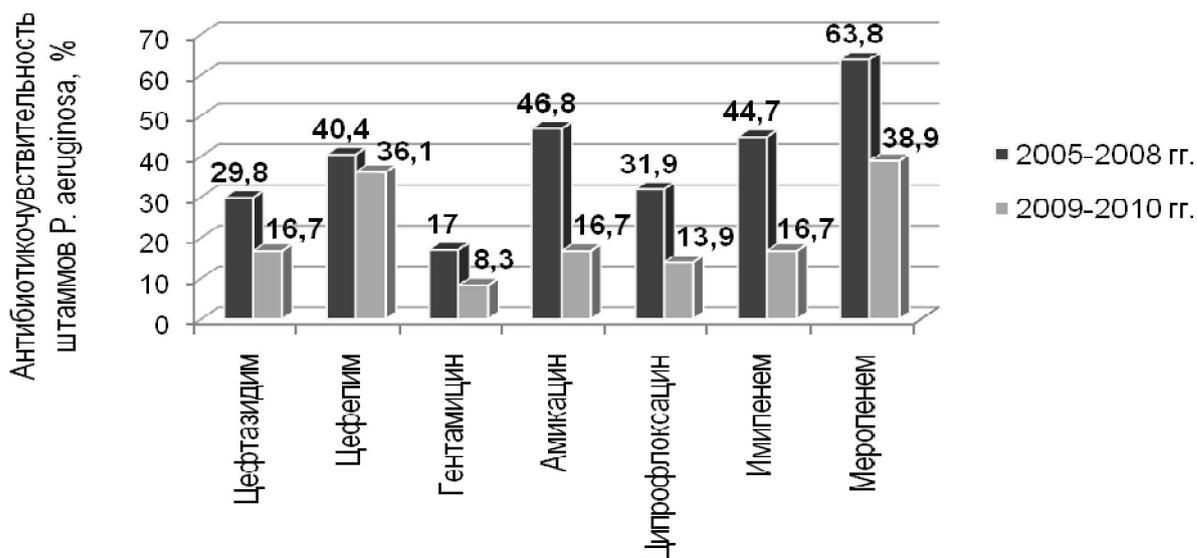


Рисунок 2 – Динамика уровней антибиотикочувствительности штаммов *P. aeruginosa* в 2005–2008 гг. (n=47) и 2009–2010 гг. (n=36)

Анализируя ассоциированную резистентность *E. coli*, отмечено, что более половины цефотаксим-резистентных штаммов имели перекрестную устойчивость к другим бета-лактамам. В отношении цефтазидим-, цефотаксим- и цефепиморезистентных штаммов *E. coli* наибольшей активностью обладали имипенем, амоксиклав и ципрофлоксацин. Резистентные к цефотаксиму штаммы *Proteus spp.* были наиболее чувствительны к имипенему и ципрофлоксацину. Перекрестной устойчивостью к цефотаксиму и цефепиму обладали 3 штамма *Proteus spp.* Штаммы *K. pneumoniae*, резистентные к цефтазидиму, обладали чувствительностью к цефепиму, имипенему и ципрофлоксацину. Перекрестной устойчивостью к цефотаксиму и цефтазидиму обладал один штамм *K. pneumoniae*.

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.

Анализ частоты совпадения стартовой антибиотикотерапии с чувствительностью микроорганизмов, выделенных из мочи пациентов, выявил совпадение в 74,81% случаев. У 25,19% пациентов превентивно назначенная антибактериальная терапия до получения результатов микробиологического исследования мочи проводилась препаратами, к которым микроорганизмы были резистентны. Дальнейшая коррекция схемы антибиотикотерапии при получении результатов определения чувствительности микроорганизмов проводилась в 90,77% случаев.

Продукция БЛРС как один из механизмов резистентности возбудителей пиелонефритов к клинически значимым антибактериальным препаратам

Методом «двойных дисков» продукция β -лактамаз расширенного спектра выявлена у 29 из 65 (44,6 \pm 6,2%) штаммов *E. coli*, в то время, как с помощью стандартного диско-диффузионного метода устойчивость к цефотаксиму и цефтазидиму обнаруживалась только у 17 из 29 (58,6 \pm 9,1%) БЛРС-продуцирующих штаммов, только к цефотаксиму – у 6 (20,7 \pm 7,5%) штаммов, только к цефтазидиму – у 4 (13,8 \pm 6,4%) штаммов.

Продукция БЛРС была выявлена у 5 из 10 (50,0 \pm 15,8%) штаммов *K. pneumoniae*, из которых 2 штамма охарактеризованы как «чувствительные» к цефотаксиму и цефтазидиму по стандартному диско-диффузионному методу. Продукция БЛРС была выявлена у 15 из 35 (42,9 \pm 8,4%) штаммов *Proteus spp.*, у 2 из которых стандартный диско-диффузионный метод не позволил обнаружить устойчивости к цефтазидиму и цефотаксиму.

Геноиндикация БЛРС разных классов выполнена для микроорганизмов, у которых скрининговым фенотипическим методом «двойных дисков» был выявлен БЛРС-фенотип: *E. coli* – 29 штаммов, *K. pneumoniae* – 5 штаммов, *Proteus spp.* – 15 штаммов. В результате 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. Анализ кривых плавления зондов не выявил точечных мутаций в кодонах 179, 238-240 *bla*_{SHV}-генов исследуемых штаммов клебсиелл. Обнаруженные *bla*_{SHV}-гены у изолятов *K. pneumoniae*, относящиеся к генетической группе SHV-1 (плазмидно-кодируемые пенициллиназы SHV-1), не обладают расширенным спектром активности в отношении бета-лактамовых антибиотиков.

У 14 штаммов *E. coli*, 8 штаммов *P. mirabilis* и 5 штаммов *K. pneumoniae* обнаружен продукт амплификации длиной 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).

Формирование биопленок изолятами бактерий, выделенными от пациентов с острыми и хроническими пиелонефритами

Из 69 клинических изолятов *E. coli* 27 изолятов были выделены от пациентов с острым пиелонефритом и 42 изолята – от пациентов с хроническим пиелонефритом, из 56 изолятов *P. aeruginosa* – соответственно 15 и 41, из 15 изолятов *S. aureus* – 8 и 7, из 10 изолятов *K. pneumoniae* – 4 и 6. У 55 (36,7%) пациентов пиелонефрит протекал на фоне мочекаменной болезни и был вызван энтеробактериями (n=25), синегнойной палочкой (n=28) и золотистым стафилококком (n=2).

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 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 пациентов с хроническими пиелонефритами, обнаружено значительное преобладание пленкообразующей активности по сравнению с микроорганизмами, выделенными при острых пиелонефритах. Указанные различия оказались статистически значимы для штаммов *E. coli* (p<0,0001), *P. aeruginosa* (p<0,0001), *K. pneumoniae* (p=0,0222), *S. aureus* (p=0,0279). Энтеробактерии, выделенные от больных пиелонефритами с сопутствующей мочекаменной болезнью, в целом отличались большей способностью к пленкообразованию (p=0,0011), по сравнению с возбудителями инфекций, протекающих без уrolитиаза.

На основе данных пленкообразующей активности возбудителей пиелонефритов определены средние значения (M±m) массы красителя для исследуемых микроорганизмов, которые составили для *E. coli* – 6,50±0,34, *K. pneumoniae* – 9,49±1,5, *P. aeruginosa* – 18,25±1,15. Выявлен ряд штаммов *E. coli*, *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae* с максимальной и минимальной биопленкообразующей способностью. При этом, штаммы *E. coli*, *P. aeruginosa* с максимальной биопленкообразующей способностью обладали сочетанной

устойчивостью ко многим, чаще 6–7 антибиотикам. В отношении штаммов *K. pneumoniae* с максимальной пленкообразующей способностью профили резистентности отмечены только к 4 антибиотикам. Клинические изоляты *E. coli* с минимальной биопленкообразующей способностью в 70% случаев устойчивы к 1–3 антибиотикам, 10% – к 4 препаратам, 20% не имели устойчивости к антибактериальным лекарственным средствам. В отношении же штаммов *K. pneumoniae* с минимальной биопленкообразующей способностью отмечена устойчивость к 1–2 антибиотикам, *P. aeruginosa* – к 2–4 антибиотикам.

Алгоритм микробиологической диагностики и рациональной антибактериальной терапии пиелонефритов

Алгоритм микробиологической диагностики пиелонефритов включает бактериологическое исследование мочи с выделением возбудителя и его идентификацией; определение чувствительности диско-диффузионным методом к ампициллину, амоксициллин/клавуланату, цефотаксиму или цефтриаксону, цефтазидиму, ципрофлоксацину или офлоксацину, гентамицину. Дополнительно (при осложненных инфекциях мочевыводящих путей или неэффективности стартовой эмпирической терапии) определяется чувствительность к цефепиму, меропенему или имипенему, цефоперазон/сульбактаму, тикарциллин/клавуланату, амикацину. Микробиологическая диагностика пиелонефритов предусматривает также определение продукции бета-лактамаз расширенного спектра фенотипическим методом «двойных дисков». При выявлении в фенотипическом тесте продукции БЛРС должна быть проведена коррекция антибиотикограммы: для аминопенициллинов и цефалоспоринов I–IV поколений (за исключением ингибиторозащищенных) категории «S» и «I» (чувствительный и умеренно устойчивый) изменяется на «R» – устойчивый.

Тактика рациональной антибактериальной терапии пиелонефритов предусматривает стартовую эмпирическую антибактериальную терапию фторхинолоном или ингибиторозащищенным аминопенициллином с последующей ее коррекцией фторхинолоном (если не использовался для стартовой терапии) или ингибиторозащищенным уреидопенициллином, карбапенемом, или применяют комбинированную терапию (амикацин + ингибиторозащищенный аминопенициллин или амикацин + фторхинолон).

Среди антибактериальных лекарственных средств, не рекомендуемых для проведения эмпирической терапии пиелонефрита, следует отметить аминопенициллины (амоксициллин, ампициллин), ко-тримоксазол, цефалоспорины I–III поколений (в связи с широким распространением продуцентов БЛРС среди возбудителей инфекций мочевыводительной системы).

При получении результатов определения чувствительности к антибиотикам и определения продукции БЛРС проводят этиотропную антибактериальную терапию пиелонефритов.

В дальнейшем на 5-й день от начала антибактериальной терапии и через 10 дней после завершения антибактериальной терапии (контроль микробиологической санации) проводят повторное микробиологическое исследование мочи.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Основные научные результаты диссертации

1. Анализ этиологической структуры пиелонефритов за периоды 2000–2003 гг. и 2008–2010 гг. показал, что основными возбудителями являются представители семейства *Enterobacteriaceae* (*E. coli*, *Proteus spp.*, *K. pneumoniae*, *Enterobacter spp.*), среди которых чаще встречается *E. coli* (2000–2003 гг. – $27,54 \pm 2,40\%$ случаев, и в 2008–2010 гг. ее удельный вес возрастает до $42,76 \pm 2,87\%$, $p=0,0001$). Частота выделения штаммов *P. aeruginosa* также увеличивается с $14,20 \pm 1,88\%$ до $20,54 \pm 2,34\%$ ($p=0,034$), а удельный вес штаммов *Enterobacter spp.* и *Staphylococcus spp.* снижается с $11,88 \pm 1,74\%$ до $2,36 \pm 0,88\%$ и с $22,03 \pm 2,23\%$ до $10,44 \pm 1,77\%$ соответственно ($p=0,0001$). Частота выделения штаммов *Proteus spp.* и *K. pneumoniae* на протяжении 10 лет изменений не претерпела [7, 8, 10, 11, 12, 13, 16, 24].

2. У возбудителей пиелонефритов установлена широкая распространенность устойчивости к β -лактамам и не- β -лактамам антибиотикам. Анализ динамики чувствительности/устойчивости *E. coli*, выделенных в 2005–2008 гг. и 2009–2010 гг., свидетельствует, что штаммы *E. coli* сохраняют чувствительность к имипенему ($93,9–100\%$), амикацину ($93,8 \pm 4,3\%$), ципрофлоксацину ($75,0 \pm 7,6\%$), $p>0,05$. По сравнению с этими препаратами, резистентность *E. coli* к амоксиклаву, цефалоспорином III поколения, гентамицину выше. Удельный вес устойчивых к аминопенициллинам (ампициллину и амоксициллину) штаммов *E. coli* составил 69–83%. За 5-летний период выявлен рост доли чувствительных штаммов *E. coli* к цефепиму на 28,3% ($81,3 \pm 6,9\%$ в сравнении с $53,0 \pm 7,1\%$, $p=0,0097$). Более половины цефотаксим-резистентных штаммов *E. coli* имели перекрестную устойчивость к другим бета-лактамам антибиотикам. В отношении цефтазидим-, цефотаксим- и цефепиморезистентных штаммов *E. coli* наибольшей активностью обладали имипенем, амоксиклавы и ципрофлоксацины.

Штаммы *Proteus spp.* в 64–71% случаев нечувствительны к аминопенициллинам, в 25–39% – к цефотаксиму и цефтазидиму. Отмечено снижение с $82,9 \pm 6,4\%$ до $60,7 \pm 9,2\%$ доли чувствительных штаммов *Proteus spp.*

к цефепиму ($p=0,049$), к ципрофлоксацину – с $82,9\pm 6,4\%$ до $60,7\pm 9,2\%$ ($p=0,049$). Штаммы *Proteus spp.* за 5-летний период сохраняют чувствительность к имипенему.

Нечувствительными к аминопеницилинам и карбенициллину были 90% клинических изолятов *K. pneumoniae*, к цефалоспорином III поколения – 20–30% штаммов. Наибольшей активностью в отношении исследованных штаммов *K. pneumoniae* обладали имипенем, ципрофлоксацин, офлоксацин, амоксициллин/клавуланат, амикацин, цефепим.

Выявлена тенденция к увеличению количества резистентных штаммов *P. aeruginosa* с 2005–2008 гг. к 2009–2010 гг. Отмечено снижение доли чувствительных штаммов *P. aeruginosa* к имипенему (с $44,7\pm 7,2\%$ до $16,7\pm 6,2\%$, $p=0,007$), меропенему (с $63,8\pm 7,0\%$ до $38,9\pm 8,1\%$, $p=0,024$), ципрофлоксацину (с $31,9\pm 6,8\%$ до $13,9\pm 5,8\%$, $p=0,047$), амикацину (с $46,8\pm 7,3\%$ до $16,7\pm 6,2\%$, $p=0,004$).

Среди штаммов *E. coli*, *Proteus spp.*, *P. aeruginosa*, выделенных от пациентов с хроническим пиелонефритом, удельный вес антибиотикорезистентных штаммов больше, чем при остром пиелонефрите. Анализ частоты совпадения стартовой антибиотикотерапии пиелонефритов с чувствительностью микроорганизмов, выделенных из мочи пациентов, выявил совпадение в 74,81% случаев [4, 7, 9, 14, 15, 18, 21, 22, 23, 26].

3. Способность продуцировать β -лактамазы расширенного спектра, расщепляющие пенициллины и цефалоспорины, выявлена скрининговым фенотипическим методом у $44,6\pm 6,2\%$ штаммов *E. coli*, $50,0\pm 15,8\%$ штаммов *K. pneumoniae* и $42,9\pm 8,4\%$ штаммов *Proteus spp.* 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-позитивных штаммов (в том числе к не- β -лактамным препаратам) [2, 4, 17, 18, 19].

4. Молекулярно-генетический анализ изолятов показал, что определяемая скрининговым фенотипическим методом БЛРС-активность исследуемых штаммов не была обусловлена наличием ОХА-генов. 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-лактамовых антибиотиков. Выявленные у большинства БЛРС-позитивных изолятов энтеробактерий гены *bla*_{TEM} не имели нуклеотидных замен, придающих расширенную бета-лактамазную

активность (WT, дикий тип), что позволило отнести их к генетической группе TEM-1. Среди штаммов *E. coli*, *P. mirabilis* и *K. pneumoniae* с подтвержденной фенотипической БЛРС-активностью выявлены изоляты, обладающие *bla*_{СТХ}-генами двух генетических кластеров (СТХ-М-1 и СТХ-М-9). У 14 штаммов *E. coli*, 8 штаммов *P. mirabilis* и 5 штаммов *K. pneumoniae* обнаружен продукт амплификации длиной 97 п.н. с температурой плавления около 82,8–83,0°C, что позволяет отнести обнаруженные *bla*_{СТХ-М}-гены к генетической группе СТХ-М-1. У 2 штаммов *E. coli* обнаружен продукт амплификации длиной 518 п.н. с температурой плавления около 91°C, генетическая группа СТХ-М-9 [1, 2, 7, 18, 19].

5. Максимальной пленкообразующей способностью обладали изоляты *P. aeruginosa*. Штаммы *E. coli*, *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae*, *S. aureus*, выделенные от пациентов с хроническим пиелонефритом, по способности формирования биопленок значительно превосходили штаммы, выделенные от пациентов с острым пиелонефритом. Отмечена более высокая способность к формированию микробных биопленок для микроорганизмов – возбудителей пиелонефритов, протекающих на фоне мочекаменной болезни. Интенсивное образование биопленок клиническими изолятами *E. coli*, *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae*, *S. aureus* может являться важным фактором хронизации инфекций мочевыделительного тракта. Клинические изоляты *P. aeruginosa*, *E. coli*, *K. pneumoniae*, *S. aureus* с максимальной пленкообразующей активностью более устойчивы к антибиотикам, чем штаммы с минимальной способностью формировать биопленки [3, 5, 6, 7, 20, 25].

6. Алгоритм микробиологической диагностики и рациональной антибактериальной терапии пиелонефритов предусматривает организацию лабораторной диагностики и антибактериальной терапии пиелонефритов на основе бактериологического исследования резистентности изолятов от пациентов, подбор препаратов для определения чувствительности возбудителей пиелонефритов, определение продукции бета-лактамаз расширенного спектра методом «двойных дисков» с последующей коррекцией антибиотикограмм, выбор лекарственных средств для стартовой эмпирической антибактериальной терапии и ее коррекции, назначение рациональной этиотропной антибактериальной терапии [4, 27].

Рекомендации по практическому использованию результатов

Определение антибиотикорезистентности и вариантов ассоциированной устойчивости энтеробактерий необходимо учитывать при разработке локальных формуляров эмпирической антибактериальной терапии пиелонефритов.

В качестве скринингового исследования рекомендовано в клинической лабораторной практике использовать фенотипическую детекцию бета-лактамаз расширенного спектра у клинических изолятов энтеробактерий – возбудителей пиелонефритов с последующей коррекцией антибиотикограмм при получении позитивного результата.

Обнаружение нуклеотидных замен в генах SHV и TEM с использованием зондовых методик и анализа кривых плавления позволяет выявлять расширенную бета-лактамазную активность и может использоваться в качестве подтверждающего метода в лабораториях молекулярной генетики. Поскольку обнаружение генов SHV и TEM не является однозначным свидетельством БЛРС-активности, требуется анализ наличия точечных мутаций в позициях, увеличивающих спектр активности в отношении цефалоспоринов III–IV поколений.

Алгоритм микробиологической диагностики и рациональной антибактериальной терапии пиелонефритов отражен в инструкции по применению, утвержденной Министерством здравоохранения Республики Беларусь 22 марта 2013 г., № 252-1212 [27], и рекомендован к использованию в работе урологических отделений и микробиологических лабораторий лечебных учреждений Республики Беларусь, о чем свидетельствуют акты о внедрении.

Определение интенсивности формирования микробных биопленок возбудителями пиелонефритов и их повышенную устойчивость к антимикробным препаратам необходимо учитывать при терапии острых и хронических форм инфекций мочевыделительной системы.

СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ СОИСКАТЕЛЯ

Статьи в журналах

1. Лагун, Л.В. Молекулярно-генетическая технология выявления резистентности энтеробактерий к бета-лактамам на основе геноиндикации бета-лактамаз расширенного спектра / Л.В. Лагун, С.В. Жаворонок // Лабораторная диагностика Восточная Европа. – 2012. – № 2. – С. 74–86.

2. Лагун, Л.В. Бета-лактамазы расширенного спектра и их значение в формировании устойчивости возбудителей инфекций мочевыводящих путей к антибактериальным препаратам / Л.В. Лагун // Проблемы здоровья и экологии. – 2012. – № 3. – С. 82–88.

3. Лагун, Л.В. Интенсивность образования микробных биопленок микроорганизмами, выделенными при пиелонефритах и мочекаменной болезни / Л.В. Лагун, Д.В. Тапальский, С.В. Жаворонок // Медицинский журнал. – 2012. – № 4. – С. 64–67.

4. 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.

5. Лагун, Л.В. Формирование микробных биопленок у возбудителей острого и хронического пиелонефрита / Л.В. Лагун, Ю.В. Атанасова, Д.В. Тапальский // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. – 2013. – № 3. – С. 18–23.

6. Лагун, Л.В. Бактериальные биопленки и их роль в развитии инфекций мочевыводящих путей / Л.В. Лагун, С.В. Жаворонок // Медицинский журнал. – 2013. – № 4. – С. 21–27.

7. Лагун, Л.В. Этиологическая структура и молекулярно-биологические свойства возбудителей пиелонефрита / Л.В. Лагун, С.В. Жаворонок // Здравоохранение. – 2014. – № 2. – С. 39–46.

Статьи в сборниках научных трудов, материалах конференций

8. Лагун, Л.В. Микробный пейзаж при пиелонефритах в современных условиях / Л.В. Лагун, А.И. Касим // Актуальные проблемы медицины: сб. науч. ст. / Гом. гос. мед. ун-т; редкол. С.В. Жаворонок [и др.]. – Гомель, 2003. – Вып. 4. – С. 141–143.

9. Лагун, Л.В. Чувствительность к антибактериальным препаратам возбудителей пиелонефрита, выделенных в урологическом отделении Гомельской областной клинической больницы / Л.В. Лагун, А.И. Касим // Актуальные проблемы медицины: сб. науч. ст. / Гом. гос. мед. ун-т; редкол. С.В. Жаворонок [и др.]. – Гомель, 2003. – Вып. 4. – С. 138–141.

10. Лагун, Л.В. Характеристика этиологической структуры острых и хронических пиелонефритов / Л.В. Лагун, А.И. Касим // Христианство и медицина. Актуальные проблемы медицины: материалы II Белорусско-Американской науч.-практ. конф. врачей и 14-й науч. сессии Гом. гос. мед. ун-та, посвящ. 18-летию катастрофы на ЧАЭС, Гомель, 13–15 апреля 2004 г. / Гом. гос. мед. ун-т; редкол. С.В. Жаворонок [и др.]. – Гомель-Амарелло, 2004. – Т. 2. – С. 84–86.

11. Лагун, Л.В. Этиопатогенетическая значимость *E. coli* в развитии пиелонефритов / Л.В. Лагун // Актуальные вопросы современной инфектологии: материалы Международной науч.-практ. конф., посвящ. 95-летию организации Иркутской городской инфекционной клинической больницы, Иркутск, 6–7 октября 2005 г. / Журнал инфекционной патологии. – Иркутск, 2005. – Т. 12. – № 3–4. – С. 102–103.

12. Лагун, Л.В. Этиологическая структура пиелонефритов в зависимости от пола и возраста пациентов / Л.В. Лагун, А.И. Касим // Актуальные проблемы медицины: материалы Респ. науч.-практ. конф. и 15-й науч. сессии Гом. гос. мед. ун-та, посвящ. 60-летию Победы в Великой Отечественной войне, Гомель, 18–20 мая 2005 г.: в 5 т. / Гом. гос. мед. ун-т; редкол. С.В. Жаворонок [и др.]. – Гомель, 2005. – Т. 2. – С. 123–125.

13. Лагун, Л.В. *Pseudomonas aeruginosa* как этиологический фактор в развитии инфекций мочевыводящей системы / Л.В. Лагун // Актуальные проблемы медицины: сб. науч. ст. Респ. науч.-практ. конф. и 16-й итоговой науч. сессии Гом. гос. мед. ун-та: в 4 т. / Гом. гос. мед. ун-т; редкол. С.В. Жаворонок [и др.]. – Гомель, 2007. – Т. 2. – С. 129–132.

14. Лагун, Л.В. Оценка антибиотикочувствительности штаммов *P. aeruginosa*, выделенных при пиелонефритах / Л.В. Лагун // Актуальные проблемы медицины: сб. науч. ст. Респ. науч.-практ. конф. и 16-й итоговой науч. сессии Гом. гос. мед. ун-та: в 4 т. / Гом. гос. мед. ун-т; редкол. С.В. Жаворонок [и др.]. – Гомель, 2007. – Т. 2. – С. 132–135.

15. Лагун, Л.В. Анализ результатов резистентности к антибактериальным препаратам штаммов *E. coli*, выделенных при пиелонефритах / Л.В. Лагун // Современные проблемы инфекционной патологии человека: сб. науч. тр. / ГУ «НИИ эпидемиологии и микробиологии»; редкол. Л.П. Титов [и др.]. – Минск, 2008. – Вып. 1. – С. 259–262.

16. Лагун, Л.В. Протейная инфекция в этиологии пиелонефритов и мочекаменной болезни / Л.В. Лагун // Актуальные проблемы медицины: сб. науч. ст. Респ. науч.-практ. конф. и 19-й итоговой науч. сессии Гом. гос. мед. ун-та: в 4 т. / Гом. гос. мед. ун-т; редкол. А.Н. Лызиков [и др.]. – Гомель, 2010. – Т. 2. – С. 210–212.

17. Лагун, Л.В. Фенотипическая детекция β -лактамаз расширенного спектра у возбудителей пиелонефритов / Л.В. Лагун // Актуальные проблемы медицины: сб. науч. ст. Респ. науч.-практ. конф. и 19-й итоговой науч. сессии Гом. гос. мед. ун-та: в 4 т. / Гом. гос. мед. ун-т; редкол. А.Н. Лызилов [и др.]. – Гомель, 2010. – Т. 2. – С. 212–215.

18. Лагун, Л.В. Оценка этиологической структуры пиелонефритов и изучение молекулярно-биологических свойств уропатогенов / Л.В. Лагун, Д.В. Тапальский // Современные проблемы инфекционной патологии человека: сб. науч. тр. / М-во здравоохран. Респ. Беларусь. РНПЦ эпидемиологии и микробиологии; под ред. Л.П. Титова. – Минск, 2013. – Вып. 6. – С. 193–198.

19. Жаворонок, С.В. Продуценты бета-лактамаз расширенного спектра среди энтеробактерий – возбудителей пиелонефритов / С.В. Жаворонок, Л.В. Лагун, Д.В. Тапальский // Актуальные вопросы инфекционной патологии: материалы 6-го съезда инфекционистов Республики Беларусь, Витебск, 29–30 мая 2014 г. / Витебский гос. мед. ун-т; под ред. проф. В.М. Семенова. – Витебск, 2014. – С. 75–76.

20. Лагун, Л.В. Бактериальные биопленки *Pseudomonas aeruginosa* при пиелонефритах / Л.В. Лагун, Д.В. Тапальский, С.В. Жаворонок // Актуальные вопросы инфекционной патологии: материалы 6-го съезда инфекционистов Республики Беларусь, Витебск, 29–30 мая 2014 г. / Витебский гос. мед. ун-т; под ред. проф. В.М. Семенова. – Витебск, 2014. – С. 103–104.

Тезисы в сборниках научных трудов, материалах конференций

21. Лагун, Л.В. Резистентность к антибактериальным препаратам изолятов *E. coli*, выделенных при пиелонефритах / Л.В. Лагун // Узловые вопросы борьбы с инфекцией: материалы Российской науч.-практ. конф., Санкт-Петербург, 1–2 декабря 2004 г. / ВМедА; редкол.: Ю.В. Лобзин [и др.]. – Санкт-Петербург, 2004. – С. 140.

22. Лагун, Л.В. Чувствительность изолятов *E. coli*, выделенных при пиелонефритах, к цефалоспорином / Л.В. Лагун // Материалы VIII Международного конгресса МАКМАХ/ASM по антимикробной терапии, Москва, 30 мая – 1 июня 2006 г. / Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. – 2006. – Т. 8, № 2. – Приложение 1. – С. 25–26.

23. Лагун, Л.В. Резистентность штаммов *Pseudomonas aeruginosa*, выделенных при пиелонефритах, к аминогликозидам / Л.В. Лагун // Материалы X Международного конгресса МАКМАХ по антимикробной терапии, Москва, 2008 г. / Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. – 2008. – Т. 10, № 2. – Приложение 1. – С. 27–28.

24. Лагун, Л.В. Анализ результатов мониторинга этиологической структуры пиелонефритов / Л.В. Лагун // Инфекции в практике клинициста.

Антибактериальная и противовирусная терапия на догоспитальном и госпитальном этапах: сб. науч. ст. науч.-практ. конф. с международным участием, Харьков, 27–28 марта 2008 г. / под ред. В.П. Малого, И.С. Кратенко. – Харьков, 2008. – С. 195.

25. Лагун, Л.В. Количественная оценка интенсивности формирования микробных биопленок клиническими изолятами *E. coli*, выделенными при острых и хронических пиелонефритах / Л.В. Лагун, Ю.В. Атанасова, Д.В. Тапальский // Материалы XIV Международного конгресса МАКМАХ/ESCMID по антимикробной терапии, Москва, 23–25 мая 2012 г. / Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. – 2012. – Т. 14, № 2. – Приложение 1. – С. 33–34.

26. Лагун, Л.В. Мониторинг антибиотикорезистентности клинических штаммов *Pseudomonas aeruginosa*, выделенных при пиелонефритах / Л.В. Лагун // Материалы XV Международного конгресса МАКМАХ/ESCMID по антимикробной терапии, Москва, 22–24 мая 2013 г. / Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. – 2013. – Т. 15, № 2. – Приложение 1. – С. 27.

Материалы внедрения

27. Метод микробиологической диагностики и рациональной антибактериальной терапии пиелонефритов: инструкция по применению : утв. Министерством здравоохранения Респ. Беларусь, 22 марта 2013 г., № 252-1212 / авт.-разр.: Л.В. Лагун, С.В. Жаворонок. – Минск: БГМУ, 2013. – 7 с.

РЭЗІЮМЭ

Лагун Людміла Васільеўна

Этыялагічная структура і малекулярна-біялагічныя ўласцівасці ўзбуджальнікаў піеланефрытаў

Ключавыя словы: вострыя і хранічныя піеланефрыты, узбуджальнікі піеланефрытаў, рэзістэнтнасць да антыбіётыкаў, β -лактамазы расшыранага спектра, біяпленкі.

Мэта даследавання: ацаніць этыялагічную структуру і малекулярна-біялагічныя ўласцівасці ўзбуджальнікаў піеланефрытаў і распрацаваць алгарытм мікрабіялагічнай дыягностыкі і тактыку рацыянальнай антыбактэрыяльнай тэрапіі.

Метады даследавання: бактэрыялагічны, метады выяўлення адчувальнасці бактэрыяў да антыбіётыкаў, метады «двайных дыскаў» для выяўлення β -лактамаз расшыранага спектра, малекулярна-генетычны, метады выяўлення біяплёнак, статыстычны.

Атрыманыя вынікі і іх навізна. Сярод этыялагічнай структуры піеланефрытаў пераважалі штамы *E. coli* і *P. aeruginosa*. У ўзбуджальнікаў піеланефрытаў вызначана шырокая распаўсюджанасць рэзістэнтнасці да антыбіётыкаў розных груп. Вывучаны механізмы фарміравання рэзістэнтнасці энтэрабактэрыяў да β -лактамных антыбіётыкаў. Выяўлена высокая распаўсюджанасць прадукцэнтаў β -лактамаз расшыранага спектра, якія адносяцца да групы СТХ-М. Паміж узбуджальнікаў піеланефрытаў максімальнай пленкаствараючай здольнасцю валодалі штамы *P. aeruginosa*. Штамы, выдзеленыя ад пацыентаў з хранічным піеланефрытам і піеланефрытам, які працякаў на фоне мочакаменнай хваробы, па здольнасці фарміравання біяплёнак значна перавышалі штамы, выдзеленыя ад пацыентаў з вострым піеланефрытам. У штамаў *P. aeruginosa*, *E. coli*, *K. pneumoniae* з максімальнай пленкаствараючай актыўнасцю адзначана больш высокая рэзістэнтнасць да антыбіётыкаў. Распрацаваны алгарытм мікрабіялагічнай дыягностыкі і рацыянальнай антыбактэрыяльнай тэрапіі піеланефрытаў.

Рэкамендацыі па выкарыстанні: атрыманыя вынікі могуць быць выкарыстаны пры правядзенні мікрабіялагічнай дыягностыкі і прызначэнні рацыянальнай антыбактэрыяльнай тэрапіі пацыентам з піеланефрытамі.

Галіна прымянення: клінічная бактэрыялогія, уралогія, нефралогія.

РЕЗЮМЕ

Лагун Людмила Васильевна

Этиологическая структура и молекулярно-биологические свойства возбудителей пиелонефритов

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

Цель исследования: оценить этиологическую структуру и молекулярно-биологические свойства возбудителей пиелонефритов и разработать алгоритм микробиологической диагностики и тактику рациональной антибактериальной терапии.

Методы исследования: бактериологический, методы определения чувствительности бактерий к антибиотикам, метод «двойных дисков» для выявления β -лактамаз расширенного спектра, молекулярно-генетический, метод выявления биопленок, статистический.

Полученные результаты и их новизна. В этиологической структуре пиелонефритов преобладали штаммы *E. coli* и *P. aeruginosa*. У возбудителей пиелонефритов установлена широкая распространенность устойчивости к антибиотикам различных групп. Изучены механизмы формирования резистентности энтеробактерий к β -лактамным антибиотикам. Выявлена высокая распространенность продуцентов β -лактамаз расширенного спектра, 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 пациентов с острым пиелонефритом. У штаммов *P. aeruginosa*, *E. coli*, *K. pneumoniae* с максимальной пленкообразующей активностью отмечена более высокая устойчивость к антибиотикам. Разработан алгоритм микробиологической диагностики и рациональной антибактериальной терапии пиелонефритов.

Рекомендации по использованию: полученные результаты могут быть использованы при проведении микробиологической диагностики и назначении рациональной антибактериальной терапии пациентам с пиелонефритами.

Область применения: клиническая бактериология, урология, нефрология.

SUMMARY

Lagun Ludmila Vasilievna

Etiologic structure and molecular-biological properties of the etiologic agents of pyelonephritises

Key words: acute and chronic pyelonephritises, etiologic agents of pyelonephritises, resistance to antibiotics, extended-spectrum beta-lactamases, biofilms.

The aim of research: the study of etiologic structure and molecular-biological properties of the etiologic agents of pyelonephritises and work out of algorithm of microbiological diagnostics and tactics of the rational antibacterial therapy.

Methods of research: bacteriological, determination methods of microorganisms susceptibility to the antibiotics, double disk diffusion method for detection of extended-spectrum beta-lactamases, molecular-genetic, method of biofilm-formation revealing, statistical.

Obtained results and their novelty. *E. coli* and *P. aeruginosa* strains are prevailed in the etiologic structure of pyelonephritises. The wide-spread resistance to antibiotics of the various groups of the etiological agents of pyelonephritises was established. Development mechanisms of enterobacteria resistance to the β -lactam antibiotics are studied. High prevalence of extended-spectrum β -lactamases producers concerning to CTX-M group was revealed. Among the etiological agents of pyelonephritises *P. aeruginosa* isolates are characterized by the maximal film-formation ability. The strains isolated from patients with chronic pyelonephritis and pyelonephritis associated with urolithiasis have surpassed significantly the strains isolated from patients with acute pyelonephritis in biofilm formation ability. Higher resistance to the antibiotics is revealed for *P. aeruginosa*, *E. coli*, *K. pneumoniae* strains with maximal biofilm formation activity. The algorithm of microbiological diagnostics and rational antibacterial therapy of pyelonephritises were designed.

Recommendation for use: the obtained results can be used in the approaches to microbiological diagnostics and appointment of rational antibacterial therapy for patients with pyelonephritises.

Application area: clinical bacteriology, urology, nephrology.

Подписано в печать 30.09.14. Формат 60×84/16. Бумага писчая «Снегурочка».
Ризография. Гарнитура «Times».
Усл. печ. л. 1,39. Уч.-изд. л. 1,4. Тираж 60 экз. Заказ 550.

Издатель и полиграфическое исполнение: учреждение образования
«Белорусский государственный медицинский университет».
Свидетельство о государственной регистрации издателя, изготовителя,
распространителя печатных изданий № 1/187 от 18.02.2014.
Ул. Ленинградская, 6, 220006, Минск.