

УДК 579.8:579.26

## ДИНАМИКА АНТИБИОТИКОЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ БАКТЕРИЙ

### *KLEBSIELLA PNEUMONIAE*

Отурина И.П., Зацепина Б.В.

Одним из основных методов борьбы с патогенными и условно-патогенными микроорганизмами является использование высокоэффективных препаратов, быстро действующих на возбудителя и не влияющих на физиолого-биохимические процессы в самом пораженном организме. Однако чувствительность бактерий, периодически оказывающихся в контакте с определенными антибиотиками, постепенно снижается, что необходимо учитывать, особенно при диагностике и лечении недостаточно изученных инфекционных заболеваний разной этиологии, среди которых особое место занимают клебсиеллёзные инфекции, обычно не распознаваемые, а потому протекающие под другими диагнозами [1]. Клебсиеллы вызывают интерес также и у специалистов ветеринарной службы, ботаников и гигиенистов, т. к. этих бактерий обнаруживают при заболеваниях животных (пневмониях, септицемиях), выделяют из пищевых продуктов, с поверхности овощей, семян, цветов, из различных водоемов.

Для бактерий рода *Klebsiella* характерна значительная устойчивость к воздействию факторов внешней среды [2], в том числе и высокая антибиотикорезистентность. Определение динамики колебаний чувствительности клебсиелл к антибиотическим препаратам – одно из важных условий совершенствования антибиотикотерапии инфекционных заболеваний, поскольку систематический контроль распространения антибиотикоустойчивых штаммов является основой для поиска и синтеза новых, обладающих более широким спектром действия антибактериальных соединений. К сожалению, исследование антибиотикочувствительности штаммов клебсиелл, высеянных в Крыму, на современном методическом уровне не проводилось, вследствие чего целью данной работы явилось изучение ответной реакции штаммов *Klebsiella pneumoniae* на воздействие различных групп антибиотиков в динамике.

#### МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

*Klebsiella pneumoniae* – представитель кишечных бактерий из семейства *Enterobacteriaceae* [3], обитающий в кишечнике человека и животных, а также выделяющийся из человеческого организма при инфекциях мочевыделительной и дыхательной систем.

Для исследований были использованы штаммы *Klebsiella pneumoniae*, выделенные от больных людей с 2002 по 2004 гг. в бактериологической лаборатории санитарно-эпидемической станции г. Феодосия АР Крым.

Для определения культуральных и физиолого-биохимических свойств исследуемые бактерии культивировались в термостате в течение 24-48 часов на селективных (среды Эндо, Плоскирева, Левина) и дифференциально-диагностических (среды Олькеницкого, Кларка, Симмонса и др.) питательных средах, рекомендованных Международным подкомитетом по *Enterobacteriaceae* (1963).

Степень чувствительности клебсиелл к антибиотикам определялась с помощью дискодиффузного метода путем сравнения диаметров зон задержки роста (ДЗЗР) вокруг бумажных дисков, пропитанных растворами антибиотиков определенных концентраций, со стандартными значениями для каждого отдельного лекарственного препарата (табл. 1) [4]. Результаты обрабатывались статистически.

Таблица 1.  
Стандартные показатели ДЗЗР микроорганизмов к антибиотикамири  
использовании дискодиффузного метода

| №  | Антибиотики        | ДЗЗР, мм |       |     |
|----|--------------------|----------|-------|-----|
|    |                    | R        | I     | S   |
| 1  | Амикацин (AM)      | ≤14      | 15-16 | ≥17 |
| 2  | Ампициллин (AMP)   | ≤9       | 10-13 | ≥14 |
| 3  | Гентамицин (GEN)   | ≤15      | -     | ≥16 |
| 4  | Доксициклин (Do)   | ≤15      | 16-19 | ≥20 |
| 5  | Канамицин (CAN)    | ≤14      | 15-18 | ≥19 |
| 6  | Левомецетин (LEV)  | ≤15      | 16-18 | ≥19 |
| 7  | Линкомицин (LIN)   | ≤19      | 20-23 | ≥24 |
| 8  | Оксациллин (Ox)    | ≤19      | 20-23 | ≥24 |
| 9  | Олеандомицин (OL)  | ≤12      | 13-17 | ≥18 |
| 10 | Офлоксацин (OFL)   | ≤12      | 13-16 | ≥17 |
| 11 | Пенициллин (PE)    | ≤9       | 10-20 | ≥21 |
| 12 | Рифампицин (RA)    | ≤12      | 13-15 | ≥16 |
| 13 | Стрептомицин (STR) | ≤16      | 17-19 | ≥20 |
| 14 | Тетрациклин (TET)  | ≤16      | 17-21 | ≥22 |
| 15 | Цефотаксим (СТК)   | ≤14      | 15-20 | ≥21 |
| 16 | Цефалексин (Ch)    | ≤12      | 13-19 | ≥20 |
| 17 | Цефтазидим (CAZ)   | ≤14      | 15-17 | ≥18 |
| 18 | Цефазолин (CZ)     | ≤14      | 15-18 | ≥19 |
| 19 | Цефтриаксон (CRK)  | ≤14      | 15-20 | ≥21 |
| 20 | Цефиксим (CM)      | ≤12      | 13-17 | ≥18 |
| 21 | Эритромицин (ERY)  | ≤17      | 18-21 | ≥22 |

Условные обозначения: R – устойчивые; S – чувствительные;  
I - умеренно чувствительные штаммы

**РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ**

Морфолого-культуральные свойства клебсиелл изучались методом светлопольной микроскопии. В мазках из исследуемых штаммов клебсиелл, окрашенных по Граму, обнаружены короткие, толстые, капсулообразующие грамотрицательные палочки с закругленными концами, располагающиеся одиночно, попарно или короткими цепочками. Клебсиеллы – факультативные неподвижные анаэробы, оптимальная температура их роста при pH 7,2 35-37<sup>0</sup> С.

В отношении источников питательных веществ клебсиеллы исключительно нетребовательны – растут на простых синтетических средах, содержащих минеральные соли, углеводы и аммоний [5]. Представители исследуемых штаммов *Klebsiella pneumoniae* проявили себя ферментативно активными энтеробактериями, утилизирующими многие субстраты (табл. 2).

При посеве на питательную среду Эндо они формировали крупные, выпуклые, красного цвета с металлическим блеском колонии слизистой консистенции; на средах Плоскирева и Левина – колонии брусничного или розово-малинового цвета, пигментация которых свидетельствовала о наличии у клебсиелл выраженных лактозоположительных свойств.

Анализ результатов проведенных биохимических тестов по исследованию ферментативной активности *K. pneumoniae* подтвердил их типичные в видовом отношении характеристики, свидетельствующие о преобладании у клебсиелл сахаролитической активности над протеолитической.

Саморегуляция жизнедеятельности *K. pneumoniae* обеспечивается адаптационной изменчивостью в ответ на изменения условий среды обитания за счет механизмов, заложенных в генофонде популяций возбудителя. Так, при воздействии антибиотиков на чувствительные к ним штаммы бактерий могут возникать устойчивые формы, не теряющие вирулентности и вызывающие патологический процесс в организме [6], причем в отдельных случаях патогенные микроорганизмы могут достигать такой высокой степени устойчивости, что дальнейшее использование ранее эффективных лечебных препаратов становится бессмысленным. Чем шире применяется тот или иной антибиотик, тем чаще и быстрее возникают устойчивые к его действию бактерии, причем отдельные штаммы микроорганизмов неодинаково чувствительны к одному и тому же антибиотику [8]. Интенсивное применение в медицинской практике определенных групп антибиотиков явилось причиной селективного распространения антибиотикорезистентных штаммов возбудителей клебсиеллёзной инфекции.

Устойчивость клебсиелл к антибиотическим веществам связана с высокой пластичностью этих микроорганизмов, позволяющей им быстро приспосабливаться к неблагоприятным условиям окружающей среды. Результаты проведенных исследований свидетельствуют о том, что чувствительные и резистентные штаммы клебсиелл могут иметь практически одинаковые морфологические и физиолого-биохимические характеристики, отличаясь лишь по степени устойчивости к используемым для подавления роста микробной культуры препаратам.

Таблица 2.  
Биохимические свойства штаммов *K. pneumoniae*, высеянных в г. Феодосия  
в 2002-2004 гг.

| Тест или субстрат  |                          | Признак или реакция |
|--|--------------------------|---------------------|
| Гидролиз мочевины  |                          | +                   |
| Разложение триптофана с образованием индола                    |                          | -                   |
| Интенсивность кислотообразования (реакция с метиловым красным) |                          | -,+                 |
| Образование ацетона  |                          | +                   |
| Образование H <sub>2</sub> S                                   |                          | -                   |
| Рост в среде с KCN   |                          | +                   |
| Разжижение желатина (при 22° С)                                |                          | -                   |
| Ферментация  | глюкозы                  | +                   |
|  | лактозы                  | +                   |
|  | сахарозы                 | +                   |
|  | рамнозы                  | +                   |
|  | ксилозы                  | +                   |
|  | мальтозы                 | +                   |
|  | арабинозы                | +                   |
|  | раффинозы                | +                   |
|  | крахмала                 | +                   |
|  | инозита                  | +                   |
|  | маннита                  | +                   |
| Утилизация   | цитрата в среде симмонса | +                   |
|  | малоната                 | +                   |
|  | ацетата натрия           | +                   |
| Наличие  | фенилаламиндезаминазы    | -                   |
|  | аргинингидролазы         | -                   |
|  | орнитиндекарбоксилазы    | -                   |
|  | лизиндекарбоксилазы      | +                   |
| «+» – 90 % и более штаммов проявляют положительную реакцию     |                          |                     |
| «-» – 90 % и более штаммов проявляют отрицательную реакцию     |                          |                     |
| «-,+» – большинство штаммов проявляют отрицательную реакцию    |                          |                     |

Так, анализ полученных экспериментальных данных свидетельствует о том, что в 2002 г. бактерии исследуемых штаммов *K. pneumoniae* проявили выраженную чувствительность к целой группе антибиотических препаратов, ингибирующих синтез компонентов клеточной стенки, нуклеиновых кислот и белков, а также нарушающих считывание генетического кода: амикацину, доксициклину, канамицину, офлоксацину, рифампицину, стрептомицину, тетрациклину (AM, Do, CAN, OFL, RA, STR, TET) и препаратам группы цефалоспоринов – цефотаксиму, цефтазидиму, цефазолину и цефтриаксону (CTK, CAZ, CZ, CRK). Выделенные в 2002 г. штаммы клебсиелл были умеренно чувствительны к гентамицину,

левомицетину, оксациллину, цефалексину, цефиксиму, эритромицину (GEN, LEV, Oх, Ch, CM, ERY); к воздействию ампициллина, линкомицина, олеандомицина, пенициллина (AMP, LIN, OL, PEN) эти бактерии были устойчивы (табл. 3).

В ходе проведенных исследований установлено, что бактерии из выделенных в 2003 г. штаммов *K pneumoniae* проявляли высокую степень чувствительности к амикацину, рифампицину, тетрациклину, цефотаксиму, цефтазидиму, цефазолину и цефтриаксону (AM, RA, TET, CTK, CAZ, CZ и CRK); умеренную чувствительность к канамицину, левомицетину, оксациллину, офлоксацину, цефалексину, эритромицину (CAN, LEV, Oх, OFL, Ch, ERY); были устойчивы к ампициллину, гентамицину, доксициклину, линкомицину, олеандомицину, пенициллину, стрептомицину, цефиксиму (AMP, GEN, Do, LIN, OL, PEN, STR, CM) (см. табл. 3). Таким образом, у клебсиелл, высеянных в г. Феодосия, в течение одного года сформировалась множественная лекарственная устойчивость к таким антибиотикам, как доксициклин (Do), стрептомицин (STR), гентамицин (GEN) и цефиксим (CM), а бактерицидный эффект канамицина (CAN) и офлаксацина (OFL) достоверно снизился. Существенно уменьшился ДЗЗР даже для таких эффективных ранее антибиотиков, как ампициллин (AM) и тетрациклин (TET) (см. табл.3), что может свидетельствовать о постепенной утрате чувствительности изучаемых бактерий к этим препаратам.

Результаты исследований, проведенных в 2004 г., показали, что клебсиеллы проявили чувствительность лишь к присутствию  $\beta$ -лактамов антибиотиков цефалоспоринового ряда II-III поколений – цефотаксиму, цефазолину, цефалексину, цефтриаксону (CTK, CZ, Ch, CRK), подавляющих синтез компонентов клеточной стенки (см. табл. 3).

К эффективным ранее амикацину (AM), рифампицину (RA), тетрациклину (TET), а также к канамицину (CAN), офлоксацину (OFL ) и цефалексину (Ch) – цефалоспорины I поколения у изучаемых бактерий выработалась выраженная устойчивость, обусловленная, по-видимому, персистенцией микробов в тканях и инактивацией лекарственных препаратов бактериальными ферментами (такими, например, как  $\beta$ -лактамазы, ацетилтрансферазы, нуклеотидазы), передачей генетического материала (хромосомного и внехромосомного – R-плазмид) от одной микробной клетки к другой, а также изменением проницаемости клеточной стенки и внутриклеточных рецепторов – рибосомальных белков, следствием чего является нарушение связывания антибиотиков со структурами микробной клетки [7].

В связи с множественностью причин возникновения антибиотикоустойчивости у микроорганизмов данный феномен должен рассматриваться не только с клинической позиции, определяющей неэффективность применения используемых терапевтических препаратов [8], но и с чисто микробиологической точки зрения, характеризующей взаимоотношения микроорганизмов с антибиотиками.

Таким образом, все более расширяющиеся проблемы антибиотикорезистентности возбудителей инфекционных заболеваний, в частности, клебсиелл, смена патогенов почти в каждом десятилетии, расширение спектра их вирулентности определяет необходимость оптимального подбора антибактериальных препаратов, который должен зависеть от чувствительности к нему возбудителя данного заболевания.

Таблица 3.  
Динамика антибиотикочувствительности штаммов *Klebsiella pneumoniae*,  
высеянных в г. Феодосия в 2002-2004 гг.

| Антибиотики        | Содержание антибиотика в диске, мкг | Средний диаметр зоны задержки роста, мм |             |             | Степень чувствительности* |       |       |
|--------------------|-------------------------------------|---|-------------|-------------|---------------------------|-------|-------|
|                    |                                     | 2002г.                                  | 2003г.      | 2004г.      | 2002г                     | 2003г | 2004г |
| Амикацин (AM)      | 10                                  | 25,33 ± 0,83                            | 19,6 ± 0,20 | 15,6 ± 0,30 | S                         | S     | I     |
| Ампициллин (AMP)   | 10                                  | 0                                       | 0           | 0           | R                         | R     | R     |
| Гентамицин (GEN)   | 10                                  | 16,1 ± 0,70                             | 13,8 ± 0,30 | 13,4 ± 0,30 | I                         | R     | R     |
| Доксициклин (Do)   | 10                                  | 25,0 ± 1,00                             | 12,4 ± 0,80 | 12,1 ± 0,20 | S                         | R     | R     |
| Канамицин (CAN)    | 30                                  | 26,1 ± 0,40                             | 16,4 ± 0,30 | 16,1 ± 0,60 | S                         | I     | I     |
| Левомецетин (LEV)  | 30                                  | 16,7 ± 0,28                             | 17,1 ± 0,50 | 11,8 ± 0,20 | I                         | I     | R     |
| Линкомицин (LIN)   | 30                                  | 13,6 ± 0,20                             | 10,4 ± 0,70 | 10,4 ± 0,70 | R                         | R     | R     |
| Оксациллин (Ox)    | 10                                  | 19,8 ± 0,35                             | 20,3 ± 0,30 | 17,4 ± 0,30 | I                         | I     | R     |
| Олеандомицин (OL)  | 15                                  | 0                                       | 0           | 0           | R                         | R     | R     |
| Офлоксацин (OFL)   | 5                                   | 20,8 ± 0,43                             | 14,4 ± 0,30 | 14,3 ± 0,30 | S                         | I     | I     |
| Пенициллин (PEN)   | 6                                   | 0                                       | 0           | 0           | R                         | R     | R     |
| Рифампицин (RA)    | 5                                   | 22,3 ± 0,50                             | 21,9 ± 0,70 | 13,8 ± 0,30 | S                         | S     | I     |
| Стрептомицин (STR) | 10                                  | 21,3 ± 0,67                             | 15,5 ± 0,60 | 14,3 ± 0,50 | S                         | R     | R     |
| Тетрациклин (TET)  | 30                                  | 33,4 ± 0,67                             | 28,4 ± 0,70 | 18,6 ± 0,20 | S                         | S     | I     |
| Цефотаксим (CTK)   | 30                                  | 29,1 ± 0,39                             | 29,0 ± 0,20 | 25,3 ± 0,80 | S                         | S     | S     |
| Цефалексин (Ch)    | 30                                  | 18,4 ± 0,30                             | 18,0 ± 0,10 | 15,4 ± 0,70 | I                         | I     | I     |
| Цефтазидим (CAZ)   | 30                                  | 18,5 ± 0,40                             | 18,2 ± 0,20 | 18,4 ± 0,30 | S                         | S     | S     |
| Цефазолин (CZ)     | 30                                  | 21,0 ± 0,60                             | 20,8 ± 0,10 | 19,6 ± 0,20 | S                         | S     | S     |
| Цефтриаксон (CRK)  | 75                                  | 30,7 ± 0,20                             | 30,3 ± 0,30 | 30,4 ± 0,30 | S                         | S     | S     |
| Цефиксим (CM)      | 5                                   | 16,3 ± 0,70                             | 0           | 0           | I                         | R     | R     |
| Эритромицин (ERY)  | 15                                  | 19,4 ± 0,50                             | 19,2 ± 0,30 | 12,3 ± 0,40 | I                         | I     | R     |

$p \leq 0,05$

\* – чувствительные (S), умеренно чувствительные (I) и устойчивые (R) к антибиотикам штаммы.

**ВЫВОДЫ**

1. Для штаммов *Klebsiella pneumoniae*, выделенных от больных людей в период с 2002 по 2004 гг. в бактериологической лаборатории санитарно-эпидемиологической станции г. Феодосия АР Крым, характерны типичные для данного вида бактерий морфолого-культуральные и физиолого-биохимические признаки.

2. Исследуемые штаммы *Klebsiella pneumoniae* относятся к активно ферментирующим бактериям, у которых сахаролитические свойства преобладают над протеолитической активностью.

3. Штаммы *K. pneumoniae*, выделенные в г. Феодосия в 2004 г., проявляют высокую степень чувствительности к  $\beta$ -лактамам антибиотикам цефалоспоринового ряда II-III поколений: цефатоксиму, цефтазидиму, цефазолину и цефтриаксону. К таким препаратам, как ампициллин, гентамицин, доксициклин, левомицетин, линкомицин, оксациллин, олеандомицин, пенициллин, стрептомицин, цефиксим и эритромицин в период с 2002 по 2004 гг. у клебсиелл выработалась стойкая множественная лекарственная устойчивость.

4. К амикацину, канамицину, офлоксацину и рифампицину у *K. pneumoniae* проявляется тенденция выработки устойчивости.

5. Полученные данные указывают на необходимость систематического определения чувствительности *Klebsiella pneumoniae* к антибиотикам, т. к. широко и длительно применяемые лекарственные препараты способствуют возникновению устойчивых к ним штаммов микроорганизмов.

**Список литературы**

1. Киселева Б.С., Голубева И.В. Роль *Klebsiella pneumoniae* в этиологии заболеваний, протекающих с разной клинической симптоматикой // Материалы 4-ого Республиканского съезда эпидемиологов, микробиологов, инфекционистов и гигиенистов Эстонской ССР. – Таллин, 1982. – С. 22-24.
2. Журавлев П.В. Динамика выживаемости *Klebsiella pneumoniae* и *P. aeruginosa* в водной среде в экспериментальных условиях // Гигиена и санитария. – 1991. – №7. – С. 27-28.
3. Энтеробактерии. Классификация и номенклатура. Приложение к главе I / Под ред. Покровского В.И. – М.: Медицина, 1985. – С. 5-16, 305-309.
4. Гивенталь Н.И., Соболев Е.Р., Ведьмина Е.А. Определение чувствительности микроорганизмов к антибиотикам методом диффузии в агар // Лабораторное дело. – 1982. – № 1. – С. 44-48.
5. Мирошниченко И.В., Киселева Б.С., Машилова Г.М. и др. Выбор питательной среды для культивирования *Klebsiella pneumoniae* // Сб. трудов: Разработка и стандартизация бактериологических питательных сред. – М., 1980. – С. 150-154.
6. Цинзерлинг В.А., Бойков С.Г., Леёман Е.Е. и др. Клебсиеллезные пневмонии в настоящее время // Арх. пат. – 1991. – Т. 53, № 9. – С. 22-27.
7. Поздеев О.К. Медицинская микробиология / Под ред. Покровского В.И. – М.: ГЭОТАР-МЕД, 2002. – 765 с.
8. Слешцов В.П., Бондаренко И.В. Антимикробные препараты в клинической медицине. Практическое руководство. – Симферополь: КГМУ, 2002. – 224 с.

Поступила в редакцию 20.02.2006 г.