

Д. Л. Кирик¹, Г. В. Філоненко², Н. О. Коваленко²,
О. С. Талалаєв², І. М. Скороход²

¹ Кафедра мікробіології і епідеміології НМАПО імені П. Л. Шупика,
вул. Дорогожицька, 9, Київ, 04112, Україна,
тел.: +38(044)205 49 74, e-mail: kyryk@ukr.net

² ДУ «Науково-практичний медичний центр дитячої кардіології та кардіохірургії
МОЗ України» вул. Мельникова, 24, Київ, 04050,
Україна, тел.: +38(044)284 50 03, e-mail: baklabccc@ukr.net

АНТИБІОТИКОРЕЗИСТЕНТНІСТЬ ТА БІОПЛІВ- КОУТВОРЮВАЛЬНІ ВЛАСТИВОСТІ ШТАМІВ *KLEBSIELLA PNEUMONIAE*, ЩО ВИДІЛЕНІ У ДІТЕЙ З ВРОДЖЕНИМИ ВАДАМИ СЕРЦЯ

Klebsiella pneumoniae – один з основних збудників, який викликає від 2 до 20% всіх інфекційних ускладнень у стаціонарних відділеннях лікарень. На сьогодні зареєстровані штами *K. pneumoniae*, резистентні до карбапенемів. До механізмів, які зумовлюють резистентність до карбапенемів, віднесені як продукція бета-лактамаз різних молекулярних класів, так і комбінація БЛРС (бета-лактамаз розширеного спектру дії) зі зниженою пенетрацією клітинної мембрани. **Мета.** Визначити механізми резистентності та біоплівкоутворювальні властивості штамів *K. pneumoniae*, виділених у дітей з вродженими вадами серця (ВВС) на етапі госпіталізації у кардіохірургічний центр. **Методи.** Для ідентифікації і визначення чутливості до антибіотиків досліджуваних штамів *K. pneumoniae*, використовувався бактеріологічний аналізатор VITEC 2 COMPACT (bioMérieux). Визначення біоплівкоутворювальних властивостей здійснювали методом культуральних планшетів за методикою D. Christensen. Генотипування БЛРС – позитивних ізолятів проводили за допомогою мультиплексної ПЛР. Для фенотипового виявлення карбапенемаз класу А використовували Modified Hodge Test (МНТ), для виявлення продукції карбапенемаз класу В (МВЛ) – метод «подвійних дисків» з (ЕДТА). **Результати.** Встановлено наявність БЛРС у 37 (46,8%) досліджуваних штамів *K. pneumoniae*. Показано, що носіями генів bla_{TEM} були 29 (79,3%) штамів, ген bla_{SHV} зустрічався у 21 (56,5%), а ген bla_{CTX-M} – у 18 (47,8%) досліджуваних штамів. Найбільш поширеною комбінацією детермінант резистентності стало співвідношення гену bla_{TEM} з одним геном БЛРС bla_{SHV} у 18 (48,8%) та з двома генами БЛРС bla_{CTX-M} та bla_{SHV} , що виявлено у 6 (16,2%) досліджуваних ізолятів. Здатність формувати біоплівку виявлена у 47 (59,5%) штамів *K. pneumoniae*. **Висновки.** Досліджувані штами, здатні до утворення біоплівки, проявляли більш високий рівень резистентності до всіх тестованих антибіотиків, крім колістину.

Ключові слова: *Klebsiella pneumoniae*, механізми резистентності, вроджені вади серця, біоплівка.



Klebsiella pneumoniae – один з основних збудників, який викликає від 2 до 20% всіх інфекційних ускладнень при перебуванні пацієнтів у стаціонарних відділеннях лікарень [2]. За даними ВООЗ *K. pneumoniae* посідає третє місце по частоті інфікування пацієнтів [11]. Для ефективної антибіотикопрофілактики необхідно враховувати рівні природної резистентності та постійний ріст набутої резистентності умовно-патогенних мікроорганізмів (УПМ), особливо родини *Enterobacteriaceae*, що продукують бета-лактамази розширеного спектру – БЛРС (ESBL – *extended spectrum beta-lactamases*) [5, 6, 7]. Найбільшою активністю до дії БЛРС наділені карбапенеми, насамперед іміпенем та меропенем. На сьогодні зареєстровані штами *K. pneumoniae*, резистентні до карбапенемів [3, 9]. До механізмів, які зумовлюють резистентність до карбапенемів, віднесені як продукція бета-лактамаз різних молекулярних класів, так і комбінація БЛРС зі зниженою пенетрацією клітинної мембрани [7, 9].

Мета дослідження: виявлення механізмів резистентності та біоплівкоутворювальних властивостей штамів *K. pneumoniae*, виділених у дітей з вродженими вадами серця (ВВС) на етапі госпіталізації у кардіохірургічний центр.

Матеріали та методи

В дослідження включені пацієнти, які були колонізовані або мали інфекцію верхніх дихальних шляхів, зумовлену *K. pneumoniae*. Всього було вивчено 79 штамів, виділених у 79 пацієнтів. В аналіз включені штами *K. pneumoniae*, виділені із дихальних шляхів у дітей на етапі госпіталізації до кардіохірургічного стаціонару за період з січня по грудень 2016 року. Штами *K. pneumoniae*, що мали однакові спектри резистентності та були повторно виділені у одного пацієнта, з аналізу виключалися.

Більшість дітей були прооперовані у зв'язку із складними поєднаними пороками серця: серед них у 32 (40,5%) пацієнтів – дефект міжшлуночкової перетинки (VSD), у 10 (12,7%) – коакртація аорти (CoAo), у 6 (7,6%) – відкрита аортальна протока (PDA), транспозиція магістральних судин (TGA), тетрада Фалло (TOF) відповідно, 4 (5,1%) – порушення ритму серця, стеноз легеневої артерії (SP) відповідно, по 3 (3,8%) – аортальний стеноз (AoSt), тотальний аномальний дренаж легеневої вени (TAPVC), антріовентрикулярна комунікація (AVSD) відповідно та по 1 (1,3%) – вторинний дефект міжшлуночкової перетинки (ASD), корегована повна атріовентрикулярна комунікація (CAVSD).

Середній вік пацієнтів склав $77,5 \pm 4,4$ днів (від 1 доби до 11 міс.), середня вага – $4,1 \pm 1,6$ кг (від 1,5 кг до 10,0 кг). Розподіл за статтю: 43 (56,4%) пацієнти – чоловічої статі, 36 (45,6%) – жіночої. Середня тривалість перебування в стаціонарі – $20,1 \pm 14,4$ ліжок/днів (від 2 до 82 л/д).

Дослідження біологічного матеріалу та інтерпретацію отриманих результатів проводили згідно з Наказом МОЗ СРСР № 535 від 22.04.85 р. Ідентифікацію виділених мікроорганізмів проводили загальноприйнятими бактеріологічними методами, дотримуючись класифікації Бергі (1997). Для ідентифікації і визначення чутливості до антибіотиків досліджуваних штамів *K. pneumoniae*, використовувався бактеріологічний аналізатор VITEC 2 COMPACT (bioMerieux).

Визначення біоплівкоутворювальних властивостей виділених мікро-



організмів здійснювали методом культуральних планшетів за методикою *D. Christensen* [12]. Оптичну щільність сформованої біоплівки оцінювали за інтенсивністю забарвлення спирту на фотометрі (Multiskan Ascent V1. 24), за довжини хвилі 620 нм. Для нівелювання похибки, пов'язаної з оптичною щільністю (ОЩ) компонентів живильного середовища, адсорбованих на планшеті, значення ОЩ контрольної лунки (стерильне живильне середовище) віднімали від результатів, отриманих для досліджених проб. Кожен дослід повторювали три рази в паралельних дослідженнях двох експериментів.

Для фенотипового виявлення продукції БЛРС використовували два методи. Перший полягав у виявленні синергізму між дисками цефотаксиму (30 мкг), цефтазидиму (30 мкг) і диском, що містить комбінацію амоксицилін/клавуланова кислота (20/10 мкг). Другий метод – у збільшенні зони затримки росту навколо дисків, цефотаксим + клавуланат (30/10 мкг) та цефтазидим + клавуланат (30/10 мкг), у порівнянні з цефотаксимом (30 мкг) і цефтазидимом (30 мкг) на ≥ 5 мм [10].

Для фенотипового виявлення карбапенемаз використовували диски з меропенемом, іміпенемом та ертапенемом. Для виявлення карбапенемаз класу А використовували *Modified Hodge Test* (МНТ), для виявлення продукції карбапенемаз класу В (MBL) – метод «подвійних дисків» з етилендіамінтетраоцтовою кислотою (ЕДТА). Контроль визначення чутливості проводили відповідно до рекомендацій CLSI з використанням референтних штамів Американської колекції типових культур *E. coli* ATCC 25922 і *K. pneumoniae* ATCC 700603 [10].

Для молекулярно-генетичного дослідження генетичних детермінант резистентності використовували метод мультиплексної ПЛР (полімеразно-ланцюгової реакції). Виділення ДНК з бактеріальних культур проводили за допомогою комерційного набору реактивів QIAGEN DNeasy Blood and Tissue Kit (Catalog# 69504) та NucleoSpin® Blood QuickPure kit (Macherey Nagel, Німеччина). Якісна оцінка ДНК виконана за допомогою електрофорезу в 1% агарозному гелі з 0,5% ТВЕ (трис-боратний електродний буфер).

Генотипування БЛРС-позитивних ізолятів здійснювали за допомогою послідовностей пар праймерів і методики мультиплексної ПЛР, з деякими змінами, описаними у посиланні [5, 6].

Реакційні суміші містили 1×ПЛР-буфер, 200 мкМ dNTP, 0,5 одиниці Taq полімерази (Roche, Німеччина), 10 пмоль/мкл кожного ген-специфічного праймеру. Умови ПЛР ампліфікації були наступними: початкова денатурація при 95 °С протягом 15 хв; 30 циклів денатурації при 94 °С протягом 30 с, відпал при 60° С протягом 30 с, елонгація при 72 °С протягом 2хв. з подальшою кінцевою стадією елонгації при 72 °С протягом 10 хв. ПЛР-амплікони були розділені методом електрофорезу в 2% (w/w) агарозному гелі, що містив 0,5 мкг/мл етидіум броміду (Sigma Aldrich, USA) і 0,5% буфер ТВЕ. Візуалізацію результатів проводили з системою "DOC-Print VX2" (Vilber Lourmat).

Статистичне опрацювання даних проводили за допомогою програм WHONET 5,6 та STATISTICA 6,0. Статистичну значимість різниць показників тестували за допомогою критерія Фішера. Відмінності вважали статистично значущі при $p > 0,05$.



Результати дослідження та їх обговорення

У роботі досліджено 79 штамів *K. pneumoniae*, виділених від дітей з вродженими вадами серця. Аналіз даних чутливості показав, що резистентність до окремих груп β-лактамних антибіотиків відрізнялася. Із тестованих антибіотиків найменшу активність відносно штамів *K. pneumoniae* виявив ампіцилін, до якого нечутливими були 73 (92,5%) досліджуваних штами. Резистентність до цефалоспоринов І покоління (цефазолін) мали 61 штама (77,8%), цефалоспоринов ІІ покоління (цефуруксим) – 40 (50,8%), цефалоспоринов ІІІ покоління (цефтріаксон) – 41 (51,9%). Тоді як до цефалоспоринов ІV покоління (цефепім) резистентність мали 36 (45,7%) штамів. Карбапенеми серед β-лактамних антибіотиків відносно *K. pneumoniae* мали найбільшу активність. До іміпенему, меропенему та ертапенему нечутливими були 8 (9,9%) штамів. Препаратами, альтернативними бета-лактамам, є аміноглікозиди і фторхінолони, їх активність щодо *K. pneumoniae* також була різною. Аміноглікозиди відносно *K. pneumoniae* мали не високу активність. Нечутливими до нетилміцину виявлено у 16 (19,8%) клінічних штамів, амікацину – 15 (18,5%) та тобраміцину – 14 (17,7%) відповідно. Резистентність *K. pneumoniae* до фторхінолонів становила зокрема до офлоксацину – 10 (12,3%), левофлоксацину та ципрофлоксацину по 11 (13,6%) штамів відповідно (рис. 1).

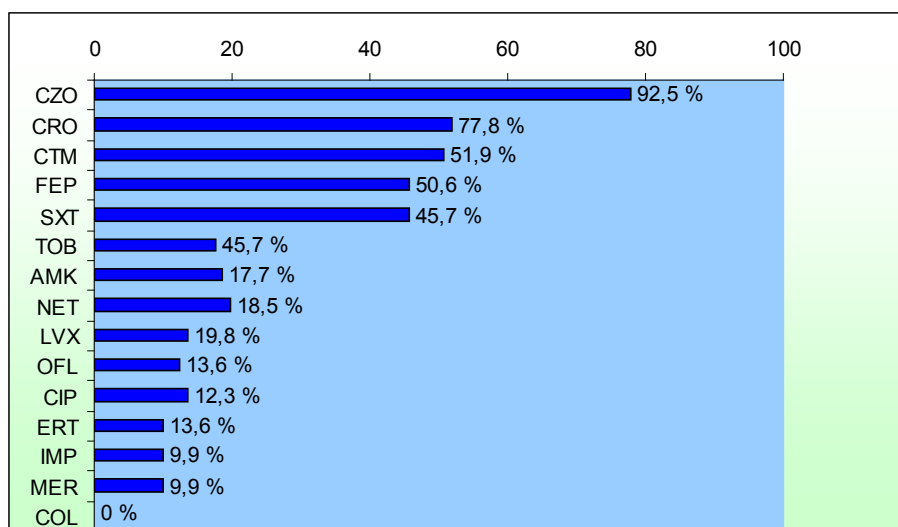


Рис. 1. Антибіотикорезистентність клінічних штамів *K. pneumoniae* (n=79)

Примітка: – AMP – ампіцилін, CZO – цефазолін, CRO – цефтріаксон, CTM-цефуруксим, FEP – цефепім, SXT – триметоприм-сульфаметаксазол, TOB – тобраміцин, AMK – амікацин, NET – нетилміцин, LVX – левофлоксацин, OFX – офлоксацин, CIP – ципрофлоксацин, ERT – ертапенем, IMP – іміпенем, MER – меропенем, COL – колістин.

Fig. 1. Antibiotic resistance of clinical strains *K. pneumoniae* (n=79)

Note: AMP – ampicillin, CZO – cefazoline, CRO – ceftriaxone, CTM- cefuroxime, FEP - cefepime, SXT – trimethoprim sulfamethoxazole, TOB – tobramycin, AMK – amikacin, NET – netilmicin, LVX – levofloxacin, OFX – ofloxacin, CIP – ciprofloxacin, ERT – ertapenem, IMP – imipenem, MER- meropenem, COL – colistin.



Слід зазначити, що поряд з резистентними штамми у пацієнтів виділялися штамми, чутливі до всіх тестованих антибіотиків: такі мікроорганізми виявлені у 6 пацієнтів, що склало 7,5%.

Вважається, що основу лікування інфекцій, викликаних представниками родини *Enterobacteriaceae*, складають бета-лактамі антибіотики, проте в стаціонарах різного профілю все частіше реєструються резистентні до них штамми. У нашому дослідженні серед виділених штамів *K. pneumoniae* лише незначна частина була чутлива до цефалоспоринів I–IV покоління – від 6,2 до 53,1%.

Фенотиповий тест на наявність БЛРС за допомогою методу подвійних дисків дав позитивний результат у 39 з 79 (49,3%) досліджуваних штамів *K. pneumoniae*. Для встановлення молекулярно-генетичної природи дані штамми були протестовані на наявність генів β -лактамаз TEM (походить від імені першого пацієнта Temoneira), SHV (сульфгідрильний реагент) та CTX-M (активний до цефтазидиму, вперше виділений в Мюнхені) методом мультиплексової ПЛР (рис. 2).

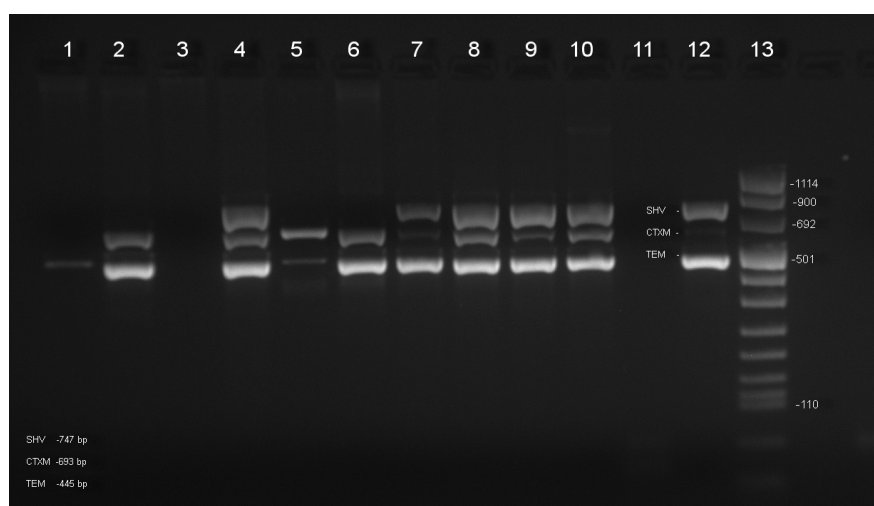


Рис. 2. Електрофореграма продуктів ампліфікації мультиплексової ПЛР ділянок генів резистентності штамів *K. pneumoniae*

Примітка: 1, 2, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 – *Klebsiella pneumoniae*; 11 – бланк; 12 – контрольний штам *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603, 13 – молекулярний маркер.

Fig. 2. Electrophoregram analysis of multiplex PCR amplified products locus of resistance genera of strains *K. pneumoniae*

Note: 1, 2, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 – *Klebsiella pneumoniae*; 11 – blank; 12 – control strain *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603, 13 – Molecular Weight Marker.

Так, носіями генів bla_{TEM} були 29 (79,3%) штамів, ген bla_{SHV} зустрічався у 21 (56,5%), а ген bla_{CTX-M} – у 18 (47,8%) досліджуваних штамів. Найбільш поширеною комбінацією детермінант резистентності стало співвідношення гену bla_{TEM} з одним геном БЛРС bla_{SHV} у 18 (48,8%) та з двома генами БЛРС bla_{CTX-M} та bla_{SHV} , що виявлено у 6 (16,2%) досліджуваних ізолятів (рис 3).

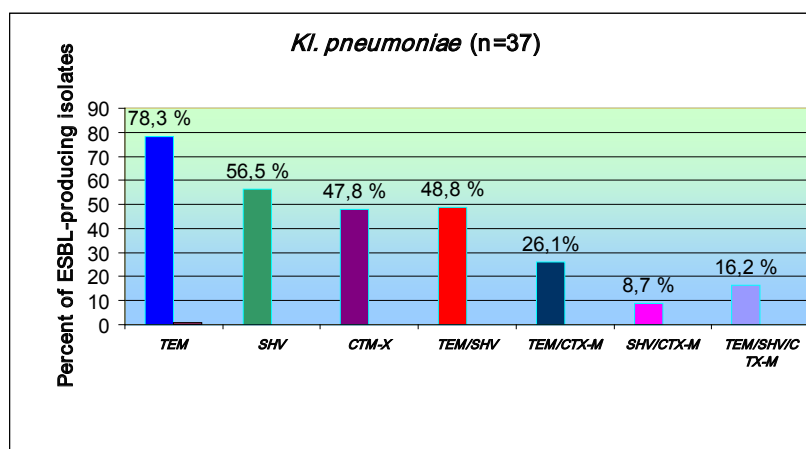


Рис. 3. Ідентифікація генів БЛРС у клінічних штамів *K. pneumoniae*
Примітка: TEM, SHV, CTX-M, TEM/SNV, TEM/CTX-M, TEM/SHV/CTX-M – гени β-лактамаз.

Fig. 3. Identification of ESBL genera in clinical strains *K. pneumoniae*
Note: TEM, SHV, CTX-M, TEM/SNV, TEM/CTX-M, TEM/SHV/CTX-M – genes of beta-lactamases.

Вивченням поширення бета-лактамаз, у тому числі БЛРС, активно займаються в багатьох країнах світу. Постійно зростає кількість публікацій, в яких наводяться дані щодо поширеності БЛРС в окремих лікувальних установах, регіонах та країнах. Дані, отримані в Європі, Північній і Південній Америці, Канаді, країнах Азіатського регіону, на Близькому Сході, свідчать про зростання стійкості збудників нозокоміальних, тобто внутрішньолікарняних, і позалікарняних інфекцій до бета-лактамних антибіотиків і значну поширеність саме БЛРС, що є серйозною проблемою для охорони здоров'я [5, 6, 7].

У нашому дослідженні у 8 (10,0%) штамів *K. pneumoniae* виявлено резистентність до карбапенемів. Всі карбапенемрезистентні штами *K. pneumoniae* були нечутливі до фторхінолонів. Чутливість до амікацину та триметоприм/сульфаметаксазолу спостерігали у 3 штамів. В нашому дослідженні колістин-резистентних карбапенемстійких ізолятів *K. pneumoniae* не було виявлено. Однак у 2009 році в Америці було зареєстровано 5 випадків виявлення таких штамів, трохи раніше в Греції також були виявлені подібні штами *K. pneumoniae*.

Таким чином, дані препарати були наділені найбільшою активністю до карбапенемрезистентних *K. pneumoniae* та можуть бути препаратами вибору для емпіричної терапії тяжких інфекцій, викликаних даним збудником.

Розподіл виділених штамів *K. pneumoniae* по регіонах був таким: 14 (17,7%) штамів з Київської області, 8 (10,1%) – Чернігівської області, по 6 (7,6%) – Вінницької, Житомирської, Миколаївської областей відповідно, по 5 (6,3%) – у Херсонській та виділених від іноземців, що знаходилися на лікуванні в кардіохірургічному центрі відповідно, 4 (5,1%) – Львівської, по 3 (3,8%) – Волинської, Запорізької, Івано-Франківської, Полтавської та Тернопільської



областей відповідно, по 2 (2,5%) – Дніпровської, Харківської та Кропивницької областей відповідно, по 1 (1,3%) – Рівненської, Сумської та Хмельницької областей відповідно.

Одним з активно досліджуваних факторів патогенності мікроорганізмів є їх здатність утворювати біоплівки. Біоплівка є структурно-функціональною «співдружністю» мікроорганізмів, які знаходяться в матриксі, що складається з екстрацелюлярного полімеру (глікокаліксу) та продуктів метаболізму мікроорганізмів. У складі біоплівки мікроорганізми захищені від пошкодження чинниками імунного захисту, антибіотиками та антисептиками. При цьому виживають субпопуляції мікроорганізмів із найбільш резистентним фенотипом, що формується в результаті тривалого впливу чинників. Більшість мікроорганізмів, що входять до складу біоплівки, мають знижений метаболізм і перебувають в стані спокою (не діляться), завдяки чому, незважаючи на вільне проникнення низки антимікробних препаратів у матрикс, різко підвищується стійкість мікроорганізмів до цих препаратів. За не зовсім зрозумілих на сьогоднішній день причин в окремих ділянках біоплівки періодично виникають вогнища проліферації з викидом у кровоток планктонних форм мікроорганізмів. Клінічна картина захворювання (від незначного періодичного субфебрилітету до сепсису) багато в чому визначається інтенсивністю утворення планктонних форм мікроорганізмів [1, 2].

Формування біоплівки в організмі хворого або на медичній діагностичній апаратурі часто спричинене збудниками внутрішньолікарняних інфекцій, у тому числі і мікроорганізмами роду *K. pneumoniae*. Саме формування біоплівки зумовлює виникнення проблем у лікуванні хронічних інфекційних хвороб, особливо при тривалому використанні апаратури (ендоскопів, катетерів, протезів тощо). Мікроорганізми в біоплівці захищені від дії хімічних агентів, антибіотиків і виявляють більшу стійкість до цих агентів. Ступінь стійкості мікроорганізмів до антибіотиків у біоплівках у 100–1000 разів вищий від планктонних форм. Для того, щоб створити у глибинних шарах біоплівки ефективну концентрацію антибіотика, потрібна в десятки і сотні разів вища доза [1, 2].

За даними фотометричного аналізу здатність формувати біоплівку на поверхні 96-лункового планшету у нашому дослідженні виявлена у 47 (59,5%) штамів *K. pneumoniae*, що колонізували верхні дихальні шляхи у дітей з вродженими вадами серця.

На відміну від нозокоміальних інфекцій, які, як правило, спричиняються мікроорганізмами з досить добре передбачуваним профілем резистентності до антимікробних препаратів, госпітальні інфекції в більшості випадків зумовлені полірезистентною мікробіотою, що створює серйозні проблеми при призначенні адекватної терапії. Головною причиною формування госпітальних штамів мікроорганізмів є широке і не завжди раціональне застосування антибіотиків, а поширення і персистенція даних штамів відбуваються внаслідок недостатньо ефективних заходів інфекційного контролю. При цьому пацієнт, потрапляючи в стаціонар, піддається різним медичним процедурам, і при цьому неминуче колонізується госпітальними мікроорганізмами, які за несприятливого збігу обставин спричиняють розвиток інфекційних усклад-



нень [2]. У низці випадків хворі на етапі госпіталізації вже є носіями резистентної мікрофлори, що пов'язано з перебуванням в інших стаціонарах, недавнім прийомом антибіотиків і ін.

Таким чином, у ході дослідження з верхніх дихальних шляхів у дітей з складними ВВС на етапі госпіталізації з різних регіонів виділено 79 штамів *K. pneumoniae*. Переважна більшість штамів виділена від пацієнтів з Києва та Київської області. У досліджуваних штамів найбільший рівень резистентності спостерігався до цефалоспоринові I–IV поколінь. У 37 штамів *K. pneumoniae* виявлена здатність до синтезу β-лактамаз. Показано, що носіями генів bla_{TEM} були 29 штамів. У 8 штамів виявлено резистентність до карбапенемів. Більше половини виділених штамів були здатні до утворення біоплівки та проявляли більш високий рівень резистентності до всіх тестованих антибіотиків, крім колістину.

Д. Л. Кирик¹, Г. В. Філоненко², Н. О. Коваленко²,
А. С. Талалаєв², І. Н. Скороход²

¹ Кафедра мікробіології та епідеміології НМАПО імені
П. Л. Шупика, ул. Дорогожицька, 9, Київ, 04112, Україна,
тел.: +38(044) 205 49 74, e-mail: kyryk@ukr.net

² ГУ «Научно-практический медицинский центр детской кардиологии
и кардиохирургии МОЗ Украины» ул. Мельникова, 24, Київ, 04050, Україна,
тел.: +38(044) 284 50 03, e-mail: baklabccc@ukr.net

АНТИБИОТИКОРЕЗИСТЕНТНОСТЬ И БИО- ПЛЁНКООБРАЗУЮЩИЕ СВОЙСТВА ШТАММОВ *KLEBSIELLA PNEUMONIAE*, ВЫДЕЛЕННЫЕ У ДЕТЕЙ С ВРОЖДЁННЫМИ ПОРОКАМИ СЕРДЦА

Реферат

Klebsiella pneumoniae – один из основных возбудителей, который вызывает от 2 до 20% всех инфекционных осложнений в стационарах. На сегодняшний день зарегистрированы штаммы *K. pneumoniae*, резистентные к карбапенемам. К механизмам, которые обуславливают резистентность к карбапенемам, отнесены как продукция бета-лактамаз различных молекулярных классов, так и комбинация БЛРС (бета-лактамаз расширенного спектра действия) со сниженной пенетрацией клеточной стенки. **Цель.** Изучить механизмы резистентности и биопленкообразующие свойства штаммов *K. pneumoniae*, выделенные у детей с врождёнными пороками сердца (ВПС) на этапе госпитализации в кардиохирургический центр. **Методы.** Для идентификации и определения чувствительности к антибиотикам исследуемых штаммов *K. pneumoniae*, использовался бактериологический анализатор VITEC 2 COMPACT (bioMérieux). Определение биопленкообразующих свойств осуществляли методом культуральных планшетов по методике D. Christensen. Генотипирование БЛРС – положительных изолятов проводили с помощью мультиплексной ПЦР. Для фенотипического выявления карбапенемаз класса А использовали Modified Hodge Test (МНТ), для выявления продукции карбапенемаз класса В (МВЛ) – метод «двойных дисков» с (ЭДТА). **Результаты.** Установлено наличие БЛРС у 37 (46,8%) исследованных штаммов *K. pneumoniae*. Показано, что носителями генів bla_{TEM} были



29 (79,3%) штаммов, ген bla_{SHV} зустрічався у 21 (56,5%), а ген bla_{CTX-M} – у 18 (47,8%) досліджуваних штаммов. Самой розповсюдженією комбінацією детермінант резистентності стало співвідношення гена bla_{TEM} з одним геном БЛРС bla_{SHV} у 18 (48,8%) і з двома генами БЛРС bla_{CTX-M} і bla_{SHV} у 6 (16,2%) досліджуваних ізолятів. Здатність утворювати біоплівку виявлена у 47 (59,5%) штаммов *K. pneumoniae*. **Висновки.** Досліджені штамми, здатні до утворення біоплівки проявляли вищий рівень резистентності до всіх тестованих антибіотиків, крім колістину. **Ключові слова:** *Klebsiella pneumoniae*, механізми резистентності вроджені пороки серця, біоплівка

**D. Kyryk¹, G. Filonenko², N. Kovalenko¹,
O. Talalaiev², I. Skorohod²**

¹ Shupyk National Medical Academy of Postgraduate Education of Ukraine, 9, Dorogozhytskaya str., Kyiv, 04112, Ukraine, tel.: +38(044)205 49 74, e-mail: kyryk@ukr.net

² Ukrainian Children's Cardiac Center of Ukraine, 24, Melnykova str., Kyiv, 04050, Ukraine, tel.: +38(044)284 50 03, e-mail: baklabccc@ukr.net

ANTIBIOTIC RESISTANCE AND BIOFILM FORMATION CHARACTERISTICS OF THE STRAINS *KLEBSIELLA PNEUMONIAE* ISOLATED IN CHILDREN WITH CONGENITAL HEART DISEASE

Summary

Klebsiella pneumoniae is one of the main pathogens that causes from 2 to 20% of all infectious complications. Nowadays, the strains of *K. pneumoniae* resistant to carbapenems have been registered. The mechanisms that cause resistance to carbapenems are classified as production of different molecular classes beta-lactamases, as well as a combination of ESBL (extended spectrum beta-lactamases) with reduced penetration of the cell wall. **Aim.** To study the mechanisms of resistance and properties of *K. pneumoniae* biofilm-forming strains isolated in children with congenital heart disease (CHD) at the stage of hospitalization at the cardiosurgical center. **Methods.** The bacteriological analyzer VITEC 2 COMPACT (bioMerieux) was used to identify and detect antibiotic susceptibility to the investigated strains of *K. pneumoniae*. The determination of biofilm formation characteristics was carried out using culture plates using the D. Christensen method. The genotyping of the ESBL-positive isolates was performed using multiplex PCR. For phenotypic detection of class A carbapenemases, the Modified Hodge Test (MHT) was used to detect Class B carbapenemase products (MBL) – the "double disc" method with (EDTA). **Results.** Presence of ESBL was found in 37 (46.8%) of the investigated strains *K. pneumoniae*. The bla_{TEM} gene was found in 29 (79.3%), the bla_{SHV} gene in 21 (56.5%), and the bla_{CTX-M} gene in 18 (47.8%) studied strains. The most common combination of the resistance determinants was the ratio of the bla_{TEM} gene to one bla_{SHV} gene, in 18 (48.8%) and with two bla_{CTX-M} gene and bla_{SHV} in 6 (16.2%) of the studied isolates. The ability to form biofilms was found in 47 (59.5%) strains of *K. pneumoniae*. **Conclusions.** The studied strains capable of forming biofilms showed a higher level of resistance to all antibiotic testing, except for colistin. **Key words:** *Klebsiella pneumoniae*, resistance mechanisms, congenital heart diseases, biofilm.



СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Hoiby N., Bjarsholt T., Givskov M., Molin S., Ciofu O. Antibiotic resistance of bacterial biofilms// Int. J. Antimicrob. Agents. – 2010. – V. 35. – P. 322–332.
2. Rogers M.A., Blumberg N., Saint S., Langa K. M., Nallamothu B. K. Hospital variation in transfusion and infection after cardiac surgery: a cohort study// BMC Medicine. – 2009. – V.7. – №37. – doi:10.1186/1741-7015-7-37-
3. Braykov N. P., Eber M. R., Klein E. Y., Morgan D. J., Laxmirarayan R. Trends in resistance to carbapenems and third-generation cephalosporins among clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* in the United States, 1999–2010// Infect Control Hosp Epidemiol. – 2013. – V. 34. – P. 259–268.
4. Zhang J., Yuan Y., Li P., Wang T., Gao J., Yao J et al. Postoperative nosocomial infections among children with congenital heart disease// Pak. J. Med. Sci. – 2014. – V. 30. – №3. – P. 554–557.
5. Monstein H. J., Ostholm-Balkhed A., Nilsson M. V. et al. Multiplex PCR amplification assay for the detection of bla_{SHV}, bla_{TEM} and bla_{CTX-M} genes in *Enterobacteriaceae* // APMIS. – 2007. – V. 115. – № 12. – P. 1400–1408.
6. D. Ojdana, P. Sacha, P. Wiczorek et al. The Occurrence of bla_{CTX-M}, bla_{SHV} and bla_{TEM} genes in extended-spectrum β-lactamase-positive strains of *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, and *Proteus mirabilis* in Poland // Internat. J. of Antibiotics. – 2014. – <http://dx.doi.org/10.1155/2014/935842>.
7. A. M. Al-Jassera. Extended-spectrum beta-lactamases (ESBLs): a global problem // Kuwait Medical Journal. – 2006. – V. 38. – № 3. – P. 171–185.
8. Bandeira M., Almeida Carvalho P., Duarte A., Jordao L. Exploring Dangerous Connections between *Klebsiella pneumoniae* Biofilms and Healthcare-Associated Infections // Pathogens. – 2014. – V. 3. – № 3. – P. 720–731.
9. Pollett S., Miller S., Hindler J. Phenotypic and Molecular Characteristics of Carbapenem-Resistant *Enterobacteriaceae* in a Health Care System in Los Angeles, California, from 2011 to 2013 // Journal of Clinical Microbiology. – 2014. – V.52. – № 11. – P. 4003–4009.
10. «EUCAST guidelines for detection of resistance mechanisms and specific resistances of Clinical and/or epidemiological importance» www.eucast.org/documents/consultations/#c18518/.
11. «Global priority list of antibiotic-resistant bacteria to guide research, discovery, and development of new antibiotics» www.who.int/medicines/publications/global-priority-list-antibiotic-resistant-bacteria/en.
12. Christensen G.D., W.A. Simpson, J.J. Younger et al. Adherence of coagulase-negative staphylococci to plastic tissue culture plates: a quantitative model for the adherence of staphylococci to medical devices // J. Clin. Microbiol. – 1985. – V. 22. – № 6. – P. 996–1006.

References

1. Hoiby N, Bjarsholt T, Givskov M, Molin S, Ciofu O. Antibiotic resistance of bacterial biofilms. Int J Antimicrob Agents. 2010; 35: 322–232.
2. Rogers MA, Blumberg N, Saint S, Langa KM, Nallamothu BK. Hospital variation in transfusion and infection after cardiac surgery: a cohort study. BMC Medicine. 2009; 7: 37: doi:10.1186/1741-7015-7-37



3. Braykov NP, Eber MR, Klein EY, Morgan DJ, Laxmirarayan R. Trends in resistance to carbapenems and third-generation cephalosporins among clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* in the United States, 1999–2010, Infect Control Hosp Epidemiol. 2013; 34: 259-268.
4. Zhang J, Yuan Y, Li P, Wang T, Gao J, Yao J, et al. Postoperative nosocomial infections among children with congenital heart disease. Pak J Med Sci. 2014; 30(3): 554-557.
5. Monstein HJ, Ostholm-Balkhed A, Nilsson MV, et al. Multiplex PCR amplification assay for the detection of bla_{SHV}, bla_{TEM} and bla_{CTX-M} genes in *Enterobacteriaceae*. APMIS. 2007; 115(12): 1400-1408.
6. D Ojdana, P Sacha, P Wiczorek, et al. The Occurrence of bla_{CTX-M}, bla_{SHV} and bla_{TEM} genes in extended-spectrum β-lactamase-positive strains of *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, and *Proteus mirabilis* in Poland. Internat. J. of Antibiotics 2014. <http://dx.doi.org/10.1155/2014/935842>
7. AM Al-Jassera. Extended-spectrum beta-lactamases (ESBLs): a global problem. Kuwait Medical Journal. 2006; 38 (3): 171-185.
8. Bandeira M, Almeida Carvalho P, Duarte A, Jordao L. Exploring Dangerous Connections between *Klebsiella pneumoniae* Biofilms and Healthcare-Associated Infections. Pathogens. 2014; 3(3):720-731.
9. Pollett S, Miller S, Hindler J. Phenotypic and Molecular Characteristics of Carbapenem-Resistant *Enterobacteriaceae* in a Health Care System in Los Angeles, California, from 2011 to 2013. Journal of Clinical Microbiology. 2014; 52(11): 4003– 4009.
10. «EUCAST guidelines for detection of resistance mechanisms and specific resistances of Clinical and/or epidemiological importance» www.eucast.org/documents/consultations/#c18518/.
11. «Global priority list of antibiotic-resistant bacteria to guide research, discovery, and development of new antibiotics» www.who.int/medicines/publications/global-priority-list-antibiotic-resistant-bacteria/en.
12. Christensen GD, Simpson WA, Younger JJ, et al. Adherence of coagulase-negative staphylococci to plastic tissue culture plates: a quantitative model for the adherence of staphylococci to medical devices. J. clin. microbiol. 1985; 22(6): 996-1006.

Стаття надійшла до редакції 17.11.2017 р.

