УДК 577.2

МОЛЕКУЛЯРНЫЕ ОСНОВЫ РЕЗИСТЕНТНОСТИ ГРАМОТРИЦАТЕЛЬНЫХ ВОЗБУДИТЕЛЕЙ РАНЕВОЙ ИНФЕКЦИИ У ПАЦИЕНТОВ ОТДЕЛЕНИЯ ГНОЙНОЙ ОСТЕОЛОГИИ

Гординская Н.А., Сабирова Е.В., Абрамова Н.В., Дударева Е.В., Митрофанов В.Н., Живцов О.П.

ФГБУ «Приволжский федеральный медицинский исследовательский центр» Министерства здравоохранения РФ, Нижний новгород, e-mail: info@nniito.ru

В работе проанализированы микроорганизмы – возбудители раневой инфекции пациентов отделения гнойной остеологии за 2013 год. В структуре возбудителей первое место занимают стафилококки (41,6%), второе место – неферментирующие грамотрицательные палочки (18,7%), третье место по частоте выделения принадлежит энтеробактериям (17,9%). Среди грамотрицательных бактерий значительное число штаммов мультирезистентны к антибактериальным препаратам: 25,9% *Pseudomonas aeruginosa*, 42,7% *Acinetobacter baumanii*, 62,6% *Klebsiella pneumoniae*. Молекулярно-генетические исследования полирезистентных штаммов показали, что 93,0% *Pseudomonas aeruginosa* являются продуцентами металло-β-лактамаз Vim- группы, 2,5% – КРС-группы, 98,2% *Acinetobacter baumanii* продуцируют OXA-40 подобные карбапенемазы, а 91,8% *Klebsiella pneumoniae* – β-лактамазы расширенного спектра.

Ключевые слова: грамотрицательные бактерии, антибиотикорезистентность, β-лактамазы расширенного спектра, металло-β-лактамазы, OXA-карбапенемазы

MOLECULAR BASIS OF RESISTANCE OF GRAM-NEGATIVE WOUND INFECTIOUS MATTER IN PATIENTS OF THE PURULENT OSTEOLOGY DEPARTMENT

Gordinskaya N.A., Sabirova E.V., Abramova N.V., Dudareva E.V., Mitrofanov V.N., Zhivtsov O.P.

Privolzhsky Federal Research Medical Centre» of the Ministry of Health of the Russian Federation, Nizny Novgorod, e-mail: info@nniito.ru

This paper analyzes the microorganisms, i.e. pathogenic agents of wound infections in patients of the Purulent Osteology Department within 2013. In the structure of pathogens staphylococcus (41,6%) is leading, followed by unfermentable gram-negative rod bacteria (18,7%), and enterobacteria (17,9%). Among gram-negative bacteria there is a significant number of antibiotic-multiresistant stocks: 25,9% Pseudomonas aeruginosa, 42,7% Acinetobacter baumanii, 62,6% Klebsiella pneumoniae. The molecular genetic studies of the antibiotic-multiresistant stocks showed that 93,0% of Pseudomonas aeruginosa are producers of metal-β-lactamase of Vim-group, 2,5% KRS-group, 98,2% Acinetobacter baumanii produce carbapenemases similar to OXA-40, and 91,8% Klebsiella pneumoniae produce β-lactamase of a wide spectrum.

Keywords: gram-negative bacteria, antibiotic resistance, wide spectrum β-lactamase, metal-β-lactamase, OXA-type carbapenemases

Актуальность. Проблема борьбы с раневой инфекцией остается в целом злободневной и актуальной, несмотря на современные методы и принципы лечения. Частота обнаружения и антибиотикорезистентность грамотрицательных бактерий в отделении гнойной остеологии представляют самостоятельную проблему [3]. Проведение рациональной антибактериальной терапии невозможно без современных знаний об этиологической структуре и резистентности возбудителей инфекции. В связи с этим изучение структуры возбудителей раневой инфекции, анализ устойчивости микроорганизмов к антимикробным препаратам и определение их молекулярно-генетических особенностей являются важнейшим этапом формирования тактики антибактериальной терапии инфекционных осложнений [4]. Для адекватного режима антибиотикопрофилактики кроме природной резистентности микроорганизмов необходимо учитывать возрастающий уровень приобретенной резистентности у госпитальных штаммов. Именно грамотрицательные микроорганизмы отличаются множественными и сложными механизмами антибиотикорезистентности [1, 5].

Цель настоящего исследования – изучение молекулярно-генетических основ резистентности грамотрицательных возбудителей раневой инфекции у пациентов отделения гнойной остеологии для назначения оптимальной антибактериальной терапии.

Материалы и методы исследования

В работе проанализированы 873 микроорганизма, выделенные у пациентов отделения гнойной остеологии за 2013 год. Идентификация микроорганизмов проводилась на анализаторе iEMS Reader FM (Labsystems, Финляндия) с помощью наборов биохимических тестов (Lachema, Чехия). Антибиотико-

граммы оценивались диско-диффузионным методом с использованием агара Мюллера – Хинтона (BD, США) и сенси-дисков (BioRad, США) в соответствии с методическими указаниями 4.2.1890-04 [2]. Минимальные подавляющие концентрации (МПК) определялись на анализаторе «ADAGIO» (BioRad, США).

Статистический анализ видового состава и количества выделенной микрофлоры проводили с помощью компьютерной программы «Микроб-2» (Россия).

Выявление генов метало-β-лактамаз (группы IMP, VIM и NDM) у псевдомонад, OXA-карбапенемаз (группы OXA-23, OXA-58 и OXA-40 подобных) и видоспецифических (ген OXA-51) β-лактамаз *Acinetobacter baumanii* осуществляли методом ПЦР с гибридизационно-флюоресцентной детекцией продуктов амплификации в режиме «реального времени».

Детекцию бета-лактамаз расширенного спектра (БЛРС) проводили с помощью Е-тестов с цефтазидимом и цефтазидимом/клавуланатом (BioMerieux, Франция) по инструкции. Для сравнения зоны задержки роста использовали штамм *E. coli* ATCC 25922, не продуцирующий бета-лактамазы, и штамм *E. coli* ATCC 700603, продуцирующий БЛРС.

Выделение ДНК проводили с помощью коммерческого набора «Рибо-преп» производства ФБУН ЦНИИЭ, следуя инструкции. Детекцию генов MBL и OXA-карбапенемаз проводили с помощью наборов «АмплиСенс MDR A.b.-OXA», «АмплиСенс MDR MBL» (ФБУН ЦНИИЭ, Россия). Амплификация проводилась в термоциклере «Rotor Gene 6000» (Corbett Research, Австралия).

Результаты исследования и их обсуждение

Лидирующее место по частоте выделения среди возбудителей раневой инфекции у пациентов отделения гнойной остеологии принадлежит стафилококкам (41,6%). Неферментирующие грамотрицательные палочки – псевдомонады и ацинетобактерии – занимают второе место в структуре анализируемых микроорганизмов (36,6%). Несмотря на то, что *Pseudomonas aeruginosa* самостоятельно составляет лишь 11,3% всей выделенной микрофлоры, а *Acinetobacter spp.* – 6,6%, отличительной их особенностью является наличие среди них большого количества мультирезистентных штаммов, создающих серьезную проблему в лечении пациентов. Выделенные штаммы *Ps. aeruginosa* в 25,9% случаев были устойчивы к различным классам антибиотиков, включая карбапенемы (табл. 1).

Таблица 1

Уровень резистентности *Ps. aeruginosa* к антибактериальным препаратам

Препарат	% резистентных штаммов
Цефтазидим	11,9%
Цефепим	5,3 %
Азтреонам	2,6%
Имипенем	21,6%
Меропенем	29,6%
Амикацин	22,5%
Ципрофлоксацин	36,6%
Пиперациллин/тазобактам	12,2%
Тикарциллин/клавуланат	48,1%

Больший уровень резистентности *Ps. aeruginosa* к карбапенемам по сравнению с цефалоспоринами, возможно, объясняется продукцией госпитальными штаммами металло-бета-лактамаз, для чего проведены молекулярные исследования. Детекция наиболее распространенных генов МБЛ показала, что 31,2% штаммов псевдомонад продуцируют гены VIM- группы металло-бета-лактамаз.

Ацинетобактеры входят в состав микрофлоры кожи здоровых лиц, колонизируя участки кожи между пальцами ног в и паховой области. В условиях стационара ацинетобактеры нередко колонизируют растворы антисептиков для наружного применения. Серьезной проблемой является значительное повышение числа бактериемий, вызванных мультирезистентными штаммами *Acinetobacter baumanii.*

Клинически наиболее значимым представителем рода *Acinetobacter* считают виды *Acinetobacter baumanii* и *Acinetobacter lwoffii*. Проведенные исследования видовой принадлежности микроорганизмов рода Acinetobacter показали, что все выделенные бактерии содержат гены видоспецифических β-лактамаз OXA-51 и соответственно относятся к *Acinetobacter baumanii.*

Среди выделенных в анализируемый период штаммов *Acinetobacter baumanii* полирезистентностных к антибактериальным препаратам обнаружено 42,7% (табл. 2).

Таблица 2

Уровень резистентности *Acinetobacter spp.* к антибактериальным препаратам

Препарат	% резистентных штаммов
Цефтазидим	88,9%
Цефепим	77,5%
Имипенем	52,3%
Меропенем	48,7%
Амикацин	100%
Ципрофлоксацин	68,2%
Пиперациллин/тазобактам	10,4%
Тикарциллин/клавуланат	73,2%
Цефоперазон/сульбактам	10,4%
Ампициллин/сульбактам	22,4%
Тигециклин	0%

В целом ацинетобактерии характеризовались более высокой резистентностью к карбапенемам и ингибиторзащищенным бета-лактамам, чем псевдомонады. Молекулярный анализ показал, что у 98,2% *Acinetobacter baumanii* обнаружен ген OXA-40 подобных карбапенемаз. Штаммов-носителей генов металло-бета-лактамаз среди ацинетобактеров не было выявлено.

Энтеробактерии в сумме составили 17,9% от всей раневой микрофлоры. При этом резистентность к антибактериальным препаратам у отдельных представителей семейства существенно различалась. Мультирезистентные штаммы встречались только среди клебсиелл (62,6%), 91,8% которых, как показали результаты исследований, продуцировали бета-лактамазы расширенного спектра.

Несмотря на возможность развития ассоциированной устойчивости к антибактериальным препаратам разных групп у бактерий, продуцирующих БЛРС, все анализируемые *Klebsiella pneumoniae* были чувствительны к карбапенемам (табл. 3).

Таблица 3

Уровень резистентности *Klebsiella pneumoniae* к антибактериальным препаратам

Препарат	% резистентных штаммов
Цефтазидим	91,7%
Цефепим	85,2%
Имипенем	0%
Меропенем	0%
Амикацин	30,8%
Ципрофлоксацин	71,8%
Пиперациллин/тазобактам	20,7%
Тикарциллин/клавуланат	82,1%
Цефоперазон/сульбактам	20,7%

Таким образом, раневая микрофлора в отделении гнойной остеологии отличается значительным многообразием. Стафилококки составляют 41,6% в этиологической структуре раневой инфекции, ацинетобактерии и псевдомонады – 18,7%, клебсиеллы – 5,4%. Перечисленные возбудители раневой инфекции отличаются высоким уровнем антибиотикорезистентности и представляют серьезную проблему для лечения пациентов. Тщательный анализ микробного пейзажа в конкретном стационаре и определение молекулярно-генетических особенностей резистентности позволяют назначить ра-

циональную антибактериальную терапию и провести максимальную эрадикацию нозокомиальных штаммов микроорганизмов.

Список литературы

1. Динамика распространенности и чувствительности БЛРС-продуцирующих штаммов энтеробактерий к различным антимикробным препаратам в ОРИТ России / М.В. Эйдельштейн [и др.] // Клинич. микробиол. и антимикроб. химиотерапия. – 2005. – № 4. – С. 323–336.

2. Методические указания МУК 4.2.1890–04. Определение чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препаратам. – М., 2004. – 92 с.

3. Сидоренко С.В. Бета-лактамазы расширенного спектра. Клиническое значение и методы детекции // Антибиотики и химиотерапия. – 2001. – Т. 46, № 12. – С. 27–35.

4. Metallo-β-lactamases: the guiet before the storm? / T.R. Walsh [et al.] // Clin. Microbiol. Rev. – 2005. – № 18. P. 306–325.

5. Navon-Venezia S., Ben-Ami R., Gameli Y. Update on Pseudomonas aeruginosa и Acinetobacter baumanii infections in the healthcare setting // Curr. Opin. Infect. Dis. – 2005. – № 18. P. 306–313.

References

1. Dinamika rasprostranennosti i chuvstvitelnosti BLRS-produtsiruyushchikh shtammov enterobakteriy k razlichnym antimikrobnym preparatam v ORIT Rossii / M.V. Eydelshteyn [i dr.] // Klinich.mikrobiol. i antimikrob.khimioterapiya. 2005. no. 4. pp. 323–336.

2. Metodicheskie ukazaniya MUK 4.2.1890–04. Opredelenie chuvstvitelnosti mikroorganizmov k antibakterialnym preparatam. M., 2004. 92 p.

3. Sidorenko S.V. Beta-laktamazy rasshirennogo spektra. Klinicheskoe znachenie i metody detektsii // Antibiotiki i khimioterapiya. 2001. T. 46, no. 12. pp.27–35.

4. Metallo-β-lactamases: the guiet before the storm? / T.R. Walsh [et al.] // Clin. Microbiol. Rev. 2005. no. 18. pp. 306–325.

5. Navon-Venezia S., Ben-Ami R., Gameli Y. Update on Pseudomonas aeruginosa i Acinetobacter baumanii infections in the healthcare setting // Curr. Opin. Infect. Dis. 2005. no. 18. pp. 306–313.