

УДК 616.24-002

ОСОБЕННОСТИ ФОРМИРОВАНИЯ АНТИБИОТИКОРЕЗИСТЕНТНОСТИ  
У ВОЗБУДИТЕЛЕЙ ГНОЙНО-ВОСПАЛИТЕЛЬНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ ЛЕГКИХВ. И. Петухов<sup>1</sup>, В. К. Окулич<sup>1</sup>, В. Ю. Земко<sup>1</sup>,  
А. В. Корнилов<sup>1</sup>, А. М. Дзядзько<sup>2</sup>, К. М. Кубраков<sup>1</sup><sup>1</sup>Учреждение образования«Витебский государственный ордена Дружбы народов медицинский университет»  
г. Витебск, Республика Беларусь,<sup>2</sup>Государственное учреждение«Минский научно-практический центр хирургии, трансплантологии и гематологии»  
г. Минск, Республика Беларусь

**Цель:** изучить особенности формирования антибактериальной резистентности возбудителей гнойно-воспалительных заболеваний легких.

**Материал и методы.** Изучен микробиологический пейзаж 59 пациентов с тяжелыми формами пневмоний, способность изолятов формировать биопленку и наличие у них генов резистентности к карбапенемам и цефалоспорином.

**Результаты.** Микробиологическим методом выделено 73 изолята. Наиболее часто встречалась *K. pneumoniae* (64,4 %). В 5 случаях получены отрицательные результаты. При использовании ПЦР-диагностики во всех случаях были идентифицированы ассоциации микроорганизмов. *P. aeruginosa* формировала биопленку наиболее интенсивно. Наиболее часто встречающимися генами резистентности были OXA-48 (63,1 %), CTX-M (35,9 %) и NDM (25 %).

**Заключение.** Наиболее часто встречающимся микроорганизмом у пациентов с тяжелыми формами пневмоний в отделении ОРИТ УЗ «Витебская областная клиническая больница» являлась *K. pneumoniae*, обладающая геном резистентности OXA-48. Большинство выделенных изолятов обладали умеренной или высокой способностью формировать биопленку с максимальным ее весом у *P. aeruginosa* — 136,5 [23; 75,1] мкг/лунку. Выявление у микроорганизмов генов резистентности методом ПЦР-диагностики позволит своевременно корректировать подбор препарата.

**Ключевые слова:** микроорганизмы, биопленка, пневмония, ПЦР-диагностика, гены резистентности.

**Objective:** to study the features of the formation of antibacterial resistance of the causative agents of pyoinflammatory lung diseases.

**Material and methods.** The microbiological landscape of 59 patients with severe forms of pneumonia, the ability of the isolates to form biofilms, and the presence of the resistance genes to carbapenems and cephalosporins have been studied.

**Results.** 73 isolates were isolated by the microbiological method. *K. pneumoniae* was the most common (64.4%). The microflora was not detected in 5 cases. The use of the PCR diagnostics made it possible to identify the associations of microorganisms in all the cases. *P. aeruginosa* was the one which formed the biofilm most intensively. The most common resistance genes were OXA-48 (63.1 %), CTX-M (35.9 %), and NDM (25 %).

**Conclusion.** *K. pneumoniae* having the OXA-48 resistance gene was the most common pathogen in the patients with severe forms of pneumonia in the Resuscitation and Intensive Care Ward of Vitebsk Regional Clinical Hospital. The majority of the isolates possessed a moderate or high ability to form the biofilm with its maximum weight in *P. aeruginosa* 136.5 [23; 75.1] µg/well. The detection of antibiotic resistance genes by the method of the PCR diagnostics will make it possible to adjust the choice of drugs.

**Key words:** microorganisms, biofilm, pneumonia, PCR diagnostics, resistance genes.

Problemy zdorov'ya i ekologii. 2019 Jan-Mar; Vol 59 (1): 68-71

The Features of the Formation of Antibiotic Resistance in the Causative Agents of Pyo-Inflammatory Lung Diseases

V. I. Petuhov, V. K. Okulich, V. Yu. Zemko, A. V. Kornilov, A. M. Dzyadz'ko, K. M. Kubrakov

**Введение**

В настоящее время болезни органов дыхания представляют собой весьма актуальную медицинскую с высокой социальной значимостью проблему [1].

Развитию деструктивного процесса в легких практически всегда предшествует пневмония. Для возникновения воспалительного процесса в легких требуется сочетание определенных факторов: наличие аэробной инфекции;

гиперсенсibilизация к инфекции; нарушение дренажной функции бронхов [2].

К гнойно-деструктивным заболеваниям легких и плевры относятся часто сочетающиеся абсцесс и гангрена легкого. Эмпиема плевры может являться осложнением данных заболеваний, реже — самостоятельной патологией [2].

Для возникновения гнойно-некротического поражения необходимо присоединение еще трех патогенетических факторов: нарушение

кровообращения в зоне воспаления, появление некроза в зоне воспаления, наличие анаэробной инфекции в зоне некроза [3].

Особенности локализации гнойной деструкции, прогрессивное бурное течение процесса, формирование синдрома эндогенной интоксикации, развитие полиорганной недостаточности и высокая летальность определяют актуальность данного исследования [4].

Для абсцессов легких наиболее характерна анаэробная микрофлора. При микробиологическом исследовании пунктата из закрытого абсцесса и сопутствующего гнойного плеврального экссудата наиболее часто выделяются ассоциации анаэробных микроорганизмов (до 70,4 % — бактероиды, пептококки, пептострептококки, фузобактерии, вейлонеллы), а в 29,6 % — ассоциации аэробов и анаэробов [5].

Учитывая, что ведущая роль в этиологии гнойно-воспалительных заболеваний легких принадлежит бактериям, антибактериальная терапия используется всегда, однако это способствует селекции резистентной флоры.

В последнее время изучению формирования защитных механизмов микроорганизмов придается большое значение [6]. Значительной частью микробиологов признано, что большинство микроорганизмов в естественных и искусственно созданных окружающих средах существует в виде структурированных, прикрепленных к поверхности сообществ — биопленок (БП), препятствующих проникновению антибиотиков в глубокие слои и нарушающих непосредственный контакт с бактериальными клетками [7, 8]. Очень важно, что формирование БП сопровождается изменением фенотипа микроорганизма, выражающееся в изменении параметров роста и экспрессии специфических генов [9]. Характерное свойство всех БП — устойчивость к физическим и биохимическим воздействиям, что, в свою очередь, является одним из механизмов приобретения антибиотикорезистентности [10].

Наиболее современным методом идентификации инфекции является ПЦР-диагностика, которая позволяет определить наличие возбудителя даже при минимальном содержании его изолятов в биологическом материале, а в отдельных случаях выявляет даже единичные клетки вирусов или бактерий. Скорость и высокая производительность ПЦР являются бесспорными преимуществами данного метода, который позволяет выявить возбудителя в течение нескольких часов, что крайне важно для быстрого назначения целенаправленной антибактериальной терапии. Определение генов VIM, NDM, OXA-48, KPC, обуславливающих резистентность к карбапенемам, природным и полусинтетическим пенициллинам, цефалоспорином I, II, III и IV поколений у *Entero-*

*bacteriaceae*, помогает намного ускорить правильный подбор антибиотика [11].

#### **Цель исследования**

Изучить особенности формирования антибактериальной резистентности возбудителей гнойно-воспалительных заболеваний легких.

#### **Материал и методы**

Обследовано 59 пациентов из отделения реанимации и интенсивной терапии (ОРИТ) УЗ «Витебская областная клиническая больница» в течение 2017–2018 гг. Средний возраст пациентов составил  $57,3 \pm 15,8$  года. Преобладали мужчины — 71,2 %; женщин было 28,9 %. Все пациенты имели одно- и двустороннюю полисегментарную или нижнедолевую пневмонию. Мокроту забирали натошак с утра в стерильные емкости, а у пациентов на ИВЛ — методом аспирации из трахеобронхиального дерева.

Изоляты определяли микробиологическим методом и методом ПЦР в режиме реального времени. Для обнаружения ДНК *Streptococcus spp.*, *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis*, *Enterobacter spp.*, *Enterococcus faecium*, *Klebsiella spp.*, *Proteus spp.*, *Staphylococcus aureus*, *Serratia spp.*, *Pseudomonas aeruginosa* использовали набор реагентов «Септоскрин» («Литех», Россия). Для определения генов резистентности к карбапенемам (VIM, NDM, OXA-48, KPC) и цефалоспорином (CTX-M) использовали наборы реактивов формата «Флуоропол-РВ» в комплектации «OneStep». Результат оценивали в программе Bio Rad CFX Manager 3.0.

Микробные биопленки изучали с помощью ранее разработанных методов [12]. Определяли способность выделенных изолятов формировать биопленку в течение 2 суток, а также массу сформированной микробной пленки с применением 96-луночного полистиролового планшета. По данным, полученным на спектрофотометре, рассчитывали среднее значение оптической плотности опытных проб и по таблице определяли способность микроорганизма формировать БП как низкую, умеренную или высокую, затем рассчитывали вес микробной биопленки, выраженный в мгк/лунку [12].

Полученные результаты статистически обрабатывали с использованием программ «Microsoft Excel», 2007, «Statistica» (Version 10, StatSoft Inc., США, лицензия №СТАФ999К347156W). При параметрическом распределении изучаемых явлений результаты представлены в виде среднего значения и стандартного отклонения. Межгрупповое сравнение значимости при непараметрическом распределении несвязанных выборок проводили с помощью критерия Манна-Уитни. Результаты представлены в виде медианы с указанием нижнего 25-го и верхнего 75-го квартилей. Различия признавались статистически значимыми при  $p < 0,05$ .

**Результаты исследования**

Микробиологическим методом выделено 73 изолята. В 5 случаях получены отрицательные результаты. Выделено 2 изолята (2,7 %) *S. aureus*, 33 изолята (11 %) *P. aeruginosa*, 47 изолятов (64,4 %) *K. pneumoniae*, 14 изолятов (19,1 %) *Acinetobacter*

*spp.*, 1 изолят (1,4 %) *S. epidermidis*. При выделении ДНК из биологического материала методом ПЦР во всех случаях были определены ассоциации микроорганизмов несмотря на то, что бактериологический метод в 5 случаях дал отрицательные результаты (таблицы 1, 2).

Таблица 1 — Изоляты, идентифицированные бактериологическим методом и подтвержденные методом ПЦР

Выделенные изоляты	Количество изолятов идентифицировано бактериологическим методом (%)	% случаев, подтвержденных методом ПЦР
<i>K. pneumoniae</i>	33 (45,2 %)	100 %
* <i>Acinetobacter spp.</i>	6 (8,2 %)	Не проводился
* <i>Acinetobacter spp.</i> + <i>K. pneumoniae</i>	6 (8,2 %)	Не проводился
<i>P. aeruginosa</i> + <i>K. pneumoniae</i>	3 (4,1 %)	97,3 %
<i>S. aureus</i> + <i>K. pneumoniae</i>	2 (2,3 %)	100 %
Микрофлора не выделена	5 (6,8 %)	0 %

\* — Идентификация *Acinetobacter spp.* методом ПЦР не проводилась из-за отсутствия реагентов.

Таблица 2 — Изоляты, идентифицированные методом ПЦР

Выделенные изоляты	Количество (%)
<i>S. aureus</i> + <i>Streptococcus spp.</i>	3 (5,1 %)
<i>Streptococcus spp.</i>	1 (1,7 %)
<i>Enterobacter spp.</i> + <i>K. pneumoniae</i> + <i>Streptococcus spp.</i>	1 (1,7 %)
<i>K. pneumoniae</i> + <i>E. coli</i> + <i>Streptococcus spp.</i>	1 (1,7 %)
<i>K. pneumoniae</i> + <i>Streptococcus spp.</i>	2 (3,4 %)
<i>Enterobacter spp.</i> + <i>Streptococcus spp.</i>	1 (1,7 %)
<i>K. pneumoniae</i> + <i>Streptococcus spp.</i> + <i>S. aureus</i> + <i>P. aeruginosa</i>	2 (3,4 %)
<i>S. aureus</i> + <i>K. pneumoniae</i> + <i>Streptococcus spp.</i> + <i>P. aeruginosa</i>	3 (5,1 %)
<i>K. pneumoniae</i> + <i>Streptococcus spp.</i> + <i>P. aeruginosa</i> + <i>E. coli</i>	4 (6,8 %)
<i>S. aureus</i> + <i>K. pneumoniae</i> + <i>Streptococcus spp.</i> + <i>E. coli</i>	1 (1,7 %)
<i>K. pneumoniae</i> + <i>Proteus spp.</i> + <i>P. aeruginosa</i> + <i>S. aureus</i> + <i>Streptococcus spp.</i>	1 (1,7 %)
<i>K. pneumoniae</i> + <i>E. coli</i> + <i>P. aeruginosa</i> + <i>S. aureus</i> + <i>Streptococcus spp.</i>	2 (3,4 %)
<i>K. pneumoniae</i> + <i>E. coli</i> + <i>S. aureus</i> + <i>Streptococcus spp.</i>	2 (3,4 %)
<i>Streptococcus spp.</i> + <i>S. aureus</i> + <i>K. pneumoniae</i>	2 (3,4 %)
<i>Enterobacter spp.</i> + <i>Streptococcus spp.</i>	1 (1,7 %)
<i>P. aeruginosa</i> + <i>Enterobacter spp.</i> + <i>E. coli</i> + <i>S. aureus</i> + <i>Proteus spp.</i> + <i>Streptococcus spp.</i> + <i>K. pneumoniae</i>	1 (1,7 %)
<i>Streptococcus spp.</i> + <i>S. aureus</i> + <i>Serratia spp.</i>	1 (1,7 %)
<i>Enterobacter spp.</i> + <i>S. aureus</i> + <i>Streptococcus spp.</i> + <i>K. pneumoniae</i>	1 (1,7 %)
<i>P. aeruginosa</i> + <i>Enterobacter spp.</i> + <i>Serratia spp.</i> + <i>E. coli</i> + <i>S. aureus</i> + <i>Proteus spp.</i> + <i>Streptococcus spp.</i> + <i>K. pneumoniae</i>	1 (1,7 %)

При изучении способности формировать биопленку обнаружено, что все изоляты *S. aureus* интенсивно формировали биопленку ( $n = 2$ ); 76,3 % изолятов *K. pneumoniae* формировали ее умеренно ( $n = 10$ ), 1 (2,1 %) изолят — плохо, остальные изоляты — интенсивно (21,6 %). Большая часть изолятов *Acinetobacter spp.* (92,8 %) также интенсивно формировали биопленку ( $n = 13$ ); 7,1 % изолятов формировали ее плохо ( $n = 1$ ). Количество интенсивно формирующих биопленку изолятов *P. aeruginosa* составило 100 %.

При анализе результатов определения массы образованной микробной биопленки обнаружено,

что наиболее высокую массу микробной пленки среди изученных изолятов имел *P. aeruginosa* — 136,5 [23; 75,1],  $p < 0,05$  мкг/лунку, *S. aureus* — 35,4 [20,8; 68] мкг/лунку, *K. pneumoniae* — 34,7 [22,5; 59,3] мкг/лунку, *Acinetobacter spp.* — 45,8 [31,2; 52,9] мкг/лунку.

74,5 % исследованных клинических изолятов *K. pneumoniae* имели хотя бы один ген резистентности. Наиболее часто выделяли ген OXA-48 (63,1 %), 35,9 % изолятов имели ген CTX-M и 25 % — ген NDM. 23,5 % имели сразу 3 гена резистентности: CTX-M, OXA-48, NDM, 2,0 % — NDM и CTX-M, 3,9 % — NDM и OXA-48, 15,7 % — CTX-M и OXA-48 (таблица 3, 4).

Таблица 3 — Наличие генов резистентности у *K. pneumoniae*

Микроорганизм	Всего изолятов	VIM, n (%)	NDM, n (%)	OXA-48, n (%)	KPC, n (%)	CTX-M, n (%)
<i>K. pneumoniae</i>	64	0 (0 %)	16 (25 %)	34 (63,1 %)	13 (20,3 %)	23 (35,9 %)

Примечание. VIM, NDM, OXA-48, CTX-M — гены резистентности.

Таблица 4 — Ассоциации генов резистентности у *K. pneumoniae*

Микроорганизм	Всего изолятов	NDM, OXA-48, CTX-M, n (%)	NDM, CTX-M, n (%)	NDM, OXA-48, n (%)	CTX-M, OXA-48, n (%)
<i>K. pneumoniae</i>	51	12 (23,5 %)	1 (2 %)	2 (3,9 %)	8 (15,7 %)

Примечание. VIM, NDM, OXA-48, CTX-M — гены резистентности.

### Выводы

1. В структуре изученных изолятов в ОРИТ УЗ «ВОКБ» наиболее часто встречалась *K. pneumoniae*, составив 64,4 %, при этом 63,1 % из них имели в своем составе ген резистентности OXA-48.

2. Большинство исследованных изолятов обладали умеренной или высокой способностью формировать биопленку, причем количество интенсивно формирующих биопленку изолятов только у *P. aeruginosa* составило 100 %, наибольшим был также вес микробной биопленки (136,5 [23; 75,1] мкг/лунку,  $p < 0,05$ ). 76,3 % изолятов *K. pneumoniae* умеренно формировали биопленку, при этом ее вес составил 34,7 [22,5; 59,3] мкг/лунку и практически не отличался от такового у *S. aureus* — 35,4 [20,8; 68],  $p > 0,05$ .

3. Наличие хотя бы одного из генов VIM, NDM, OXA-48, KPC, обуславливающих резистентность к карбапенемам, природным и полусинтетическим пенициллинам, цефалоспорином I, II, III и IV поколений у семейства *Enterobacteriaceae*, позволяет ускорить возможность правильного подбора антибиотика при лечении и исключить назначение карбапенемов в случае выявления карбапенем-резистентной *K. pneumoniae*, имеющей хотя бы один из вышеперечисленных генов резистентности.

### ЛИТЕРАТУРА

1. Чучалин АГ. Плевра: патофизиологические и клинические аспекты. *Пульмонология*. 1999; 1: 6-10.
2. Бисенков ЛН, Бебия НВ, Гришаков СВ, Железный ОГ, Замятин МН [и др.]. Торакальная хирургия. Санкт-Петербург, РФ: Гиппократ, 2004. 1918 с.
3. Вишневикий АА, Маршак АМ, Кашин ЮД. Лечение анаэробных плевропневмонийных заболеваний. *Вестник хирургии*. 1980; 2: 19-21.
4. Гостищев ВК, Смоляр ВА, Афанасьев АН, Шевченко ЮЛ. Дифференцированный подход к комплексному лечению больных с абсцессами и гангреней легких: документы, представленные на Третьем конгрессе ассоциации хирургов им. Н.И. Пирогова. Москва: М.; 2002.

5. Лаптев АН. Гнойно-некротические деструкции легких. *Медицинская панорама*. 2008; 13: 21-26.
6. Palmer RJ, Stoodley J. Biofilms 2007: broadened horizons and new emphases. *J. Bacteriol.* 2007; 189 (22): 7948-7960.
7. Davey ME. Microbial biofilms: from ecology to molecular genetics. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 2000; 64: 847-867.
8. Чеботарь ИВ, Погорелов АГ, Яшин ВА. Современные технологии исследования бактериальных биопленок. *Современные технологии в медицине*. 2013; 5(1): 14-20.
9. Donlan RM. Biofilms: Survival Mechanisms of Clinically Relevant Microorganisms. *CLIN. MIC. REV.* 2002; 15 (2): 167-193.
10. Stewart PS. Antibiotic resistance of bacteria in biofilms. *Lancet*. 2001; 358: 135-138.
11. Лопухов ЛВ, Эйдельштейн МВ. Полимеразная цепная реакция в клинической микробиологической диагностике. Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. 2000; 4(2): URL96-106 [http://www.antibiotic.ru/cmacc/2000\\_2\\_3/096.htm](http://www.antibiotic.ru/cmacc/2000_2_3/096.htm).
12. Окулич ВК, Кабанова АА, Плотников ФВ. Микробные биопленки в клинической микробиологии и антибактериальной терапии. Витебск. 2017: 300. <http://elib.vsmu.by/handle/123/12846>.

### REFERENCES

1. Chuchalin AG. Plevra: patofiziologicheskie i klinicheskie aspekty. *Pulmonologiya*. 1999; 1: 6-10.
2. Bisenkov LN, Bebiya NV, Grishakov SV, Zheleznyiy OG, Zamyatin MN [i dr.]. *Torakalnaya hirurgiya*. Sankt-Peterburg, RF: Gippokrat, 2004. 1918 s.
3. Vishnevskiy AA, Marshak AM, Kashin YuD. Lechenie anaerobnykh pleuropulmonalnykh zabolevaniy. *Vestnik hirurgii*. 1980; 2: 19-21.
4. Gostishev VK, Smolyar VA, Afanasev AN, Shevchenko YuL. Differentsirovannyi podhod k kompleksnomu lecheniyu bolnykh s abscessami i gangrenoy legkih: dokumenty, predstavlenyie na Tretem kongresse assotsiatsii hirurogov im. N.I. Pirogova. Moskva: M.; 2002.
5. Laptev AN. Gnoyno-nekroticheskie destruktii legkih. *Meditsinskaya panorama*. 2008; 13: 21-26.
6. Palmer RJ, Stoodley J. Biofilms 2007: broadened horizons and new emphases. *J. Bacteriol.* 2007; 189 (22): 7948-7960.
7. Davey ME. Microbial biofilms: from ecology to molecular genetics. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 2000; 64: 847-867.
8. Chebotar IV, Pogorelov AG, Yashin VA. Sovremennyye tehnologii issledovaniya bakterialnykh bioplenok. *Sovremennyye tehnologii v meditsine*. 2013; 5(1): 14-20.
9. Donlan RM. Biofilms: Survival Mechanisms of Clinically Relevant Microorganisms. *CLIN. MIC. REV.* 2002; 15 (2): 167-193.
10. Stewart PS. Antibiotic resistance of bacteria in biofilms. *Lancet*. 2001; 358: 135-138.
11. Lopuhov LV, Ejdel'shtejn MV. Polimeraznaya cernaya reakciya v klinicheskoy mikrobiologicheskoy diagnostike. *Klinicheskaya mikrobiologiya i antimikrobnaya himioterapiya*. 2000; 4(2): URL96-106 [http://www.antibiotic.ru/cmacc/2000\\_2\\_3/096.htm](http://www.antibiotic.ru/cmacc/2000_2_3/096.htm).
12. Okulich VK, Kabanova AA, Plotnikov FV. Mikrobnye bioplenki v klinicheskoy mikrobiologii i antibakterial'noj terapii. Vitebsk. 2017: 300. <http://elib.vsmu.by/handle/123/12846>.