УДК 617.001.17–022.7:579.84:615.33.015.8

РАСПРОСТРАНЕНИЕ КАРБАПЕНЕМРЕЗИСТЕНТНЫХ ШТАММОВ ACINETOBACTER SPP. В ОЖОГОВЫХ СТАЦИОНАРАХ

Гординская Н.А., Сабирова Е.В., Абрамова Н.В., Карасева Г.Н.

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

Проанализирована частота выделения, видовая принадлежность и антибиотикорезистентность Acinetobacter spp. – возбудителей раневой ожоговой инфекции за период 2012–2015 гг. в стационарах ФГБУ «ПФМИЦ» Минздрава России г. Нижнего Новгорода. Молекулярные исследования видоспецифичности бактерий рода Acinetobacter по наличию гена OXA-51 подтвердили принадлежность 97% анализируемых штаммов к виду Acinetobacter baumanii. Более 50% анализируемых штаммов Acinetobacter baumanii фенотипически были устойчивы к карбапенемам. Определение продукции различных β-лактамаз у раневых ацинетобактерий показало наличие OXA-40 подобных карбапенемаз у всех фенотипически карбапенемрезистентных штаммов. Максимальную активность среди антимикробных препаратов в отношении раневых ацинетобактерий – продуцентов карбапенемаз –проявлял цефоперазон/сульбактам. Определение фенотипа устойчивости Acinetobacter baumanii к антимикробным препаратам и детекция карбапенемаз позволяют провести рациональное лечение и предотвратить циркуляцию госпитальных штаммов.

Ключевые слова: раневая ожоговая инфекция, Acinetobacter baumanii, антибиотикорезистентность, карбапенемазы

ACINETOBACTER SPP CARBAPENEM-RESISTANT STRAINS SPREAD IN BURN CENTERS

Gordinskaya N.A., Sabirova E.V., Abramova N.V., Karaseva G.N.

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

Detection frequency, species identity and antibiotic resistance of Acinetobacter spp. as a burn wound infectious agent were analyzed in hospitals of FSBI PFMRC of the Ministry of Health of the Russian Federation, Nizhny Novgorod, over the period of 2012 to 2015. Molecular studies of Acinetobacter bacteria species specificity for the presence of OXA-51 gene confirmed the identity of 97% of the strains being analyzed to the Acinetobacter baumanii species. Over 50% of Acinetobacter baumanii strains analyzed were resistant to carbapenems phenotypically. Determination of various β-lactamase production in wound acinetobacteria showed the presence of OXA-40–like carbapenemases in all phenotypically carbapenem-resistant strains. Cefoperazone/sulbactam demonstrated the maximum activity among antimicrobial agents in relation to wound acinetobacteria as producers of carbapenemases. Determination of the phenotype of Acinetobacter baumanii resistance to antimicrobial agents and detection of carbapenemases makes it possible to provide appropriate treatment and prevent nosocomial strain circulation.

Keywords: burn wound infectious, Acinetobacter baumanii, antibiotic resistance, carbapenemases

В последнее десятилетие наблюдается неуклонный рост числа инфекций, вызванных Acinetobacter spp. [1, 8]. Данные зарубежной статистики свидетельствуют о том, что ацинетобактер входит в число шести самых опасных бактерий для населения развитых стран [5]. Являясь условными патогенами, ацинетобактеры, тем не менее, представляют серьезную угрозу для пациентов отделений, где широко используют инвазивные методы диагностики и лечения (длительное лечение, катетеризация сосудов, искусственная вентиляция легких, многочисленные наркозы и перевязки) [9]. Ацинетобактерии вызывают инфекционный процесс только на фоне иммуносупрессии. Факторами риска являются тяжелые травмы, длительные операции, тяжелые термические травмы. Раневая ожоговая инфекция нередко обусловлена наличием ацинетобактерий, которые занимают второе место после стафилококков в общей структуре возбудителей [2]. Факторы патогенности, определяющие повреждение тканей и выживание ацинетобактерий в организме, активно действуют на всех этапах инфекционного процесса – адгезии, инвазии, в случае диссеминации и персистенции вызывают интоксикацию и обеспечивают неэффективность иммунного ответа. Бактерии рода Acinetobacter отличаются высокой природной резистентностью к антимикробным препаратам. Выживаемость ацинетобактерий в условиях антибиотикотерапии может быть связана с существованием персистирующих штаммов. Среди Acinetobacter baumanii обнаружено пять наборов токсин-антитоксин, ответственных за трансформацию метаболически активных форм в персистирующие [7]. Клиническая значимость Acinetobacter spp. с одной стороны вызвана их распространенностью, они колонизируют кожу рук персонала, клавиатуры компьютеров, поверхности оборудования,

а с другой стороны – способностью приобретать устойчивость к антимикробным препаратам. Если в 2002–2004 гг. в России выявляли всего 6% имипенемрезистентных Acinetobacter baumanii, то в 2011–1012 гг. их доля выросла до 96% [4]. Одной из главных причин резистентности ацинетобактерий является продукция β-лактамаз. Ацинетобактерии продуцируют все три класса сериновы β-лактамазы A, C и D классов, а также метало-β-лактамазы (класс B). Большое число штаммов Acinetobacter baumanii продуцируют оксацилиназы – лактамазы, обуславливают резистентность не только к пенициллинам, но и к карбапенемам [10]. Карбапенемрезистентные A. baumanii могут служить источником для переноса карбапенемаз другим видам грамотрицательных бактерий. Это осложняет выбор адекватного антимикробного препарата, результатом чего является неэффективность терапии, увеличение продолжительности и стоимости лечения, а нередко и исход ожоговой болезни [6].

Цель работы: анализ распространенности карбапенемрезистентных штаммов A. baumanii в детском и взрослом ожоговом стационаре ФГБУ «ПФМИЦ» Минздрава России г. Нижнего Новгорода для составления рациональных протоколов стартовой антимикробной терапии.

Материалы и методы исследования

В работе проанализировано 942 раневых штамма Acinetobacter spp., выделенных у взрослых пациентов и детей с термической травмой за период 2012–2015 гг.

Идентификация микроорганизмов проводилась на анализаторе iEMS Reader FM (Labsystems, Финляндия) с помощью набора тест-систем (Lachema, Чехия), в 2015 году – масс-спектрометрически на приборе Autoflex (Bruker). Статистический анализ видового состава выделенной микрофлоры проводили с помощью компьютерной программы «Микроб-2». Антибиотикорезистентность микробных изолятов оценивалась диско-диффузионным методом с использованием агара Мюллера-Хинтон и сенси-дисков Oxoid (Англия) в соответствии с методическими указаниями, минимальные подавляющие концентрации рассчитывали на анализаторе «ADAGIO» (BioRad, США) [3].

Выявление карбапенем-гидролизующих β-лактамаз (OXA-карбапенемаз группы OXA-23, OXA-58 и OXA-40 подобных и метало-β-лактамаз (MBL группы IMP, VIM и NDM), а также видоспецифических β-лактамаз Acinetobacter baumanii (ген OXA-51) осуществляли методом мультиплексной полимеразноцепной реакции (ПЦР) с гибридизационно-флюоресцентной детекцией продукции амплификации в режиме «реального времени». В качестве контрольного использовали штамм Acinetobacter baumanii 19606 коллекции ATCC.

Выделение ДНК и выявление наличия генов MBL и OXA-карбапенемаз проводили с помощью коммерческих наборов «Рибо-преп», «АмплиСенс MDR MBL-FL» и «АмплиСенс MDR Acinetobacter OXA-FL» проводили с помощью коммерческого набора «Рибо-преп» производства ФГУН ЦНИИЭМ. Амплификация проводилась в термоциклере «Rotor Gene 6000» (Corbett Research, Австралия) по инструкции к наборам. Статистическую обработку полученных данных проводили с помощью компьютерной программы Statistica.

Результаты исследования и их обсуждение

Анализ раневой микрофлоры показал, что в детском ожоговом отделении Acinetobacter spp. составляют в среднем 10% всей раневой микрофлоры, во взрослом ожоговом – 15% (табл. 1).

За период наблюдения в разные годы выявлены определенные колебания численности раневых ацинетобактерий, однако достоверных изменений в обоих отделениях не произошло. Следует подчеркнуть, что в структуре возбудителей раневой ожоговой инфекции у взрослых и детей с термической травмой в настоящее время Acinetobacter spp. занимают второе место после стафилококков и первое место среди грамотрицательных микроорганизмов.

Клинически значимыми представителями рода Acinetobacter являются виды Acinetobacter baumanii и Acinetobacter Lwoffii, которые могут вызывать пневмонии, инфекции мочевого тракта, раневые и катетерассоциированные инфекции. Молекулярные исследования видоспецифичности бактерий Acinetobacter spp. по наличию гена OXA-51 подтвердили принадлежность 97% анализируемых штаммов к виду Acinetobacter baumanii, 2% по данным масс-спектрометрии относились к Acinetobacter Lwoffii и 1% – к Acinetobacter calcoaceticus.

Таблица 1

Частота выделения Acinetobacter spp. в ожоговых отделениях (%)

Ожоговое отделение	Период, год			
	2012	2013	2014	2015
Детское отделение (ДО)	7,7	11,5	12,2	9,9
Взрослое отделение (ВО)	18,6	13,0	16,1	15,0

На протяжении всего периода наблюдения более 50% штаммов Acinetobacter baumanii в обоих отделениях фенотипически были резистентны к карбапенемам – имипенему, меропенему и дорипенему (табл. 2).

Активность имипенема в отношении ацинетобактерий, выделенных как у взрослых, так и у детей с термической травмой, была достоверно выше (P<0,05), чем дорипенема, в отношении меропенема достоверных отличий не выявлено. Количество карбапенемустойчивых штаммов в детском и взрослом отделениях в разные годы отличалось. В 2012 и 2015 годах в детском ожоговом отделении выделено больше карбапенемрeристентных Acinetobacter baumanii, чем в отделении взрослых больных с термической травмой, в 2013–2014 гг. – их число было практически одинаковым.

устойчивости к антимикробным препаратам у госпитальных штаммов, нами была исследована их распространенность в ожоговых стационарах. В результате молекулярно-генетических анализов наличия карбапенем-гидролизующих β-лактамаз практически у всех полирезистентных штаммов Acinetobacter baumanii выявлен ген OXA-40 подобных карбапенемаз, у двух штаммов обнаружен ген OXA-23 подобных ферментов, что соответствует литературным данным о частоте продукции оксациллиназ. Генов, кодирующих продукцию металло-бета-лактамаз, у анализируемых штаммов не было обнаружено. Молекулярная детекция карбапенемаз у госпитальных изолятов является абсолютно точным ориентиром при включении карбапенемов в протоколы стартовой терапии до выполнения бактериологических анализов.

Таблица 2

Резистентность Acinetobacter baumanii к карбапенемам (%)

Антибиотик	Период, год							
	2012		2013		2014		2015	
	ДО	ВО	ДО	ВО	ДО	ВО	ДО	ВО
Имипенем	68,0	50,3	55,1	52,8	40,8	53,5	66,7	50,9
Меропенем	65,4	53,0	58,1	56,9	43,1	55,0	68,3	52,2
Дорипенем	81,3	73,0	56,5	61,8	46,9	60,8	72,5	55,7

Примечание. ДО – детское отделение, ВО – взрослое отделение.

Эти результаты свидетельствуют о необходимости тестирования устойчивости к нескольким представителям карбапенемов. Учитывая разнообразие приобретенных карбапенемаз и чрезвычайно быстрое их распространение среди Acinetobacter baumanii, появление новых сочетаний детерминант

Полученные в работе данные свидетельствуют о повышении частоты резистентности ацинетобактерий к большинству антимикробных препаратов. Фенотип антибиотикорезистентности циркулирующих в ожоговых стационарах Acinetobacter spp. представлен в табл. 3.

Таблица 3

Антибиотикорезистентность Acinetobacter baumanii, выделенных у пациентов с термической травмой (%)

Антибиотик	Период, год							
	2012		2013		2014		2015	
	ДО	ВО	ДО	ВО	ДО	ВО	ДО	ВО
Гентамицин	79,2	86,0	64,7	84,2	66,7	86,1	82,0	88,1
Нетилмицин	70,8	47,6	52,9	52,3	51,0	51,5	48,8	48,7
Цефтазидим	87,5	94,2	72,9	89,3	70,9	94,6	92,1	93,4
Цефоперазон	66,7	93,9	87,9	75,0	100	99,1	94,9	100
Цефепим	74,1	82,8	66,7	88,3	64,0	88,5	89,5	90,9
Ципрофлоксацин	69,2	95,2	72,2	86,2	63,8	92,7	90,0	88,9
Цефоперазон/ сульбактам	28,6	57,8	53,5	49,6	40,3	44,8	52,9	42,4
Тикарциллин/ клавуланат	73,1	90,4	76,0	93,1	64,9	89,9	82,5	83,9
Пиперациллин/тазобакта	76,0	90,4	74,0	89,6	69,2	87,8	92,1	86,0

Примечание. ДО – детское отделение, ВО – взрослое отделение.

Несмотря на самый тщательный анализ устойчивости раневой микрофлоры к антимикробным препаратам и назначение максимально рациональной терапии в отделениях термической травмы, в анализируемый период наблюдается резкое увеличение количества штаммов Acinetobacter, резистентных к цефалоспоринам III поколений. 90 % раневых ацинетобактеров были устойчивы к цефепиму. Высокая устойчивость Acinetobacter baumanii наблюдалась в 2015 году в отношении фторхинолонов.

Активность представителей аминогликозидов резко отличалась в зависимости от конкретного препарата. Если к гентамицину традиционно выявлялась высокая резистентность раневых изолятов, то к нетилмицину в среднем половина штаммов были чувствительны.

Максимальную активность среди ингибиторзащищенных антимикробных препаратов в отношении раневых штаммов бактерий рода Acinetobacter в обоих отделениях продемонстрировал цефоперазон/сульбактам, другие ингибиторы – клавуланат и тазобактам – не проявляли эффекта в отношении β-лактамаз.

Заключение. В ходе настоящего исследования установлено, что бактерии рода Acinetobacter в последние годы были одним из ведущих возбудителей раневой ожоговой инфекции. В отделениях термической травмы, как у детей, так и у взрослых, нередко выделяются полирезистентные штаммы Acinetobacter baumanii. Учитывая высокую природную способность Acinetobacter baumanii к приобретению возможности вырабатывать ферменты устойчивости в отношении антимикробных препаратов, на практике крайне важное значение имеет определение фенотипа и генотипа антибиотикорезистентности циркулирующих в стационарах штаммов. Более половины изученных ацинетобактерий у взрослых пациентов и 70 % у детей с ожогами устойчивы к карбапенемам. Все карбапенемрезистентные изоляты ацинетобактерий продуцировали лактамазы класса D – OXA-ферменты. Из всего многообразия β-лактамаз карбапенемазы представляют собой наибольшую угрозу, так как обладают высокой каталитической активностью и широким спектром субстратной специфичности, включающим практически все классы β-лактамных антибиотиков. Наиболее активным препаратом среди карбапенемов в анализируемый период был имипенем, наименьшую активность проявлял меропенем. Полученные данные свидетельствуют, что карбапенемы в настоящее время не могут рассматриваться в качестве основных антимикробных препаратов для эрадикации Acinetobacter baumanii, способность цефоперазон/сульбактама была выше, чем у карбапенемов. Половина штаммов ацинетобактерий были чувствительны к нетилмицину. Вероятно, комбинация карбапенемов с нетилмицином может быть вариантом лечения инфекции, вызванной Acinetobacter baumanii.

В целом регулярный анализ антибиотикограмм Acinetobacter baumanii, оценка распространенности антибиотикорезистентных штаммов в конкретных стационарах и определение молекулярно-генетических особенностей позволяют максимально правильно сформировать протоколы стартовой антимикробной терапии, провести выбор адекватного лечения пациенту, предотвратить тем самым передачу детерминант резистентности среди микроорганизмов и уменьшить количество госпитальных ацинетобактерий.

Список литературы

1. Воробьева О.Н., Камалеева М.Ф., Жилина Н.М., Чеченин Г.И., Челпанова Л.И. Этиологическая структура нозокомиальных инфекций у больных в отделении реанимации и интенсивной терапии // Рос. мед.-биол. вестн. им. акад. И.П. Павлова. – 2009. – №1. – С.33–38.

2. Гординская Н.А., Сабирова Е.В., Абрамова Н.В., Дударева Е.В., Склеенова Е.Ю., Некаева Е.С. Фенотипические и молекулярно-генетические особенности возбудителей раневой ожоговой инфекции // Клинич. микробиол. и антимикроб. химиотер. -2012. – Т.14, №4. – С.342–347.

3. Определение чувствительности бактерий к антибактериальным препаратам: клинические рекомендации МАКМАХ 2014. – Смоленск, 2014. – 154 с.

4. Сухорукова М.В., Эйдельштейн М.В., Склеенова Е.Ю., Иванчик Н.В., Тимохова А.В., Шек Е.А., Дехнич А.В., Козлов Р.С., Попов Д.А. Антибиотикорезистентность нозокомиальных штаммов Acinetobacter spp. в стационарах России: результаты многоцентрового эпидемиологического исследования МАРАФОН в 2011–2012 гг. //Клинич. микробиол. и антимикроб. химиотер. – 2014. – Т.16, №4. – С.266–272.

5. Boucher H.W., Talbot G.H., Bradley J.S., Edwards J.E., Gibet D., Rice L.B., Scheld M., Spellberg B., Bartlett J. Bad bugs, no drugs: no ESKAPE! An update from the Infections Diseases Society of America // Clin. Infect.Dis. – 2009, – Vol. 48, №1. P. 1–12.

6. Giamarellou H., Antoniadou A., Kanellakopoulou K. Acinetobacter baumanii: a universal threat to public health? // Int. J. Antimicrob. Agents. – 2006. – Vol.32, №2. – P.106–119.

7. Jurenaite M., Markuckas A., Suziedeliene E. Identification and characterization of type II toxin-antitoxin systems in the opportunistic pathogen Acinetobacter baumanii // J.Bacteriol. – 2013. – Vol.195, №14. – P. 3165–3172.

8. Perez F., Hujer A.M., Hujer K.M., Decker B.K., Rather P.N., Bonomo R.A. Global challenge of multidrug-resistant Acinetobacter baumanii // Antimicrob. Agents Chemother. – 2007. – Vol.51, N10. – P.3471–3484.

9. Visca P., Scifert H., Towner K.J. Acinetobacter infection – an emerging threant to human health // IUBMB Life. – 2011. – Vol.63, N12. – P.1048–1054.

10. Zarrilli R., Pournaras S., Giannoulli M., Tsackris A. Global evolution of multidrug-resistant Acinetobacter baumanii clonal lineages // Int.J.Antimicrob.Agents. – 2013. – Vol. 41, №1. – P.11–19.