ISSN 1817-7883 eISSN 2522-9354

DOI: 10.31393/reports-vnmedical-2018-22(2)-03
УДК: 615.33:579.84

ОСОБЛИВОСТІ ФОРМУВАННЯ РЕЗИСТЕНТНОСТІ ДО АНТИБІОТИКІВ У ГРАМНЕГАТИВНИХ НЕФЕРМЕНТУЮЧИХ БАКТЕРІЙ

Кондратюк В.М., Прокопчук З.М., Буркот В.М., Вовк І.М.
Вінницький національний медичний університет ім. М.І. Пирогова (вул. Пирогова, 56, м. Вінниця, Україна, 21018)

Відповідальний за листування:
e-mail: *kondratuk2007@gmail.com*

Статтю отримано 22 березня 2018 р.; прийнято до друку 27 квітня 2018 р.

Анотація. *Проблема розвитку антибіотикорезистентності патогенних мікроорганізмів до основних груп антибактеріальних препаратів переросла з медичної у соціально-економічну. Спостерігається зростання резистентності P.aeruginosa, A.baumannii, віднесених у групу грамнегативних неферментуючих бактерій (ГНБ), до антибіотиків, які використовують у медицині. Можливість набуття ГНБ резистентності до основних груп антибактеріальних препаратів пов'язана зі здатністю бактерій набувати нової генетичної інформації. Продукція метало-бета-лактамаз стає все більш поширеною проблемою резистентності до бета-лактамних антибіотиків ГНБ. Виявлення генів резистентності до бета-лактамних антибіотиків blaVIM, blaOXA 23, blaOXA 40, blaOXA 69 та blaOXA 100 здійснювали за допомогою полімеразної ланцюгової реакції в реальному часі (ПЛР-РЧ). Чутливість виділених штамів мікроорганізмів до антибіотиків досліджували з використанням стандартного дисково-дифузійного методу (ДДМ). Вплив меропенему на формування резистентності мікроорганізмів досліджували in vitro за методом пасажування мікроорганізмів на м'ясо-пептонному бульйоні (МПБ) з наростаючими концентраціями антибіотика. В процесі досліджень виділено і ідентифіковано 14 клінічних штамів P.aeruginosa та 30 штамів A.baumannii майже усі штами цих видів бактерій, характеризуються стійкістю до цефалоспоринів третього та четвертого покоління і антибіотиків-карбапенемів. При цьому три штами - носії маркерів продукції бета-лактамаз виявляли стійкість до карбапенемів, а один із штамів (P.aeruginosa №68), здатний до продукції МБЛ, за даними ДДМ був чутливим до карбапенемів і МБцК меропенему для нього дорівнювала 31,2 мкг/мл. Серед досліджених штамів A.baumannii 18 (60%) із 30 виділених виявились потенційними продуцентами бета-лактамаз, здатних інактивувати антибіотики карбапенемового ряду. При цьому тільки у 6 із 18 штамів виявляли стійкість до карбапенемів за даними ДДМ. Чутливість до карбапенемів виявили усі штами продуценти бета-лактамази OXA 69 та OXA 100 і три штами - OXA 23. У нашій роботі висвітленні сучасні уявлення про механізми розвитку резистентності ГНБ, що виділяються від пацієнтів лікувальних закладів м. Вінниці найбільш поширеними є продуценти бета-лактамаз типів OXA 23, OXA 69, OXA 100 та VIM.*

Ключові слова: *мікроорганізми, метало-бета-лактамази, антибіотикорезистентність.*

Вступ

Загальновизнаною тривожною тенденцією останніх років є істотне зростання у етіологічній структурі нозокоміальних інфекцій різної локалізації мікроорганізмів, віднесених у групу грамнегативних неферментуючих бактерій (ГНБ). Представники цієї групи бактерій поширені у оточуючому людину середовищі і набувають все більшого клінічного значення. Більшість із клінічно значимих ГНБ володіють великим ступенем генетичної спорідненості з бактеріями роду *Pseudomonas* і ще у 90-х роках минулого сторіччя у ньому і об'єднувались. З удосконаленням молекулярно-генетичних та інших методів диференціації у окремі роди були виділені Burkholderia, Acinetobacter, Stenotrophomonas. Важливою спільною ознакою бактерій перерахованих родів є безмежний адаптивний потенціал, що виявляється високою витривалістю до дії антибіотиків, антисептиків і дезінфектантів і здатністю до швидкої колонізації предметів лікарняного середовища.

У 2017 р. Всесвітньою організацією охорони здоров'я у список стійких до дії антибіотиків "пріоритетних патогенів", що несуть найбільшу загрозу для здоров'я людини, включено 12 видів бактерій. З їх числа у групу з критично високим рівнем пріоритетності віднесено *Acinetobacter baumannii, Pseudomonas aeruginosa,* стійкі до карбапенемів. Ці мікроорганізми найчастіше викликають важкі ранові інфекції, смертельні вентилятор-асоційовані пневмонії, катетер-асоційовані септичні стани. При цьому, майже усі штами цих видів бактерій, що виділяють у клініках, характеризуються стійкістю до цефалоспоринів третього та четвертого покоління і антибіотиків-карбапенемів, здатністю формувати нові механізми резистентності [3].

Основним механізмом формування стійкості ГНБ до бета-лактамних антибіотиків (БЛА) є продукція бета-лактамаз, які зв'язуючись з молекулами БЛА запускають гідроліз амінного зв'язку лактамного кільця, що призводить до інактивації молекул антибіотика. Відомо уже понад 500 відмінних за молекулярною структурою бета-лактамаз, які поділені на 4 класи і мають генетичні маркери. Штами-продуценти різних бета-лактамаз мають особливості у біологічних характеристиках та географічній поширеності [1]. Являє інтерес дослідження особливостей біологічних характеристик ГНБ, що є продуцентами бета-лактамаз різних типів.

Метою дослідження було виявлення продуцентів бета-лактамаз різних типів серед штамів ГНБ, що ви-

©Вінницький національний медичний університет ім. М.І. Пирогова

діляються у пацієнтів лікувальних закладів м.Вінниці та дослідження особливостей формування стійкості у них до антибіотиків.

Матеріали та методи

Матеріал для виділення ГНБ забирали у пацієнтів, що лікувалися в опіковому відділенні Вінницької обласної клінічної лікарні ім. М. І. Пирогова. А також, використовувалися штами, що були виділенні від поранених, які отримали мінно-вибухові травми з локалізацією в нижніх кінцівках. Пораненні брали участь в антитерористичній операції на сході України, проходили лікування у військово-медичному клінічному центрі міста Вінниці. Забір матеріалу, його транспортування проводили відповідно існуючих вимог до доставки матеріалу для бактеріологічних досліджень. Виділення чистих культур збудників, їх ідентифікацію, оцінку клінічної значимості проводили за загальновживаними методами в бактеріологічній лабораторії Вінницького національного медичного університету ім. М. І. Пирогова. Ідентифікацію мікроорганізмів проводили з урахуванням морфологічних, тинкторіальних, культуральних та біохімічних властивостей. Біохімічні властивості виділених штамів ГНБ визначали за допомогою тест-систем НЕФЕРМтест 24.

Виявлення генів резистентності до бета-лактамних антибіотиків blaVIM, blaOXA 23, blaOXA 40, blaOXA 69 та blaOXA 100 здійснювали за допомогою полімеразної ланцюгової реакції в реальному часі (ПЛР-РЧ). Бактеріальну ДНК виділяли за допомогою набору ДНК-експрес (НПФ "Литех") відповідно до інструкції виробника. Ампліфікацію відповідної ділянки досліджуваних генів проводили на ампліфікаторі BioRad IQ-5 використовуючи набори формату Флуоропол-РВ (НПФ "Литех"). Для детекції продуктів ампліфікації використовували канали FAM (специфічний сигнал) та HEX (внутрішній контроль). Режим ампліфікації: початкова денатурація - 94˚, 90 с, 40 циклів: денатурація - 94˚, 10 с, віджиг праймерів - 62˚, 10 с, елонгація - 72˚, 20 с.

Чутливість виділених штамів мікроорганізмів до антибіотиків досліджували з використанням стандартного диско-дифузійного методу (ДДМ). Мінімальні бактеріостатичні (МБсК) та бактерицидні (МБцК) концентрації антибіотиків визначали методом послідовних серійних розведень антибіотиків у рідкому поживному середовищі [2].

Швидкість формування резистентності мікроорганізмів до меропенему досліджували in vitro за методом пасажування мікроорганізмів у м'ясо-пептонному бульйоні (МПБ) з наростаючими концентраціями антибіотика. Для цього готували ряд послідовних двократних розведень меропенему у пробірках з м'ясо-пептонним бульйоном (МПБ). В пробірки вносили досліджувану культуру бактерій і інкубували протягом 24 годин в термостаті при температурі 37˚С. Після чого визначали в ряду пробірку з максимальною концентрацією антибіотика, в якій не спостерігається бактеріостатичної дії антибіотика і використовували її вміст у якості інокуляту для наступного пасажу. Паралельно у кожному пасажі визначали мінімальну бактерицидну концентрацію (МБцК) меропенему шляхом висіву вмісту пробірок, у яких візуально росту бактерій не відмічалось, на м'ясо-пептонний агар.

Результати. Обговорення

У процесі досліджень виділено і ідентифіковано 14 клінічних штамів *Pseudomonas aeruginosa* та 30 штамів *Acinetobacterium baumannii.* У процесі визначення чутливості виділених штамів псевдомонад до карбапенемів за допомогою ДДМ було встановлено, що рівно половина з них є стійкими до антибіотиків цього ряду. Кількісне дослідження показало, що МБцК меропенему для штамів, які за даними ДДМ є чутливими до карбапенемів, становить 31,2-62,5 мкг/мл. Показник МБцК цього препарату для штамів, що за даними ДДМ були стійкими, коливався в діапазоні від 200 мкг/мл до 2000 мкг/мл.

За результатами ПЛР у чотирьох штамів паличок синьо-зеленого гною було виявлено генетичні маркери резистентності до БЛА, а саме: ОХА 40, та у трьох випадках - метало-бета-лактамаз (МБЛ) типу VIM. Безумовно, обмеженням дослідження була відсутність технічної можливості для визначення більш широкого переліку генетичних маркерів продукції бета-лактамаз різних типів, що ускладнює розуміння механізмів резистентності у всіх випадках наявності її фенотипового прояву. При цьому три штами-носії маркерів продукції бета-лактамаз виявляли стійкість до карбапенемів, а один із штамів (*P aeruginosa* №68), здатний до продукції МБЛ, за даними ДДМ був чутливим до кар-

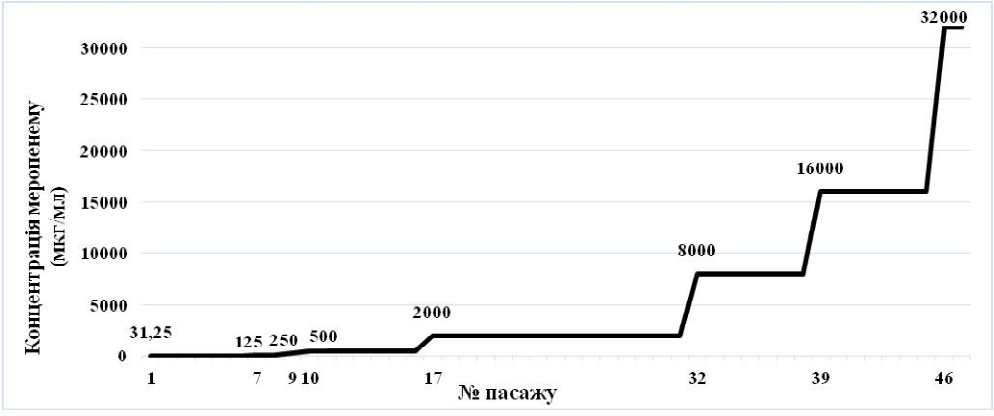


Рис. 1. Характеристика швидкості зростання стійкості до меропенему у *P.aeruginosa* № 68.

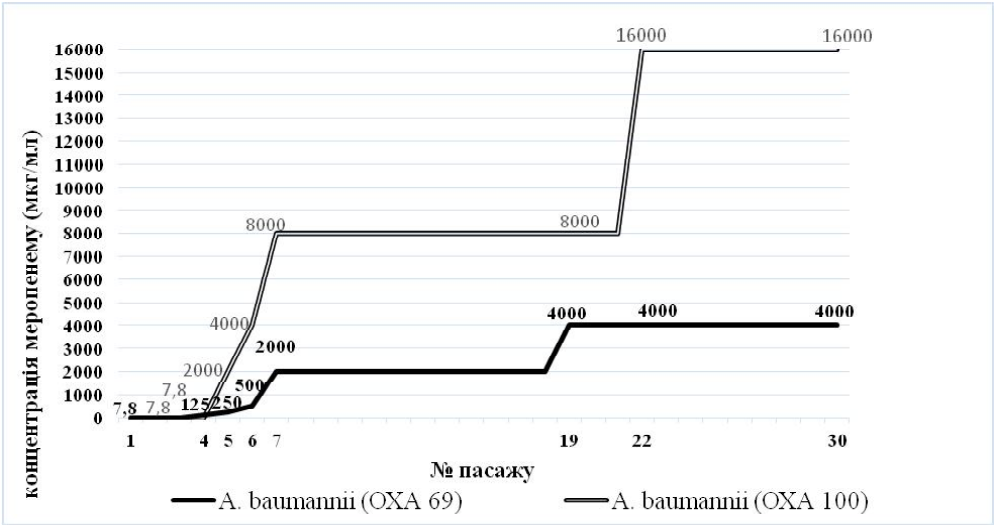


Рис. 2. Характеристика швидкості зростання стійкості до меропенему у штамів *A.baumannii*, з різними генетичними маркерами продукції бета-лактамаз.

бапенемів і МБцК меропенему для нього дорівнювала 31,2 мкг/мл. Було цікаво дослідити швидкість експресії генетично детермінованої ознаки в штучних умовах. Швидкість формування стійкості до меропенему у штаму *P.aeruginosa* № 68 відображено на рис. 1.

Зміни чутливості псевдомонад до меропенему в процесі культивування в наростаючих концентраціях антибіотика відбувались стрибкоподібно: до шостого пасажу показник МБцК антибіотика тримався на вихідному рівні, на IV пасажі - зріс у 4 рази. Після ряду подібних стрибкоподібних змін культура на 46-му пасажі набула здатності зберігати фізіологічну активність в присутності 32000 мкг/мл меропенему. Подальше пасажування не призвело до зростання МБцК меропенему. Таким чином, субстратна індукція генетично детермінованої здатності до продукції МБЛ у дослідженого штаму псевдо монад збільшила стійкість мікробної популяції до антибіотика карбапенемового ряду більш ніж у 1000 разів. Слід зазначити, що паралельно зростанню стійкості до меропенему у штаму *P.aeruginosa* № 68 з'явилась резистентність до аміноглікозидного антибіотика амікацину без змін чутливості до антибіотиків інших груп.

Серед досліджених штамів A.baumannii 8 виявились продуцентами бета-лактамази OXA 23, 5 штамів - OXA 69, 4 штами - OXA 100 і один штам - OXA 40, то б то 18 (60%) із 30 виділених штамів акінетобактерій виявились потенційними продуцентами бета-лактамаз, здатних інактивувати антибіотики карбапенемового ряду. При цьому тільки у 6 із 18 штамів виявляли стійкість до карбапенемів за даними ДДМ. Чутливість до карбапенемів виявили усі штами продуценти бета-лактамази OXA 69 та OXA 100 і три штами - OXA 23.

Пасажування штамів акінетобактерій з детермінантами бета-лактамазопродукції, що первинно не виявляли стійкості до карбапенемів, у середовищі з наростаючими концентраціями меропенему показало, що у продуцентів OXA 100 показник фенотипової реалізації генетично детермінованої ознаки стійкості до карбапенемів (МБцК меропенему) зростає швидше і рівень стійкості сягає вищих показників, ніж у продуцентів OXA 69 (рис. 2).

Дослідження чутливості адаптованих до існування в присутності високих концентрацій меропенему штамів акінетобактерій показало, що у наслідок штучної адаптації цими штамами було втрачено стійкість до ріфампіцину та моксіфлоксацину.

Висновки та перспективи подальших розробок

1. Серед полірезистентних до антибіотиків штамів неферментуючих грамнегативних паличок, що виділяються від пацієнтів лікувальних закладів м. Вінниці найбільш поширеними є продуценти бета-лактамаз типів OXA 23, OXA 69 та OXA 100. Тривожною тенденцією слід вважати появу серед госпітальних контамінант штамів псевдомонад, здатних до продукції металло-бета-лактамаз типу VIM, які відомі високим рівнем резистентності до більшості антибіотиків і швидким поширенням у госпітальному середовищі.

Подальші дослідження властивостей штамів неферментуючих бактерій, що є носіями генетичних маркерів різних механізмів резистентності до антибіотиків, посилить об'єктивність епідеміологічного прогнозування та відкриє нові можливості вибору ефективних засобів боротьби з ними.

Список посилань

1. Дуда, О. К., Горбаль, Н. Б. & Масалітіна, О. В. (2015). Роль бета-лактамаз у формуванні антибіотикорезистентності. *Ліки України*, 5 (191), 4-8.
2. Методичні вказівки МВ 9.9.5-143-2007. *Визначення чутливості мікроорганізмів до антибактеріальних препаратів.* Київ: МОЗ України (2007).
3. Global priority list of antibiotic-resistant bacteria to guide research, discovery, and development of new antibiotics. *The World Health Organization.* Взято з URL: http://www.who.int/medicines/publications/global-priority-list-antibiotic-resistant-bacteria/en/ (Publication date: 27 February 2017).

Referenses

1. Duda, O. K., Horbal, N. B. & Masalitina, O. V. (2015). Rol beta-

laktamaz u formuvanni antybiotykorezystentnosti. [The role of beta-lactamases in the formation of antibiotic resistance]. *Liky Ukrainy - Medications of Ukraine*, 5 (191), 4-8.
2. Metodychni vkazivky MV 9.9.5-143-2007. *Vyznachennia chutlyvosti mikroorhanizmiv do antybakterialnykh preparative [Guidance MB 9.9.5-143-2007. Determination of the sensitivity of microorganisms to antibacterial drugs].* Kyiv: MOZ Ukrainy (2007).
3. Global priority list of antibiotic-resistant bacteria to guide research, discovery, and development of new antibiotics. *The World Health Organization.* Retrieved from URL: http://www.who.int/medicines/publications/global-priority-list-antibiotic-resistant-bacteria/en/ (Publication date: 27 February 2017).

Кондратюк В. Н., Прокопчук З. Н., Буркот В. М., Вовк И.Н.

ОСОБЕННОСТИ ФОРМИРОВАНИЯ РЕЗИСТЕНТНОСТИ К АНТИБИОТИКАМ У ГРАМОТРИЦАТЕЛЬНЫХ НЕФЕРМЕНТИРУЮЩИХ БАКТЕРИЙ

Аннотация. *Проблема развития антибиотикорезистентности патогенных микроорганизмов к основным группам антибактериальных препаратов переросла из медицинской в социально-экономическую. Наблюдается рост резистентности P.aeruginosa, A.baumannii, отнесенных в группу грамотрицательных неферментирующих бактерий (ГНБ) к антибиотикам, которые используют в медицине. Возможность приобретения ГНБ резистентности к основным группам антибактериальных препаратов связана со способностью бактерий приобретать новую генетическую информацию. Продукция металло-бета-лактамаз становится все более распространенной проблемой резистентности к бета-лактамным антибиотикам ГНБ. Выявление генов резистентности к бета-лактамным антибиотикам blaVIM, blaOXA 23 blaOXA 40, blaOXA 69 и blaOXA 100 проводили с помощью полимеразной цепной реакции в реальном времени (ПЦР-РВ). Чувствительность выделенных штаммов микроорганизмов к антибиотикам исследовали с использованием стандартного диско-диффузионного метода (ДДМ). Влияние меропенема на формирование резистентности микроорганизмов исследовали in vitro с помощью метода пассажирования микроорганизмов в мясо-пептонному бульоне (МПБ) с нарастающими концентрациями антибиотика. В процессе исследований выделено и идентифицировано 14 клинических штаммов P.aeruginosa и 30 штаммов A.baumannii, почти все штаммы этих видов бактерий, характеризовались устойчивостью к цефалоспоринам третьего и четвертого поколения и антибиотикам-карбапенемам. При этом три штамма-носителя маркеров продукции бета-лактамаз проявляли устойчивость к карбапенемам, а один из штаммов (P.aeruginosa №68), способный к продукции МБЛ, по данным ДДМ был чувствительным к карбапенемам и МБцК меропенема для него равнялась 31,2 мкг / мл. Среди исследованных штаммов A.baumannii 18 (60%) из 30 выделенных оказались потенциальными продуцентами бета-лактамаз, способных инактивировать антибиотики карбапенемного ряда. При этом только 6 из 18 штаммов проявляли устойчивость к карбапенемам по данным ДДМ. Чувствительность к карбапенемам демонстрировали все штаммы продуценты бета-лактамазы ОХА 69 и ОХА 100 и три штамма - ОХА 23. В нашей работе освещены современные представления о механизмах развития резистентности ГНБ, выделяемых от пациентов лечебных заведений Винницы, наиболее распространены продуценты бета-лактамаз типов ОХА 23 ОХА 69, ОХА 100 и VIM.*

Ключевые слова: *микроорганизмы, металло-бета-лактамазы, антибиотикорезистентность.*

Kondratuk V.M., Prokopchuk Z.M, Burkot V.M., Vovk I.M.

FEATURES OF RESISTANCE FORMATION OF GRAM-NEGATIVE NON-FERMENTING BACTERIA TO ANTIBIOTICS

Annotation. *The problem of the antibiotic resistance development of pathogenic microorganisms to the main groups of antibacterial drugs has evolved from medical to socio-economic. There is a resistance increase of P.aeruginosa, A.baumannii belonging to the group of gram-negative non-fermenting bacteria (GNB), to antibiotics that are used in medicine. The possibility of acquiring GNB resistance to the main groups of antibacterial drugs is related to the ability of bacteria to acquire new genetic information. The production of metal-beta-lactamase by GNB become a widespread problem of resistance to beta-lactam antibiotics. Detection of resistance genes to beta-lactam antibiotics blaVIM, blaOXA 23, blaOXA 40, blaOXA 69 and blaOXA 100 was performed using real time polymerase chain reaction (PCR-RT). Sensitivity of isolated strains of microorganisms to antibiotics was investigated using the standard disco-diffusion method (DDM). Influence of meropenem on formation of microorganism resistance was investigated in vitro by method of microorganisms passage on meat-peptone broth (MPB) with increasing concentrations of antibiotics. In the process of research, 14 clinical strains of P. aeruginosa and 30 strains of A.baumannii were isolated and identified, almost all strains of these types of bacteria, characterized by resistance to antibiotics-carbapenems and third and fourth generation of cephalosporins. At the same time, the three strain-carries of markers of beta-lactamase products exhibited resistance to carbapenems, and one of the strains (P.aeruginosa No. 68) was capable of producing MBL, according to DDM, was sensitive to carbapenems and MCC was 31.2 ?g / ml for it. Among the investigated strains of A.baumannii 18 (60%) out of 30 isolated ones were potential producers of beta-lactamases, capable of inactivating carbapenem antibiotics. In this case, only 6 out of 18 strains showed resistance to carbapenems according to DDM. Sensitivity to carbapenems revealed all strains of the beta-lactamase producers OXA 69 and OXA 100 and three strains - OXA 23. In this work, modern ideas about the mechanisms of development of resistance of GNB were described, isolated from patients of medical institutions (Vinnytsa city), the most common are producers of beta-lactamase types of OXA 23, OXA 69, OXA 100 and VIM.*

Keywords: *microorganisms, metal-beta-lactamase, antibiotic resistance.*