

ФЕНОТИПОВІ І ГЕНОТИПОВІ ДЕТЕРМІНАНТИ АНТИБІОТИКОРЕЗИСТЕНТНОСТІ ГРАМНЕГАТИВНИХ БАКТЕРІЙ – ЕТИОЛОГІЧНИХ ЧИННИКІВ ІНФЕКЦІЙНИХ УСКЛАДНЕНЬ БОЙОВИХ РАН

В.П. Ковальчук, В.М. Кондратюк, І.М. Коваленко, В.М. Буркот

Вінницький національний медичний університет ім. М. І. Пирогова,
вул. Пирогова, 56, Вінниця, 21018, Україна
e-mail: kovalenko.in@gmail.com

Серед збудників інфекційних ускладнень бойових поранень в сучасності домінує резистентна до антибіотиків грамнегативна мікрофлора. В процесі вибору та прогнозування ефективності лікувальних заходів важливими є дані не лише щодо фенотипових проявів стійкості до антибіотиків, але й їх генетичних детермінант. Дані генетичного аналізу допоможуть визначити механізми, за рахунок яких реалізовано стійкість до антибіотиків, встановити гени, що знаходяться в неактивному стані, але потенційно можуть компрометувати ефективність антибіотиків. Інформація про розповсюдження генів антибіотикорезистентності дозволить визначити тенденцію зміни епідемічної ситуації в системі медичної евакуації та допомоги пораненим, розробити профілактичні та протиепідемічні заходи. **Мета.** Визначити фенотипові прояви і генетичні детермінанти антибіотикорезистентності грамнегативних бактерій – збудників інфекційних ускладнень бойових поранень у сучасному військовому конфлікті в Україні. **Методи.** Визначення фенотипу резистентності 18 штамів грамнегативних бактерій – збудників інфекційних ускладнень бойових поранень – проводили автоматичним методом з використанням трьох комерційних тест-систем відповідно до рекомендацій Clinical and Laboratory Standards Institute. Визначення первинної структури нуклеотидних послідовностей штамів проводили з використанням методу сіквенування «нового покоління» (next-generation sequencing) на платформі Applied biosystems/life technologies. Порівняння виділених нуклеотидних послідовностей проводили по базі GenBank® за технологію Basic Local Alignment Search Tool. **Результати.** Загалом у досліджуваних мікроорганізмів ідентифіковано 47 окремих генів антибіотикорезистентності. Серед *Acinetobacter baumannii* виявлено носіїв генів β -лактамаз класів blaTEM-1B та blaOXA-2, blaOXA-24, blaPER-1. Усі штами *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter cloacae* та *Pseudomonas aeruginosa* містили детермінанти β -лактамаз вузького спектру. Ген blaCTX-M-15, що кодує β -лактамазу розширеного спектру, виявлено у *K. pneumoniae* та у всіх ізолятів *E. cloacae*. Продукентами карбапенемаз виявилися *A. baumannii*, *E. cloacae* та *K. pneumoniae*. У *A. baumannii* цей фенотип був асоційований з геном blaOXA-23 та blaOXA-24, у ентеробактерій – з геном blaOXA-48. **Висновки.** Досліджені штами мікроорганізмів виявляють полірезистентні фенотипи. Геном цих штамів містить гени, що зумовлюють стійкість до карбапенемів, аміноглікозидів, низьку ефективність фторхінолонів та незахищених цефалоспоринов, що пояснює асоційовану резистентність до антибіотиків з різним механізмом протимікробної дії. Одержані дані доцільно використовувати в процесі розробки практичних рекомендацій з раціонального застосування антибіотиків при лікуванні інфекційних ускладнень бойових поранень.

Ключові слова: грамнегативні бактерії, резистентність до антибіотиків, генетичні детермінанти, інфекційні ускладнення, бойові поранення.

Проблема антибіотикорезистентності умовно патогенних мікроорганізмів має глобальний характер і в розвинутих країнах світу давно розглядається як загроза національній безпеці [1]. Антибіотикорезистентні мікроорганізми формуються і циркулюють в стаціонарах, набувають додаткових детермінант стійкості і завдяки чисельним факторам можуть передаватись від пацієнта до пацієнта, викликаючи гнійно-запальні захворювання і навіть спалахи інфекцій.

Слід відзначити, що, на відміну від природної стійкості до антибіотиків, яка прогнозована і є постійною видовою ознакою певного виду мікроорганізмів, набута антибіотикорезистентність мікроорганізмів контролюється генами, що можуть передаватись як в межах окремих популяцій, так і на міжпопуляційному рівні [2]. Тому на сьогодні стійкість мікроорганізмів до антибіотиків розглядається як епідемія генів антибіотикорезистентності.

Для прогнозування розвитку стійкості умовно патогенних мікроорганізмів до антибіотиків, а також розповсюдження генів антибіотикорезистентності важливими є дані щодо наявності останніх в штаммах мікроорганізмів, що викликають гнійно-запальні захворювання у людей. Це дозволить визначити тенденцію зміни епідемічної ситуації, розробити профілактичні та протиепідемічні заходи, які дозволять запобігти спалахам внутрішньолікарняних інфекцій, а також удосконалити стратегію і тактику застосування антибіотиків для лікування пацієнтів. Крім того, дані порівняльного аналізу фенотипових ознак стійкості мікроорганізмів до антибіотиків (профілів антибіотикорезистентності) із наявністю в їх геномі певних генів антибіотикорезистентності допоможе прогнозувати можливу експресію генів, що знаходяться в неактивному стані.

Такі дослідження особливо актуальні в країнах, де відбуваються військові конфлікти, а тому підвищується кількість пацієнтів з ранами різної тяжкості, які інфікуються мікроорганізмами, зокрема стійкими до антибіотиків. Особливістю надання медичної допомоги в збройних конфліктах є переміщення поранених, що створює умови для неконтрольованого виносу таких штамів мікроорганізмів за межі стаціонарів, їх розповсюдження у закладах системи медичної допомоги [3]. Тому для прогнозування епідемічної ситуації та розробки протиепідемічних заходів, зокрема емпіричної антибіотикотерапії, в кожному конкретному госпіталі і навіть відділенні важливим є постійний моніторинг не лише видового складу і рівнів стійкості до антибіотиків збудників гнійно-запальних захворювань поранених, але й генів, що кодують цю стійкість. В деяких розвинутих країнах, зокрема в США, навіть створено репозитарії, де збираються і зберігаються штами збудників гнійно-запальних ускладнень бойових поранень з множинною стійкістю до антибіотиків, досліджується повний геном цих штамів, виявляються гени стійкості до антибіотиків, розробляються прогнози розвитку стійкості до антимікробних препаратів, а також заходи щодо попередження розвитку антибіотикорезистентності госпітальних штамів і їх розповсюдження.

Метою даної роботи було визначити фенотипові і генотипові детермінанти антибіотикорезистентності грамнегативних бактерій – збудників інфекційних ускладнень бойових поранень у сучасному військовому конфлікті в Україні.

Матеріали і методи. Об'єктом досліджень були 10 штамів *Acinetobacter baumannii*, 4 – *Enterobacter cloacae*, 3 – *Klebsiella pneumoniae*, 1 – *Pseudomonas aeruginosa*, що виділені з інфікованих ран верхніх та нижніх кінцівок пацієнтів, які лікувались в Військово-медичному клінічному центрі Центрального регіону України.

Визначення фенотипу резистентності проводили автоматичним методом за значеннями мінімальної бактерицидної концентрації (МБЦК) антибіотиків з використанням трьох різних комерційних систем відповідно до рекомендацій CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute). Чутливість неферментуючих грамнегативних бактерій визначали до амікацину, азтреонаму, цефепіму, цефтазидиму, цефтріаксону, ципрофлоксацину, гентаміцину, іміпенему, левофлоксацину, меропенему, тігецикліну, тобраміцину, триметоприм-сульфаметоксазолу, піперацилін-тазобактаму; ентеробактерій – до 18 антибіотиків, а саме: амікацину, амоксицилін/клавулонової кислоти, ампіцилін/сульбактаму, ампіциліну, азтреонаму, цефазоліну, цефепіму, цефтазидиму, цефтріаксону, ципрофлоксацину, ертапенему, гентаміцину, іміпенему, левофлоксацину, меропенему, тетрацикліну, тігецикліну, тобраміцин, триметоприм-сульфаметоксазолу, піперацилін-тазобактаму. В роботі наводяться фенотипи чутливості з урахуванням результатів визначення мінімальної бактерицидної концентрації досліджуваних антибіотиків з усіх трьох досліджень.

Визначення первинної структури нуклеотидних послідовностей штамів проводили у репозитарії полірезистентних мікроорганізмів Військового інституту досліджень ім. Волтера Ріда (США) з використанням методу сіквенування «нового покоління» (next – generation sequencing) на платформі Applied biosystems/life technologies (SOLiD system) [4]. Порівняння виділених нуклеотидних послідовностей проводили по базі GenBank® у Національному центрі біотехнології та інформації (National Center for Biotechnology Information (NCBI) [5] за технологією BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) [6]. Нові послідовності, отримані від представлених мікроорганізмів, внесені в цю ж базу даних.

Результати. За даними, опублікованими нами раніше, серед збудників хірургічної ранової інфекції у поранених в сучасному військовому конфлікті в Україні домінують грамнегативні умовно патогенні мікроорганізми, а саме ентеробактерії і неферментуючі грамнегативні бактерії, що проявляли стійкість до кількох класів антибактеріальних препаратів одночасно [7].

У зв'язку з цим нами відібрано 18 штамів цих груп мікроорганізмів, а саме: 10 – *Acinetobacter baumannii*, 4 – *Enterobacter cloacae*, 3 – *Klebsiella pneumoniae*, 1 – *Pseudomonas aeruginosa*, що за профілями антибіотикорезистентності відносились до полірезистентних (стійких до 3 і більше антибіотиків) і превалювали серед досліджених раніше штамів цих видів бактерій. Загалом у досліджуваних мікроорганізмів ідентифіковано 47 окремих генів антибіотикорезистентності, а саме: *aac(3)-Ia*, що зумовлює стійкість до гентаміцину; *aac(6')-Ib* – амікацину та тобраміцину; *ant(3'')-Ia* – стрептоміцину; *ant(2'')-Ia* – гентаміцину, канаміцину, тобраміцину; *aph(3')-Ib*, *aph(3')-Ic*; *aph(3')-Via* і *aph(3')-Vib* – канаміцину; *aph(6)-Id* – стрептоміцину; *armA* – до всіх клінічно значущих аміногліко-

зидів; *blaADC-25*, *blaTEM-1B* і *blaTEM-1D* – до пеніцилінів і цефалоспоринових I-II поколінь; *blaGES-11*, *blaOXA-23*, *blaOXA-48* і *blaOXA-72* – карбапенемів; *blaOXA-1*, *blaOXA-50* і *blaPAO* – клоксациліну; *blaOXA-66*, *blaOXA-69* і *blaOXA-100* – клоаксіциліну, карбапенемів; *blaPER-1* і *blaCTX-M-15* – широкого спектру цефалоспоринових, монобактамів; *blaACT-16* і *blaACT-7* – цефалоспоринових; *blaSHV-11* – пеніцилінів, цефалоспоринових; *mph(E)*, *msr(E)* і *ere(A)* – макролідів; *catA1*, *cmlA1* і *catA7* – феніколідів; *sul1*, *sul2* і *sulI* – сульфаніламідів; *tet(A)* і *tet(B)* – тетрациклінів; *dfrA12*, *dfrA5*, *dfrA7*, а також *dfrA14* – триметоприму; *fosA* – фосфоміцину; *oqxA* і *oqxB* – хінолонів I-II покоління; *qnrB1* – хінолонів.

Встановлено, що усі досліджувані штами *A. baumannii*, а також штаму *P. aeruginosa* виявились стійкими до 3–9 антибіотиків, що на сьогодні рекомендовані для лікування інфекцій, етіологічним чинником яких є неферментуючі грамнегативні бактерії (табл. 1). Рівні стійкості до антибіотиків варіювали в залежності від досліджуваного штаму. Найбільш стійкими виявились штами 001, 28, 81 та 133, що були резистентними одночасно до гентаміцину, амікацину, цефтазидиму, цефтріаксону, імipенему та меропенему, тобто препаратів першого вибору при лікуванні інфекцій, етіологічним чинником яких є неферментуючі грамнегативні бактерії. Крім того, ці штами були стійкими до антибіотиків резерву – цефепіму, азтреонаму і левофлоксацину, а штаму 133 ще до тобраміцину.

Гени штаму *A. baumannii* повністю відповідали фенотипу, встановленому у тесті на чутливість до антибіотиків. Резистентність до карбапенемів у штаму 001 була асоційована з геном *blaOXA-23*, тоді як у штаму 133 це було зумовлене варіантом *blaOXA-72* гена *blaOXA-24*. Слід відзначити, що штаму 133 також містить ген *armA*, який обумовлює стійкість до аміноглікозидів. Це співпадає з фенотиповим профілем резистентності цього штаму. Стійкість штаму 28 та 81 до гентаміцину і тобраміцину зумовлена геном *ant(2'')-Ia*, а до цефалоспоринових – завдяки наявності в геномі генів *blaOXA-100*, *blaOXA-69*, що контролюють синтез кількох β-лактамаз. Загалом у 10 ізолятів *A. baumannii* було виявлено 28 генів резистентності, більшість яких кодує синтез β-лактамаз або ензимів, що модифікують аміноглікозиди.

Штаму *P. aeruginosa* 086 був резистентним до 8 з 12 досліджених антибіотиків. При цьому він зберігав чутливість до меропенему, азтреонаму, цефепіму та цефтазидиму. Стійкість до імipенему проявлялась не за рахунок набутих генетичних детермінант, а була зумовлена іншими адаптивними механізмами, що підтверджено результатами сіквенування геному: виявлено дві слабкі β-лактамази, які не забезпечують стійкості до карбапенемів. У цього ізоляту були наявними лише 5 генів резистентності.

За результатами визначення чутливості *E. cloacae* до антибіотиків всі чотири ізоляти характеризувались полірезистентним фенотипом і були стійкими до 10 – 13 з дев'ятнадцяти досліджених хіміопрепаратів (табл. 2). Штами *E. cloacae* 005 і 040 були стійкими до ертапенему, до того ж штаму 040 виділявся підвищеною стійкістю до імipенему та меропенему. Всі 4 ізоляти були резистентними до цефалоспоринових антибіотиків третього та четвертого поколінь.

**Стойкість до антибіотиків і гени антибіотикорезистентності
штамів неферментуючих грамнегативних бактерій**

Номер штаму	Профіль антибіотико-резистентності	Детермінанти стійкості до антибіотиків
<i>A. baumannii</i>		
001	T U I O P A S D F	<i>aac(3)-Ia; ant(3'')-Ia; aph(3')-Vib; blaADC-25; blaOXA-66; blaOXA-72; blaPER-1; sul1</i>
8	I O P D	<i>ant(2'')-Ia; blaADC-25; blaOXA-69; sul2</i>
28	T U I O P A D J	<i>aac(6')-Ib; ant(2'')-Ia; aph(3')-Via; aph(6)-Id; blaADC-25; blaGES-11; blaOXA-100; cmlA1; sul1; dfrA7</i>
81	T U I O P A S D J	<i>ant(2'')-Ia; aph(3')-Via; blaADC-25; blaOXA-69; catA1; sul2; tet(B)</i>
85	U I O P A D J	<i>ant(2'')-Ia; blaADC-25; blaOXA-69; sul2</i>
130-1	U P A D	<i>blaADC-25; blaOXA-100</i>
130-2	U P A D	<i>blaADC-25; blaOXA-100</i>
132	P A D	<i>aph(3')-Via; blaADC-25; blaOXA-100</i>
133	T U O P A S D F J	<i>aac(3)-Ia; ant(3'')-Ia; ant(2'')-Ia; aph(3')-Via; armA; blaADC-25; blaOXA-23; blaOXA-69; blaTEM-1D; mph(E); msr(E); sul1; dfrA12</i>
134	T U I O P A D	<i>aph(3')-Ic; blaADC-25; blaOXA-69; catA1; sul2</i>
<i>P. aeruginosa</i>		
086	O P S D G H J L	<i>aph(3')-IIb; blaOXA-50; blaPAO; fosA; catA7</i>

Примітка: Q – амікацин; T – азтреонам; U – цефепім; I – цефтазидим; O – цефтріаксон; P – ципрофлоксацин; A – гентаміцин; S – іміпенем; D – левофлоксацин; F – меропенем; H – тігециклін; J – тобраміцин; K – триметоприм-сульфаметоксазол; L – піперацилін-тазобактам.

Ідентифікація генетичних маркерів резистентності у штамів *E. cloacae* дозволила виявити наявність в їх геномі 18 різних генів стійкості, що відповідало встановленому фенотипу. Всі ізоляти містили глобально розповсюджений ген β-лактамази розширеного спектру *blaCTX-M-15*, що пояснювало стійкість досліджених штамів до азтреонаму та всіх антибіотиків третього і четвертого поколінь групи цефалоспоринів.

Штам 040 містив ген карбапенемази *blaOXA-48*, який відповідає за підвищену стійкість до іміпенему та меропенему. Генетичний профіль резистентності штамів 040 та 005 повністю співпадав, за винятком гена *blaOXA-48*, якого не було у штаму 005. Проте цей ізолят містив детермінанту *blaOXA-48*, локалізовану у плазміді, яка може передаватись іншим бактеріям.

Чутливість до антибіотиків трьох ізолятів *K. pneumoniae* значно варіювала. Штам 010 характеризувався чутливістю до всіх препаратів окрім ампіциліну. На противагу цьому інші два штами були стійкими до більшості антибіотиків, а штам 086 відрізнявся стійкістю до всіх досліджених карбапенемів (ертапенем, іміпенем та меропенем). Результати генетичного аналізу відповідали встановленому фенотипу. Ідентифіковано 18 різних генів стійкості, при цьому носієм 17 з них був штам 086. Резистентність до карбапенемів у цього штаму обумовлювалась геном *blaOXA-48*, що

кодує карбапенемазу, яка локалізована на трансмісивній плазміді. Цей самий ген був визначений у *E. cloacae* 040. Ген *bla*CTX-M-15, що кодує потужну β-лактамазу розширеного спектру, виявлено у двох з трьох досліджених ізолятів. Майже панрезистентний фенотип *K. pneumoniae* 131 також був відображений у його геномі.

Таблиця 2

Чутливість до антибіотиків штамів ентеробактерій

Номер штаму	Профіль антибіотико-резистентності	Детермінанти стійкості до антибіотиків
<i>E. cloacae</i>		
5	WERTYUIOPZDK	<i>bla</i> ACT-16; <i>bla</i> CTX-M-15; <i>fosA</i> ; <i>ere(A)</i> ; <i>oqxA</i> ; <i>oqxB</i> ; <i>sull</i> ; <i>dfrA14</i>
40	WERTYUIOPZDFK	<i>bla</i> ACT-16; <i>bla</i> CTX-M-15; <i>bla</i> OXA-48; <i>fosA</i> ; <i>ere(A)</i> ; <i>oqxA</i> ; <i>oqxB</i> ; <i>sull</i> ; <i>dfrA14</i>
043	WERTYUIOPDGJK	<i>ant(3'')-Ia</i> ; <i>aac(6')Ib-cr</i> ; <i>bla</i> ACT-7; <i>bla</i> CTX-M-15; <i>bla</i> OXA-1; <i>bla</i> TEM-1B; <i>fosA</i> ; <i>catA1</i> ; <i>oqxA</i> ; <i>oqxB</i> ; <i>qnrB1</i> ; <i>sull</i> ; <i>tet(A)</i> ; <i>dfrA5</i>
052	WERTYUIOPD	<i>ant(3'')-Ia</i> ; <i>bla</i> ACT-7; <i>bla</i> CTX-M-15; <i>bla</i> TEM-1B; <i>fosA</i> ; <i>oqxA</i> ; <i>oqxB</i> ; <i>sull</i>
<i>K. pneumoniae</i>		
010	R	<i>bla</i> SHV-36; <i>fosA</i> ; <i>oqxA</i> ; <i>oqxB</i>
086	WERTYUIOPZASD FJK	<i>aac(6')Ib-cr</i> ; <i>ant(3'')-Ia</i> ; <i>ant(2'')-Ia</i> ; <i>aph(6)-Ia</i> ; <i>bla</i> CTX-M-15; <i>bla</i> OXA-1; <i>bla</i> OXA-48; <i>bla</i> SHV-11; <i>bla</i> TEM-1B; <i>fosA</i> ; <i>catA1</i> ; <i>oqxA</i> ; <i>oqxB</i> ; <i>sull</i> ; <i>sul2</i> ; <i>dfrA14</i>
131	WERTYUIOPDK	<i>aac(6')Ib-cr</i> ; <i>aph(6)-Ia</i> ; <i>bla</i> CTX-M-15; <i>bla</i> OXA-1; <i>bla</i> SHV-11; <i>bla</i> TEM-1B; <i>oqxA</i> ; <i>oqxB</i> ; <i>sul2</i> ; <i>dfrA14</i>

Примітка: Q – амікацин; W – амоксіцилін/клавулонова кислота; E – ампіцилін сульбактам; R – ампіцилін; T – азтреонам; Y – цефазолін; U – цефепім; I – цефтазидим; O – цефтріаксон; P – ципрофлоксацин; Z – ертапенем; A – гентаміцин; S – іміпенем; D – левофлоксацин; F – меропенем; G – тетрациклін; H – тігекциклін; J – тобраміцин; K – триметаприм-сульфаметоксазол; L – піперацилін-тазобактам.

Обговорення. Результати проведених досліджень показують, що мікроорганізми, які спричиняють хірургічну інфекцію бойових поранень в сучасному військовому конфлікті, є носіями чисельних генетичних детермінант резистентності до антибіотиків. Слід зауважити, що поранені до моменту надходження у ВМКЦ ЦР проходили лікування у кількох медичних закладах, в процесі якого неминуче внутрішньогоспітальне інфікування [8]. Тому отримані дані характеризують епідемічну ситуацію не лише шпиталю, в якому проводились бактеріологічні дослідження, а відображають загальну ситуацію усіх медичних закладів, де надавалась допомога пораненим.

Серед представників кожного дослідженого виду грамнегативних паличок були виділені такі, що за своїм фенотипом відносяться до полірезистентних та, навіть, пан-резистентних, тобто стійких до всіх антибактеріальних препаратів. Цей факт підтверджено з використанням трьох

різних комерційних тест-систем автоматизованого визначення чутливості до антибіотиків. Слід відзначити, що встановлені генетичні детермінанти переважно відповідали визначеним фенотипам досліджених штамів бактерій. Генів антибіотикорезистентності, що не експресовані, виявлено не було. Встановлена у неферментуючих грамнегативних паличок стійкість до ципрофлоксацину та левофлоксацину забезпечується не ефлюксними насосами, а переважно біфункціональними ферментами, які транскрибуються з гена *aac(6')Ib-cr* та переважно забезпечують стійкість до аміноглікозидів.

Цей факт підтверджує вагомість ідентифікації генетичних детермінант стійкості, що допомагають віддиференціювати механізми, якими бактерії блокують вплив антибіотиків та дозволяють передбачити можливі варіанти перехресної стійкості, навіть до антибіотиків інших хімічних груп, і уникнути помилкового призначення неефективних препаратів.

Загальна кількість генів стійкості, що були виділені у штамів *A. baumannii*, сягала 28 та по 18 у штамів ентеробактерів та клебсієл. Необхідно відмітити, що більшість досліджених ізолятів були продуцентами декількох різних типів β -лактамаз. Так, серед *A. baumannii* встановлені штами, що утримували в геномі по декілька генів, з яких відбувається транскрипція β -лактамаз класів *bla*TEM-1D та *bla*OXA-72, *bla*OXA-23. Дві останні зумовлювали резистентність до карбапенемів. β -Лактамаза розширеного спектру у *A. baumannii* кодувалась геном *bla*PER-1. Досліджені клебсієли та ентеробактери містили детермінанти β -лактамаз вузького спектру дії TEM-1 та SHV-1, а саме гени – *bla*TEM-1B та *bla*SHV-36, *bla*ACT-7. Слід відзначити, що ці β -лактамази руйнують пеніциліни та цефалоспорини 1-2 поколінь, але при їх гіперпродукції штами виявляють також стійкість і до інших β -лактамних антибіотиків [9].

Ген *bla*CTX-M-15, що кодує синтез β -лактамази розширеного спектру, виявлено у *K. pneumoniae* та у всіх ізолятів *E. cloacae*. Це на сьогодні типова для госпітальних штамів ентеробактерій β -лактамаза, яка є поширеною і часто локалізується у плазмідах [10, 11]. Цей факт свідчить про госпітальне походження досліджуваних ентеробактерій, а також про загрозу передачі генів, відповідальних за синтез цієї β -лактамази, іншим госпітальним штамам мікроорганізмів, зокрема, грамнегативним неферментуючим бактеріям, а також збудникам позагоспітальних інфекцій.

Продуцентами карбапенемаз виявилися *A. baumannii*, *E. cloacae* та *K. pneumoniae*. У *A. baumannii* цей фенотип був асоційований з геном *bla*OXA-23 та *bla*OXA-24. У *K. pneumoniae* це обумовлювалось геном *bla*OXA-48, що кодує карбапенемазу, яка локалізована на трансмісивній плазміді. Цей самий ген був визначений у *E. cloacae*.

Серед ентеробактерій широко розповсюдженими виявились гени стійкості до хінолонів (гени ефлюксних насосів – *oqx*A, *oqx*B; гени захисту мішені – *qnr*B1 та біфункціональних ферментів – *aac(6')Ib-cr*). Всі штами ентеробактеру та 2 штами клебсієл мали ген стійкості до фосфоміцину, більшість – гени стійкості до феніколів, сульфаніламідів, триметоприму.

Таким чином, комбінація різних детермінант в геномі одного штаму мікроорганізму обумовлює асоційовану стійкість до різних груп хіміопрепаратів. Це доведено порівняльним аналізом фенотипів резистентності та результатів сіквенування геному. Малоефективними у боротьбі з грам-

негативними паличками є фторхінолони, а місце незахищених цефалоспоринів у лікуванні інфекцій, пов'язаних з наданням медичної допомоги пораненим, необхідно критично переглянути.

В практичному сенсі отримання даних про фенотипові прояви резистентності та їх генетичні детермінанти є фундаментальними для інтерпретації антибіотикограм, прогнозування ефективності антибіотиків у найближчому майбутньому, побудови протоколів антибактеріальної терапії та розробки профілактичних заходів [12].

Висновки. Грамнегативні бактерії, які ускладнюють перебіг бойових мінно-вибухових поранень, одержаних у військовому конфлікті на сході України, у переважній більшості характеризуються множинною стійкістю до сучасних антибіотиків, що необхідно враховувати для розробки тактики раціональної антибіотикотерапії.

Стійкість до антибіотиків грамнегативних неферментуючих паличок – збудників інфекційних ускладнень бойових поранень – зумовлена наявністю в їх геномі широкого спектру генів, що контролюють синтез β -лактамаз та ензимів, що модифікують аміноглікозиди та частково фторхінолони. У досліджених штамів ентеробактерій наявні гени, відповідальні за синтез β -лактамаз широкого спектру, карбапенемаз та гени, що обумовлюють стійкість до фторхінолонів за рахунок ефлюксу. Наявність чисельних генетичних детермінант стійкості до антибіотиків у штамів бактерій, що циркулюють в медичних закладах, де проходить лікування поранених, негативно впливає на результати лікування і потребує оновлення стратегії антибіотикопротифілактики.

Наявність декількох генів стійкості в геномі кожного виділеного штаму пояснює феномен явища асоційованої резистентності до антибіотиків з різним механізмом протимікробної дії.

Одержані дані доцільно використати в процесі розробки практичних рекомендацій з антибіотикопротифілактики та раціонального застосування антибіотиків при лікуванні гнійно-запальних ускладнень бойових поранень.

Подяка. Автори вдячні керівнику підрозділу “Молекулярних досліджень” інституту наукових досліджень армії США ім. Волтера Ріда, доктору філософії *Патріку Мак Ганну* та головному біоінформатисту інституту наукових досліджень армії США ім. Волтера Ріда *Еріку Шнеруду* за пропозицію співпрацювати, надані засоби транспортування культур, результати повного геномного сіквенування.

ФЕНОТИПИЧЕСКИЕ И ГЕНОТИПИЧЕСКИЕ ДЕТЕРМИНАНТЫ АНТИБИОТИКОРЕЗИСТЕНТНОСТИ ГРАМОТРИЦАТЕЛЬНЫХ БАКТЕРИЙ – ЭТИОЛОГИЧЕСКИХ ФАКТОРОВ ИНФЕКЦИОННЫХ ОСЛОЖНЕНИЙ БОЕВЫХ РАН

В.П. Ковальчук, В.Н. Кондратюк, И.Н. Коваленко, В.М. Буркот

*Винницкий национальный медицинский университет им. Н.И. Пирогова,
ул. Пирогова, 56, Винница, 21018, Украина*

Резюме

Среди возбудителей инфекционных осложнений боевых ранений в современности доминирует резистентная к антибиотикам грамотрицательная микрофлора. В процессе выбора и прогнозирования эффективности лечебных мероприятий одинаково важны данные о фенотипических проявлениях устойчивости и информация об их генетических детерминантах. Данные генетического анализа помогут определить механизмы, за счет которых реализована устойчивость к антибиотикам, а сравнительный анализ позволит выделить гены, которые находятся в неактивном состоянии, но могут компрометировать эффективность антибиотиков. Информация о распространении генов антибиотикорезистентности позволит определить тенденцию изменения эпидемической ситуации в системе медицинской эвакуации и помощи раненым, разработать профилактические и противоэпидемические мероприятия. **Целью** исследования было определить фенотипические проявления и генетические детерминанты резистентности у грамотрицательных бактерий – возбудителей инфекционных осложнений боевых ранений в современном военном конфликте в Украине. **Методы.** Определение фенотипа резистентности 18 штаммов грамотрицательных бактерий проводили автоматическим методом с использованием трех коммерческих тест-систем в соответствии с рекомендациями Clinical and Laboratory Standards Institute. Определение первичной структуры нуклеотидных последовательностей штаммов проводили методом сиквенирования «нового поколения» (next generation sequencing) на платформе Applied biosystems/life technologies. Сравнение выделенных нуклеотидных последовательностей осуществляли по базе GenBank® с помощью технологии Basic Local Alignment Search Tool. **Результаты.** У исследованных микроорганизмов в целом определено 47 отдельных генов антибиотикорезистентности. Среди *Acinetobacter baumannii* установлены носители генов β-лактамаз классов *bla*TEM-1B и *bla*OXA-2, *bla*OXA-24, *bla*PER-1. Исследованные штаммы *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter cloacae* и *Pseudomonas aeruginosa* содержали детерминанты β-лактамаз узкого спектра. Ген *bla*CTX-M-15, кодирующий β-лактамазу расширенного спектра, обнаружен у *K. pneumoniae* и у всех изолятов *E. cloacae*. Продуцентами карбапенемаз оказались *A. baumannii*, *E. cloacae* и *K. pneumoniae*. У *A. baumannii* этот фенотип был ассоциирован с генами *bla*OXA-23 и *bla*OXA-24, у энтеробактерий – с геном *bla*OXA-48. **Выводы.** Изученные микроорганизмы демонстрируют полирезистентные фенотипы. В геномах этих штаммов содержатся гены, обуславливающие устойчивость к карбапенемам, аминогликозидам, низкую эффективность фторхинолонов и незащищенных цефалоспоринов. Полученные данные целесообразно использовать в процессе разработки

практических рекомендаций по рациональному использованию антибиотиков для лечения инфекционных осложнений боевых ранений.

Ключевые слова: грамотрицательные бактерии, резистентность к антибиотикам, генетические детерминанты, инфекционные осложнения, боевые ранения.

PHENOTYPIC AND GENOTYPIC DETERMINANTS OF ANTIBIOTIC RESISTANCE OF GRAM-NEGATIVE BACTERIA - ETIOLOGICAL FACTORS OF INFECTIOUS COMPLICATIONS OF WAR WOUNDS

V.P. Kovalchuk, V.M. Kondratiuk, I. M. Kovalenko, V.M. Burkot

*National Pirogov Memorial Medical University,
56 Pirogova str, Vinnytsya, 21018, Ukraine*

Summary

For the present day, antibiotic-resistant gram-negative bacterial flora dominates among the pathogens of infectious complications of war wounds. In the process of choosing and predicting the effectiveness of therapeutic measures, the data related to the phenotypic evidence of antibiotic resistance, as well as its genetic determinants are of vital importance. Genetic analysis data will help determine the mechanisms by which the resistance to antibiotics is implemented, establish genes that are inactive, but potentially can compromise the effectiveness of antibiotics. The information on the distribution of antibiotic-resistant genes will determine the tendency of the epidemic situation changing in the system of medical evacuation and assistance to the wounded, as well as develop the anti-epidemic measures.

The purpose of the study was to determine antibiotic resistance phenotypes and antibiotic resistance genes peculiar to gram-negative bacteria, which inflict the infectious complications of war wounds in a modern military conflict in Ukraine.

Methods. Antibiotic susceptibility testing of eighteen gram negative bacteria isolates which caused infectious complications of battle wounds had been studied automatically on the three commercial platforms according to current Clinical and Laboratory Standards Institute guidelines. The isolates underwent analysis by whole genome sequencing with “next – generation sequencing” method on applied biosystems/life technologies platform. Comparison of identified genome sequences had been done with Genbank data using Basic Local Alignment Search Tool technology. **Results.** Overall, 47 different antibiotic resistance genes were identified among the presented isolates. *Acinetobacteria* sp. isolates carried beta-lactamases of the classes *bla*TEM-1B and *bla*OXA-2, *bla*OXA-24, *bla*PER-1. Studied *Klebsiella* sp., *Enterobacteriaceae* sp. and *P. aeruginosa* harbor several narrow-spectrum β -lactamases. The *bla*CTX-M-15 gene encoding the extended spectrum of beta-lactamase was detected in *K. pneumoniae* and in all isolates of *E. cloacae*. *A. baumannii*, *E. cloacae* and *K. pneumoniae* were capable to produce carbapenemases. In *Acinetobacteria* sp., this phenotype was associated with the *bla*OXA-23 and *bla*OXA-24 genes, for *Enterobacteriaceae* sp. – with *bla*OXA-48.

Conclusions. The investigated microorganism strains express multidrug-resistant phenotypes. The genome of these strains contains the genes determining the resistance to carbapenems, aminoglycosides, low effectiveness of fluoroquinolones and unprotected cephalosporins, which explains the associated resistance to antibiotics with different mechanisms of antimicrobial activity. It is reasonable to use the obtained data in the process of developing the practical recommendations for the rational use of antibiotics in the treatment of infectious complications of war wounds.

Keywords: gram-negative bacteria, antibiotic resistance, genetic determinants, surgical infection, battle wound.

1. Huttner A, Harbarth S, Carlet J, et al. Antimicrobial resistance: a global view from the 2013 World Healthcare-Associated Infections Forum. *Antimicrob Resist Infect Control*. 2013; 18;2:31.
2. Von Wintersdorff CJH, Penders J, van Niekerk JM, et al. Dissemination of antimicrobial resistance in microbial ecosystems through horizontal gene transfer. *Front Microbiol*. 2016; 19; 7:173.
3. Wallum TE, Yun HC, Rini EA et al. Pathogens present in acute mangled extremities from Afghanistan and subsequent pathogen recovery. *Mil Med*. 2015; 180(1):97–103.
4. Pillai S, Gopalan V, Lam AK Review of sequencing platforms and their applications in phaeochromocytoma and paragangliomas. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2017; 116:58–67.
5. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>
6. <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>
7. Kovalchuk P, Valentine, Kondratiuk M, Viacheslav Bacterial flora of combat wounds from eastern Ukraine and time-specified changes of bacterial recovery during treatment in Ukrainian military hospital. *BMC Res Notes*. 2017; 10(1):152. <https://bmcresnotes.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13104-017-2481-4>
8. Kaspar RL, Griffith ME, Mann PB, Lehman DJ. Association of bacterial colonization at the time of presentation to a combat support hospital in a combat zone with subsequent 30-day colonization or infection. *Mil Med*. 2009; 174(9):899–903.
9. Kiiiru J, Kariuki S, Goddeeris BM, Butaye P. Analysis of β -lactamase phenotypes and carriage of selected β -lactamase genes among *Escherichia coli* strains obtained from Kenyan patients during an 18-year period. *BMC Microbiol*. 2012; 12:155.
10. Huang XZ, Frye JG, Chahine MA, Glenn LM, et al. Characteristics of plasmids in multi-drug-resistant Enterobacteriaceae isolated during prospective surveillance of a newly opened hospital in Iraq. *PLoS One*. 2012; 7(7):e40360.
11. Doit C, Mariani-Kurkdjian P, Bingen E. Extended-spectrum beta-lactamase producing enterobacteriaceae. *Arch Pediatr*. 2010; 17(4):140–4.
12. Dunne WM Jr, Jaillard M, Rochas O, Van Belkum A. Microbial genomics and antimicrobial susceptibility testing. *Expert Rev Mol Diagn*. 2017; 17(3):257–269.

Отримано 14.08.2018