



ИНФЕКЦИЯ, СВЯЗАННАЯ С ОКАЗАНИЕМ МЕДИЦИНСКОЙ ПОМОЩИ В ХИРУРГИЧЕСКОМ СТАЦИОНАРЕ

Б.Ю. ГУМИЛЕВСКИЙ*, Б.Н. КОТИВ*, Ф.В. ИВАНОВ*, Л.А. КРАЕВА*,
О.П. ГУМИЛЕВСКАЯ*, А.А. КОЛОБОВ**, Е.С. ОРЛОВА*

*Военно-медицинская академия имени С.М. Кирова,
ул. Академика Лебедева, 6, Санкт-Петербург, 194044, Россия
**Государственный НИИ особо чистых биопрепаратов ФМБА России,
Пудожская улица, 7, Санкт-Петербург, 197110, Россия

Аннотация. Введение. Бактерии *E.faecium*, *S.aureus*, *K.pneumoniae*, *A.baumannii*, *P.aeruginosa*, *Enterobacter spp.* отнесены к числу наиболее клинически значимых патогенов, против которых, в первую очередь необходимы новые способы антимикробной борьбы. **Цель исследования** – изучить этиологическую структуру, антибиотикорезистентность, фагочувствительность возбудителей инфекции, связанной с оказанием медицинской помощи в специализированном хирургическом стационаре и оценить антимикробную активность *пентадефенина* по отношению к выделенным возбудителям. **Материалы и методы исследования.** Проведено бактериологическое обследование пациентов, проходивших лечение в 2021 г. в одной из хирургических клиник Военно-медицинской академии. Проведен анализ чувствительности и резистентности микроорганизмов к антибиотикам, бактериофагам и антимикробному пептиду *пентадефенину*. **Результаты и их обсуждение.** В результате исследования выявлено 5 штаммов грамположительных бактерий, что составило 4% от общего количества. К грамотрицательным бактериям принадлежало 116 (96%) штаммов. В группе грамположительных бактерий были *S.aureus* – 60% и *E.faecium* составила 40%. Среди грамотрицательных бактерий преобладали *K.pneumoniae* – 58% и *P.aeruginosa* – 24%, доля *A.baumannii* составила 9,4%, *E.coli* 6%. Выделенная флора в целом обладала полирезистентностью к антибиотикам. Среди выделенных штаммов были бактерии чувствительные к бактериофагам (*S.aureus* – 50%, *K.pneumoniae* – 82%) и имеющие резистентность к фаготерапии. Это снижает возможности для управления нозокомиальной флорой и повышает актуальность разработки новых подходов антибактериальной терапии. Оценка антибактериальной активности нового антимикробного пептида *пентадефенина* показала, что он активно подавлял рост основных возбудителей инфекции. **Вывод.** Антимикробная борьба с возбудителями инфекции, связанной с оказанием медицинской помощи должна быть комплексной и наряду с применением антибиотиков необходимо использование бактериофагов и других средств.

Ключевые слова: возбудители гнойно-септических инфекций, антибактериальная терапия, резистентность к антибиотикам, чувствительность к антибиотикам, фаговая терапия, пептид, *пентадефенин*.

INFECTION ASSOCIATED WITH THE PROVISION OF MEDICAL CARE IN A SURGICAL HOSPITAL

B.Yu. GUMILEVSKY*, B.N. KOTIV*, F.V. IVANOV*, L.A. KRAEVA*,
O.P. GUMILEVSKAYA*, A.A. KOLOBOV**, E.S. ORLOV*

*Military Medical Academy named after S.M. Kirov,
Academician Lebedev Str., 6, St. Petersburg, 194044, Russia
**State Research Institute of Highly Pure Biopreparations of the Federal Medical and Biological Agency
of Russia, Pudozhskaya Str., 7, St. Petersburg, 197110, Russia

Abstract. Bacteria *E.faecium*, *S.aureus*, *K.pneumoniae*, *A.baumannii*, *P.aeruginosa*, *Enterobacter spp.* are among the most clinically significant pathogens against which, first of all, new methods of antimicrobial control are needed. **The research purpose** was to study the etiological structure, antibiotic resistance, phage sensitivity of pathogens associated with the provision of medical care in a specialized surgical hospital and to evaluate the antimicrobial activity of *pentadefenin* in relation to isolated pathogens. **Materials and research methods.** A bacteriological examination of patients treated in 2021 in one of the surgical clinics of the Military Medical Academy was carried out. An analysis of the sensitivity and resistance of microorganisms to antibiotics, bacteriophages and the antimicrobial peptide *pentadefenin* was carried out. **Results and its discussion.** The study revealed 5 strains of gram-positive bacteria, which accounted for 4% of the total. Gram-negative bacteria belonged to 116 (96%) strains. In the group of gram-positive bacteria were *S.aureus* - 60% and *E.faecium* was 40%. Gram-

negative bacteria were dominated by *K.pneumoniae* - 58% and *P.aeruginosa* - 24%, the proportion of *A.baumannii* was 9.4%, *E.coli* 6%. The isolated flora as a whole had polyresistance to antibiotics. Among the isolated strains were bacteria sensitive to bacteriophages (*S.aureus* - 50%, *K.pneumoniae* - 82%) and resistant to phage therapy. This reduces the ability to manage the nosocomial flora and increases the relevance of developing new approaches to antibiotic therapy. Evaluation of the antibacterial activity of the new antimicrobial peptide pentadefenin showed that it actively suppressed the growth of the main infectious agents. **Conclusion.** Antimicrobial control of infectious agents associated with the provision of medical care should be comprehensive. Along with the use of antibiotics, it is necessary to use bacteriophages and other means.

Keywords: causative agents of purulent-septic infections, antibiotic therapy, antibiotic resistance, antibiotic sensitivity, phage therapy, peptide, pentadefenin.

Введение. Всемирная организация здравоохранения отнесла бактерии: *E.faecium*, *S.aureus*, *K.pneumoniae*, *A.baumannii*, *P.aeruginosa*, *Enterobacter spp.* (*ESKAPE*) в число наиболее значимых патогенов, против которых в первую очередь необходимы новые антибиотики. В свою очередь, в соответствии с потребностью в новых антибиотиках выделены 3 категории патогенов: критические, высокоприоритетные и среднеприоритетные. Устойчивые к карбапенемам *A.baumannii* и *P.aeruginosa* наряду с β -лактамазой расширенного спектра (БЛРС) или устойчивыми к карбапенему *K.pneumoniae* и *Enterobacter spp.* отнесены к числу критических патогенов; в то время как устойчивые к ванкомицину *E.faecium* (*VRE*) и устойчивые к метициллину и ванкомицину *S.aureus* (*MRSA* и *VRSA*) входят в группу с высоким приоритетом [6]. Бактериофаги обладают преимуществами по сравнению с антибиотиками, поскольку могут прицельно поражать бактерии, не нарушая при этом нормальную микробиоту. Фаги не индуцируют перекрестную резистентность к антибиотикам, и у них меньше шансов, чем у антибиотиков, спровоцировать бактериальную резистентность [2]. Чтобы избежать последней проблемы, пациентам вводят коктейль из различных фагов, и заменяют их, как только бактерии обретают чувствительность к препарату [4]. Фаги эффективны как против чувствительных к антибиотикам, так и против устойчивых к ним патогенов. Их активность не бактериостатическая, как в случае с некоторыми антибиотиками, а бактерицидная, уничтожающая их мишени и тем самым предотвращающая выработку устойчивости у бактерий [2]. Перспективным методом лечения инфекции, связанной с оказанием медицинской помощи (ИСМП) является использование в качестве антибактериальных агентов антимикробных пептидов [3]. Антимикробное действие пептидов проявляется в способности разрушать клеточную мембрану бактерий, вызывая их гибель. Одним из таких препаратов является пентадефенин – синтетический пептид, который действует, как на грамположительные, так и на грамотрицательные бактерии [5].

Цель исследования – изучить этиологическую структуру, антибиотикорезистентность, фагочувствительность возбудителей инфекции, связанной с оказанием медицинской помощи в специализированном хирургическом стационаре из группы «*ESKAPE*» и оценить антимикробную активность пентадефенина по отношению к выделенным возбудителям.

Материалы и методы исследования. В исследование включены штаммы микроорганизмов, выделенные в центре клинической лабораторной диагностики от пациентов хирургической клиники Военно-медицинской академии. В указанной клинике в 2021 году развернуто 88 коек, проходило лечение 3282 пациента, выполнено 2432 оперативных вмешательства (хирургическая активность составила 74,1%), а оборот койки составил 37,3 дня. Пациенты с ИСМП были переведены из других подразделений для дальнейшего лечения в профильном стационаре по поводу торакальных и заболеваний гепатопанкреатобилиарной зоны. Выделение микроорганизмов проводили с использованием общепринятых питательных сред и методик. По месту высева изученные штаммы бактерий распределились следующим образом (табл. 1).

Идентификацию выделенных микроорганизмов проводили с помощью метода *MALDI-TOF* на микробиологическом анализаторе *VactoSCREEN* (Россия). Определение спектра антибиотикорезистентности выделенных штаммов и наличие БЛРС проводили на автоматическом микробиологическом анализаторе *Vitek 2* (*BioMerieux*, Франция). Определяли минимальные ингибирующие концентрации с использованием карт для определения чувствительности к антибиотикам. Полученные значения минимальных ингибирующих концентраций оценивались с использованием критериев *CLSI*, США. Для оценки возможности фаготерапии проводили исследование фагочувствительности выделенных штаммов к бактериофагам отечественного производства согласно Федеральным клиническим рекомендациям [1].

В качестве перспективного антимикробного препарата изучали антибактериальные свойства пентадефенина – синтетического пептида, аналога индолицидина быка, разработанного в Государственном научно-исследовательском институте особо чистых биопрепаратов ФМБА России.

Источники выделенных микроорганизмов

| Локализация | <i>E. faecium</i> | <i>S. aureus</i> | <i>K. pneumoniae</i> | <i>A. baumannii</i> | <i>P. aeruginosa</i> | <i>Enterobacter spp.</i> (<i>E. coli</i>) |
|--|-------------------|------------------|----------------------|---------------------|----------------------|--|
| Асцитическая жидкость | – | – | 3 | – | – | – |
| Жидкость из бронхоальвеолярного лаважа | – | – | 1 | 1 | 2 | – |
| Гной из раны | – | – | 1 | – | 1 | – |
| Желчь | – | – | 5 | 2 | 1 | – |
| Кровь | – | 1 | 11 | 2 | 2 | 1 |
| Мокрота | 1 | – | 11 | 3 | 3 | 2 |
| Моча | – | – | 3 | – | – | – |
| Отделяемое из дренажа плевральной полости | – | 1 | 9 | 1 | 9 | – |
| Отделяемое из внутриполостного абсцесса | – | – | 2 | – | 1 | – |
| Отделяемое из дренажа брюшной полости | – | – | 4 | – | 2 | 2 |
| Отделяемое из области хирургического вмешательства | 1 | – | 17 | 2 | 7 | 2 |
| Содержимое кисты печени | – | – | 1 | – | – | – |
| Содержимое полости деструкции легкого | – | – | – | – | 1 | – |
| Итого | 2 | 2 | 68 | 11 | 29 | 7 |

Антимикробную активность *пентадефенина* изучали методом серийных разведений в жидкой питательной среде – бульоне Миллера-Хинтона (*HiMedia*, Индия). Для этого, готовили суточную культуру исследуемого микроорганизма в жидкой среде. Затем готовили взвесь микроорганизмов с концентрацией 0,5 единиц по МакФарланду ($1,5 \times 10^8$ микробных клеток в мл). Исследование антимикробной активности *пентадефенина* проводили в стерильных 96-луночных планшетах. Готовую взвесь микроорганизмов вносили в лунки планшета из расчета 1×10^4 КОЕ бактерий в 50 мкл среды на лунку. *Пентадефенин* растворяли в 0.01 М натрий-фосфатном буфере, pH 7.4 с 150 мМ NaCl и вносили по 50 мкл в лунки планшетов, содержащие суспензии микроорганизмов. В контрольные лунки вместо препаратов вносили буфер. Конечный объем в лунке составлял 100 мкл. Диапазон конечных концентраций антибактериального пептида в лунке составлял диапазон в мкг/мл (256, 128, 64, 32, 16, 8, 4, 0). Планшеты инкубировали при +37°C в течение 20 часов. За минимальную ингибирующую концентрацию принимали наименьшую концентрацию пептида, при которой полностью ингибировался рост микроорганизмов в соответствующих лунках планшета.

Результаты и их обсуждение. Оценка этиологической структуры возбудителей ИСМП показала, что 119 штамм микроорганизмов, обнаруженных у пациентов с ИСМП, относятся к 6 видам, что указывает на полиэтиологичность. Было выявлено 4 штамма грамположительных бактерий, что составило 3,4% от общего количества. К грамотрицательным бактериям принадлежало 115 (96,6%) штаммов. В группе грамположительных бактерий доли *S. aureus* и *E. faecium* оказались равными. Среди грамотрицательных бактерий преобладали *K. pneumoniae* – 59,2% и *P. aeruginosa* – 25,2%, доля *A. baumannii* составила 9,6%, а *E. coli* только 6% (табл. 2).

Анализ резистентности микроорганизмов к антибиотикам в обследованном стационаре специализированной хирургической помощи показал, что штаммы *K. pneumoniae* устойчивы к фторхинолонам 2 поколения (ципрофлоксацин – 80%), цефалоспорином 3 поколения (цефотаксим – 69%, цефтазидим – 92,6%), цефалоспорином 4 поколения (цефепим – 88%), карбапенемам (эртапенем – 70%), и чувствительны к полипептидам (колистин – 82%) и аминогликозидам 2 поколения (амикацин – 43%).

Штаммы *P. aeruginosa* оказались резистентными к фторхинолонам 3 поколения (левофлоксацин – 78,5%), цефалоспорином 4 поколения (цефепим – 75%), монобактамам (азтреонам – 75%) и чувствительными к полипептидам (колистин – 92,8%), аминогликозидам 2 поколения (амикацин – 71,4%), цефалоспорином 3 поколения (цефтазидим – 50%).

Микроорганизмы, выделенные у пациентов с гнойными инфекциями

| Возбудители инфекции | Число посевов, n (%) |
|-----------------------------------|----------------------|
| <i>Грамотрицательные бактерии</i> | |
| <i>K.pneumoniae</i> | 68 (57,1%) |
| <i>P.aeruginosa</i> | 29 (24,4%) |
| <i>A.baumannii</i> | 11 (9,2%) |
| <i>E.coli</i> | 7 (5,9%) |
| <i>Грамположительные бактерии</i> | |
| <i>S.aureus</i> | 2 (1,7%) |
| <i>E.faecium</i> | 2 (1,7%) |
| Итого | 119 (100%) |

Штаммы *A.baumannii* оказались устойчивыми к аминогликозидам 2 поколения (амикацин – 63,6%), фторхинолонам 2 поколения (ципрофлоксацин – 63,6%), карбапенемам (меропенем – 63,6%), аминогликозидам 2 поколения (гентамицин – 54,5%) а чувствительность обнаружили только к полипептидам (колистин – 72,7%).

Штаммы *E.coli* оказались устойчивыми к фторхинолонам 3 поколения (левофлоксацин – 87,5%), монобактамам (азтреонам – 62,5%), цефалоспорином 3 поколения (цефтазидим – 62,5%), а к полипептидам (колистин), карбапенемам (меропенем, имипенем), аминогликозидам 2 поколения (гентамицин) проявили абсолютную чувствительность (100%).

Штаммы *S.aureus* проявляли абсолютную устойчивость только к биосинтетическим пенициллинам (бензилпенициллин), а к фторхинолонам 2 поколения (ципрофлоксацин), линкозамидам (клиндамицин), макролидам (эритромицин), аминогликозидам 2 поколения (гентамицин), фторхинолонам 3 поколения (левофлоксацин), комбинированным β -лактамным антибиотикам (оксацилин) проявили абсолютную (100%) чувствительность. Таким образом, доля MRSA штаммов составила 52%.

Штаммы *E.faecium* отличались абсолютной устойчивостью к полусинтетическим пенициллинам (ампициллин), фторхинолонам 2 поколения (ципрофлоксацин), фторхинолонам 3 поколения (левофлоксацин) и гликопептидам (ванкомицин), и были абсолютно чувствительны только к тигециклину.

В результате изучения механизмов антибиотикорезистентности грамотрицательной микрофлоры установлено, что главным фактором устойчивости является синтез β -лактамаз расширенного спектра большинством штаммов возбудителей ИСМП: *K.pneumoniae* – 70% штаммов, *A.baumannii* – 62%, *P.aeruginosa* – 53%.

Полученные результаты свидетельствуют о наличии довольно узкого спектра препаратов для эффективной антибиотикотерапии. Это диктует необходимость применения других способов противодействия ИСМП, как, например, фаготерапия. Для оценки возможности применения бактериофагов было проведено исследование чувствительности к ним возбудителей ИСМП клиники госпитальной хирургии. В результате исследования установлено, что только половина штаммов *S.aureus* (MRSA) обладают чувствительностью к бактериофагам (интести-бактериофаг жидкий, производства НПО «Микроген» г. Пермь), чувствительность штаммов *K.pneumoniae* (БЛРС) к бактериофагам составляла 82% (Бактериофаг клебсиел поливалентный очищенный, производства НПО «Микроген» в г. Уфа). Полученные результаты позволяют заключить, что применение бактериофагов в сочетании с антибиотиками может повысить эффективность противомикробной терапии, но, тем не менее, и оно не позволяет полностью преодолеть резистентность возбудителей ИСМП (в частности, *K.pneumoniae*, *S.aureus*) к антимикробным препаратам. Поэтому, разработка и поиск новых противомикробных средств является актуальным, в связи с чем, проведено исследование антибактериального свойства *пентадеффенина* – одного из новых перспективных антимикробных пептидов.

Бактерицидную активность *пентадеффенина* исследовали на выделенных от пациентов клиники госпитальной хирургии штаммах MRSA *S.aureus*, карбапенемазообразующего штамма *K.pneumoniae*, *P.aeruginosa*, *A.baumannii*. В ходе исследования установлено, что *пентадеффенин* эффективно подавлял рост всех исследованных бактерий. Минимальные ингибирующие концентрации пептида для штаммов *S.aureus*, *K.pneumoniae* составила 4 мкг/мл. Более высокие концентрации необходимы для подавления роста *A.baumannii* и *P.aeruginosa* (8 и 16 мкг/мл соответственно). Следует отметить, что такие концентрации *пентадеффенина* не выходят за пределы клинической нормы при местном применении.

Заключение. Возбудителями ИСМП являются в основном микроорганизмы *A.baumannii*, *K.pneumoniae* и *P.aeruginosa*. Они характеризуются высокой устойчивостью к антибиотикам. Более половины внутрибольничных штаммов способна синтезировать БЛРС действия. Подобная ситуация требует систематического микробиологического мониторинга и назначения антибактериальных препаратов

исключительно в соответствии с антибиотикограммой. Достаточно большое количество выделенных штаммов возбудителей ИСМП обладает чувствительностью к бактериофагам, что позволяет применять фаготерапию для повышения противомикробной терапии. Однако, для этого необходимо проводить предварительную оценку фагочувствительности выделенных микроорганизмов у каждого пациента. Необходимо поиск новых способов антимикробной терапии. Исследование противомикробных свойств *пентадефина* показало его эффективность против основных возбудителей ИСМП, в связи с чем, он является перспективным препаратом для местного применения в хирургии.

Литература

1. Рациональное применение бактериофагов в лечебной и противоэпидемической практике: Федеральные клинические (методические) рекомендации / Асланов Б.И., Зуева Л.П., Кафтырева Л.А. [и др.]. Москва: Ремедиум Приволжье, 2014. 54 с.
2. Forde A., Hill C. Phages of life – the path to pharma // *Br J Pharmacol*. 2018. №175. P. 412–418.
3. Kaur I. Novel strategies to combat antimicrobial resistance // *J. Infect. Dis. Ther.* 2016. №4. P. 292.
4. Schooley R.T., Biswas B., Gill J.J. Development and use of personalized bacteriophage-based therapeutic cocktails to treat a patient with a disseminated resistant *Acinetobacter Baumannii* infection // *Antimicrob Agents Chemother.* 2017. № 61. P. e00954–17.
5. Smirnova M.P., Kolodkin N.I., Kolobov A.A. Indolicidin analogs with broad-spectrum antimicrobial activity and low hemolytic activity // *Peptides*. 2020. Vol. 132. P. 170356.
6. Tacconelli E., Carrara E., Savoldi A., Harbarth S., Mendelson M., Monnet D. L. Discovery, research, and development of new antibiotics: the WHO priority list of antibiotic-resistant bacteria and tuberculosis // *Lancet Infect. Dis.* 2018. №18. P. 318–327.

References

1. Aslanov BI, Zueva LP, Kaftyreva LA, et al. Racional'noe primenenie bakteriofagov v lechebnoj i protivoepidemicheskoj praktike: Federal'nye klinicheskie (metodicheskie) rekomendacii [Rational use of bacteriophages in therapeutic and antiepidemic practice: Federal clinical (methodological) recommendations]. Moscow: Remedium Privolzhye; 2014. Russian.
2. Ford A, Hill S. Phages of life - the path to pharmacy. *Br J Pharmacol* 2018;175:412-8.
3. Kaur I. New strategies to combat antimicrobial resistance. *J. Infect. Dis.* In the same place. 2016;4:292.
4. Skuli RT, Biswas B, Jill JJ, et al. Development and use of personalized therapeutic cocktails based on bacteriophages for the treatment of a patient with disseminated resistant infection *Acinetobacter Baumannii*. *Antimicrobial agents Chemotherapy* 2017;61:e00954-17.
5. Smirnova MP, Kolodkin NI, Kolobov AA, et al. Analogues of indolicidin with broad-spectrum antimicrobial activity and low hemolytic activity. *Peptides*. 2020;132:170356.
6. Tacconelli E, Carrara E, Savoldi A, Harbart S, Mendelson M, Monnet DL, et al. Discovery, research and development of new antibiotics: the WHO priority list for antibiotic-resistant bacteria and tuberculosis. *Infection with the Lancet. Dis.* 2018;18:318-27.

Библиографическая ссылка:

Гумилевский Б.Ю., Котив Б.Н., Иванов Ф.В., Краева Л.А., Гумилевская О.П., Колобов А.А., Орлова Е.С. Инфекция, связанная с оказанием медицинской помощи в хирургическом стационаре // Вестник новых медицинских технологий. Электронное издание. 2022. №4. Публикация 1-3. URL: <http://www.medtsu.tula.ru/VNMT/Bulletin/E2022-4/1-3.pdf> (дата обращения: 11.07.2022). DOI: 10.24412/2075-4094-2022-4-1-3. EDN YZQNLX*

Bibliographic reference:

Gumilevsky BYU, Kotiv BN, Ivanov FV, Kraeva LA, Gumilevskaya OP, Kolobov AA, Orlov ES. Infekcija, svjazannaja s okazaniem medicinskoj pomoshhi v hirurgicheskom stacionare [Infection associated with the provision of medical care in a surgical hospital]. *Journal of New Medical Technologies, e-edition*. 2022 [cited 2022 Jul 11];4 [about 5 p.]. Russian. Available from: <http://www.medtsu.tula.ru/VNMT/Bulletin/E2022-4/1-3.pdf>. DOI: 10.24412/2075-4094-2022-4-1-3. EDN YZQNLX

* номера страниц смотреть после выхода полной версии журнала: URL: <http://medtsu.tula.ru/VNMT/Bulletin/E2022-4/e2022-4.pdf>

**идентификатор для научных публикаций EDN (eLIBRARY Document Number) будет активен после загрузки полной версии журнала в eLIBRARY