

ANTIBIOTIC RESISTANCE OF MICROORGANISMS ASSOCIATED WITH WOUND SURFACES

O. Iungin

Kyiv National University of Technologies and Design

V. Potochilova, K. Rudnieva

Kyiv Regional Clinical Hospital

O. Moshynets

Institute of Molecular Biology and Genetics NAS of Ukraine

Key words:

*Antibiotic resistance
Wound surfaces
Infections
Treatment strategies
Monitoring*

Article history:

Received 04.08.2021
Received in revised form
13.08.2021
Accepted 25.08.2021

Corresponding author:

O. Iungin

E-mail:

olgaungin@gmail.com

ABSTRACT

Skin and soft tissue infections are mainly caused by the so called ESKAPE pathogens (*Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, and *Enterobacter* species). Microorganisms isolated from wound surfaces show frequently increased resistance to the antibiotics of choice, which complicates the treatment process. Monitoring of antibiotic resistance of isolates from wounds allows to assess the future prospects for antibiotic therapy and the current situation in the hospitals. At the same time, the search for promising antibiotics and antimicrobial substances for new treatment strategies and overcoming antibiotic resistance of microorganisms is continued.

The aim of the study was to detect bacteria associated with wound surfaces of patients from Kyiv Regional Clinical Hospital (Kyiv) for the period of April 2019 — April 2020, and check their resistance to the most commonly used antibiotics. Isolation, identification and antibiotic resistance estimation were performed according to generally accepted methods and in accordance with international recommendations of EUCAST.

As a result of the research, 1540 isolates were analyzed. The most part of isolates from wound surfaces were presented by *Staphylococcus epidermidis* and *S. aureus*. Among the gram-negative microflora *Enterobacteriaceae* was dominated and presented by *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli* and others. The isolates were mostly resistant to fosfomycins, penicillins, β -lactam inhibitors and monobactams. At the same time, they were highly sensitive to the last line antibiotics — teicoplanin, vancomycin and linezolid. The obtained data are important according to the assessment of antibiotic resistance development in hospitals in Ukraine and the prospects of developing new strategies for the treatment of antibiotic-resistant infections.

СТІЙКІСТЬ ДО АНТИБІОТИКІВ МІКРООРГАНІЗМІВ, АСОЦІЙОВАНИХ З РАНОВИМИ ПОВЕРХНЯМИ

О. С. Юнгін

Київський національний університет технологій та дизайну

В. В. Поточилова, К. Л. Руднева

Комунальне неприбуткове підприємство «Київська обласна клінічна лікарня»

О. В. Мошинець

Інститут молекулярної біології і генетики НАН України

Інфекції шкіри та м'яких тканин в основному викликаються так званими збудниками ESKAPE (Enterococcus faecium, Staphylococcus aureus, Klebsiella pneumoniae, Acinetobacter baumannii, Pseudomonas aeruginosa та Enterobacter). Усе частіше мікроорганізми, виділені з ранових поверхонь, демонструють підвищення стійкості до антибіотиків вибору, що ускладнює процес лікування. Моніторинг профілей антибіотикорезистентності, виділених з ран ізолятів, дає змогу оцінити перспективи розвитку антибіотикотерапії в майбутньому та ситуації в лікарні загалом. Водночас триває пошук перспективних антибіотиків та антимікробних речовин для формування нових стратегій лікування і подолання проблеми антибіотикорезистентності мікроорганізмів.

У статті описано бактерії, представлені в ранових поверхнях пацієнтів Комунального неприбуткового підприємства «Київська обласна клінічна лікарня» (м. Київ) за період квітень 2019 р. — квітень 2020 р., і профіль їх стійкості до найпоширеніших антибіотиків, що використовуються в терапії. Виділення ізолятів, визначення їх видової приналежності та профілей стійкості до антибіотиків проводили за загальноприйнятими методиками і відповідно до міжнародних рекомендацій EUCAST.

У результаті досліджень виділено та проаналізовано 1540 ізолятів. Найбільшу частку виділених ізолятів з ранових поверхонь складала епідермальний і золотистий стафілококи. Серед грам-негативної флори переважали представники родини Enterobacteriaceae (Klebsiella pneumoniae, Escherichia coli та інші). Найбільше виділені мікроорганізми проявляли стійкість до фосфоміцинів, пеніцилінів, β-лактамних інгібіторів і монобактамів. Водночас залишалася високою чутливість до антибіотиків резерву — тейкопланіну, ванкоміцину та лінезоліду. Отримані дані є важливими з огляду оцінки поширення антибіотикорезистентності в лікарнях України та перспектив розробки нових стратегій лікування антибіотикорезистентних інфекцій.

Ключові слова: антибіотикорезистентність, ранові поверхні, інфекції, стратегії лікування, моніторинг.

Постановка проблеми. Підбір оптимальних антимікробних компонентів для застосування в терапії опортуністичних інфекцій є вирішальним завданням при створенні препаратів комбінованої дії для лікування ранових поверхонь. Колонізація ранових поверхонь мікроорганізмами відбувається майже одразу після пошкодження епітелію (Tsiouris & Tsiouri, 2017) і може призвести як до

локалізованої інфекції, так і до системної інфекції, сепсису, поліорганної дисфункції та подальшого розвитку стану, що загрожує життю.

Аналіз останніх досліджень і публікацій. Найчастіше ранові поверхні колонізують мікроорганізми різних видів (Ibberson et al., 2017), що ще більше ускладнює лікування. Інфекція в рані затримує загоєння, подовжує час перебування в лікарні, збільшує травматизм, створює ризик для дезартикуляції та ампутації, підвищує потребу в медичній допомозі та збільшує витрати на лікування (Nussbaum et al., 2018).

Визначення збудника інфекції може ускладнюватися формуванням біоплівки не на поверхні, а глибоко в тканині рани, тому одним із найкращих способів лікування є очищення (санація) рани та використання місцевих протимікробних засобів (Pfalzgraff, Brandenburg & Weindl, 2018). Антибіотикорезистентність основних збудників інфекційних захворювань є однією з проблем сучасної медицини. Авторами статті досліджено бактеріальний профіль інфікованих ран різної етіології та оцінено чутливість до антибіотиків виділених бактеріальних ізолятів на базі Комунального неприбуткового підприємства «Київська обласна клінічна лікарня» (м. Київ) за період квітень 2019 — квітень 2020.

Мета дослідження: виявити види бактерій, представлені в ранах, і профіль їх стійкості до найпоширеніших антибіотиків, що використовуються в терапії.

Матеріали і методи. Вміст ран відбирали шприцем або тампоном до початку антимікробної терапії. Надалі з матеріалу виділяли мікроорганізми та визначали чутливість до антибіотиків з використанням ряду поживних середовищ — МПА (Biolife), Мюллера-Хінтона (HiMedia), Ендо, агар Сабуро, кров'яний агар, елективний сольовий агар (Biolife). Ідентифікацію мікроорганізмів здійснювали з використанням мікробіологічного аналізатора VITEK 2 compact 15 (Франція).

Чутливість виділених штамів визначали за допомогою диск-дифузійного методу, методу мінімальних інгібуючих концентрацій відповідно до міжнародних рекомендацій EUCAST (The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing). Середовище розливали в стерильні чашки Петрі та наносили бактеріальну суспензію щільності еквівалентної стандарту мутності 0,5 за McFarland. Чутливість до антибіотиків визначали диск-дифузійним методом (Jonasson, Matuschek & Kahlmeter, 2020). Після інкубації чашок у термостаті при температурі 37°C протягом 18—24 год враховували результати шляхом вимірювання діаметра зони навколо диска в міліметрах. Використовували диски з антибіотиками виробництва: HiMedia (Індія), OXOID (США), Becton Dickinson (BD) (Ірландія).

Для контролю якості визначення чутливості до антибіотиків застосовували референтні штами колекції типових культур *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Escherichia coli* ATCC 25922.

Статистичну обробку отриманих даних проводили з використанням програми та електронних таблиць MS Excel 2007. Аналіз антибіотикорезистентності виділених мікроорганізмів проводили за допомогою комп'ютерної програми WHONET 5.6. Імовірність відмінностей кількісних результатів визначали за допомогою *t*-критерію надійності Стюдента та стандартних відхилень ($M \pm m$).

Викладення основних результатів дослідження. Було виділено та проаналізовано 1540 штамів збудників інфекцій, виділених з гнійних ран. Встановлено, що найпоширенішими інфекційними агентами є представники родів *Staphylococcus*, *Klebsiella*, *Enterococcus*, *Pseudomonas*, *Escherichia*. У меншій кількості були представлені бактерії родів *Acinetobacter* та *Streptococcus*, а також дріжджі роду *Candida*. В результаті досліджень з'ясовано, що в інфекційний процес ранових поверхонь були залучені грамнегативні мікроорганізми родини *Enterobacteriaceae*: *Enterobacter aerogenes* та *Enterobacter cloacae*, *Proteus mirabilis*, *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*. Кількісний розподіл ізолятів вказаних видів представлено в табл. 1.

Таблиця 1. Кількісний розподіл ізолятів мікроорганізмів родини *Enterobacteriaceae*, асоційованих з рановими поверхнями

№	Вид мікроорганізму	Кількість ізолятів
1	<i>Enterobacter aerogenes</i>	14
2	<i>Enterobacter cloacae</i>	13
3	<i>Proteus mirabilis</i>	24
4	<i>Escherichia coli</i>	50
5	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	63

Хоча деякі дослідження показали, що порівняно з грамнегативною мікробіотою грампозитивні бактерії є менш поширеними (Kassam, Damian, Kajeguka, Nyombi & Kibiki, 2017), однак вирішальне значення має сайт виділення та тип рани. Так, серед грампозитивної мікробіоти, асоційованої з рановими поверхнями, найчисленнішими були представники родин *Staphylococcaceae* та *Enterococcaceae*. Серед цієї групи найбільшу кількість становили представники виду *Staphylococcus epidermidis* — 220 та *Staphylococcus aureus* — 136 ізолятів відповідно. Крім вказаних видів, також було виділено й інші види цього роду, але в значно меншій кількості. Кількісний розподіл представників роду *Staphylococcus*, що асоційовані з рановими поверхнями, представлений у табл. 2.

Таблиця 2. Кількісний розподіл представників роду *Staphylococcus*, що асоційовані з рановими поверхнями

№	Вид мікроорганізму	Кількість ізолятів
1	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	220
2	<i>Staphylococcus aureus</i>	136
3	<i>Staphylococcus capitis</i>	1
4	<i>Staphylococcus caprae</i>	1
5	<i>Staphylococcus delphini</i>	6
6	<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	4
7	<i>Staphylococcus hyicus</i>	1
8	<i>Staphylococcus intermedius</i>	1
9	<i>Staphylococcus lugdunensis</i>	2
10	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	1
11	<i>Staphylococcus sciuri</i>	1
12	<i>Staphylococcus warneri</i>	2

Відомо, що представники роду *Staphylococcus* переважають у випадках ран, отриманих внаслідок травм (40%), та післяопераційних сайтах (~20%), тоді як *Enterococcus* sp. більше асоційовані з хронічними ранами типу діабетичної стопи (~36%) (Kassam, Damian, Kajeguka, Nyombi & Kibiki, 2017).

Велику занепокоєність серед клініцистів викликають ізоляти *Enterococcus* spp., стійкі до ванкоміцину, зокрема штамів *Enterococcus faecium* (Remschmidt et al. 2018). Проте за даними 2018 р. в Україні не виявлено жодного ванкоміцин-резистентного штаму *Enterococcus faecalis* (Березняков, 2020). У нашому дослідженні було ізольовано три види роду *Enterococcus*: *Enterococcus avium* — 2, *Enterococcus faecalis* — 20 та *Enterococcus faecium* — 64 ізолятів відповідно.

Відомо, що представники роду *Enterococcus*, особливо *Enterococcus faecium*, застосовуються в харчовій промисловості як пробіотики, а також мають перспективи використання проти мультирезистентних патогенів завдяки своїй здатності синтезувати бактеріюцини (Araújo & Ferreira, 2013). Водночас наявність факторів вірулентності і генів резистентності до антибіотиків не дозволяють вважати представників роду *Enterococcus* повністю безпечними та надати їм статус GRAS — загальноновизнаними безпечними мікроорганізмами (Hanchi, Mottawea, Sebei & Hammami, 2018). Дискусії щодо доцільності та безпечності використання ентерококів у харчовій промисловості досі тривають.

У дослідженні (Alharbi et al., 2019) поширення мікроорганізмів, що відносяться до групи ESBL (розширений спектр β-лактамаз), була показана важливість сайту виділення штаму. Так, ізоляти *E.coli*, виділені з ран, проявляли ознаки ESBL, а з харчових продуктів (сире молоко) — ні. Підкреслюється важливість постійного моніторингу цього типу резистентності, оскільки *E.coli* залишається найчастішою причиною інфекцій кровотоку, а карбапенем-резистентні ентеробактерії швидко поширюються як у позалікарняних умовах, так і в стаціонарах (Березняков, 2020). За досліджуваній період на базі Комунального неприбуткового підприємства «Київська обласна клінічна лікарня» (м. Київ) було виділено 9 ізолятів, що відносили до ESBL, що є тривожним сигналом розвитку антибіотикорезистентності.

Дослідження профілів резистентності ізолятів, виділених на території не лише окремих країн, а й окремих лікарень, є вкрай важливими. Результати таких досліджень можуть бути використані для вибору антибіотикотерапії інфекцій пацієнтів місцевих лікарень (Torumkuney, Bratus, Yuvko, Pertseva & Morrissey, 2020) або для з'ясування причини виникнення резистентності. Численні дослідження показали, що більшість ізолятів з інфікованих ран стійкі до ампіциліну та амоксициліну. Велика кількість *S. aureus* є метицилінрезистентними (MRSA). Повідомляється, що більшість виділених з ран бактерій є чутливими до хінолонів, аміноглікозидів і монобактамів (Negut, Grumezescu & Grumezescu, 2018). У нашому дослідженні спостерігали схожу тенденцію: зі 190 ізолятів 50,5% визначали як резистентні (R) до амоксициліну та 49,7% — до ампіциліну. Зі 346 ізолятів 71,1% були чутливі (S) до хінолонів (левофлоксацин, офлоксацин), 74,8% — до аміноглікозидів (тобраміцин, амікацин). Однак з 252 ізолятів чутливими до монобактамів (азтреонам) було лише 39,7%, в той час коли резистентність проявляли 47,2% (табл. 3).

Таблиця 3. Розподіл кількості бактеріальних ізолятів за стійкістю до антибіотиків

Антибіотик	Клас	Кількість ізолятів	Кількість резистентних (R), %	Кількість чутливих (S), %
Амоксицилін	Пеніциліни	190	50,5	42,1
Ампіцилін	Пеніциліни	181	49,7	17,1
Кліндаміцин	Лінкозаміди	344	24,1	72,1
Левофлуксацин	Хінолони	346	25,7	71,1
Рифампіцин	Анзаміцин	319	12,5	85,6
Тобраміцин	Аміноглікозиди	353	22,9	74,8
Колістин	Ліпопептиди	192	12,5	87,5
Лінезолід	Оксазолідінони	546	8,4	91,2
Тейкопланін	Глікопептиди	222	2,7	92,3
Амікацин	Аміноглікозиди	262	23,7	68,7
Еритроміцин	Макроліди	215	36,3	46,0
Пеніцилін G	Пеніциліни	288	49,7	20,5
Цефокситім	Цефалоспорины	298	41,3	58,7
Ампіцилін/ Сульбактам	β-лактамі інгібітори	548	44,9	49,8
Азтреонам	Монобактами	252	47,2	39,7
Меропенем	Карбапенеми	379	40,9	44,9
Триметоприм и сульфаметоксазол	Інгібітори фолатного шляху	255	34,2	61,8
Ванкоміцин	Глікопептиди	518	3,3	96,7
Цефтазидим/ Авибактам	β-лактамі інгібітори	246	39,4	56,1
Ципрофлоксацин	Хінолони	412	29,9	62,6
Фосфоміцин	Фосфоміцини	105	76,2	15,2

Як видно з отриманих даних, кількість ізолятів, резистентних до вказаних антибіотиків, наближається до 50%, що свідчить про розвиток резистентності патогенів до антибіотиків вибору. Високу кількість чутливих ізолятів виявляли до тейкопланіну (92,3%), ванкоміцину (96,7%) та лінезоліду (91,2%). Тож ці три антибіотики все ще можуть бути успішно застосовані у випадках, коли альтернативного лікування немає.

Висновки

Дані, отримані під час дослідження, важливі з огляду оцінки поширення патогенів і рівнів їх резистентності на території України та розробки дієвих протоколів лікування інфекцій.

Література

- Березняков, І. Г. (2020). Стан антибіотикорезистентності в Україні: результати дослідження АУРА. *Здоров'я України*, 5, 21—23.
- Alharbi, N. S., Khaled, J. M., Kadaikunnan, S., Alobaidi, A. S., Sharafaddin, A. H., Alyahya, S. A., ... & Shehu, M. R. (2019). Prevalence of *Escherichia coli* strains resistance to antibiotics in wound infections and raw milk. *Saudi journal of biological sciences*, 26(7), 1557—1562.
- Araújo, T. F., & Ferreira, C. L. D. L. F. (2013). The genus *Enterococcus* as probiotic: safety concerns. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 56(3), 457—466.

- Bjarnsholt, T., McBain, A. J., James, G. A., Stoodley, P., Leaper, D., ... & Malone, M., Wolcott, R. D. (2017). The prevalence of biofilms in chronic wounds: a systematic review and meta-analysis of published data. *Journal of Wound Care*, 26(1), 20—25.
- Cepas, V., López, Y., Muñoz, E., Rolo, D., Ardanuy, C., Martí, S., ... & Soto, S. M. (2019). Relationship between biofilm formation and antimicrobial resistance in gram-negative bacteria. *Microbial Drug Resistance*, 25(1), 72—79.
- Hanchi, H., Mottawea, W., Sebei, K., & Hammami, R. (2018). The genus *Enterococcus*: between probiotic potential and safety concerns—an update. *Frontiers in microbiology*, 9, 1791.
- Ibberson, C. B., Stacy, A., Fleming, D., Dees, J. L., Rumbaugh, K., Gilmore, M. S., & Whiteley, M. (2017). Co-infecting microorganisms dramatically alter pathogen gene essentiality during polymicrobial infection. *Nature microbiology*, 2(8), 1—6.
- Jonasson, E., Matuschek, E., & Kahlmeter, G. (2020). The EUCAST rapid disc diffusion method for antimicrobial susceptibility testing directly from positive blood culture bottles. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 75(4), 968—978.
- Kassam, N. A., Damian, D. J., Kajeguka, D., Nyombi, B., & Kibiki, G. S. (2017). Spectrum and antibiogram of bacteria isolated from patients presenting with infected wounds in a Tertiary Hospital, northern Tanzania. *BMC research notes*, 10(1), 1—6.
- Negut, I., Grumezescu, V., & Grumezescu, A. M. (2018). Treatment strategies for infected wounds. *Molecules*, 23(9), 2392.
- Nussbaum, S. R., Carter, M. J., Fife, C. E., DaVanzo, J., Haught, R., Nusgart, M., & Cartwright, D. (2018). An economic evaluation of the impact, cost, and medicare policy implications of chronic nonhealing wounds. *Value in Health*, 21(1), 27—32.
- Patel, R. (2005). Biofilms and antimicrobial resistance. *Clinical Orthopaedics and Related Research*®, 437, 41—47.
- Pfalzgraff, A., Brandenburg, K., & Weindl, G. (2018). Antimicrobial peptides and their therapeutic potential for bacterial skin infections and wounds. *Frontiers in pharmacology*, 9, 281.
- Remschmidt, C., Schröder, C., Behnke, M., Gastmeier, P., Geffers, C., & Kramer, T. S. (2018). Continuous increase of vancomycin resistance in enterococci causing nosocomial infections in Germany—10 years of surveillance. *Antimicrobial Resistance & Infection Control*, 7(1), 1—7.
- Torumkunev, D., Bratus, E., Yuvko, O., Pertseva, T., & Morrissey, I. (2020). Results from the Survey of Antibiotic Resistance (SOAR) 2016-17 in Ukraine: data based on CLSI, EUCAST (dose-specific) and pharmacokinetic/pharmacodynamic (PK/PD) breakpoints. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 75(Supplement_1), i100—i111.
- Tsiouris, C. G., & Tsiouri, M. G. (2017). Human microflora, probiotics and wound healing. *Wound Medicine*, 19, 33—38.