

Клиническая медицина

УДК 616.98

DOI 10.52246/1606-8157_2021_26_4_20

МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ МИКРОФЛОРЫ МОКРОТЫ ПАЦИЕНТОВ С ВНЕБОЛЬНИЧНОЙ ПНЕВМОНИЕЙ, ВЫЗВАННОЙ ВИРУСОМ SARS-COV-2

И. В. Криворучко^{1*}, кандидат медицинских наук,

Л. А. Каширина²,

Ю. Г. Притулина¹, доктор медицинских наук

¹ ФГБОУ ВО «Воронежский государственный медицинский университет имени Н.Н. Бурденко» Минздрава России, 394036, Россия, г. Воронеж, ул. Студенческая, д. 10

² БУЗ Воронежской области «Воронежский областной клинический центр профилактики и борьбы со СПИД», 394065, Россия, г. Воронеж, просп. Патриотов, д. 296.

РЕЗЮМЕ Цель – изучение спектра микробного пейзажа нижних дыхательных путей и оценка антибиотикорезистентности микроорганизмов при внебольничных пневмониях, ассоциированных с SARS-CoV-2,

Материал и методы. Исследовалась неспецифическая микрофлора респираторного секрета нижних дыхательных путей пациентов с внебольничной пневмонией, вызванной идентифицированным вирусом SARS-CoV-2. Больные проходили стационарное лечение в ковидных госпиталях г. Воронежа и Воронежской области в период с ноября 2020 по апрель 2021 г. Идентификация микроорганизмов в мокроте проводилась методом масс-спектрометрии с использованием бактериологического анализатора, антибиотикочувствительность определялась аппаратным и диско-диффузионным методами.

Результаты и обсуждение. Установлено, что в спектре микроорганизмов мокроты доминировали грамотрицательные бактерии с преобладанием представителей семейства Enterobacterales (*K. pneumoniae*) и неферментирующих грамотрицательных бактерий (*Acinetobacter* spp.). Выявлен высокий уровень устойчивости бактерий семейства Enterobacterales к цефалоспорином III поколения и пенициллинам, *Klebsiella pneumoniae* также демонстрировала толерантность к цефалоспорином III поколения. Представители *Acinetobacter* проявили устойчивость к цефалоспорином I–IV поколений. Грамположительные бактерии характеризовались толерантностью к фторхинолонам II–III поколения, карбапенемам, пенициллиновой группе, цефалоспорином III поколения. В спектре микроорганизмов, выявленных из мокроты пациентов с пневмонией, вызванной Covid-19, в половине случаев идентифицированы дрожжеподобные грибы вида *Candida albicans* и *C. Glabrata*, которые были чувствительны к вориконазолу и флуконазолу.

Ключевые слова: внебольничная пневмония, SARS-CoV2, Covid-19, антибиотикорезистентность, антибактериальная чувствительность, штаммы бактерий.

* Ответственный за переписку (corresponding author): wid-na-more@mail.ru

Пандемия новой коронавирусной инфекции Covid-19 признана ВОЗ чрезвычайной ситуацией в области здравоохранения. Среди клинических вариантов течения данного заболевания выделяют пневмонию, нередко клиническая картина характеризуется развитием респираторного дистресс-синдрома с высокой вероятностью гибели пациента [1]. Известно, что микробные комбинации нижних дыхательных путей оказывают влияние на прогрессирование интерстициальных поражений легких [2]. Бактериальные осложнения развиваются при Covid-19 не столь часто, однако их роль является ведущей при развитии тяжелых

форм заболевания, что существенно осложняет терапию и негативно влияет на прогноз. Представляет интерес исследование микробного пейзажа мокроты пациентов с Covid-19-пневмонией, что в перспективе позволит применять адекватный терапевтический подход к лечению внебольничной пневмонии, ассоциированной с SARS-CoV-2.

Целью исследования явилось изучение спектра микробного пейзажа нижних дыхательных путей и оценка антибиотикорезистентности микроорганизмов при внебольничных пневмониях, ассоциированных с SARS-CoV-2.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Исследование проведено на базе БУЗ Воронежской области «Воронежский областной клинический центр профилактики и борьбы со СПИД», БУЗ Воронежской области «Борисоглебская РБ» и БУЗ Воронежской области «Павловская РБ». В исследование включено 757 пациентов с подтвержденным диагнозом внебольничной пневмонии различной тяжести, ассоциированных с SARS-CoV-2. Больные проходили лечение в стационарах за период с ноября 2020 по апрель 2021 г.

Исследование мокроты осуществляли в лаборатории бактериологических исследований БУЗ Воронежской области «Воронежский областной клинический центр профилактики и борьбы со СПИД». Лабораторное исследование биологического материала, а также его отбор и транспортировка проводились в соответствии с требованиями законодательства РФ по работе с возбудителями инфекционных заболеваний человека I-II групп патогенности (СП 3.1.3597-20, МР 4.2.0114-16, МУК 4.2.3115-13).

Идентификация микроорганизмов проводилась методом масс-спектрометрии с использованием анализатора бактериологического VITEK MS-масс-спектрометр (MALDI-TOF) («BioMérieux», Франция). Антибиотикочувствительность определялась аппаратным (использовался анализатор VITEK 2 Compact («BioMérieux», Франция)) и диско-диффузионным (на питательной среде Мюллер-Хинтон («CONDA», Испания) методами).

Результаты анализировались в соответствии с Клиническими рекомендациями «Определение чувствительности микроорганизмов к антимикробным препаратам» Версия – 2018-03 (обновление наборов для ДДМ проведено 09.01.2020).

У штаммов бактерии рода *Enterococcus* (22 шт.) проводилась интерпретация данных антибиотикограммы при использовании дисков с ампициллином, тобрамицином, амоксициллин/клавулановой кислотой, ципрофлоксацином, левофлоксацином, имипенемом, меропенемом, гентамицином. Определялась устойчивость бактерий рода *Streptococcus* spp. (11 культур) к ампициллину, амоксициллин/клавулановой кислоте, цефотаксиму, цефазолину, цефепиму, цефтазидиму, клиндамицину левофлоксацину, тобрамицину. Оценивалась чувствительность *Staphylococcus* (86 штаммов) к ципрофлоксацину, левофлоксацину, гентамицину, клиндамицину, тобрамицину, имипенему, меропенему, цефазолину, цефепиму, цефтазидиму, цефокситину, амикацину.

Интерпретировалась зона задержки роста бактерий семейства *Enterobacteriaceae* (139 культур микроорганизмов) и штаммов неферментирующих грамотрицательных бактерий – 53 шт. под воздействием ампициллина, амоксициллин/клавулановой кислоты, амикацина, ципрофлоксацина, меропенема, имипенема, цефотаксима, цефепима, цефтазидима.

Статистическая обработка данных осуществлялась с использованием программного обеспечения IBM SPSS Statistics v. 22, предназначенного для научных работ.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В ходе проведенного бактериологического исследования респираторного секрета, полученного от больных с положительными тестами на ПНК SARS-CoV-2, выделено и изучено 757 штаммов микроорганизмов.

Всего в мокроте идентифицировано 45 видов микроорганизмов, структура которых представлена в *таблице 1*, при этом многие штаммы были единичными.

В наблюдаемый период основными этиологическим патогенами, выделенными из мокроты пациентов с пневмонией, вызванной SARS-CoV-2, были представители семейства *Enterobacterales*, которым принадлежит 18,4 % от всего количества выделенных из мокроты культур. Нужно отметить, что наиболее часто встречались следующие виды энтеробактерий: *K. Pneumoniae* (5,94 %), *E. coli* (3,7 %), *E. faecalis* (2,4 %), *Enterobacter cloacae* (1,59 %), *Enterobacter hormaechei* (1,32 %).

Из неферментирующих грамотрицательных бактерий лидирующие позиции занимали штаммы *Pseudomonas* – 29 (3,84 %) проб (из них: *Ps. Aeruginosus* – 23 (3,04 %), остальные виды выявлены в единичных случаях) и *Acinetobacter* spp. – 24 (3,16 %)

Дрожжеподобные грибы рода *Candida* идентифицированы в мокроте в 56,2 % случаев, из них 358 проб (47,3 %) относятся к виду *Candida albicans*, *Candida glabrata* выявлена у 47 пациентов (6,21 %).

Род *Staphylococcus* представлен видами *Staphylococcus aureus* (3,9 %), *St. Haemolyticus* (3,4 %), *St. Hominis* (1,6 %), остальные виды микроорганизмов представлены единичными штаммами.

Представители рода *Streptococcus* выделены в 11 (1,44 %) пробах, из них вид *St. vestibularis* – в 0,79%, остальные виды были в виде единичных штаммов.

Таблица 1. Спектр микроорганизмов, идентифицированных в респираторном секрете у пациентов с внебольничной пневмонией, вызванной вирусом SARS-CoV-2

Наименование микроорганизма	Число больных		Наименование микроорганизма	Число больных	
	абс	%		абс	%
Staphylococcus aureus	30	3,9	Acinetobacter baumannii	11	1,45
St. haemolyticus	26	3,4	Acinetobacter johnsonii	2	0,26
St. epidermidis	5	0,67	Acinetobacter pitii	3	0,4
St. hominis	12	1,59	Acinetobacter junii	6	0,79
St. warneri	2	0,26	Acinetobacter iwoffii	2	0,26
St. agalactiae	6	0,79	Moraxella catarrhalis	3	0,4
St. capitis	2	0,26	Stenotrophomonas maltophilia	7	0,92
St. vitulinus	3	0,39	Corynebacterium xerosis	5	0,67
Streptococcus anginosus	3	0,39	Candida albicans	358	47,3
St. mitis	2	0,26	Candida krusei	6	0,79
St. vestibularis	6	0,79	Candida tropicalis	7	0,92
E. coli	28	3,7	Candida kefyr	4	0,53
E. faecalis	18	2,4	Candida glabrata	47	6,21
E. faecium	4	0,53	Candida dublinensis	5	0,67
Citrobacter freundii	4	0,53	Candida famata	3	0,4
Citrobacter braakii	2	0,26	Aspergillus spp.	4	0,53
Citrobacter koseri	4	0,53	Saccharomyces cerevisiae	3	0,4
Citrobacter youngae	2	0,26	Haemophilus parainfluenzae	9	1,19
Klebsiella pneumoniae	45	5,94	Haemophilus haemolyticus	4	0,53
Klebsiella oxytoca	10	1,32	Serratia marcescens	3	0,4
Enterobacter cloacae	12	1,59	Serratia liquefaciens	5	0,67
Enterobacter hormaechei	10	1,32	Pseudomonas aeruginosa	23	3,04
			Pseudomonas putida	3	0,4
			Pseudomonas fluorescens	3	0,4

Полученные данные по антибиотикорезистентности грамположительных и грамотрицательных изолятов бактерий в зависимости от вида антимикробного препарата представлены в *таблицах 2, 3*.

Установлена устойчивость к пенициллинам, а также к цефалоспорином III поколения представителей семейства Enterobacteriales, однако отмечается их высокая чувствительность к цефалоспорином IV поколения. Штаммы грамотрицательного микроорганизма *Klebsiella pneumoniae* демонстрируют толерантность к цефалоспорином, особенно к цефтазидиму, у изолятов *Klebsiella oxytoca* также выявлена устойчивость к цефалоспорином I–IV поколений, при этом отмечена восприимчивость к карбапенемам. Изоляты *Acinetobacter* показали чувствительность к меропенему и имипенему, в то время как выявлена тотальная резистентность к цефалоспорином I–IV поколений.

Спектр бактерий *Streptococcus* spp. представляют штаммы *S. anginosus*, *S. mitis*, *S. vestibularis*, которые демонстрировали значительную резистентность к цефалоспорином III поколения и препаратам пенициллинового ряда. Бактерии рода *Staphylococcus* (*S. aureus*, *S. haemolyticus*, *S. hominis*, *S. Agalactiae*) были толерантны к карбапенемам, пенициллиновой группе, цефалоспорином III поколения, фторхинолоном III поколения. Представители рода *Enterococcus*, в основном это *E. faecalis*, демонстрировали высокую резистентность к фторхинолоном II–III поколения и абсолютную толерантность к карбапенемам.

Дрожжеподобные грибы рода *Candida* идентифицированы в мокроте в 56,2 % случаев, из них 358 (47,3 %) проб относятся к виду *Candida albicans*, вид *Candida glabrata* встречается в 47 (6,21 %) случаях, остальные грибы представлены *C. tropicalis* – 7 (0,92 %) проб, *C. krusei* – 6 (0,79 %), *C. kefyr* выделены у 4 (0,53 %) пациентов, *C. dublinensis* – у 5 (0,67 %),

Таблица 2. Антибиотикорезистентность грамотрицательных штаммов, выделенных из респираторного секрета пациентов с внебольничной пневмонией, вызванной вирусом SARS-CoV-2

Антимикробные препараты	Число случаев, %			
	<i>Acinetobacter spp.</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Семейство <i>Enterobacterales</i>	Неферментирующие грамотрицательные бактерии
Амикацин	35,6	26,4	38,3	48,4
Гентамицин	37,5	12,6	44,2	29,2
Тобрамицин	89,3	7,2	33,4	64,3
Ампициллин	–	–	56,5	–
Ципрофлоксацин	100	27,3	52,4	75,3
Меропенем	38,6	14,6	13,4	78,6
Имипенем	34,2	18,5	15,7	73,4
Цефазолин	100	92,3	39,4	82,4
Цефепим	100	87,6	24,2	72,1
Цефтазидим	–	97,2	36,4	36,2
Цефотаксим	–	56,3	45,6	–
Амоксициллин / клавулановая кислота	–	74,6	68,7	–

S. faecalis – у 3 (0,4 %). Указанные микроорганизмы в 90 % случаев демонстрировали чувствительность к вориконазолу и в 93 % – к флуконазолу.

Таким образом, анализ спектра микробной флоры, исследованной в мокроте пациентов с внебольничной пневмонией, вызванной новой коронавирусной инфекцией Covid-19, показал, что в респираторном секрете преобладали грамотрицательные бактерии: преобладали семейство *Enterobacterales* (*K. pneumoniae*) и не-

ферментирующие грамотрицательные бактерии (*Acinetobacter spp.*). Бактерии семейства *Enterobacterales* характеризуются высоким уровнем резистентности к цефалоспорином III поколения и пенициллинам, при этом чувствительность к цефалоспорином IV была весьма высокой. Штаммы *Klebsiella pneumoniae* демонстрируют толерантность к цефалоспорином III поколения, в то же время *Klebsiella oxytoca* весьма устойчивы к цефалоспорином I–IV поколений, однако к карбапенемам данные возбудители восприимчивы.

Таблица 3. Антибиотикорезистентность грамположительных штаммов, выделенных из респираторного секрета пациентов с внебольничной пневмонией, вызванной вирусом SARS-CoV-2

Антимикробные препараты	Число случаев, %		
	<i>Enterococcus spp</i>	<i>Streptococcus spp.</i>	<i>Staphylococcus spp</i>
Амикацин	–	–	5,8
Гентамицин	65,2	–	38,4
Тобрамицин	22,3	18,4	28,4
Ампициллин	72	73,6	–
Ципрофлоксацин	83	–	38
Левифлоксацин	76	16,5	52,2
Меропенем	100	–	45,3
Имипенем	100	–	51,3
Цефазолин	–	12,4	15,3
Цефокситин	–	–	67,4
Цефепим	–	14,3	12,7
Цефтазидим	–	38,5	54
Цефотаксим	–	39,2	–
Клиндамицин	–	15,7	26,3
Амоксициллин /клавулановая кислота	72,3	76,4	68,5

Представители *Acinetobacter* проявили резистентность к цефалоспорином I–IV поколений, но регистрировалась чувствительность к имипенему и меропенему.

Грамположительные бактерии характеризуются значительной толерантностью к фторхинолонам II–III поколения, карбапенемам, пенициллиновой группе, цефалоспорином III поколения.

В спектре микроорганизмов, выявленных в биологическом материале из нижних дыхательных путей пациентов с пневмонией, вызванной вирусом SARS-CoV-2, в половине случаев идентифицированы дрожжеподобные грибы рода *Candida* (наиболее часто выявлялись вид *Candida albicans* и *Candida glabrata*). Указанные микроорганизмы в подавляющем большинстве случаев демонстрировали чувствительность к вориконазолу и флуконазолу.

Проведение идентификации патогенов в респираторном секрете позволяет корректировать терапевтический подход к лечению внебольничной пневмонии, ассоциированной с SARS-CoV-2, и разрабатывать тактику эпидемиологического надзора в условиях пандемии, вызванной новой коронавирусной инфекцией Covid-19.

ЛИТЕРАТУРА

1. Стулова М.В., Кудряшева И.А., Полуин О.С., Черенова Л.П., Аршба Т.Е., Лисина О.А., Казакова Е.А. Сравнительный клинико-лабораторный анализ Covid-19 ассоциированной пневмонии с внебольничной пневмонией бактериальной этиологии. *Современные проблемы науки и образования*. 2020;3:134.
2. Похиленко В.Д. Как микробиом легких борется с бактериальной и вирусной инфекцией. *Чебоксары*. 2020:68.

MICROBIOLOGICAL EXAMINATION OF SPUTUM MICROFLORA IN PATIENTS WITH COMMUNITY-ACQUIRED PNEUMONIA WHICH WAS CAUSED BY SARS-CoV-2 VIRUS

I. V. Krivoruchko, L. A. Kashirina, Yu. G. Pritulina

ABSTRACT Objective – to study the microflora spectrum of low respiratory passages and to estimate antibiotic resistance of microorganisms in community-acquired pneumonia which is associated with SARS-CoV-2.

Material and methods. Nonspecific microflora of respiratory secret of low respiratory passages was examined in patients with community-acquired pneumonia which was caused by identified virus SARS-CoV-2. Patients were treated in COVID hospitals in the city of Voronezh within the period from November 2020 to April 2021. The identification of microorganisms in the sputum was performed by mass spectrometry with bacteriological analyzer; antibiotic sensitivity was determined by hardware and discodiffuse methods.

Results and discussion. It was defined that gram-negative bacteria dominated in sputum microflora spectrum with prevalence of representatives of bacterial family Enterobacterales (*K. pneumoniae*) and non-fermenting gram-negative bacteria (*Acinetobacter*spp.). High resistance level of bacterial family Enterobacterales to cephalosporins of the III generation and to penicillins was revealed, *Kebsiellapneumoniae* also demonstrated tolerance to cephalosporins of the III generation. Representatives of *Acinetobacter* showed tolerance to cephalosporins of the I–IV generations. Gram-positive bacteria were characterized by tolerance to fluoroquinolones of the II–III generations, carbapenems, penicillin group, cephalosporins of the III generation. In the spectrum of microorganisms which were revealed from the sputum in patients with pneumonia which was caused by Covid-19, *Candidaalbicans* and *C. Glabrata* yeast-like fungus were identified in 50% cases, and they were sensitive to voriconazole and to fluconazole.

Key words: community-acquired pneumonia, SARS-CoV2, Covid-19, antibiotic resistance, antibacterial sensitivity, bacterial strains.