

DOI: 10.31393/reports-vnmedical-2018-22(2)-21

УДК:615.33-084:616.24-002-053.34

ПРОБЛЕМА ЕФЕКТИВНОСТІ АНТИБІОТИКОПРОФІЛАКТИКИ ВЕНТИЛЯТОР-АСОЦІЙОВАНИХ ПНЕВМОНІЙ У НОВОНАРОДЖЕНИХ

Фоміна Н.С.¹, Арцибасова І.А.², Прокопчук З.М.¹, Трофіменко Ю.Ю.¹

¹Вінницький національний медичний університет ім. М. І. Пирогова (вул. Пирогова, 56, м. Вінниця, 21018),

²Вінницька обласна дитяча клінічна лікарня (Хмельницьке шосе, 108, м. Вінниця, Україна, 21000)

Відповідальний за листування:
e-mail: fomina.vnmu@gmail.com

Статтю отримано 23 квітня 2018 р.; прийнято до друку 14 травня 2018 р.

Анотація. Наявність ендотрахеальної інтубаційної трубки (ЕІТ) в дихальних шляхах є фактором, що сприяє розвитку ВАП. Вагомим чинником у патогенезі вентилятор-асоційованих інфекцій нижніх дихальних шляхів є формування біоплівки на ЕІТ. Метою було дослідження біологічних властивостей мікрофлори ендотрахеальних трубок новонароджених, визначення чутливості планктонних та плівкових форм мікроорганізмів до антибіотиків. Обстежено 18 інтубаційних трубок. Лідерами серед контамінантів були грамнегативні бактерії (77%). *K. pneumoniae* виділяли з трубок 36% новонароджених, *E. cloacae* з 23%. У 9% випадків поверхні ЕІТ колонізували псевдомонади та стенотрофомонади, які були нечутливими до карбапенемів, рифампіцину, цефалоспоринів III та IV поколінь. *P. aeruginosa* не виявили чутливості до цефоперазон/сульбактаму, фторхінолонів. До поліміксину були чутливі 100% штамів псевдомонад. Стенотрофомонади у 100% випадків були чутливими до фторхінолонів. Чутливість *K. pneumoniae* до карбапенемів та цефоперазон/сульбактаму була на рівні 50-58%. Штами *E. cloacae* проявили 100% чутливість до карбапенемів, до захищених цефалоспоринів чутливість була на рівні 83%. Цефепім, меропенем, амікацин не елімінують у повній мірі життєздатних клітин стенотрофомонад, клебсієл та ентеробактерій із біоплівок навіть при підтриманні такої концентрації протягом 4-х діб. Не виявлено лише життєздатних клітин у плівках псевдомонад, що понад добу перебували у розчині амікацину. Низький рівень чутливості мікроорганізмів, які колонізують ендотрахеальні трубки, до більшості сучасних антибіотиків, складність впливу на плівкові форми бактерій спонукає до проведення комплексних широкомасштабних досліджень і внесення на основі їх результатів змін у протоколи лікування та профілактики інфекцій.

Ключові слова: біоплівки, антибіотики, інтубаційні трубки, мікрофлора.

Вступ

Інфекції, пов'язані з наданням медичної допомоги (ІПМД), визнані глобальною проблемою, яка існує у всіх країнах. Вентилятор-асоційована пневмонія (ВАП) за даними національної системи контролю за нозокоміальними інфекціями (National Nosocomial Infections Surveillance, США) є другою за частотою причиною внутрішньолікарняного інфікування дітей у ВІТ США [1, 2]. Наявність ендотрахеальної інтубаційної трубки (ЕІТ) для респіраторної підтримки пацієнтів, є головним фактором, що сприяє розвитку інфекційних ускладнень з подальшим розвитком ВАП.

Спектр мікроорганізмів, що колонізують поверхні інтубаційних трубок є досить різноманітним. В перші дні від початку ШВЛ у більшості пацієнтів домінуючими мікроорганізмами ЕІТ є представники аутофлори. В подальшому ЕІТ колонізуються госпітальною мікрофлорою. Відсутність сформованого власного мікробіоценозу ротової порожнини та верхніх дихальних шляхів у новонароджених, які потребують респіраторної підтримки, сприяє швидкій колонізації ЕІТ госпітальними штамми. Додатковими факторами щодо розвитку ВАП є морфофункціональна незрілість новонароджених, наявність перинатальної патології, вроджених вад розвитку, тощо.

Вагомим чинником у патогенезі вентилятор-асоційованих інфекцій нижніх дихальних шляхів є формування біоплівки на поверхні ендотрахеальної трубки,

яка виконує роль постійного джерела контамінованих мікроорганізмами альвеолярних емболів. У біоплівці за рахунок високої щільності розташування бактерій ефективніше реалізується механізм quorum sensing бактерій, що обумовлює продукцію додаткових чинників вірулентності і інтенсивний вихід бактерій за межі біоплівки у прилеглі анатомічні ділянки. Характерною властивістю всіх біоплівок - це стійкість до фізичних, хімічних впливів та антибіотиків. Глікокалікс ускладнює проникнення в біоплівку антибіотиків, тому для знищення бактерій у біоплівці потрібна у 10-100 разів вища концентрація антибіотика, ніж для знищення вільних бактерій.

Метою роботи було дослідження біологічних властивостей мікрофлори ендотрахеальних трубок у відділенні анестезіології та інтенсивної терапії новонароджених, визначення чутливості планктонних та плівкових форм мікроорганізмів до антибіотиків.

Матеріали та методи

Було обстежено 18 інтубаційних трубок, які були забрані починаючи з кінця 1-ої доби від початку респіраторної підтримки дітей, які знаходились на штучній вентиляції легень у відділенні анестезіології та реанімації новонароджених Вінницької обласної клінічної лікарні. Визначення характеру мікробної контамінації дихальних трубок проводили шляхом посіву сегмента

на щільне поживне середовище шляхом його прокатування по поверхні поживного середовища. Висіви виконували на кров'яний м'ясо-пептонний агар (МПА) та середовище Сабу-ро. Ідентифікацію мікроорганізмів проводили з урахуванням морфологічних, тінкторіальних, культуральних та біохімічних властивостей. Біохімічні властивості ентеробактерій та неферментуючих грамнегативних бактерій визначали за допомогою тест-систем ЕНТЕРОтест-24 та НЕФЕРМ-тест24.

Чутливість планктонних форм виділених штамів мікроорганізмів до антибіотиків вивчали методом стандартних паперових дисків (ДДМ), мінімальні бактеріостатичні (МБСК) та бактерицидні (МБЦК) концентрації препаратів визначали методом послідовних серійних розведень антибіотиків у рідкому поживному середовищі.

У процесі визначення чутливості плівкових форм бактерій до антибіотиків, з метою створення моделі бактеріальної плівки на поверхні інтубаційної трубки стерильні фрагменти останніх довжиною 0,5 см занурювали у м'ясо-пептонний бульйон (МПБ), інокулювали однією з досліджуваних культур, термостатували протягом 3-х діб. Для визначення впливу антибіотиків на біоплівку, одержані вищевказаним способом зразки, переносили у пробірки з розчином антибіотика у ізотонічному розчині хлориду натрію. Концентрації антибіотиків, які використовували для дослідів, відповідають максимальним концентраціям даних препаратів в крові пацієнтів через 2 години після введення. Через 2, 6, 24, 48, 72, 96 годин перебування тест-об'єктів у розчині антибіотика один зразок переносили у стерильний МПБ і інкубували у термостаті. Ефективність впливу антибіотиків на плівкову форму бактерій оцінювали по тривалості експозиції, необхідної для повної елімінації життєздатних мікроорганізмів із плівки.

Результати. Обговорення

Згідно даних системи інфекційного контролю в неонатальних відділеннях інтенсивної терапії (спостереження 2009-2013 рр.), частота контамінації поверхонь інтубаційних трубок грампозитивними мікроорганізмами серед новонароджених, яким проводилась ШВЛ, достовірно зменшилась, проте частота виявлення грамнегативної флори суттєво не змінилась. Ці дані корелюють з результатами, отриманими в ході нашого дослідження. Так, грампозитивні бактерії контамінували поверхню ендотрахеальних трубок лише у 18% ви-

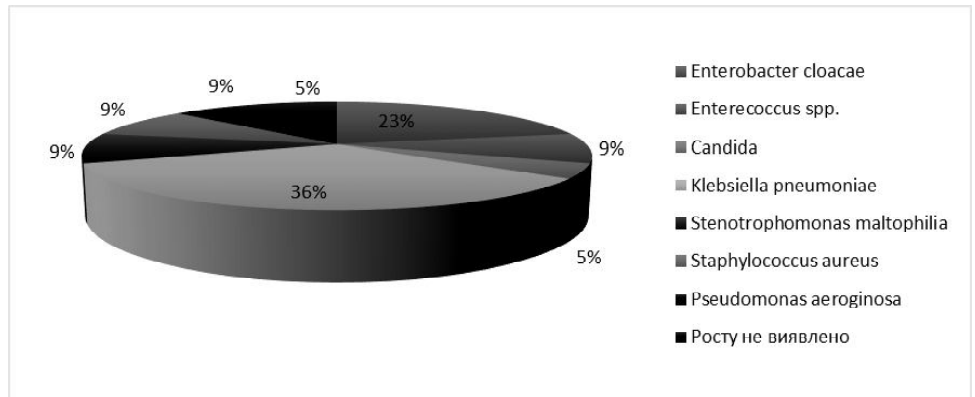


Рис. 1. Питома вага окремих груп мікроорганізмів, виділених з поверхонь ендотрахеальних трубок новонароджених

падків, і були ідентифіковані як *S.aureus* і *Enterococcus spp.* Лідерами серед контамінантів поверхонь інтубаційних трубок виявились грамнегативні бактерії, яких виділили у 77% випадків. Одержані результати ілюструє рисунок 1.

Цікавим є те, що серед виділених мікроорганізмів безперечними лідерами були представники роду *Klebsiella*, які виділяли з трубок 36% новонароджених. На другому місці по частоті виділення були *E.cloacae* (23% випадків). З числа неферментуючих паличок в рівній кількості поверхні інтубаційних трубок колонізували псевдомонади та стенотрофомонади. Дані мікроорганізми виділяли у 9% випадків. Усі виділені штами характеризувалися полірезистентністю до антибіотиків. Отримані дані щодо чутливості грамнегативних мікроорганізмів представлені на рисунку 2.

Найвищим ступенем резистентності до антибіотиків характеризувалися псевдомонади та стенотрофомонади. Так, дані мікроорганізми були нечутливими до карбапенемів, рифампіцину, цефалоспоринов III та IV поколінь. Жоден штам *P.aeruginosa* не виявив чутливості до захищеного цефалоспоринов III покоління цефоперазон/сульбактаму. Абсолютну стійкість бактерії цього виду виявляли і до фторхінолонів. Стенотрофомонади у 100% випадків були чутливими до левофлоксацину та ципрофлоксацину, до цефоперазон/сульбактаму чутливість виявили 25% виділених штамів.

Необхідно зазначити високий ступінь чутливості *P.aeruginosa* до поліміксину та амікацину (100%). Ефективність поліміксину щодо стенотрофомонад становила 75%, до амікацину *S.maltophilia* були резистентними.

Чутливість штамів *K.pneumoniae* до карбапенемів була на рівні 50-58%. Цефоперазон/сульбактам виявляв активність щодо кожного другого штаму клебсіел. Найвищим (67%) показник чутливості у клебсіел був до поліміксину.

Штами *E.cloacae* проявили 100% чутливість до іміпенему та меропенему, до захищених цефалоспоринов чутливість була на рівні 83%. Поліміксин виявив активність щодо 67% ізолятів цього виду.

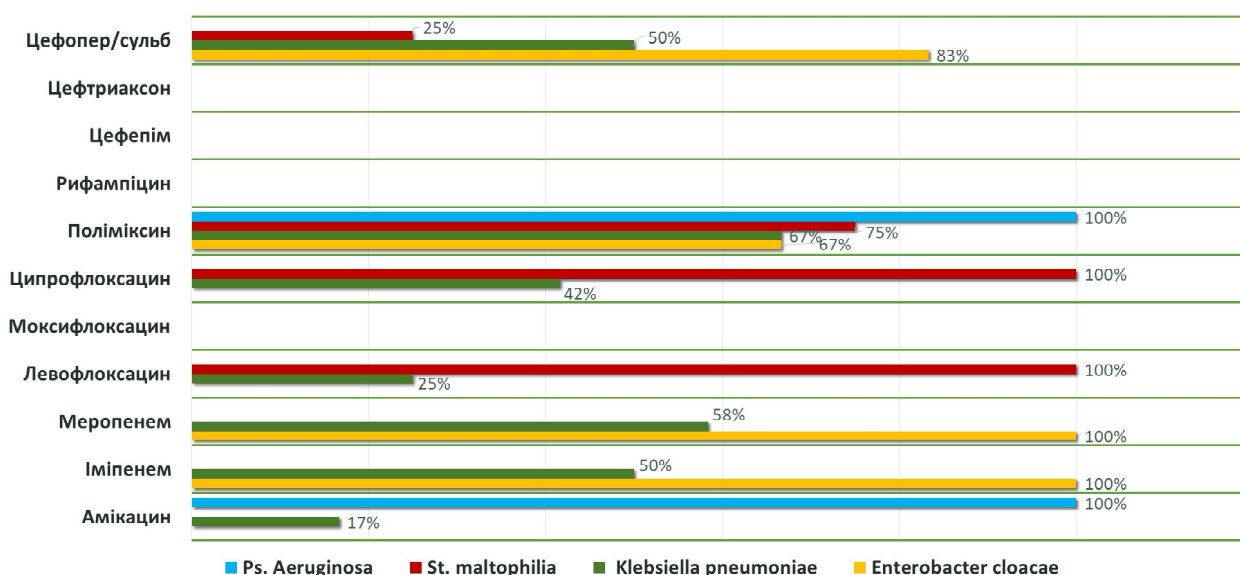


Рис. 2. Чутливість до антибіотиків виділених штамів грамнегативних мікроорганізмів (% чутливих штамів).

При дослідження поверхонь інтубаційних трубок новонароджених було виділено всього 2 штами *S.aureus*. Проте, стійкість виділених ізолятів до оксациліну, цефокситину, захищених пеніцилінів дозволила віднести виділені штами до метицилінрезистентних (MRSA), присутність яких в госпітальному середовищі є несприятливою епідеміологічною ознакою.

Практичні лікарі обираючи препарати для антибіотикопрофілактики інфекційних ускладнень ШВЛ керуються стандартними протокольними схемами, і, в кращому випадку, антибіотикограмою, визначеною ДДМ. Показовими є результати порівняння результатів чутливості виділених штамів бактерій до антибіотиків ДДМ і кількісних характеристик чутливості, визначених методом серійних розведень препаратів у рідкому поживному середовищі щодо планктонних форм бактерій.

Штами псевдомонад, які за результатами ДДМ були чутливими до амікацину, мали МБСК цього препарату 7,8 мкг/мл. При цьому МБЦК амікацину для тих самих штамів сягала понад 500 мкг/мл. Для *S.maltophilia* МБСК амікацину складала 156,25 мкг/мл. Проте, повної загибелі бактерій цього виду не відбувалось навіть у присутності 2500 мкг/мл препарату.

Препаратами вибору у лікуванні інфекцій, обумовлених MRSA, є ванкоміцин і лінезолід. Тому, цікаво було визначити показники чутливості виділених у нашому дослідженні штамів стафілококів до цих препаратів. До ванкоміцину було встановлено досить високий рівень чутливості. Так, МБСК даного препарату для стафілококів була на рівні 1,17-2,34 мкг/мл, МБЦК становила 75 мкг/мл. При цьому слід звернути увагу на великий розрив (більш ніж у 30 разів) між двома показниками. МБСК лінезоліду теж свідчила про високий рівень антистафілококової активності препарату. Од-

нак бактерицидного ефекту не спостерігали, навіть, у присутності 1000 мкг препарату у мл поживного середовища.

Таким чином, результати ДДМ визначення чутливості мікроорганізмів до антибіотиків далеко не завжди дозволяють об'єктивно прогнозувати клінічну ефективність препаратів. Особливо важко передбачуваними є результати впливу антибіотиків на бактеріальні клітини, інкорпоровані у біоплівку, утворену на по-

Таблиця 1. Характеристика активності антибіотиків щодо плівкових форм мікроорганізмів.

Вид мікроорганізму	Антибіотик	Час експозиції					
		2 год.	6 год.	24 год.	48 год.	72 год.	96 год.
<i>P.aeruginosa</i>	амікацин	+	+	-	-	-	-
	цефепім	+	+	+	+	+	+
	меропенем	+	+	+	+	+	+
<i>S.maltophilia</i>	амікацин	+	+	+	+	+	+
	цефепім	+	+	+	+	+	+
	меропенем	+	+	+	+	+	+
<i>K.pneumoniae</i>	амікацин	+	+	+	+	+	+
	цефепім	+	+	+	+	+	+
	меропенем	+	+	+	+	+	+
<i>E.cloacae</i>	амікацин	+	+	+	+	+	+
	цефепім	+	+	+	+	+	+
	меропенем	+	+	+	+	+	+
<i>S.aureus 22a</i>	ванкоміцин	+	+	+	+	-	-
	лінезолід	+	+	+	+	+	+
<i>S.aureus 25a</i>	ванкоміцин	+	+	+	-	-	-
	лінезолід	+	+	+	+	+	+

Примітки: "+" - наявність росту; "-" - відсутність росту.

верхні ЕІТ.

Для визначення ефективності впливу антибіотиків на плівкові форми грамнегативних бактерій використовували препарати, що найчастіше застосовують у відділеннях реанімації та інтенсивної терапії з профілактичною метою: меропенем у концентрації 75 мг/мл, амікацин (50 мг/мл), цефепім (50 мг/мл). Для вивчення ефективності знищення стафілококів у біоплівці обрали ванкомицин у концентрації 60 мг/мл та лінезолід (15 мг/мл). Наведені нижче результати (табл. 1) дозволяють, у певній мірі, зрозуміти причини низької ефективності антибіотикопрофілактики ВАП у процесі тривалої ШВЛ.

Як свідчать наведені у таблиці 1 дані, цефепім, меропенем, амікацин у максимальних концентраціях, що можуть бути створені у сироватці крові пацієнта, не елімінують у повній мірі життєздатних клітин стенотрофомонад, клебсіел та ентеробактерій із біоплівок навіть при підтриманні такої концентрації протягом 4-х діб. Не виявлено лише життєздатних клітин у плівках псевдомонад, що понад добу перебували у розчині амікацину.

Результати дослідження впливу антибіотиків на біоплівку золотистих стафілококів підтвердили низьку ефективність лінезоліду. Натомість, ванкомицин, який показав свою дієвість на штами *S. aureus* і у дослідженнях методом послідовних серійних розведень, знищував плівкові форми стафілококів у клінічно досяжних концентраціях при експозиції дії 48 годин.

Зрозумілим є те, що наведені вище дані не дають можливості сформулювати рекомендації з антибіотикопрофілактики ВАП та потребують подальших досліджень. Низький рівень чутливості мікроорганізмів, які колонізують елементи дихального контуру при ШВЛ,

до більшості сучасних антибіотиків, складність впливу на плівкові форми бактерій спонукає до проведення комплексних широкомасштабних досліджень і внесення на основі їх результатів змін у протоколи лікування та профілактики інфекцій, що ускладнюють надання допомоги важкохворим новонародженим.

Висновки та перспективи подальших розробок

1. Провідна роль у колонізації поверхонь ЕІТ у відділенні анестезіології та інтенсивної терапії новонароджених належить грам-негативній мікрофлорі (77% випадків). Лідерами по частоті виявлені є *K. pneumoniae*, які виділяли з трубок у 36% новонароджених, у 23% випадків поверхню ЕІТ колонізували представники роду *Enterobacter*. Грампозитивні мікроорганізми виділяли з 18% обстежених інтубаційних трубок.

2. Виділені з ЕІТ пацієнтів відділення реанімації новонароджених штами мікроорганізмів володіють полірезистентністю до більшості сучасних широковживаних антибактеріальних засобів та препаратів резерву.

3. Використані у дослідженнях антибіотики в клінічно досяжних концентраціях не здатні чинити згубний вплив на плівкові форми більшості бактерій, що колонізують ЕІТ.

У перспективі необхідні широкомасштабні дослідження ефективності антибіотикопрофілактики ВАП у пацієнтів, що потребують респіраторної підтримки, та розробка на основі їх результатів чітких практичних рекомендацій. Підтримка ефективності подібних рекомендацій повинна ґрунтуватись на результатах безперервного мікробіологічного моніторингу.

Список посилань - References

1. Brady, M. T. & Polin, R. A. (2013). Prevention and Management of Infants With Suspected or Proven Neonatal Sepsis. *Pediatrics*, 1 (132), 166-168. doi: 10.1542/peds.2013-1310.
2. Choudhury, A. M., Nargis, S., Mollah, A. H., Kabir, L. M. & Sarkar, R. N. (2010). Determination of risk factors of neonatal pneumonia. *Mymensingh Med. J.*, 19 (3), 323-329. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20639820>.

Фомина Н. С., Арцибасова И. А. Прокопчук З. М., Трофименко Ю. Ю

ПРОБЛЕМА ЭФФЕКТИВНОСТИ АНТИБИОТИКОПРОФИЛАКТИКИ ВЕНТИЛЯТОР-АССОЦИИРОВАННЫХ ПНЕВМОНИЙ У НОВОРОЖДЕННЫХ

Аннотация. Наличие эндотрахеальной интубационной трубки (ЭИТ) в дыхательных путях является фактором, способствующим развитию ВАП. Весомым фактором в патогенезе вентилятор-ассоциированных инфекций нижних дыхательных путей является формирование биопленки на поверхности ЭИТ. Целью было исследование биологических свойств микрофлоры эндотрахеальных трубок новорожденных, определение чувствительности планктонных и пленочных форм микроорганизмов к антибиотикам. Обследовано 18 интубационных трубок. Лидерами среди контаминантов были грамотрицательные бактерии (77%). *K. pneumoniae* выделяли из трубок 36% новорожденных, *E. cloacae* из 23%. В 9% случаев поверхности ЭИТ колонизировали псевдомонады и стенотрофомонады, которые были нечувствительными к карбапенемам, рифампицину, цефалоспорином III и IV поколений. *P. aeruginosa* не проявил чувствительности к цефоперазон/сульбактаму, фторхинолонам. К полимиксину были чувствительны 100% штаммов *P. aeruginosa*. Стенотрофомонады в 100% случаев были чувствительными к фторхинолонам. Чувствительность *K. pneumoniae* к карбапенемам и цефоперазон/сульбактаму была на уровне 50-58%. Штаммы *E. cloacae* в 100% были чувствительны к карбапенемам, к защищенным цефалоспорином чувствительность была на уровне 83%. Цефепим, меропенем, амикацин не элиминируют в полной мере жизнеспособные клетки стенотрофомонад, клебсиелл и энтеробактерий с биопленок даже при поддержании такой концентрации в течение 4-х суток. Не выявлены только жизнеспособные клетки в пленках псевдомонад, которые более суток находились в растворе амикацина. Низкий уровень чувствительности микроорганизмов, которые колонизируют эндотрахеальные

трубки, к большинству современных антибиотиков, сложность влияния на пленочные формы бактерий побуждает к проведению комплексных широкомасштабных исследований и внесение на основе их результатов изменений в протоколы лечения и профилактики инфекций.

Ключевые слова: биопленки, антибиотики, интубационные трубки, микрофлора.

Fomina N. S., Artsybasova I. A., Prokopchuk Z. M., Trofimenko Yu. Yu.

PROBLEM OF EFFICIENCY OF ANTIBIOTIC PROPHYLAXIS VENTILATOR-ASSOCIATED PNEUMONIA IN NEWBORNS

Annotation. The presence of the endotracheal intubation tube (EIT) in the respiratory tract is a factor contributing to the development of the VAP. The formation of biofilms on the surface of the EIT is a significant factor in the pathogenesis of ventilator-associated infections of the lower respiratory tract. The purpose was to study the biological properties of the microflora of the endotracheal tubes of newborns, determining the sensitivity of planktonic and film forms of microorganisms to antibiotics. 18 intubation tubes were examined. Gram-negative bacteria (77%) were the leaders among contaminants. From tubes of newborns there were isolated *K.pneumoniae* isolated (36%), *E.cloacae* (23%). The surface of the intubation in 9% of cases tubes was colonized *Pseudomonas* and *Stenotrophomonas*, were insensitive to carbapenems, rifampicin, cephalosporins III and IV generations. *P. aeruginosa* has not shown sensitivity to cefoperazone/sulbactam, fluoroquinolones. There were sensitive 100% of strains *P.aeruginosa* to polymyxin. *Stenotrophomonas* were sensitive to fluoroquinolones in 100% of cases. Sensitivity of the *K.pneumoniae* to carbapenems and cefoperazone/sulbactam was determined in 50-58% of strains. *E.cloacae* strains demonstrated sensitivity to carbapenems in 100% of cases, and sensitivity to protected cephalosporins was 83%. Cefepim, meropenem, amikacin do not completely eliminate the viable cells of *Stenotrophomonas*, *Klebsiella* and *Enterobacter* cells from the biofilms, even under the maintenance of such a concentration during 4 days. Only viable cells of *Pseudomonas* in biofilms that were present in the solution of amikacin for more than a twenty-four hours were not detected. The low level of sensitivity of microorganisms colonizing endotracheal tubes to the majority of modern antibiotics and the complexity of exposure to biofilm forms of bacteria lead to complex large-scale studies and the introduction, based on their results, of protocols for treatment and prevention of infections.

Keywords: biofilms, antibiotics, intubation tubes, microflora.
